

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Stephan Kersting, MBA)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

Thema:

**Einfluss des chirurgischen Traumas auf Immunreaktion und ausgewählte Stoffwechselprozesse im  
murinen Pankreaskarzinommodell**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität Greifswald

2022

vorgelegt von:  
Friederike Löning, geb. Hegner  
geb. am: 18.11.1993  
in: Ludwigslust



Dekan:	Prof. Dr. med. habil. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	PD Dr. med. habil. Pia Menges
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. habil. Doreen Richardt, LL.M.
(3. Gutachter:)	
Ort, Raum:	Universitätsmedizin Greifswald, Seminarraum L02.22
Tag der Disputation:	7. September 2023



# Inhalt

---

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pankreaskarzinom.....	1
1.2 Tumormodell.....	2
1.3 Die Rolle des Immunsystems in der Tumorabwehr.....	2
1.3.1 Überblick über den Aufbau und die Funktionsweise des Immunsystems.....	2
1.3.2 Leukozyten in der Tumorimmunologie.....	3
1.3.3 Rolle der Zytokine.....	5
1.4 Postoperative Immundysfunktion.....	5
1.4.1 Das SID-Model.....	6
1.5 Behandlung Tumor-tragender Mäuse mit der SID.....	6
1.6 Tumormetabolismus.....	7
<b>2 Fragestellung und Zielsetzung.....</b>	<b>8</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>9</b>
3.1 Laborgeräte.....	9
3.2 Verbrauchsmaterialien.....	10
3.3 Reagenzien und Chemikalien.....	11
3.4 Puffer, Medien und Lösungen.....	12
3.5 Kits.....	13
3.6 Antikörper.....	13
3.7 Software.....	14
<b>4 Methoden.....</b>	<b>15</b>
4.1 Methodik der in vivo Untersuchungen: Tierexperimentelle Vorgehensweisen.....	15
4.1.1 Genehmigung.....	15
4.1.2 Tiere.....	15
4.1.3 Tierhaltung.....	15
4.1.4 Versuchsgruppen und Tierzahl.....	15
4.1.5 Versuchsaufbau.....	16
4.1.6 Anästhesie.....	16
4.1.7 Tumorimplantation.....	17

4.1.7.1 Vorbereitung der Tumorzellen.....	17
4.1.7.2 Implantation der Tumorzellen.....	17
4.1.8 Operationsmethoden.....	18
4.1.8.1 Laparotomie.....	18
4.1.8.2 Surgically-induced Immune Dysfunction (SID).....	18
4.1.9 Magnetresonanztomografie.....	19
4.1.10 Beurteilung des Zustandes der Mäuse.....	20
4.1.11 Schmerzmanagement.....	20
4.1.12 Organentnahme.....	20
4.2 Methodik der ex vivo Untersuchungen.....	21
4.2.1 Aufarbeitung und Analyse der Milz.....	21
4.2.1.1 Aufarbeitung der Milz und Bestimmung der Zellzahl.....	21
4.2.1.2 Durchflusszytometrie: Übersicht über die Zellpopulationen der Milz.....	21
4.2.1.3 Splenozytenstimulation mit LPS bzw. mit IL-2, IL-12 und IL-18 und intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung.....	23
4.2.1.4 Stimulation der Splenozyten mit LPS zur Bestimmung der Zytokinproduktion.....	25
4.2.2 Analyse und Aufarbeitung des Blutes.....	25
4.2.2.1 Blutbildbestimmung .....	25
4.2.2.2 Gewinnung von Serum für die Zytokinbestimmung .....	25
4.2.2.3 Vollblutstimulation mit LPS.....	25
4.2.2.4 Massenspektrometrische Untersuchung von EDTA-Plasma - Metabolom.....	26
4.2.3 Messung der Zytokinkonzentration im Serum bzw. im Überstand von stimulierten Splenozyten bzw. Blutzellen mit Hilfe eines Cytometric Bead Array.....	26
4.3 Statistik.....	27
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
5.1 Überlebenskinetik.....	28
5.2 Zustand der Tiere.....	29
5.2.1 Gesamtbelastung.....	29
5.2.2 Entwicklung des Körpergewichtes der Versuchstiere.....	30
5.3 Beurteilung des Tumorwachstums.....	32
5.4 Veränderungen in der Zusammensetzung des zellulären Immunsystem.....	33

