

Aus der

Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik
Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und
Verbrennungschirurgie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

**Auswirkung von Remote Ischemic Conditioning (RIC) auf
die Größe von Hypoxiearealen und Immunantwort im B16-
OVA-murinen Melanommodell**

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

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

vorgelegt von

Rachunek-Medved, Katarzyna Malgorzata, geb. Rachunek

2024

Dekan: Professor Dr. B.Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J.Kolbenschlag

2. Berichterstatter: Professorin Dr. L.Quintanilla Martinez de Fend

Tag der Disputation: 30.04.2024

Für Martin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	16
1. Einleitung.....	19
A. Hypoxie und Hallmarks of cancer	20
a) Genominstabilität und Mutationen	21
b) Resistenz gegen antiproliferative Signale und Unabhängigkeit von exogenen Wachstumssignalen	22
c) Umgehung der Apoptose	23
d) Angiogenese/Vaskularisation	25
e) Dysregulation des Zellmetabolismus	28
f) Epigenetische Reprogrammierung	28
g) Unbegrenztetes Teilungsvermögen	31
h) Metastasierung	31
i) Einfluss der Hypoxie auf die Anti-Tumor Immunantwort	34
j) Senescente Zellen	35
k) Auswirkung von Hypoxie auf die onkologische Therapie	37
B. Remote ischemic Conditioning (RIC)	38
C. Fragestellung und Hypothesen	40
2. Material und Methoden	42
A. Modell	43
B. Zellkulturen	44
C. Versuchs- und Kontrollgruppen.....	45
a) Haltung	46
b) Überwachung des Gesundheitszustands der Tiere	47
i. Tumorlast.....	47
ii. Konkrete, versuchsbedingt erforderliche Abbruchkriterien (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1. d TierSchVersV)	48

D. Durchführung des Experiments.....	48
a) Vorbereitung der Zellsuspension für die subkutane Implantation	49
b) Implantation der Melanomzellen und Ohrlochmarkierung.....	50
c) Enthaarung	51
d) Narkose und Einleiten eines Versuchs	52
e) Platzierung von Elektroden und O2C-Messung	53
f) Remote Ischemic Conditioning bei angewachsenem Melanom.....	58
g) Vorbereitung der Gewebe und Serum Proben.....	59
E. Bio-Plex Multiplex Immunoassay	59
F. Histopathologische Untersuchung der Proben.....	66
a) Nekrose	66
b) Hypoxie.....	67
c) Infiltration durch T-Zellen	67
d) Infiltration durch Regulatorische T-Zellen (Treg) (Suppressor-T-Zellen)...	68
G. Statistische Analyse.....	68
3. Ergebnisse.....	70
A. Studienpopulation	70
B. Mikrozirkulationsmessungen mit O2C.....	70
a) Vergleich der Perfusionsparameter der RIC- und Kontrollgruppe während der Ausgangsmessung (Baseline).....	71
b) Analyse der Perfusionsparameter in der Kontrollgruppe (Vergleich der Baseline- und Abschlussphasen, Einfluss der Isoflurannarkose)	73
c) Analyse der Perfusionsparameter in der RIC-Gruppe (direkter Vergleich der Baseline- und Abschlussphase)	76
d) Vergleich der Perfusionsparameter der RIC- und Kontrollgruppe während der Abschlussphase (letzte Reperfusionphase).....	77
e) Vergleich der Unterschiede (delta = Differenz zwischen den Abschluss- und Baselinewerten) der folgenden Perfusionsparameter zwischen der RIC- und Kontrollgruppe	80
f) Mikrozirkulation des Tumors im Verhältnis zum normalen Gewebe	83
i. Ausgangsmessung (Baseline).....	83
ii. Abschlussphase (letzte Reperfusionphase).....	84

g)	Auswirkung des RICs auf normales Gewebe - Ratio Sauerstoffsättigung zu relativem Hämoglobingehalt	85
C.	Histologische Analyse	85
D.	Nekrose	86
E.	Histopathologische Analyse der Hypoxie	89
a)	Pimonidazol-Färbung.....	90
b)	CAIX-Färbung.....	90
c)	Intraindividuellem Unterschied zwischen der Pimonidazol- und CAIX-Färbung	92
d)	Hypoxische Scores im Verhältnis zum vitalen Tumorgewebe*	94
i.	Pimonidazol*.....	94
ii.	CAIX*.....	95
iii.	Unterschied zwischen Pimonidazol* und CAIX Score* im Verhältnis zum vitalen Tumorgewebe	96
e)	Histopathologische Analyse der Immuninfiltration	97
i.	Infiltration durch CD3-positive Zellen.....	97
ii.	Infiltration durch regulatorische T (Treg)-Zellen.....	101
F.	Multiplex-Immunoassay	107
G.	Korrelationen im Hinblick auf gesamte Immuninfiltration mit CD3 positiven T-Zellen	110
a)	Perfusionsparameter	110
b)	Immuninfiltration	111
c)	Vergleiche der vereinfachten Nekrosentypen	112
d)	Korrelationen im Hinblick auf Immuninfiltration mit FoxP3-positiven Treg-Zellen.....	113
H.	Zusammenfassung der Ergebnisse	115
a)	Fazit Mikrozirkulationsmessungen.....	116
b)	Fazit histologische und immunhistochemische Untersuchung.....	117
c)	Fazit Multiplex Immunoassay	118
4.	Diskussion	119
A.	Einfluss von Isoflurannarkose auf die Perfusionsparameter in der Kontrollgruppe.....	119

B. Einfluss des RIC auf die Perfusionsparameter unter Berücksichtigung der Wirkung der Isoflurannarkose	122
C. Interpretation der Ergebnisse im Kontext der bisherigen Erkenntnisse über RIC.....	123
D. Immunmodulation im Tumorgewebe infolge der RIC-Intervention	128
E. Serologische Änderungen infolge der RIC-Applikation	132
a) Interleukin 17	132
b) Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	136
F. RIC im Kontext der Radiotherapie	141
5. Zusammenfassung	143
6. Literaturverzeichnis	145
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	168
8. Anhang.....	170
Anhang A. Score Sheet zur Kontrolle der Belastung der Tiere und Definition der Abbruchkriterien:.....	170
Anhang B. Dosierung der Medikamente während des Versuchs	173
Anhang C. Body Conditioning (BC) Scoring für Beurteilung des Ernährungszustandes der Tiere, modifiziert nach Ullman-Culleré & Foltz, 1999	174
Anhang D. Gesichtsausdruck der Mäuse als Anhaltspunkt für Schmerzen	175
Anhang E. Protokoll-Nr. 771: DAB Map CC1std 6h, D1.anti rabbit (28.10.2019) Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT	176
Anhang F. Protokoll-Nr. 991: OmniUltraMapCC1Std6h D5 Mouse on Mouse (28.10.2019) Prozedur: Res IHC Omni-UltraMap HRP XT	180
9. Danksagung.....	184

Abkürzungsverzeichnis

A2aR- und A2bR	Adenosin Rezeptoren 2a und 2b
ACT	Adaptive Zelltransfertherapien
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	Eng. Activation-induced cell death, ein programmierter durch die Interaktion von Fas-Rezeptoren (Fas, CD95) und Fas-Liganden (FasL, CD95-Ligand) verursachter Zelltod
a-KG	Alpha-Ketoglutarat (a-KG)
Akt	Proteinkinase B
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1, Apoptose-auslösender Faktor-1
Apc	Adenomatous-polyposis-coli-Gen
ASOs	Antisense-Oligonukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
AU	arbitrary units
BAD	BCL2 associated agonist of cell death
BALB	„Bagg Albino“, ein albino, im Labor gezüchteter Stamm der Hausmaus
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 Protein
BMDCs	Bone marrow-derived cells
BNIP3	BCL2 Interacting Protein 3
BOLD	Blood-oxygen-level-dependent imaging
BRC	biseriale Rangkorrelation
CAIX	Carboanhydrase Isoform 9
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCL	Chemokine mit einer Sequenz von zwei benachbarten Cysteinen

CD25	Polypeptid-alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors
CD73	Oberflächenproteinmarker, Ecto-5'-Nukleotidase
c-fos	Menschlicher Homolog vom retroviralen Proto-onkogen v-fos (Finkel–Biskis–Jinkins murine osteogenic sarcoma virus)
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
CKB	Kreatinkinase, Gehirntyp
CO ₂	Kohlendioxid
CR	Vollremission
CRPS	Komplexes regionales Schmerzsyndrom
CSN8	Cop9 signalosome subunit 8
CTLA-4	Eng. cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
Cul2	Cullin-2
CXC	Chemokine, die die Sequenz Cystein-X-Cystein am C-Ende enthalten
CXCR4	chemokine receptor type 4, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
Cys-Asn-Gly-Arg-Cys	Cystein-Asparagin-Glycin-Arginin-Cystein-Peptid
DC	Dendritic cell/ Dendritische Zelle
DEC2	differentiated embryonic chondrocyte expressed gene 2
DFS	krankheitsfreie Überlebenszeit (disease free survival)
DANN	Desoxyribonukleinsäure
EDIM	Mouse rotavirus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. Epidermal Growth Factor)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMPHO	Erlangen Micro-lightguide Spectrophotometer

EMT	epithelial-mesenchymale Transition
EphA2	Erythropoietin -produzierender hepatozellulärer Rezeptor A2
ER	Östrogenrezeptor
EZH2	Eng. Enhancer of zeste homolog 2, funktionale enzymatische Komponente des PRC2 Komplexes
FAK	fokale Adhäsionskinase
Fas	Fas Cell Surface Death Receptor
FasL	Fas Cell Surface Death Ligand
FBS	fetal bovine serum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FR α	Folat-Rezeptor α
G	Gauge
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
GLUT1	Glukosetransporter 1
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
H&E	Hämatoxylin und Eosin
H3K27	Aminosäure Lysin (K) an Position 27 der Aminosäuresequenz des 3 Histons
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha
HPF	high power field
HR	Hazard Ratio
HRE	hypoxia response elements
HRE	Hypoxie-Antwortelement
i.p.	intraperitoneal

I/R	Ischämie und Reperfusion
IAP	Inhibitors of apoptosis protein
ICOS	Inducible T-cell Co-Stimulator
IFN	Interferone
IGF-1	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (eng. Insulin-like Growth Factor)
IGF-2	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 2 (eng. Insulin-like Growth Factor)
ICH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ILP	isolierte Gliedmaßenperfusion
ISCOMATRIX	immunstimulierende Komplexe und Matrix ohne Antigene
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KC	Keratinocyten-Chemoattraktant
KDM6A	H3K27Lysine Demethylase 6A
KDM6B	H3K27 Lysine Demethylase 6B
KG	Körpergewicht
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis virus
LDEV	Lactate dehydrogenase-elevating virus
LOX	Lysin-Oxidase
LOXL2, LOX4	LOX-ähnlichen Proteine 2 and 4
LY294002	chemischer Inhibitor von der Phosphoinositid-3-Kinase
MAB	monoclonal antibody (Monoklonaler Antikörper)
MAC	minimale alveoläre Konzentration
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MAV	Mouse adenovirus
Max.	Maximum
MCMV	Mouse cytomegalovirus (MCMV)
MCP-1	Monozyten-Chemoattraktant-Protein-1
MDA- 231	eine epitheliale, humane Brustkrebszelllinie, die aus einem Pleuraerguss einer 51-jährigen kaukasischen Frau mit einem metastasierenden Brustdrüsenadenokarzinom etabliert wurde
MDCSs	Myeloid-derived suppressor cells/ Myeloide Suppressorzellen
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC-I	major histocompatibility complex class I
MHV	Mouse hepatitis virus
Min.	Minimum
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 alpha
MIP-1 β	Macrophage inflammatory protein 1 beta
MMPs	Matrix-Metalloproteinasen
MNV	Murine norovirus
MPV	Mouse parvovirus
MRI	Magnetic resonance imaging
mTOR	Eng. mammalian target of rapamycin
MVM	Minute virus of mice
MWU	Mann-Whitney-U Test
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Wasserstoff
NEC	Nekrotisierende Enterokolitis
NGR-TNF	Asparagin-Glycin-Arginin-Tumornekrosefaktor
Nix	proapoptotischer Gen geregelt durch Histotoxische Hypoxie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NMRI	Naval Medical Research Institute Maus Stamm
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NR2F1	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (non-small-cell lung cancer)
NY-ESO-1	New York esophageal squamous cell carcinoma-1
NY-ESO-1	New York esophageal squamous cell carcinoma-1 Antigen
OS	overall survival/ Gesamtüberleben
OT II	Tansgene Mäuse mit OVA-spezifischen CD4 T-Zellen mit der MHC-Klasse II
OVA	Ovalbumin
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen
PBC	punktbiseriale Korrelation
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, eng. phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDGF	Eng. Platelet-derived Growth Factor
PDH	Prolinhydroxylase
PDL1	Programmed death-ligand 1
PF4	Platelet factor 4
PFA	Posterior Fossa A
PGE2	Prostaglandin E2
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMT	Photovervielfacher
PMT	Standard Photomultiplier Tube
PP2A	Protein Phosphatase 2A

PR	Teilremission
PRC2	Eng. Polycomb Repressive Complex 2
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog
PVM	Pneumonia virus of mice
RANTES	Eng. regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (Chemokine)
RAU	relative absorbance units
Rbx1	RING-box protein 1
REO3	Reovirus 3
rHb	relative Hämoglobinmenge
RIC	Remote ischemic Conditioning
ROR γ t	retinoid-related orphan receptor gamma
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	<u>engl.</u> <i>revolutions per minute</i> ; „Umdrehungen pro Minute“
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.c.	subcutaneus/subkutan
SAM	S-Adenosylmethionin
SA-PE	Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat
SAPK	stress-activated phospho-kinase
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SO ₂ [%]	prozentuelle Sauerstoffsättigung des Hämoglobins
STD	Standard Abweichung
TEMRA	Terminally differentiated effector memory T cells
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TET	eng. ten-eleven translocation
TGF- β	Transforming growth factor- β
Th-Zellen	T-Helferzellen
TILs	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
TIM3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing Protein 3

TME	Tumor Microenvironment
TMEV	Theiler's murine encephalomyelitis virus
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1
TNFR2	Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ2
TNFRSF9	tumor necrosis factor receptor superfamily member 9
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
T-regs	Regulatorische T-Zellen
UICC-TNM	Union for International Cancer Control- TNM Classification of Malignant Tumors
VBC Komplex	VHL-Elongin B-Elongin C Komplex
VEGF	Eng. Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR1	Eng. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
VHL-Gen	Von-Hippel-Lindau Gen
VM	vaskulogenische Mimikry
WHO	World Health Organization
WNT	„Wnt“ setzt sich zusammen aus Wg für Wingless und Int-1-Gen
xMAP	x = analyte, MAP = Multi-Analyte Profiling
ZEB1	Eng. Zinc finger E-box-binding homeobox 1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: „Hallmarks of cancer“	19
Abbildung 2: Funktion und Signalwege des VHL-Proteins im normalen Gewebe und im Fall einer VHL-Mutation im klarzelligen Nierenkarzinom. ...	22
Abbildung 3: Physiologische Mechanismen der Angiogenese und pathologische Mechanismen der Tumovaskularisation.....	27
Abbildung 4: Nichtmutationale epigenetische Reprogrammierung in PFA Ependymomzellen durch Acetylierung der Histone.....	30
Abbildung 5: M Power Analyse für den Vergleich zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen mittels G*Power Applikation	46
Abbildung 6: Messung des Tumordurchmessers bei einer Versuchsmaus, 10 Tage nach der Implantation von B16-OVA-Zellen in die rechte Flanke.	51
Abbildung 7: Detaillierte Messung des Tumordurchmessers während des Versuchs bei einer narkotisierten Maus.	52
Abbildung 8: Lokalisation des Tumors vor Platzierung der Sonden (A.), Positionierung der Sonden auf dem Tumor und auf dem rechten nicht-ischämischen Hinterlauf der Maus (B.).....	55
Abbildung 9: Position der Maus sowie Darstellung der Messapparatur während der Baselinephase.	56
Abbildung 10: Erzeugung einer Ischämie mittels Low-pressure Tourniquet während der RIC Phase mit einer Kraft von 0,6 N.	57
Abbildung 11: Prinzipien des Bio-Plex Immunoassays.....	63
Abbildung 12: Schritte eines Bio-Plex Protokolls (alle Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis beschrieben).....	65
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Werte der Perfusionsparameter	74
Abbildung 14: Darstellung der Flow-Werte [AU] in der Abschlussphase.	79
Abbildung 15: Darstellung der Sauerstoffsättigung [%] in der Abschlussphase. ...	79
Abbildung 16: Darstellung des relativen Hämoglobingehalts [AU] in der Abschlussphase.	80

Abbildung 17: Der Box-plot zeigt einen Anstieg der Perfusionsparameter	81
Abbildung 18: Verteilung verschiedener Nekrosetypen, die in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung in der RIC- und Kontrollgruppe beobachtet werden.	88
Abbildung 19: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Tumorproben einer Kontrollgruppe (A) und einer RIC-Gruppe (B).	89
Abbildung 20: Pimonidazol-Färbung (A.) und schematische Darstellung (B.) der unterschiedlich oxygenierten Zellen im Verhältnis zum Blutgefäß. 90	
Abbildung 21: CAIX-Färbung (A.) und schematische Darstellung (B.) der unterschiedlich oxygenierten Zellen im Verhältnis zum Blutgefäß. 91	
Abbildung 22: Hypoxie-Beurteilung in Tumorproben der Kontroll- und RIC-Gruppe	93
Abbildung 23: Die Box-plots zeigen ein Verhältnis des akuten Hypoxieausmaßes zum vitalen Tumorgewebe für die Pimonidazol-Färbung mit Vergleich der RIC- und Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,67$).	94
Abbildung 24: Die Box-plots zeigen ein Verhältnis des chronischen Hypoxieausmaßes zum vitalen Tumorgewebe für die CAIX-Färbung mit Vergleich der RIC- und Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,82$).	96
Abbildung 25: Die Box-plots zeigen den Vergleich der Differenz zwischen CAIX- und Pimonidazol-Score im Verhältnis zum vitalen Tumorgewebe zwischen der RIC- und der Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,42$).	97
Abbildung 26: Negative (A.) und positive Kontrolle (B) für die CD3 Färbung	98
Abbildung 27: CD3-Immunhistochemie der Tumorproben, dargestellt unter 300-facher Vergrößerung; CD3-positive Zellen sind an einer braunen Färbung und kleinen Zellkernen zu erkennen.	99
Abbildung 28: Die Box-plots zeigen den Vergleich der Anzahl der CD3-positiver Zellen	100
Abbildung 29: Die Box-plots zeigen den Vergleich der Immuninfiltration mit den CD3-positiven Zellen (analysiert mit semiquantitativem Score) in der	

Tumorperipherie zwischen der RIC- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U Test, p = 0,67).	101
Abbildung 30: FoxP3-Immunhistochemie der Tumorproben	104
Abbildung 31: Darstellung der Immuninfiltration	105
Abbildung 32: Darstellung der Proportionen (Ratios)	106
Abbildung 33: Box plots der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von Interleukin-17 (IL-17) in der Kontroll- und RIC-Gruppe. Die MFI von IL-17 weist höhere Werte in der RIC- als in der Kontrollgruppe auf (Mann-Whitney-U-Test, p = 0,035).	107
Abbildung 34: Box-plots der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) in der Kontroll- und RIC-Gruppe.	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die geplanten Versuchs- und Kontrollgruppen inkl. Tierzahlen	45
Tabelle 2: Übersicht und Vergleich der gewählten Daten der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, STD (Standardabweichung), Minimum (Min), Medianwert und Maximum (Max), sowie p-Werte der statistischen Analyse (*Mann-Whitney-U Test)	71
Tabelle 3: Übersicht und Vergleich der Perfusionsparameter in der Baselinephase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Median und Maximum (Max) sowie p-Werte der statistischen Analyse (*Mann-Whitney-U Test).....	72
Tabelle 4: Übersicht der Perfusionsparameter	73
Tabelle 5: Übersicht der Perfusionsparameter	75
Tabelle 6: Übersicht der Perfusionsparameter	76
Tabelle 7: Übersicht der Perfusionsparameter	77
Tabelle 8: Übersicht und Vergleich der Perfusionsparameter aus der Abschlussphase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Maximum (Max), Medianwerte sowie p-Werte der statistischen Analyse (*Mann-Whitney-U Test	78
Tabelle 9: Übersicht und Vergleich der Delta-Werte (Abschlussphase - Baselinephase) der Perfusionsparameter.....	82
Tabelle 10: Übersicht und Vergleich der Ratios (Verhältnis der Perfusionsparameter des Tumorgewebes zur nicht-ischämischen Pfote) während der Baselinephase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Medianwert und Maximum (Max) sowie p-Werte des Mann-Whitney-U Tests.	84
Tabelle 11: Übersicht und Vergleich der Ratio (Verhältnis der Perfusionsparameter des Tumorgewebes zur nicht-ischämischen Pfote) während der Abschlussphase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert,	

	Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Medianwert und Maximum (Max), sowie p-Werte des Mann-Whitney-U Tests.	85
Tabelle 12:	Darstellung der histopathologischen Untersuchung der Tumorproben in der Kontroll (Ko.)- und RIC-Gruppe inklusive Identifikationsnummer (ID-Nr.) im Experiment mit ausgewählten Daten der untersuchten Tiere. Zwei RIC-Proben (11 und 12) werden für die Messung der Nekrosefläche nicht berücksichtigt, da die Proben teilweise fragmentiert sind. HPF: high power field,	87
Tabelle 13:	Übersicht der Infiltration mit CD3- und FoxP3-positiven Zellen im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie in der RIC- und Kontrollgruppe (Ko.), inklusive Identifikationsnummer (ID-Nr.) der Tiere im Experiment.....	103
Tabelle 14:	Übersicht und Vergleich der analysierten Zytokine mit Mittelwerten, Standardabweichung (STD), Median, minimalen und maximalen Werten der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von jedem Assay und dazugehörige p-Werte des Man-Whitney-U-Tests (MWU) in der Kontroll- und RIC-Gruppe.	109
Tabelle 15:	Übersicht der Korrelationen zwischen SpO ₂ Ratio Tumor/Pfote und Immuninfiltration mit T-Zellen (CD3) in der Tumorperipherie und im Tumorzentrum, mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gewählten Zytokine und Nekrosefläche mit dazugehörigen p-Werten der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient-Werten.....	111
Tabelle 16:	Übersicht der Korrelationen zwischen CD3 ⁺ -Immuninfiltration im Tumorzentrum und den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gewählten Zytokine, sowie Nekrosefläche mit dazugehörigen p-Werten der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient (Pearson)-Werten.	112
Tabelle 17:	Übersicht der Korrelationen zwischen CD3 ⁺ -Immuninfiltration in der Tumor-peripherie und mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gewählten Zytokine sowie Nekrosefläche mit dazugehörigen p-Werten	

der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient (Spearman)- Werten.	112
Tabelle 18: Übersicht der Korrelationen zwischen zwei Nekrosetypen (mit dominierenden und nicht-dominierenden Strängen) und CD3 ⁺ - Immuninfiltration im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie mit dazugehörigen p-Werten der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient-Werten.	113
Tabelle 19: Darstellung der Korrelationen der Immuninfiltration mit FoxP3-positiven Treg-(regulatorischen) Zellen im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie mit anderen untersuchten Parametern.	114
Tabelle 20: Darstellung der Korrelationen der FoxP3 ⁺ /CD3 ⁺ -Ratios im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie mit anderen untersuchten Parametern.	115

1. Einleitung

Basierend auf den Daten der Global Cancer Observatory (GLOBOCAN 2020) sind im Jahr 2020 etwa 19 Millionen Menschen neu an maligne Tumoren erkrankt und nahezu 10 Millionen aus diesem Grund verstorben (<https://gco.iarc.fr/> [Zugriff 19.06.2023]). Die World Health Organization (WHO) prognostiziert einen weiteren Anstieg von Neuerkrankungen im Jahr 2040 auf 30,2 Millionen mit einer daraus resultierenden Mortalität von 16,3 Millionen Menschen (<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1> [Zugriff 30.06.2023])

Krebs ist eine komplexe Erkrankung mit molekularer Entwicklung und Immundysfunktion. Eine Krebszelle ist eine Zelle, die alle notwendigen und auch pathologischen Änderungen adaptiert, um zu überleben – eine Eigenschaft, die sie von normalen Zellen grundlegend unterscheidet (Abb.1.)

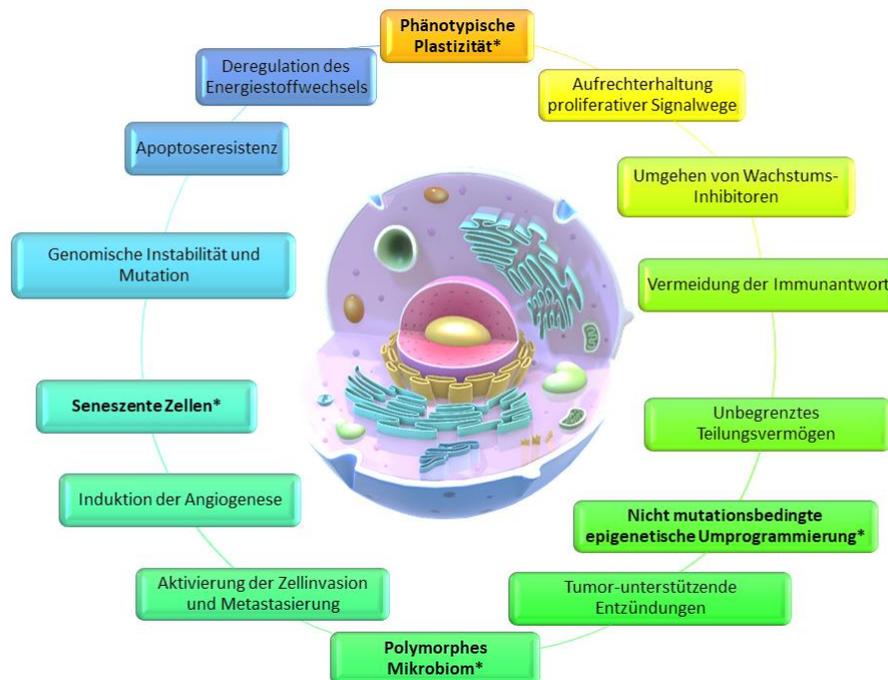


Abbildung 1: „Hallmarks of cancer“. Die Darstellung umfasst zusätzlich aufkommende Merkmale der Krebszellen, wie Entschlüsselung der phänotypischen Plastizität, nichtmutationale

epigenetische Reprogrammierung, polymorphe Mikrobiome und seneszente Zellen. In Anlehnung an Hanahan D. (2022)

Im Jahr 2000 charakterisierten Hanahan und Weinberg sechs grundlegende Merkmale („Hallmarks“) einer Tumorzelle, die sie bei ihrer Entwicklung hin zur Malignität erwirbt, diese wurden nach 22 Jahren von Hanahan und Douglas um weitere 8 Fähigkeiten ergänzt (Hanahan, 2022; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011) (Abb. 1.).

A. Hypoxie und Hallmarks of cancer

In ihrer bahnbrechenden Arbeit definierten Hannahan und Weinberg die kontinuierliche Angiogenese als eines der Markenzeichen von Krebszellen (Hanahan, 2022; Hanahan and Weinberg, 2000, 2011). Die Angiogenese ist aufgrund ihres grenzenlosen Replikationspotenzials und ihrer Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen von großer Bedeutung für das potenziell unbegrenzte Wachstum von Krebszellen. Aufgrund der hohen Proliferationsrate bei vielen Krebsarten wächst der Tumor jedoch oft weiter, ohne eine angemessene Gefäßversorgung zu gewährleisten, was unweigerlich zu hypoxischen Bereichen in seinem Inneren führt. Ein Sauerstoffentzug scheint aus therapeutischer Sicht auf den ersten Blick vorteilhaft zu sein und hat zur Entwicklung verschiedener anti-angiogener Strategien geführt, um den Tumor mit dem Ziel der Tumornekrose auszuhungern.

Zahlreiche Forschende haben jedoch gezeigt, dass Hypoxie in einem bösartigen Tumor zu einer bevorzugten Selektion hypermaligner Zellklone führt und gleichzeitig die therapeutische Wirkung von Radio- und Chemotherapie behindert. Diese Erkenntnisse gaben den Anstoß für den umgekehrten Ansatz der Gefäßnormalisierung (T. Yang et al., 2021). Er basiert auf der Idee, dass der primäre vaskuläre Zustand eines malignen soliden Tumors eine dysfunktionale vaskuläre Architektur besitzt, und dass die Wiederherstellung einer "physiologischeren" Vaskularisierung tatsächlich von Vorteil sein könnte, nicht für den Tumor, sondern für seine Behandlung. Ein

ungünstiger Einfluss der Hypoxie auf eine Tumorzelle und das Tumorenvironment manifestiert sich in mehreren der beschriebenen „Hallmarks of cancer“.

a) Genominstabilität und Mutationen

Aufgrund der aberranten Zellvermehrung haben die Krebszellen eine erhöhte Tendenz zu genomischen Veränderungen und Mutationen, die zur Schädigung mehrerer Gene beitragen. Die beschädigten Gene regulieren häufig die Zellteilung und Tumorsuppression. Manche dieser Gene, wie z. B. das VHL (Von-Hippel-Lindau) Gen, sind verbunden mit der Zelladaptation auf Hypoxie. Keimbahnmutationen des VHL-Gens (im Bereich von Chromosom 3, p25/26) liegen dem autosomal dominant vererbten Von Hippel-Lindau-Syndrom zugrunde (Kaelin, 2002; Kim and Kaelin, 2004). Das Hämangioblastom, das klarzellige Nierenzellkarzinom und das Phäochromozytom repräsentieren die häufigsten malignen Tumoren bei Patient*innen, die vom VHL-Syndrom betroffen sind. Somatische Mutationen des VHL-Gens sind auch sehr häufig in sporadisch auftretenden klarzelligen Nierenzellkarzinomen (80 %) zu finden (Gnarra et al., 1996). Ein Protein kodiert vom Tumor-Suppressor VHL Gen beinhaltet 213 Aminosäuren und funktioniert im Komplex (VBC) mit anderen Proteinen, nämlich mit Elonginen B und C und Co-Aktivatoren (Cul2 und Rbx1) als E3 Ubiquitin-Ligase (Abb. 2) (Hon et al., 2002). HIF-1 α wird, abhängig vom Sauerstoffangebot, durch O₂-abhängige Prolinhydroxylase modifiziert. Unter Normoxie bindet sich der VBC-Komplex zu Hydroxyprolin (Pro 564 in HIF-1) des HIF-1 α Proteins, wodurch HIF-1 α ubiquitiniert wird (Hon et al., 2002). In Folge der Ubiquitinierung wird HIF-1 α zum Proteasom transportiert und dort degradiert. Eine Fehlfunktion vom VHL-Protein im Knudson-Modell beeinträchtigt die Ubiquitinierung von HIF-1 α und führt zur Akkumulation von HIF 1 α bereits unter normoxischen Bedingungen. HIF-1 α wirkt weiter als Transkriptionsfaktor und aktiviert eine Reihe von Genen und Wachstumsfaktoren, die u. a. für die Entstehung der neuen Gefäße oder für eine metabolische Umstellung verantwortlich sind (Kaelin, 2002; Shweiki et al., 1992;

Zhang et al., 2007). Dies erklärt die sehr gute Vaskularisation von Tumoren mit mutiertem VHL-Gen.

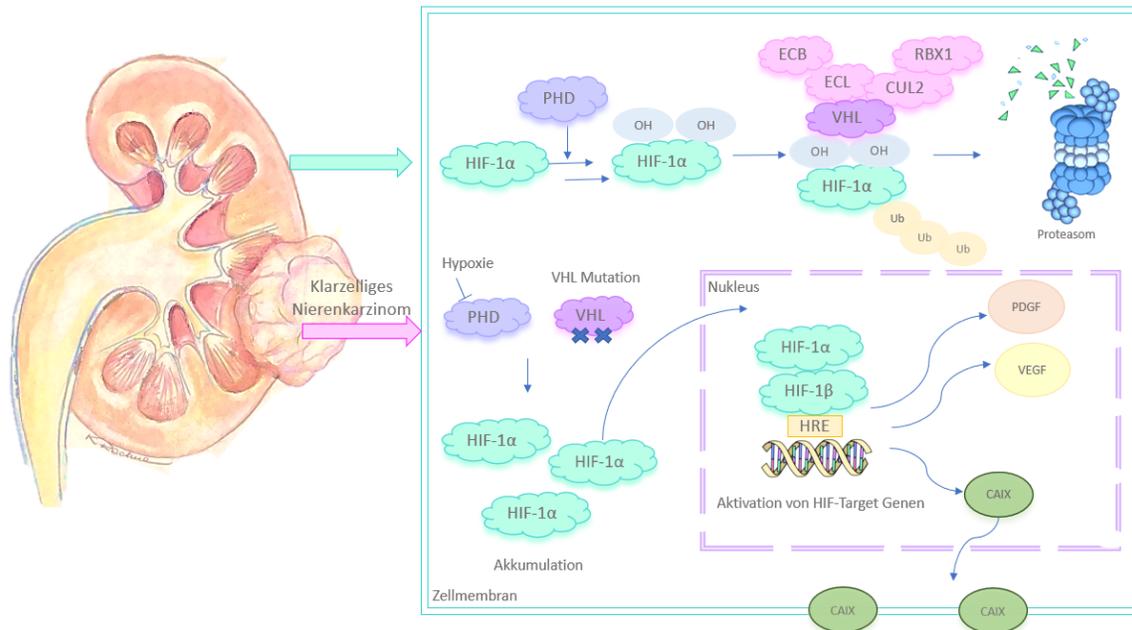


Abbildung 2: Funktion und Signalwege des VHL-Proteins im normalen Gewebe und im Fall einer VHL-Mutation im klarzelligem Nierenkarzinom.

Unter Normoxie kann die oxygenabhängige Prolinhydroxylase (PDH) zwei Hydroxylgruppen an HIF-1 α binden. Dadurch ist eine weitere Reaktion zwischen HIF-1 α und dem gesamten VBC-Komplex möglich. Der VBC-Komplex beinhaltet: VHL, Elongin B (ELB) und C (ELC) und Co-Aktivatoren (Cul2 und Rbx1) und wirkt als E3-Ubiquitin-Ligase. Unter Normoxie wird sodann HIF-1 α durch E3-Ubiquitin-Ligase ubiquitiniert und im Proteasom degradiert. Im Nierenzellkarzinom bestehen häufig VHL-Mutationen, welche eine VHL-Bindung zu HIF-1 α , die Bildung von VBC-Komplex und somit die Ubiquitinierung und Destruktion von HIF-1 α unmöglich machen. HIF-1 α akkumuliert und nach Dimerisation mit HIF-1 β bindet es sich an das Hypoxie-Response-Element (HRE) im Bereich der spezifischen Gene, z. B. CAIX, PDGF oder VEGF. Die Transkription dieser Gene wird nun durch HIF-1 α initiiert.

b) Resistenz gegen antiproliferative Signale und Unabhängigkeit von exogenen Wachstumssignalen

In einer hypoxischen Mikroumgebung können sich die Krebszellen unabhängig von exogenen mitogenen Wachstumssignalen vermehren. Dies gelingt durch eine Überexpression der mitogenen Wachstumsfaktoren der Krebszellen selbst oder durch

die konstitutive Aktivierung der Signaltransduktionswege stromabwärts des Rezeptors. Hypoxie kann die Expression von epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), Insulin, insulinähnlichem Wachstumsfaktor 2 (IGF-2) und Platelet-derived Wachstumsfaktor (PDGF) durch die Krebszelle fördern (Maxwell et al., 2001). Die konstitutive Aktivierung des Signalwegs der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K-Akt) tritt aufgrund der Amplifikation des PIK3C-Gens oder als Ergebnis von Mutationen in Komponenten des Signalwegs, z. B. des Phosphatase und Tensin Homologs (PTEN) auf, die die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) hemmen können. Die Aktivierung von Akt spielt jedoch eine zentrale Rolle bei grundlegenden zellulären Funktionen wie Zellproliferation und Überleben durch Phosphorylierung der verschiedenen Substrate (Osaki et al., 2004). Die Reinduktion von Wildtyp PTEN in einer Glioblastoma Zelllinie mit fehlendem PTEN schwächt die hypoxische Induktion der von HIF-1 α regulierten Gene und IGF-1 ab. Aus diesem Grund können die PTEN-Mutationen durch Stärkung der HIF-1 α -vermittelten Reaktionen ein Tumorwachstum verstärken (Zundel et al., 2000).

c) Umgehung der Apoptose

Die Mechanismen der Apoptose-Regulierung unter Hypoxie sind nicht vollständig bekannt. Hypoxie-bedingte Apoptose ist abhängig von einer Permeabilität der Mitochondrienmembran. HIF-1 α fördert die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien in das Zytoplasma, welches für die Aktivierung von Caspase-9 und ihrem Ko-Faktor: Apoptose-auslösender Faktor-1 (Apaf-1) notwendig ist (Soengas et al., 1999). Darüber hinaus aktiviert HIF-1 α das BCL2 Interacting Protein 3 (BNIP3) und das proapoptotische Gen geregelt durch histotoxische Hypoxie (NIX), welche zur Insertion in Organellenmembranen fähig sind und, unabhängig von der Freisetzung von Cytochrom C, den Zelltod durch Erhöhung der Permeabilität der mitochondrialen Membranen hervorrufen können (Field and Gordon, 2022).

Im Gegensatz zu normalen Zellen unterbrechen die Krebszellen ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Signalen unter Hypoxie und können dadurch

die Apoptose umgehen. Beispielweise werden die Zellen mit Hochregulation von Apoptose-Inhibitor 2 (IAP-2) gegen Apoptose unter hypoxischen Bedingungen resistent (Dong et al., 2001). Diese Überexpression von IAP-Proteinen wird durch Hypoxie an sich und nicht durch Adenosintriphosphat (ATP)-Depletion, HIF-1 α -Wirkung oder Zellschädigung verursacht. Eine hohe IAP-Expression wurde in Melanomen, Pankreas- und Lungenkarzinomen sowie in high-grade Non-Hodgkin Lymphomen nachgewiesen (Ambrosini et al., 1997; Vucic et al., 2000).

Ein weiterer Mechanismus der Apoptose-Umgehung in Krebszellen betrifft den PI3K/Akt Signalweg (Kilic-Eren et al., 2013). Der PI3K/Akt-Weg ist dafür bekannt, Überlebenssignale in Zellen zu vermitteln und ist konsekutiv in verschiedenen Malignomen, wie in Ovarial- und Magenkarzinomen, Glioblastomen sowie in Rhabdomyosarkomen (RMS) aktiviert (Kilic-Eren et al., 2013; Osaki et al., 2004). Akt ist insbesondere an der Hemmung der Apoptose beteiligt, indem es pro-apoptische Moleküle, z. B. Bcl-2-Antagonist of Cell Death (BAD) und Caspase-9, phosphoryliert. Die Inhibition der PI3K/Akt-Signalgebung durch LY294002 verringert signifikant die Proteinexpression sowie die DNA-Bindungsaktivität von HIF-1 α und reaktiviert die Apoptose unter Hypoxie in RMS und Ewing Sarkom-Zellen (Kilic-Eren et al., 2013).

Der Verlust des p53-Tumorsuppressor-Gens oder die Überexpression des Apoptose-Inhibitors: B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) Proteins kann den Hypoxie-induzierten Zelltod erheblich reduzieren (Shen & White, 2001). Graeber et al. zeigten, dass die stark apoptotischen Tumorareale mit Wildtyp p53 stark mit hypoxischen Regionen korrelierten, wohingegen in hypoxischen Regionen von p53-defizienten Tumoren weniger Apoptose auftrat (Graeber et al., 1996). Hypoxie bedingt in Tumoren somit einen physiologischen Selektionsdruck für die Expansion von Zellvarianten, die ihr apoptotisches Potenzial vor allem durch die p53-Mutationen verloren haben.

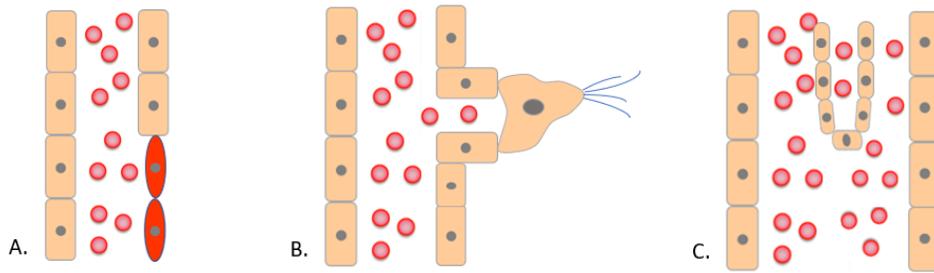
d) Angiogenese/Vaskularisation

Solide Tumoren neigen dazu, hypoxische Tumorareale auszubilden, da Vaskularisation und Angiogenese langsamer ablaufen als das Tumorwachstum selbst und die Tumorgefäße zudem u. a. häufig blind enden, erweitert sind oder eine aberrante Anatomie der Gefäßwand aufweisen (Graham & Unger, 2018; Nagy et al., 2009; Vaupel et al., 2004). Sauerstoffmoleküle können nur 100 -180 µm durch Gewebe diffundieren bevor sie vollständig metabolisiert sind, sodass Zellen mit größerer Entfernung zu Kapillaren hypoxisch werden (Koh et al., 2010). Die Zellen, die außerhalb des Diffusionslimits liegen, aktivieren den Transkriptionsfaktor HIF-1 α (Harris, 2002). HIF-1 α wirkt als Transkriptionsfaktor und aktiviert das Erythropoetin-Gen und eine Reihe weiterer Gene, u. a. Wachstumsfaktoren aus der Gruppe des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Kaelin, 2002; Shweiki et al., 1992). VEGF und PDGF- β wirken als potente Mitogene von Perizyten und Endothelzellen und fördern die Entstehung neuer Gefäße. HIF-1 α reguliert gleichzeitig die Gene der Multidrug Effluxpumpe hoch und trägt dadurch zur Resistenz gegen Chemotherapeutika bei. Die proangiogenen Stimuli dominieren ständig in der Tumorumgebung. Die Vaskularisation entsteht in Tumoren durch die drei gleichen Mechanismen wie im Normalgewebe, nämlich durch Neoangiogenese initiiert durch Vermehrung von sog. Tip-Zellen (die vordersten Zellen wachsender Blutgefäße), durch Vaskulogenese initiiert durch Progenitorzellen aus dem Knochenmark und letztlich durch Intussuszeption und Gefäßspaltung (engl. vessel splitting) (Abb.3) (Carmeliet and Jain, 2011). Die Tumoren haben allerdings zusätzlich weitere, pathologische und spezifische Mechanismen der Vaskularisation entwickelt. Die Gefäßkooption ist ein nicht-angiogener Mechanismus der Tumolvaskularisation, bei dem Krebszellen bereits vorhandene Blutgefäße nutzen, anstatt die Bildung neuer Blutgefäße zu induzieren (Kuczyński et al., 2019; Wechman et al., 2020).

Im Unterschied zur klassischen Tumorangiogenese stellt die vaskulogene Mimikry (VM) eine von Endothelzellen unabhängige Blutversorgung für Tumorzellen dar (Abb. 3. E., F.) (Wechman et al., 2020). Hier bilden die Tumorzellen direkt die Gefäßwand. Von VM gibt es zwei unterschiedliche Typen, den tubulären Typ und den

strukturierten Matrixtyp. Es gibt zudem mehrere potenzielle Mechanismen der VM-Bildung: Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und verschiedene Signalwege und Faktoren, die die VM-Bildung fördern, z. B. vaskuläres Endothel-Cadherin, Erythropoietin-produzierender hepatozellulärer Rezeptor A2 (EphA2), PI3K, Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 (VEGFR1), zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), fokale Adhäsionskinase (FAK) und HIF-1 α (Liu et al., 2016; Sun et al., 2017; Wechman et al., 2020).

Physiologische Mechanismen der Angiogenese



Physiologische Mechanismen der Tumervaskularisation

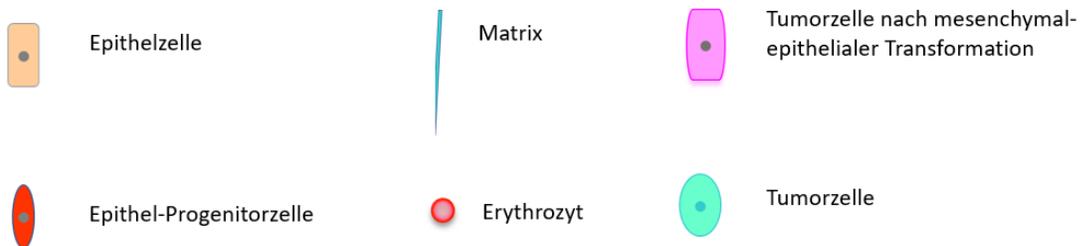
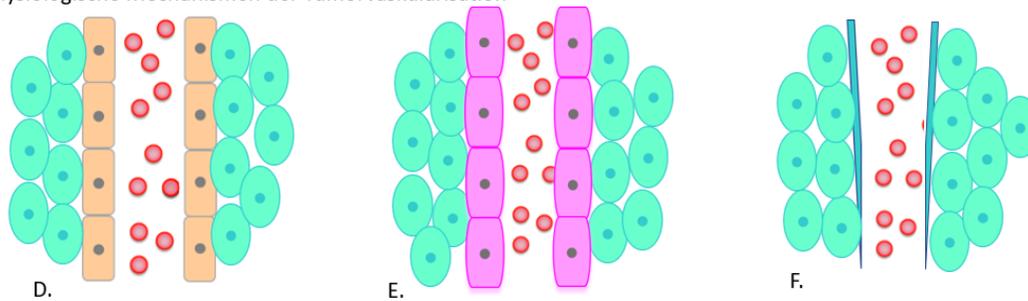


Abbildung 3: Physiologische Mechanismen der Angiogenese und pathologische Mechanismen der Tumervaskularisation.

Quelle: in Anlehnung an Luo Q. et al. (2020)

- A. Vaskulogenese initiiert durch Progenitorzellen aus dem Knochenmark
- B. Neovaskulogenese initiiert durch Vermehrung von sog. Tip-Zellen
- C. Vaskulogenese initiiert durch Intussuszeption und Gefäßspaltung (engl. Vessel splitting).
- D. Gefäßkooption (Infiltration der bereits existierenden Gefäße durch Tumorzellen)
- E. Vaskulogene Mimikry des tubulären Typs
- F. Vaskulogene Mimikry des strukturierten Matrixtyps

e) Dysregulation des Zellmetabolismus

Unter Normoxie erfolgt in normalen Zellen die ATP-Produktion durch oxydative Phosphorylierung und Elektronentransportkette. Der Krebs-Zyklus ist ebenfalls O₂-abhängig, weil die Co-Enzyme in diesem Prozess, wie z. B. das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD), durch die mitochondriale Elektronentransportkette entstehen. Um die Energie zu produzieren, aktivieren viele Tumorzellen jedoch einen O₂-unabhängigen Prozess der Glykolyse bereits unter Normoxie. Das Phänomen wurde von Otto Warburg im Jahr 1920 identifiziert und ist nach ihm benannt (Pascale et al., 2020). Da die Umstellung des Metabolismus der Tumorzellen bereits unter Normoxie stattfindet, wurde sie auch als Pseudohypoxie bezeichnet. HIF-1 α wird infolge einer echten Hypoxie produziert oder infolge einer VHL-Mutation abnormal angereichert (O₂-unabhängige Stabilisierung durch Behinderung der Ubiquitinierung) (Semenza, 2003). Zu den Zielgenen von HIF-1 α gehören u. a. jene für die Proteine der Glykolyse. Obwohl unter normalen Bedingungen energetisch im Vergleich zur oxydativen Phosphorylierung eher ungünstig, kann eine Glykolyse für die Tumorzelle vorteilhaft sein: Sie garantiert die Energieproduktion im Zytoplasma anstatt in den Mitochondrien, verursacht eine wesentlich niedrigere Produktion freier Radikale und erniedrigt den pH-Wert, was direkt die Zellmembran und die extrazelluläre Matrix beeinflussen und die Immunantwort schwächen kann (Heiden et al., 2009).

f) Epigenetische Reprogrammierung

Das Konzept der nicht-mutationsbedingten epigenetischen Regulierung der Genexpression ist natürlich als zentraler Mechanismus etabliert, der die embryonale Entwicklung, Differenzierung und Organogenese kontrolliert (Bitman-Lotan and Orian, 2021; Goldberg et al., 2007; Zeng and Chen, 2019). Verschiedene Beobachtungen deuten darauf hin, dass die abweichenden physikalischen Eigenschaften der Tumormikroumgebung verschiedene Veränderungen im Epigenom verursachen können. Ein gemeinsames Merkmal von Tumoren (oder Regionen innerhalb von Tumoren) ist Hypoxie als Folge einer unzureichenden Vaskularisierung. Hypoxie reduziert

beispielsweise die Aktivität der sog. Ten-eleven-translocation-(TET)-Demethylasen, was zu wesentlichen Veränderungen des Methyloms führt, insbesondere zu einer Hypermethylierung (Thienpont et al., 2016).

Ein überzeugender Nachweis des Einflusses der Hypoxie auf die epigenetische Reprogrammierung wurde von Michealraj et al. in sog. Posterior fossa A (PFA)-Ependymomen beschrieben (Michealraj et al., 2020). PFA-Ependymome sind histologisch definierte Tumoren, die im zentralen Nervensystem hauptsächlich bei Säuglingen und Kleinkindern auftreten und eine sehr schlechte Prognose aufweisen (Lin and Monje, 2020; Michealraj et al., 2020; Vladioiu et al., 2019). Die Herkunftszellen für PFA-Ependymome existieren in der humanen embryonalen Entwicklung nur sehr früh während des ersten Trimesters, wenn die Mikroumgebung des sich entwickelnden Hinterhirns stark hypoxisch ist (Michealraj et al., 2020; Vladioiu et al., 2019). Zuerst beobachteten die Autor*innen, dass PFA-Ependymomzellen unter hypoxischen Bedingungen eine erhöhte Expression von Inhibitoren des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) aufwiesen. Dieser Komplex ist verantwortlich für die Methylierung von Lysin an der 27. Position der Aminosäuresequenz des H3 Histones (H3K27) (Michealraj et al., 2020). Des Weiteren ist auch eine reduzierte Konzentration des PRC2-Substrates S-Adenosylmethionin (SAM) für die Histonmethylierung unter Hypoxie verringert. Die Konzentration von α -Ketoglutarat (α -KG), ein Co-Faktor für die H3K27-Demethylasen (KDM6A und KDM6B), war unter Hypoxie deutlich erhöht. Auch die Konzentration von Acetyl-CoA war bei Hypoxie höher, wodurch die Acetylierung von H3K27 gefördert und die Fähigkeit von Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) zur Methylierung von H3K27 blockiert war (Abb. 4) (Lin & Monje, 2020; Michealraj et al., 2020; Vladioiu et al., 2019).

Das Posterior fossa A Ependymom, ein tödlicher Hirntumor bei Kindern mit einem stillen Genom, ist abhängig von metabolischen Veränderungen, die mit Hypoxie zusammenhängen und die charakteristische epigenetische Dysregulation des Tumors vorantreiben.



↑ Hypoxie-assoziierte genetische Signatur
 ↓ H3K27 Methylierung
 ↑ H3K27 Acetylierung
 Veränderung des metabolischen Profils

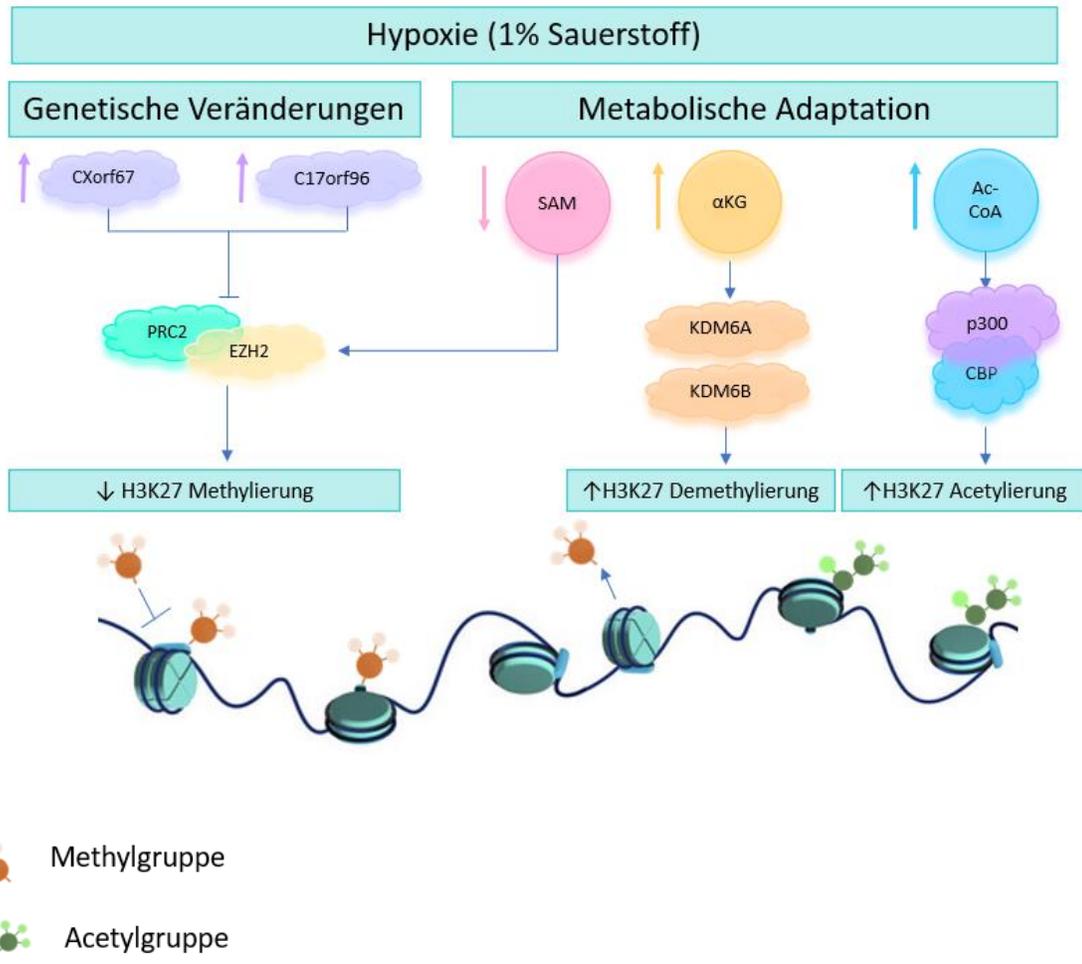


Abbildung 4: Nichtmutationale epigenetische Reprogrammierung in PFA Ependymomzellen durch Acetylierung der Histone.
 Erklärung im Text. Quelle: in Anlehnung an Lin et al. 2020.

g) Unbegrenztetes Teilungsvermögen

Keine der Krebszeleigenschaften ist jedoch so faszinierend und gleichzeitig so grundlegend für die Krebszellpathologie wie die unbegrenzte Fähigkeit zur Zellteilung. Im Jahr 1961 entdeckten Hayflick und Moorhead, dass die Lebensdauer der kultivierten normalen menschlichen Zelle begrenzt ist und interpretierten diese Beobachtung als Manifestation des menschlichen Alterns auf zellulärer Ebene (Hayflick and Moorhead, 1961). Harley et al. zeigten, dass die maximale Anzahl der Mitosen in normalen Zellen durch die Länge der sich mit jeder Teilung verkürzenden Telomere begrenzt ist (Harley et al., 1990). Die Telomerase wirkt diesem Verkürzungsprozess entgegen, indem sie neue Telomerasequenzen an die Chromosomenenden hinzufügt. Kim et al. wiesen die Aktivität der Telomerase in 90 von 101 Primärtumoren, aber nicht in normalem Gewebe nach (Kim et al., 1994). Seimiya et al. zeigten, dass die Aktivität der Telomerase in Krebszellen unter Hypoxie steigt und gleichzeitig mit der Aktivierung von mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK) and c-fos Expression korreliert (Seimiya et al., 1999). Die vorliegenden Forschungsergebnisse von Yatabe et al. legen nahe, dass Hypoxie die Telomerase über die Transkriptionsaktivierung von Telomerase Reverse Transkriptase (TERT) in Gebärmutterhalskrebszellen aktiviert und dass HIF-1 α eine entscheidende Rolle als Transkriptionsfaktor spielt (Yatabe et al., 2004). Die In-vitro-Studien am papillären Schilddrüsenkarzinom zeigten, dass HIF-1 α als transkriptioneller Aktivator der TERT wirkt und positiv mit dem malignen Verhalten der Krebszellen korreliert. Die Überexpression von TERT hemmt die mTOR- Kinaseaktivität (Ziel des Rapamycins im Säugetier), was zur Aktivierung der Autophagie führt. Funktionell bietet die TERT-induzierte Autophagie der Schilddrüsenkrebszellen einen Überlebensvorteil unter Hypoxie (Song et al., 2021).

h) Metastasierung

Die Metastasierung ist verantwortlich für 90 % der mit einer Krebserkrankung assoziierten Mortalität (Chaffer and Weinberg, 2011). Eine Überexpression von HIF-1 α

in den Proben von Brustkrebspatientinnen korreliert laut mehreren Studien mit einer erhöhten Metastasierungsrate und Mortalität (Bos et al., 2003, n.d.; Dales et al., 2005; Gruber et al., 2004). Hypoxie ist ein potenter Faktor für metastatische Entwicklungen in der Tumorumgebung. Im ersten Stadium der Metastasierung gewinnen Tumorzellen die Fähigkeit zur Invasion und Migration. In vitro Zellmigration ist assoziiert mit epithelial-mesenchymaler Transition (EMT). Es wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von HIF-Faktoren die EMT in multiplen Tumorzelllinien effizient aktivieren kann (Higgins et al., 2007; Krishnamachary et al., 2006, 2003; Liu et al., 2014; Yang et al., 2008). Eine direkte Rolle der HIF-Regulation in EMT basiert auf der Erkenntnis, dass die für EMT wichtigsten Transkriptionsfaktoren: Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), Snail und Twist sog. hypoxia response elements (HREs) innerhalb der regulatorischen Elemente beinhalten (Liu et al., 2014; Yang et al., 2008; Zhang et al., 2015). Die EMT kann durch HIF auch indirekt über andere molekulare Signalwege wie Notch, transformierender Wachstumsfaktor beta (TGF- β), Integrin-linked Kinase, Wnt, Hedgehog und AXL-Rezeptor-Tyrosin Kinase aktiviert werden (Byers et al., 2013; Chen et al., 2010; Chou et al., 2015; Copple, 2010; Gjerdrum et al., 2010; Lei et al., 2013; Rankin et al., 2010, 2014; Sahlgren et al., 2008; Spivak-Kroizman et al., 2013; W. Zhang et al., 2015).

Im späteren Stadium der metastatischen Entwicklung gewinnen die Tumorzellen zudem die Fähigkeit der Kolonisierung, des Überlebens und weiteren Wachstums in weiter entfernten Mikroumgebungen. Die von Paget etablierte „Seed and Soil“-Theorie besagt, dass der Metastasierungsprozess eine gewisse Gewebespezifität ausweist und nicht zufällige, sondern jene Organe betrifft, in denen gute Bedingungen für die Tumorzellen herrschen (Akhtar et al., 2019; Fokas et al., 2007). Dieses Phänomen wurde heutzutage durch Formation der prämetastatischen Nische erklärt. HIF-1 α reguliert die Produktion von Sekretionsfaktoren durch den primären Tumor, die einen Einfluss auf die Entstehung von prämetastatischen Nischen nehmen (Rankin and Giaccia, 2016; Wong et al., 2011). In Brustkrebszellen resultiert die HIF-Signalisierung in einer erhöhten Expression und Sekretion von Lysin-Oxidase (LOX)

und LOX-ähnlichen Proteinen (LOXL2 und LOXL4) (Wong et al., 2011). Diese Proteine modifizieren die Kollagenmatrix in Lungen- und rekrutierten Knochenmarkstammzellen (engl. bone marrow-derived cells, BMDCs), die eine Reihe von Chemokinen produzieren (Erler et al., 2009; Lyden et al., 2001). Diese Zytokine rekrutieren die Tumorzellen und stimulieren deren Extravasation (Erler et al., 2009; Gao et al., 2008; Kaplan et al., 2005; Lyden et al., 2001; Wong et al., 2011; Yang et al., 2004). Proteomische Analysen vom hypoxischen Sekretom aus der knochenaffinen MDA-231 humanen Brustkrebszelle identifizierten LOX als eines der am häufigsten hochregulierten Proteine, verglichen mit MDA-231 knochenaffinen Zellen unter Normoxie (Cox et al., 2015). Eine hohe Expression von LOX in primären Brusttumorzellen oder die systemische Verabreichung von LOX führt zur Bildung osteolytischer Läsionen, während die Hemmung der LOX-Aktivität die tumorinduzierte osteolytische Läsionsbildung aufhebt (Cox et al., 2015). Die prämetastatische Nischenbildung in Lungen und Knochen stellt ein HIF-1-abhängiges Ereignis während der Brustkrebsprogression dar (Todd et al., 2021).

Im weiteren Verlauf der metastatischen Kolonisierung der Nische durch Tumorzellen ist deren Adaptierung an die neue Mikroumgebung unabdingbar. Das Kolorektalkarzinom metastasiert häufig in die Leber. Angenommen, dass die Metastasierung von Kolonkrebszellen über die Portalzirkulation stattfindet, wo der Sauerstoffpartialdruck 60 – 65 mm Hg beträgt, ist davon auszugehen, dass diese Zellen auf ihrem Weg zur neuen Nische die akute Hypoxie überstehen müssen (Jungermann, 1988; Loo et al., 2015). Loo et al. zeigten, dass metastasierte Kolonkrebszellen im hypoxischen Tumormikroumgebung (TME) der Leber ihre extrazelluläre Sekretion der sog. Brain-type Creatine Kinase (CKB) erhöhen (Loo et al., 2015). CKB katalysiert eine Übertragung der Phosphatgruppe von ATP auf Kreatin. Das Produkt dieser Reaktion – P-Kreatin – kann nach intrazellulärem Transport als Donor der Phosphatgruppe dienen und ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) unter metabolischem Stress, wie Hypoxie, schnell und unabhängig von O₂-Angebot regenerieren (Wyss and Kaddurah-

Daouk, 2000). Loo et al. zeigten, dass die Depletion von CKB signifikant die Metastasierung von Dickdarmkrebszellen unterdrückt (Loo et al., 2015). Der Extrazellulär- raum ist ein wichtiges Kompartiment für maligne energetische Katalyse. Diese ist von zentraler Bedeutung für das Überleben der Kolonkrebszellen im hypoxischen TME der Leber.

i) Einfluss der Hypoxie auf die Anti-Tumor Immunantwort

Krebszellen unter Hypoxie reduzieren die Expression von major histocompatibility complex (MHC)-Klasse-I-Molekülen (Sethumadhavan et al., 2017). Diese sind unabdingbar für die Erkennung durch Immunzellen und immunbedingte Lyse von Tumorzellen (Blander, 2016). Die negativen ko-stimulatorischen Moleküle, sogenannte Immun-Checkpoints, spielen für die Funktion der T-Zellen eine wichtige Rolle. Zu den Immun-Checkpoints gehören cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA4), programmed cell death protein 1 (PD1), programmed death-ligand 1 (PDL1), lymphocyte-activation gene 3 (LAG3) und T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing protein 3 (TIM3), die die Immunantwort in verschiedenen Entwicklungsstadien verschiedener Tumorarten negativ regulieren (Andrews et al., 2017; Bertucci and Gonçalves, 2017; Burugu et al., 2018; Noman et al., 2014; Ruf et al., 2016; Semaan et al., 2017; Zhao and Subramanian, 2017). HIF-1 α ist ein transkriptioneller Aktivator von PD-L1 in Tumor- und Immunzellen. Eine in Nierenzellkarzinomzellen erhöhte PD-L1-Expression korreliert mit der HIF-1 α -Konzentration, deren Erhöhung aus der beeinträchtigten Funktion des VHL-Proteins resultiert (Ruf et al., 2016). Anhand der Analyse der Proben der hepatozellulären Karzinome wurde nachgewiesen, dass die Expression von PD-L1 mit Hypoxie korreliert und zusätzlich negative prognostische Wert zeigt (Semaan et al., 2017). Darüber hinaus kann HIF-1 durch die Aktivierung von Carboanhydrase IX (CAIX) auch die Expression von PD-L1 in Tumorzellen hochregulieren und TME modulieren. CAIX verursacht eine Gewebeazidose, indem es CO₂ hydratisiert und Bikarbonat sowie Protonen in die extrazelluläre Umgebung freisetzt. Die Gewebeazidose (pH 6,0 - 7,0) ist

ein herausragendes Merkmal solider Tumoren. Ein niedriger pH-Wert kann die zytotoxische Funktion von CD8⁺-T-Zellen und die Interferon (IFN) -Produktion von T-helper-1-Zellen hemmen (Erra Díaz et al., 2018). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Expression von CAIX in Tumorzellen positiv mit der Expression von PD-L1 korreliert (Giatromanolaki et al., 2020). Die reduzierte Anti-Tumor-Immunität in hypoxischen Tumoren wird hauptsächlich durch Adenosinrezeptor-Signalisierung vermittelt (Semaan et al., 2017). Adenosin wird durch Hydrolyse von aus Tumorzellen gewonnenem ATP im extrazellulären Raum gebildet. CD39 ist ein Enzym, das zusammen mit CD73 für eine Kaskade verantwortlich ist, die ATP in ADP und zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt, was letztendlich zur Freisetzung einer immunsuppressiven Form von Adenosin in der Tumormikroumgebung führt. Durch HIF-1 α wird die Expression von CD39 und CD73 auf den Tumorzellen hochreguliert (Young et al., 2014). Die Akkumulation von Adenosin in TME und Bindung am A2a- und A2b-Rezeptor (A2bR) auf der Oberfläche von Antitumor-T-Zellen fördert die Expression von cAMP in Antitumor-T-Zellen. Folglich reguliert die Ado-Akkumulation die Expression von PD1 und CTLA4 auf der Oberfläche von T-Zellen und hemmt die Sekretion von IFN, was zur funktionellen Hemmung von Antitumor-T-Zellen führt (Eckert et al., 2019; Hatfield et al., 2015; Hatfield and Sitkovsky, 2016; Leone et al., 2015).

j) Seneszente Zellen

Zelluläre Seneszenz ist eine reversible Form des proliferativen Stillstands, die sich wahrscheinlich als Schutzmechanismus zur Aufrechterhaltung der Gewebemö-
stase entwickelt hat. Dieser Mechanismus des proliferativen Stillstands dient dazu, kranke, dysfunktionale oder anderweitig überschüssige Zellen zu inaktivieren und zu gegebener Zeit zu entfernen. Zusätzlich zum Abschalten des Zellteilungszyklus ruft das Seneszenzprogramm Veränderungen in der Zellmorphologie und im Zellstoffwechsel hervor (Birch and Gil, 2020; Faget et al., 2019). Durch eine Aktivierung eines Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) kommt es zusätzlich

zur Freisetzung einer Vielzahl bioaktiver Chemokine, Zytokine und Proteasen (Birch and Gil, 2020; Faget et al., 2019; Song et al., 2021). Seneszenz kann in Zellen durch Mikroumgebungsstress wie Nährstoffmangel, Hypoxie, Veränderungen in der Desoxyribonukleinsäure (DNA), Schäden an Organellen und zellulärer Infrastruktur, sowie durch ein Ungleichgewicht in zellulären Signalnetzwerken induziert werden (Hahnan, 2022). Seneszenten Krebszellen sind jedoch imstande, die eigene Apoptose zu vermeiden, TME durch SASP zu modulieren, Angiogenese zu induzieren, Invasion und Metastasierung zu stimulieren und die Tumormunität zu unterdrücken (Birch and Gil, 2020; Faget et al., 2019; Hofstetter et al., 2012; Kobayashi et al., 2012; Lee and Schmitt, 2019; Wang et al., 2020, 2015).

Hofstetter et al. zeigten, dass es in Glioblastomen unter Hypoxie zur Protein Phosphatase 2A (PP2A) -Aktivierung und zum Stillstand des Zellzyklus in der G1/S-Phase kommt. In Prostatakarzinomzellen aktiviert HIF-1 α u. a. die Expression vom CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) (Hofstetter et al., 2012). Wang et al. zeigten, dass Seneszenz und gleichzeitig eine Überexpression von CXCR4 charakteristisch für die Subpopulation der Prostatakrebszellen sind, die die höchste Fähigkeit zur ossären Metastasierung aufweisen (Wang et al., 2015). Die Cop9 signalosome subunit 8 (CSN8)-Überexpression in Kolonkarzinomzellen hält die Zellproliferation auf, reguliert aber viele wichtige Quieszenz-Gene [Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1 (NR2F1), differentiated embryonic chondrocyte expressed gene 2 (DEC2), p27] und Hypoxie-Response-Gene [HIF-1 α , Glukosetransporter 1 (GLUT1)] hoch, wodurch das Überleben unter Hypoxie nach Serumentzug oder nach Gabe von 5-Fluorouracil positiv beeinflusst werden kann (Ju et al., 2020). Die experimentelle Neutralisation von CSN8 blockiert die EMT und eine Überleitung zur Quieszenz, die durch die Hypoxie von 1 % O₂ in vitro induziert werden, und beeinträchtigt die Anpassungsfähigkeit von Kolonkarzinomzellen in vivo negativ (Ju et al., 2020).

Die wichtigste Auswirkung seneszenten Krebszellen sind reversible senescente Zellzustände, bei denen die metabolisch stillen Krebszellen aus ihrem SASP-exprimierenden, nichtproliferativen Zustand entkommen und die Zellproliferation und die Manifestation der damit verbundenen Fähigkeiten voll lebensfähiger onkogener Zellen wieder aufnehmen können (De Blander et al., 2021). Eine solche vorübergehende Seneszenz ist bei Therapieresistenz am besten dokumentiert (De Blander et al., 2021). Eindeutige Beweise des negativen Einflusses der Seneszenz auf das therapeutische Ergebnis stammen aus In-vivo-Experimenten an Mäusen mit Brusttumoren (Jackson et al., 2012). Die Autor*innen beobachteten, dass mit Doxorubicin behandelte Tumoren mit p53-Mutation den Zellzyklus bis zu abnormen Mitosen und anschließendem Zelltod durchlaufen und letztlich ein besseres Ansprechen auf die Behandlung zeigen. Die Tumoren mit normalem p53 Gen hingegen unterliegen nach der Behandlung nicht dem Zelltod, sondern treten stattdessen in einen Zellzyklusstillstand und in die Seneszenz ein. Diese Zellen stoßen reichlich proinflammatorische Zytokine mit pro-tumorigenem Potenzial aus, was zu einer minimalen Rückbildung des Tumors und einem frühen Rückfall führt (Jackson et al., 2012).

k) Auswirkung von Hypoxie auf die onkologische Therapie

Neben den Auswirkungen von Hypoxie auf den Tumor selbst können hypoxische Tumorzellen von den Therapien schlechter erreicht werden. Sauerstoff gilt als Radiosensitizer, der wichtig ist, um durch Bestrahlung Doppelstrangbrüche in der TumordNA fixieren zu können (Quintiliani, 1986). Bereits in den 50er Jahren konnte gezeigt werden, dass hypoxische Zellen mit einer dreimal so hohen Strahlendosis therapiert werden müssen wie ausreichend oxygenierte Zellen, um die gleiche Wirkung zu erzielen. Da gesundes Gewebe jedoch ebenfalls von der Bestrahlung betroffen ist, ist es nicht möglich, die Strahlendosis soweit zu erhöhen, dass sie auch in den hypoxischen Tumorarealen eine ausreichend letale Wirkung entfalten kann (Gray et al., 1953). So können nach der Strahlentherapie hypoxische Tumorzellen bestehen

bleiben und weiter proliferieren, sodass ein noch aggressiverer Tumor entsteht (Graham and Unger, 2018).

Chemotherapeutika gelangen aufgrund der aberranten Gefäßarchitektur und der langen Diffusionstrecke bis zu den hypoxischen Zellen teilweise ebenfalls schlecht zu diesen Tumorzellen. Zudem wirken viele Chemotherapeutika, wie z. B. Cyclophosphamid, Carboplatin, Melphalan, Adriamycin, Vincristin, Etoposid, Bleomycin und 5-Fluorouracil, besser auf normoxygenierte als auf hypoxische Zellen (Teicher et al., 1990).

Was die Immuntherapie angeht, so ist auch deren Wirkung in hypoxischen Tumorealen reduziert, da es durch die vermehrt ablaufende anaerobe Glykolyse zu einer Akkumulation von Adenosin im Extrazellulärraum kommt. Dies hemmt die Antitumor-T-Zellen und natürlichen Killerzellen und aktiviert gleichzeitig T-Suppressorzellen (Facciabene et al., 2011; Hatfield et al., 2015). Die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Reduktion des hypoxischen Tumoreals ist daher von großer Bedeutung.

B. Remote ischemic Conditioning (RIC)

Die Erkenntnis, dass kurze, nicht schädliche Ischämiephasen vor einem ischämischen Insult eine schützende Wirkung auf das Gewebe hat, geht auf die Arbeiten von Murry et al. aus dem Jahr 1986 zurück (Murry et al., 1986). In einem Tiermodell zeigten sie, dass das Ausmaß des durch einen Koronarinfarkt geschädigten Gewebes erheblich reduziert werden kann, wenn dem Infarkt mehrere kurze Zyklen von Ischämie und Reperfusion (I/R) in demselben Gefäßgebiet vorausgingen. Einige Jahre später wurde das Konzept der lokalen ischämischen Konditionierung durch Przyklenk et al. erweitert. Sie fanden heraus, dass kurze Ischämieepisoden in einem Gefäßbett des Herzes in einem Hundemodell auch das entfernte, nicht direkt präkonditionierte Myokard vor einem anschließenden anhaltenden Koronararterienverschluss schützen (Przyklenk et al., 1993). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen

wurde gezeigt, dass dieser Effekt nicht auf das Herz selbst beschränkt ist, sondern auch auf andere Organe übertragbar ist. Gho et al. zeigten anschließend, dass eine protektive Wirkung auf den Herzmuskel auch durch kurze wiederholte Ischämieepisodes der Nieren induziert werden kann (Gho et al., 1996). Durch wiederholtes Abklemmen der Nierengefäße gelang es ihnen, eine Schutzwirkung auf das Herz zu erzielen, die mit der durch I/R im Herzen verursachten Wirkung vergleichbar war. Birnbaum et al. zeigten, dass die Größe des Myokardinfarkts durch die Anwendung von RIC auf die Beugemuskulatur der hinteren Pfote des Kaninchens reduziert werden kann (Birnbaum et al., 1997). Aus praktischen Gründen ist die Applikation von RIC an den Extremitäten viel einfacher als am Herzen oder an der Niere. Daher werden in den meisten Studien über RIC die Extremitäten als Auslöseorgan verwendet.

Obwohl zunächst die Auswirkung von RIC auf das Herz untersucht wurde, konnten mehrere Autor*innen RIC-Effekte auch auf die Perfusion anderer Organe zeigen. Koike et al. untersuchten einen Einfluss von RIC auf Entwicklung und Verlauf einer experimentell induzierten nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) im murinen Modell (Koike et al., 2020). NEC ist eine verheerende Darmerkrankung, die Frühgeborene oder Säuglinge mit sehr geringem Geburtsgewicht betrifft und mit einer Mortalität von bis zu 25 % assoziiert ist (30 - 50% in fortgeschrittenen Stadien). Die Ursache der Erkrankung ist immer noch nicht eindeutig geklärt, wobei mehrere Risikofaktoren wie Frühgeburtlichkeit, Fütterung mit Säuglingsnahrung, mikrobielle Kolonisierung, Entzündungen und Hypoxie bereits identifiziert worden sind. Die Applikation von RIC an der Hinterpfote neugeborener Mäuse mit induzierter NEC verbesserte die Durchblutung des unreifen Darms aufgrund einer durch Stickstoffmonoxid und Schwefelwasserstoff vermittelten Gefäßerweiterung (Koike et al., 2020). Dies verminderte das Ausmaß der Darmnekrose und verbesserte das Überleben der an NEC erkrankten Tiere.

Am Menschen konnten ebenfalls bereits vielversprechende Erkenntnisse im Hinblick auf die Verbesserung der Mikrozirkulation durch Anwendung des RIC gewonnen

werden. So konnte von Kolbensschlag et al. gezeigt werden, dass drei 10-minütige, nicht-invasive, ischämische Stimuli gefolgt von Reperusionsphasen den kutanen Blutfluss am anterolateralen Oberschenkel signifikant stärker erhöhen als die Applikation kürzerer ischämischer Stimuli (Kolbensschlag et al., 2017). Zudem konnte von dieser Forschungsgruppe festgestellt werden, dass die Applikation ischämischer Stimuli an der oberen Extremität den kutanen Blutfluss am anterolateralen Oberschenkel signifikant stärker erhöht als ischämische Stimuli an der unteren Extremität, wobei auch diese zu einer Verbesserung der kutanen Mikrozirkulation am Oberschenkel führen (Kolbensschlag et al., 2015). Letztlich konnten diese Erfahrungen sogar bereits an Patient*innen, die eine gestielte oder freie Lappenplastik erhalten hatten, angewandt werden. Hier zeigte sich, dass die Durchführung des RIC zu einer verbesserten Mikrozirkulation in den gestielten und den freien Lappenplastiken führt (Kolbensschlag et al., 2016). Dies war gleichzeitig die erste Studie zu RIC mit Patient*innen, die eine Lappenplastik erhalten hatten.

Untersuchungen zu RIC bei Tumorpatient*innen gibt es bisher nur im Rahmen einer noch nicht abgeschlossenen Studie, die den kardioprotektiven Effekt von RIC auf das Myokard unter der Gabe von Anthrazyklinen analysieren soll (Chung et al., 2016).

C. Fragestellung und Hypothesen

Durch komplexe Prozesse führt Hypoxie innerhalb von Tumoren zu zahlreichen unerwünschten Effekten, wie die Resistenz gegenüber anti-proliferativen Signalen, die Umgehung der Apoptose, die Erhöhung des replikativen Potenzials, die reduzierte Immunreaktion auf die Tumorzellen sowie eine erhöhte Metastasierungsrate. Eine Reduktion der hypoxischen Areale in Tumoren kann zu einem weniger aggressiven Phänotyp sowie zu einem besseren Therapieansprechen, vor allem bei Bestrahlung, und stärkerer Immunabwehr führen.

Der Einsatz von RIC könnte aufgrund seiner Wirkweise zu einer Reduktion des hypoxischen Areals in Tumoren führen. Die Wirkung von RIC auf Tumoren selbst wurde bisher weder im Tiermodell noch am Menschen untersucht, sodass sich dazu keinerlei Daten aus der Literatur erheben lassen.

Diese Arbeit soll deswegen die folgenden Fragen beantworten:

- 1. Kann die Durchführung von Remote Ischemic Conditioning zu einer Verkleinerung des Hypoxieareals in einem Tumor führen?*
- 2. Ändert sich damit einhergehend die Immunzellinfiltration im Tumorzentrum und in der Peripherie?*
- 3. Kann eine immunsuppressive Wirkung (Infiltration durch Regulatorische T (Treg)-Zellen) positiv oder negativ durch RIC beeinflusst werden?*
- 4. Ändert sich infolge von RIC die Konzentration der im Serum zirkulierenden Zytokine?*

Die Beantwortung dieser Fragen in dieser Arbeit soll als primäres Ziel ermöglichen, Aufschluss über die Wirkung von RIC auf Tumoren zu erhalten. RIC könnte prinzipiell, wie bereits im normalen Gewebe nachgewiesen, die Sauerstoffsättigung des Tumorgewebes verbessern. Zudem könnte eine Reduktion der hypoxischen Tumormasse zu einer veränderten, möglicherweise erhöhten Immunzellinfiltration im Vergleich zum unbehandelten Tumor führen. Auch die Zytokine im Tumoreal sowie die systemisch messbaren Zytokine könnten durch eine Reduktion des hypoxischen Tumoreals im Vergleich zu unbehandelten Tieren variieren. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Studie soll dann ggf. in einer Folgestudie untersucht werden, ob das somit verringerte Hypoxieareal zu einem besseren Ansprechen auf eine Bestrahlungstherapie führt.

2. Material und Methoden

Die Genehmigung für den Tierversuch wurde durch das Regierungspräsidium Tübingen erteilt, und dem Experiment wurde die Nummer BG 01/19 G zugeordnet. B16-OVA Melanomzellen werden C57BL/6NCrL Mäusen subkutan in die Flanke implantiert. Nach dem Anwachsen des Tumors auf eine Größe von 0,7 – 1 cm Durchmesser werden die Terminalversuche eingeleitet. Ab einer Größe von 0,7 cm ist zu erwarten, dass ein hypoxisches Areal von ausreichender Größe im Tumor vorliegt. Für die Versuche wird bei einer Gruppe der Mäuse RIC unter Isoflurannarkose durchgeführt. Hierfür wird ein Hinterlauf mittels Tourniquets für 6 Zyklen à 5 min einer Ischämie ausgesetzt, mit dazwischenliegenden Pausen à 5 min zur Reperfusion. Um Narkoseeffekte bei der Wirkung des RIC auszuschließen, gibt es eine Kontrollgruppe, die lediglich eine Isoflurannarkose ohne RIC erhält. Während der Phase in Narkose wird sowohl bei der RIC- als auch bei der Kontrollgruppe mittels nicht-invasiver Elektrode auf dem Tumor und auf dem kontralateralen (nicht-ischämischen) Hinterlauf die Mikrozirkulation im Gewebe gemessen. Nach dem letzten Zyklus RIC bzw. korrespondierend nach ca. 57 min Narkosedauer ohne RIC bei der Kontrollgruppe wird den Tieren der Hypoxiemarker Pimonidazol intraperitoneal (i.p.) injiziert und 90 min später die Tötung in Narkose durchgeführt. Danach werden die Tumoren entnommen. Anhand des applizierten Pimonidazol kann das hypoxische Areal in den Tumoren angefärbt und verglichen werden, ob ein Unterschied in der Größe des Hypoxieareals bei der RIC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe besteht. Zudem soll mittels CD3-Färbung die T-Zellinfiltration in den Tumoren der beiden Gruppen verglichen werden. T-Suppressorzellen können als Subpopulation der T-Zellen mittels Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3)-Färbung identifiziert werden. Aus den gewonnenen Plasmaproben soll zudem die Zytokinkonzentration im Plasma beider Gruppen verglichen werden.

Anhand des Versuchsaufbaus kann evaluiert werden, ob die Applikation Zielort-ferner, ischämischer Stimuli mittels RIC dazu führt, das hypoxische Areal im Melanom zu verringern und die Antitumor-Immunantwort zu beeinflussen.

A. Modell

Die Fragestellung sollte anhand eines orthotopen, syngenem Melanom-Mausmodells beantwortet werden. Im syngenem Transplantationsmodell werden Melanomzellen, die in einem bestimmten Tierstamm auf natürliche Art entstanden sind, einem Tier derselben Spezies implantiert. Da die Tumorzellen und der Empfänger den gleichen genetischen Hintergrund haben, wird das transplantierte Gewebe vom Immunsystem des Empfängers nicht abgestoßen. Der Vorteil der syngenem Transplantationsmodelle im Vergleich zu Xenotransplantatmodellen ist, dass die Tiere ein funktionierendes Immunsystem haben, wodurch eine genauere Darstellung der Mikroumgebung des Tumors und vor allem der Immunreaktion möglich ist (Saleh, 2018).

Die am weitesten verbreitete Melanomzelllinie ist die B16-Zelllinie, die aus einem Melanom von C57BL/6J-Mäusen, die spontan einen Tumor hinter dem Ohr entwickelt haben, isoliert und von Dr. I.J. Fidler (M.D. Anderson Cancer Center, Houston) eingeführt wurde. Diese Zelllinie kann ein vielfältiges Spektrum von Subklonen mit unterschiedlicher Tendenz zur Proliferation, Invasion und Metastasierung hervorbringen (Bloom et al., 1997). Die primäre Zelllinie wurde durch Transfektion des Hühner-Ovalbumin-Gens in die von C57BL/6 (H-2b-Haplotyp) stammende murine Melanomzelllinie B162 weiter modifiziert. Nach Selektion und Isolierung des Ovalbumin (OVA)-transfizierten B16-Klons, wurde eine neue B16-OVA Zelllinie initiiert. Durch Expression von Fremdprotein (Ovalbumin) wurden solche modifizierten Melanomzellen immunogener im Vergleich zur primären Zelllinie.

Die C57BL/6NCrl Mäuse sind genetisch identisch und daher frei von hereditären Unterschieden, die sich auf die Forschungsergebnisse auswirken könnten. Inzucht-Mausstämme weisen ein hohes Maß an Einheitlichkeit in ihren vererbten Eigenschaften oder Phänotypen auf, dazu gehören Aussehen, Verhalten und Reaktion auf experimentelle Behandlungen.

Zusammengefasst haben wir für die Analyse der Hypoxie und der Immunantwort infolge des RICs ein orthotopes, syngenes Melanom-Mausmodell mit B16-OVA Melanomzellen und C57BL/6NCrl Mäusen gewählt.

B. Zellkulturen

Die B16-OVA Zellen stammen aus dem Labor der IDEXX GmbH (Ludwigsburg, Deutschland) und werden vor Durchführung der Versuchsreihe mittels PCR (IMPACT II PCR Profile) auf folgende Pathogene negativ getestet:

- Mycoplasma species
- Mycoplasma pulmonis
- Mouse hepatitis virus (MHV)
- Minute virus of mice (MVM)
- Mouse parvovirus (MPV1-5)
- Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)
- Sendai virus
- Pneumonia virus of mice (PVM)
- Murine norovirus (MNV)
- Reovirus 3 (REO3)
- Mouse rotavirus (EDIM)
- Ectromelia virus
- Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)
- Polyomavirus
- Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDEV)
- Mouse adenovirus (MAV1)
- Mouse adenovirus (MAV2)
- Mouse cytomegalovirus (MCMV)

Die B16-OVA Zelllinie wird in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Fa. Gibco) mit 10 % (in gesamter Lösung) fötalem, hitzeinaktivierten Kälberserum

(FBS, Fa. Gibco) sowie 1 mM Natriumpyruvat und 2 mM L-Glutamin kultiviert und im Brutschrank unter 5 % CO₂ Konzentration und bei ca. 37 °C inkubiert. Dank Phenolrot in RPMI 1640 Medium kann der pH-Wert des Zellkulturmediums durch Farbveränderung optisch eingeschätzt werden. Die Zellkultur wird alle 4 - 5 Tage passagiert.

C. Versuchs- und Kontrollgruppen

Aufgrund der biometrischen Versuchsplanung werden 14 Tiere pro Gruppe benötigt (Fig. 4) (Erdfelder et al., 2009). Bei einer Tumoranwachsrate von ca. 90 % wurden pro Gruppe je 2 zusätzliche Mäuse als Reserve eingeplant. Es werden 6 - 8 Wochen alte C57BL/6NCrI (Charles River) Mäuse (männlich und weiblich in gleicher Anzahl) mit einem Gewicht von ca. 25 g in die Studie eingeschlossen.

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht über die geplanten Versuchs- und Kontrollgruppen inkl. Tierzahlen

Maus-stamm	allogenes Transplantat	Experimental-Gruppe	Mäuse pro Gruppe
C57BL/6NCrI (Charles River)	B16-OVA Melanomzellen (1 × 10 ⁵ Zellen)	RIC-Gruppe	16
C57BL/6NCrI (Charles River)	B16-OVA Melanomzellen (1 × 10 ⁵ Zellen)	Kontrollgruppe	16
Gesamt			32

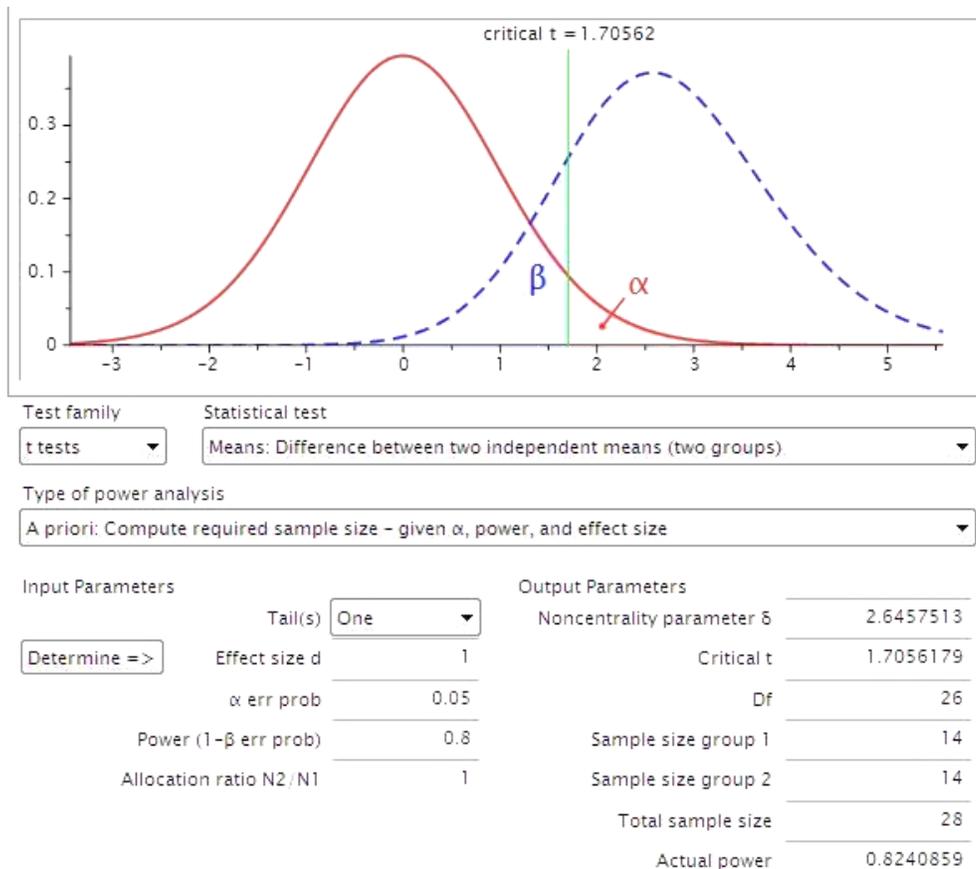


Abbildung 5: M Power Analyse für den Vergleich zwischen Kontroll- und Versuchsgruppen mittels G*Power Applikation (Erdfelder et al., 2009)

a) Haltung

Alle in den Versuchen verwendeten Mäuse werden nach Geschlechtern getrennt unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen in "Typ 2 long" IVC-Käfigen gehalten. Die weiblichen Tiere werden in Gruppen zu je 4 - 5 Mäusen gehalten. Die männlichen Tiere werden einzeln gehalten, da das Halten in Gruppen zu Rangordnungskämpfen und anderem Stress für die Tiere führen kann, was die immunologische Situation beeinflussen und somit die Ergebnisse der Studie beeinträchtigen kann. Die Tiere erhalten ausreichend Zellstoff für den Nestbau, Holzeinstreu und ein Häuschen bzw. Holzhöhren, Futter und H₂O ad libitum.

b) Überwachung des Gesundheitszustands der Tiere

Um klinische Auffälligkeiten der Tiere möglichst frühzeitig zu erkennen, werden die Mäuse täglich inspiziert und zunächst 2 x wöchentlich gewogen. Sobald der Tumor sicht- und/oder tastbar ist, werden die Tiere alle 2 Tage gewogen. Die Tumorgroße wird mit der Schiebelehre gemessen und kontrolliert, sodass die Tumoren die Zielgröße nicht überschreiten. Ab einer beginnenden Gewichtsreduktion werden die Tiere täglich kontrolliert und gewogen. Des Weiteren wird bei der Kontrolle der Mäuse besonders auf die Motorik sowie das Putz- und Sozialverhalten der Tiere geachtet. Bei einer Gewichtsreduktion $\geq 20\%$ zum Ausgangsgewicht, korrigiert um die erwartete Zunahme unbehandelter Mäuse gleichen Alters, Geschlechts und gleicher Linie im Beobachtungszeitraum, werden die Tiere schmerzfrei mittels letaler CO₂-Inhalation und zervikaler Dislokation getötet. Bei tumorassoziierter Symptomatik (siehe Score Sheet, Anhang A.) werden die Tiere entsprechend den im Score Sheet aufgeführten Bedingungen versorgt, behandelt bzw. schmerzfrei getötet (wie oben beschrieben). Symptomfreie Mäuse werden am Ende der Tumoranwachszeit in die Durchführung der Versuche eingeschlossen und in Isoflurannarkose nach retrobulbärer Blutgewinnung durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Die Tumoren und das Blut der Tiere für weitere immunhistologische Untersuchungen asserviert.

i. Tumorlast

Melanome führen bei Patient*innen in 50 % zu Lymphknotenmetastasen, in 25 % zu lokalen Metastasen (Satellitenmetastasen, In-transit-Metastasen) und in 25 % zu Fernmetastasen in Haut, Leber, Skelett, Zentralnervensystem und Lunge. Zudem kann der Primärtumor exulzerieren. Eine Tumorexulzeration, eine Tumorgroße über 1,5 cm, tumorbedingte Funktionseinschränkungen und Hinweise auf Metastasen werden als Abbruchkriterien gewertet.

- ii. Konkrete, versuchsbedingt erforderliche Abbruchkriterien (§ 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1. d TierSchVersV)

Kranke Tiere werden gemäß den Abbruchkriterien (siehe beigefügtes Score-Sheet, Anhang A.) aus dem Versuch genommen und schmerzfrei getötet, insbesondere bei:

- trotz Meloxicam-Schmerztherapie anhaltenden Schmerzen (72 Stunden) (Anhang B.),
- Gewichtsverlust $\geq 20\%$ bezogen auf Referenz-Kontrolltiere,
- abgemagertem Ernährungszustand (siehe beigefügtes Body Condition Score, Anhang C.),
- Tumorexulzeration,
- Tumorgroße $> 1,5$ cm und
- tumorbedingten Funktionseinschränkungen.

Die separaten Scores für die Beurteilung des Ernährungszustandes (sog. „Body Condition Score“, Anhang C.), der Schmerzlinderung (sog. „Mouse Grimace Scale“, Anhang D.), sowie die Liste der während des Versuchs verabreichten Medikamente (Anhang B.) mit entsprechender Dosierung befinden sich in der Appendix der Sektion Material und Methoden.

D. Durchführung des Experiments

Das subkutane Modell wird in vielen Tumormodellen, einschließlich des B16-Melanoms, verwendet. Nach subkutaner Injektion bilden B16-Melanomzellen innerhalb von 5 bis 10 Tagen einen tastbaren Tumor und wachsen innerhalb von 14 bis 21 Tagen zu einem $1 \times 1 \times 1$ cm großen Tumor heran. Die am häufigsten verwendete Dosis beträgt 1×10^5 Zellen/Maus, was dem 1,5- bis 2-fachen der minimalen tumor-erzeugenden Dosis bei normalen C57BL/6-Mäusen entspricht (Overwijk and Restifo, 2000).

a) Vorbereitung der Zellsuspension für die subkutane Implantation

Die B16-Zellen sollten sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, wenn sie für die Injektion geerntet werden, d. h. die Zellen in den Flaschen zu $\leq 50\%$ konfluent sein. Steigende Konfluenz bewirkt eine Verlangsamung der Zellteilungsrate durch Zellkontakthemmung. Unter Sterilbank-Bedingungen wird das Medium aus der Zellkulturflasche abpipettiert, anschließend wird 4 ml Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS-Puffer) langsam hinzugefügt und die geschlossene Flasche ein wenig und zart ausgeschwenkt. PBS wird anschließend ohne Kontakt mit dem Boden der Flasche abpipettiert. Zur Spaltung von extrazellulären Proteinen, die eine Konfluenz der Zellen ermöglichen, wird ca. 2,5 ml Trypsin/EDTA (0,25 %, Fa. Gibco) zugegeben. Die Zellkulturflasche mit Trypsin wird in der Sterilbank geschlossen und anschließend im Brutschrank unter 5 % CO₂ Konzentration und ca. 37°C für ca. 2 Minuten inkubiert. Die Zellen sollten nicht länger als nötig in Trypsin belassen werden, um eine hohe Vitalität zu gewährleisten. Aus diesem Grund wird die Zellseparation mechanisch durch Klopfen auf die Seite der Flasche und Ausschwenken beschleunigt, bis sich die Zellen lösen und die Plastikoberfläche hinuntergleiten. Anschließend wird 5 ml komplettes Medium (RPMI 1640 + 10 % FBS) zugegeben und die Lösung kräftig mit der Pipette gemischt, um eine einzellige Suspension zu erhalten. Ca. 0,5 ml der Suspension wird entnommen, um die Zellen in der Lösung zählen zu können. Die restliche Suspension wird anschließend in 15 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und ca. 5 min unter 1500 rpm (engl. revolutions per minute; Umdrehungen pro Minute) bei 20°C zentrifugiert. Parallel dazu werden die Zellen nach 1:10 Verdünnung gezählt und die Gesamtzahl der Zellen in der Suspension mathematisch bestimmt. Bei einer geplanten Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen in 0,05 ml PBS (3×10^6 /ml PBS) wird, nach dem Abpipettieren von Medium und Trypsin, das entsprechende Volumen von PBS zum belassenen Zellpellet unter sterilen Bedingungen zugegeben. Die Suspension wird langsam mit der Pipette gemischt, um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Anschließend wird 0,1 ml der Zellsuspension entnommen und mit Trypanblau (0,9 ml)

1:10 verdünnt, um die Anzahl der vitalen Zellen prozentuell zu bestimmen. Trypanblau wird nur von abgestorbenen und perforierten Zellen aufgenommen, die durch den Farbstoff dunkelblau angefärbt werden. Die Zellviabilität sollte mindestens 90 % betragen. Die Zellen werden in einer Kühlbox mit Eis schnellstmöglich in die Tierhaltung transportiert und implantiert.

b) Implantation der Melanomzellen und Ohrlochmarkierung

Subkutane Injektion und Ohrlochmarkierung werden ohne Narkose durchgeführt, da die Durchführung einer Narkose als belastender anzusehen ist als die Injektion der Melanomzellen und die Ohrlochmarkierung.

Zunächst erfolgt die Ohrlochmarkierung. Die Implantation der Tumorzellen erfolgt hiernach an der desinfizierten rechten Flanke des Tieres. Eine helfende Person hält die Maus in stabiler Position, die andere Person schiebt die Haare des Tieres zur Seite und exponiert die Haut. Die Haut wird zwischen Daumen und Zeigefinger zart nach oben gehalten, sodass eine Hautfalte entsteht. Die Tumorzellen werden anschließend mit einer 1 ml Spritze (Omnifix® 1 ml Insulinspritze) und einer 27 1/1 G Kanüle subkutan injiziert. Die Kanüle wird 5 mm subkutan vorgeschoben. Dann werden $1,5 \times 10^5$ B16-OVA Zellen (in 50 μ l PBS gelöst) injiziert. Dabei ist die Entstehung einer subkutanen Schwellung zwischen Daumen und Zeigefinger spürbar und sichtbar, dies sind Anzeichen für eine korrekte Injektion. Die Tiere werden nach der Injektion streng überwacht, falls Zeichen von Schmerzen auftreten sollten, wird Meloxicam (1 – 2 mg/kg) p. o. in einer Suspension (Dosierung 1,5 mg/ml) zur Schmerztherapie verabreicht.

Die Tiere werden nach der Injektion täglich überwacht und alle 2 Tage gewogen. Nach der subkutanen Injektion der Melanomzellen entwickelt sich laut Wachstumskurven nach ca. 11 Tagen ein ca. 7 mm durchmessender Tumor (Mittelwert $6,5 \pm 0,8$ mm). Das Tumorwachstum kann makroskopisch beobachtet werden.

Nachdem die Tumore sichtbar werden, erfolgt eine tägliche Messung des Durchmessers (Abb. 6). Sobald der Tumor die Zielgröße von 0,7 bis 1 cm Durchmesser erreicht hat, wird die Enthaarung und das RIC durchgeführt.



Abbildung 6: Messung des Tumordurchmessers bei einer Versuchsmaus, 10 Tage nach der Implantation von B16-OVA-Zellen in die rechte Flanke.

c) Enthaarung

Etwa zwei Tage zuvor wird lokal auf den Tumor sowie auf einen proximalen Hinterlauf eine Creme (Veet Sensitive) auf einer Fläche von 1 cm² zur Depilierung aufgetragen, um während der Versuche die Sonden zur Messung der Mikrozirkulation (s. u.) aufbringen zu können. Dies fügt den Tieren keine Schmerzen zu. Nach dem Auftragen der Creme wird über das Areal geschabt, um die Haare abzutragen. Anschließend werden Cremerückstände sorgfältig entfernt, sodass keine orale Aufnahme der Creme durch die Mäuse erfolgen kann. Die Enthaarung mittels Creme wird einer Rasur vorgezogen, um eine haarlose Fläche zum Aufbringen der nicht-invasiven Sonden zu erhalten. Die Anwendung der Creme führt über einen längeren

Zeitraum zu einem haarlosen Areal, während die Rasur unmittelbar vor dem Versuch durchgeführt werden müsste, was durch die mechanische Reizung der Haut jedoch die Mikrozirkulationsmessungen verfälschen könnte.

d) Narkose und Einleiten eines Versuchs

Der Terminalversuch erfolgt unter Narkose mit Isofluran. Hierzu werden die Mäuse mittels Isofluran (Einleitung der Narkose mit 4 - 5 % Isofluran, Erhaltung der Narkose mit 0,8 % Isofluran) narkotisiert. Eine zusätzliche Schmerztherapie ist nicht erforderlich. Bei bereits am Menschen durchgeführten Studien wurde die Applikation des Tourniquets ohne Schmerzmittelgabe als nicht schmerzhaft empfunden (Kolbenschlag et al., 2017, 2016, 2015). Die narkotisierten Mäuse werden auf ein Wärmekissen gebettet, um ein Auskühlen der Tiere zu verhindern. Vor jeglichen Interventionen erfolgt eine genaue Messung des Tumordurchmessers (Abb. 7.).



Abbildung 7: Detaillierte Messung des Tumordurchmessers während des Versuchs bei einer narkotisierten Maus.

Darüber hinaus wird die Kerntemperatur der Mäuse alle 5 Minuten (bei RIC-Tieren während der Reperfusionphasen) mit einem rektalen Thermometer (Rodent thermometer BIO-TK8851, Fa. BIOSEB) gemessen und notiert.

e) Platzierung von Elektroden und O2C-Messung

Zur Analyse der Mikrozirkulation wird ein O2C System (Oxygen to see, Fa. LEA Medizintechnik GmbH) angewandt. Die O2C Messungen basieren auf 2 Methoden: Laser-Doppler-Spektroskopie (OptoFlow) und Weißlichtspektrometrie [(**A**bsorption-**T**issue-**S**pectrometry und Erlangen Micro-lightguide Spectrophotometry (EMPHO)).

Mittels Laser-Doppler-Spektroskopie wird durch eine Analyse der Doppler-Verschiebung des Laserlichts, verursacht durch in Bewegung befindliche Erythrozyten, ein Blutfluss, sog. Flow, ermittelt.

Die Bestimmung der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins SO_2 [%] und der relativen Hämoglobinmenge (rHb) erfolgt mittels Weißlichtspektrometrie. Das emittierte Weißlicht wird auf dem Weg durch das Gewebe spektral verändert. Diese Veränderung ist vor allem von der Farbe des Blutes abhängig. Da die Farbe des Blutes vom Grad der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins abhängt, kann anhand der Unterschiede im Farbspektrum die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins im untersuchten Gewebe errechnet werden. Der relative Hämoglobingehalt im untersuchten Gewebe wird durch eine Analyse des absorbierten Lichtanteils ermittelt. Je mehr Hämoglobin sich im Gewebe befindet, desto mehr Licht wird durch das Gewebe absorbiert und desto weniger wird durch den Sensor des O2C Geräts detektiert. Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins, die relative Hämoglobinmenge und der relative Blutfluss im Gewebe wird in einer Tiefe von 2 mm gemessen.

Die Messungen erfolgen durch nicht-invasive Sonden, welche mittels Tapes aufgeklebt werden. Die erste Sonde wird auf den Tumor, die Kontroll-Sonde auf den rechten nicht-ischämischen Hinterlauf der Maus aufgeklebt (Abb. 8 A, B). Die Messungen erfolgen in Echtzeit während des gesamten Versuchs.



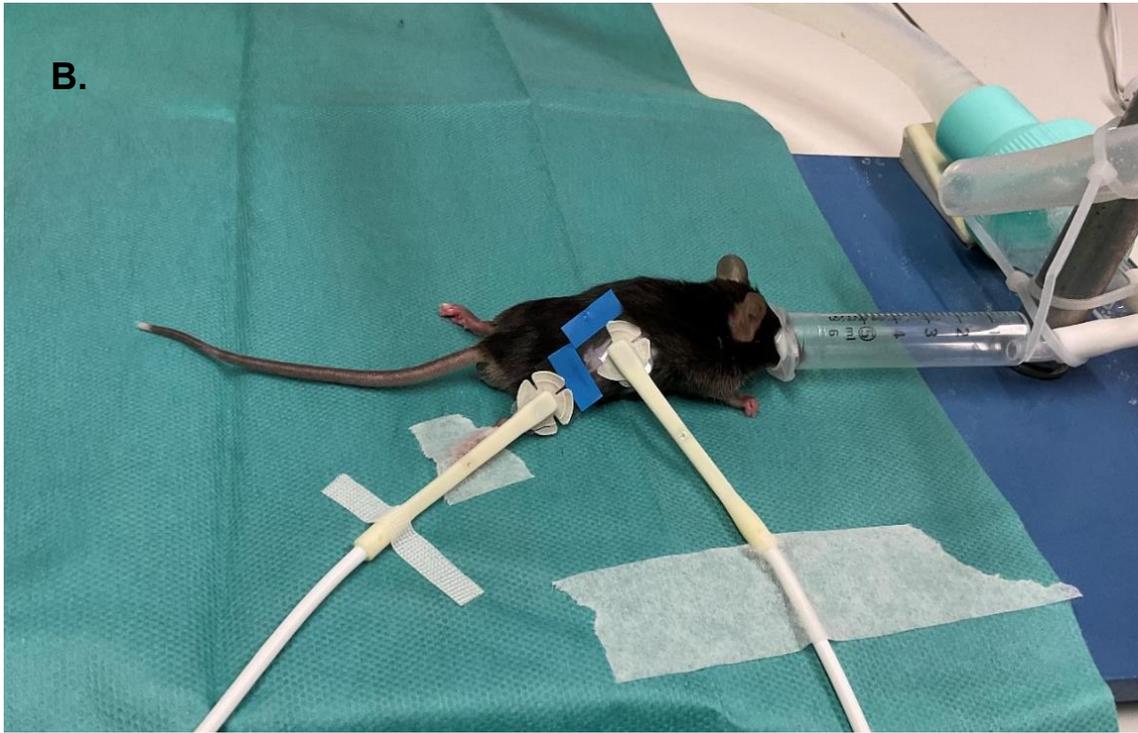


Abbildung 8: Lokalisation des Tumors vor Platzierung der Sonden (A.), Positionierung der Sonden auf dem Tumor und auf dem rechten nicht-ischämischen Hinterlauf der Maus (B.)