5.4.1 Analyse des Blutbildes.....	34
5.4.1.1 Absolute Zellzahlen .....	34
5.4.1.2 Anteil der Immunzellpopulationen an den Leukozyten .....	35
5.4.1.3 Beurteilung der Erythrozytenparameter .....	37
5.4.1.4 Thrombozytenparameter .....	38
5.4.2 Analyse der Immunzellen der Milz.....	38
5.4.2.1 Gesamtzellzahl der Milz .....	38
5.4.2.2 Zellzahlen der Immunzellpopulationen in der Milz .....	39
5.4.2.3 Anteile der Immunzellpopulationen in der Milz .....	40
5.4.2.4 Veränderungen der T-Lymphozytensubpopulationen .....	43
5.4.2.5 T-Lymphozytenaktivierungsmarker CD69 .....	46
5.4.3 Beurteilung der Aktivität der Natürlichen Killer-Zellen anhand von CD107a und der Interferon- $\gamma$ -Produktion.....	47
5.4.3.1 Anteile der NK-Zellen an der Gesamtzahl der vitalen Zellen .....	48
5.4.3.2 Bestimmung der GMFI von Interferon- $\gamma$ .....	50
5.4.3.3 Bestimmung von CD107a auf den NK-Zellen.....	50
5.5 Veränderungen in der Zytokinantwort verschiedener Kompartimente.....	51
5.5.1 Zytokinkonzentrationen im Blut.....	52
5.5.1.1 Zytokine im Serum .....	52
5.5.1.2 Zytokinkonzentration im Vollblut nach Stimulation .....	54
5.5.1.3 Zusammenschau .....	56
5.5.2 Zytokinkonzentration im Splenozytenüberstand ohne und nach Stimulation mit LPS.....	57
5.5.2.1 Zytokinkonzentrationen im unbehandelten Splenozytenüberstand.....	57
5.5.2.2 Zytokinkonzentrationen im Überstand von mit LPS-stimulierten Splenozyten.....	59
5.5.3 Zusammenfassung.....	61
5.6 Analyse des Stoffwechsels.....	62
5.6.1 Hexosen.....	62
5.6.2 Aminosäuren.....	63
5.6.3 Biogene Amine.....	64
5.6.4 Acylcarnitine.....	65
5.6.5 Glycerophospholipide.....	66

5.6.5.1 Lysophosphatidylcholine.....	66
5.6.5.2 PC-aa-Phosphatidylcholine.....	67
5.6.5.3 PC-ae-Phosphatidylcholine.....	68
5.6.6 Sphingolipide.....	69
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>71</b>
6.1 Ursachenforschung - mögliche Erklärungen für Mortalität, Gewichtsverlust und Belastungsreaktion der Tiere.....	71
6.2 Die Kombination von Tumor und SID führt zu einer starken Reaktion des Immunsystems.....	73
6.2.1 Veränderte Zusammensetzung der zellulären Komponenten des Immunsystem bei Tumor und SID.....	73
6.2.2 Operativer Stress führt zu einer Aktivierung von T-Helfer- und Zytotoxischen T-Zellen.....	76
6.2.3 Spielen die Natürlichen Killerzellen in diesem Modell tatsächlich eine untergeordnete Rolle?.....	77
6.2.4 Insgesamt verstärkte Zytokinausschüttung bei Tumor und SID messbar.....	79
6.3 Begünstigt die SID eine Anämie und Thrombozytose bei den Tumor-tragenden Tieren?.....	83
6.4 Anzeichen für einen katabolen Stoffwechsel im Mausmodell.....	84
6.5 Welche Rolle spielen einzelne Metabolite im Tumorgeschehen?.....	86
6.6 Beeinflussen Tumor und SID sogar den Metabolismus von Membranbestandteilen?.....	88
6.7 Ergänzungen und Ausblick.....	89
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>90</b>
<b>8 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>91</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>10 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>11 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>99</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>V</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>XV</b>