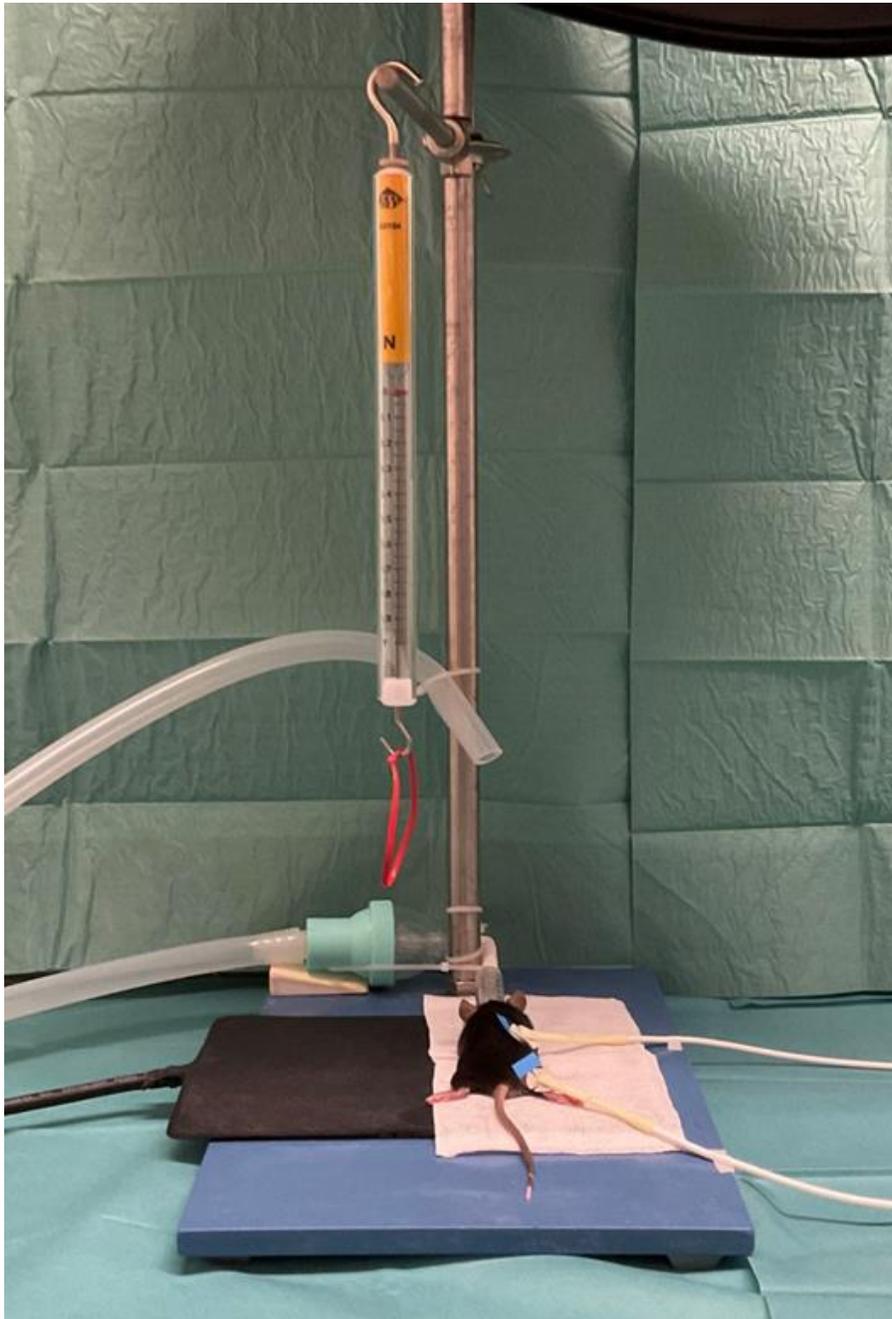


Abbildung 9: Position der Maus sowie Darstellung der Messapparatur während der Baselinephase.

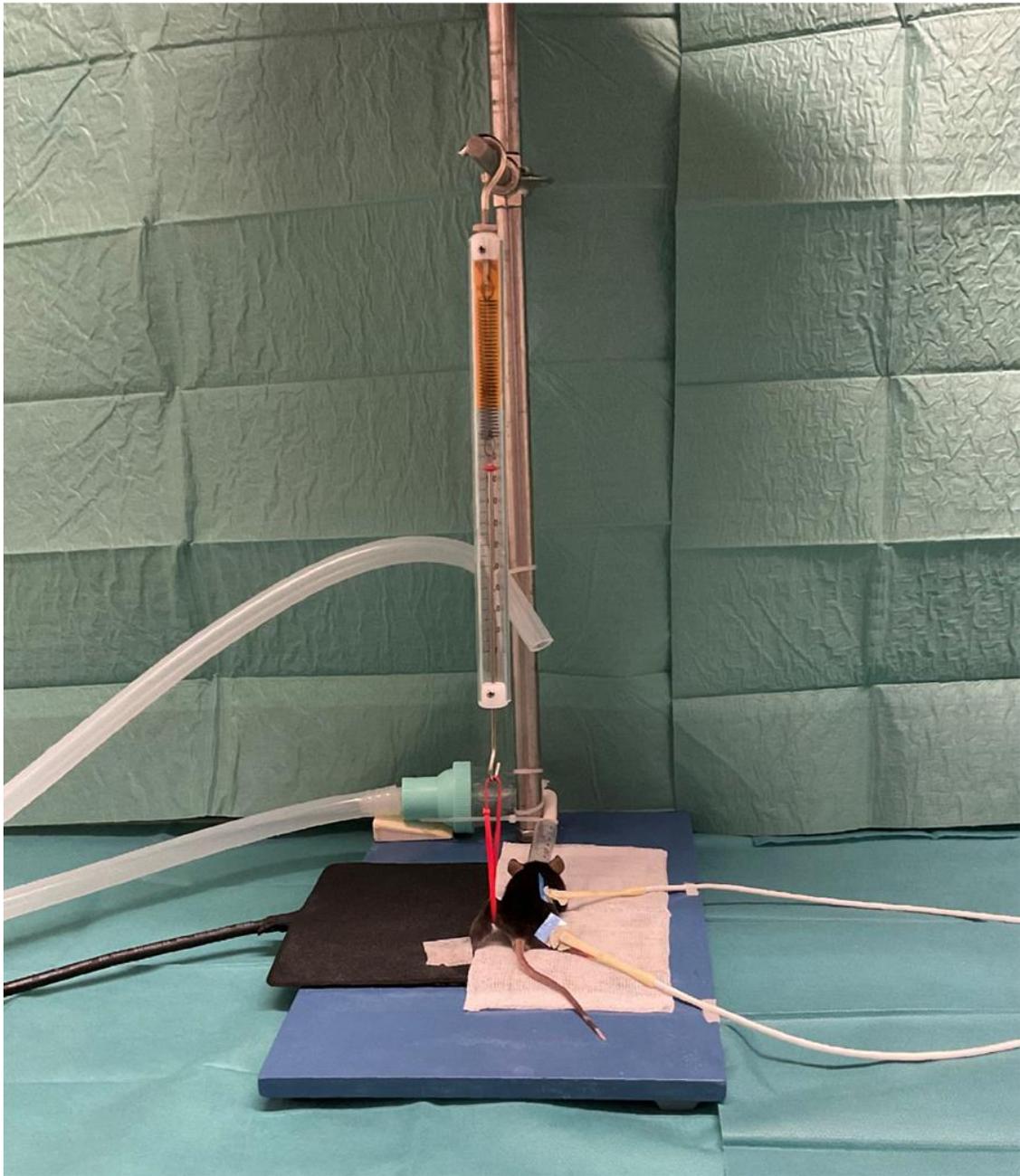


Abbildung 10: Erzeugung einer Ischämie mittels Low-pressure Tourniquet während der RIC Phase mit einer Kraft von 0,6 N.

f) Remote Ischemic Conditioning bei angewachsenem Melanom

In der RIC-Gruppe werden 6 Zyklen à 5 min RIC durchgeführt, mit jeweils 5 min Pause dazwischen zur Reperfusion des Gewebes. Vor der Durchführung des RICs erfolgt eine 2-minütige Baseline (Ausgangsmessung) der Perfusionsparameter. Insgesamt dauert die Durchführung des RIC inklusive Pausen dann 57 min. Hierfür wird ein Tourniquet zum Abbinden des Blutflusses inguinal am Hinterlauf der Maus angebracht und für die Dauer des Zyklus belassen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wird das Tourniquet wie folgt angelegt: ein mechanischer Federdynamometer wird an einer Seite einer Aluminiumplatte befestigt, an der unteren Seite des Dynamometers wird eine Soft-Gefäßschlinge aus Silikon mit 1,5 mm Dicke über einen Metallhaken angebracht. (Abb. 9). Die Schlinge wird um den Hinterlauf der Maus gelegt, wobei eine Kraft von 0,6 N angewendet wird, um die Gefäße durch den vertikalen Zug zu verschließen. Die vertikale Kraft kann durch die Anpassung der Höhe der beweglichen horizontalen Metallrohr adjustiert werden (Abb. 10) (Drysck et al., 2019).

Die Kontrolle der Ischämie erfolgt mittels Inspektion (Blässe am Fuß nach Anlage des Tourniquets, Hyperämie nach Entfernung des Tourniquets). Die Ischämie des Beines wird durch zusätzliche Messung direkt vor dem Versuch unter Narkose und am Ende der ersten RIC-Phase mit einem Pulsoximeter (PalmSAT® 2500A VET mit Vet Wrap Sensor) bestätigt. Das RIC wird als Terminalversuch durchgeführt. Um die hypoxischen Tumorareale bestimmen zu können, wird den Tieren beider Gruppen direkt nach dem letzten RIC-Zyklus bzw. nach 57 min Narkose ohne Intervention Pimonidazol (100 mg/kg KG) i.p. mit einer 30G Kanüle injiziert. Neunzig Minuten nach Pimonidazolinjektion werden die Tiere nach retrobulbärer Blutgewinnung durch zervikale Dislokation getötet.

g) Vorbereitung der Gewebe und Serum Proben

Direkt nach Tötung der Tiere erfolgt die Resektion des Tumors mit umgebendem Gewebe und Einbettung in 4 % Formalin. Nach ca. 4 Stunden werden die Tumoren in der Mitte präzise mit einem Skalpell durchgeschnitten, um die gleichmäßige Wirkung von Formalin auch im Tumorzentrum zu ermöglichen. Die Proben werden für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

Das entnommene Blut wird in Eppendorf-Röhrchen bei Raumtemperatur belassen, um die Gerinnung ablaufen zu lassen (ca. 20 Minuten). Anschließend erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 x g für 15 Minuten bei 4°C. Das Serum wird dann in ein frisches Röhrchen transferiert und im Tiefkühlschrank auf -80°C gebracht.

E. Bio-Plex Multiplex Immunoassay

Der Bio-Plex Pro Assay ist ein Immunoassay basierend auf magnetischen, fluoreszenzgefärbten Mikrosphären (Beads), der die Quantifizierung von mehreren Proteinen in einem Well (in einer Probe) ermöglicht, wobei nur kleine Volumina (0,05 ml) von Serum oder Plasma zur Durchführung der Analyse notwendig sind (Abb 11.). Das Bio-Plex Multiplex System basiert auf der xMAP (x = Analyte, MAP = Multi-Analyte Profiling) Technologie. Diese Technik beinhaltet bis zu 100 mittels zweier fluoreszierender Farbstoffe unterschiedlich gefärbte Mikrosphären. Auf jeder Mikrosphäre sind spezifische Antikörper gegen einen bestimmten Biomarker (z. B. ein Zytokin) kovalent gebunden. Der zu analysierende Biomarker wird in der Lösung durch die spezifischen Antikörper an die Mikrosphären gebunden. Da in der Lösung mehrere unterschiedlich fluoreszenzgefärbte Beads mit gebundenen Antikörpern vorliegen, kann die Bestimmung einer Reihe von Biomarkern erfolgen. Alle nichtgebundenen Substanzen werden durch Waschen und Verwendung einer magnetischer Platte, die die magnetischen Beads am Boden der 96-Well-Platte stabilisiert, entfernt. Anschließend wird eine Lösung mit biotinylierten Detektionsantikörpern zugegeben, was zur Bildung von Bead-Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexen

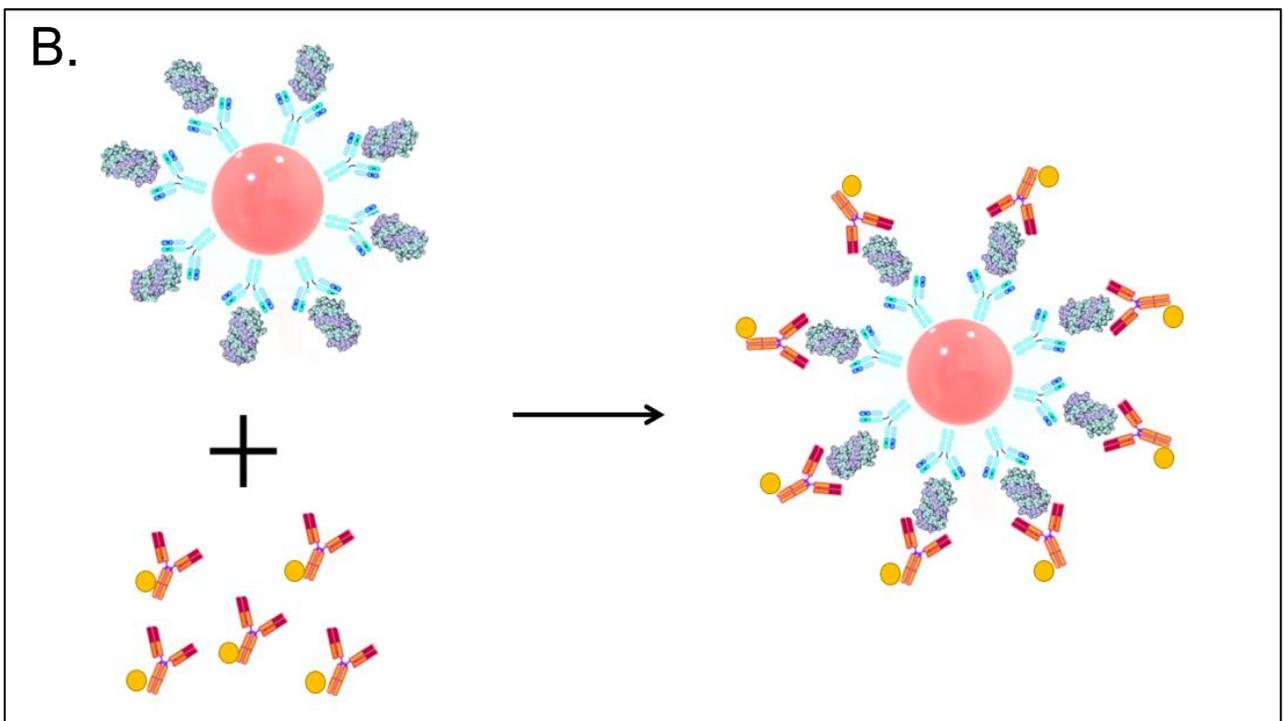
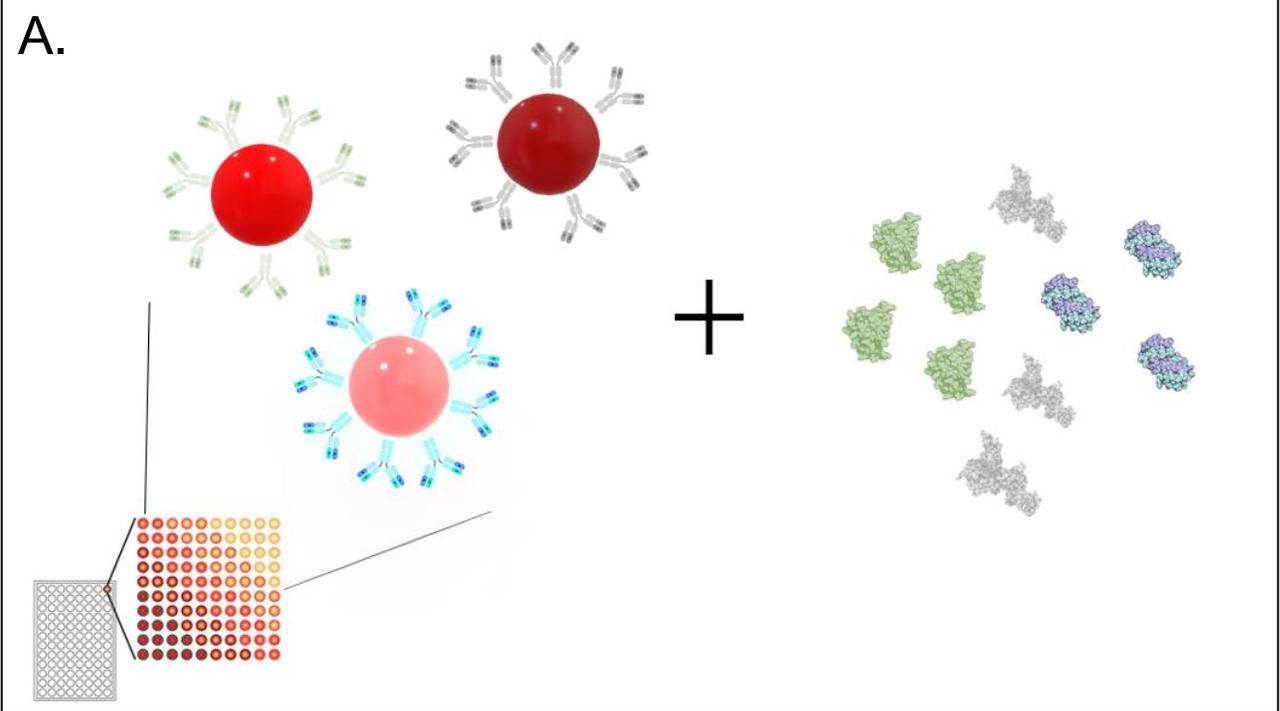
führt. Das dann zugegebene Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat (SA-PE) wird durch starke nicht-kovalente Bindung an die biotinylierten spezifischen Antikörper der Bead-Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe stabilisiert. Phycoerythrin dient als fluoreszierender Indikator für das Vorhandensein der markierten Antikörper.

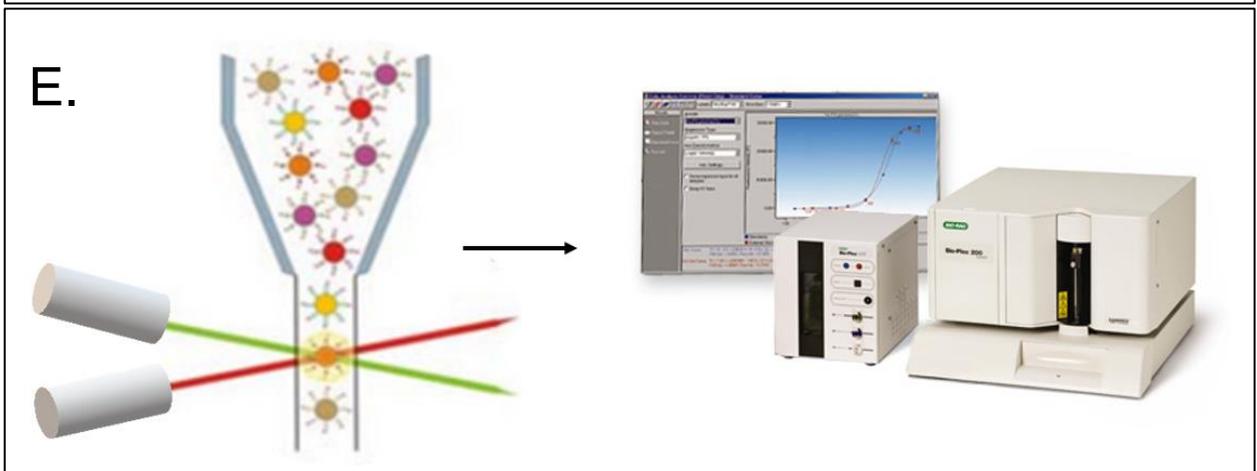
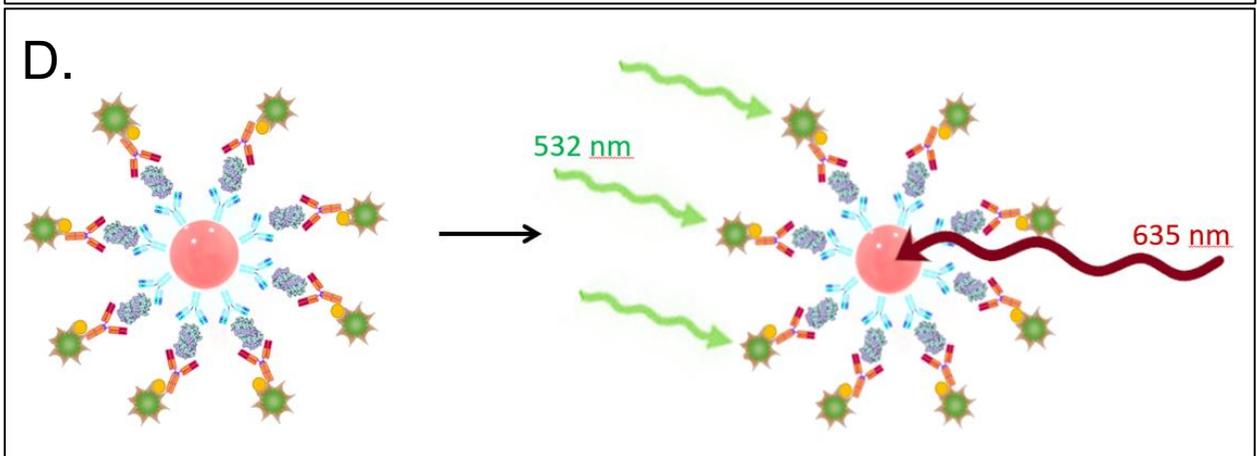
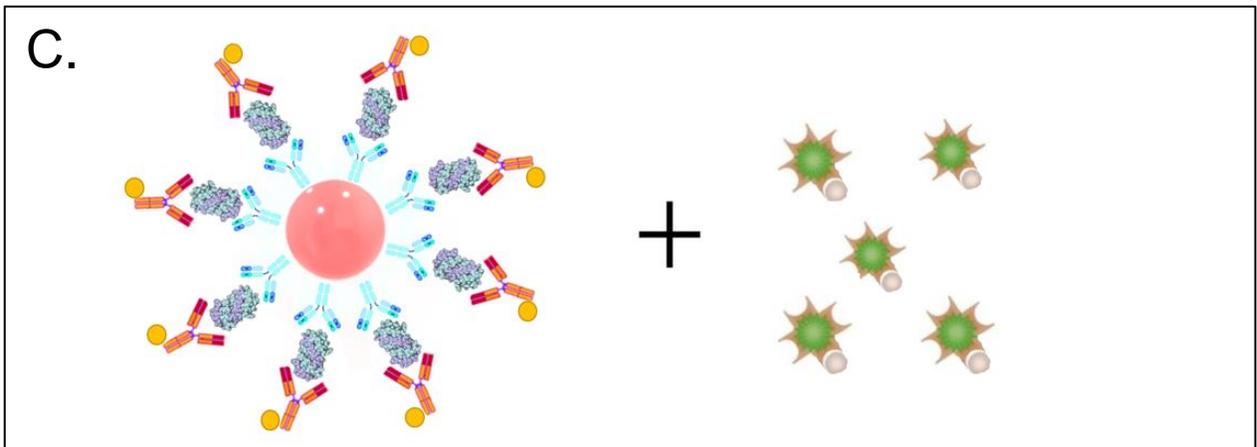
Bio-Plex® 200 ist ein System mit einem Durchflusszytometer, das zwei verschiedene Laser, den Reporterlaser (mit einer Wellenlänge von 532 nm, > 10mW frequenzverdoppelter Diode und 30 x 60 µm elliptischem Strahl) und den Klassifikationslaser (mit 635 nm, 10 mW Diode; 30 x 60 µm elliptischem Strahl) beinhaltet. Der rote Klassifikationslaser strahlt die Fluoreszenzfarbstoffe in den Mikrosphären an, wodurch eine Klassifikation von verschiedenen Beads und die Assay-Identifikation erfolgt. Parallel dazu regt der grüne Reporterlaser Phycoerythrin des SA-PE-Konjugates zur Bildung des Reportersignals an, dieses wird durch einen Photovervielfacher (PMT) erkannt.

Ein digitaler High-Speed-Prozessor verarbeitet die Daten und berechnet die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) sowie die Konzentration des jeweiligen Proteins (in pg/ml). Die Konzentration des untersuchten Biomarkers, gebunden an entsprechende Beads, ist proportional zur MFI des Reportersignals.

Die Konzentrationen von 23 Zytokinen wurden mit Hilfe des BIO-PLEX PRO MOUSE CYTOKINE 23-PLEX ASSAY Kit nach Angaben des Herstellers und mit dem bereits beschriebenen Bio-Plex® 200 System bestimmtbestimmt (Abb. 12). Die Liste der zu analysierenden Zytokine beinhaltet (Abkürzungen im Abkürzungsverzeichnis):

IL-1 β	IL-5	Eotaxin	KC	RANTES
IL-1 α	IL-6	IL-17A	MCP-1	TNF- α .
IL-2	IL-9	G-CSF	MIP-1 α	IL-13
IL-3	IL-10	GM-CSF	MIP-1 β	
IL-4	IL-12 (p40)	IFN- γ	IL-12 (p70)	





F.  Fluoreszenzgefärbte Mikrosphären (beads) mit den spezifischen Antikörpern

 Verschiedene Proteine (Interleukine)

 Biotinylierte Detektionsantikörper

 Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat

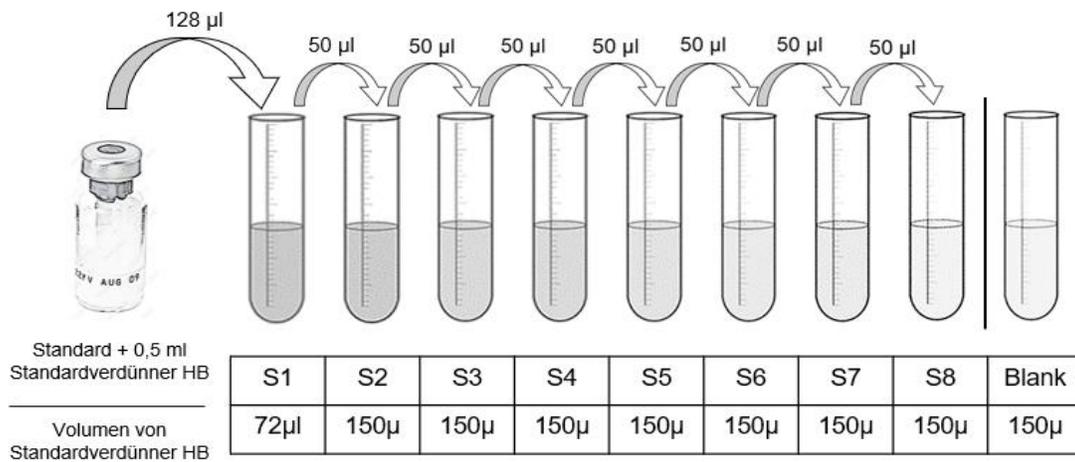
Abbildung 11: Prinzipien des Bio-Plex Immunoassays

- A. Fluoreszenzgefärbte Beads mit den spezifischen Antikörpern auf der Oberfläche, Zugabe von Serum mit verschiedenen Proteinen.
- B. Die Proteine werden an spezifischen Beads durch Antikörper gebunden, Zugabe der biotylinierten Detektionsantikörper.
- C. Entstehung vom Bead-Antikörper-Antigen-biotylinierten Antikörper-Komplex (BAABAK), Zugabe vom Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat (SA-PE).
- D. Das SA-PE Konjugat wird durch Biotin an BAABAKs stabilisiert. PE und die Farbstoffe der Mikrosphären werden durch den roten und grünen Laser angeregt.
- E. Die Beads werden durch ihre spektrale Adresse identifiziert und ein Reportersignal von PE gleichzeitig errechnet.
- F. Legende

Planung eines optimalen Plattenlayouts mit Dubletten für Standards und Proben

Vorbereitung der Serumproben. Nach Auftauen der bei -80°C gelagerten Proben erneute Zentrifugation $10.000 \times g$ für 10 Minuten. Verdünnung 1:4 ($50 \mu\text{l}$ Serum+ $150 \mu\text{l}$ Bio-Plex-Sample Verdüner ggf. 40/120)

Vorbereiten von Verdünnungsreihen des Standards S1-S8
(mit Standardverdüner) PMT-Setting für die Standardkurve: Niedrige PMT



Waschen der Platte mit $100 \mu\text{l}$ Bio-Plex-Assay-Puffer, Abtrocknen der Platte

Vorbereitung der Mikrosphären: $5175 \mu\text{l}$ Assay Puffer + $575 \mu\text{l}$ (10x Beads) in 15 ml Zentrifugenröhrchen (10-fache Verdünnung im Vergleich zur Ausgangslösung mit Beads)

$50 \mu\text{l}$ der Lösung mit Beads in jedes Well der Mikroplatte transferieren
+ die Platte **2-mal** mit $100 \mu\text{l}$ Bio-Plex-Wasch-Puffer mithilfe der magnetischen Platten waschen

Zugabe von S1-S8 Standards, Blindproben, Proben 1-28 in Dubletten in die entsprechenden Wells der Mikroplatte, Abdichten der Platte mit einer Folie

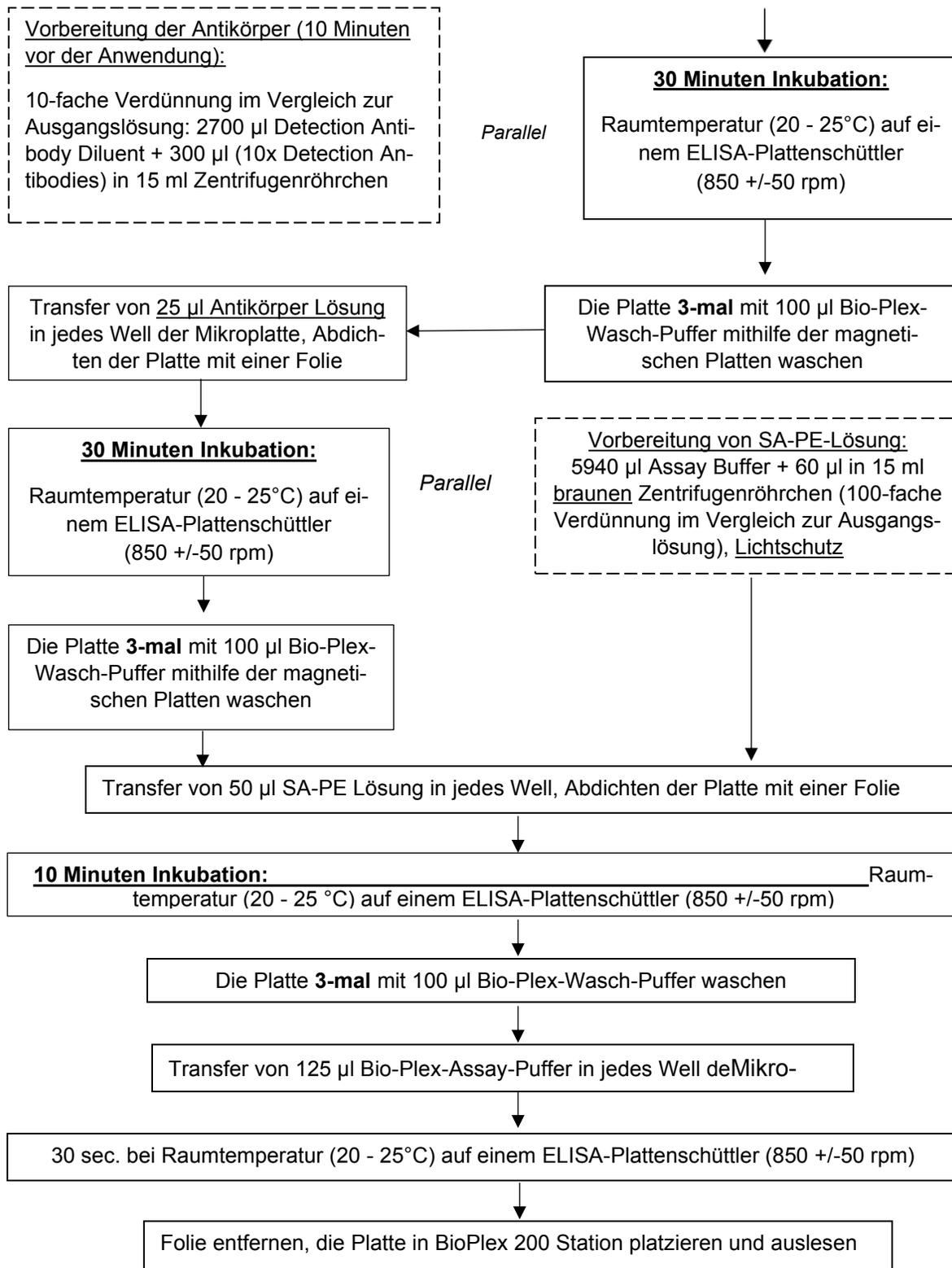


Abbildung 12: Schritte eines Bio-Plex Protokolls (alle Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis beschrieben)

F. Histopathologische Untersuchung der Proben

Alle Tumore werden in 4 % Formalin und Paraffin eingebettet. Für die Histologie werden 3 -5 µm dicke Schnitte aus dem Zentrum des Tumors entnommen. Es erfolgt eine Färbung des ersten Schnittes aus jedem Tumor zunächst mit Hämatoxylin und Eosin (H&E). Die Immunhistochemie wird auf einem automatisierten Immunfärber (Ventana Medical Systems, Inc.) gemäß den Protokollen des Unternehmens für offene Verfahren mit leichten Modifikationen durchgeführt. Die histopathologischen Schnitte werden mit den Antikörpern CD3 (Clone SP7, DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH u. Co. KG, Hamburg, Deutschland), FoxP3 (Abcam ab215206 1:100), MAB1 (Hypoxyprobe, Burlington, Massachusetts, USA) und CAIX (Abcam plc, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, UK) gefärbt. Die Immunhistochemie für CD3, FoxP3 und CAIX erfolgt nach dem Protokoll Nr. 771 (Anhang E.) und für MAB1 nach dem Protokoll Nr. 991 (Anhang F.). Geeignete Positiv- und Negativkontrollen werden durchgeführt, um die Validität der Färbung zu bestätigen. Alle Proben werden mit dem Nanozoomer (Hamamatsu) gescannt und mit den Programmen Case Viewer, NDP.view 2 und Adobe Photoshop CS6 bearbeitet.

a) Nekrose

Die Größe des Tumors wird durch eine Vermessung seiner Fläche auf dem H&E Schnitt errechnet. Die nekrotischen Areale werden ebenfalls auf den H&E Schnitten mit Hilfe o. g. Applikationen identifiziert, markiert und durch Vermessung der Fläche quantifiziert. Im Anschluss wird der prozentuelle Anteil der Nekrosen im Verhältnis zur Gesamtfläche des Tumors berechnet.

b) Hypoxie

CAIX (Carboanhydrase IX) ist ein endogener Hypoxiemarker sowohl in humanem als auch in murinem Gewebe. In vitro benötigt CAIX sechs Stunden, um eine maximale Expression unter Anoxie zu erreichen. Die Halbwertszeit von CAIX beträgt 38 bis über 96 Stunden, sodass die Konzentration von CAIX sehr langsam auf Reoxygenierung reagiert und auf chronische Hypoxie im Tumor hinweisen kann (Kyung et al., 2007). Im Gegensatz dazu reagiert die Pimonidazol-Färbung schnell auf Änderungen der Tumorphypoxie und Hypoxie-modifizierende Interventionen aufgrund der direkten Redox-Reaktion im hypoxischen Gewebe (Kyung et al., 2007).

Angesichts der diffusen Natur der Hypoxie selbst können die Grenzen der hypoxischen Bereiche nicht genau quantifiziert werden. Wir haben aus dem Grund ein Bewertungssystem für eine semiquantitative Analyse der Hypoxie etabliert:

- +: wenige kleine hypoxische Bereiche
- ++: moderate hypoxische Bereiche
- +++ : große hypoxische Bereiche

c) Infiltration durch T-Zellen

Schließlich wird das entzündliche Infiltrat in beiden Gruppen mittels Immunhistochemie mit Anti-CD3 Antikörpern untersucht. Die Analyse der Infiltration von CD3-positiven T-Zellen erfolgt separat jeweils für die Peripherie und das Zentrum des Tumors.

Die Analyse der Infiltration im Zentrum erfolgt quantitativ durch Zählen der CD3-positiven Zellen unter 400-facher Vergrößerung in insgesamt 10 Hauptgesichtsfeldern, wobei dann ein Durchschnittswert ermittelt wird.

Die Tumorperipherie zeigt sich im Vergleich zum Tumorzentrum sehr inhomogen, sodass zur Beurteilung der T-Zellinfiltration eine semiquantitative Analyse etabliert

wird. Die gesamte Tumorperipherie wird unter 400-facher Vergrößerung beobachtet und anhand der unten beschriebenen Skala klassifiziert:

- : keine T-Zellen feststellbar
- +: wenige T-Zellen
- ++: moderate T-Zellinfiltration
- +++ : starke T-Zellinfiltration

Bei grenzwertigen Befunden können zwei Werte angegeben werden (beispielsweise +/++ , ++/+++ , -/+).

d) Infiltration durch Regulatorische T-Zellen (Treg) (Suppressor-T-Zellen)

Die Treg-Zellen werden mittels Immunhistochemie mit Anti-FoxP3 Antikörpern identifiziert. Im Tumorzentrum wird die Quantifizierung der FoxP3-positiven Zellen in 10 zufällig ausgewählten Hauptgesichtsfeldern (unter 200-facher Vergrößerung) durchgeführt, wobei dann ein Durchschnittswert ermittelt wird. Zusätzlich wird die Menge der FoxP3-positiven Zellen auch im Tumorrand bewertet als:

- : negativ,
- +: mild und
- ++: moderat.

G. Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgt mittels SAS-Program Version 9.4; Hersteller SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, U.S.)

Zur Deskription der metrischen Variablen werden im Bericht folgende Größen verwendet: Anzahl, Mittelwert, Standardabweichung, Extrema (Min und Max) und Median. Die Verteilung kategorialer Daten wird mittels absoluter und relativer Häufigkeiten beschrieben.

Zum Vergleich der Lage der Verteilung einer metrischen Variablen von unabhängigen Gruppen wird zunächst mit dem Shapiro-Wilk Test überprüft, ob die Daten normalverteilt sind. Im Falle der Ablehnung der Normalverteilungsannahme kommt bei zwei Gruppen der Mann-Whitney-U Test, bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis Test zur Anwendung.

Zum Vergleich der Häufigkeitsverteilungen einer kategorialen Variablen von unabhängigen Gruppen wird der Chi-Quadrat-Test oder der exakte Test nach Fisher (falls es erwartete Häufigkeiten kleiner als fünf gibt) verwendet.

Die Korrelation zwischen zwei Datensätzen wird mit Pearson (für metrische Variablen) und Spearman (ordinale und metrische Variablen) bewertet. Für die Korrelation zwischen dem Nekrosetyp (dominante Cord/Cord nicht dominierend) und der T-Zellinfiltration innerhalb des Tumorzentrums werden die punktbiseriale Korrelation (PBC) und für die T-Zellinfiltration in der Peripherie die biseriale Rangkorrelation (BRC) berechnet.

Alle Tests werden zweiseitig gerechnet. Die Analyse erfolgt rein explorativ. Aus diesem Grund werden die p-Werte rein deskriptiv interpretiert.

3. Ergebnisse

A. Studienpopulation

Es werden insgesamt 28 Tiere in den Versuch eingeschlossen, davon 14 in die Kontroll- und 14 in die RIC-Gruppe. Die Geschlechtsverteilung in beiden Gruppen beträgt 50 % (7) männliche und 50 % (7) weibliche Mäuse.

Zwei Tiere müssen anhand der humanen Endpunkte ausgeschlossen werden: Das erste aufgrund der entstandenen Paraparese der unteren Extremitäten (tumorbedingte Funktionseinschränkungen) und Gewichtsabnahme von 10 %. Die zweite ausgeschlossene Maus entwickelt eine ausgeprägte Tumorexulzeration. Bei zwei anderen Tieren kommt es zu keinem Tumorwachstum nach Injektion der B16-OVA Zellen. Die Wachstumsrate von Tumoren nach Injektion von B16-OVA Zellen beträgt 93,75 % (30 von 32 Tieren).

Das Experiment wird in der Kontrollgruppe 19 Tage und in der RIC-Gruppe 18 Tage (Medianwerte) nach Implantation der Tumorzellen eingeleitet ($p > 0,05$). Das mediane Alter beim Einleiten des Versuchs ist 11 Wochen in der Kontroll- und 12 Wochen in der RIC-Gruppe ($p > 0,05$). Das mediane Gewicht beträgt 22,8 g in der Kontroll- und 23,8 g in der RIC-Gruppe ($p > 0,05$) (Tab. 4).

B. Mikrozirkulationsmessungen mit O2C

Die mediane Körpertemperatur der Mäuse während des Versuchs beträgt 37°C in beiden Gruppen und zeigt keine relevanten Unterschiede zwischen RIC- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U Test [MWU], $p = 0,944$) (Tab. 2). Die mediane Sauerstoffsättigung (SpO_2) gemessen mit einem Pulsoximeter (PalmSAT® 2500A VET mit Vet Wrap Sensor) direkt vor dem Versuch bei den RIC-Tieren unter Narkose beträgt 97 % (94 – 98 %). Die mediane Sauerstoffsättigung (SpO_2) der ischämischen Pfote gemessen am Ende der 1. RIC-Phase erreicht einen Median von 79 % (75 – 82 %). Der Unterschied ist statistisch relevant (Wilcoxon Test, $p = 0,0003$) und bestätigt

eine Ischämie durch die Anwendung des Low-Pressure-Tourniquet. Der mediane Tumordurchmesser, gemessen direkt vor dem Versuch, erreicht 8,6 mm in der Kontroll- und 8,88 mm in der RIC-Gruppe. Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (MWU, $p > 0,05$) (Tab. 2).

Tabelle 2: Übersicht und Vergleich der gewählten Daten der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, STD (Standardabweichung), Minimum (Min), Medianwert und Maximum (Max), sowie p-Werte der statistischen Analyse (*Mann-Whitney-U Test)

Kategorie	Gruppe	Anzahl der Tiere	Mittelwert	STD	Min	Median	Max	p-Wert*
Zeit zwischen Implantation von Tumorzellen und dem Experiment (Tage)	Kontrolle	14	20,5	8,2	10,0	19,0	38,0	1*
	RIC	14	20,3	7,0	13,0	18,0	36,0	
Alter beim Experiment (Wochen)	Kontrolle	14	11,1	1,8	9,0	11,0	15,0	0,66*
	RIC	14	11,3	1,6	9,0	12,0	14,0	
Gewicht (g)	Kontrolle	14	23,1	2,8	19,4	22,8	29,0	0,65*
	RIC	14	23,8	3,2	19,0	23,8	28,0	
Durchmesser des Tumors (mm)	Kontrolle	14	8,9	1,1	7,3	8,6	11,0	0,85*
	RIC	14	9,1	1,9	7,2	8,9	15,0	
Temperatur (rektal)	Kontrolle	14	37,0	0,6	36,9	37,0	37,2	0,94*
	RIC	14	37,0	0,2	36,8	37,0	37,4	

a) Vergleich der Perfusionsparameter der RIC- und Kontrollgruppe während der Ausgangsmessung (Baseline)

Der mediane Blutfluss im Gewebe (gemessen in „arbitrary units“ [AU]) während der Baselinephase an der hinteren Pfote beträgt 134,7 AU in der Kontroll- und 129,4 AU in der RIC-Gruppe und weist keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (MWU, $p = 0,77$). Der mediane Blutfluss im Tumorgewebe in der Kontrollgruppe erreicht während der Ausgangsmessung 204,0 AU und 157,7 AU in der RIC-Gruppe. Diese Unterschiede sind ebenfalls statistisch nicht signifikant (MWU, $p = 0,57$) (Tab.3).

Die Sauerstoffsättigung der Pfote weist keine signifikanten Unterschiede zu Beginn des Experiments auf und erreicht einen Median von 52,3 % in der Kontroll- und

59,4 % in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,12$). Auch die Sauerstoffsättigung des Tumors unterscheidet sich nicht relevant zwischen beiden Gruppen mit einem Median von 49,4 % in der Kontroll- und 56,5 % in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,15$) (Tab.3).

Der mediane relative Hämoglobingehalt (rHb) der Pfote, gemessen in sog. „relative absorbance units“ (RAU) beträgt 79,6 RAU in der Kontrollgruppe und 80,6 RAU in der RIC-Gruppe. Diese Unterschiede sind ebenfalls nicht statistisch signifikant (MWU; $p = 0,60$). Der rHb des Tumors in der Baselinephase erreicht einen Median von 49,2 RAU in der Kontroll- und 62,1 RAU in der RIC-Gruppe und zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede (MWU, $p = 0,51$) (Tab.3).

Tabelle 3: Übersicht und Vergleich der Perfusionsparameter in der Baselinephase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Median und Maximum (Max) sowie p-Werte der statistischen Analyse (*Mann-Whitney-U Test)

Kategorie	Gruppe	Anzahl der Tiere	Mittelwert	STD	Min	Median	Max	p-Wert*
<i>Flow Pfote (Baseline)</i>	Kontrolle	14	141,6	47,7	83,0	137,4	240,0	0,77
	RIC	14	145,7	40,8	97,9	129,4	222,5	
<i>Flow Tumor (Baseline)</i>	Kontrolle	14	178,9	70,5	35,1	204,0	258,5	0,57
	RIC	14	171,6	88,3	45,7	157,7	328,8	
<i>SpO₂ Pfote (Baseline)</i>	Kontrolle	14	55,6	11,7	34,2	52,3	75,7	0,12
	RIC	14	61,3	9,3	48,7	59,4	81,3	
<i>SpO₂ Tumor (Baseline)</i>	Kontrolle	14	47,1	15,7	13,3	49,4	72,3	0,15
	RIC	14	55,8	14,2	22,3	56,5	73,1	
<i>rHb Pfote (Baseline)</i>	Kontrolle	14	78,4	9,2	64,4	79,6	93,3	0,60
	RIC	14	80,2	7,6	65,3	80,6	90,4	
<i>rHb Tumor (Baseline)</i>	Kontrolle	14	52,1	21,4	23,4	49,2	84,4	0,51
	RIC	14	58,4	19,6	24,5	62,1	83,1	

- b) Analyse der Perfusionparameter in der Kontrollgruppe (Vergleich der Baseline- und Abschlussphasen, Einfluss der Isoflurannarkose)

Die Isoflurannarkose kann möglicherweise einen Einfluss auf die Perfusionparameter haben. Aus dem Grund werden diese zunächst in der Kontrollgruppe analysiert. Hierfür erfolgt ein Vergleich der Werte der Abschluss- und Baselinephase für die nicht-ischämische Pfote und das Tumorgewebe (Tab. 4, Abb. 13A.).

Tabelle 4: Übersicht der Perfluationsparameter gemessen an der nicht-ischämischen Pfote in der Kontrollgruppe und Vergleich zwischen Baseline- und Abschlussphase mit dazugehörigen minimalen (Min), maximalen (Max) Werten, Mittelwerten, Medianen, Standardabweichung (STD), 25. und 75. Perzentile und p-Werten des Wilcoxon Tests

	<i>Flow Pfote</i>		<i>SO₂ Pfote</i>		<i>rHb Pfote</i>	
	Baseline	Abschluss	Baseline	Ab-schluss	Baseline	Ab-schluss
Min	82,97	43,55	34,16	39,50	64,35	48,19
Max	239,95	284,53	75,74	76,42	93,32	89,25
Mittelwert	141,63	157,15	55,57	61,59	78,42	77,33
STD	47,65	61,39	11,69	10,41	9,18	11,20
Median	137,36	143,86	52,30	64,08	79,62	81,16
25. Perzentile	103,40	122,47	48,07	56,03	69,44	70,86
75. Perzentile	172,74	186,99	67,40	70,13	85,41	85,16
p-Wert (Wilcoxon Test)	0,073		0,06		0,64	

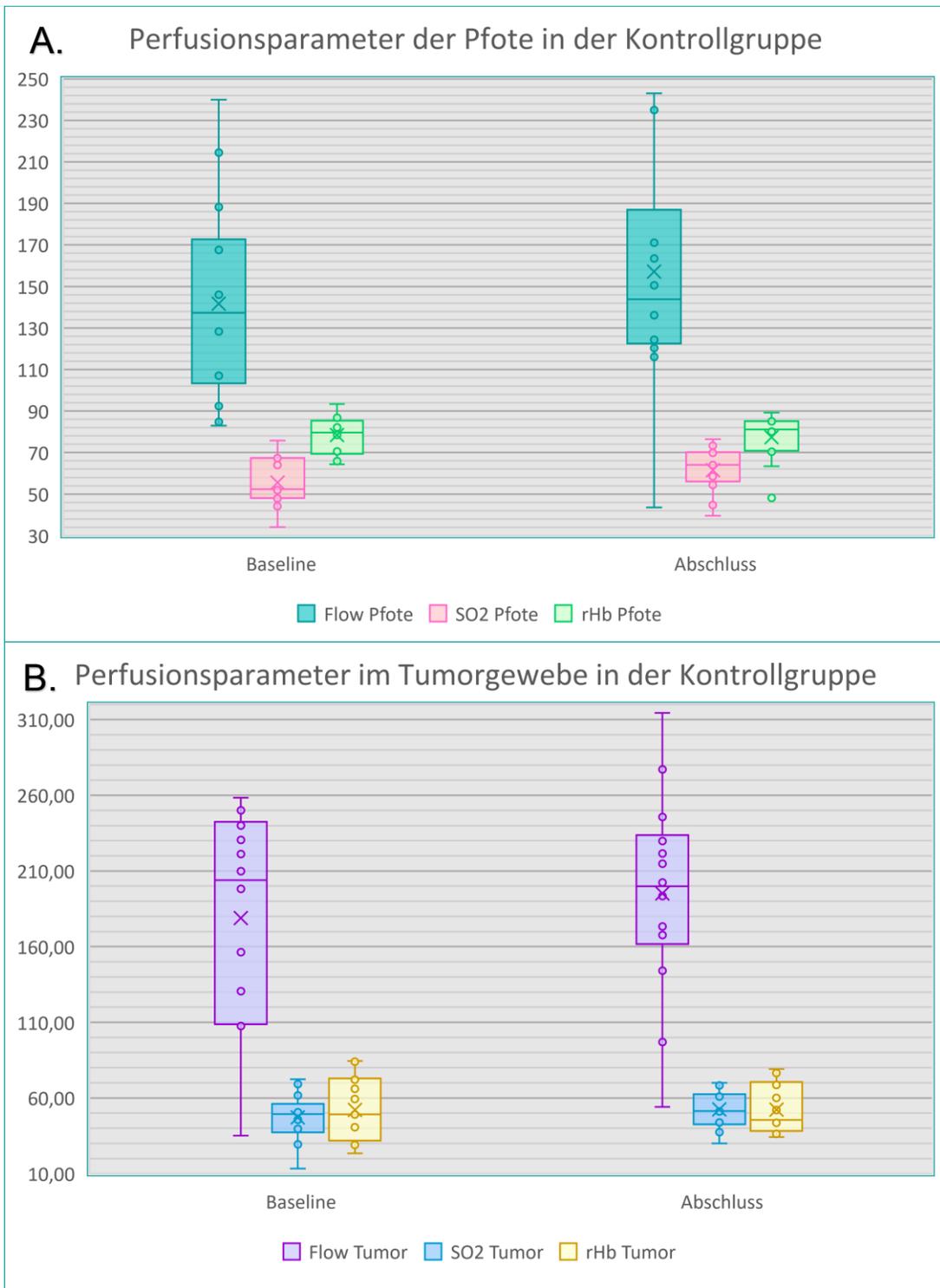


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Werte der Perfusionsparameter Flow [AU], sO_2 [%], rHb [AU] gemessen an der nicht-ischämischen Pfote (A.), im Tumorbereich (B.) in der Kontrollgruppe in der Baseline- und Abschlussphase

Die Isoflurannarkose scheint selbst einen Einfluss auf die Perfusionsparameter in der Kontrollgruppe zu haben. Im gesunden Gewebe (an der nicht-ischämischen Pfote) kommt es zu einer leichten Erhöhung des Flow ($p = 0,07$) und der Sauerstoffsättigung ($p = 0,06$) (Tab. 4, Abb. 13A.). Dies kann aus der leicht vasodilatativen Wirkung von Isofluran resultieren. Dagegen kommt es im Tumorgewebe zu einer signifikanten Erhöhung der Sauerstoffsättigung ($p = 0,035$), während andere Parameter unverändert bleiben (Tab. 5, Abb. 13B.). Da Flow und rHb stabil bleiben, kann vermutet werden, dass die Isoflurannarkose zu einer verminderten Sauerstoffextraktion im Tumorgewebe, also zu einer Reduktion des Sauerstoffverbrauchs, führen kann.