# 1 Einleitung

---

Tumorerkrankungen sind seit jeher von großem Interesse für Wissenschaftler aller Epochen. Eine erstmalige schriftliche Erwähnung findet sich in der aus dem 16. Jahrhundert vor Christus stammenden ägyptischen Schrift, dem so genannten Papyrus Ebers. In den folgenden Jahrhunderten beschäftigten sich zahlreiche Gelehrte wie Hippocrates oder Galen bis hin zu Rudolf Virchow in ihren Forschungen mit diesem Thema [1]. Bis heute stellen bösartige Tumoren die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. 2019 starben über 230 000 Menschen allein in Deutschland an einem malignen Prozess [2]. Da ist es naheliegend, dass sich ein großer Teil der medizinischen Forschung mit der biologischen Entstehung, Prävention, Früherkennung und Therapie von Karzinomen beschäftigt. Gibt man auf der medizinischen Datenbank PubMed den Suchbegriff „Cancer“ ein, finden sich weit mehr als 4 Millionen Publikationen (Stand Oktober 2021) [3]. In nahezu jedem Organ des menschlichen Körpers können Zellen entarten und Karzinome entstehen.

## 1.1 Pankreaskarzinom

---

In diesem Zusammenhang zählt das Pankreaskarzinom zu den zehn häufigsten Krebsformen in Deutschland (Rangfolge nach Häufigkeit: Männer 10. Stelle, Frauen 6. Stelle). Es rückt sogar bei beiden Geschlechtern an die 4. Stelle auf, wenn man die Tumorlokalisation der an einem Karzinom Verstorbenen betrachtet. Im Jahr 2016 lag die Inzidenz in Deutschland bei etwa 18.400 Fällen. Fünf Jahre nach Diagnosestellung leben durchschnittlich nur noch 9 % der Patient\*innen [4]. Ein Grund für die hohe Sterblichkeitsrate liegt sicherlich auch im späten Erkennen eines Pankreaskarzinoms und der damit spät eingeleiteten Therapie begründet [5]. Symptomatisch werden häufig nur fortgeschrittene Befunde, beispielweise durch einen schmerzlosen Ikterus oder eine plötzlich auftretende akute Pankreatitis unklarer Ätiologie, meist durch größere und die entsprechenden Ausführungsgänge verlegende Tumoren bedingt. Retrospektiv können häufig unspezifische Symptome, wie ein Gewichtsverlust festgestellt werden [6].

Die einzige potentiell kurative Therapieform stellt heute die chirurgische Resektion dar, sofern der Tumor bei Erstdiagnose noch resektabel ist. Je nach Lage des Tumors im Pankreas (Pankreaskopf vs. Pankreasschwanz) wird eine partielle Duodenopankreatektomie mit oder ohne Erhalt des Magenspylorus von einer Pankreaslinksresektion unterschieden. Um das Langzeitüberleben der Patienten zu verbessern, kann die chirurgische Resektion mit einer adjuvanten bzw. additiven Chemotherapie kombiniert werden. Jedoch ist nur noch bei 15 – 20 % der Patienten der Tumor am Zeitpunkt der Erstdiagnose noch resektabel. Beim lokal fortgeschrittenen oder metastasierten

Pankreaskarzinom besteht nur noch die Möglichkeit zur Durchführung einer palliativen Chemotherapie [7]. All dies macht deutlich, dass es gerade bei dieser Tumorentität noch viel Potenzial zur Verbesserung von Früherkennung und Therapie durch gezielte Forschung gibt.

## **1.2 Tumormodell**

---

Zur weiteren Untersuchung des Pankreaskarzinoms wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Tumormodell in der immunkompetenten Maus entwickelt und etabliert. Hierbei wird eine spezielle Zellreihe (6606PDA) aus einem Adenokarzinom des Pankreas aus C57BL6/N-Mäusen verwendet. Nach entsprechender Vorbereitung der Tumorzellen in der Zellkultur werden sie über eine Mikrokaliberspritze orthotop in den Pankreaskopf der Maus injiziert. Es handelte sich somit um ein syngenes Zelltransplantat (siehe Abschnitt 4.1.7) [8].

## **1.3 Die Rolle des Immunsystems in der Tumorabwehr**

---

Das Immunsystem dient der Abwehr von Pathogenen wie Viren und Bakterien sowie dem Erkennen und Vernichten von geschädigten oder entarteten Zellen. Während der Zellteilung und der DNA-Replikation entstehen immer wieder Fehler (Mutationen). In der Regel werden diese durch spezielle Zellzyklusproteine erkannt und ein Reparaturmechanismus oder der Zelltod eingeleitet. So wird verhindert, dass sich veränderte Zellen unkontrolliert vermehren und Karzinome entstehen. Weitere Mechanismen des Immunsystems, die das Wachstum und die Entwicklung entarteter Zellen eindämmen, beziehen sich auf unterschiedliche Leukozytenpopulationen, Botenstoffe und Proteine (z.B. zur Antigenpräsentation) [9]. Das Zusammenwirken der einzelnen Bestandteile des Immunsystems insbesondere in der Tumorabwehr ist äußerst komplex und soll daher in den folgenden Abschnitten kurz dargestellt werden.

### **1.3.1 Überblick über den Aufbau und die Funktionsweise des Immunsystems**

---

Das Immunsystem funktioniert als ein Netzwerk aus Organen, wie dem Knochenmark, der Milz und Lymphknoten sowie Zellen und Molekülen im Blut. Es gibt verschiedene Einteilungsmöglichkeiten. Zum einen kann die humorale Abwehr (u.a. Antikörper und Komplementsystem) von der zellulären Abwehr (Leukozytenpopulationen) unterschieden werden, zum anderen kann in das angeborene/unspezifische und das erworbene/spezifische Immunsystem eingeteilt werden. Die natürliche Immunantwort stützt sich auf das Zusammenwirken von angeborenem und erworbenem Immunsystem. Bestandteile des unspezifischen Immunsystems können schnell auf eingedrungene Pathogene reagieren. An dieser direkten Abwehrreaktion beteiligte Zellen sind beispielweise Granulozyten, Monozyten oder Natürliche Killerzellen. Das spezifische Immunsystem arbeitet antigenabhängig. Zunächst müssen antigenpräsentierende Zellen Antigene aufnehmen, um diese

dann u.a. den T-Zellen zu präsentieren. T-Zellen proliferieren daraufhin und differenzieren unter Zytokineinfluss zu T-Effektorzellen. Die B-Zellen dienen unter anderem der Antigenpräsentation und nach Umwandlung zu Plasmazellen der Antikörperproduktion. Ein weiterer Baustein des adaptiven Immunsystems ist die Ausbildung von B- und T-Gedächtniszellen, die bei erneuter Infektion schnell und spezifisch reagieren können [10, 11].

### **1.3.2 Leukozyten in der Tumorimmunologie**

---

Alle Zellen des Blutes und somit auch die Immunzellen können auf eine gemeinsame Stammzelle zurückgeführt werden. Die Bildung findet beim Erwachsenen im Knochenmark statt. Die meisten Immunzellen können noch anhand ihrer Funktion oder ihrer Morphologie unterteilt werden.