Tabelle 5: Übersicht der Perfusionsparameter gemessen im Tumorbereich in der Kontrollgruppe und Vergleich zwischen Baseline- und Abschlussphase mit dazugehörigen minimalen (Min), maximalen (Max) Werten, Mittelwerten, Medianen, Standardabweichung (STD), 25. und 75. Perzentile und p-Werten des Wilcoxon Tests. Statistisch signifikanter Unterschied der Sauerstoffsättigung des Tumors wurde mit einem Sternsymbol (*) markiert.

	<i>Flow Tumor [AU]</i>		<i>SpO₂ Tumor [%]</i>		<i>rHb Tumor [AU]</i>	
	Baseline	Abschluss	Baseline	Abschluss	Baseline	Abschluss
Min	35,1	54,03	13,32	29,97	23,35	34,21
Max	258,45	314,52	72,27	70,03	84,42	79,16
Mittelwert	178,94	195,20	47,12	52,39	52,05	52,32
STD	70,47	67,51	15,71	12,42	21,41	16,97
Median	203,98	199,97	49,38	51,43	49,15	45,47
25. Perzentile	108,72	161,76	37,33	42,63	31,83	38,25
75. Perzentile	242,51	233,78	56,12	62,46	72,94	70,51
p-Wert (Wilcoxon)	0,12		0,035*		0,27	

- c) Analyse der Perfusionsparameter in der RIC-Gruppe (direkter Vergleich der Baseline- und Abschlussphase)

Analog zur Analyse der Perfusionsparameter in der Kontrollgruppe erfolgt ein Vergleich der Werte in der Abschluss- und Baselinephase für die nicht-ischämische Pfote und das Tumorgewebe in der RIC-Gruppe.

In der RIC-Gruppe kann im intraindividuellen Vergleich kein signifikanter Unterschied der Perfusionsparameter, weder an der nicht-ischämischen Pfote noch im Tumorbereich, festgestellt werden. Blutfluss, Oxygenierung im venös-kapillären Gefäßbett sowie relativer Hämoglobingehalt bleiben in beiden Gruppen stabil (Tab. 6, Tab. 7).

Tabelle 6: Übersicht der Perfusionsparameter gemessen an der nicht-ischämischen Pfote in der RIC-Gruppe und Vergleich zwischen Baseline- und Abschlussphase mit dazugehörigen minimalen (Min), maximalen (Max) Werten, Mittelwerten, Medianen, Standardabweichung (STD), 25. und 75. Perzentile und p-Werten des Wilcoxon Tests

	Flow Pfote [AU]		SpO₂ Pfote [%]		rHb Pfote [AU]	
	Baseline	Abschluss	Baseline	Abschluss	Baseline	Abschluss
<i>Min</i>	97,91	84,55	48,67	40,18	65,31	29,22
<i>Max</i>	222,53	201	81,27	74,09	90,38	89,79
<i>Mittelwert</i>	145,74	138,57	61,34	59,15	80,15	70,17
<i>STD</i>	40,81	38,81	9,32	10,62	7,55	17,77
<i>Median</i>	129,39	132,56	59,36	60,74	80,64	74,61
<i>25. Perzentile</i>	110,5	102,41	54,78	52,97	74,42	62
<i>75. Perzentile</i>	181,82	178,3	68,9	66,55	86,78	82,78
<i>p-Wert (Wilcoxon)</i>	0,83		0,93		0,18	

Tabelle 7: Übersicht der Perfusionsparameter gemessen im Tumorgewebe in der RIC-Gruppe und Vergleich zwischen Baseline- und Abschlussphase mit dazugehörigen minimalen (Min), maximalen (Max) Werten, Mittelwerten, Medianen, Standardabweichung (STD), 25. und 75. Perzentile und p-Werten des Wilcoxon Tests

	Flow Tumor [AU]		SpO₂ Tumor [%]		rHb Tumor [AU]	
	Baseline	Abschluss	Baseline	Abschluss	Baseline	Abschluss
<i>Min</i>	45,71	60,48	22,29	15,73	24,53	26,17
<i>Max</i>	328,79	363,09	73,06	77,29	83,07	87,82
<i>Mittelwert</i>	171,58	182,95	55,76	59,67	58,37	58,95
<i>STD</i>	88,34	83,77	14,20	16,00	19,60	19,54
<i>Median</i>	157,69	179,61	56,48	62,65	62,10	63,98
<i>25. Perzentile</i>	101,79	114,06	45,12	53,65	39,56	38,95
<i>75. Perzentile</i>	228,76	230,99	69,04	70,17	73,58	71,13
<i>p-Wert (Wilcoxon)</i>	0,25		0,12		0,73	

- d) Vergleich der Perfusionsparameter der RIC- und Kontrollgruppe während der Abschlussphase (letzte Reperfusionphase)

Während der letzten Reperfusionphase an der hinteren nicht-ischämischen Pfote beträgt der mediane Blutfluss im Gewebe 143,9 AU in der Kontroll- und 132,6 AU in der RIC-Gruppe und weist keine statistisch relevanten Unterschiede auf (MWU; $p = 0,48$) (Tab.8). Im Tumorgewebe erreicht der mediane Blutfluss in der Kontrollgruppe 200,0 AU, in der RIC-Gruppe 179,6 AU. Diese Unterschiede waren ebenfalls nicht statistisch signifikant (MWU, $p = 0,66$) (Tab 8., Abb. 14).

Die Sauerstoffsättigung der Pfote weist keine signifikanten Unterschiede in der letzten Reperfusionphase des Experiments auf und erreicht einen Median von 64,1 % in der Kontroll- und 60,7 % in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,57$). Die Sauerstoffsättigung des Tumors erreicht einen Median von 51,4 % in der Kontroll- und 62,7 % in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,09$). Obwohl sich die Unterschiede bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ formal nicht signifikant zeigen, weisen sie jedoch eine leichte Tendenz zur besseren Oxygenierung in der RIC-Gruppe auf (Tab.8, Abb. 15).

Der mediane rHb der Pfote erreicht 81,2 RAU in der Kontrollgruppe und 74,6 RAU in der RIC-Gruppe. Diese Unterschiede sind nicht statistisch signifikant (MWU; $p = 0,42$). Der rHb des Tumors erreicht in der letzten Reperfusionphase einen Median von 45,5 RAU in der Kontroll- und 64 RAU in der RIC-Gruppe, ebenfalls ohne statistisch signifikanten Unterschied (MWU, $p = 0,42$) (Tab.8, Abb. 16).

Tabelle 8: Übersicht und Vergleich der Perfusionsparameter aus der Abschlussphase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Maximum (Max), Medianwerte sowie p-Werte der statistischen Analyse (*Mann-Whitney-U Test)

Kategorie	Gruppe	Anzahl der Tiere	Mittelwert	STD	Min	Median	Max	p-Wert*
<i>Flow Pfote (Abschluss)</i>	Kontrolle	14	157,2	61,4	43,6	143,9	284,5	0,48
	RIC	14	138,6	38,8	84,6	132,6	201,0	
<i>Flow Tumor (Abschluss)</i>	Kontrolle	14	195,2	67,5	54,0	200,0	314,5	0,66
	RIC	14	183,0	83,8	60,5	179,6	363,1	
<i>SpO₂ Pfote (Abschluss)</i>	Kontrolle	14	61,6	10,4	39,5	64,1	76,4	0,57
	RIC	14	59,1	10,6	40,2	60,7	74,1	
SpO₂ Tumor (Abschluss)	Kontrolle	14	52,4	12,4	30,0	51,4	70,0	0,09
	RIC	14	59,7	16,0	15,7	62,7	77,3	
<i>rHb Pfote (Abschluss)</i>	Kontrolle	14	77,3	11,2	48,2	81,2	89,3	0,42
	RIC	14	70,7	17,8	29,2	74,6	89,8	
<i>rHb Tumor (Abschluss)</i>	Kontrolle	14	52,3	17,0	34,2	45,5	79,2	0,42
	RIC	14	58,9	19,5	26,2	64,0	87,8	

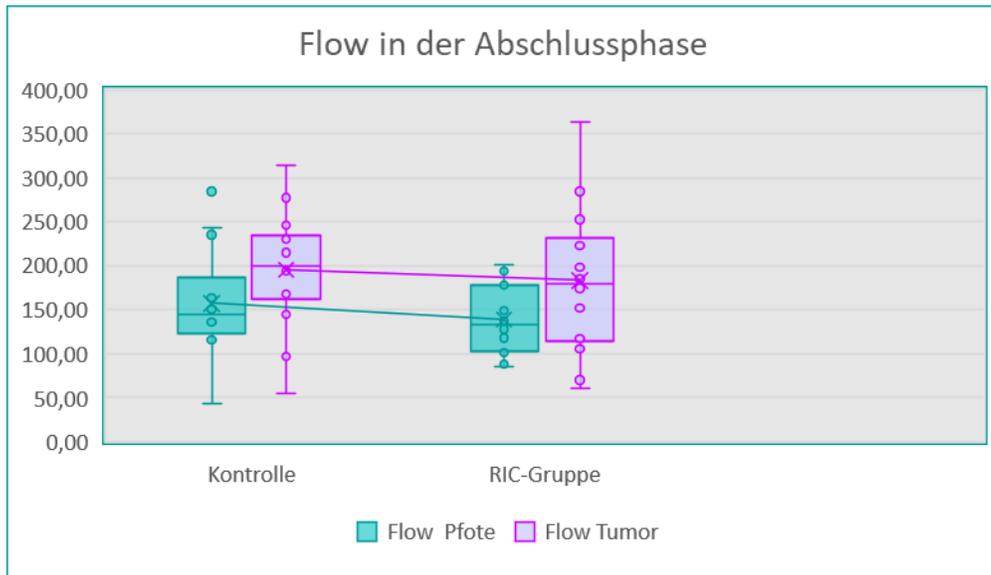


Abbildung 14: Darstellung der Flow-Werte [AU] in der Abschlussphase. Die Unterschiede zwischen RIC- und Kontrollgruppe sind statistisch nicht signifikant mit $p = 0,48$ (MWU) für Flow an der Pfote und $p = 0,66$ für Flow im Tumorgewebe (MWU).

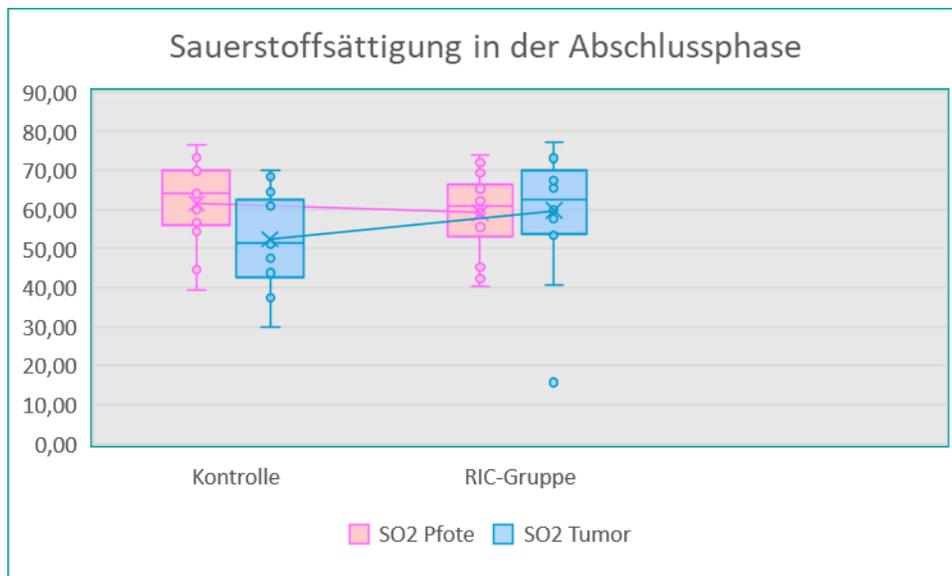


Abbildung 15: Darstellung der Sauerstoffsättigung [%] in der Abschlussphase. Die Unterschiede zwischen RIC- und Kontrollgruppe zeigen eine leichte Tendenz zur besseren Sauerstoffsättigung im Tumorgewebe mit $p = 0,09$ (MWU). An der Pfote sind die Unterschiede statistisch nicht signifikant mit $p = 0,57$ (MWU).

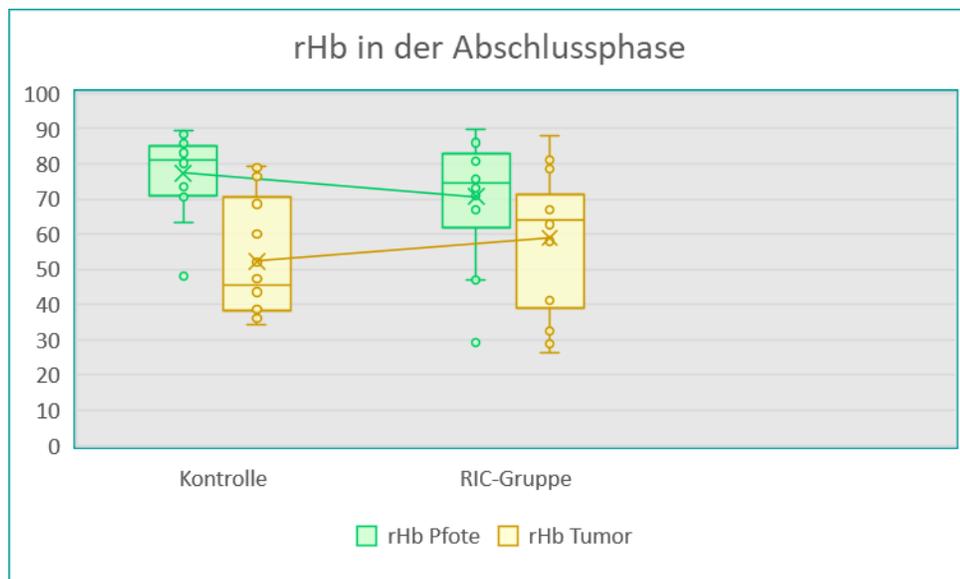


Abbildung 16: Darstellung des relativen Hämoglobingehalts [AU] in der Abschlussphase. Die Unterschiede zwischen RIC- und Kontrollgruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede, weder an der Pfote (MWU, $p = 0,42$) noch im Tumorgewebe (MWU, $p = 0,42$).

- e) Vergleich der Unterschiede (delta = Differenz zwischen den Abschluss- und Baselinewerten) der folgenden Perfusionsparameter zwischen der RIC- und Kontrollgruppe

Um die Wirkung von RIC auf die Mikrozirkulation zu bestimmen, werden die Unterschiede (sog. delta) der folgenden Parameter zwischen der Baseline- und der letzten Reperfusionphase in der RIC- und der Kontrollgruppe verglichen. Die Werte aus der Reperfusionphase in der RIC-Gruppe entsprechen hier den Werten aus den letzten 5 Minuten der Narkosezeit in der Kontrollgruppe.

Der mediane Anstieg (delta) des mikrovaskulären Blutflusses innerhalb des Tumors beträgt 17,91 AU in der Kontrollgruppe und 12,95 AU in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,7$), während der an der hinteren Pfote gemessene Fluss in der Kontrollgruppe um 22,92 AU und in der RIC-Gruppe um 7,3 AU zunimmt ($p = 0,148$). Diese Differenzen des Blutflusses sind nicht signifikant (Tab. 9., Abb. 17).

Der mediane Unterschied (delta) der Oxygenierung der nicht-ischämischen Hintergliedmaße betrug 4,55 % in der Kontrollgruppe und 2,7 % in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,15$), während die Oxygenierung des Tumors um 1,06 % in der Kontroll- und um 3,14 % in der RIC-Gruppe ansteigt (MWU, $p = 0,87$). Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant (Tab. 9., Abb. 17).

Darüber hinaus erreicht die mediane Veränderung der relativen Hämoglobingewebekonzentration innerhalb der nicht-ischämischen Extremität 0,83 RAU in der Kontrollgruppe und -1,38 RAU in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,32$). Der mediane Anstieg des rHb innerhalb des Tumors beträgt 1,87 in der RIC- und 3,0 RAU in der Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,95$). Die RIC- und Kontrollgruppe unterscheiden sich bzgl. der Veränderungen des rHb der Pfote und des Tumors nicht signifikant (Tab. 9., Abb. 17).

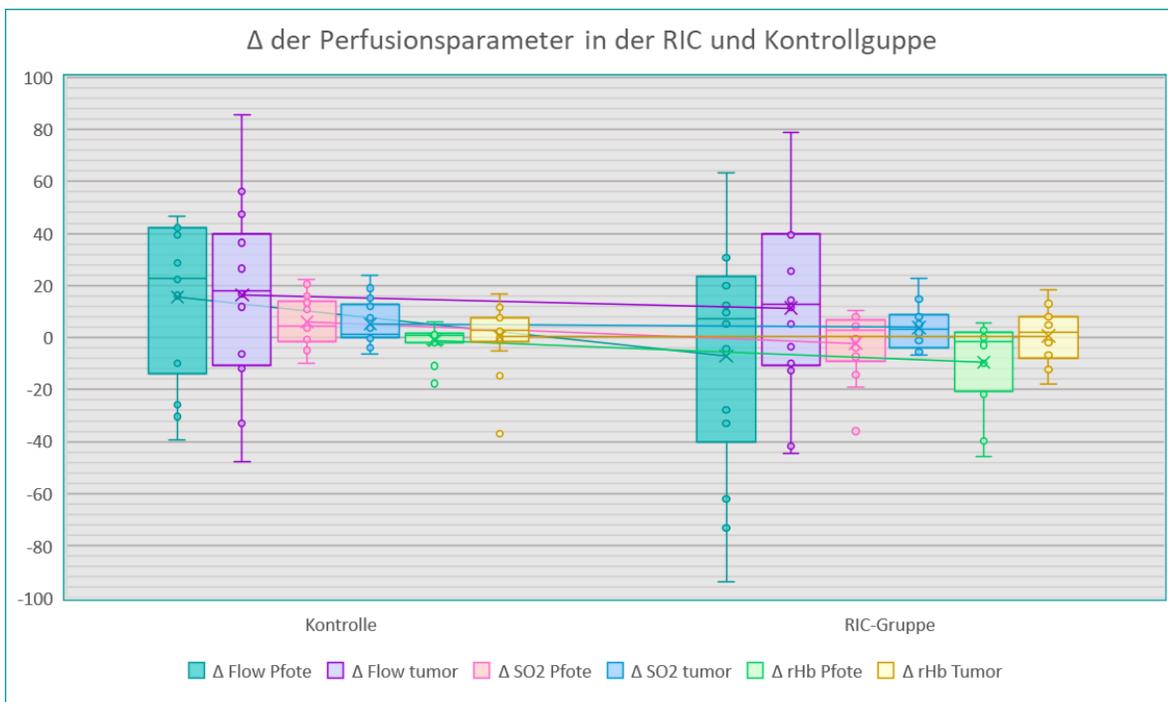


Abbildung 17: Der Box-plot zeigt einen Anstieg der Perfusionsparameter Flow [AU], sO₂ [%], rHb [AU] in der RIC- und in der Kontrollgruppe. Es können mittels MWU-Tests zwischen beiden Gruppen keine relevanten Unterschiede festgestellt werden (Δ Flow Pfote: $p = 0,11$; Δ Flow Tumor: $p = 0,7$; Δ SO₂ Pfote: $p = 0,15$; Δ SO₂ Tumor, $p = 0,87$; Δ rHb Pfote: $p = 0,32$, Δ rHb Tumor: $p = 0,95$).

Tabelle 9: Übersicht und Vergleich der Delta-Werte (Abschlussphase - Baselinephase) der Perfusionsparameter

Flow [AU], sO₂ [%], rHb [AU] in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Medianwert und Maximum (Max), sowie p-Werte der statistischen Analyse. Direkte Werte des Anstiegs werden mit einem p-Wert des Mann-Whitney-U (MWU) Tests verglichen und mit einem Stern markiert (*). Der Vergleich des prozentuellen Anstiegs der Werte der Perfusionsparameter im Verhältnis zur Baselinephase wird mittels MWU-Testes analysiert und mit zwei Sternen markiert (**).

	<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>STD</i>	<i>Min</i>	<i>Median</i>	<i>Max</i>	<i>p-Wert MWU *</i>	<i>Median des prozentuellen Anstiegs</i>	<i>p-Wert MWU **</i>
Δ Flow Pfote	Kontrolle	14	15,53	29,84	-39,4	22,92	46,72	0,11	16,2%	0,2
	RIC	14	-7,17	44,96	-94	7,30	63,19		5,1%	
Δ Flow Tumor	Kontrolle	14	16,26	35,98	-47,7	17,91	85,48	0,7	10,7%	0,81
	RIC	14	11,36	33,39	-44,3	12,95	78,76		11,8%	
Δ SpO ₂ Pfote	Kontrolle	14	6,02	9,92	-9,98	4,55	22,42	0,15	6,3%	0,2
	RIC	14	-2,20	13,14	-36	2,70	10,54		4,1%	
Δ SpO ₂ Tumor	Kontrolle	14	5,27	8,95	-6,18	1,06	23,97	0,87	2,2%	0,73
	RIC	14	3,91	8,37	-6,56	3,14	22,81		4,9%	
Δ rHb Pfote	Kontrolle	14	-1,09	6,10	-17,7	0,83	6,07	0,32	1%	0,35
	RIC	14	-9,44	16,51	-45,7	-1,38	5,60		-1,8%	
Δ rHb Tumor	Kontrolle	14	0,27	12,99	-37	3,00	16,68	0,95	5,3%	0,67
	RIC	14	0,58	10,51	-17,9	1,87	18,20		1,3%	

f) Mikrozirkulation des Tumors im Verhältnis zum normalen Gewebe

Neben dem direkten Vergleich der prä- und postinterventionellen Perfusionsparameter ist es wichtig, eine Echtzeitbeurteilung der Tumormikrozirkulation in Relation zum normalen Gewebe zu beschreiben. Die Mikrozirkulation im Gewebe wird jede Sekunde durch mehrere Faktoren beeinflusst und hängt von der aktuellen Funktion des Kreislaufsystems und dem aktuellen Gewebemetabolismus ab. Um diese besondere Dynamik und die Zusammenhänge der Perfusion zu adressieren, werden unten beschriebene Ratios in der Baseline- und Abschlussphase berechnet und zwischen Kontroll- und RIC-Gruppe verglichen.

i. Ausgangsmessung (Baseline)

Das Verhältnis des Blutflusses im Tumorgewebe zur Pfote wird durch die Ratio Flow Tumor/Flow Pfote definiert, diese erreicht in der Baselinephase einen Medianwert von 1,43 in der Kontroll- und 1,02 in der RIC-Gruppe. Diese Analyse weist jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf (MWU, $p = 0,535$) (Tab. 10).

Die Ratio Sauerstoffsättigung Tumor/Pfote erreicht in der Baselinemessung einen Median von 0,81 in der Kontroll- und 0,89 in der RIC-Gruppe und unterscheidet sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant (MWU, $p = 0,346$) (Tab. 10).

Die mediane Ratio rHb Tumor/Pfote beträgt 0,68 in der Kontroll- und 0,75 in der RIC-Gruppe. Die beiden Gruppen unterscheiden sich bezüglich dieser Ratio ebenfalls nicht signifikant (MWU, $p = 0,448$) (Tab. 10).

Tabelle 10: Übersicht und Vergleich der Ratios (Verhältnis der Perfusionsparameter des Tumorgewebes zur nicht-ischämischen Pfote) während der Baselinephase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Medianwert und Maximum (Max) sowie p-Werte des Mann-Whitney-U Tests.

<i>Ratio Tu- mor/Pfote</i>	<i>Gruppe</i>	<i>Anzahl der Tiere</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>STD</i>	<i>Min</i>	<i>Median</i>	<i>Max</i>	<i>p- Wert</i>
<i>Flow (Base- line)</i>	Kontrolle	14	1,37	0,69	0,42	1,43	2,49	0,54
	RIC	14	1,20	0,63	0,47	1,02	2,56	
<i>SpO₂ (Base- line)</i>	Kontrolle	14	0,85	0,29	0,39	0,81	1,57	0,35
	RIC	14	0,92	0,27	0,42	0,89	1,50	
<i>rHb (Base- line)</i>	Kontrolle	14	0,67	0,30	0,30	0,68	1,19	0,45
	RIC	14	0,72	0,23	0,31	0,75	0,98	

ii. Abschlussphase (letzte Reperfusionphase)

Die Ratio Flow Tumor/Pfote erreicht einen Medianwert von 1,42 in der Kontroll- und 1,15 in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,696$), dies ist nicht signifikant (Tab. 11).

Die Ratio rHb Tumor/Pfote beträgt in der Abschlussphase 0,59 in der Kontroll- und 0,79 in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,161$) (Tab. 11).

Es zeigt sich jedoch, dass die Oxygenierung des Tumorgewebes im Verhältnis zur Sauerstoffsättigung der nicht-ischämischen hinteren Pfote, während der letzten Reperfusionphase in der RIC- signifikant höher als in der Kontrollgruppe ist. Die mediane Oxygenierung des Tumors beträgt 81 % der Sauerstoffsättigung der nicht-ischämischen Pfote in der Kontrollgruppe im Vergleich zu 96 % in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,03$) (Tab. 11).

Tabelle 11: Übersicht und Vergleich der Ratio (Verhältnis der Perfusionsparameter des Tumorgewebes zur nicht-ischämischen Pfote) während der Abschlussphase in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit Mittelwert, Standardabweichung (STD), Minimum (Min), Medianwert und Maximum (Max), sowie p-Werte des Mann-Whitney-U Tests.

Ratio Tu- mor/Pfote	Gruppe	Anzahl der Tiere	Mittel- wert	STD	Min	Median	Max	p- Wert
Flow (Abschluss- phase)	Kontrolle	14	1,36	0,50	0,41	1,42	2,07	0,7
	RIC	14	1,40	0,77	0,59	1,15	2,83	
SpO2 (Abschlussphase)	Kontrolle	14	0,85	0,16	0,66	0,81	1,14	0,03
	RIC	14	1,03	0,32	0,27	0,96	1,68	
rHb (Abschlussphase)	Kontrolle	14	0,70	0,26	0,43	0,56	1,12	0,16
	RIC	14	0,86	0,33	0,46	0,79	1,67	

- g) Auswirkung des RICs auf normales Gewebe - Ratio Sauerstoffsättigung zu relativem Hämoglobingehalt

Die Ratio der Sauerstoffsättigung zum relativen Hämoglobingehalt an der nicht-ischämischen Pfote erreicht in der Baselinephase einen Median von 0,76 und in der Abschlussphase einen Median von 0,81. Dieser Unterschied zeigte sich statistisch signifikant (Wilcoxon-Test, $p = 0,049$).

C. Histologische Analyse

Die Tumoren werden in allen Fällen detektiert und sind von Haut, Weichteilgewebe und Muskeln bedeckt. Obwohl nicht eingekapselt, sind die Tumoren im Allgemeinen gut umschrieben. Die Tumorzellen sind groß mit rundem Kern, offenem Chromatin,

mehreren klaren Nukleoli und moderater Menge an Zytoplasma. Reichliche Mitosen und Apoptose werden in allen Tumoren beobachtet.

D. Nekrose

Zwei RIC-Proben können für die Messung der Nekrosefläche nicht berücksichtigt werden, da die Proben teilweise fragmentiert sind. Die gemessene Nekrosefläche erreicht in der Kontrollgruppe einen Median von 25,7 % und in der RIC-Gruppe 26 % und zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (MWU, $p = 0,82$).

Die Kontrolltumoren zeigen jedoch häufiger periphere und zentrale Nekrosen. Trotz des sehr ähnlichen prozentuellen Nekrose-Anteils gibt es einen qualitativen Unterschied im Nekrosemuster. Die Nekrose in den meisten Tumorproben aus der RIC-Gruppe ist in Schnüren (Cords) angeordnet, wobei das periphere und zentrale Nekrosemuster häufiger in der Kontrolltumoren beobachtet wird (exakter Fisher Test, $p = 0,03$) (Tab. 12., Abb. 18., Abb. 19).

Tabelle 12: Darstellung der histopathologischen Untersuchung der Tumorproben in der Kontroll (Ko.)- und RIC-Gruppe inklusive Identifikationsnummer (ID-Nr.) im Experiment mit ausgewählten Daten der untersuchten Tiere. Zwei RIC-Proben (11 und 12) werden für die Messung der Nekrosefläche nicht berücksichtigt, da die Proben teilweise fragmentiert sind. HPF: high power field,

Gruppe und ID-Nr.	Alter in Wochen	Gewicht (g)	Tumor Größe (mm)	CD3+ Zellen in der Tumor Peripherie	CD3+ Zellen/HPF Tumorzentrum	Mab1	CAIX	Nekrose (%)	Nekrose Muster
Ko. 1	9,5	25,3	10,5	+ / ++	3,1	++	+++	20,52	peripher
Ko. 2	9,5	25,1	11	+	0,8	+	+++	11,03	peripher
Ko. 3	9,5	19,4	8,35	+	1,7	+	+++	6,49	peripher
Ko. 9	11,5	22	8,5	+	1,2	+++	+++	43,09	zentral
Ko. 13	9	22,5	8,5	+ / ++	1,8	++	+++	9,24	cords
Ko. 16	14	23,3	8,5	+ / +++	1,5	++	+++	47,81	zentral
Ko. 18	9,5	23	9,5	+	1,8	++	+++	54,41	peripher + zentral
Ko. 19	14,5	26,6	10,0	+ / +++	3,7	+++	+++	31,36	peripher + cords
Ko. 20	10	20	7,25	+ / +++	1,9	++	+++	30,92	peripher + cords
Ko. 22	10,5	24,5	8,7	++	1,8	+++	+++	36,73	peripher + cords
Ko. 24	11	20,1	7,5	+	1,5	++	+++	8,42	cords
Ko. 26	11,5	20,5	8,5	++	1,5	+	+++	11,1	cords
Ko. 27	12	22,2	9,25	+ / ++	1,1	++	+++	9,66	cords
Ko. 29	13,7	29	9,0	+ / ++	1,0	+	+++	32,23	cords
RIC 4	9,5	19,8	9,5	+	2,9	++	+++	14,65	peripher + zentral
RIC 6	10	22	8,0	++	1,4	+++	+++	24,69	cords
RIC 7	12	26,8	10	++	2,2	+++	+++	36,62	cords
RIC 8	13	28	9,0	+ / +++	5,5	+++	+++	32,7	cords
RIC 10	12	22,8	9,5	- / +	1,8	+++	+++	23,59	cords
RIC 11	12	24,8	15,0	+ / ++	3,7	+++	++		cords
RIC 12	12	24,8	8,75	+ / +++	4,7	++	++		cords
RIC 14	9	19	7,75	+	3,1	+++	+++	39,84	zentral
RIC 15	9	21,5	8,5	+ / +++	2,8	+++	+++	27,1	cords
RIC 17	14	27,1	8,0	+++	4,5	+	+++	6,45	cords
RIC 21	10	21,6	9,0	+ / +++	4,1	++	+++	24,86	cords
RIC 23	11	20,4	7,5	+	2,0	+	+++	6,86	cords
RIC 25	11,5	26,7	9,25	+ / ++	2,0	+	+++	31,74	zentral
RIC 28	13,5	28	7,2	+ / ++	1,1	+	+++	60,13	peripher

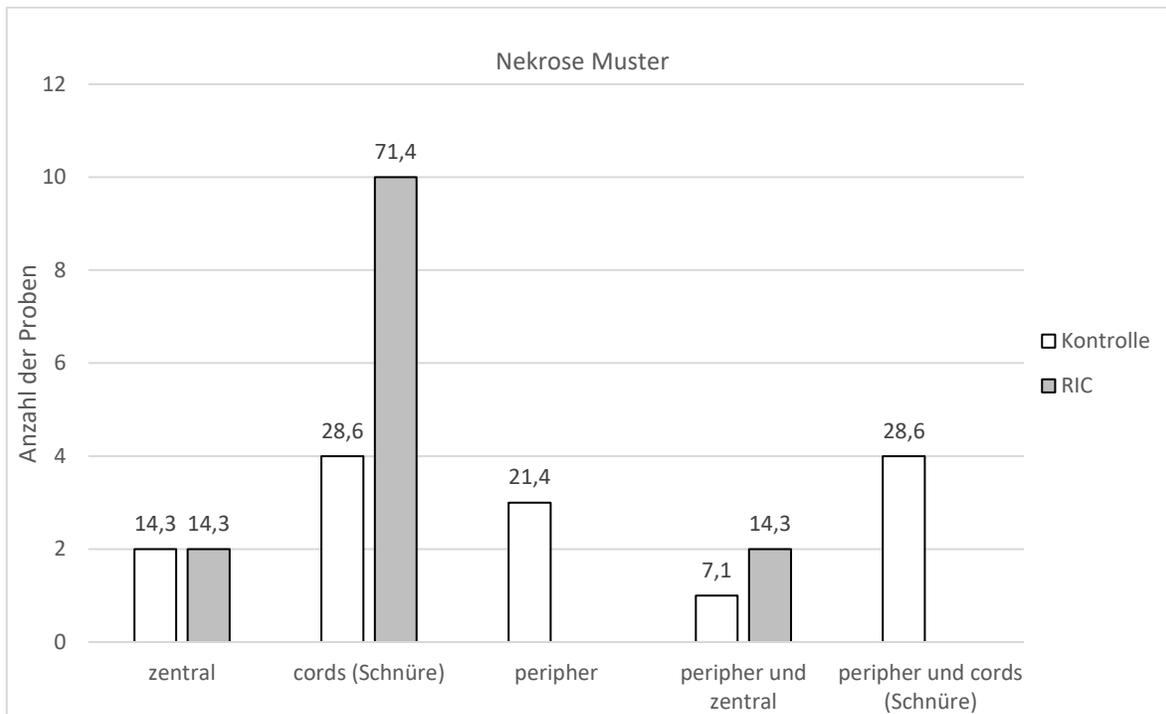


Abbildung 18: Verteilung verschiedener Nekrosetypen, die in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung in der RIC- und Kontrollgruppe beobachtet werden.

Die Variable über jeder Säule des Diagramms wird dem Prozentsatz aller Proben aus der Kontroll- oder RIC-Gruppe zugeordnet, die den auf der x-Achse beschriebenen Nekrosetyp aufweisen.

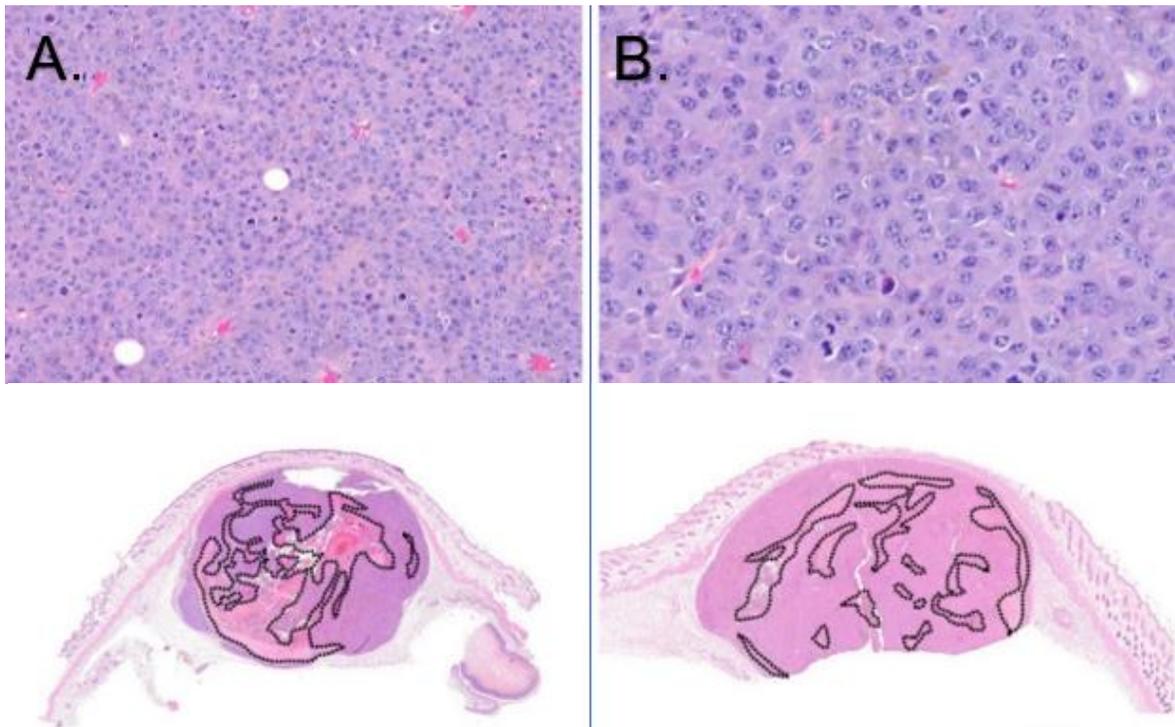


Abbildung 19: Hämatoxylin-Eosin-Färbung der Tumorproben einer Kontrollgruppe (A) und einer RIC-Gruppe (B).

Die Grenzen der nekrotischen Bereiche innerhalb der Tumorproben sind mit einer gestrichelten schwarzen Linie markiert.

- A. Die Nekrose dominiert im zentralen Teil des Tumors in der Tumorprobe aus der Kontrollgruppe.
- B. Die Nekrose in einer RIC-Tumorprobe ist in Schnüren (cords) angeordnet.

E. Histopathologische Analyse der Hypoxie

Die akute Hypoxie wird mittels Verwendung des MAB1-Antikörpers (Pimonidazol-Technik) aufgrund einer schnellen Redoxreaktion von Pimonidazol im Gewebe dargestellt. Die chronische endogene Hypoxie wird aufgrund der langen Halbwertszeit von CAIX von 38 bis 96 Stunden durch den CAIX-Antikörper nachgewiesen (Kyung et al., 2007). Aufgrund der sehr diffusen Natur der Hypoxie wird ein Score für eine semiquantitative Analyse erstellt (Abb. 20-22).

a) Pimonidazol-Färbung

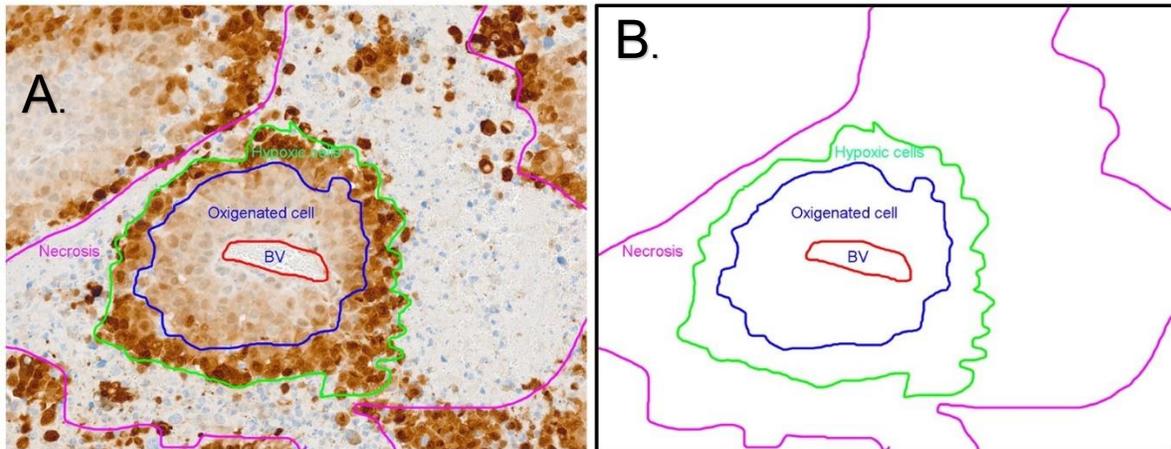


Abbildung 20: Pimonidazol-Färbung (A.) und schematische Darstellung (B.) der unterschiedlich oxygenierten Zellen im Verhältnis zum Blutgefäß.

Die MAB1 Immunhistochemie zeigt ein klares hypoxisches Muster. Die nicht-hypoxischen Tumorzellen (blaue Linie) werden um ein zentrales Blutgefäß (BV, rote Markierung) herum identifiziert. Weiter entfernt von der Mitte des Blutgefäßes werden die hypoxischen Tumorzellen (grüne Linie) mit starker nukleärer und zytoplasmatischer Färbung als Palisade zwischen den sauerstoffreichen Tumorzellen und der Nekrose (rosa Linie) identifiziert. Die Nekrose ist negativ für die Pimonidazol-(MAB1) -Färbung.

Gemäß der MAB1-Färbung werden wenige hypoxische Bereiche (+) in 4 Proben aus der RIC- und 4 Proben aus der Kontrollgruppe gefunden, während mäßige akute Hypoxie (++) in 7 RIC- und 3 Kontrollproben vorhanden war. Große hypoxische Bereiche (+++) wurden bei 7 RIC- und 3 Kontrollproben beobachtet. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (exakter Fisher-Test, $p = 0,24$) (Abb. 22, Tab. 12).

b) CAIX-Färbung

CAIX hat sich als guter endogener Hypoxiemarker erwiesen, der durch kurzfristige Interventionen wie RIC nicht beeinflusst wird.

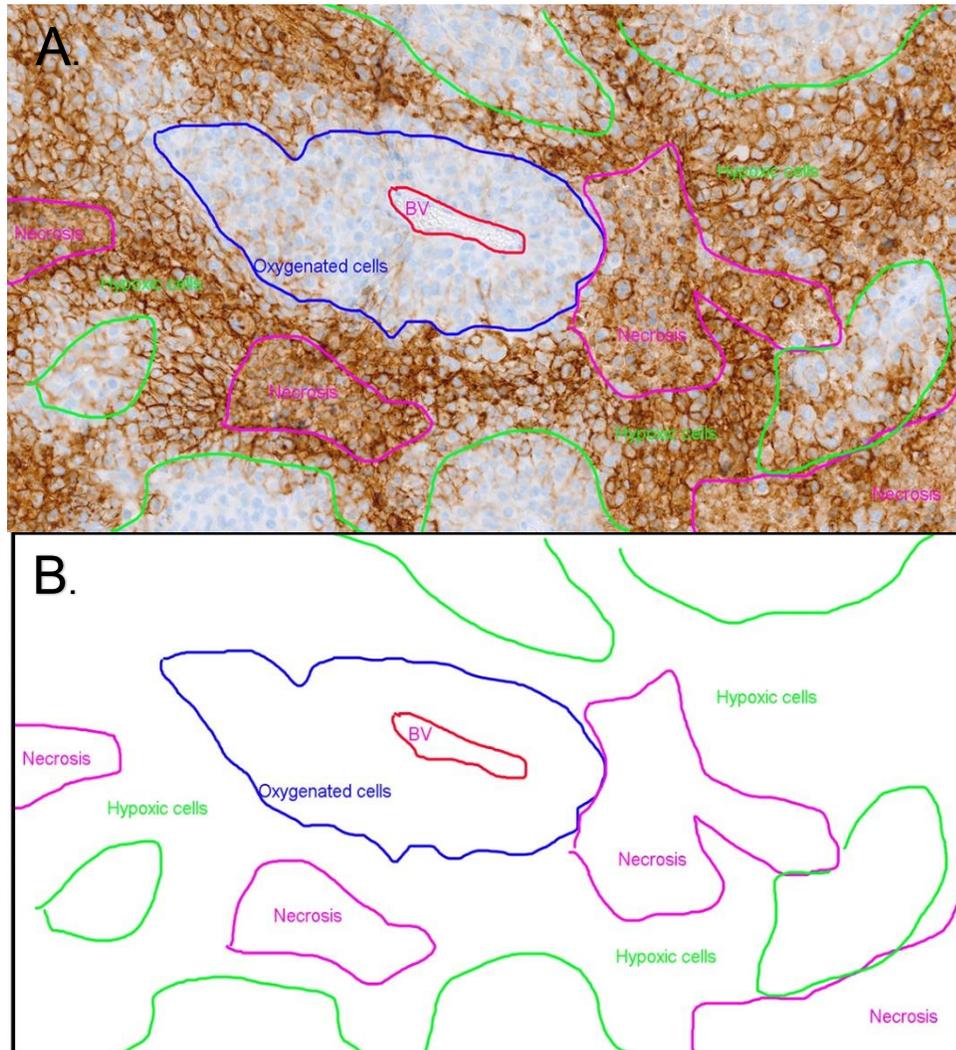


Abbildung 21: CAIX-Färbung (A.) und schematische Darstellung (B.) der unterschiedlich oxygenierten Zellen im Verhältnis zum Blutgefäß.

Die CAIX-positiven Zellen zeigen eine klare Membranfärbung. Die nicht-hypoxischen Tumorzellen (blaue Linie) werden um ein zentrales Blutgefäß (BV, rote Markierung) herum identifiziert. Die meisten positiven, hypoxischen Zellen (grüne Linie) werden als Palisadenbildung um die nekrotischen Bereiche (rosa Linie) herum nachgewiesen, ähnlich wie es für die Pimonidazol-Färbung beobachtet wurde. Bei der CAIX-Färbung zeigt die Nekrose jedoch auch eine unspezifische diffuse Färbung, die nicht mit der Membran assoziiert ist. Durch diese nicht-membran-spezifische Färbung können die Nekroseareale von den hypoxischen Zellen unterschieden werden.

Tatsächlich werden keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des CAIX-Hypoxie-Scores festgestellt, mit großen hypoxischen Bereichen in fast allen analysierten Proben (Kontrolle: +++, n = 14; RIC: ++, n = 2 und +++, n = 12) (exakter Fisher-Test, $p = 0,48$) (Abb. 22, Tab. 12,).

c) Intraindividueller Unterschied zwischen der Pimonidazol- und CAIX-Färbung

Der Unterschied zwischen der CAIX und Pimonidazol-Färbung in der Kontrollgruppe beträgt 0 bei 3, + bei 7 und ++ bei 4 Proben. In der RIC-Gruppe erreichte dieser Unterschied -1 bei 1, 0 bei 7, 1 (+) bei 2 und 2 (++) bei 4 Gewebeprobe. Die intraindividuellen Diskrepanzen zwischen CAIX- und MAB1-Score unterscheiden sich nicht signifikant zwischen der RIC- und der Kontrollgruppe (exakter Fisher-Test, $p = 0,13$).

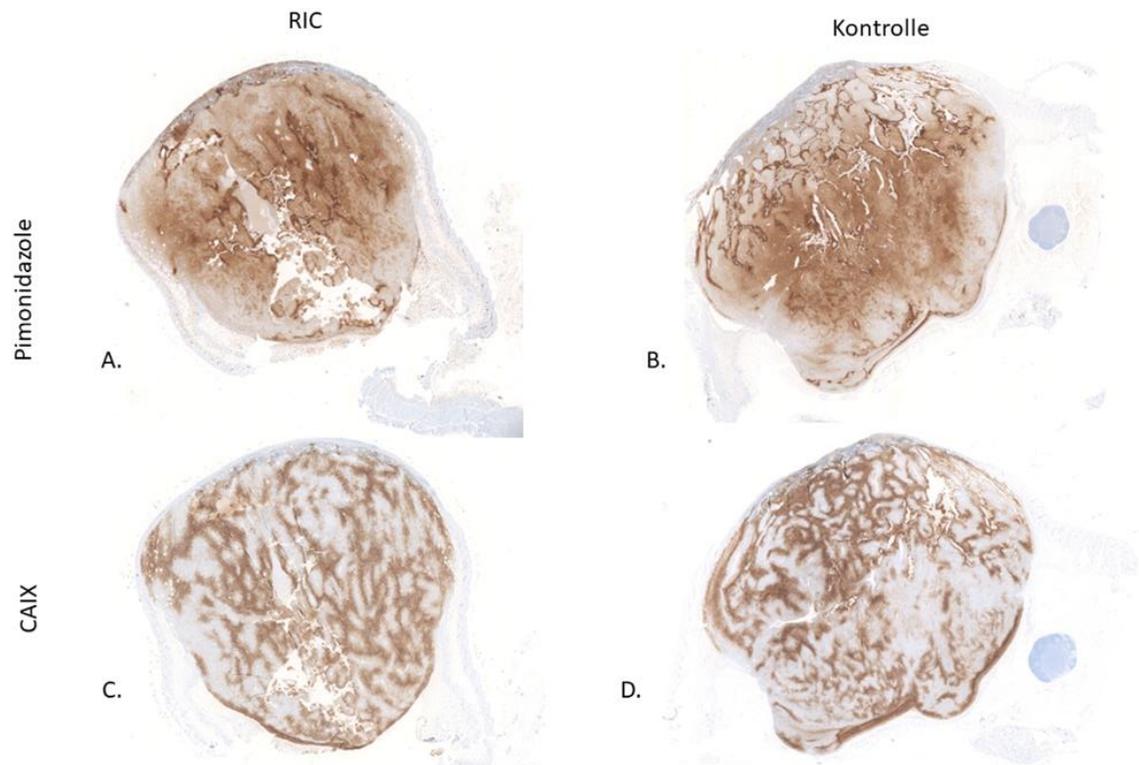


Abbildung 22: Hypoxie-Beurteilung in Tumörproben der Kontroll- und RIC-Gruppe

- A. Moderater Hypoxie-Score in der MAB1-Färbung (Pimonidazol) der RIC-Tumorprobe
- B. Moderater Hypoxie-Score in der MAB1-Färbung (Pimonidazol) der Kontrolltumorprobe
- C. Große hypoxische Bereiche, die durch CAIX-Färbung in der RIC-Tumorprobe aufgedeckt wurden
- D. Große hypoxische Bereiche, die durch CAIX-Färbung in der Tumorprobe aus der Kontrollgruppe dargestellt wurden

Die Unterschiede zwischen der RIC- und Kontrollgruppe sind nicht statistisch signifikant, weder für die Pimonidazol-Färbung (exakter Fisher-Test, $p = 0,24$), noch für die CAIX-Färbung (exakter Fisher-Test, $p = 0,48$).

d) Hypoxische Scores im Verhältnis zum vitalen Tumorgewebe*

i. Pimonidazol*

Aufgrund der insgesamt großen nekrotischen Areale im Bereich der Tumoren wird zusätzlich ein semiquantitativer Score* gebildet. Dazu wird eine semiquantitativ eingeschätzte Hypoxie (wie oben beschrieben) mittels Pimonidazol-Färbung durch eine prozentuelle Fläche des vitalen Tumorgewebes dividiert. Bezüglich der MAB-1 Färbung (Pimonidazol) beträgt der Medianwert des Scores* 2,37 (Minimum = 1,07; Maximum = 5,27) in der Kontroll- und 3,29 (Minimum = 1,07, Maximum = 4,99) in der RIC-Gruppe. Diese Unterschiede sind nicht signifikant (MWU, $p = 0,67$) (Abb. 23).

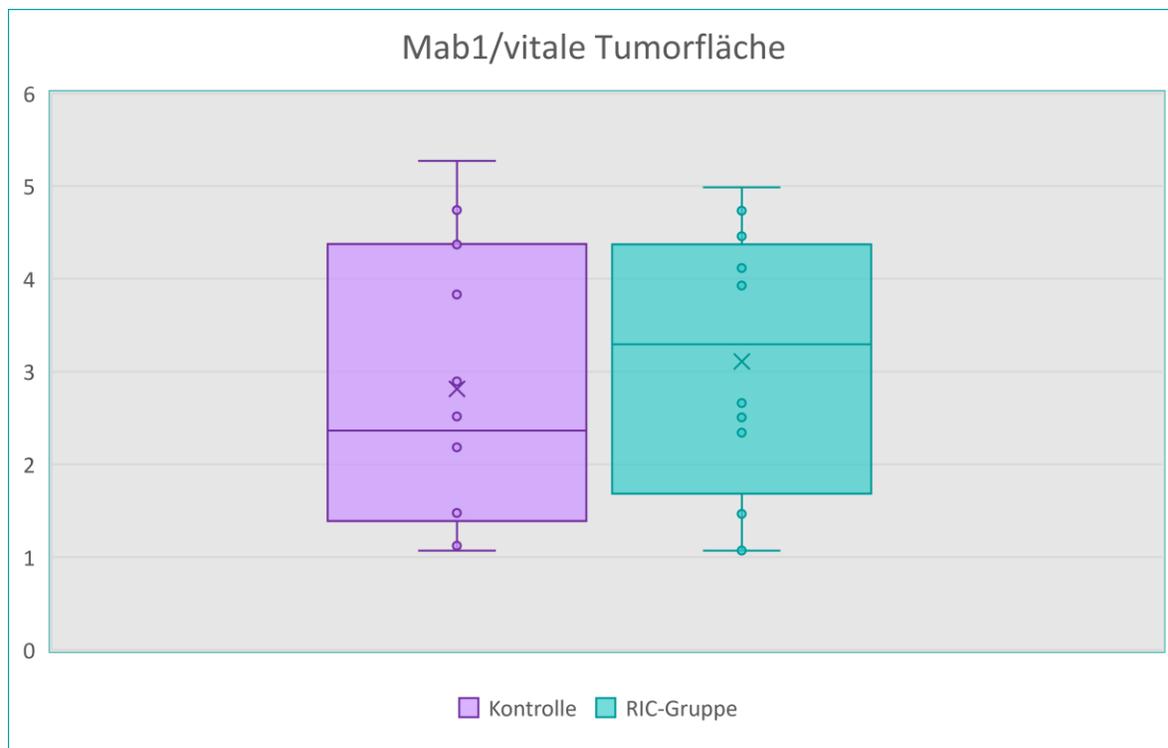


Abbildung 23: Die Box-plots zeigen ein Verhältnis des akuten Hypoxieausmaßes zum vitalen Tumorgewebe für die Pimonidazol-Färbung mit Vergleich der RIC- und Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,67$).

	Kontrolle	RIC-Gruppe
Anzahl der Proben	14	12
Minimum	1,069404	1,068947
Maximum	5,271481	4,986702
Mittelwert	2,814964	3,110282
Stand. dev	1,453324	1,432825
Median	2,365108	3,293943
25 prcntil	1,387899	1,684563
75 prcntil	4,374704	4,372046
p-value MWU*		0,67

ii. CAIX*

Wie oben für Pimonidazol bereits beschrieben, wird auch eine semiquantitativ eingeschätzte Hypoxie (wie oben beschrieben) mittels CAIX Färbung durch eine prozentuelle Fläche des vitalen Tumorgewebes dividiert. Bezüglich CAIX Färbung beträgt der Median des Scores* 4,06 in der Kontroll- und 4,05 in der RIC Gruppe. Diese Unterschiede sind nicht signifikant (MWU, $p = 0,82$) (Abb. 24).

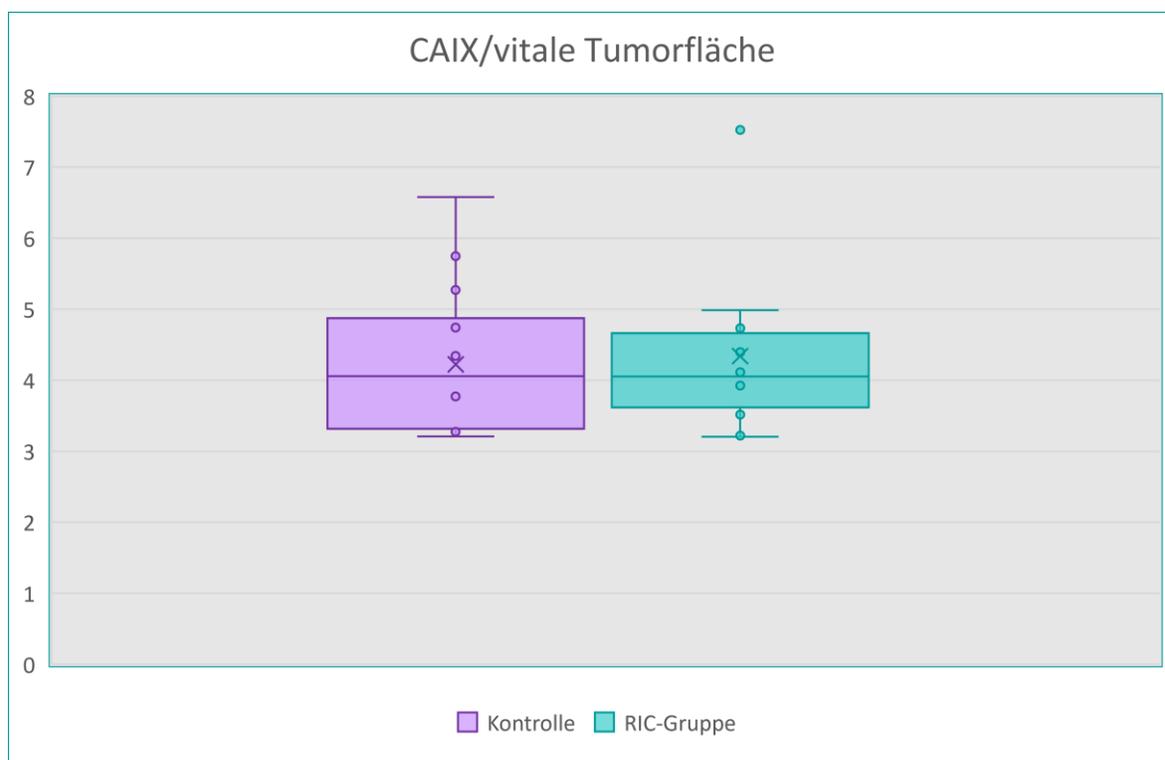


Abbildung 24: Die Box-plots zeigen ein Verhältnis des chronischen Hypoxieausmaßes zum vitalen Tumorgewebe für die CAIX-Färbung mit Vergleich der RIC- und Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,82$).

iii. Unterschied zwischen Pimonidazol* und CAIX Score* im Verhältnis zum vitalen Tumorgewebe

Der Median der Unterschiede der Scores (CAIX-Pimonidazole Score) * im Verhältnis zum vitalen Tumorgewebe erreicht 1,35 in der Kontroll- und 0,59 in der RIC-Gruppe. Der p-Wert des MWU-Tests beträgt 0,42 (Abb. 25).

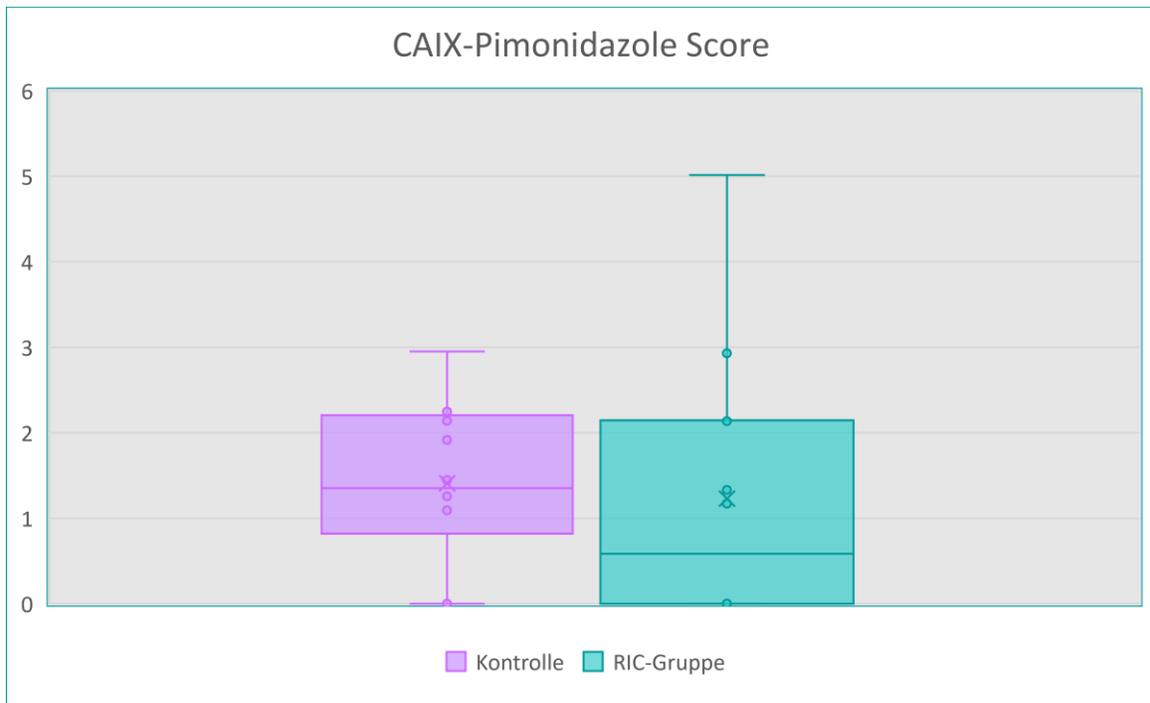


Abbildung 25: Die Box-plots zeigen den Vergleich der Differenz zwischen CAIX- und Pimonidazol-Score im Verhältnis zum vitalen Tumorgewebe zwischen der RIC- und der Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,42$).

e) Histopathologische Analyse der Immuninfiltration

i. Infiltration durch CD3-positive Zellen

Es werden entsprechende positive Lymphknoten und negative Kontroll-Muskulatur für die CD3 Färbung analysiert (Abb. 26). Die CD3-Immunhistochemie zeigt eine insgesamt moderate Präsenz von CD3-positiven T-Zellen in der Peripherie aller Tumore und eine geringere Anzahl von CD3-positiven T-Zellen innerhalb der Tumore (Abb 27).

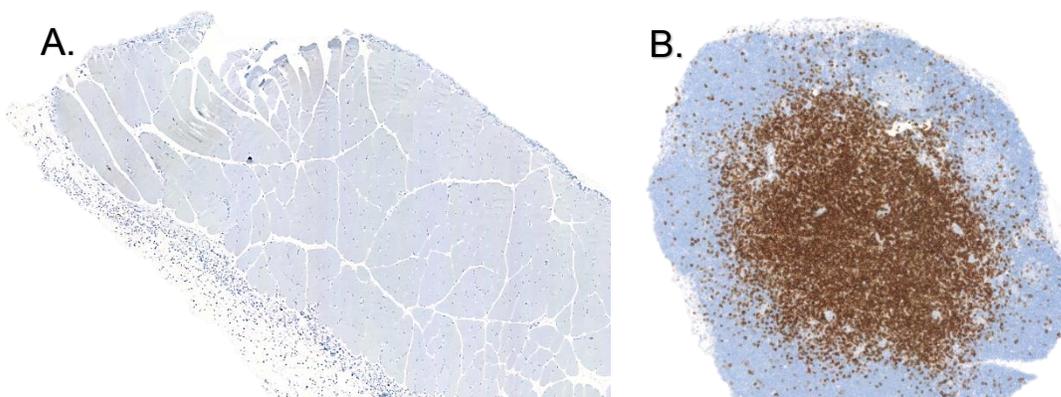


Abbildung 26: Negative (A.) und positive Kontrolle (B) für die CD3 Färbung

A. Beispiel einer negativen CD3-Färbung im Bereich der Muskulatur

B. Beispiel einer stark positiven (braunen) CD3-Färbung innerhalb eines Lymphknotens

Bei den RIC-Tumoren erreicht die mediane Anzahl CD3-positiver Zellen aus 10 zufällig ausgewählten Hochleistungsfeldern (HPF, 400-fache Vergrößerung) im Tumorzentrum 2,8 T-Zellen/HPF und ist im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Median von 1,6 T-Zellen/HPF signifikant höher (MWU, $p = 0,01$) (Abb. 27, Abb. 28).

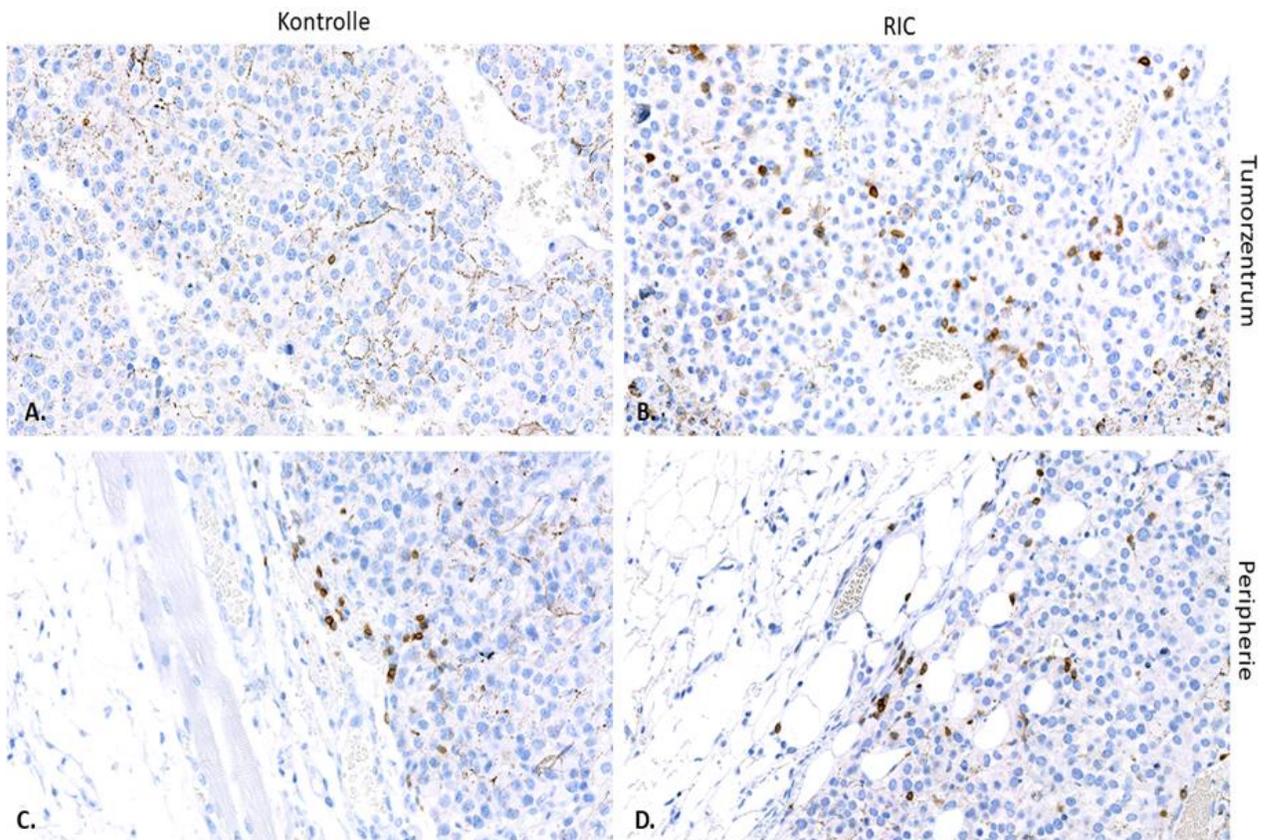


Abbildung 27: CD3-Immunhistochemie der Tumorproben, dargestellt unter 300-facher Vergrößerung; CD3-positive Zellen sind an einer braunen Färbung und kleinen Zellkernen zu erkennen.

- A. Geringe Immuninfiltration in der Mitte der Tumorprobe aus einer Kontrollgruppe,
- B. Tumorzentrum einer RIC-Tumorprobe mit signifikanter Immuninfiltration mit T-Zellen,
- C. Moderate T-Zellen-Infiltration in der Tumorperipherie in der Probe aus der Kontrollgruppe,
- D. Moderate T-Zellen-Infiltration in der Tumorperipherie in der RIC-Tumorprobe.

Die Immuninfiltration mit T-Zellen erscheint im Tumorzentrum (MWU Test, $p = 0,01$), aber nicht in der Tumor-Peripherie (MWU Test, $p = 0,67$), in der RIC-Gruppe ausgeprägter im Vergleich zur Kontrolle zu sein.

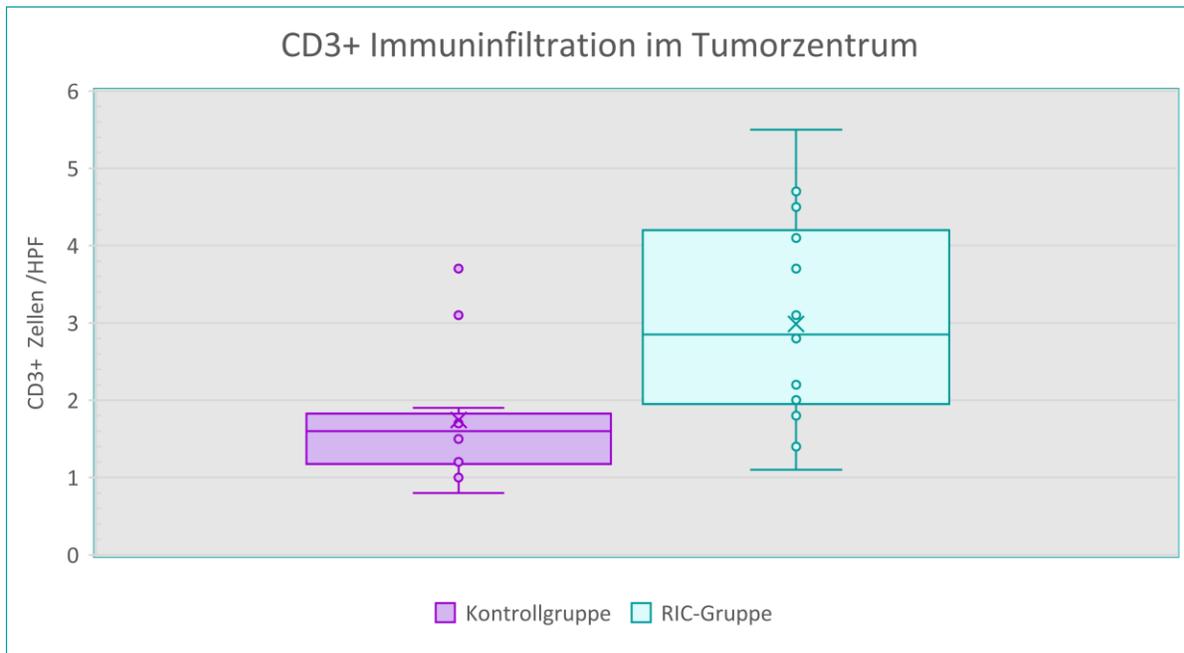


Abbildung 28: Die Box-plots zeigen den Vergleich der Anzahl der CD3-positiver Zellen (Durchschnitt der gesichteten Zellen aus 10 zufällig ausgewählten Hochleistungsfeldern unter 400-facher Vergrößerung) im Tumorzentrum zwischen der RIC- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U Test, $p = 0,01$). Die Immuninfiltration mit T-Zellen erscheint im Tumorzentrum der RIC-Gruppe ausgeprägter im Vergleich zur Kontrolle zu sein.

Aufgrund der sehr inhomogenen Verteilung von T-Zellen in der Peripherie wird die CD3-Immunhistochemie mit semiquantitativem Score analysiert. Der Median der peripheren CD3⁺-Infiltration beträgt in beiden Gruppen +/++, die Unterschiede sind nicht signifikant (MWU, $p = 0,67$) (Abb. 27, Abb. 29).

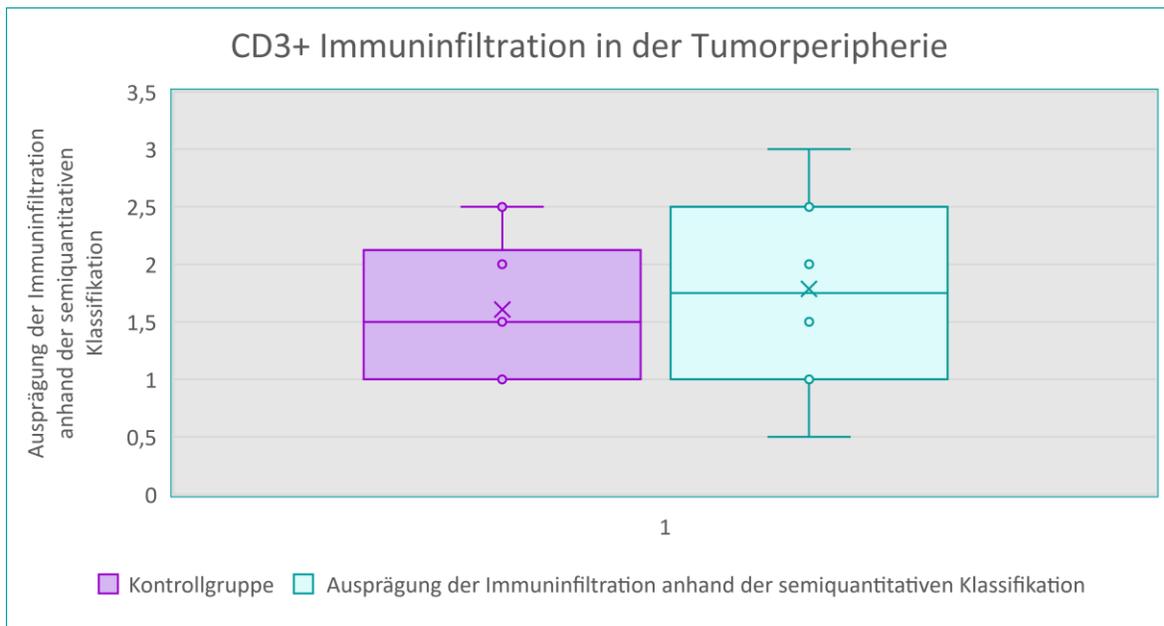


Abbildung 29: Die Box-plots zeigen den Vergleich der Immuninfiltration mit den CD3-positiven Zellen (analysiert mit semiquantitativem Score) in der Tumorperipherie zwischen der RIC- und Kontrollgruppe (Mann-Whitney-U Test, $p = 0,67$). Die Immuninfiltration mit T-Zellen erscheint in der Tumor-Peripherie der RIC- und Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich.

ii. Infiltration durch regulatorische T (Treg)-Zellen

Sehr wenige FoxP3-positive Zellen werden innerhalb des Tumors nachgewiesen, was mit den geringen Mengen an CD3-positiven T-Zellen übereinstimmt, die zuvor nachgewiesen wurden (Tab. 13, Abb. 30).

Insgesamt werden keine Unterschiede hinsichtlich der FoxP3-positiven Zellen innerhalb des Tumors und in der Tumorperipherie zwischen der Kontroll- und der RIC-Gruppe festgestellt.

Im Tumorzentrum beträgt die mediane Anzahl von Treg-Zellen 0,71/HPF(200x) (Minimum = 0; Maximum = 2,75) in der Kontroll- und 0,41/HPF(200x) (Minimum = 0; Maximum = 5,33) in der RIC-Gruppe, was sich im Vergleich mittels MWU-Tests nicht signifikant unterscheidet ($p = 0,84$) (Abb. 30, Abb 31).

In der Tumorperipherie erreicht die semiquantitativ-analyseerte Anzahl der Treg-Zellen einen Median von 1 (+) in der Kontroll- und RIC-Gruppe mit gleichen minimalen (jeweils 0,5; +/-) und maximalen Werten (2, ++) (MWU; $p = 0,627$) (Abb. 30, Abb. 31).

Das Verhältnis der Treg-Zellen zur gesamten Immuninfiltration wird als Ratio der FoxP3 (200x Vergrößerung) - zu CD3-positiven Zellen (400x Vergrößerung) im Tumorzentrum und in der Peripherie dargestellt. In der RIC-Gruppe beträgt der Median dieser Ratio 0,21 (Minimum = 0, Maximum = 1,13) und in der Kontrollgruppe 0,51 (Minimum = 0, Maximum = 1,45) im Tumorzentrum. Der statistische Vergleich mittels MWU weist keine statistisch signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,19$). In der Peripherie beträgt die mediane Anzahl der Treg-Zellen 0,58 (Minimum = 0,33, Maximum = 1,5) in der Kontroll- und 0,6 (Minimum = 0,2, Maximum = 1,33) in der RIC-Gruppe, was ebenfalls nicht statistisch signifikant ist ($p = 0,76$) (Abb. 32).

Tabelle 13: Übersicht der Infiltration mit CD3- und FoxP3-positiven Zellen im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie in der RIC- und Kontrollgruppe (Ko.), inklusive Identifikationsnummer (ID-Nr.) der Tiere im Experiment.

<i>Gruppe und ID-Nr.</i>	<i>Durchschnittliche Anzahl der CD3⁺ Zellen/HPF im Tumorzentrum</i>	<i>Durchschnittliche Anzahl der FoxP3⁺ Zellen/HPF im Tumorzentrum</i>	<i>CD3⁺ Zellen in der Tumorperipherie</i>	<i>FoxP3⁺ Zellen in der Tumorperipherie</i>
<i>Ko. 1</i>	3,1	1,8	1,5	1,0
<i>Ko.2</i>	0,8	0,96	1,0	1,5
<i>Ko.3</i>	1,7	1,0	1,0	1,0
<i>Ko.9</i>	1,2	0,75	1,0	1,0
<i>Ko.13</i>	1,8	2,45	1,5	1,0
<i>Ko.16</i>	1,5	0,67	2,5	1,0
<i>Ko.18</i>	1,8	0,2	1,0	0,5
<i>Ko.19</i>	3,7	0,22	2,5	1,0
<i>Ko.20</i>	1,9	2,75	2,5	2,0
<i>Ko.22</i>	1,8	1,18	2,0	1,5
<i>Ko.24</i>	1,5	0,21	1,0	0,5
<i>Ko.26</i>	1,5	0,35	2,0	1,0
<i>Ko.27</i>	1,1	0,0	1,5	0,5
<i>Ko.29</i>	1,0	0,12	1,5	0,5
<i>RIC 4</i>	2,9	0,0	1,0	0,5
<i>RIC 6</i>	1,4	0,27	2,0	1,0
<i>RIC 7</i>	2,2	0,74	2,0	1,0
<i>RIC 8</i>	5,5	1,25	2,5	1,5
<i>RIC 10</i>	1,8	0,4	0,5	0,5
<i>RIC 11</i>	3,7	1,21	1,5	2,0
<i>RIC 12</i>	4,7	5,33	2,5	2,0
<i>RIC 14</i>	3,1	0,25	1,0	0,5
<i>RIC 15</i>	2,8	0,44	2,5	0,5
<i>RIC 17</i>	4,5	0,0	3,0	1,5
<i>RIC 21</i>	4,1	1,1	2,5	1,5
<i>RIC 23</i>	2,0	0,3	1,0	1,0
<i>RIC 25</i>	2,0	0,41	1,5	1,0
<i>RIC 28</i>	1,1	0,59	1,5	1,0

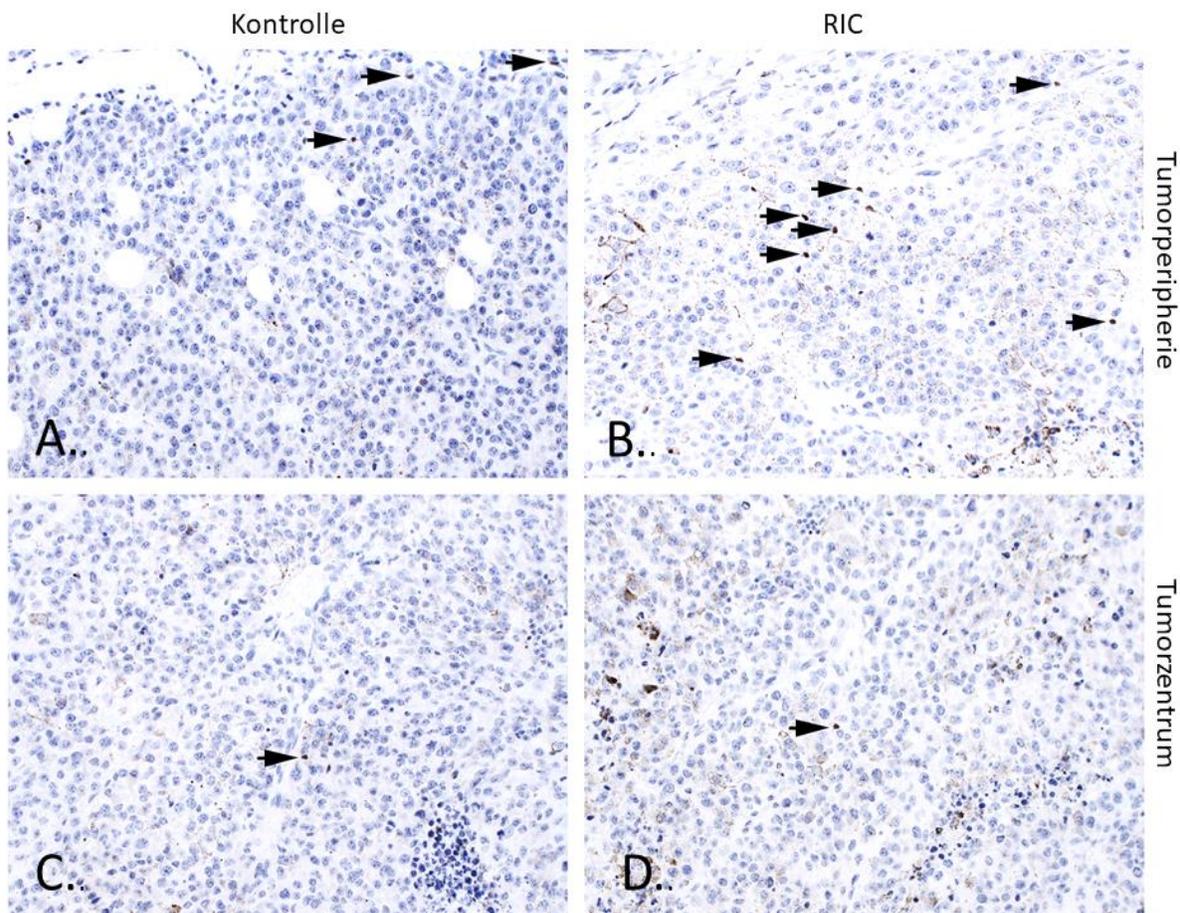


Abbildung 30: FoxP3-Immunhistochemie der Tumorproben dargestellt unter 200-facher Vergrößerung; FoxP3-positive Zellen sind an einer braunen Färbung und kleinen Zellkernen zu erkennen. Im Tumorzentrum beträgt die mediane Anzahl von Treg-Zellen 0,71/HPF(200x) in der Kontroll- und 0,41/HPF(200x) in der RIC-Gruppe, was sich im Vergleich mittels Man-Whitney-U-Tests nicht signifikant unterscheidet ($p = 0,84$). In der Tumorperipherie erreicht die semiquantitativ-analyisierte Anzahl der Treg-Zellen einen Median von 1 (+) in der Kontroll- und RIC Gruppe (Man-Whitney-U-Test; $p = 0,63$).

- A. Moderate/milde (+/++) Infiltration mit Treg-Zellen in der Tumorperipherie der Tumorprobe aus der Kontrollgruppe
- B. Moderate (++) Infiltration mit Treg-Zellen in der Tumorperipherie der Tumorprobe aus der RIC-Gruppe
- C. Milde (+) Infiltration mit Treg-Zellen im Tumorzentrum der Tumorprobe aus der Kontrollgruppe
- D. Milde (+) Infiltration mit Treg-Zellen im Tumorzentrum der Tumorprobe aus der RIC-Gruppe

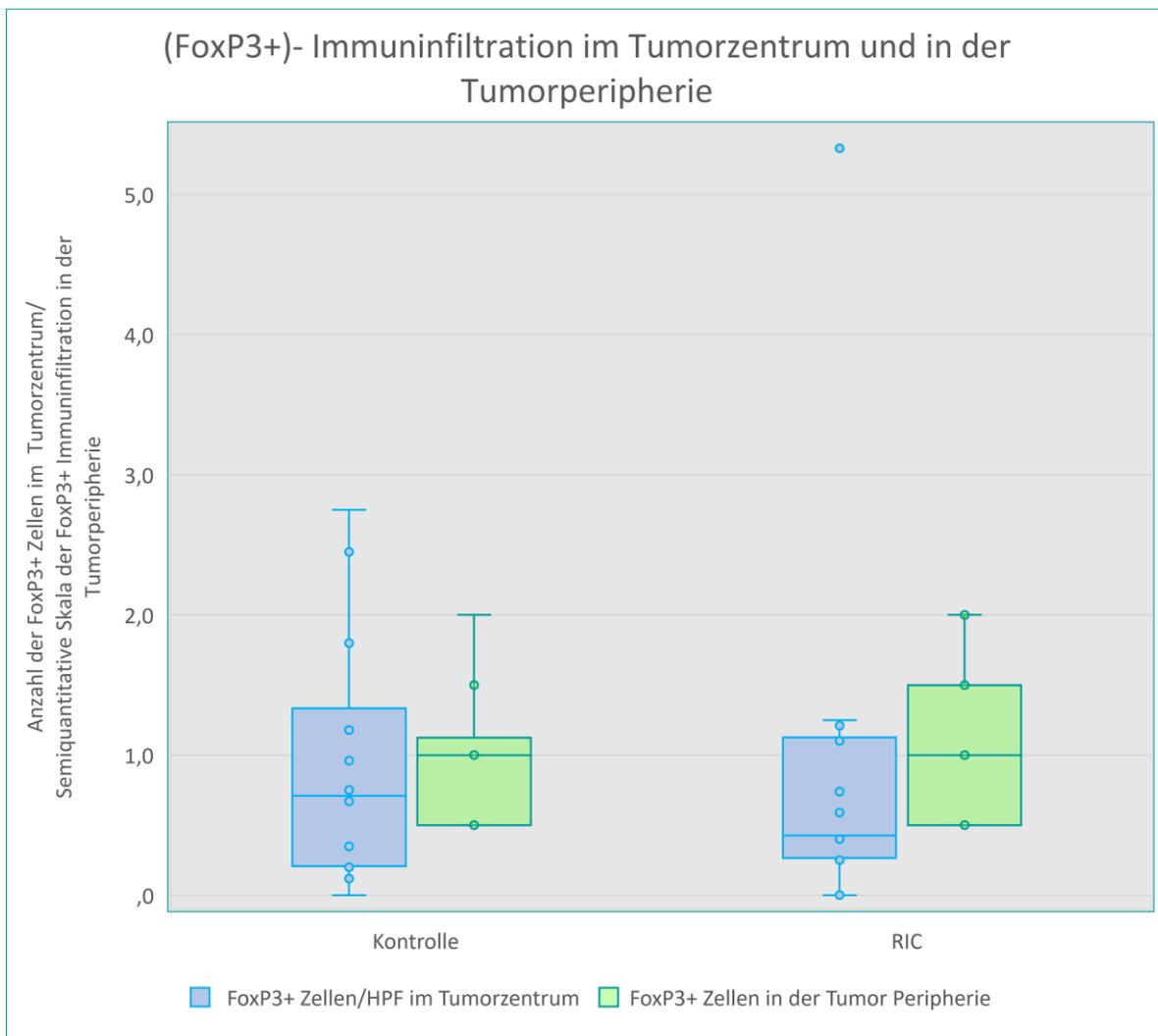


Abbildung 31: Darstellung der Immuninfiltration mit FoxP3⁺-Treg-Zellen in der Tumorperipherie anhand der semiquantitativen Skala und im Tumorzentrum durch die Analyse der durchschnittlichen Anzahl der positiv gefärbten Zellen pro High Power Field unter 200-facher Vergrößerung. Im Vergleich mittels Man-Whitney-U-Tests zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Tregs-Immuninfiltration, weder im Tumorzentrum ($p = 0,84$), noch in der Tumorperipherie (MWU; $p = 0,627$) zwischen RIC- und Kontrollgruppe.

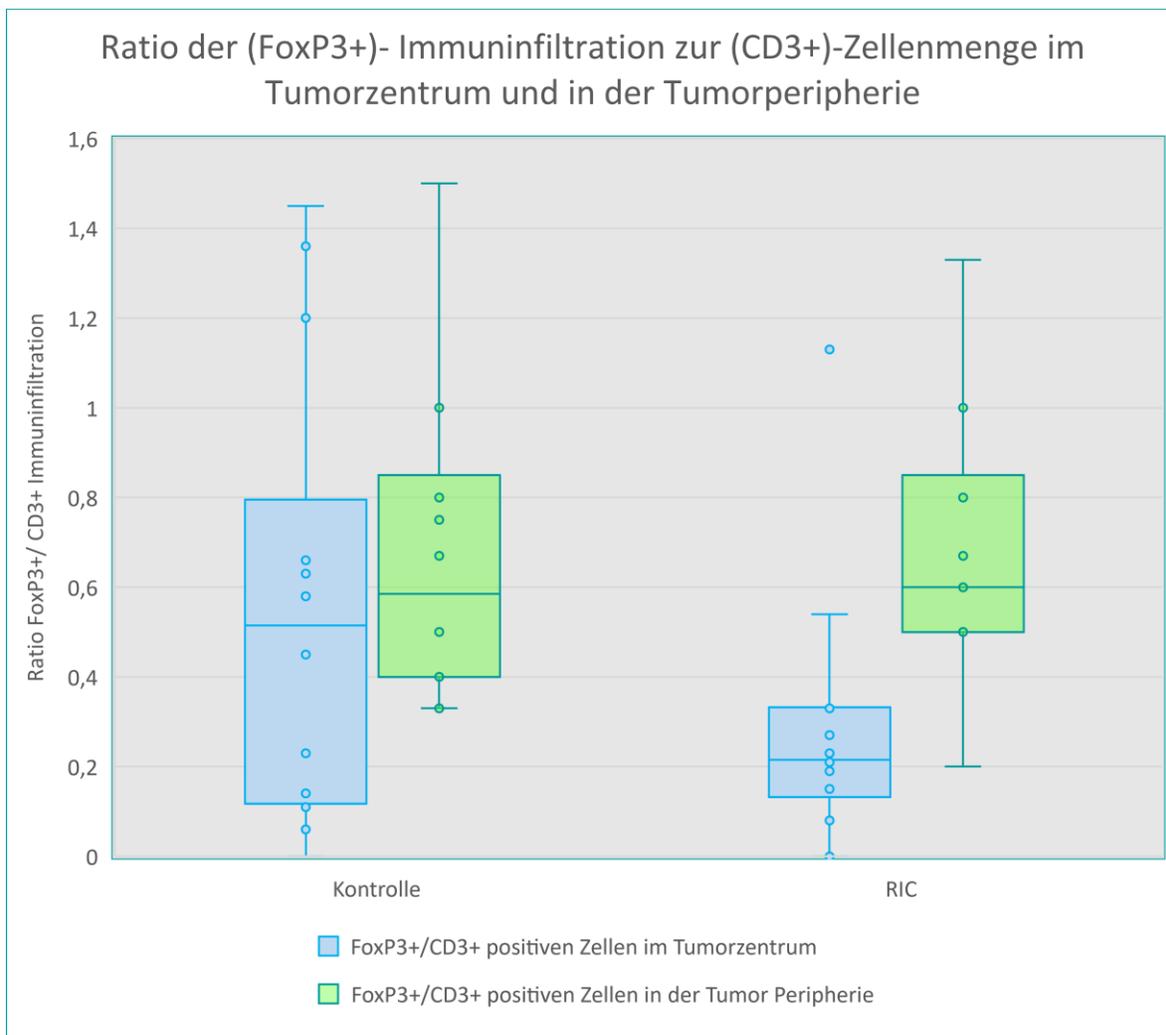


Abbildung 32: Darstellung der Proportionen (Ratios) zwischen der Immuninfiltration mit FoxP3⁺-Treg-Zellen zur gesamten Infiltration mit CD3-positiven Zellen im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie. Der statistische Vergleich mittels Man-Whitney-U-Tests weist keine statistisch signifikanten Unterschiede der FoxP3⁺/CD3⁺-Ratio, weder im Tumorzentrum ($p = 0,19$), noch in der Peripherie ($p = 0,76$) auf.

F. Multiplex-Immunoassay

Insgesamt 23-Zytokine: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-17A, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und TNF- α werden in 12 Serumproben aus der RIC- und 13 Proben aus der Kontrollgruppe analysiert (Abkürzungen sind im Abkürzungsverzeichnis erklärt). Drei Proben werden aufgrund von Hämolyse und/oder inkonsistenten Ergebnissen in den analysierten Duplikaten aus der Analyse ausgeschlossen. Die relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von jedem Assay werden zwischen der RIC- und der Kontrollgruppe verglichen.

Der MFI für IL-17 ist in der RIC-Gruppe signifikant höher (Median 34,4) als in der Kontrollgruppe (Median 28) (MWU, $p = 0,035$) (Abb. 33).

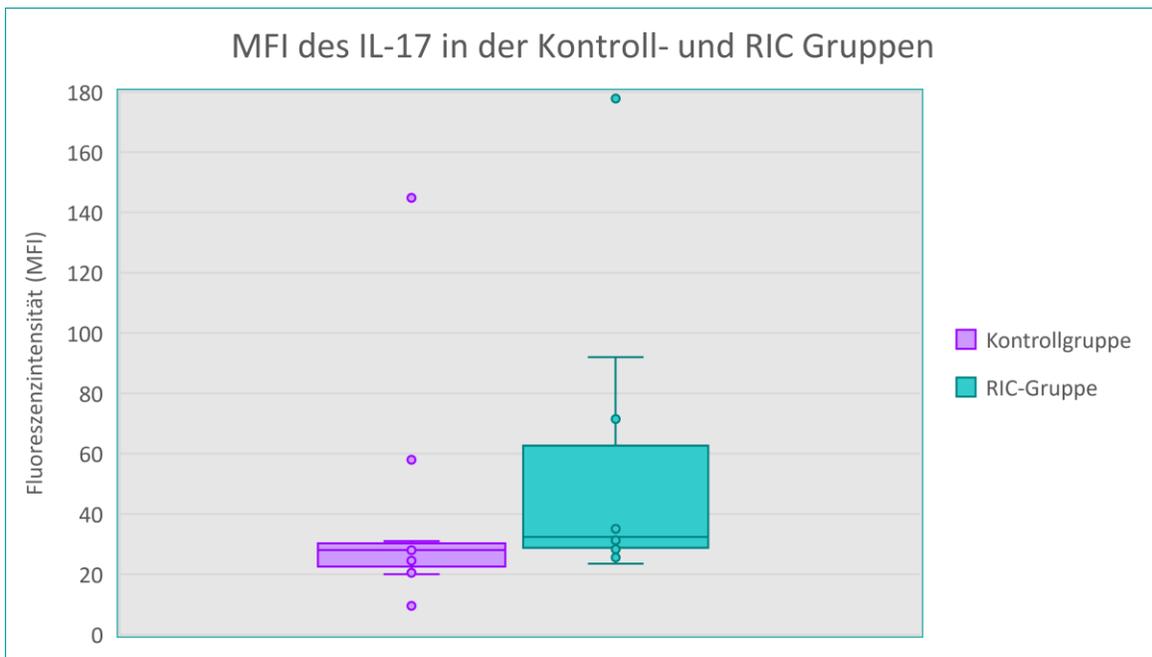


Abbildung 33: Box plots der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von Interleukin-17 (IL-17) in der Kontroll- und RIC-Gruppe. Die MFI von IL-17 weist höhere Werte in der RIC- als in der Kontrollgruppe auf (Man-Whitney-U-Test, $p = 0,035$).

Wir beobachten eine Tendenz zu einer höheren MFI von TNF- α in der RIC-Kohorte (Median 16,25) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median 15). Dies erreicht jedoch nicht das gewählte Signifikanzniveau (MWU, $p = 0,063$) (Abb. 34).

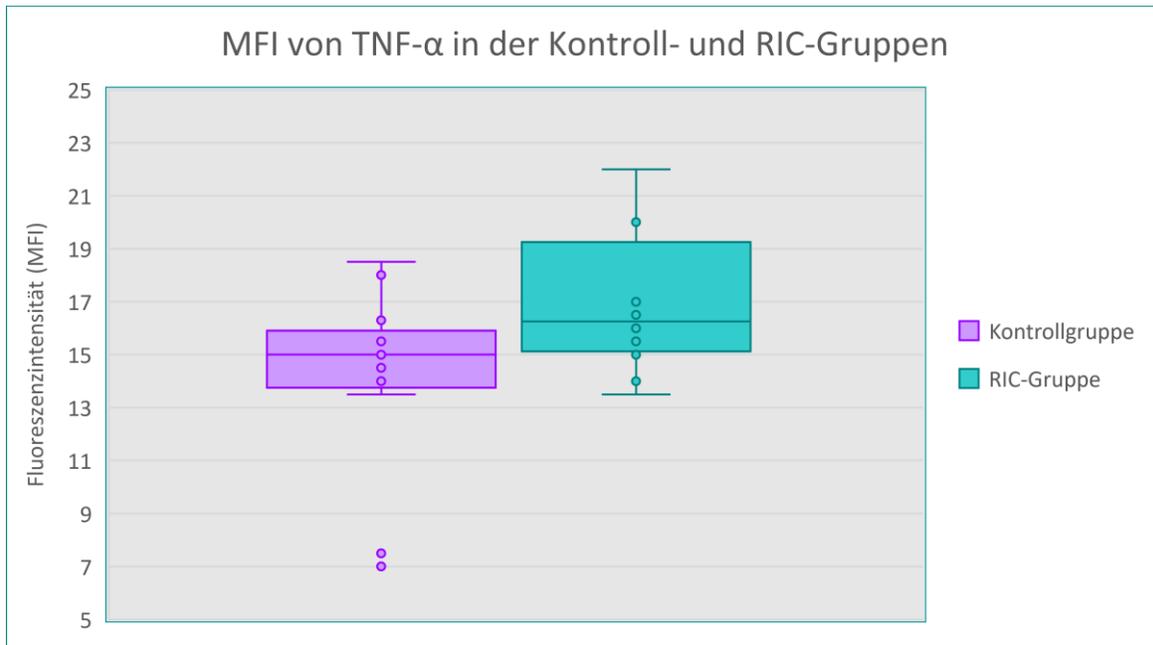


Abbildung 34: Box-plots der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von Tumornekrosefaktor α (TNF- α) in der Kontroll- und RIC-Gruppe.

Die MFI von TNF- α weist eine Tendenz zu höheren Werten in der RIC- verglichen mit der Kontrollgruppe auf (Man-Whitney-U-Test, $p = 0,063$).

Die MFIs von anderen Zytokinen zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p > 0,05$). Die Übersicht der gemessenen MFIs der Interleukine befindet sich in Tabelle 14.

Tabelle 14: Übersicht und Vergleich der analysierten Zytokine mit Mittelwerten, Standardabweichung (STD), Median, minimalen und maximalen Werten der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von jedem Assay und dazugehörige p-Werte des Man-Whitney-U-Tests (MWU) in der Kontroll- und RIC-Gruppe.

<i>Analyt</i>		<i>Mittelwert</i>	<i>STD</i>	<i>Min.</i>	<i>Median</i>	<i>Max</i>	<i>p-Wert (MWU)</i>
<i>IL-1a</i>	Kontrolle	33,7	10,7	12	35,8	47	0,41
	RIC	38,	5,4	9	37	47	
<i>IL-1b</i>	Kontrolle	9,5	2	5,5	9,8	12	0,38
	RIC	10,6	4,8	9	10	26,3	
<i>IL-2</i>	Kontrolle	16,6	7	6,5	16	25	0,47
	RIC	17,4	2,9	14	17,4	24,5	
<i>IL-3</i>	Kontrolle	19,8	5,5	9	20	26,8	0,35
	RIC	22,3	4,6	14,5	22	34,5	
<i>IL-4</i>	Kontrolle	18	4,5	10	18	25	0,5
	RIC	19,3	2,7	16	19,5	25	
<i>IL-5</i>	Kontrolle	14	6,9	6	14	34	0,09
	RIC	15,7	2,5	12	15,3	20	
<i>IL-6</i>	Kontrolle	173,1	179,3	6	103,3	582,8	0,69
	RIC	139,9	72,8	68	115,8	304	
<i>IL-9</i>	Kontrolle	23,7	8,2	8,8	23,3	37,3	0,47
	RIC	26,9	5,4	20,5	26,4	40	
<i>IL-10</i>	Kontrolle	24,3	8,6	7,5	24,5	36	0,35
	RIC	28,9	7,2	23,5	27,3	51	
<i>IL-12</i>	Kontrolle	49,8	9,6	42	47	60,5	0,11
	RIC	55,4	11,7	41	51	83	
<i>IL-12</i>	Kontrolle	1253,9	674,8	10	1273	2243	0,11
	RIC	1782,9	676,5	925	1698,6	3353	
<i>IL-13</i>	Kontrolle	24,4	34,7	9,5	15	139,5	0,14
	RIC	28,9	40,9	14,5	16,8	158,5	
<i>IL-17</i>	Kontrolle	36,6	34,3	9,5	28	144,8	0,035
	RIC	51,3	44,8	23,5	32,4	177,8	
<i>Eotaxin</i>	Kontrolle	606,2	357	10	603	1350	0,26
	RIC	835,7	395,7	346,8	831,1	1560,5	
<i>G-CSF</i>	Kontrolle	111	97,1	10,5	89	404,5	0,21
	RIC	155,5	106,7	69,5	110,9	430,5	
<i>GM-CSF</i>	Kontrolle	30,62	65,6	8	13,5	248,8	0,54
	RIC	19,1	18,5	13	13,5	77,8	
<i>IFN-Gamma</i>	Kontrolle	25,2	7,9	9	26	34	0,44
	RIC	28,9	5,4	23	26,9	43	

<i>KC</i>	Kontrolle	102,7	136,3	11,5	56,5	502,5	0,65
	RIC	74,4	40,9	39	60,2	153	
<i>MCP-1</i>	Kontrolle	16,4	4,3	10	15,5	22,5	0,23
	RIC	18,1	3,2	15,5	17	27	
<i>MIP-1a</i>	Kontrolle	25,8	6,2	14	25	34,3	0,85
	RIC	27,5	4,7	24	25,9	39	
<i>MIP-1b</i>	Kontrolle	48,3	20,3	9,5	51,5	73,5	0,58
	RIC	56,8	15,9	42	50,7	99	
<i>RANTES</i>	Kontrolle	74,9	43,1	10	67	173	0,17
	RIC	147,1	167,6	52	85,8	637,8	
<i>TNF-α</i>	Kontrolle	14,3	3,4	7	15	18,5	0,06
	RIC	22,2	19,7	13,5	16,25	84,3	

G. Korrelationen im Hinblick auf gesamte Immuninfiltration mit CD3 positiven T-Zellen

a) Perfusionsparameter

Die Ratio der Sauerstoffsättigung des Tumors zu der der hinteren Pfote korreliert nicht mit der Immuninfiltration in der Tumorperipherie ($p = 0,49$). Die Korrelation zwischen der o. g. Ratio und CD3⁺-Zellinfiltration im Tumorzentrum ist statistisch nicht signifikant ($p = 0,45$). Darüber hinaus besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der SpO₂ Ratio Tumor/Pfote und dem prozentuellen Ausmaß der Nekrose ($p = 0,48$), sowie zwischen o. g. Ratio und den MFIs der gewählten Zytokine Il-17 ($p = 0,49$) und TNF- α ($p = 0,63$) (Tab. 15).

Tabelle 15: Übersicht der Korrelationen zwischen SpO₂ Ratio Tumor/Pfote und Immuninfiltration mit T-Zellen (CD3) in der Tumorperipherie und im Tumorzentrum, mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gewählten Zytokine und Nekrosefläche mit dazugehörigen p-Werten der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient-Werten.

SpO₂ Ratio Tumor/Pfote mit	Anzahl der Proben	Spearman	p-Wert
<i>Immuninfiltration (CD3⁺) in der Peripherie</i>	28	0,14	0,49
SpO₂ Ratio Tumor/Pfote mit	n	Pearson	p
<i>Immuninfiltration (CD3⁺) zentral</i>	28	0,15	0,45
<i>Ausmaß der Nekrose in %</i>	26	-0,15	0,48
<i>MFI von IL-17</i>	25	-0,15	0,49
<i>MFI von TNF-α</i>	25	0,10	0,63

b) Immuninfiltration

Die Immuninfiltration im Tumorzentrum korreliert nicht mit dem prozentuellen Ausmaß der Nekrose ($p = 0,76$) (Tab. 16). Es besteht auch keine Korrelation zwischen der Anzahl der CD3⁺-Zellen im Tumorzentrum und der MFI von IL-17 ($p = 0,9$) sowie der MFI von TNF- α ($p = 0,55$) (Tab. 16).

Tabelle 16: Übersicht der Korrelationen zwischen CD3⁺-Immuninfiltration im Tumorzentrum und den mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gewählten Zytokine, sowie Nekrosefläche mit dazugehörigen p-Werten der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient (Pearson)-Werten.

CD3⁺-Immuninfiltration zentral mit:	Anzahl der Proben	Pearson	p
<i>Ausmaß der Nekrose in %</i>	26	-0,06	0,76
<i>MFI von IL 17</i>	25	0,03	0,90
<i>MFI von TNF-α</i>	25	0,13	0,55

Die CD3⁺-Immuninfiltration in der Tumorperipherie korreliert nicht mit dem prozentuellen Ausmaß der Nekrose ($p = 0,52$) (Tab. 17). Des Weiteren zeigt sich keine signifikante Korrelation zwischen der Immuninfiltration in der Tumorperipherie und der MFI von IL-17 ($p = 0,82$), sowie der MFI von TNF- α ($p = 0,7$) (Tab.17).

Tabelle 17: Übersicht der Korrelationen zwischen CD3⁺-Immuninfiltration in der Tumorperipherie und mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der gewählten Zytokine sowie Nekrosefläche mit dazugehörigen p-Werten der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient (Spearman)-Werten.