Bei den **Granulozyten** können Neutrophile, Basophile und Eosinophile unterschieden werden. Als Teil des angeborenen Immunsystems spielen sie eine große Rolle in der frühen Initiierung einer Entzündungsreaktion. Über das Auslösen einer Vasodilatation ermöglichen sie anderen Immunzellen das schnellere Vordringen in das betroffene Gewebe. Neutrophile Granulozyten verfügen außerdem über die Fähigkeit zur Phagozytose und somit zur Zerstörung von Pathogenen [11]. Ihre Rolle in der Tumorimmunologie ist nicht endgültig geklärt, es werden sowohl Pro- als auch Anti-Tumor-Effekte beschrieben [12]. So konnten Effekte wie eine verstärkte Tumorangiogenese ebenso wie eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen gezeigt werden [12, 13].

**Monozyten/Makrophagen** und **Dendritische Zellen** können Pathogene ebenfalls phagozytieren, unschädlich machen und Teile der aufgenommenen Partikel auf ihrer Oberfläche anderen Immunzellen (darunter T-Lymphozyten) präsentieren. Die Präsentation der aufgenommenen Antigene funktioniert über den MHC-II-Rezeptor (Major histocompatibility complex). Sie stellen damit ein Verbindungsstück zum spezifischen (adaptiven) Immunsystem dar [11].

Zahlreiche Untersuchungen lassen darauf schließen, dass Tumor-assoziierte Makrophagen eher zu einem Progress in soliden Tumoren führen. So scheint es eine Korrelation zwischen der Anzahl an Makrophagen und dem Ausmaß der Neovaskularisation, der Invasivität oder dem schlechten Ansprechen auf Therapien zu geben. Beispielweise können sie die Ausschüttung von Zytokinen hemmen, die NK-Zellen stimulieren (IL-12) oder immunsuppressive Pfade aktivieren [14].

**T-Lymphozyten** können in Abhängigkeit von ihren Oberflächenrezeptoren (CD4 und CD8) in Zytotoxische T-Zellen (CD8-positiv) und T-Helfer-Zellen (CD4-positiv) unterschieden werden. T-Helfer-Zellen kommt eine Rolle in der Regulierung der Immunantwort über die Beeinflussung der Zytokinantwort sowie der Rekrutierung anderer Immunzellen wie Makrophagen, Zytotoxische T-Zellen und B-Lymphozyten zu. Die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten lassen sich noch in weitere Unterformen

unterteilen. Zu ihnen zählen unter anderem die Th1-, Th2-, Th17- und T<sub>reg</sub>-Zellen (regulatorische T-Zellen). Welcher Subtyp zur Ausprägung kommt, ist abhängig von verschiedenen Stimulationsmechanismen, wie beispielsweise dem jeweiligen Zytokineinfluss. Die einzelnen Subtypen übernehmen im Gefüge der Immunantwort unterschiedliche Aufgaben. Die T<sub>reg</sub>-Zellen beispielsweise sind maßgeblich an der Regulierung der Immunantwort (Unterdrücken überschießender Reaktionen), der immunologischen Selbsttoleranz sowie der Prävention von Autoimmunerkrankungen oder Allergien beteiligt [15]. Im Rahmen von malignen Prozessen supprimieren die Treg häufig die tumorabwehrenden Mechanismen der anderen Immunzellen. Ihre Unterdrückung ist daher Ziel zahlreicher Ansätze in der Immuntherapie von Karzinomen [16]. CD-8-positive T-Zellen spielen durch ihre zytotoxischen Eigenschaften eine wichtige Rolle in der Zerstörung neoplastischer Zellen und sind Mittelpunkt zahlreicher Studien zur Immuntherapie verschiedener Tumoren [17]. Um ihrer Funktion nachzukommen, müssen T-Lymphozyten in der Regel über verschiedene Signale aktiviert werden (u.a. TCR, MHC-I-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen) [11].