(CD3⁺) -Immuninfiltration in der Peripherie mit:	Anzahl der Proben	Spearman	p
<i>Ausmaß der Nekrose in %</i>	26	0,13	0,52
<i>MFI von IL 17</i>	25	-0,05	0,82
<i>MFI TNF-alpha</i>	25	0,08	0,70

c) Vergleiche der vereinfachten Nekrosetypen

Für die statistische Korrelationsanalyse werden Nekrosetypen in 2 Kategorien dichotomisiert, nämlich mit dominierenden und nicht-dominierenden Strängen (Cords). Die Nekrosetypen korrelieren weder mit der T-Zell-Infiltration innerhalb des Tumorzentrums ($p = 0,1$) noch mit der T-Zell-Infiltration in der Peripherie ($p = 0,2$) (Tab. 18).

Tabelle 18: Übersicht der Korrelationen zwischen zwei Nekrosetypen (mit dominierenden und nicht-dominierenden Strängen) und CD3⁺-Immuninfiltration im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie mit dazugehörigen p-Werten der statistischen Analyse und Korrelationskoeffizient-Werten.

Punktbiseriale Korrelation			
<i>Nekrosetyp mit:</i>	Anzahl der Proben	Pearson	p
<i>CD3 zentral</i>	28	0,32	0,1
Biseriale Rang-Korrelation			
<i>Nekrosetyp mit:</i>	n	Spearman	p
<i>CD3 peripher</i>	28	0,25	0,2

d) Korrelationen im Hinblick auf Immuninfiltration mit FoxP3-positiven Treg-Zellen
 Die Anzahl der Treg-Zellen im Tumorzentrum korreliert weder mit der prozentuellen Nekrosefläche ($p = 0,33$) noch mit der Verteilung der Nekrose innerhalb des Tumors ($p = 0,6$). Darüber hinaus besteht keine Korrelation zwischen MFI von IL-17 ($p = 0,15$) und TNF- α ($p = 0,61$) und Treg-Immuninfiltration innerhalb des Tumorzentrums. Ebenfalls wird im Hinblick auf eine Ratio der Sauerstoffsättigung zwischen Tumor und Pfote keine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen ($p = 0,51$) (Tab. 19).

Auch in der Tumorperipherie zeigt sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen dem semiquantitativen Score der Treg-Immuninfiltration und den Nekrosetypen ($p = 0,62$) oder der Nekrosefläche ($p = 0,86$). Der semiquantitative Score korreliert weder mit den MFIs der IL-17 ($p = 0,3$) noch mit der MFI von TNF- α ($p = 0,28$). Auch zwischen der Ratio der Sauerstoffsättigung Tumor/Pfote und dem semiquantitativen Score der Treg-Immuninfiltration ist keine statistisch signifikante Korrelation nachzuweisen ($p = 0,95$) (Tab. 19).

Tabelle 19: Darstellung der Korrelationen der Immuninfiltration mit FoxP3-positiven Treg- (regulatorischen) Zellen im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie mit anderen untersuchten Parametern.

*Die Korrelation zwischen Treg-Zellen im Tumorzentrum und Nekrosetypen wird mittels punktbiserialer Korrelation und zwischen Treg-Zellen in der Tumorperipherie (semiquantitativer Score) und Nekrosetypen mittels biserialer Rang-Korrelation** berechnet.

Tregs im Tumorzentrum	Anzahl der Proben	Pearson/punktbiserialer Korrelation*	p-Wert
<i>Nekrose %</i>	26	-0,20	0,33
<i>Nekrosetyp (dominierende Stränge /andere Nekrosetypen*</i>	28	0,10*	0,60*
<i>MFI IL-17</i>	25	-0,29	0,15
<i>MFI TNF-α</i>	25	-0,11	0,61
<i>Ratio Sauerstoffsättigung Tumor/Pfote</i>	28	-0,13	0,51
Tregs in der Tumorperipherie	Anzahl der Proben	Spearman/biserialer Rang-Korrelation**	p-Wert
<i>Nekrose %</i>	26	-0,04	0,86
<i>Nekrosetyp (dominierende Stränge /andere Nekrosetypen**</i>	28	0,10**	0,62
<i>MFI IL-17</i>	25	-0,22	0,30
<i>MFI TNF-α</i>	25	-0,23	0,28
<i>Ratio Sauerstoffsättigung Tumor/Pfote</i>	28	0,01	0,95

Die gleichen Korrelationen, wie oben beschrieben, werden für die Proportion zwischen FoxP3-positiven Zellen und CD3-positiven Zellen in der Tumorperipherie und im Tumorzentrum berechnet. Analog zu den oben beschriebenen Ergebnissen finden sich keine statistisch signifikanten Korrelationen. Die Übersicht dieser Analyse mit dazugehörigen p-Werten ist der Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Darstellung der Korrelationen der FoxP3⁺/CD3⁺-Ratios im Tumorzentrum und in der Tumorperipherie mit anderen untersuchten Parametern.

*Die Korrelation zwischen der FoxP3⁺/CD3⁺-Ratio im Tumorzentrum und Nekrosetypen wird mittels punktbiserialer-Korrelation berechnet.

Ratio Treg/CD3 Zellen im Tumorzentrum	Anzahl der Proben	Pearson/punktbiserialer Korrelation*	p-Wert
<i>Nekrose %</i>	26	-0,02	0,92
<i>Nekrosotyp (dominierende Stränge /andere Nekrosetypen*</i>	28	-0,17	0,40
<i>MFI IL-17</i>	25	0,10	0,62
<i>MFI TNF-α</i>	25	-0,15	0,47
<i>Ratio Sauerstoffsättigung Tumor/Pfote</i>	28	-0,13	0,50
Ratio Treg/CD3 Zellen in der Tumorperipherie	Anzahl der Proben	Pearson/punktbiserialer Korrelation*	p-Wert
<i>Nekrose %</i>	26	-0,20	0,33
<i>Nekrosotyp (dominierende Stränge /andere Nekrosetypen*</i>	28	-0,08	0,69
<i>MFI IL-17</i>	25	-0,29	0,15
<i>MFI TNF-α</i>	25	-0,11	0,61
<i>Ratio Sauerstoffsättigung Tumor/Pfote</i>	28	-0,13	0,51

H. Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es, zum ersten Mal die Auswirkung von RIC auf die Tumorphoxie, die Immuninfiltration und das Zytokinprofil zu untersuchen. Es wird eine Wirkung von RIC auf verschiedene Aspekte der Tumorbiologie gezeigt.

a) Fazit Mikrozirkulationsmessungen

Um die Wirkung von RIC auf die Mikrozirkulation zu bestimmen, werden die Unterschiede in den o. g. Parametern zwischen der Baseline- und der letzten Reperfusionphase in der RIC-Gruppe und der entsprechenden Zeit in den Kontrollen verglichen.

Wir können keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zunahme (delta) der Perfusionsparameter zwischen der RIC- und der Kontrollgruppe feststellen.

Entgegen unseren Erwartungen ist die mikrozirkulatorische Wirkung der Isofluranarkose in der Kontrollgruppe sichtbar, allerdings mit unterschiedlich starker Ausprägung im gesunden Gewebe (nicht-ischämische Pfote) und im Tumorbereich. An der Pfote zeigt sich eine Tendenz zur Beschleunigung des Blutflusses ($p = 0,07$) parallel zur Besserung der Sauerstoffsättigung im kapillär-venösen Gefäßbett ($p = 0,06$). Im Tumorgewebe dagegen zeigt sich nur eine statistisch signifikante Erhöhung der Sauerstoffsättigung im kapillär-venösen Gefäßbett ($p = 0,035$), wobei Blutfluss und relativer Hämoglobingehalt keine Unterschiede zwischen Baseline- und Abschlussphase aufweisen. Ebenfalls unerwartet sind die Ergebnisse des Vergleichs derselben Parameter zwischen Baseline- und Abschlussphase in der RIC-Gruppe. In der RIC-Kohorte waren die Parameter der Abschlussphase im Vergleich zur Baselinephase unverändert ($p > 0,05$).

Es zeigen sich keine Unterschiede der Perfusionsparameter in der Baselinephase zwischen RIC- und Kontroll-Gruppe. Im direkten Vergleich der Perfusionsparameter aus der Abschlussphase zwischen der Kontroll- und RIC-Gruppe zeigt sich allerdings eine Tendenz zu einer besseren prozentuellen Oxygenierung des Tumorgewebes in der RIC-Gruppe, die um 11,3 Prozentpunkte und 22% höher im Verhältnis zur Kontrollgruppe ist (MWU, $p = 0,09$). Die mediane Oxygenierung des Tumors ist in der Kontrollgruppe um 19 % und in der RIC-Gruppe nur um 4 % niedriger im Vergleich zum gesunden Gewebe der nicht-ischämischen Hinterbeine (MWU, $p = 0,026$).

Eine Auswirkung des RIC auf die Pfote manifestiert sich zusätzlich in einer signifikant erhöhten Ratio Sauerstoffsättigung/relative Hämoglobingehalt nach der RIC-Intervention (Wilcoxon- Test, $p = 0,049$).

b) Fazit histologische und immunhistochemische Untersuchung

Es können keine Unterschiede bezüglich ICH Färbung für die akute (Pimonidazol) und chronische (CAIX) Hypoxie zwischen RIC- und Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Tumore aus der RIC- und Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht im Hinblick auf ein Ausmaß der Nekrose. RIC-Tumore entwickeln häufiger in Strängen angeordnete Nekrosen, während die Tumoren aus der Kontrollgruppe häufiger periphere oder zentrale Nekrosetypen aufweisen (exakter Fisher Test, $p = 0,03$).

Die CD3⁺-Immuninfiltration im Tumorzentrum ist in der RIC-Gruppe ausgeprägter. Bei den RIC-Tumoren ist der Median der Anzahl CD3-positiver Zellen mit 2,8 T-Zellen/HPF im Tumorzentrum im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Median von 1,6 T-Zellen/HPF signifikant höher (MWU, $p = 0,01$). In der Peripherie zeigt sich die Immuninfiltration in der RIC- und Kontrollgruppe vergleichbar mit einem Median von +/++ in beiden Gruppen (MWU, $p = 0,67$).

Insgesamt werden keine Unterschiede hinsichtlich der FoxP3-positiven Zellen innerhalb des Tumors und in der Tumorperipherie zwischen der Kontroll- und der RIC-Gruppe festgestellt. Im Tumorzentrum beträgt der Median der Anzahl von Treg-Zellen 0,71/HPF(200x) in der Kontroll- und 0,41/HPF(200x) in der RIC-Gruppe, was sich im Vergleich mittels MWU-Tests nicht signifikant unterscheidet ($p = 0,84$). In der Tumorperipherie erreicht die semiquantitativ-analyisierte Anzahl der Treg-Zellen einen Median von 1 (+) in der Kontroll- und RIC-Gruppe (MWU; $p = 0,63$).

c) Fazit Multiplex Immunoassay

Bei der Untersuchung von 23 Zytokinen zeigt sich, dass sich die beiden Gruppen bezüglich der MFI für IL-17 signifikant unterscheiden, mit höherer MFI (Median 34,4) in der RIC- als in der Kontrollgruppe (Median 28) (MWU, $p = 0,035$). Darüber hinaus besteht eine Tendenz zur höheren MFI von TNF- α in der RIC-Gruppe (Median 16,25) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Median 15) (MWU, $p = 0,063$).

4. Diskussion

Unseres Wissens haben bisher keine Studien die Wirkung von RIC auf solide Tumoren untersucht. Nach der Metaanalyse von Weir et al. war die durch den Verschluss der Oberschenkelarterie bei C57BL/6N-Mäusen hervorgerufene RIC-Wirkung bei experimentellen ischämischen Schlaganfällen neuroprotektiv, wobei die wirksamste Interventionszeit zwischen 10 und 45 Minuten bei mehr als 4 Zyklen lag (Weir et al., 2021). Die Wirkung von RIC wurde in dieser Metaanalyse anhand von 8 Studien an C57BL/6N-Mäusen nachgewiesen. Es ist wichtig zu betonen, dass RIC in kleineren Studien an Inzuchtratten und Rhesusaffen möglicherweise aufgrund zu kleiner Versuchsgruppen keine statistisch signifikante Wirkung zeigte. Das anfängliche Schutzfenster tritt unmittelbar nach der RIC-Applikation auf und dauert 2 Stunden, während das zweite Schutzfenster 12 - 24 Stunden nach dem RIC auftritt und 48 - 72 Stunden anhält (Kuzuya et al., 1993; Ren et al., 2008). Unsere Studie analysiert also nur die unmittelbare Auswirkung der RIC-Applikation. Drysch et al. verwendeten die nicht-invasive Niederdruckabschnürung mit 0,6 N bei C57BL/6N-Mäusen und zeigten, dass solch ein Tourniquet eine signifikante Verringerung der Gewebedurchblutung und Sauerstoffversorgung, eine erhöhte Schädigung der Muskelfasern und eine Zunahme der apoptotischen Marker verursachte, was wahrscheinlich auf den Verschluss der kollateralen Blutgefäße zurückzuführen war (Drysch et al., 2019). Unsere Überlegung, 6 RIC-Zyklen á 5 Minuten, mit kumulativ 30 Minuten Ischämie mit einer nicht-invasiven Methode in C57BL/6N-Mäusen durchzuführen, steht im Einklang mit der verfügbaren Literatur.

A. Einfluss von Isoflurannarkose auf die Perfusionsparameter in der Kontrollgruppe

Unter Isoflurannarkose in der Kontrollgruppe stellen wir an der Pfote eine Tendenz zur Beschleunigung des Blutflusses ($p = 0,07$) fest, parallel zur Besserung der Sauerstoffsättigung im kapillar-venösen Gefäßbett ($p = 0,06$). Im Tumorgewebe dagegen zeigt sich nur eine signifikante Erhöhung der Sauerstoffsättigung im kapillär-

venösen Gefäßbett ($p = 0,035$) ohne Veränderung des Flow oder Hämoglobingehalts. Diese Messungen könnten auf einen zusätzlichen Einfluss der Isoflurannarkose auf die Perfusion des Tumors und der nicht-ischämischen Pfote hinweisen.

Szczesny et al. beschrieben, dass die Anästhesie mit verdampftem Isofluran in Konzentrationen von bis zu 4 % in der Induktionsphase, von bis zu 1,5 % bei akuten chirurgischen Eingriffen und von bis zu 0,8 - 1,3 % bei längeren experimentellen Beobachtungen ohne Atemkomplikationen oder Veränderungen der systemischen Kreislaufparameter bei haarlosen, BALB/c und Nacktmäusen aufrechterhalten werden konnte (Szczesny et al., 2004). Das Narkoseprotokoll mit 4 % Isofluran in der Induktionsphase mit einer Erhaltungsdosis von 0,8 - 1,0 % wird in unserem Versuch ebenfalls komplikationslos angewendet. Baudelet et al. untersuchten den Einfluss von vier verschiedenen Anästhetika: Pentobarbital (60 mg/kg), Ketamin/Xylazin (80/8 mg/kg), Fentanyl/Droperidol (0,078/3,9 mg/kg) und Isofluran (1,5 %) auf die Tumoroxygenierung und den Blutfluss mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (MRT) mit Blood-oxygen-level-dependent imaging (BOLD)-Kontrast und OxyLite/OxyFlo-Sondensystem bei NMRI-Mäusen mit Tumoren (Leberkarzinomzellen) im Gastrocnemius-Muskel (Baudelet and Gallez, 2004). Die Signalintensität nahm in den Tumoren nach der Verabreichung von Anästhetika, mit Ausnahme von Isofluran, drastisch ab. Diese Ergebnisse korrelierten gut mit den Messungen von Oxygenierung und Blutfluss mittels OxyLite/OxyFlo-Sondensystem. Isofluran führte zu einem konstanten SpO_2 -Wert und einer konstanten Durchblutung der Muskeln, obwohl bei einigen Tumoren starke vorübergehende Schwankungen des SpO_2 -wertes und des Blutflusses festgestellt wurden. In dem Modell von Baudelet et al. wurde gezeigt, dass Isofluran vernachlässigbare Auswirkungen auf die Hämodynamik des Tumors hatte und sich daher optimal für die Untersuchung der Auswirkung anderer Faktoren auf die Hämodynamik des Tumors eignet.

Es wurde allerdings auch nachgewiesen, dass Isofluran in C57BL/6N-Mäusen eine kardiodepressive Wirkung hatte (Gentry-Smetana et al., 2008). Isofluran verringerte die Calciumsensitivität in Trabekeln der Herzmuskulatur bei gesunden Tieren und

auch bei Tieren (Frettchen) mit induzierter rechtsventrikulärer Hypertrophie (Hannon et al., 2004). Stevens et al. zeigten bei Menschen, dass die Isoflurannarkose zur Vasodilatation und Reduktion des Gefäßwiderstandes, Senkung des arteriellen Blutdrucks und Reduktion des Herzschlagvolumens führen kann (Stevens et al., 1971). Die Autor*innen stellten aber eine leichte Erhöhung des Blutflusses in der Muskulatur und Haut fest. Das reduzierte Herzschlagvolumen führte zunächst zu einem reduzierten Herzzeitvolumen, welches während der Narkose durch die kompensatorische Erhöhung der Herzschlagfrequenz ausgeglichen werden konnte. Bei höheren Konzentrationen von Isofluran (2,4 %) wurde eine Reduktion des Sauerstoffverbrauchs festgestellt (Stevens et al., 1971). Brett et al. beobachteten allerdings noch andere Effekte von Isofluran in neugeborenen Lämmern. Diese Autor*innen zeigten, dass Isofluran zur Reduktion des regionalen Blutflusses im Gehirn, an der Flanke, in Herz, Nieren, Nebennieren und Milz führte, wobei hier auch eine stärkere kardio-depressive Wirkung mit Reduktion von Herzfrequenz, Schlagvolumen, Herzzeitvolumen sowie mit Blutdrucksenkung beobachtet wurde (Brett et al., 1987). Der systemische Gefäßwiderstand änderte sich bei neugeborenen Lämmern nicht, die Sauerstoffextraktion war erst bei MAC 1,5 reduziert. Palmisano et al. untersuchten einen Einfluss von Isofluran auf isolierte Kaninchenherzen und stellten eine dosisabhängige Beschleunigung der atrioventrikulären Überleitung, sowie einen Anstieg des Blutflusses im koronaren Gefäßbett sowie eine ebenfalls dosisabhängige Reduktion der Sauerstoffextraktion fest (Palmisano et al., 1994).

In unserer Arbeit kam es unter Isoflurannarkose in der Kontrollgruppe an der Hinterpfote zu dem leichten Anstieg von Blutfluss ($p = 0,07$) und Sauerstoffsättigung ($p = 0,06$) bei unverändertem relativen Hämoglobingehalt, was durch eine leicht vasodilatative Wirkung von Isofluran erklärt werden könnte. Aufgrund des schnelleren Austausches des Blutes im Gefäßbett der Hinterpfote blieb mehr Sauerstoff im Gewebe übrig und somit erhöhte sich auch leicht die Sauerstoffsättigung. Die Gefäße im Tumorbereich reagierten anders als das Gefäßbett der Hinterpfote auf die Isoflurannarkose. Hier wurde ein statistisch signifikanter Anstieg der Sauerstoffsättigung

($p = 0,035$) ohne Anstieg des Flow oder des relativen Hämoglobingehalts beobachtet. Im Tumorgewebe mit pathologischem Gefäßsystem scheint Isofluran keine wesentliche vasodilatative Wirkung zu haben. Ein alleiniger Anstieg der Sauerstoffsättigung könnte aufgrund der verminderten Sauerstoffextraktion, also aus dem verminderten Metabolismus des Tumorgewebes während der Narkose resultieren. Der intraindividuelle Vergleich der Perfusionsparameter der Baseline- und Abschlussphasen sowohl an der Hinterpfote wie auch im Tumorgewebe in der RIC-Gruppe ergab keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,1$). Es kann wiederum drauf hingewiesen werden, dass RIC zumindest teilweise die Isofluranwirkung auf die Perfusion des Tumors und der Hinterpfote in diesem direkten Vergleich aufheben konnte.

B. Einfluss des RIC auf die Perfusionsparameter unter Berücksichtigung der Wirkung der Isoflurannarkose

Obwohl statistisch nicht signifikant, wird während des Experiments in der Kontrollgruppe ein Anstieg von Flow, rHb, Sauerstoffsättigung an der Pfote und im Tumor beobachtet. In der RIC-Gruppe zeigen sich ähnliche Tendenzen, obwohl der rHb an der Pfote in der RIC-Gruppe als einziger Parameter um -1,38 RAU gesunken ist. Ebenfalls rein deskriptiv steigen die medianen Werte der Perfusionsparameter höher in der Kontrollgruppe, mit Ausnahme der Sauerstoffsättigung des Tumors in der RIC-Gruppe, welche um 3,14% in der RIC-Gruppe und um 1,06% in der Kontrollgruppe anstieg.

Bei einer Tendenz zu einer besseren Oxygenierung des Tumorgewebes in der RIC-Gruppe in der Abschlussphase, die im direkten Vergleich um 11,3 Prozentpunkte (und somit 18 %) höher als in der Sham-Gruppe (MWU, $p = 0,09$) ist, ist zusätzlich festzustellen, dass in der RIC-Gruppe eine Sauerstoffsättigung des Tumors im Verhältnis zur Sauerstoffsättigung der Pfote statistisch signifikant (MWU, $p = 0,026$) höher als in der Kontrollgruppe war. Es weist darauf hin, dass RIC eine unterschiedliche Wirkung auf das Gefäßbett des gesunden Gewebes und des Tumors haben

kann. Die Proportionen von anderen Perfusionsparametern unterscheiden sich nicht statistisch signifikant in der Abschlussphasen zwischen der RIC- und Kontrollgruppe.

Zusammengefasst scheint die Isoflurannarkose in der Kontrollgruppe eine Erhöhung der Perfusionsparameter zu verursachen, mit gleichen Tendenzen, aber summarisch kleineren Unterschieden als in der RIC-Gruppe. Eine besondere Ausnahme ist hier, wie oben beschrieben, die SpO₂ des Tumors. Die höhere Sauerstoffsättigung im Tumorgewebe nach RIC im Vergleich zur Kontrollgruppe kann eine Folge einer Erhöhung (um 11,75 % im Vergleich zur Anfangsphase) des Blutflusses sein. Eine zusätzliche Wirkung der Isoflurananästhesie könnte im Vergleich zur Kontrollgruppe (Erhöhung vom Blutfluss im Tumorgewebe um 10,7 %) die Effekte der Erhöhung des Flow statistisch unbemerkbar machen.

Eine andere Erklärung für die höhere Sauerstoffsättigung im Tumorgewebe ist die reduzierte Sauerstoffextraktion infolge der RIC-Applikation, die möglicherweise erst im metabolisch sehr aktiven Gewebe zur Ausprägung kommt und daher bevorzugt das Tumorgewebe betrifft. RIC könnte im narkotisierten Tier möglicherweise bei niedrigerem Anstieg des Flow und der kapillären Füllung im Tumorgewebe, verglichen zur Kontrollgruppe möglicherweise zur zumindest relativen Reduktion der Sauerstoffextraktion führen. In der Kontrollgruppe war der Anstieg von Flow und kapillärer Füllung im Tumorgewebe deskriptiv höher als in der RIC-Gruppe, dabei stieg die SpO₂ im Verhältnis weniger an als in der RIC-Gruppe, sodass in der Kontrollgruppe möglicherweise die Sauerstoffextraktion und der Sauerstoffverbrauch größer oder zumindest proportional zum Anstieg von anderen Perfusionsparametern war.

C. Interpretation der Ergebnisse im Kontext der bisherigen Erkenntnisse über RIC
Kolbensschlag et al. haben mit der gleicher Messmethode beobachtet, dass sich bei freien Lappen infolge der RIC-Applikation die Gewebesauerstoffsättigung signifikant

an den postoperativen Tagen 1 und 12, und der Blutfluss signifikant an den postoperativen Tagen 5 und 12 ($p < 0,05$) verbesserte (Kolbensschlag et al., 2016). Die Autor*innen beobachteten zunächst eine Steigerung der Gewebesauerstoffsättigung und anschließend nach ein paar Tagen erst eine statistisch signifikante Besserung des Blutflusses. Diese Erkenntnisse können im Kontext unserer Ergebnisse darauf hinweisen, dass eine alleinige Erhöhung der Sauerstoffsättigung im Tumorgewebe im Verhältnis zur Kontrollgruppe ein erster Schritt der positiven Modifikation der Mikroperfusion infolge der kurzfristigen RIC-Applikation sein könnte.

Die Wirkung von RIC erscheint aber viel komplexer als eine reine Verbesserung der Sauerstoffsättigung und des Blutflusses zu sein. Diese diversen Effekte von RIC wurden in der Studie von Hegelmaier et al., die die Wirkung von RIC bei Patient*innen mit komplexem regionalem Schmerzsyndrom (CRPS) untersuchte, auf interessante Weise demonstriert (Hegelmaier et al., 2017). Nach RIC nahm der Blutfluss der betroffenen Extremitäten bei CRPS-Patient*innen entgegen den Erwartungen der Autor*innen ab ($p < 0,01$). Die Sauerstoffsättigung nahm sowohl bei CRPS als auch bei gesunden Kontrollen ab ($p < 0,01$). Nur bei CRPS-Patient*innen korrelierte die Sauerstoffextraktion negativ mit dem reduzierten Blutfluss ($p < 0,05$). Dies ließ vermuten, dass RIC eine pathologische Mikrozirkulation bei CRPS-Patient*innen normalisierte und das Gewebe dadurch Sauerstoff aus dem Gefäßbett besser extrahieren konnte. Eine Folgestudie bewies, dass Glukokortikoide in Kombination mit einer begleitenden Schmerzbehandlung die Perfusion bei CRPS-Patient*innen ebenfalls normalisierte, was anhand von Perfusionsparametern gezeigt werden konnte. Dieser Effekt könnte a. e. durch eine reduzierte Heterogenität der Kapillardurchlaufzeit und damit eine verbesserte Sauerstoffextraktion der betroffenen Hand vermittelt werden (Kumowski et al., 2019).

Eine ausführliche Analyse der Wirkung von RIC in einem tierexperimentellen murinen Modell für nekrotisierende Enterokolitis (NEC) haben Koike et al. dargestellt (Koike et al., 2020). Sie haben drei unterschiedliche Zeitpunkte im Krankheitsverlauf der nekrotisierenden Enterokolitis für RIC gewählt, die jeweils aus zwei Episoden

von RIC bestanden und 48 Stunden auseinanderlagen. Wenn RIC in den frühen Stadien des Krankheitsverlaufs verabreicht wurde, konnte es intestinale Läsionen verringern und das Überleben der betroffenen Tiere verlängern. An der Hinterpfote applizierte RIC wirkte durch eine Erhöhung der intestinalen Perfusion infolge einer Vasodilatation, die durch Stickstoffmonoxid und Wasserstoffsulfid vermittelt wurde. Entgegen diesen Beobachtungen bewiesen Kolbenschlag et. al, dass eine RIC-Applikation an der oberen Extremität für die Förderung des kutanen Blutflusses des anterolateralen Oberschenkels der RIC-Applikation an der unteren Extremität überlegen ist (Kolbenschlag et al., 2015). Da die Größenordnung der Freisetzung der oben genannten Substanzen mit der Menge an ischämischem Gewebe korrelieren sollte, könnte vermutet werden, dass eine höhere Masse an ischämischem Gewebe zu einer Zunahme des Effekts der RIC führen könnte. Die Ergebnisse von Kolbenschlag et al. zeigen jedoch das Gegenteil, da die Menge an ischämischem Gewebe in der Bein-Gruppe etwa dreimal so hoch war wie in der Arm-Gruppe. Daher könnte man vermuten, dass es eine bestimmte Schwelle gibt, die einen RIC-Reiz auslöst und nach der weiteren Aktivierung nicht zu einer erhöhten Reaktion führt (Kolbenschlag et al., 2015).

Brzozowski et al. haben den Einfluss einer kardialen, hepatischen und gastrischen Präkonditionierung mit kurzer Ischämie (Verschluss der Koronararterien sowie hepatischer und zöliakaler Arterien zweimal für 5 Minuten) auf die Magendurchblutung und auf Schäden nach 3-stündiger Ischämie/Reperfusion untersucht (Brzozowski et al., 2004). Eine 3-stündige Ischämie und nachfolgende Reperfusion des Magens führte zu zahlreichen Magenläsionen, verminderter Magendurchblutung und verminderter Bildung von mukosalem Prostaglandin E₂ (PGE₂) sowie erhöhter Expression und Freisetzung von IL-1 und TNF- α . PGE₂ spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des vaskulären glatten Muskeltonus. Es ist ein Vasodilatator, der von Endothelzellen produziert wird. Es fördert die Vasodilatation der glatten Muskulatur, indem es die Aktivität von cAMP erhöht und den intrazellulären Calciumspiegel senkt. In der Studie von Brzozowski et al. konnte gezeigt werden, dass eine RIC-

Präkonditionierung die schädlichen Folgen der Ischämie abschwächen konnte. Da die protektiven Effekte der kurzen gastrischen, kardialen und hepatischen Präkonditionierung durch selektive Cyclooxygenase-1- und Cyclooxygenase-2-Inhibitoren sowie durch Capsaicin-Denervierung aufgehoben werden konnte, vermuteten diese Autor*innen, dass der Mechanismus der RIC-Präkonditionierung auf der Wirkung von Prostaglandinen, die von Cyclooxygenase-1 und Cyclooxygenase-2 produziert werden, sowie auf der Aktivierung von sensiblen Nerven, die Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) freisetzen, basierte (Brzowski et al., 2004).

Eine mögliche Mitwirkung von Stickstoffmonoxid und neuronaler Aktivierung sensibler Nerven kann sich hypothetisch in einer Rolle dieses Gases als Neurotransmitter manifestieren (Boehning and Snyder, 2003). Im Bereich der Synapse aktiviert Calciumeintritt durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren die Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) in einem Calcium/Calmodulin-abhängigen Mechanismus. Das von nNOS produzierte NO kann in benachbarte Zellen diffundieren, um die lösliche Guanylatzyklase zu aktivieren oder Cysteinreste von Zielproteinen kovalent durch S-Nitrosylierung zu modifizieren. Die Nitrosylierung von NMDA-Rezeptoren hemmt deren Aktivität und bietet somit eine negative Rückkopplungsschleife für die NMDA-Rezeptor-Signalgebung (Nowaczyk et al., 2021). Obwohl NMDA-Rezeptoren vor allem mit einer Neurotransmission im zentralen Nervensystem assoziiert sind, haben sie auch eine Rolle im peripheren Nervensystem. McRoberts et al. fanden NMDA-Rezeptoren auf den Zellen und peripheren Endigungen von primären afferenten Nerven, die den Darm von Ratten innervieren (McRoberts et al., 2001). Die Aktivierung peripherer NMDA-Rezeptoren in Kolon-Gewebeschnitten führte zu einer Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung der proinflammatorischen Neuropeptide: Calcitonin-Gen-Related Peptide und Substanz P (McRoberts et al., 2001). Die erste dieser Substanzen wurde in der Studie von Brzowski et al. als kritisch für die protektive Wirkung in der RIC-Präkonditionierung des Magens identifiziert (Brzowski et al., 2004).

Obwohl einige kurzfristige Veränderungen der Mikrozirkulation dokumentiert wurden, werden in dieser Arbeit bei der IHC keine statistisch relevanten Veränderungen

der akuten Hypoxie im Verhältnis zur chronischen, endogenen Hypoxie zwischen der RIC- und der Kontrollgruppe festgestellt. Nordmark et al. beobachteten jedoch auch, dass die invasiven Messungen der Gewebeoxygenierung (invasive O₂-sensitive Elektroden) in menschlichen Gebärmutterhalskarzinomen aufgrund einer heterogenen Verteilung der hypoxischen Bereiche innerhalb des Tumors nicht eindeutig mit der Pimonidazol-Markierung korrelierten (Nordmark et al., 2001). Die inhomogene Verteilung der hypoxischen Bereiche innerhalb der dreidimensionalen Tumorproben könnte ebenfalls ein Grund für die Diskrepanzen zwischen den Sauerstoffmessungen und der zweidimensionalen IHC sein. Eine adäquate Quantifikationsmethode der Hypoxie stellte eine weitere Herausforderung der Studie dar, sodass die Analyse mit einer semiquantitativen Skala erfolgte. Andere Autor*innen, wie z. B. Hasseldam et al., haben eine semiquantitative Western-Blot-Detektion von Pimonidazol-Addukten in einem Rattenmodell des reversiblen Verschlusses der mittleren Hirnarterie verwendet, in dem die Ratten mit RIC-Postkonditionierung behandelt wurden (Hasseldam et al., 2013). Sie zeigten, dass Pimonidazol zur Quantifizierung des ischämischen Einflusses bei Schlaganfällen verwendet werden kann, selbst nach sehr kurzen Überlebenszeiten. Möglicherweise war also die eher diskrete Modifikation der Mikrozirkulation durch RIC in unserer Studie in dem sowieso stark ischämischen Tumorgewebe nicht ausreichend, um die signifikanten Veränderungen in der Pimonidazol-Immunhistochemie zu verursachen.

Tumornekrose wurde als negativer prognostischer Faktor bei Krebserkrankungen wie Melanomen, Brust- und Darmkrebs gezeigt (Ladstein et al., 2012; Richards et al., 2012; Xu et al., 2012; L. Zhang et al., 2018). Wir beobachteten keinen signifikanten quantitativen Unterschied der nekrotischen Areale zwischen der RIC- und der Kontrollgruppe. In der aktuellen Literatur fanden wir keine Beschreibungen oder Relevanz für die verschiedenen Nekrose-Verteilungen, die in unserer Studie beobachtet wurden. Die Arten der Nekrose korrelierten nicht mit der Immuninfiltration der Tumorproben.

Der Mechanismus von RIC ist also komplex und nicht vollständig untersucht. Er scheint die neuronalen und chemischen Faktoren zu involvieren, die möglicherweise voneinander abhängig sind. Die Komplexität von RIC spiegelt sich auch in den immunologischen Reaktionen wider, die in unserer Studie interessanterweise beobachtet werden.

D. Immunmodulation im Tumorgewebe infolge der RIC-Intervention

Die Hauptveränderungen durch RIC in unserer Studie betreffen die Entzündungsreaktion, da die Anzahl der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) im Tumorzentrum (MWU, $p = 0,01$) und die MFI von IL-17 (MWU, $p = 0,035$) signifikant höher sind als in der Kontrollgruppe mit starker Tendenz zu höheren MFI von TNF- α (MWU, $p = 0,06$) in der RIC-Gruppe. Es besteht keine Korrelation zwischen den MFIs von Zytokinen und der Anzahl der TILs innerhalb des Tumors oder in der Tumorperipherie.

Schon im Jahr 1989 wurde erkannt, dass die Dichte („brisk“, „non-brisk“, „absent“) von TILs innerhalb primärer Melanom-Hautläsionen eine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben hat (Clark et al., 1989). In mehreren späteren Studien wurde eine T-Zellinfiltration nicht nur mit einer besseren Gesamtüberlebensrate beim menschlichen Melanom, sondern auch mit einer besseren Reaktion auf Immuntherapien in Verbindung gebracht (Fu et al., 2019; Maibach et al., 2020; Morrison et al., 2022; Taube et al., 2012; Thomas et al., 2013; Vasaturo et al., 2016; J. Yang et al., 2021). Vasaturo et al. beobachteten, dass Patient*innen mit metastasiertem Melanom, die eine dendritische Zellimpfung erhielten, ein besseres Gesamtüberleben (OS) hatten, wenn die Infiltration von CD3⁺-TILs stärker war (Vasaturo et al., 2016). Außerdem stellten sie fest, dass die Verteilung von CD3⁺-Zellen innerhalb des Tumors (beurteilt durch intratumorale versus peritumorale T-Zelldichten) der stärkste Vorhersagefaktor für das OS nach der Behandlung war.

In einer umfassenden Arbeit zum kolorektalen Karzinom von Galon et al. wurde eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Markern für die Th1-Polarisation sowie zytotoxischen und Gedächtnis-T-Zellen und einer niedrigen Inzidenz von Tumorrezidiven festgestellt (Galon et al., 2006). Diese Beobachtung hing a. e. von der Funktion der langanhaltenden antitumoralen Kapazität von Gedächtnis-T-Zellen ab, die eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Tumorrezidiven spielen (Galon et al., 2006). Der Typ und die Dichte von Immunzellen in Kolonkarzinomen hatten sogar einen prognostischen Wert, der dem der Union for International Cancer Control- TNM (UICC-TNM) -Klassifikation überlegen und von dieser Klassifikation unabhängig war (Pagès et al., 2018). Dies legt nahe, dass die Zeit bis zum Rezidiv und die Gesamtüberlebenszeit vom Zustand der lokalen adaptiven Immunantwort abhängig sind.

Da die Erhöhung von CD3⁺-T-Zellen im Tumorzentrum in der RIC-Gruppe kurzfristig war, ist zu vermuten, dass diese Infiltration durch Eindringen der bereits aktivierten antitumoralen T-Zellen im Rahmen der adaptiven Immunantwort beeinflusst war. Im Kontext der verfügbaren Literatur zeigte RIC einen positiven Einfluss auf die Immuninfiltration, vor allem im Tumorzentrum, was möglicherweise auch eine Auswirkung auf das OS und die bessere Kontrolle von Tumorrezidiven in der Kombination mit anderen, etablierten Therapiestrategien wie Immun- oder Chemotherapie haben könnte. Dies ist allerdings erst im Rahmen der Folgestudien zu analysieren.

Obwohl praktisch nützlich, stellt die Analyse der T-Zell-Immuninfiltration nur mittels CD3⁺-IHC eine Vereinfachung dar, da auch die immunsuppressiven Treg-Zellen den CD3 Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 ist ein Schlüsselmolekül für die Entwicklung und Funktion von Tregs und gilt bisher als spezifischster Treg-Marker, auch bei den untersuchten C57BL/6 Mäusen (Shang et al., 2015). Unter normalen Bedingungen funktionieren die FoxP3⁺-Tregs als essenzielle Suppressoren von Antitumor-Reaktionen und erhalten so die immunologische Toleranz gegenüber dem Wirtsgewebe (Shang et al., 2015; Tanaka & Sakaguchi, 2017; Ward-Hartstonge & Kemp, 2017).

Die Metaanalyse von Shang et al. bestätigte, dass eine Infiltration mit FoxP3⁺-Tregs kumulativ für alle Krebsarten mit einer signifikant niedrigeren Überlebensrate verbunden war [Odds-Ratio (OR) von 1,46] (Shang et al., 2015). Im Detail war eine hohe Infiltration von FoxP3⁺-Tregs mit einer kürzeren Überlebenszeit bei Patient*innen mit Gebärmutterhalskrebs (OR 5,11), Nierenkarzinom (OR 4,26), Melanom (OR 2,15), Leberzellkarzinom (OR 1,82), Magenkrebs (OR 1,65) und Brustkrebs (OR 1,65,) assoziiert. Im Gegensatz dazu wurde allerdings eine höhere Infiltration mit FoxP3⁺-Tregs mit einer verbesserten Überlebenszeit bei Darmkrebs (OR 0,71) und Ösophaguskarzinom (OR 0,51) in Verbindung gebracht (Shang et al., 2015). Eine andere Metaanalyse von Shou et al. zeigte, dass eine höhere Anzahl an infiltrierenden FoxP3⁺-T-Zellen bei Patientinnen mit Brustkrebs zu einer niedrigeren Gesamtüberlebensrate führte und signifikant mit dem positiven human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)- Status, dem positiven Lymphknotenstatus sowie dem negativen Östrogenrezeptor (ER)-Status assoziiert war (Shou et al., 2016).

Die Blockade von Tregs stellt eine der neuesten, aktuell noch in der experimentellen Phase befindlichen Strategien in der Krebstherapie dar. FoxP3-blockierende Antisense-Oligonukleotide (ASOs) haben in vitro und in vivo eine Reduktion von mehr als 70 % der infiltrierenden FoxP3⁺-Tregs verursacht, Treg-Effektormoleküle [z. B. Inducible T-cell Co-Stimulator (ICOS), CTLA-4, CD25 und tumor necrosis factor receptor superfamily member 9 (TNFRSF9)] stark moduliert und die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen erhöht sowie eine antitumorale Aktivität in syngenem Tumor-Modellen erzeugt (Revenko et al., 2022).

Weitere Erkenntnisse zum Einfluss von Treg-Zellen konnten in der klinischen Studie von Krebsimpfungen in der Gruppe von Patient*innen mit metastasierten Melanomen gewonnen werden (Nicholaou et al., 2009). New York esophageal squamous cell carcinoma-1 (NY-ESO-1) ist ein hoch immunogenes Antigen, das in verschiedenen Krebsarten exprimiert wird und daher ein ausgezeichnetes Ziel für Krebsimpfungen darstellt. Nicholaou und Kolleg*innen haben einen Impfstoff aus vollständig rekomb-

binantem NY-ESO-1-Protein in Kombination mit dem ISCOMATRIX-Adjuvans entwickelt (Nicholaou et al., 2009). Dieser Impfstoff erzeugte starke humorale und T-Zell-vermittelte Immunantworten und reduzierte das Risiko eines Rezidivs bei Patient*innen mit vollständig reseziertem Melanom. Patient*innen mit fortgeschrittenem Melanom zeigten aber keine klinischen Reaktionen auf die Impfung. Obwohl starke Antikörperantworten auftraten, war die Bildung einer verzögerten Überempfindlichkeitsreaktion signifikant beeinträchtigt. Der Anteil an Patient*innen mit zirkulierenden NY-ESO-1-spezifischen CD4⁺-T-Zellen war ebenfalls reduziert und, obwohl viele Patient*innen CD8⁺-T-Zellen hatten, die spezifisch für eine breite Palette von NY-ESO-1-Epitopen waren, waren die meisten dieser Reaktionen bereits vorbestehend. Tregs wurden im Blut durch durchflusszytometrische Detektion von Zellen mit einem CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ und CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ Phänotyp gezählt. Patient*innen mit fortgeschrittenem Melanom hatten im Vergleich zu denen mit minimalem Resttumor einen signifikant höheren Anteil an zirkulierenden Tregs. Die fehlende klinische und immunologische Wirksamkeit des NY-ESO-1 ISCOMATRIX-Krebsimpfstoffs wurde mit einer erhöhten Anzahl von Treg-Zellen in Patient*innen mit fortgeschrittenen Melanomen assoziiert (Nicholaou et al., 2009).

Laut der aktuellen Literatur ist von einem überwiegend negativen Einfluss der Treg-Zellen auf die antitumorale Immunantwort auszugehen. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie auch der Einfluss auf die Infiltration mit Treg-Zellen infolge der RIC-Applikation untersucht. Trotz der Erhöhung der Infiltration mit CD3⁺-T-Zellen im Tumorzentrum in der RIC-Gruppe zeigt sich die Infiltration von Treg Zellen mit einem Median von 0,71/HPF (200x) in der Kontroll- und 0,41/HPF (200x) in der RIC-Gruppe, in beiden Gruppen in Tumorzentrum vergleichbar (MWU, p = 0,84). In der Tumorperipherie finden sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede (MWU, p = 0,76). Deskriptiv zeigt sich, dass im Tumorzentrum der RIC-Gruppe ca. 10,5 % aller T-Zellen T-Suppressor-Zellen sind, während in der Kontrollgruppe ca. 26 % der T-Zellen auch FoxP3 positiv sind, diese Unterschiede sind allerdings nicht statistisch signifikant (MWU, p = 0,19). In der Tumorperipherie beträgt die Ratio

zwischen FoxP3-positiven Zellen und allen CD3-positiven Zellen 0,58 in der Kontroll- und 0,6 in der RIC-Gruppe, was sich auch statistisch nicht signifikant unterscheidet (MWU, $p = 0,76$).

RIC scheint also selektiv im Tumorzentrum eine Erhöhung von CD3-positiven aber nicht von T-Suppressor-Zellen zu verursachen, was im Kontext zur verfügbaren Literatur als positiv zu sehen ist und möglicherweise zur verstärkten Antitumor-Antwort führen könnte. Diese Eigenschaft der RIC-Antwort wäre ebenfalls in Kombination mit anderen Therapien, z. B. Impfungen gegen bestimmte Krebs-Antigene nützlich, bei denen eine Erhöhung von Treg-Zellen einen negativen Effekt auf die Antitumor-Antwort infolge der Therapie zeigte (Nicholaou et al., 2009).

E. Serologische Änderungen infolge der RIC-Applikation

a) Interleukin 17

IL-17, vor allem von sog. T-Helfer (TH17)-Zellen produziert, wirkt hauptsächlich auf die angeborene Immunität und induziert stark eine Neutrophile, was indirekt durch die Produktion von Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF), Monozyten-Chemoattraktant-Protein-1 (MCP-1) und CXC-Chemokinen aus nicht-hämatopoetischen Zielzellen erreicht wird. Demzufolge geht ein Mangel an IL-17 fast immer mit einer verringerten Aktivierung von Neutrophilen einher (Buckley et al., 2017; McGeachy et al., 2019). IL-17 ist an Immunreaktionen gegen extrazelluläre Bakterien (Klebsiella, Staphylococcus, Enterobacteriae, Porphyromonas), Pilze (Candida, Blastomyces) und intrazelluläre Pathogene wie Mycobacterium tuberculosis beteiligt (Gopal et al., 2014; Ivanov et al., 2009; Khader et al., 2007). Darüber hinaus schützt IL-17 die Schleimhautbarrieren, indem es die sog. Tight Junctions des Darmepithels aufrechterhält und antimikrobielle Proteine wie β -Defensine und Calprotectin hochreguliert (Veldhoen, 2017).

Im Darm trägt die Signalübertragung von IL-17 zur Adenombildung bei, indem es die Proliferation und das Überleben von Enterozyten, die Mutationen im Adenomatöse-

Polyposis-Coli-Gen (Apc-Gen) aufweisen, erhöht. Das Adenom beeinträchtigt die Darmbarrierefunktion und verstärkt so eine intratumorale IL-17-Antwort, die das Tumorstadium verstärkt (Wang et al., 2014). Eine wachsende Zahl von Studien wies auf eine tumorigene Rolle des proinflammatorischen IL-17 hin, die hauptsächlich Schleimhautgewebe betraf und sich abhängig vom genetischen Polymorphismus des IL-17 auswirkte (Chen et al., 2019; Gao et al., 2019; Liu et al., 2022; McGeachy et al., 2019; Wang et al., 2014, 2010; Y. Zhang et al., 2018). Die experimentellen Ergebnisse zeigten, dass das Wachstum der Melanom-Zelllinie B16-F10 in IL-17^{-/-}-c57/B6N Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant gehemmt wurde. Darüber hinaus wurde das Wachstum von B16-F10-Tumoren bei Wildtyp-Mäusen durch eine Behandlung mit neutralisierenden Anti-IL-17-Antikörpern oder mit Platelet factor 4 (PF4) im Vergleich zu Kontrollen gehemmt (Fang et al., 2014; Tang et al., 2013).

Ein Einfluss von IL-17 auf den Krankheitsverlauf der bereits existierenden Malignome ist allerdings komplexer und vielseitiger. In der Metaanalyse von Zeng et al. wurde festgestellt, dass IL-17 mit einer schlechten OS und kürzerer krankheitsfreier Überlebenszeit (DFS) bei gastrointestinalen Tumoren und nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) korrelierte, während es als vorteilhafter Faktor für Patient*innen mit Ösophaguskarzinom [OS, Hazard Ratio (HR)= 0,65] und Ovarialkarzinom (OS, HR = 0,33) beschrieben worden war (Zeng et al., 2015). Diese Metaanalyse zeigte, dass die Auswirkung von IL-17 auf den Verlauf einer Krebserkrankung gewebespezifisch sein könnte.

Garcia-Hernandez et al. beobachteten in einem murinen Melanom-Modell, dass der Transfer von OVA-spezifischen IL-17-produzierenden CD8⁺-T-Zellen auf Melanomtragende Mäuse das Tumorstadium unterdrückte und zu einer verstärkten Rekrutierung von TILs führte, wahrscheinlich aufgrund der verstärkten Sekretion von IL-17, TNF- α und IFN- γ durch die transferierten Zellen (Garcia-Hernandez et al., 2010). Der beschriebene ko-stimulatorische Effekt von IL-17 und TNF- α ähnelt der Zytokin-signatur in der RIC-Gruppe in unserer Studie. In unserer Untersuchung ist die MFI

des IL-17 in der RIC-Gruppe höher (MWU, $p = 0,035$) und es besteht eine Tendenz zur höheren MFI von TNF- α (MWU, $p = 0,063$) in der RIC- Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen.

Andere Autor*innen haben ovalbuminspezifische Th17-Zellen generiert und transgenen OTII-Mäusen mit B16-OVA-Melanomen verabreicht (Ankathatti Munegowda et al., 2011). Th17-Zellen haben sog. MHC-I-Komplex erworben und eine Expression von retinoid-related orphan receptor gamma (ROR γ T), IL-17 und IL-2 gezeigt (Ankathatti Munegowda et al., 2011). Obwohl Th17-Zellen keine direkte tumorzell-törende Aktivität in vitro hatten, waren sie in der Lage, CD8⁺-zytotoxische-Antworten über IL-2 und pMHC-I, aber nicht über IL-17-Signalgebung, zu stimulieren. Th17-Zellen stimulierten die Expression von Chemokine 2 und 20 in der Mikroumgebung von Lungentumoren und förderten die Rekrutierung verschiedener entzündlicher Leukozyten [Dendritischen Zellen (DCs), CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen], die eine stärker ausgeprägte therapeutische Immunität gegen frühe Lungenmetastasen bei kleinen Tumoren als gegen gut etablierte (6 mm, s. c.) Tumore zeigten. Der therapeutische Effekt von transferierten Th17-Zellen korrelierte jedoch stark mit IL-17 (Ankathatti Munegowda et al., 2011).

Zelba et al. beobachteten beim humanen Melanom, dass der Einfluss von IL-17 und der T-Zell-Antwort stark von einem gezielten Antigen abhing (Zelba et al., 2014). Patient*innen mit dominierenden zirkulierenden CD4⁺-T-Zellen gegen Melan-A hatten eine schlechtere Überlebensrate als jene mit CD8⁺-Typ-Antwort. Die Produktion von IL-17 der CD4⁺-T-Zellen trug bei diesen Patient*innen unabhängig zur schlechteren Prognose bei. Patient*innen mit vorherrschenden T-Zellen, die auf das NY-ESO-1-Antigen reagierten, hatten eine bessere und längere Überlebensrate, unabhängig von der Art der T-Zell-Antwort oder der Produktion von IL-17 (Zelba et al., 2014). Eine Rolle von IL-17 im Krankheitsverlauf hängt also von dem Zielantigen der Immunantwort ab.

Køllgaard et al. analysierten eine mögliche Korrelation von Th17-Zellen, myeloiden Suppressorzellen und Tregs vor der Impfung mit Survivin-abgeleiteten Peptiden mit

sowohl einer vakzininduzierter T-Zell-Antwort als auch den klinischen Ergebnissen bei Patient*innen mit metastasiertem Melanom (Køllgaard et al., 2015). Die Autor*innen stellten fest, dass der Anteil der Th17-Zellen ($p = 0,03$) und Tregs ($p = 0,02$) in der Subpopulation der mononukleären Zellen im peripheren Blut im Vergleich zu gesunden Spender*innen erhöht war. IL-17-produzierende $CD4^+$ -T-Zellen zeigten eine signifikante Auswirkung auf die immunologischen und klinischen Effekte der Impfung. Patient*innen mit einer hohen Anzahl von Th17-Zellen vor der Impfung hatten eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine Survivin-spezifische T-Zell-Reaktivität nach der Impfung zu entwickeln ($p = 0,03$). Darüber hinaus korrelierte die Konzentration von Th17 ($p = 0,09$) positiv mit dem Überleben der Patient*innen nach der Impfung (Køllgaard et al., 2015).

Im murinen Brustkrebsmodell verhinderte die Neutralisierung von IL-17 oder G-CSF und das Fehlen von $\gamma\delta$ -T-Zellen die Ansammlung von Neutrophilen, reduzierte die Metastasierungsrate und hemmte das Fortschreiten des Tumors (Coffelt et al., 2015). Diese Ergebnisse lassen also eine sehr negative Rolle von IL-17 für die Metastasierung von Brustkrebs vermuten.