**Natürliche Killerzellen** können zu den T-Lymphozyten gezählt werden. Ähnlich wie die Zytotoxischen T-Zellen können sie den Zelltod herbeiführen. Natürliche Killerzellen benötigen dabei aber nicht zwingend das Vorhandensein des Oberflächenrezeptors MHC-I. Tumorzellen exprimieren häufig weniger oder keine MHC-I-Moleküle, um anderen Immunzellen wie den Zytotoxischen T-Zellen zu entgehen. Natürliche Killerzellen können über ihre Rezeptoren andere tumorzellspezifische Moleküle erkennen oder bereits die Abwesenheit der MHC-I-Proteine registrieren. Die Differenzierung und Aktivierung von Natürlichen Killerzellen wird vor allem über die Zytokine IL-2 und IL-15 stimuliert. Sie selbst schütten zahlreiche Zytokine aus, darunter vor allem Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) [11, 18].

**B-Lymphozyten** müssen zunächst über die Präsenz des passenden Antigens aktiviert werden. Daraufhin können sie sich in Plasmazellen differenzieren und mit der Produktion von Antikörpern beginnen. Diese Antikörper können dann an das Zielprotein des Pathogens binden und die Neutralisation einleiten [11]. In der Tumormunologie sind unter anderem die regulatorischen B-Zellen von Relevanz. Sie können beispielsweise die T-Zell-Differenzierung oder die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine hemmen. Für B-Zellen insgesamt sind sowohl Tumorstützende als auch -hemmende Mechanismen oder Szenarien beschrieben worden [19].

### 1.3.3 Rolle der Zytokine

---

Zur effektiven Pathogenabwehr ist ein Kommunikationssystem zwischen den Zellen elementar. Diese Aufgabe übernehmen unter anderem die Zytokine. Zu ihnen wird ein breites Spektrum unterschiedlicher Peptide, Proteine und Glykoproteine gezählt. Die größte Gruppe sind die Interleukine. Produktionsort und Ziel variieren dabei je nach Zytokin. Ihnen werden unterschiedliche Eigenschaften, wie z.B. proinflammatorisch oder antiinflammatorisch zugeordnet. Einige wirken hemmend, andere aktivierend auf die Differenzierung bestimmter Zellpopulationen. Die Bildung von TNF- $\alpha$  beispielsweise erfolgt von allem durch T-Zellen und spielt in der Hemmung der Tumorgenese eine wichtige Rolle [11]. Die Rolle von Zytokinen in der Tumorimmunologie ist äußerst komplex. Einige Zytokine schaffen eine proinflammatorische Umgebung und unterstützen so das Tumorwachstum. Andere können wiederum durch die Tumorzellen selbst sezerniert werden und sorgen für ein Mikromilieu, das ebenfalls das Tumorwachstum stützt, indem es beispielweise Effektorzellen wie Zytotoxische T-Zellen oder NK-Zellen hemmt. Eine tumorfeindliche Umgebung hingegen schaffen vor allem die Interferone [20].

### 1.4 Postoperative Immundysfunktion

---

Das Immunsystem unterliegt zahlreichen inneren Regulationsmechanismen und äußeren Einflüssen. So wird es nicht nur durch Pathogene und den für sie typischen Molekülen, den so genannten PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*) aktiviert [21], sondern auch durch größere Traumata, wie beispielsweise ein Schädel-Hirn-Trauma oder ein signifikanter Blutverlust (hämorrhagischer Schock) [22, 23]. Auch (größere) Operationen können das Immunsystem beeinflussen [24]. Traumata und Operationen führen durch die Zerstörung von Gewebe und Zellen zur Freisetzung sogenannter DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*). DAMPs werden passiv aus nekrotischen Zellen freigesetzt oder aber aktiv von Zellen des Immunsystems sezerniert. DAMPs wie auch PAMPs binden an so genannte *Pattern Recognition Receptors* (PRR), speziellen ‚Mustererkennungsrezeptoren‘ auf Zellen des angeborenen Immunsystems und lösen so über eine Signalkaskade und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren unter anderem die Produktion von Zytokinen aus [24]. Nach großen chirurgischen Eingriffen kann eine mitunter ausgeprägte Reaktion des Immunsystems beobachtet werden. Man kann dabei zwei sich überlappende Phasen voneinander unterscheiden. Zunächst kommt es nach auslösendem Trauma zu einer pro- bzw. hyperinflammatorischen Immunantwort. Diese erste Phase wird in der Literatur auch als SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrom*) bezeichnet. Es kann dabei zu einer exzessiven Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oder IL-6 kommen. Außerdem kann eine Dysfunktion der angeborenen zellulären