Kryczek und Kolleg*innen haben festgestellt, dass durch Th17 exprimiertes IL-17 und IFN γ die Produktion anderer Chemokine, wie Chemokine 9 und 10, weiter induzierte und die Migration von Effektorzellen bei Ovarialtumoren gefördert wurde (Kryczek et al., 2009). Basierend auf vorherigen Beobachtungen, dass IL-17 und Th17-Zellen mit einer verbesserten Überlebensrate bei Ovarialkarzinom assoziiert sind, wurde die Rolle von Th17 auch im Kontext antitumorale Impfungen untersucht (Kryczek et al., 2009; Lan et al., 2013; Zeng et al., 2015). Dendritische Zellen können durch die pharmakologische Hemmung der p38-mitogenaktivierten Proteinkinasen (p38 MAPK) ex vivo befähigt werden, eine Th17-angereicherte Immunantwort zu fördern. Solch eine Behandlung von aus Monozyten abgeleiteten DCs mit einem p38-Inhibitor in Kombination mit IL-15 begünstigte die Stimulation durch ein Tumorantigen des Ovarialkarzinoms und reduzierte die Expansion von $CD4^+Foxp3^+$ -Tregs (Cannon et al., 2013). Block et al. untersuchten eine antitumorale Impfung mit wie

oben beschrieben modifizierten DCs gegen Folat-Rezeptor α (FR α) in einer Gruppe von Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Block et al., 2020). Die DC-Impfung führte schnell und effizient zu FR α -spezifischen IFN- γ^+ - und IL-17 $^+$ -T-Zell-Antworten gegen die meisten FR α -Epitope. Th1- und Antikörperantworten sowie die zytotoxische antikörperabhängige Aktivität gegen FR α nach der Impfung waren mit einem längeren rezidivfreien Überleben in der Patientenkohorte assoziiert. Obwohl weder die Stärke der Th17-Antwort noch die Reduktion von im Blut zirkulierenden Tregs mit einem längeren rezidivfreien Überleben korrelierten, konnte diese spezifische Th17-induzierende DC-Impfung die Antikörperreaktion gegen die FR α -Epitope besonders stark fördern. Dies scheint mit dem besonderen Th17-induzierenden Impfmodus zusammenzuhängen, da keine Antikörper gebildet wurden, wenn die Epitope als freie Peptide zusammen mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) als Adjuvant verabreicht wurden (Kalli et al., 2018). Obwohl die Konzentration von IL-17 in dieser Studie nicht untersucht wurde, kann vermutet werden, dass IL-17 als Signaturzytokin von Th17 in der Achse der Th17-abhängigen antitumoralen Antworten infolge der DC-Impfung ebenfalls involviert sein könnte.

Zusammengefasst ist die Wirkung von IL-17 auf den Krankheitsverlauf der Malignome in der Literatur umstritten und stark abhängig von der Dignität und dem Stadium der Krebserkrankung. In humanen Melanomen hängt allerdings der Einfluss von IL-17 vom Zielantigen der Immunantwort ab. Insgesamt erscheinen bei ausgewählten Krebsarten und Antigenen die Th17- und IL-17-Antworten für die DC-Impfung im Fall von Ovarialkarzinom und Melanom einen positiven Einfluss zu haben. RIC könnte also vor allem in Kombination mit solchen gut ausgewählten Impfungen mit nachgewiesenem positivem Einfluss der Th17-Antwort appliziert werden.

b) Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

TNF wurde erstmals in den 1970er Jahren von Carswell et al. identifiziert und aufgrund seiner Fähigkeit, die Nekrose von transplantierten, durch Methylcholanthren

induzierten Sarkomen bei Mäusen zu induzieren, benannt (Carswell et al., 1975). TNF- α wirkt vor allem proinflammatorisch mit unterschiedlichen Auswirkungen auf Krebszellen (Mehta et al., 2018). Dieses Phänomen wurde später in Verbindung gebracht mit der Fähigkeit von TNF, die Apoptose von Tumorendothelzellen durch Bindung an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ1 (TNFR1) auszulösen (Robaye et al., 1991). Die hohe systemische Toxizität, die mit der TNF-Behandlung einherging, erschwerte die Durchführung einer solchen Behandlung in der Klinik, bis zwei Forscherteams Verfahren entwickelten, bei denen hohe Konzentrationen von TNF in isolierte Gliedmaßen von Patient*innen mit Melanomen oder Sarkomen perfundiert wurden (Eggermont et al., 1996; Fraker et al., 1996). Im Rahmen der isolierten Gliedmaßenperfusion (ILP) mit Melphalan erwies sich TNF- α als wirksames Antikrebsmedikament bei Patient*innen mit lokal fortgeschrittenem Weichteilsarkom in Induktionstherapie mit einer hohen Ansprechrate, die einen Extremitätenerhalt ermöglichen konnte (Eggermont et al., 1996). Die ILP mit TNF, IFN und Melphalan konnte bei der Mehrheit der Patient*innen mit multiplen In-Transit-Melanom-Metastasen an den Extremitäten zu vollständigen lokalen Remissionsraten führen (Fraker et al., 1996).

Die direkte Auswirkung von TNF auf die Immunaktivierung scheint nur teilweise bekannt zu sein und muss noch genauer untersucht werden. Man könnte jedoch vermuten, dass die durch TNF-induzierte Tumor-Nekrose durch die Freisetzung von "Gefahr-Signalen" und/oder durch eine erhöhte Antigenpräsentation eine gewisse Immunaktivierung fördern sollte. Aus dem Grund wurde die Wirkung von TNF- α im Kontext moderner Immuntherapien weiter erforscht.

Um die Spezifität der TNF-Wirkung auf die Tumorzellen zu erhöhen, stellten Forscher ein Fusionsprotein von TNF und einem Cys-Asn-Gly-Arg-Cys-Peptid (NGR-TNF) her. Solch ein modifiziertes TNF- α (NGR-TNF) war in der Lage, die Aminopeptidase N (CD13) an den Zellen von Tumorblutgefäßen gezielt zu binden, wodurch es sich effektiver als TNF allein bei der Reduzierung des Tumorwachstums in murinen Melanom- und Lymphommodellen erwies (Curnis et al., 2000).

In anderen Studien wurde gezeigt, dass bereits 2 Stunden nach der Behandlung mit NGR-TNF tumor-spezifische IFN- γ -produzierende CD8⁺-T-Zellen bereits in der Tumormasse der B19-OVA Melanome, aber nicht in Blut, Milz oder Niere der tumor-tragenden C57BL/6 Mäusen gefunden werden konnten (Calcinotto et al., 2012). Diese schnelle Wirkung auf die Immuninfiltration geht mit unseren Ergebnissen einher, obwohl in unserer Studie TNF- α infolge RIC produziert und nicht weiter modifiziert wurde. Tatsächlich wirkte die NGR-TNF-Behandlung auch mit einer auf DCs basierenden OVA-Impfung synergistisch, die allein oder in Kombination mit Chemotherapie verabreicht wurde (Calcinotto et al., 2012). In einer anderen Studie wurde ein Einfluss der intratumoralen Injektion eines onkolytischen Adenovirus, das murines TNF und IL-2 kodierte, auf die Wirksamkeit der Anti-programmed cell-death protein 1 (PD-1) Therapie bei murinem Melanom untersucht (Cervera-Carrascon et al., 2018). Diese Zytokine führen zu einem immunologischen Gefahrensignal und haben mehrere T-Zell-Effekte, einschließlich Trafficking, Aktivierung und Vermehrung. Wenn diese Viren gleichzeitig mit Anti-PD-1 Antikörpern bei Mäusen mit B16-OVA Melanomen injiziert wurden, verbesserte sich sowohl die Kontrolle des Tumorstadiums als auch das Gesamtüberleben der Tiere. Die virale Expression von IL2 und TNF- α veränderte das Zytokin-Gleichgewicht im Tumormikromilieu zugunsten von Th1-Antworten und erhöhte gleichzeitig den Anteil von CD8⁺- und konventionellen CD4⁺-T-Zellen im Tumorbereich (Cervera-Carrascon et al., 2018).

Basierend auf einem präklinischen murinen Modell von kolorektalen Tumoren, die mit CD4⁺ T-Zell-basierter adaptiver Immuntherapie behandelt wurden, zeigten Habtetsion et al., dass sich nach der Behandlung tiefgreifende Stoffwechseleränderungen in den Tumoren ereigneten, bevor eine eigentliche Tumorregression eintrat (Habtetsion et al., 2018). Die Autor*innen zeigten, dass T-Zell-abgeleitetes TNF- α in synergistischer Weise mit Chemotherapie den oxidativen Stress und den Zelltod von Tumorzellen in einer Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Wasserstoff (NADPH)-Oxidase-abhängigen Weise verstärken kann. Die Reduktion von oxidativem Stress durch die Inhibierung der TNF- α -Signalgebung in Tumorzellen oder

durch das Scavenging von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) antagonisierte die therapeutischen Effekte der Immuntherapie. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Verstärkung von oxidativem Stress im Tumor durch TNF- α einen wichtigen Mechanismus für die Wirksamkeit der adaptiven Immuntherapie darstellt (Habtetsion et al., 2018).

Insgesamt zeigten die oben genannten Studien, dass die physiologischen intra-tumoralen TNF-Spiegel trotz des Potenzials zur Aktivierung von Zelltodprozessen wahrscheinlich sowohl bei Mäusen als auch bei Patient*innen nicht ausreichen, um eine vollständige Krebsrückbildung zu induzieren. Wege zur Steigerung der Produktion dieses Zytokins können aber die Wirksamkeit der Immuntherapie in den dargestellten Modellen erhöhen. Solch eine Erhöhung von TNF- α kann durch eine nicht-invasive RIC-Applikation erreicht werden, doch die gezielte Bekämpfung von Tumorzellen, unterstützt durch TNF- α , sowie das Management der mit solchen Ansätzen verbundenen Toxizität bleiben eine Herausforderung.

TNF- α kann in einigen Fällen auch eine negative Wirkung auf Tumorzellen haben (Moore et al., 1999). Charles et al. zeigten in einem Mausmodell für Ovarialkarzinom, bei dem entweder die TNF-Rezeptor-1 Signalgebung in verschiedenen Leukozytenpopulationen manipuliert wurde oder TNF- α durch Antikörperbehandlung neutralisiert wurde, dass dieses entzündliche Zytokin die TNFR1-abhängige IL-17-Produktion durch CD4⁺-Zellen aufrechterhielt und dies zur Rekrutierung von myeloischen Zellen in die Tumormikroumgebung und zur Steigerung des Tumorwachstums führte (Charles et al., 2009). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Produktion von TNF- α in Mausmelanomzellen zum Auslösen vom programmierten Zelltod (AICD) von CD8⁺-TILs in einem von TNF-R1 abhängigen Mechanismus führte. Die Blockierung der TNF/TNFR1-Signalgebung in vivo durch gezielte Antikörper konnte den Anteil der melanomspezifischen CD8⁺-T-Zellen in der Mikroumgebung erhöhen und das Tumorwachstum somit verzögern (Bertrand et al., 2015). Andere Studien haben gezeigt, dass TNF- α an der Aktivierung, Funktion und Differenzierung von immunregulatorischen Zellen, einschließlich myeloid-abgeleiteter Suppressor Zellen oder Treg-

Zellen in der Regel durch die Aktivierung vom Tumornekrosefaktor-Rezeptor Typ2 (TNF-R2) beteiligt war (Torrey et al., 2017; Zhao et al., 2012).

Landsberg et al. untersuchten die Rolle von TNF- α in sog. adaptiven Zelltransfertherapien (ACTs) mit zytotoxischen T-Zellen, die Melanozytenantigene anvisierten (Landsberg et al., 2012). Solche Therapien können zu Remissionen bei Patient*innen mit metastasiertem Melanom führen, obwohl es häufig zu Rezidiven kommt, deren Mechanismus und Ursache unklar sind (Landsberg et al., 2012; Restifo et al., 2012). Die Autor*innen etablierten ein effektives ACT-Protokoll in einem genetisch veränderten Maus-Melanom-Modell, das die Tumorregression, Remission und Rezidiv ähnlich wie beim Menschen widerspiegelte. In dieser Studie wurde beobachtet, dass Melanome durch einen durch Entzündung verursachten reversiblen Verlust von melanozytären Antigenen eine ACT-Resistenz entwickelten (Landsberg et al., 2012). In seriellen Transplantationsexperimenten wechselten Melanomzellen als Reaktion auf T-Zell-getriebene entzündliche Reize zwischen einem differenzierten und einem dedifferenzierten Phänotyp. Das proinflammatorische TNF- α wurde dabei als entscheidender Faktor identifiziert, der direkt eine reversible Dedifferenzierung von murinen und humanen Melanomzellen verursachte. Tumorzellen, die TNF- α ausgesetzt waren, wurden von T-Zellen, die spezifisch für melanozytäre Antigene waren, schlecht erkannt, während die Erkennung durch T-Zellen, die spezifisch für nicht-melanozytäre Antigene waren, unbeeinträchtigt oder sogar erhöht war. Diese Ergebnisse zeigten, dass die phänotypische Plastizität von Melanomzellen in einem entzündlichen Mikroumfeld mit einem hohen TNF- α Spiegel zu einem Rezidiv des Tumors nach einer zunächst erfolgreichen T-Zell-Immuntherapie beitrug (Landsberg et al., 2012). Bei Melanomen wurden TNF-abhängige Dedifferenzierungsprozesse auch mit einer erhöhten Expression von Immun-Checkpoint-Molekülen wie PD-L1 und CD73 in Verbindung gebracht (Reinhardt et al., 2017; Zingg et al., 2017).

Aktuell versuchen Forschende sogar, TNF-Antikörper zusammen mit Check-Point Inhibitoren in der Therapie von Melanomen einzusetzen (Montfort et al., 2021). Dies

wurde im Rahmen der TICIMEL (NTC03293784) Phase-Ib klinischen Studie untersucht. Die Patient*innen mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Melanom (Stadium IIIc/IV) wurden mit der Kombination aus Nivolumab und Ipilimumab, ergänzt durch Infliximab (5 mg/kg, n = 6) oder Certolizumab (400/200 mg, n = 8) behandelt. Trotz der geringen Patientenzahl zeigten die Ergebnisse, dass beide Kombinationen sicher waren und klinische sowie biologische Aktivitäten u. a. mit einer Erhöhung von CD4⁺ und CD8⁺ terminal differenzierten CD45RA⁺-T-Zellen (TEMRA) verursachten. Die hohe Ansprechrates einschließlich 4 Vollremissionen (CR) und 3 Teilremissionen (PR) bei den mit Certolizumab behandelten Patient*innen wird in weiteren Studien untersucht (Montfort et al., 2021).

Zusammengefasst ist der Einfluss von TNF- α auf den Verlauf der Krebserkrankung sehr komplex und vom Stadium und den eingesetzten Therapien abhängig. Ein Gleichgewicht zwischen hohen und niedrigen TNF-Spiegeln hat in verschiedenen Modellen gegensätzliche Auswirkungen auf das Tumorstadium. Die Suche nach Möglichkeiten, dieses Gleichgewicht auszunutzen, hat das Potenzial, die anti-tumorale Immunantwort zu fördern und die Wirksamkeit bestehender Anti-Krebs-Therapien, insbesondere Immuntherapien, zu verbessern. RIC kann dazu beitragen die TNF- α Reaktion auf eine nicht-invasive Weise zu modulieren und dies in Kombination mit anderen Therapien einzusetzen.

F. RIC im Kontext der Radiotherapie

Hypoxie ist ein negativer Prognosefaktor bei Patient*innen, die sich einer Strahlentherapie unterziehen (Fyles et al., 2006, 2002). Die im Gewebe absorbierte Strahlung führt über die Radiolyse von Wassermolekülen zur Freisetzung hochreaktiver freier Radikale und zur Bildung von Makromolekülradikalen. Diese Radikale können an das Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat der DNA binden. Wenn letztere oxidiert und ihre molekularen Bindungen zerstört werden, können einzelsträngige oder dop-

pelsträngige DNA-Brüche entstehen (Eckert et al., 2019). Die hohe Sauerstoffspannung begünstigt die Bildung von doppelsträngigen Brüchen und damit den Tod der bestrahlten Krebszellen. Nach der Bestrahlung steigt die zytoplasmatische Konzentration von Ca^{2+} an, was zu einer erhöhten Aufnahme von Ca^{2+} in die Mitochondrien und zur Erhöhung von deren Permeabilität führt. Dies führt zu einer Dysregulation der mitochondrialen Atmungskette, Freisetzung von Cytochrom c und damit zur Bildung von Superoxidanionen (Eckert et al., 2019; Huber et al., 2013). Darüber hinaus kann derselbe Mechanismus der Bildung von ROS in anderen Mitochondrien durch eine reversible, Ca^{2+} -abhängige mitochondriale Permeabilitätssteigerung induziert werden (Leach et al., 2001). Interessanterweise ist derselbe Mechanismus in den Mitochondrien an der Ca^{2+} -Überlastung, ROS-Bildung und Zellschädigung bei Reoxygenierung und Reperfusionverletzung beteiligt (Yellon & Hausenloy, 2007). Die kurzfristige Normalisierung der Zell-Sauerstoffversorgung im Tumor kann potenziell zur Bildung von mitochondrialen ROS führen und die radiotoxische Wirkung weiter unterstützen. Eine leicht höhere Konzentration von Sauerstoff im Tumorbereich in der RIC-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ($p=0,09$) sowie eine höhere MFI von $\text{TNF-}\alpha$ ($p=0,06$) könnte die Produktion von ROS potenziell steigern und die Effekte der Radiotherapie somit positiv beeinflussen.

5. Zusammenfassung

Durch komplexe Mechanismen hat Hypoxie innerhalb von Tumoren verschiedene unerwünschte Auswirkungen, wie eine Steigerung des Proliferationspotenzials, eine verringerte Immunantwort gegenüber den Tumorzellen und eine erhöhte Metastasierungsrate. Die Sauerstoffsättigung im Tumorgewebe stellt einen entscheidenden Faktor für den Behandlungserfolg in der Strahlentherapie dar, wobei gut sauerstoffversorgte Tumorregionen eine bis zu dreifach höhere Reaktion im Vergleich zu anoxischen Tumorbereichen zeigen. Eine sichere, leicht anwendbare und kostengünstige Methode zur Verbesserung der Durchblutung und Modulation der antitumoralen Immunantwort gegen Tumorantigene erscheint erstrebenswert.

Das Remote Ischemic Conditioning (RIC) wurde bereits in verschiedenen klinischen Bereichen eingesetzt, um genau das Ziel zu erreichen. RIC bezieht sich auf die Anwendung kurzer, nicht schädlicher Ischämieperioden auf eine Extremität, die wiederum eine systemische Reaktion hervorruft. Die Wirkung von RIC auf die Durchblutung und Immunantwort bei bösartigen Tumoren wurde unserem Kenntnisstand nach bisher noch nicht untersucht.

Bei C57BL/6NCrL Mäusen wurden B16-OVA Melanomzellen subkutan in die rechte Flanke implantiert. Nach dem Anwachsen des Tumors auf eine Größe von 0,7 – 1 cm wurde RIC unter Isoflurannarkose bei 14 Tieren durchgeführt. Hierfür wurde ein Hinterlauf mittels Tourniquets während 6 Zyklen à 5 min einer Ischämie ausgesetzt, mit dazwischenliegenden Pausen à 5 min zur Reperfusion. Um Narkoseeffekte bei der Wirkung des RIC auszuschließen, wurde eine Kontrollgruppe mit ebenfalls 14 Tieren, die lediglich Isoflurannarkose erhielten, geplant. Die Mikrozirkulation im Tumorgewebe und in der nicht-ischämischen Pfote wurde nicht-invasiv mit dem O2C Gerät gemessen. Nach dem letzten Zyklus RIC bzw. korrespondierend nach ca. 57 min Narkosedauer in der Kontrollgruppe wurde den Tieren der Hypoxiemarker Pimonidazol i.p. injiziert und 90 min später die Tötung in Narkose durchgeführt. Anhand des applizierten Pimonidazols wurde das hypoxische Areal in den rezezierten Tumoren angefärbt. Zudem wurde mittels CD3 und FoxP3 Färbung die T-

Zellinfiltration in den Tumoren der beiden Gruppen analysiert. Aus den gewonnenen Plasmaproben wurden Zytokinspiegel im Plasma beider Gruppen analysiert und verglichen.

Im direkten Vergleich der Perfusionsparameter aus der Abschlussphase zwischen der Kontroll- und RIC-Gruppe zeigte sich eine Tendenz zu einer besseren prozentuellen Oxygenierung des Tumorgewebes in der RIC-Gruppe, die um 11,3 Prozentpunkte und 22 % höher im Verhältnis zur Kontrollgruppe war (MWU, $p = 0,09$). Die mediane Oxygenierung des Tumors war in der Kontrollgruppe um 19 % und in der RIC-Gruppe nur um 4 % niedriger im Verhältnis zum gesunden Gewebe der nicht-ischämischen Hinterbeine (MWU, $p = 0,026$.) Es konnten keine Unterschiede bezüglich ICH Färbung für die akute (Pimonidazol) und chronische (CAIX) Hypoxie zwischen der RIC- und Kontroll-Gruppe festgestellt werden. Die CD3⁺-Immuninfiltration im Tumorzentrum war stärker in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,01$). Insgesamt wurden keine Unterschiede hinsichtlich der FoxP3-positiven Zellen (Treg-Zellen) zwischen der Kontroll- und der RIC-Gruppe (Tumorzentrum: ($p = 0,84$), Tumorpherie: $p = 0,627$) festgestellt. In der Untersuchung von 23 Zytokinen zeigte sich, dass sich die beiden Gruppen bezüglich der MFI des IL-17 unterschieden, mit einer höheren MFI in der RIC- als in der Kontrollgruppe (MWU, $p = 0,035$). Es bestand ebenfalls eine Tendenz zur höheren MFI von TNF- α in der RIC-Gruppe (MWU, $p = 0,063$).

RIC erscheint somit eine komplexe und unterschiedliche Wirkung auf das Gefäßbett des gesunden Gewebes und des Tumors zu haben und wies vor allem eine positive immunmodulierende Wirkung auf die Tumoren auf. RIC scheint selektiv eine Verstärkung der Immuninfiltration im Tumorzentrum der bereits voraktivierten CD3-positiven-T-Zellen, aber nicht der T-Suppressor-Zellen, hervorzurufen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollten Arbeiten folgen, welche die Mehrfachapplikation und mittelfristige Wirkung von RIC in Kombination mit Radio- und Chemotherapie untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Akhtar, M., Haider, A., Rashid, S., Al-Nabet, A.D.M.H. (2019) Paget's "seed and Soil" Theory of Cancer Metastasis: An Idea Whose Time has Come. *Adv Anat Pathol* 26:69-74. doi: 10.1097/PAP.000000000000219.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C. (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3:917-21. doi: 10.1038/nm0897-917.
- Andrews, L.P., Marciscano, A.E., Drake, C.G., Vignali, D.A.A. (2017) LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev* 276:80-96. doi: 10.1111/imr.12519.
- Ankathatti Munegowda, M., Deng, Y., Mulligan, S.J., Xiang, J. (2011) Th17 and Th17-stimulated CD8+ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 60: 1473-84. doi: 10.1007/s00262-011-1054-y.
- Baudelet, C., Gallez, B. (2004) Effect of anesthesia on the signal intensity in tumors using BOLD-MRI: Comparison with flow measurements by Laser Doppler flowmetry and oxygen measurements by luminescence-based probes. *Magn Reson Imaging* 22:905-12. doi: 10.1016/j.mri.2004.02.005.
- Bertrand, F., Rochotte, J., Colacios, C., Montfort, A., Tilkin-Mariamé, A.F., Touriol, C., Rochaix, P., Lajoie-Mazenc, I., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Benoist, H., Ségui, B. (2015) Blocking tumor necrosis factor α enhances CD8 T-cell-dependent immunity in experimental melanoma. *Cancer Res* 75:2619-28. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2524.
- Bertucci, F., Gonçalves, A. (2017) Immunotherapy in Breast Cancer: the Emerging Role of PD-1 and PD-L1. *Curr Oncol Rep.*10:64. doi: 10.1007/s11912-017-0627-0.
- Birch, J., Gil, J. (2020) Senescence and the SASP: Many therapeutic avenues. *Genes Dev* 34: 23-24. doi: 10.1101/gad.343129.120.
- Birnbaum, Y., Hale, S.L., Kloner, R.A. (1997) Ischemic preconditioning at a distance: Reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 96: 1641-6. doi: 10.1161/01.cir.96.5.1641.
- Bitman-Lotan, E., Orian, A. (2021) Nuclear organization and regulation of the differentiated state *Cell Mol Life Sci* 78:3141-3158. doi: 10.1007/s00018-020-03731-4.
- Blander, J.M. (2016) The comings and goings of MHC class I molecules herald a new dawn in cross-presentation. *Immunol Rev.* 272:65-79. doi: 10.1111/imr.12428.

- Block, M.S., Dietz, A.B., Gustafson, M.P., Kalli, K.R., Erskine, C.L., Youssef, B., Vijay, G. V., Allred, J.B., Pavelko, K.D., Strausbauch, M.A., Lin, Y., Grudem, M.E., Jatoi, A., Klampe, C.M., Wahner-Hendrickson, A.E., Weroha, S.J., Glaser, G.E., Kumar, A., Langstraat, C.L., Solseth, M.L., Deeds, M.C., Knutson, K.L., Cannon, M.J. (2020) Th17-inducing autologous dendritic cell vaccination promotes antigen-specific cellular and humoral immunity in ovarian cancer patients. *Nat Commun* 11:5173. doi: 10.1038/s41467-020-18962-z.
- Bloom, M.B., Perry-Lalley, D., Robbins, P.F., Li, Y., El-Gamil, M., Rosenberg, S.A., Yang, J.C. (1997) Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J Exp Med* 185:453-9. doi: 10.1084/jem.185.3.453.
- Boehning, D., Snyder, S.H. (2003) Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci* 26:105-31. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131047.
- Bos, R., Van der Groep, P., Greijer, A.E., Shvarts, A., Meijer, S., Pinedo, H.M., Semenza, G.L., Van Diest, P.J., Van der Wall, E. (2003) Levels of hypoxia-inducible factor-1 α independently predict prognosis in patients with lymph node negative breast carcinoma. *Cancer* 97, 1573-1581. doi: 10.1002/cncr.11246.
- Bos, R., Zhong, H., Hanrahan, C.F., Mommers, E.C.M., Semenza, G.L., Pinedo, H.M., Abeloff, M.D., Simons, J.W., Van Diest, P.J., Van Der Wall, E., n.d. (2001) Levels of Hypoxia-Inducible Factor-1 During Breast Carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 3:309-14. doi: 10.1093/jnci/93.4.309.
- Brett, C.M., Teitel, D.F., Heymann, M.A., Rudolph, A.M. (1987) The cardiovascular effects of isoflurane in lambs. *Anesthesiology* 67:60-5. doi: 10.1097/00000542-198707000-00011.
- Brzozowski, T., Konturek, P.C., Konturek, S.J., Pajdo, R., Kwiecien, S., Pawlik, M., Drozdowicz, D., Sliwowski, Z., Pawlik, W.W. (2004) Ischemic preconditioning of remote organs attenuates gastric ischemia-reperfusion injury through involvement of prostaglandins and sensory nerves. *Eur J Pharmacol* 499: 201-13. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.072.
- Buckley, K.M., Ho, E.C.H., Hibino, T., Schrankel, C.S., Schuh, N.W., Wang, G., Rast, J.P. (2017) IL17 factors are early regulators in the gut epithelium during inflammatory response to *Vibrio* in the sea urchin larva. *Elife* 6: e23481. doi: 10.7554/eLife.23481.
- Burugu, S., Gao, D., Leung, S., Chia, S.K., Nielsen, T.O., 2018. TIM-3 expression in breast cancer. *Oncoimmunology* 7: e1502128. doi: 10.1080/2162402X.2018.1502128.
- Byers, L.A., Diao, L., Wang, J., Saintigny, P., Girard, L., Peyton, M., Shen, L., Fan, Y., Giri, U., Tumula, P.K., Nilsson, M.B., Gudikote, J., Tran, H., Cardnell, R.J.G., Bearss, D.J., Warner, S.L., Foulks, J.M., Kanner, S.B., Gandhi, V.,

- Krett, N., Rosen, S.T., Kim, E.S., Herbst, R.S., Blumenschein, G.R., Lee, J.J., Lippman, S.M., Ang, K.K., Mills, G.B., Hong, W.K., Weinstein, J.N., Wistuba, I.I., Coombes, K.R., Minna, J.D., Heymach, J. V. (2013) An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 19: 279-90. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1558.
- Calcinotto, A., Grioni, M., Jachetti, E., Curnis, F., Mondino, A., Parmiani, G., Corti, A., Bellone, M. (2012) Targeting TNF- α to Neoangiogenic Vessels Enhances Lymphocyte Infiltration in Tumors and Increases the Therapeutic Potential of Immunotherapy. *J Immunol* 188:2687-94 doi: 10.4049/jimmunol.1101877.
- Cannon, M.J., Goyne, H.E., Stone, P.J.B., MacDonald, L.J., James, L.E., Cobos, E., Chiriva-Internati, M. (2013) Modulation of p38 MAPK signaling enhances dendritic cell activation of human CD4⁺ Th17 responses to ovarian tumor antigen. *Cancer Immunol Immunother.* 62:839-49. doi: 10.1007/s00262-013-1391-0.
- Carmeliet, P., Jain, R.K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307. doi: 10.1038/nature10144.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage). *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-70. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- Cervera-Carrascon, V., Siurala, M., Santos, J.M., Havunen, R., Tähtinen, S., Karella, P., Sorsa, S., Kanerva, A., Hemminki, A. (2018) TNF α and IL-2 armed adenoviruses enable complete responses by anti-PD-1 checkpoint blockade. *Oncoimmunology* 7: e1412902. doi: 10.1080/2162402X.2017
- Chaffer, C.L., Weinberg, R.A. (2011) A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 331:1559-64. doi: 10.1126/science.1203543.
- Charles, K.A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T., Schultheis, A., Chakravarty, P., Thompson, R.G., Kollias, G., Smyth, J.F., Balkwill, F.R., Hagemann, T. (2009) The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J Clin Invest* 119:3011-23. doi: 10.1172/JCI39065.
- Chen, J., Imanaka, N., Chen, J., Griffin, J.D. (2010) Hypoxia potentiates Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer* 102:351-60.
doi: 10.1038/sj.bjc.6605486
- Chen, X., Cai, G., Liu, C., Zhao, J., Gu, C., Wu, L., Hamilton, T.A., Zhang, C. jin, Ko, J., Zhu, L., Qin, J., Vidimos, A., Koyfman, S., Gastman, B.R., Jensen,

- K.B., Li, X. (2019) IL-17R–EGFR axis links wound healing to tumorigenesis in Lrig1 + stem cells. *J Exp Med* 216:195-214. doi: 10.1084/jem.20171849.
- Chou, C.C., Chuang, H.C., Salunke, S.B., Kulp, S.K., Chen, C.S. (2015) A novel HIF-1 α -integrin-linked kinase regulatory loop that facilitates hypoxia-induced HIF-1 α expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Oncotarget* 6:8271-85. doi: 10.18632/oncotarget.3186.
- Chung, R., Maulik, A., Hamarneh, A., Hochhauser, D., Hausenloy, D.J., Walker, J.M., Yellon, D.M. (2016) Effect of Remote Ischaemic Conditioning in Oncology Patients Undergoing Chemotherapy: Rationale and Design of the ERIC-ONC Study - A Single-Center, Blinded, Randomized Controlled Trial. *Clin Cardiol* 39:72-82. doi: 10.1002/clc.22507.
- Clark, W.H., Elder, D.E., Guerry, D., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., Halpern, A.C. (1989) Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 81:1893-904. doi: 10.1093/jnci/81.24.1893.
- Coffelt, S.B., Kersten, K., Doornebal, C.W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C.S., Versteegen, N.J.M., Ciampricotti, M., Hawinkels, L.J.A.C., Jonkers, J., De Visser, K.E. (2015) IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* 522:345-348. doi: 10.1038/nature14282.
- Copple, B.L. (2010) Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor- β -dependent mechanisms. *Liver Int* 30:669-82. doi: 10.1111/j.1478-3231.2010.02205.x.
- Cox, T.R., Rumney, R.M.H., Schoof, E.M., Perryman, L., Høye, A.M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N.A., Forrest, H., Evans, H.R., Huggins, I.D., Lang, G., Linding, R., Gartland, A., Erler, J.T. (2015) The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 522: 106-110. doi: 10.1038/nature14492.
- Curnis, F., Sacchi, A., Borgna, L., Magni, F., Gasparri, A., Corti, A. (2000) Enhancement of tumor necrosis factor α antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD 13). *Nat Biotechnol* 18:1185-90. doi: 10.1038/81183
- Dales, J.P., Garcia, S., Meunier-Carpentier, S., Andrac-Meyer, L., Haddad, O., Lavaut, M.N., Allasia, C., Bonnier, P., Charpin, C. (2005) Overexpression of hypoxia-inducible factor HIF-1 α predicts early relapse in breast cancer: Retrospective study in a series of 745 patients. *Int J Cancer* 116, 734–739. doi: 10.1002/ijc.20984
- De Blander, H., Morel, A.P., Senaratne, A.P., Ouzounova, M., Puisieux, A. (2021) Cellular plasticity: A route to senescence exit and tumorigenesis. *Cancers (Basel)* 13:4561. doi: 10.3390/cancers13184561.

- Dong, Z., Venkatachalam, M.A., Wang, J., Patel, Y., Saikumar, P., Semenza, G.L., Force, T., Nishiyama, J. (2001) Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia: HIF-1-independent mechanisms. *J of Biol Chem* 276:18702-9. doi: 10.1074/jbc.M011774200
- Drysch, M., Wallner, C., Schmidt, S.V., Reinkemeier, F., Wagner, J.M., Lehnhardt, M., Behr, B. (2019) An optimized low-pressure tourniquet murine hind limb ischemia reperfusion model: Inducing acute ischemia reperfusion injury in C57BL/6 wild type mice. *PLoS One* 14:e0210961. doi: 10.1371/journal.pone.0210961.
- Eckert, F., Zwirner, K., Boeke, S., Thorwarth, D., Zips, D., Huber, S.M. (2019) Rationale for combining radiotherapy and immune checkpoint inhibition for patients with hypoxic tumors. *Front Immunol.* 10:407. doi: 10.3389/fimmu.2019.00407.
- Eggermont, A.M.M., Koops, H.S., Klausner, J.M., Kroon, B.B.R., Schlag, P.M., Liénard, D., Van Geel, A.N., Hoekstra, H.J., Meller, I., Nieweg, O.E., Kettelhack, C., Ben-Ari, G., Pector, J.C., Lejeune, F.J. (1996) Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcomas: The cumulative multicenter European experience. *Ann Surg* 224:756-64; discussion 764-5. doi: 10.1097/00000658-199612000-00011.
- Erdfelder, E., FAul, F., Buchner, A., Lang, A.G. (2009) Statistical power analyses using G*Power 3.1: Tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 41:1149-60. doi: 10.3758/BRM.41.4.1149.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.T., Giaccia, A.J. (2009) Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. *Cancer Cell* 15:35-44. doi: 10.1016/j.ccr.2008.11.012.
- Erra Díaz, F., Dantas, E., Geffner, J. (2018) Unravelling the interplay between extracellular acidosis and immune cells. *Mediators Inflamm.* doi: 10.1155/2018/1218297.
- Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I.S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.P., Gimotty, P.A., Gilks, C.B., Lal, P., Zhang, L., Coukos, G. (2011) Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T reg cells. *Nature* 475:226-30. doi: 10.1038/nature10169.
- Faget, D. V., Ren, Q., Stewart, S.A. (2019) Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat Rev Cancer* 19:439-453. doi: 10.1038/s41568-019-0156-2.

- Fang, S., Liu, B., Sun, Q., Zhao, J., Qi, H., Li, Q. (2014) Platelet Factor 4 Inhibits IL-17/Stat3 Pathway via Upregulation of SOCS3 Expression in Melanoma. *Inflammation* 37:1744-50. doi: 10.1007/s10753-014-9903-4.
- Field, J.T., Gordon, J.W. (2022) BNIP3 and Nix: Atypical regulators of cell fate. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 1869:119325. doi: 10.1016/j.bbamcr.2022.119325.
- Fokas, E., Engenhart-Cabillic, R., Daniilidis, K., Rose, F., An, H.X. (2007) Metastasis: The seed and soil theory gains identity. *Cancer Metastasis Rev* 26:705-15. doi: 10.1007/s10555-007-9088-5.
- Fraker, D.L., Alexander, H.R., Andrich, M., Rosenberg, S.A. (1996) Treatment of Patients with Melanoma of the Extremity Using Hyperthermic Isolated Limb Perfusion with Melphalan, Tumor Necrosis Factor, and Interferon Gamma: Results of a Tumor Necrosis Factor Dose-Escalation Study. *J Clin Oncol* 14:479-89. doi: 10.1200/JCO.1996.
- Fu, Q., Chen, N., Ge, C., Li, R., Li, Z., Zeng, B., Li, C., Wang, Y., Xue, Y., Song, X., Li, H., Li, G. (2019) Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology.* 8:1593806. doi: 10.1080/2162402X.2019.1593806.
- Fyles, A., Milosevic, M., Hedley, D., Pintilie, M., Levin, W., Manchul, L., Hill, R.P. (2002) Tumor hypoxia has independent predictor impact only in patients with node-negative cervix cancer. *J Clin Oncol* 20: 680-7. doi: 10.1200/JCO.2002.20.3.680.
- Fyles, A., Milosevic, M., Pintilie, M., Syed, A., Levin, W., Manchul, L., Hill, R.P., (2006) Long-term performance of interstitial fluid pressure and hypoxia as prognostic factors in cervix cancer. *Radiother Oncol.* 80: 132-7. doi: 10.1016/j.radonc.2006.07.014.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Brunel, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H., Pagès, F. (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960-4. doi: 10.1126/science.1129139.
- Gao, D., Nolan, D.J., Mellick, A.S., Bambino, K., McDonnell, K., Mittal, V. (2008) Endothelial progenitor cells control the angiogenic switch in mouse lung metastasis. *Science* 319:195-8. doi: 10.1126/science.
- Gao, J.F., Zhang, H., Lv, J., Wang, L., Fan, Y.Y. (2019) Associations of the IL-17A rs2275913 and IL-17F rs763780 polymorphisms with the risk of digestive system neoplasms: A meta-analysis. *Int Immunopharmacol.* 67:248-259. doi: 10.1016/j.intimp.2018.12.016.

- Garcia-Hernandez, M. de la L., Hamada, H., Reome, J.B., Misra, S.K., Tighe, M.P., Dutton, R.W. (2010) Adoptive Transfer of Tumor-Specific Tc17 Effector T Cells Controls the Growth of B16 Melanoma in Mice. *J Immunol* 184: 4215-27. doi: 10.4049/jimmunol.0902995.
- Gentry-Smetana, S., Redford, D., Moore, D., Larson, D.F. (2008) Direct effects of volatile anesthetics on cardiac function. *Perfusion* 23: 43-7. doi: 10.1177/0267659108094528.
- Gho, B.C.G., Schoemaker, R.G., Van den Doel, M.A., Duncker, D.J., Verdouw, P.D. (1996) Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94:2193-200. doi: 10.1161/01.cir.94.9.2193.
- Giatromanolaki, A., Harris, A.L., Banham, A.H., Contrafouris, C.A., Koukourakis, M.I. (2020) Carbonic anhydrase 9 (CA9) expression in non-small-cell lung cancer: correlation with regulatory FOXP3+T-cell tumour stroma infiltration. *Br J Cancer* 122:1205-1210. doi: 10.1038/s41416-020-0756-3.
- Gjerdrum, C., Tiron, C., Høiby, T., Stefansson, I., Haugen, H., Sandal, T., Collett, K., Li, S., McCormack, E., Gjertsen, B.T., Micklem, D.R., Akslen, L.A., Glackin, C., Lorens, J.B. (2010) Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1124-9. doi: 10.1073/pnas.0909333107.
- Gnarra, J.R., Zhou, S., Merrill, M.J., Wagner, J.R., Krumm, A., Papavassiliou, E., Oldfield, E.H., Klausner, R.D., Linehan, W.M. (1996) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor mRNA by the product of the VHL tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10589-94. doi: 10.1073/pnas.93.20.10589
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E. (2007) Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 12:635-8. doi: 10.1016/j.cell.2007.02.006.
- Gopal, R., Monin, L., Slight, S., Uche, U., Blanchard, E., A. Fallert Junecko, B., Ramos-Payan, R., Stallings, C.L., Reinhart, T.A., Kolls, J.K., Kaushal, D., Nagarajan, U., Rangel-Moreno, J., Khader, S.A. (2014) Unexpected Role for IL-17 in Protective Immunity against Hypervirulent Mycobacterium tuberculosis HN878 Infection. *PLoS Pathog* 10:e1004099. doi: 10.1371/journal.ppat.1004099.
- Graeber, T.G., Osmanian, C., Jacks, T., Housman, D.E., Koch, C.J., Lowe, S.W., Giaccia, A.J. (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379:88-91. doi: 10.1038/379088a0.
- Graham, K., Unger, E. (2018) Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Int J Nanomedicine* 13:6049-6058. doi: 10.2147/IJN.S140462.

- Gray, L.H., Conger, A.D., Ebert, M., Hornsey, S., Scott, O.C (1953) The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br J Radiol* 26:638-48. doi: 10.1259/0007-1285-26-312-638.
- Gruber, G., Greiner, R.H., Hlushchuk, R., Aebbersold, D.M., Altermatt, H.J., Berclaz, G., Djonov, V. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 alpha in high-risk breast cancer: An independent prognostic parameter? *Breast Cancer Res* 6:R191-8. doi: 10.1186/bcr775.
- Habtetsion, T., Ding, Z.C., Pi, W., Li, T., Lu, C., Chen, T., Xi, C., Spartz, H., Liu, K., Hao, Z., Mivechi, N., Huo, Y., Blazar, B.R., Munn, D.H., Zhou, G. (2018) Alteration of Tumor Metabolism by CD4+ T Cells Leads to TNF- α -Dependent Intensification of Oxidative Stress and Tumor Cell Death. *Cell Metab* 28:228-242.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.012
- Hanahan, D., (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 12:31-46. doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., (2000). Weinberg RA, Hanahan D. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Hannon, J.D., Cody, M.J., Sun, D.X., Housmans, P.R. (2004) Effects of isoflurane and sevoflurane on intracellular calcium and contractility in pressure-overload hypertrophy. *Anesthesiology* 101:675-86. doi: 10.1097/00000542-200409000-00016.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345:458-60. doi: 10.1038/345458a0.
- Harris, A.L. (2002) Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2:38-47. doi: 10.1038/nrc704.
- Hasseldam, H., Hansen-Schwartz, J., Munkholm, N., Hou, J., Johansen, F.F. (2013) Remote post-conditioning reduces hypoxic damage early after experimental stroke. *Neurol Res* 35:336-43. doi: 10.1179/1743132812Y.0000000130.
- Hatfield, S.M., Kjaergaard, J., Lukashev, D., Schreiber, T.H., Belikoff, B., Abbott, R., Sethumadhavan, S., Philbrook, P., Ko, K., Cannici, R., Thayer, M., Rodig, S., Kutok, J.L., Jackson, E.K., Karger, B., Podack, E.R., Ohta, A., Sitkovsky, M. V. (2015) Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med* 7:277ra30. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1260.

- Hatfield, S.M., Sitkovsky, M. (2016) A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1 α driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 7:277ra30. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa1260
- Hayflick, L., Moorhead, P.S. (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621. doi: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.
- Hegelmaier, T., Kumowski, N., Mainka, T., Vollert, J., Goertz, O., Lehnhardt, M., Zahn, P.K., Maier, C., Kolbenschlag, J. (2017) Remote ischaemic conditioning decreases blood flow and improves oxygen extraction in patients with early complex regional pain syndrome. *Eur J of Pain* 21:1346-1354. doi: 10.1002/ejp.1033.
- Heiden, M.G.V., Cantley, L.C., Thompson, C.B. (2009) Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.
- Higgins, D.F., Kimura, K., Bernhardt, W.M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R.S., Kretzler, M., Cohen, C.D., Eckardt, K.U., Iwano, M., Haase, V.H. (2007) Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 117:3810-20. doi: 10.1172/JCI30487.
- Hofstetter, C.P., Burkhardt, J.K., Shin, B.J., Gürsel, D.B., Mubita, L., Gorrepati, R., Brennan, C., Holland, E.C., Boockvar, J.A. (2012) Protein phosphatase 2A mediates dormancy of glioblastoma multiforme-derived tumor stem-like cells during hypoxia. *PLoS One* 7: e30059. doi: 10.1371/journal.pone.0030059.
- Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D.W., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I., Jones, E.Y. (2002) Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL. *Nature* 417:975-8. doi: 10.1038/nature00767.
- Huber, S.M., Butz, L., Stegen, B., Klumpp, D., Braun, N., Ruth, P., Eckert, F. (2013) Ionizing radiation, ion transports, and radioresistance of cancer cells. *Front Physiol*. 4:212. doi: 10.3389/fphys.2013.00212.
- Ivanov, I.I., Atarashi, K., Manel, N., Brodie, E.L., Shima, T., Karaoz, U., Wei, D., Goldfarb, K.C., Santee, C.A., Lynch, S. V., Tanoue, T., Imaoka, A., Itoh, K., Takeda, K., Umesaki, Y., Honda, K., Littman, D.R. (2009) Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* 139: 485-98. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.033.
- Jackson, J.G., Pant, V., Li, Q., Chang, L.L., Quintás-Cardama, A., Garza, D., Tavvana, O., Yang, P., Manshour, T., Li, Y., El-Naggar, A.K., Lozano, G. (2012) P53-Mediated Senescence Impairs the Apoptotic Response to Chemotherapy

and Clinical Outcome in Breast Cancer. *Cancer Cell* 21:793-806. doi: 10.1016/j.ccr.2012.04.027.

Ju, Songwen, Wang, F., Wang, Y., Ju, S. (2020) CSN8 is a key regulator in hypoxia-induced epithelial–mesenchymal transition and dormancy of colorectal cancer cells. *Mol Cancer* 19:168. doi: 10.1186/s12943-020-01285-4.

Jungermann, K (1988) Metabolic zonation of liver parenchyma. *Semin Liver Dis* 8:329-41. doi: 10.1055/s-2008-1040554.

Kaelin, W.G. (2002) Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer* 2:673-82. doi: 10.1038/nrc885.

Kalli, K.R., Block, M.S., Kasi, P.M., Erskine, C.L., Hobday, T.J., Dietz, A., Padley, D., Gustafson, M.P., Shreeder, B., Puglisi-Knutson, D., Visscher, D.W., Mangskau, T.K., Wilson, G., Knutson, K.L. (2018) Folate receptor alpha peptide vaccine generates immunity in breast and ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 24:3014-3025. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2499.

Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., Zhu, Z., Hicklin, D., Wu, Y., Port, J.L., Altorki, N., Port, E.R., Ruggero, D., Shmelkov, S. V., Jensen, K.K., Rafii, S., Lyden, D. (2005) VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 438:820-7. doi: 10.1038/nature04186.

Khader, S.A., Bell, G.K., Pearl, J.E., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Cilley, G.E., Shen, F., Eaton, S.M., Gaffen, S.L., Swain, S.L., Locksley, R.M., Haynes, L., Randall, T.D., Cooper, A.M. (2007) IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. *Nat Immunol* 8:369-77. doi: 10.1038/ni1449.

Kilic-Eren, M., Boylu, T., Tabor, V. (2013) Targeting PI3K/Akt represses Hypoxia inducible factor-1 α activation and sensitizes Rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma cells for apoptosis. *Cancer Cell Int* 13:36. doi: 10.1186/1475-2867-13-36.

Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W. (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-5. doi: 10.1126/science.7605428.

Kim, W.Y., Kaelin, W.G. (2004) Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol* 22:4991-5004. doi: 10.1200/JCO.2004.05.061.

- Kobayashi, A., Okuda, H., Xing, F., Pandey, P.R., Watabe, M., Hirota, S., Pai, S.K., Liu, W., Fukuda, K., Chambers, C., Wilber, A., Watabe, K. (2012) Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *J Exp Med*. 208:2641-55. doi: 10.1084/jem.20110840.
- Koh, M.Y., Spivak-Kroizman, T.R., Powis, G. (2010) HIF-1alpha and cancer therapy. *Recent Results Cancer Res*. 180:15-34. doi: 10.1007/978-3-540-78281-0_3.
- Koike, Y., Li, B., Ganji, N., Zhu, H., Miyake, H., Chen, Y., Lee, C., Janssen Lok, M., Zozaya, C., Lau, E., Lee, D., Chusilp, S., Zhang, Z., Yamoto, M., Wu, R.Y., Inoue, M., Uchida, K., Kusunoki, M., Delgado-Olguin, P., Mertens, L., Daneman, A., Eaton, S., Sherman, P.M., Pierro, A. (2020) Remote ischemic conditioning counteracts the intestinal damage of necrotizing enterocolitis by improving intestinal microcirculation. *Nat Commun* 11:4950. doi: 10.1038/s41467-020-18750-9.
- Kolbenschlag, J., Sogorski, A., Harati, K., Daigeler, A., Wiebalck, A., Lehnhardt, M., Kapalschinski, N., Goertz, O. (2015) Upper extremity ischemia is superior to lower extremity ischemia for remote ischemic conditioning of antero-lateral thigh cutaneous blood flow. *Microsurgery* 35:211-7. doi: 10.1002/micr.22336.
- Kolbenschlag, J., Sogorski, A., Kapalschinski, N., Harati, K., Lehnhardt, M., Daigeler, A., Hirsch, T., Goertz, O. (2016) Remote Ischemic Conditioning Improves Blood Flow and Oxygen Saturation in Pedicled and Free Surgical Flaps. *Plast Reconstr Surg* 138:1089-1097. doi: 10.1097/PRS.0000000000002664.
- Kolbenschlag, J., Sogorski, A., Timmermann, C., Harati, K., Daigeler, A., Hirsch, T., Goertz, O., Lehnhardt, M. (2017) Ten minutes of ischemia is superior to shorter intervals for the remote ischemic conditioning of human microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc* 66:239-248. doi: 10.3233/CH-170268.
- Køllgaard, T., Ugurel-Becker, S., Idorn, M., Andersen, M.H., Becker, J.C., Straten, P.T (2015) Pre-vaccination frequencies of Th17 cells correlate with vaccine-induced T-Cell responses to survivin-derived peptide epitopes. *PLoS One* 10: e0131934. doi: 10.1371/journal.pone.0131934.
- Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., Semenza, G.L. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 63:1138-43.
- Krishnamachary, B., Zagzag, D., Nagasawa, H., Rainey, K., Okuyama, H., Baek, J.H., Semenza, G.L. (2006) Hypoxia-inducible factor-1-dependent repression of E-cadherin in von Hippel-Lindau tumor suppressor-null renal cell carcinoma mediated by TCF3, ZFH1A, and ZFH1B. *Cancer Res* 66:2725-31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3719.

- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., Chang, A., Coukos, G., Liu, R., Zou, W. (2009) Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114:1141-9. doi: 10.1182/blood-2009-03-208249.
- Kuczynski, E.A., Vermeulen, P.B., Pezzella, F., Kerbel, R.S., Reynolds, A.R. (2019) Vessel co-option in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 16:469-493. doi: 10.1038/s41571-019-0181-9.
- Kumowski, N., Hegelmaier, T., Kolbensschlag, J., Mainka, T., Michel-Lauter, B., Maier, C. (2019) Short-Term Glucocorticoid Treatment Normalizes the Micro-circulatory Response to Remote Ischemic Conditioning in Early Complex Regional Pain Syndrome. *Pain Pract* 19:168-175. doi: 10.1111/papr.12730.
- Kuzuya, T., Hoshida, S., Yamashita, N., Fuji, H., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., Tada, M. (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res* 72:1293-9. doi: 10.1161/01.res.72.6.1293.
- Kyung, H.S., Diaz-Gonzalez, J.A., Russell, J., Chen, Q., Burgman, P., Li, X.F., Ling, C.C. (2007) Detecting changes in tumor hypoxia with carbonic anhydrase IX and pimonidazole. *Cancer Biol Ther* 6:70-5. doi: 10.4161/cbt.6.1.3550
- Ladstein, R.G., Bachmann, I.M., Straume, O., Akslen, L.A. (2012) Tumor necrosis is a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol* 36:1477-82. doi: 10.1097/PAS.0b013e31825a5b45.
- Lan, C., Huang, X., Lin, S., Huang, H., Cai, Q., Lu, J., Liu, J. (2013) High density of IL-17-producing cells is associated with improved prognosis for advanced epithelial ovarian cancer. *Cell Tissue Res* 352:351-9. doi: 10.1007/s00441-013-1567-0.
- Landsberg, J., Kohlmeyer, J., Renn, M., Bald, T., Rogava, M., Cron, M., Fatho, M., Lennerz, V., Wölfel, T., Hölzel, M., Tüting, T. (2012) Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 490:412-6. doi: 10.1038/nature11538.
- Leach, J.K., Van Tuyle, G., Lin, P.S., Schmidt-Ullrich, R., Mikkelsen, R.B. (2001) Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 61:3894-901
- Lee, S., Schmitt, C.A. (2019) The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol.* 21:94-101. doi: 10.1038/s41556-018-0249-2.
- Lei, J., Ma, J., Ma, Q., Li, X., Liu, H., Xu, Q., Duan, W., Sun, Q., Xu, J., Wu, Z., Wu, E. (2013) Hedgehog signaling regulates hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition and invasion in pancreatic cancer cells via a ligand-independent manner. *Mol Cancer* 12:66. doi: 10.1186/1476-4598-12-66.