Immunität beobachtet werden. Neutrophile Granulozyten können beispielsweise fälschlich aktiviert werden und über die Freisetzung von proteolytischen Enzymen oder Reaktiven Sauerstoffspezies Gewebe- und Organschäden herbeiführen. In der zweiten Phase, dem *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* (CARS) dominieren die anti-inflammatorischen Zytokine, wie IL-10 oder IL-4 und können so wichtige Funktionen der angeborenen Immunität unterdrücken. In beiden Phasen kann es unter anderem durch die beschriebenen Mechanismen zu einer Organdysfunktion kommen, auch beschrieben als MODS (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*). So werden postoperative Komplikationen, wie Wundinfektionen, Pneumonien, Abszesse bis hin zur Sepsis mit den beschriebenen Mechanismen in Verbindung gebracht, sei es entweder durch eine direkte Gewebeschädigung oder durch Unterdrückung einer Immunantwort auf eingedrungene Pathogene [24, 25].

#### **1.4.1 Das SID-Modell**

---

Kommt es nach einem chirurgischen Eingriff zu einer Dysfunktion des Immunsystems, ist dies mit einer höheren Mortalitätsrate bei Auftreten von septischen Komplikationen assoziiert [26]. Unsere Arbeitsgruppe konnte ein Tiermodell, die *Surgically Induced Immune Dysfunction* (SID) entwickeln, welches gut reproduzierbar auf ein chirurgisches Trauma eine vergleichbare wie oben beschriebene Immunreaktion zeigt. Narkotisierte C57BL/6-Mäuse werden laparotomiert und der Dünndarm drei Mal in Folge zwischen zwei Wattestäbchen ausgestrichen [27]. Diese Operationsmethode stellt eine Weiterentwicklung des *Intestinal Manipulation Model* der Arbeitsgruppe um Professor Kalff dar [28]. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die SID zu einer signifikant höheren Ausschüttung von HMGB1 führt, als es in den Vergleichsgruppen der Fall ist. HMGB1 ist eines von vielen DAMPs-Molekülen, die von *Pattern Recognition Receptors* (PRR) erkannt werden und das Immunsystem aktivieren. Ebenso konnte sechs Stunden nach SID ein signifikanter Anstieg des proinflammatorischen Zytokins IL-6 beobachtet werden [27].

#### **1.5 Behandlung Tumor-tragender Mäuse mit der SID**

---

Eine erstmalige Kombination der Tiermodelle zur Erforschung des Pankreaskarzinoms und der postoperativen Immundysfunktion konnte bereits relevante Ergebnisse liefern. So zeigte sich eine signifikant erhöhte Mortalität bei den Tumor-tragenden Tieren, die zusätzlich einem operativem Trauma und der damit verbundenen Immunalteration ausgesetzt waren im Vergleich zu alleinig Tumor-tragenden Tieren oder Tumor-tragenden und laparotomierten Tieren [29].