- Leone, R.D., Horton, M.R., Powell, J.D. (2015) Something in the air: Hyperoxic conditioning of the tumor microenvironment for enhanced immunotherapy. *Cancer Cell* 27:435-6. doi: 10.1016/j.ccell.2015.03.014
- Lin, G.L., Monje, M. (2020) Understanding the Deadly Silence of Posterior Fossa A Ependymoma. *Mol Cell*. 78:999-1001. doi: 10.1016/j.molcel.2020.05.020.
- Liu, Q., Qiao, L., Liang, N., Xie, J., Zhang, Jingxin, Deng, G., Luo, H., Zhang, Jiandong (2016) The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions. *J Cell Mol Med*. 20:1761-9. doi: 10.1111/jcmm.12851.
- Liu, T., Yang, L., Lv, X., Zuo, C., Jia, C., Yang, Z., Fan, C., Chen, H. (2022) Cumulative evidence for associations between genetic variants in interleukin 17 family gene and risk of human diseases. *Front Immunol*. 13:1008184. doi: 10.3389/fimmu.2022.1008184.
- Liu, Yang, Liu, Yawei, Yan, X., Xu, Y., Luo, F., Ye, J., Yan, H., Yang, X., Huang, X., Zhang, J., Ji, G. (2014) HIFs enhance the migratory and neoplastic capacities of hepatocellular carcinoma cells by promoting EMT. *Tumor Biol*. 35:8103-14. doi: 10.1007/s13277-014-2056-0.
- Loo, J.M., Scherl, A., Nguyen, A., Man, F.Y., Weinberg, E., Zeng, Z., Saltz, L., Paty, P.B., Tavazoie, S.F. (2015) Extracellular metabolic energetics can promote cancer progression. *Cell* 160:393-406. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.018.
- Luo Q., Wang J., Zhao W., Peng Z., Liu X., Li B., Zhang H., Shan B., Zhang C., Duan C. (2020) Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 13:19. doi: 10.1186/s13045-020-00858-6.
- Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Moore, M.A.S., Hajjar, K.A., Manova, K., Benezra, R., Rafii, S., (2001) Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 7:1194-201. doi: 10.1038/nm1101-1194.
- Maibach, F., Sadozai, H., Seyed Jafari, S.M., Hunger, R.E., Schenk, M. (2020) Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Front Immunol*. 11:2105. doi: 10.3389/fimmu.2020.02105.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J. (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 11:293-9. doi: 10.1016/s0959-437x(00)00193-3.
- McGeachy, M.J., Cua, D.J., Gaffen, S.L. (2019) The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity* 50:892-906. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.021.

- McRoberts, J.A., Coutinho, S. V., Marvizón, J.C.G., Grady, E.F., Tognetto, M., Sengupta, J.N., Ennes, H.S., Chaban, V. V., Amadesi, S., Creminon, C., Lant-horn, T., Geppetti, P., Bunnett, N.W., Mayer, E.A. (2001) Role of peripheral N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in visceral nociception in rats. *Gastroenterology* 120:1737-48. doi: 10.1053/gast.2001.24848.
- Mehta, A.K., Gracias, D.T., Croft, M., 2018. TNF activity and T cells. *Cytokine* 101:14-18. doi: 10.1016/j.cyto.2016.08.003.
- Michealraj, K.A., Kumar, S.A., Kim, L.J.Y., Cavalli, F.M.G., Przelicki, D., Wojcik, J.B., Delaidelli, A., Bajic, A., Saulnier, O., MacLeod, G., Vellanki, R.N., Vla-doiu, M.C., Guilhamon, P., Ong, W., Lee, J.J.Y., Jiang, Y., Holgado, B.L., Ras-nitsyn, A., Malik, A.A., Tsai, R., Richman, C.M., Juraschka, K., Haapasalo, J., Wang, E.Y., De Antonellis, P., Suzuki, H., Farooq, H., Balin, P., Kharas, K., Van Ommeren, R., Sirbu, O., Rastan, A., Krumholtz, S.L., Ly, M., Ahmadi, M., Deblois, G., Srikanthan, D., Luu, B., Loukides, J., Wu, X., Garzia, L., Ramaswamy, V., Kanshin, E., Sánchez-Osuna, M., El-Hamamy, I., Coutinho, F.J., Prinos, P., Singh, S., Donovan, L.K., Daniels, C., Schramek, D., Tyers, M., Weiss, S., Stein, L.D., Lupien, M., Wouters, B.G., Garcia, B.A., Ar-rowsmith, C.H., Sorensen, P.H., Angers, S., Jabado, N., Dirks, P.B., Mack, S.C., Agnihotri, S., Rich, J.N., Taylor, M.D., 2020. Metabolic Regulation of the Epigenome Drives Lethal Infantile Ependymoma. *Cell* 181:1329-1345.e24. doi: 10.1016/j.cell.2020.04.047.
- Montfort, A., Filleron, T., Virazels, M., Dufau, C., Milhes, J., Pages, C., Olivier, P., Ayyoub, M., Mounier, M., Lusque, A., Brayer, S., Delord, J.P., Andrieu-Abadie, N., Levade, T., Colacios, C., Segui, B., Meyer, N. (2021) Combining Nivolumab and Ipilimumab with Infliximab or Certolizumab in Patients with Ad-vanced Melanoma: First Results of a Phase Ib Clinical Trial. *Clin Cancer Res* 27:1037-1047. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3449.
- Moore, R.J., Owens, D.M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., Kollias, G., Balkwill, F. (1999) Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 5:828-31. doi: 10.1038/10552.
- Morrison, S.L., Han, G., Elenwa, F., Vetto, J.T., Fowler, G., Leong, S.P., Kashani-Sabet, M., Pockaj, B.A., Kosiorek, H.E., Zager, J.S., Sondak, V.K., Messina, J.L., Mozzillo, N., Schneebaum, S., Han, D., 2022. Is the presence of tumor-infiltrating lymphocytes predictive of outcomes in patients with melanoma? *Cancer* 128.
- Murry, C.E., Jennings, R.B., Reimer, K.A. (1986) Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-36. doi: 10.1161/01.cir.74.5.1124.

- Nagy, J.A., Chang, S.H., Dvorak, A.M., Dvorak, H.F. (2009) Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer*. 100:865-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6604929.
- Nicholaou, T., Ebert, L.M., Davis, I.D., McArthur, G.A., Jackson, H., Dimopoulos, N., Tan, B., Maraskovsky, E., Miloradovic, L., Hopkins, W., Pan, L., Venhaus, R., Hoffman, E.W., Chen, W., Cebon, J. (2009) Regulatory T-Cell-mediated attenuation of T-Cell responses to the NY-ESO-1/ISCOMATRIX vaccine in patients with advanced malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 15:2166-73. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2484.
- Noman, M.Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., Bronte, V., Chouaib, S. (2014) PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 α , and its blockade under hypoxia enhanced: MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med* 211:781-90. doi: 10.1084/jem.20131916.
- Nordsmark, M., Loncaster, J., Chou, S.C., Havsteen, H., Lindegaard, J.C., Davidson, S.E., Varia, M., West, C., Hunter, R., Overgaard, J., Raleigh, J.A., 2001. Invasive oxygen measurements and pimonidazole labeling in human cervix carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:581-6. doi: 10.1016/s0360-3016(00)01493-0.
- Nowaczyk, A., Kowalska, M., Nowaczyk, J., Grzešek, G. (2021) Carbon monoxide and nitric oxide as examples of the youngest class of transmitters. *Int J Mol Sci*. 22:6029. doi: 10.3390/ijms22116029.
- Osaki, M., Oshimura, M., Ito, H., 2004. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9:667-76. doi: 10.1023/B:APPT.0000045801.
- Overwijk, W.W., Restifo, N.P., 2000. B16 as a Mouse Model for Human Melanoma. *Curr Protoc Immunol* 39. doi: 10.1002/0471142735.im2001s39.
- Pagès, F., Mlecnik, B., Marliot, F., Bindea, G., Ou, F.S., Bifulco, C., Lugli, A., Zlobec, I., Rau, T.T., Berger, M.D., Nagtegaal, I.D., Vink-Börger, E., Hartmann, A., Geppert, C., Kolwelter, J., Merkel, S., Grützmänn, R., Van den Eynde, M., Jouret-Mourin, A., Kartheuser, A., Léonard, D., Remue, C., Wang, J.Y., Bavi, P., Roehrl, M.H.A., Ohashi, P.S., Nguyen, L.T., Han, S.J., MacGregor, H.L., Hafezi-Bakhtiari, S., Wouters, B.G., Masucci, G. V., Andersson, E.K., Zavadova, E., Vocka, M., Spacek, J., Petruzella, L., Konopasek, B., Dundr, P., Skalova, H., Nemejcova, K., Botti, G., Tatangelo, F., Delrio, P., Ciliberto, G., Maio, M., Laghi, L., Grizzi, F., Fredriksen, T., Buttard, B., Angelova, M., Vasaturo, A., Maby, P., Church, S.E., Angell, H.K., Lafontaine, L., Bruni, D., El Sissy, C., Haicheur, N., Kirilovsky, A., Berger, A., Lagorce, C., Meyers, J.P., Paustian, C., Feng, Z., Ballesteros-Merino, C., Dijkstra, J., van de Water, C., van Lent-van Vliet, S., Knijn, N., Muşină, A.M., Scripcariu, D.V., Popivanova, B., Xu, M., Fujita, T., Hazama, S., Suzuki, N., Nagano, H., Okuno, K., Torigoe, T., Sato, N., Furuhashi, T., Takemasa, I., Itoh, K., Patel, P.S., Vora, H.H., Shah,

- B., Patel, J.B., Rajvik, K.N., Pandya, S.J., Shukla, S.N., Wang, Y., Zhang, G., Kawakami, Y., Marincola, F.M., Ascierto, P.A., Sargent, D.J., Fox, B.A., Galon, J. (2018) International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *The Lancet* 391:2128-2139. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30789-X.
- Palmisano, B.W., Mehner, R.W., Stowe, D.F., Bosnjak, Z.J., Kampine, J.P (1994) Direct myocardial effects of halothane and isoflurane: Comparison between adult and infant rabbits. *Anesthesiology* 81:718-29. doi: 10.1097/0000542-199409000-00026.
- Pascale, R.M., Calvisi, D.F., Simile, M.M., Feo, C.F., Feo, F. (2020) The warburg effect 97 years after its discovery. *Cancers (Basel)* 12:2819. doi: 10.3390/cancers12102819.
- Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R.A., Whittaker, P. (1993) Regional ischemic "preconditioning" protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87:893-9. doi: 10.1161/01.cir.87.3.893.
- Quintiliani, M. (1986) The oxygen effect in radiation inactivation of DNA and enzymes. *Int J Radiat Biol.* 50:573-94. doi: 10.1080/09553008614550981.
- Rankin, E.B., Fuh, K.C., Castellini, L., Viswanathan, K., Finger, E.C., Diep, A.N., LaGory, E.L., Kariolis, M.S., Chan, A., Lindgren, D., Axelson, H., Miao, Y.R., Krieg, A.J., Giaccia, A.J. (2014) Direct regulation of GAS6/AXL signaling by HIF promotes renal metastasis through SRC and MET. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:13373-8. doi: 10.1073/pnas.1404848111.
- Rankin, E.B., Fuh, K.C., Taylor, T.E., Krieg, A.J., Musser, M., Yuan, J., Wei, K., Kuo, C.J., Longacre, T.A., Giaccia, A.J. (2010) AXL is an essential factor and therapeutic target for metastatic ovarian cancer. *Cancer Res* 70:7570-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1267.
- Rankin, E.B., Giaccia, A.J. (2016) Hypoxic control of metastasis. *Science* 352:175-80. doi: 10.1126/science.aaf4405.
- Reinhardt, J., Landsberg, J., Schmid-Burgk, J.L., Ramis, B.B., Bald, T., Glodde, N., Lopez-Ramos, D., Young, A., Ngiow, S.F., Nettersheim, D., Schorle, H., Quast, T., Kolanus, W., Schadendorf, D., Long, G. V., Madore, J., Scolyer, R.A., Ribas, A., Smyth, M.J., Tume, P.C., Tuting, T., Holz, M. (2017) MAPK signaling and inflammation link melanoma phenotype switching to induction of CD73 during immunotherapy. *Cancer Res* 77:4697-4709. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0395.

- Ren, C., Gao, X., Steinberg, G.K., Zhao, H. (2008) Limb remote-preconditioning protects against focal ischemia in rats and contradicts the dogma of therapeutic time windows for preconditioning. *Neuroscience* 151: 1099-103. doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.11.056.
- Restifo, N.P., Dudley, M.E., Rosenberg, S.A. (2012) Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol.* 12:269-81. doi: 10.1038/nri3191.
- Revenko, A., Carnevalli, L.S., Sinclair, C., Johnson, B., Peter, A., Taylor, M., Hettrick, L., Chapman, M., Klein, S., Solanki, A., Gattis, D., Watt, A., Hughes, A.M., Magiera, L., Kar, G., Ireland, L., Mele, D.A., Sah, V., Singh, M., Walton, J., Mairesse, M., King, M., Edbrooke, M., Lyne, P., Barry, S.T., Fawell, S., Goldberg, F.W., MacLeod, A.R. (2022) Direct targeting of FOXP3 in Tregs with AZD8701, a novel antisense oligonucleotide to relieve immunosuppression in cancer. *J Immunother Cancer* 10: e003892. doi: 10.1136/jitc-2021-003892.
- Richards, C.H., Roxburgh, C.S.D., Anderson, J.H., McKee, R.F., Foulis, A.K., Horgan, P.G., McMillan, D.C. (2012) Prognostic value of tumour necrosis and host inflammatory responses in colorectal cancer. *Br J Surg* 99: 287-94. doi:10.1002/bjs.7755.
- Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J.E., Galand, P. (1991) Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138:447-53
- Ruf, M., Moch, H., Schraml, P. (2016) PD-L1 expression is regulated by hypoxia inducible factor in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 139:396-403. doi: 10.1002/ijc.30077
- Sahlgren, C., Gustafsson, M. V., Jin, S., Poellinger, L., Lendahl, U. (2008) Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:6392-7. doi: 10.1073/pnas.0802047105.
- Saleh, J. (2018) Murine models of melanoma. *Pathol Res Pract.* 214:1235-1238. doi: 10.1016/j.prp.2018.07.008.
- Seimiya, H., Tanji, M., Oh-Hara, T., Tomida, A., Naasani, I., Tsuruo, T. (1999) Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 365-70. doi: 10.1006/bbrc.1999.0910.
- Semaan, A., Dietrich, D., Bergheim, D., Dietrich, J., Kalff, J.C., Branchi, V., Matthaei, H., Kristiansen, G., Fischer, H.P., Goltz, D. (2017) CXCL12 expression and PD-L1 expression serve as prognostic biomarkers in HCC and are induced by hypoxia. *Virchows Archiv* 470:185-196. doi: 10.1007/s00428-016-2051-5.

- Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3:721-32. doi: 10.1038/nrc1187.
- Sethumadhavan, S., Silva, M., Philbrook, P., Nguyen, T., Hatfield, S.M., Ohta, A., Sitkovsky, M. V. (2017) Hypoxia and hypoxia-inducible factor (HIF) downregulate antigen-presenting MHC class I molecules limiting tumor cell recognition by T cells. *PLoS One* 12: e0187314. doi: 10.1371/journal.pone.0187314.
- Shang, B., Liu, Yao, Jiang, S.J., Liu, Yi (2015) Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 5:15179. doi: 10.1038/srep15179.
- Shen, Y., White, E. (2001) p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res*. 82:55-84. doi: 10.1016/s0065-230x(01)82002-9.
- Shou, J., Zhang, Z., Lai, Y., Chen, Z., Huang, J. (2016) Worse outcome in breast cancer with higher tumor-infiltrating FOXP3+ Tregs: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 16:687. doi: 10.1186/s12885-016-2732-0.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-5. doi: 10.1038/359843a0.
- Soengas, M.S., Alarcón, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mak, T.W., Lowe, S.W. (1999) Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* (1979) 284:156-9. doi: 10.1126/science.284.5411.156.
- Song, H., Chen, X., Jiao, Q., Qiu, Z., Shen, C., Zhang, G., Sun, Z., Zhang, H., Luo, Q.Y. (2021) HIF-1 α -Mediated Telomerase Reverse Transcriptase Activation Inducing Autophagy through Mammalian Target of Rapamycin Promotes Papillary Thyroid Carcinoma Progression during Hypoxia Stress. *Thyroid* 31: 233-246. doi: 10.1089/thy.2020.0023.
- Spivak-Kroizman, T.R., Hostetter, G., Posner, R., Aziz, M., Hu, C., Demeure, M.J., Von Hoff, D., Hingorani, S.R., Palculict, T.B., Izzo, J., Kiriakova, G.M., Abdelmelek, M., Bartholomeusz, G., James, B.P., Powis, G. (2013) Hypoxia triggers hedgehog-mediated tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. *Cancer Res* 73, 3235–47. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1433.
- Stevens, W.C., Cromwell, T.H., Halsey, M.J., Eger, E.I., Shakespeare, T.F., Bahlman, S.H. (1971) The cardiovascular effects of a new inhalation anesthetic, Forane, in human volunteers at constant arterial carbon dioxide tension. *Anesthesiology* 35:8-16. doi: 10.1097/00000542-197107000-00005.
- Sun, B., Zhang, D., Zhao, N., Zhao, X. (2017) Epithelial-to-endothelial transition and cancer stem cells: Two cornerstones of vasculogenic mimicry in malignant tumors. *Oncotarget*. 8:30502-30510. doi: 10.18632/oncotarget.8461.

- Szczyński, G., Veihelmann, A., Massberg, S., Nolte, D., Messmer, K. (2004) Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice - The haemodynamic effects. *Lab Anim* 38:64-9. doi: 10.1258/00236770460734416.
- Tanaka, A., Sakaguchi, S. (2017) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 27:109-118. doi: 10.1038/cr.2016.151.
- Tang, Q., Li, J., Zhu, H., Li, P., Zou, Z., Xiao, Y. (2013) Hmgb1-IL-23-IL-17-IL-6-Stat3 axis promotes tumor growth in murine models of melanoma. *Mediators Inflamm* 2013:713859. doi: 10.1155/2013/713859.
- Taube, J.M., Anders, R.A., Young, G.D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T.L., Chen, S., Klein, A.P., Pardoll, D.M., Topalian, S.L., Chen, L. (2012) Colocalization of inflammatory response with B7-H1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 4:127ra37. doi: 10.1126/scitranslmed.3003689.
- Teicher, B.A., Holden, S.A., Al-Achi, A., Herman, T.S. (1990) Classification of Antineoplastic Treatments by Their Differential Toxicity toward Putative Oxygenated and Hypoxic Tumor Subpopulations in Vivo in the FSallC Murine Fibrosarcoma. *Cancer Res* 50:3339-44.
- Thienpont, B., Van Dyck, L., Lambrechts, D. (2016) Tumors smother their epigenome. *Mol Cell Oncol* 3: e1240549. doi: 10.1080/23723556.2016.
- Thomas, N.E., Busam, K.J., From, L., Krickler, A., Armstrong, B.K., Anton-Culver, H., Gruber, S.B., Gallagher, R.P., Zanetti, R., Rosso, S., Dwyer, T., Venn, A., Kanetsky, P.A., Groben, P.A., Hao, H., Orlov, I., Reiner, A.S., Luo, L., Paine, S., Ollila, D.W., Wilcox, H., Begg, C.B., Berwick, M. (2013) Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *J Clin Oncol* 31:4252-9. doi: 10.1200/JCO.2013.51.3002.
- Todd, V.M., Vecchi, L.A., Clements, M.E., Snow, K.P., Ontko, C.D., Himmel, L., Pinnelli, C., Rafat, M., Johnson, R.W. (2021) Hypoxia inducible factor signaling in breast tumors controls spontaneous tumor dissemination in a site-specific manner. *Commun Biol* 4:1122. doi: 10.1038/s42003-021-02648-3.
- Torrey, H., Butterworth, J., Mera, T., Okubo, Y., Wang, L., Baum, D., Defusco, A., Plager, S., Warden, S., Huang, D., Vanamee, E., Foster, R., Faustman, D.L., (2017) Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs. *Sci Signal* 10:eaaf8608. doi: 10.1126/scisignal.aaf8608.
- Ullman-Culleré, M.H., Foltz, C.J. (1999) Body condition scoring: A rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci* 49:319-23.
- Vasaturo, A., Halilovic, A., Bol, K.F., Verweij, D.I., Blokx, W.A.M., Punt, C.J.A., Groenen, P.J.T.A., Van Krieken, J.H.J.M., Textor, J., De Vries, I.J.M., Figdor,

- C.G. (2016) T-cell landscape in a primary melanoma predicts the survival of patients with metastatic disease after their treatment with dendritic cell vaccines. *Cancer Res* 76:3496-506. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3211.
- Vaupel, P., Mayer, A., Höckel, M. (2004) Tumor Hypoxia and Malignant Progression. *Methods Enzymol* 381:335-54. doi: 10.1016/S0076-6879(04)81023-1. P
- Veldhoen, M. (2017) Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity. *Nat Immunol* 18:612-621. doi: 10.1038/ni.3742.
- Vladoiu, M.C., El-Hamamy, I., Donovan, L.K., Farooq, H., Holgado, B.L., Sundaravadanam, Y., Ramaswamy, V., Hendrikse, L.D., Kumar, S., Mack, S.C., Lee, J.J.Y., Fong, V., Juraschka, K., Przelicki, D., Michealraj, A., Skowron, P., Luu, B., Suzuki, H., Morrissy, A.S., Cavalli, F.M.G., Garzia, L., Daniels, C., Wu, X., Qazi, M.A., Singh, S.K., Chan, J.A., Marra, M.A., Malkin, D., Dirks, P., Heisler, L., Pugh, T., Ng, K., Notta, F., Thompson, E.M., Kleinman, C.L., Joyner, A.L., Jabado, N., Stein, L., Taylor, M.D., (2019) Childhood cerebellar tumours mirror conserved fetal transcriptional programs. *Nature* 572:67-73. doi: 10.1038/s41586-019-1158-7.
- Vucic, D., Stennicke, H.R., Pisabarro, M.T., Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (2000) ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* 10:1359-66. doi: 10.1016/s0960-9822(00)00781-8.
- Wang, B., Kohli, J., Demaria, M. (2020) Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends Cancer* 6:838-857. doi: 10.1016/j.trecan.2020.05.004.
- Wang, K., Kim, M.K., DiCaro, G., Wong, J., Shalapour, S., Wan, J., Zhang, W., Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Wu, L.W., Taniguchi, K., Feng, Y., Fearon, E., Grivennikov, S.I., Karin, M. (2014) Interleukin-17 receptor a signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis. *Immunity* 41:1052-63. doi: 10.1016/j.immuni.2014.11.009.
- Wang, L., Yi, T., Zhang, W., Pardoll, D.M., Yu, H. (2010) IL-17 enhances tumor development in carcinogen-induced skin cancer. *Cancer Res* 70: 10112-20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0775.
- Wang, N., Docherty, F., Brown, H.K., Reeves, K., Fowles, A., Lawson, M., Ottewill, P.D., Holen, I., Croucher, P.I., Eaton, C.L.(2015) Mitotic quiescence, but not unique “stemness,” marks the phenotype of bone metastasis-initiating cells in prostate cancer. *FASEB Journal* 29:3141-50. doi: 10.1096/fj.14-266379.
- Ward-Hartstonge, K.A., Kemp, R.A. (2017) Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response. *Clin Transl Immunology* 6: e154. doi: 10.1038/cti.2017.43.

- Wechman, S.L., Emdad, L., Sarkar, D., Das, S.K., Fisher, P.B. (2020) Vascular mimicry: Triggers, molecular interactions and in vivo models. *Adv Cancer Res* 148:27-67. doi: 10.1016/bs.acr.2020.06.001.
- Weir, P., Maguire, R., O'Sullivan, S.E., England, T.J. (2021) A meta-analysis of remote ischaemic conditioning in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 41:3-13. doi: 10.1177/0271678X20924077.
- Wong, C.C.L., Gilkes, D.M., Zhang, H., Chen, J., Wei, H., Chaturvedi, P., Fraley, S.I., Wong, C.M., Khoo, U.S., Ng, I.O.L., Wirtz, D., Semenza, G.L. (2011) Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:16369-74. doi: 10.1073/pnas.1113483108.
- Wyss, M., Kaddurah-Daouk, R. (2000) Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* 80:1107-213. doi: 10.1152/physrev.2000.80.3.1107.
- Xu, Z., Marko, N.F., Angelov, L., Barnett, G.H., Chao, S.T., Vogelbaum, M.A., Suh, J.H., Weil, R.J. (2012) Impact of preexisting tumor necrosis on the efficacy of stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases in women with breast cancer. *Cancer* 118:1323-33. doi: 10.1002/cncr.26314.
- Yang, J., Lian, J.W., Chin, Y.P., Wang, L., Lian, A., Murphy, G.F., Zhou, L. (2021) Assessing the Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Patients with Melanoma Using Pathologic Features Identified by Natural Language Processing. *JAMA Netw Open* 4:e2126337. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.2633
- Yang, L., DeBusk, L.M., Fukuda, K., Fingleton, B., Green-Jarvis, B., Shyr, Y., Matrisian, L.M., Carbone, D.P., Lin, P.C. (2004) Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6:409-21. doi: 10.1016/j.ccr.2004.08.031.
- Yang, M.H., Wu, M.Z., Chiou, S.H., Chen, P.M., Chang, S.Y., Liu, C.J., Teng, S.C., Wu, K.J. (2008) Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* 10:295-305. doi: 10.1038/ncb1691.
- Yang, T., Xiao, H., Liu, X., Wang, Z., Zhang, Q., Wei, N., Guo, X. (2021) Vascular Normalization: A New Window Opened for Cancer Therapies. *Front Oncol* 11:719836. doi: 10.3389/fonc.2021.719836.
- Yatabe, N., Kyo, S., Maida, Y., Nishi, H., Nakamura, M., Kanaya, T., Tanaka, M., Isaka, K., Ogawa, S., Inoue, M. (2004) HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* 23:3708-15. doi: 10.1038/sj.onc.1207460.
- Yellon, D.M., Hausenloy, D.J. (2007) Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 357:1121-35. doi: 10.1056/NEJMra071667.

- Young, A., Mittal, D., Stagg, J., Smyth, M.J. (2014) Targeting cancer-derived adenosine: New therapeutic approaches. *Cancer Discov* 4:879-88. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0341.
- Zelba, H., Weide, B., Martens, A., Derhovanessian, E., Bailur, J.K., Kyzirakos, C., Pflugfelder, A., Eigentler, T.K., Di Giacomo, A.M., Maio, M., Aarntzen, E.H.J.G., De Vries, J., Sucker, A., Schadendorf, D., Büttner, P., Garbe, C., Pawelec, G. (2014) Circulating CD4+ T cells that produce IL4 or IL17 when stimulated by Melan-A but not by NY-ESO-1 have negative impacts on survival of patients with stage IV melanoma. *Clin Cancer Res* 20:4390-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1015.
- Zeng, Y., Chen, T. (2019) DNA methylation reprogramming during mammalian development. *Genes (Basel)* 10:257. doi: 10.3390/genes10040257.
- Zeng, Y., Zhang, Q., Wang, H., Lu, M., Kong, H., Zhang, Y., Shi, H. (2015) Prognostic significance of interleukin-17 in solid tumors: A meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8:10515-36.
- Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V. V., Semenza, G.L. (2007) HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity. *Cancer Cell* 11:407-20. doi: 10.1016/j.ccr.2007.04.001.
- Zhang, L., Zha, Z., Qu, W., Zhao, H., Yuan, J., Feng, Y., Wu, B. (2018) Tumor necrosis as a prognostic variable for the clinical outcome in patients with renal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 18:870. doi: 10.1186/s12885-018-4773-z.
- Zhang, W., Shi, X., Peng, Y., Wu, M., Zhang, P., Xie, R., Wu, Y., Yan, Q., Liu, S., Wang, J. (2015) HIF-1 α promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through direct regulation of ZEB1 in colorectal cancer. *PLoS One* 10:e0129603. doi: 10.1371/journal.pone.0129603.
- Zhang, Y., Zoltan, M., Riquelme, E., Xu, H., Sahin, I., Castro-Pando, S., Montiel, M.F., Chang, K., Jiang, Z., Ling, J., Gupta, S., Horne, W., Pruski, M., Wang, H., Sun, S.C., Lozano, G., Chiao, P., Maitra, A., Leach, S.D., Kolls, J.K., Vilar, E., Wang, T.C., Bailey, J.M., McAllister, F. (2018) Immune Cell Production of Interleukin 17 Induces Stem Cell Features of Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Cells. *Gastroenterology* 155:210-223.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2018.03.041.
- Zhao, X., Subramanian, S. (2017) Intrinsic resistance of solid tumors to immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Res.* 77:817-822. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2379.
- Zhao, Xueqiang, Rong, L., Zhao, Xiaopu, Li, X., Liu, X., Deng, J., Wu, H., Xu, X., Erben, U., Wu, P., Syrbe, U., Sieper, J., Qin, Z. (2012) TNF signaling drives

myeloid-derived suppressor cell accumulation. *J Clin Invest* 122:4094-104.
doi: 10.1172/JCI64115.

Zingg, D., Arenas-Ramirez, N., Sahin, D., Rosalia, R.A., Antunes, A.T., Haeusel, J., Sommer, L., Boyman, O. (2017) The Histone Methyltransferase Ezh2 Controls Mechanisms of Adaptive Resistance to Tumor Immunotherapy. *Cell Rep* 20:854-867. doi: 10.1016/j.celrep.2017.07.007.

Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B., Stokoe, D., Giaccia, A.J. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* 14:391-6.

Dynamische Internetseiten:

<https://gco.iarc.fr/> [Zugriff 30.06.2023]

<https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?types=1> [Zugriff 30.06.2023]

<https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/grimace-scale-mouse> [Zugriff 30.06.2023]

7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. med. MHBA Jonas Kolbenschlag, Leitender Oberarzt für Hand-, Plastische, Rekonstruktive und Verbrennungschirurgie und Dr. med. Sabrina Krauß, Oberärztin der Abteilung geplant. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Apl. Prof. Dr. Stephan Huber, Arbeitsgruppenleiter und Laborleiter des Labors für Experimentelle Radioonkologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und PD Dr. med. Franziska Eckert, Arbeitsgruppenleiterin des Labors für Experimentelle Radioonkologie, Oberärztin der Klinik für Radioonkologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meine Einarbeitung im Labor wurde von Nicolai Stransky, Heidrun Faltin und Katrin Ganser betreut und durchgeführt. Die experimentellen Arbeiten mit der Zellkultur (B16-OVA) wurde komplett eigenständig von mir, Katarzyna Rachunek-Medved, durchgeführt. Die Vorbereitung der Zellsuspension für die subkutane Implantation gemäß dem im Manuskript genannten Protokoll wurde ebenfalls eigenständig von mir durchgeführt.

Der Aufbau des „Low Pressure Turniquets“ erfolgte eigenständig durch mich. Die Konzeption und Montage des Narkosegeräts wurde von mir unter Supervision von Herrn Prof. Dr. Huber durchgeführt. Die Durchführung der Ohrlochmarkierung, die Implantation der Melanomzellen, die Überwachung tumortragender Tiere, die Enthaarung der Mäuse an den zu messenden Körperarealen mittels Creme, die Durchführung des RIC unter Isoflurannarkose, die Injektion von Pimonidazol, die retrobulbäre Blutentnahme und die Sakrifizierung der Tiere wurden eigenständig von mir unter der Aufsicht von Herrn Prof. Dr. Huber gemäß dem Tierversuchsantrag durchgeführt.

Die histologische Aufarbeitung der Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mauspathologie des CoreFacility der Universitätsklinik Tübingen in Kooperation mit Dr. Irene Gonzalez-Menendez und Professor Dr. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend. Die Analyse der digitalisierten histologischen Schnitte wurde von mir unter Anleitung von Dr. Irene Gonzalez-Menendez durchgeführt.

Der Bio-Plex Multiplex Immunoassay wurde von mir in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Constantin Adams (Kinderklinik, Universitätsklinik Tübingen) durchgeführt. Die Aufbereitung der Serumproben gemäß dem Herstellerprotokoll wurde von mir unter Anleitung von Nicolai Stransky durchgeführt. Die Kalibration der Bio-Plex® 200 Station mit Durchflusszytometer sowie das Bedienen der Bio-Plex Washstation wurden in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Constantin Adams durchgeführt.

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

Tübingen, den 04.03.2024

Katarzyna Rachunek-Medved

8. Anhang

Anhang A. Score Sheet zur Kontrolle der Belastung der Tiere und Definition der Abbruchkriterien:

Score sheet	Bewertung	Score	Datum
Pflegezustand	glatt, glänzend,	0	
	keine Fellpflege, stumpfes Fell	1	
	keine Fellpflege, schmutzig,	2	
	keine Fellpflege, schmutzig, Aufrichten der Körperhaare (Piloerektion)	3	
Augen	normal	0	
	etwas eingesunken, geschwollen	1	
	Lider geschlossen	2	
	stark eingesunken, Lider geschlossen, verklebt	3	
Körperhaltung	normal	0	
	leicht gekrümmt	1	
	aufgekrümmter Rücken,	2	
	stark buckelig, Beine unter den Bauch gestellt	3	
Mobilität	normal	0	
	langsames Vorsetzen der Gliedmaßen	1	
	unsicherer Gang	2	
	durch Berührung kaum provozierbare Bewegung, stark eingeschränkte ggf. schwankende Bewegung	3	

Gesichtsausdruck	kein Hinweis auf Schmerzen	0	
	Hinweis auf Schmerzen	1	
	anhaltende Schmerzen über 72 Stunden trotz Schmerzmittelgabe	Versuchsabbruch	
Ernährungszustand			
Bodycondition Score	Wirbel, Becken nur mit leichtem Druck palpierbar	0	
	Wirbel, Becken palpierbar, abdominale Einziehung seitlich sichtbar	1	
	Wirbel sind sichtbar und Beckenknochen fühlbar	2	
	Wirbel, Becken und Rippen sichtbar	Versuchsabbruch	
Gewicht *bezogen auf das Ausgangsgewicht, korrigiert um die erwartete Gewichtszunahme gleichaltriger, gleichgeschlechtlicher Tiere derselben Linie im Beobachtungszeitraum	normal, kontinuierliche Zunahme (Schwankungen um 5 %)	0	
	Abnahme des Gewichts 5 – 10 %	1	
	Abnahme des Gewichts 10 bis < 20 %	2	
	Abnahme des Gewichts um maximal 20 %	Versuchsabbruch	
Atmung	regelmäßig	0	
	regelmäßig, leicht verstärkt	1	
	deutlich verstärkt	2	
	erschwerete Atmung, pumpend	3	
Verhalten/Aktivität	normal	0	
	leichte Änderung	1	
	wenig Bewegung, isoliert	2	
	apathisch, teilnahmslos	3	
	kein Tumorwachstum	0	

Versuchsbedingte Kriterien, z. B. Tumorgröße/ Beschaffenheit	Tumordurchmesser <10 mm	1	
	Tumordurchmesser <15 mm	2	
	Tumordurchmesser > 15 mm oder exulzeriert	Versuchsabbruch	
	Punktsumme:		
Außerordentliche Maßnahmen	bei Gewichtsverlust von 20 % bei Tumordurchmesser > 15 mm Tumorexulzeration Tumorbedingte Funktionseinschränkungen abgemagertes Ernährungszustand anhaltende Schmerzen über 72 Stunden trotz Schmerzmittelgabe bei Vergabe von 2 x 3 Punkten	Versuchsabbruch	
Bewertung			
0 - 2 Punkte in unterschiedlichen Kategorien	normal		
3 - 8 Punkte	erhöhte Überwachung, ggf. tierärztlichen Rat einholen (Gabe von Schmerzmitteln), Erhöhung der Frequenz der Gewichtskontrolle		
9 und mehr Punkte	Leiden der Tiere erreicht den definierten humanen Endpunkt → Euthanasie		

Anhang B. Dosierung der Medikamente während des Versuchs

BEHANDLUNG	DOSIS	GRUND	EXPERIMENT
ISOFLURAN	4 – 5 % in Druckluft (Einleitung) 0,8 % in Druckluft (Erhaltung) inhalativ	Narkose	Durchführung RIC
MELOXICAM	1 – 2 mg/kg KG p.o. in einer Suspension mit Dosierung 1,5 mg/ml	Schmerztherapie	nach Tumorzelltransplantation und auch sonst bei Anzeichen von Schmerzen
PIMONIDAZOL	100 mg/kg KG i.p.	Anfärbung	Bestimmung des hypoxischen Tumorareals
ENTHAARUNGS-CREME (VEET SENSITIVE)	Topische Applikation nach Herstellerangaben	Enthaarung der Körperstellen, an denen die Mikrozirkulation gemessen werden soll	Vorbereitung, um nichtinvasive Messsonden für die RIC aufsetzen zu können

Anhang C. Body Conditioning (BC) Scoring für Beurteilung des Ernährungszustandes der Tiere, modifiziert nach Ullman-Culleré & Foltz, 1999



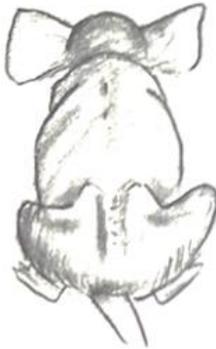
BC 1
Die Maus ist abgemagert

- Das Skelett ist stark hervorstehend; wenig oder keine Fleischbedeckung.
- Die Wirbel sind deutlich segmentiert.



BC 4
Die Maus ist überkonditioniert.

- Die Wirbelsäule bildet eine durchgehende Säule.
- Die Wirbel sind nur bei festem Druck tastbar.



BC 2
Die Maus ist unterkonditioniert.

- Die Segmentierung der Wirbelsäule ist erkennbar.
- Die dorsalen Beckenknochen sind leicht tastbar.



BC 5
Die Maus ist fettleibig.

- Die Maus ist glatt und massig.
- Die Knochenstruktur verschwindet unter dem Weichteilmantel und dem subkutanen Fett.



BC 3
Die Maus ist gut konditioniert.

- Die Wirbel und das dorsale Becken sind nicht prominent; mit leichtem Druck tastbar.

Anhang D. Gesichtsausdruck der Mäuse als Anhaltspunkt für Schmerzen

aus <https://www.nc3rs.org.uk/3rs-resources/grimace-scales/grimace-scale-mouse> [Zugriff 30.06.2023]. Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung vom National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs), Großbritannien.

NC
3R^s

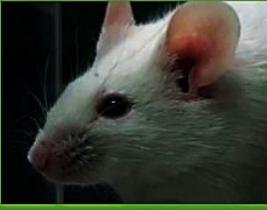
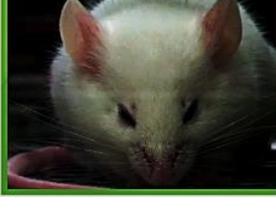
National Centre
for the Replacement
Refinement & Reduction
of Animals in Research

The Mouse Grimace Scale

Research has demonstrated that changes in facial expression provide a means of assessing pain in mice.

The specific facial action units shown below have been used to generate the Mouse Grimace Scale. These action units increase in intensity in response to post-procedural pain and can be used as part of a clinical assessment.

The action units should only be used in awake animals. Each animal should be observed for a short period of time to avoid scoring brief changes in facial expression that are unrelated to the animal's welfare.

	Not present "0"	Moderately present "1"	Obviously present "2"
Orbital tightening <ul style="list-style-type: none"> ▪ Closing of the eyelid (narrowing of orbital area) ▪ A wrinkle may be visible around the eye 			
Nose bulge <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bulging on the bridge of the nose ▪ Vertical wrinkles on the side of the nose 			
Cheek bulge <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bulging of the cheeks 			
Ear position <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ears rotate outwards and/or backwards, away from the face ▪ Ears may fold to form a 'pointed' shape ▪ Space between the ears increases 			
Whisker change <ul style="list-style-type: none"> ▪ Whiskers are either pulled back against the cheek, or pulled forward to 'stand on end' ▪ Whiskers may clump together ▪ Whiskers lose their natural 'downward' curve 			

Anhang E. Protokoll-Nr. 771: DAB Map CC1std 6h, D1.anti rabbit (28.10.2019) Prozedur: Forschung IHC DAB Map XT

Discovery XT Färbemodul

- 1 ***** Getimete Schritte starten *****
- 2 ***** EZ Prep auswählen *****
- 3 Aufheizen des Objektträgers bis 75°C, und für 8 Minuten inkubieren
- 4 Einstellen des EZ Prep Volumens (DXT)
- 5 Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT)
- 6 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 7 Inkubieren für 8 Minuten
- 8 Objektträger waschen
- 9 Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT)
- 10 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 11 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
- 12 ***** SSC Wash auswählen *****
- 13 ***** EZ Prep auswählen *****
- 14 ***** EZ Prep auswählen *****
- 15 Objektträger waschen
- 16 Jet Drain (DXT)
- 17 Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 18 Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip (DXT)
- 19 Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 20 Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip (DXT)
- 21 Aufheizen des Objektträgers bis 95 °C, und für 8 Minuten inkubieren
- 22 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 23 Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 24 Aufheizen des Objektträgers bis 100°C und für 4 Minuten inkubieren
- 25 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 26 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 27 Inkubieren für 4 Minuten
- 28 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 29 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 30 Inkubieren für 4 Minuten
- 31 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 32 Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 33 Inkubieren für 4 Minuten
- 34 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 35 Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 36 Inkubieren für 4 Minuten

37 Abgabe von Coverslip (DXT)
38 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
39 Inkubieren für 4 Minuten
40 Abgabe von Coverslip (DXT)
41 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
42 Inkubieren für 4 Minuten
43 Abgabe von Coverslip (DXT)
44 Objektträger-Heizung ausschalten
45 Inkubieren für 8 Minuten
46 Spülen mit Reaktionspuffer
47 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
48 Abgabe von Coverslip (DXT)
49 ***** EZ Prep auswählen *****
50 ***** SSC Wash auswählen *****
51 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
52 Spülen mit Reaktionspuffer
53 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
54 Abgabe von Coverslip (DXT)
55 1 Tropfen Inhibitor D auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
56 Spülen mit Reaktionspuffer
57 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
58 1 Tropfen BLOCKER A auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
59 Inkubieren für 8 Minuten (Avidin)
60 Spülen mit Reaktionspuffer
61 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
62 1 Tropfen BLOCKER B auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
63 Inkubieren für 8 Minuten (Biotin)
64 Objektträger-Heizung ausschalten
65 Spülen mit Reaktionspuffer
66 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
67 Abgabe von Coverslip (DXT)
68 ***** Mischer Aus *****
69 ***** Bitte auf Knopf warten (Warteposition) *****
70 ***** Mischer An *****
71 Spülen mit Reaktionspuffer
72 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
73 Abgabe von Coverslip (DXT)
74 ***** Mischer Aus *****
75 ***** Manueller Auftrag (Titration) *****
76 ***** Mischer An *****
77 Inkubieren für 6 Stunden (Primärer Antikörper)

- 78 Spülen mit Reaktionspuffer
- 79 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 80 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 81 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
- 82 Spülen mit Reaktionspuffer
- 83 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 84 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 85 1 Tropfen [DETECTION 1] (Nachweis Nr.2), und für 32 Minuten inkubieren.
- 86 Spülen mit Reaktionspuffer
- 87 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 88 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 89 1 Tropfen Blocker D auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
- 90 1 Tropfen SA-HRP D auftragen, und für 16 Minuten inkubieren.
- 91 Spülen mit Reaktionspuffer
- 92 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 93 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 94 Spülen mit Reaktionspuffer
- 95 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 96 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 97 Spülen mit Reaktionspuffer
- 98 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 99 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 100 Spülen mit Reaktionspuffer
- 101 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 102 1 Tropfen DAB D und einen Tropfen DAB H2O2 D auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
- 103 Spülen mit Reaktionspuffer
- 104 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 105 1 Tropfen Copper D auftragen, Coverslip auftragen, und für 4 Minuten inkubieren.
- 106 Spülen mit Reaktionspuffer
- 107 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 108 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 109 ***** EZ Prep auswählen *****
- 110 Spülen mit Reaktionspuffer
- 111 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 112 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 113 Inkubieren für 4 Minuten
- 114 Objektträger-Heizung ausschalten
- 115 ***** Mischer Aus *****
- 116 ***** Bitte auf Knopf warten (Halteschritt Gegenfärbung/Säuberung) *****
- 117 ***** Mischer An *****
- 118 ***** EZ Prep auswählen *****

- 119 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
 - 120 Spülen mit Reaktionspuffer
 - 121 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
 - 122 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen
u. für [4 Minuten] inkubieren.
 - 123 Spülen mit Reaktionspuffer
 - 124 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
 - 125 Abgabe von Coverslip (DXT)
 - 126 Spülen mit Reaktionspuffer
 - 127 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
 - 128 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (Nach-Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen
u. für [4 Minuten] inkubieren.
 - 129 Spülen mit Reaktionspuffer
 - 130 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
 - 131 Abgabe von Coverslip (DXT)
 - 132 Spülen mit Reaktionspuffer
 - 133 Spülen mit Reaktionspuffer
- * Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe

Inst. f. Pathologie d. Universitaet Tuebingen, Liebermeisterstr. 8 72076 Tuebingen Germany

Discovery XT Färbemodul

- 1 ***** Getimete Schritte starten *****
- 2 ***** EZ Prep auswählen *****
- 3 Aufheizen des Objektträgers bis 75°C und für 8 Minuten inkubieren
- 4 Einstellen des EZ Prep Volumens (DXT)
- 5 Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT)
- 6 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 7 Inkubieren für 8 Minuten
- 8 Objektträger waschen
- 9 Einstellen des Entparaffinierungsvolumens (DXT)
- 10 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 11 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
- 12 ***** SSC Wash auswählen *****
- 13 ***** EZ Prep auswählen *****
- 14 ***** EZ Prep auswählen *****
- 15 Objektträger waschen
- 16 Jet Drain (DXT)
- 17 Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 18 Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip (DXT)
- 19 Abgabe lang: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 20 Abgabe von Cell Cond. u. Coverslip (DXT)
- 21 Aufheizen des Objektträgers bis 95°C und für 8 Minuten inkubieren
- 22 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 23 Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 24 Aufheizen des Objektträgers bis 100°C und für 4 Minuten inkubieren
- 25 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 26 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 27 Inkubieren für 4 Minuten
- 28 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 29 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 30 Inkubieren für 4 Minuten
- 31 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 32 Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
- 33 Inkubieren für 4 Minuten
- 34 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 35 Abgabe mittel: Cell Conditioner Nr.1 (DXT)

36 Inkubieren für 4 Minuten
37 Abgabe von Coverslip (DXT)
38 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
39 Inkubieren für 4 Minuten
40 Abgabe von Coverslip (DXT)
41 Abgabe von Cell Conditioner Nr.1 (DXT)
42 Inkubieren für 4 Minuten
43 Abgabe von Coverslip (DXT)
44 Objektträger-Heizung ausschalten
45 Inkubieren für 8 Minuten
46 Spülen mit Reaktionspuffer
47 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
48 Abgabe von Coverslip (DXT)
49 ***** EZ Prep auswählen *****
50 ***** SSC Wash auswählen *****
51 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
52 Spülen mit Reaktionspuffer
53 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
54 Abgabe von Coverslip (DXT)
55 1 Tropfen Inhibitor CM auftragen und für 4 Minuten inkubieren.
56 Objektträger-Heizung ausschalten
57 Spülen mit Reaktionspuffer
58 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
59 Abgabe von Coverslip (DXT)
60 ***** Mischer Aus *****
61 ***** Bitte auf Knopf warten (Warteposition) *****
62 ***** Mischer An *****
63 Spülen mit Reaktionspuffer
64 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
65 Abgabe von Coverslip (DXT)
66 ***** Mischer Aus *****
67 ***** Manueller Auftrag (Titration) *****
68 ***** Mischer An *****
69 Inkubieren für 6 Stunden (Primär Antikörper)
70 Spülen mit Reaktionspuffer
71 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
72 Abgabe von Coverslip (DXT)
73 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
74 Spülen mit Reaktionspuffer
75 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
76 Abgabe von Coverslip (DXT)

- 77 Spülen mit Reaktionspuffer
- 78 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 79 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 80 1 Tropfen [DETECTION 5] (Nachweis Nr.2) und für 32 Minuten inkubieren.
- 81 Spülen mit Reaktionspuffer
- 82 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 83 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 84 Spülen mit Reaktionspuffer
- 85 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 86 1 Tropfen von [OMap anti-Rb HRP] (Multimer HRP) auftragen, LCS auftragen u. für [16 Minuten] inkubieren.
- 87 Spülen mit Reaktionspuffer
- 88 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 89 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 90 Spülen mit Reaktionspuffer
- 91 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 92 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 93 Spülen mit Reaktionspuffer
- 94 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 95 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 96 Spülen mit Reaktionspuffer
- 97 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 98 1 Tropfen DAB CM und einen Tropfen H₂O₂ CM auftragen, LCS auftragen und für 8 Minuten inkubieren.
- 99 Spülen mit Reaktionspuffer
- 100 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 101 1 Tropfen Copper CM auftragen, Coverslip auftragen und für 4 Minuten inkubieren.
- 102 Spülen mit Reaktionspuffer
- 103 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 104 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 105 ***** EZ Prep Auswählen *****
- 106 Spülen mit Reaktionspuffer
- 107 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens
- 108 Abgabe von Coverslip (DXT)
- 109 Inkubieren für 4 Minuten
- 110 Objektträger-Heizung ausschalten
- 111 ***** Mischer Aus *****
- 112 ***** Bitte auf Knopf warten (Halteschritt Gegenfärbung/Säuberung) *****
- 113 ***** Mischer An *****
- 114 ***** EZ Prep Auswählen *****
- 115 Aufheizen des Objektträgers bis 37°C und für 4 Minuten inkubieren
- 116 Spülen mit Reaktionspuffer

117 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

118 1 Tropfen von [HEMATOXYLIN] (Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für 4 Minuten inkubieren.

119 Spülen mit Reaktionspuffer

120 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

121 Abgabe von Coverslip (DXT)

122 Spülen mit Reaktionspuffer

123 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

124 1 Tropfen von [BLUING REAGENT] (nach Gegenfärbung) auftragen, LCS auftragen u. für 4 Minuten inkubieren.

125 Spülen mit Reaktionspuffer

126 Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens

127 Abgabe von Coverslip (DXT)

128 Spülen mit Reaktionspuffer

129 Spülen mit Reaktionspuffer

* Ein Tropfen entspricht einer Reagenzienabgabe, Inst. f. Pathologie d. Universitaet Tuebingen, Liebermeisterstr. 8 72076 Tuebingen Germany

9. Danksagung

Ich bin meinem Doktorvater Prof. Dr. med. MHBA Jonas Kolbensschlag zutiefst für die fachliche Kompetenz, unermüdliche Unterstützung und die wertvollen Anregungen während des gesamten Forschungsprojekts dankbar. Seine Ideen und seine Erfahrung waren für meine wissenschaftliche Entwicklung von unschätzbarem Wert.

Bei meiner Arbeitskollegin und Betreuerin Dr. med. Sabrina Krauß möchte ich mich besonders für die Planung der Arbeit und Vorbereitung des Tierversuchsantrages bedanken. Ohne ihre Unterstützung wäre die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Prof. Dr. med. Adrien Daigeler danke ich herzlich für die großzügig gewidmete Zeit, die wertvollen Ratschläge und die ständige Ermutigung. Seine Fachkenntnisse und Begeisterung für Forschung haben mich inspiriert und meinen Horizont erweitert.

Die Rolle als Arbeitsgruppenleiter und Laborleiter des Labors für Experimentelle Radioonkologie von Apl. Prof. Dr. Stephan Huber war von unschätzbarem Wert für den Erfolg meiner Forschungsarbeit und ich danke ihm für seine wissenschaftliche Anleitung. Ihr fachliches Know-how und Ihre wertvollen Diskussionen sowie Ihre Unterstützung haben es mir ermöglicht, die Ergebnisse meiner Arbeit zu vertiefen und besser zu interpretieren.

PD Dr. med. Franziska Eckert, ich bin Ihnen zutiefst dankbar für Ihre wertvollen Einblicke, Ihre fachliche Expertise und Ihre wertvolle Anleitung während meiner Forschungsarbeit. Ihre Begeisterung für das Labor für Experimentelle Radioonkologie und Ihre Unterstützung haben mir geholfen, die experimentelle Arbeit besser zu planen und die Auswertungsmethoden zu optimieren. Ich schätze ihre Geduld und Offenheit gegenüber neuen Ideen.

Mein Dank gilt auch den Labormitgliedern Heidrun Faltin, Nicolai Stransky und Katrin Ganser. Ihre technische Unterstützung, Ihr Engagement und Ihre Zusammenarbeit haben maßgeblich dazu beigetragen, dass die Experimente erfolgreich durchgeführt werden konnten. Ich schätze Ihre Professionalität und Ihren Beitrag zum reibungslosen Ablauf der Forschungsarbeit.

Ich möchte hiermit meinen aufrichtigen Dank gegenüber Dr. Irene Gonzalez-Mendez und Professor Dr. Leticia Quintanilla-Martinez de Fend (Mauspathologie, Core Facility der Universitätsklinik Tübingen) aussprechen, für ihre herausragende Hilfe und Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung der Proben.

Des Weiteren möchte ich einen besonderen Dank an Dr. rer. nat. Constantin Adams (Kinderklinik, Universitätsklinikum Tübingen) aussprechen für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung des Bio-Plex Multiplex Immunoassays.

Ich möchte auch meiner Mutter Alicja und meiner gesamten Familie meinen tiefsten Dank für ihre bedingungslose Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit ausdrücken. Ihre Unterstützung war unermesslich wertvoll und hat mir geholfen, die Herausforderungen dieses Weges zu bewältigen.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Ehemann Fabian. Seine Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen und als Arzt hat mir geholfen, neue Perspektiven zu erlangen und wichtige Einsichten in meine Forschung zu gewinnen. Darüber hinaus danke ich ihm für seine Geduld und sein Verständnis während der stressigen Phasen meiner Arbeit.