## 1.6 Tumormetabolismus

---

Hanahan und Weinberg definierten im Jahr 2000 sechs biologische Fähigkeiten, die charakteristisch für die Entwicklung von Tumoren seien. Dazu zählen unter anderem die Fähigkeiten von Tumorzellen sich dem programmierten Zelltod oder Wachstum hemmenden Faktoren zu entziehen [30]. Im Jahr 2011 erweiterten sie diese Aufzählung um weitere Eckpunkte. Einer dieser befasst sich mit den Tumor-induzierten Veränderungen im Energiestoffwechsel des Organismus [31]. Ein sehr bekannter Mechanismus wurde bereits in den 1920er Jahren von Otto Warburg beschrieben. Es wurde beobachtet, dass Karzinomzellen einen veränderten Glucosestoffwechsel aufweisen und die Zellen trotz ausreichend vorhandenem Sauerstoff vermehrt Glykolyse mit erhöhter Laktatausscheidung betreiben. Durch diese weniger effektive Energiegewinnung steigt der Energiebedarf von Tumoren bzw. des Organismus stark an [32, 33]. Auch für weitere Substanzklassen wurden bereits Veränderungen in ihren Stoffwechselwegen beschrieben. So konnte beispielsweise für Glutamin (Aminosäure) eine vermehrte Aufnahme in die Zelle sowie eine erhöhte Umwandlung in Glutamat beobachtet werden. Glutamin gilt als wichtiger Baustein für Gewebe mit einer hohen Proliferationsrate. Im Serum war dann eine erhöhte Glutamatkonzentration messbar [34]. In einigen Studien konnte eine T-Zell-modulierende Wirkung von Glutamat gezeigt werden [35]. Eine Beeinflussung des Metabolismus durch Tumorzellen konnte für viele weitere Stoffwechselwege aufgezeigt werden (z.B. Metabolismus von Arginin, Adenosin oder Tryptophan). So legen zahlreiche Studien einen Zusammenhang zwischen Metabolismus, Tumorprogress und eine Beeinflussung des Immunsystems nahe [36]. Dieser Zusammenhang bietet zahlreiche interessante Anknüpfungspunkte für die Forschung zur Karzinomentstehung und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien.

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

---

Für die körpereigene Bekämpfung eines Tumors ist ein gut ausbalanciertes Immunsystem essentiell. Ebenso sind möglichst genaue Kenntnisse über die Vorgänge im Organismus, sei es der Metabolismus, das Immunsystem oder Kenntnisse über die gegenseitige Beeinflussung dieser Systeme für das Verständnis von Tumorerkrankungen und die Entwicklung geeigneter Therapien von hoher Relevanz.

Der Fokus dieser Arbeit lag nicht auf dem Einfluss einer Tumor-resezierenden Operation, sondern auf den Veränderungen, die eine Operation im Allgemeinen in einem tumorbeeinflussten Organismus auslöst. Denn durch ein chirurgisch induziertes Gewebetrauma kann es zu einer Aktivierung oder auch Dysregulation des Immunsystems kommen und die Balance empfindlich gestört werden. Dies kann schwerwiegende Komplikationen, wie Wundinfektionen oder die Entwicklung einer Sepsis begünstigen und das Outcome des Patienten/der Patientin verschlechtern.

Diese Problematik - den Einfluss einer dysregulierten Immunantwort auf den Verlauf des Pankreaskarzinoms - sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit genauer untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden beide beschriebenen Tiermodelle kombiniert.

Dabei sollten folgende grundlegende Fragen beantwortet werden: Welchen Einfluss hat der Tumor, das operative Trauma bzw. die Kombination beider auf die Kompartimente des Immunsystems? Kann eine veränderte Aktivierung wichtiger an der Tumorabwehr beteiligter Zellreihen wie den T-Lymphozyten oder den Natürlichen Killerzellen beobachtet werden? Inwiefern verändert sich der Zytokinhaushalt im tumorbeeinflussten Organismus? Welchen Einfluss hat der Tumor, das operative Trauma oder die Kombination beider auf den Metabolismus wichtiger Stoffgruppen der Mäuse?

Ziel dieser Arbeit war dabei einen Beitrag zum Verständnis der komplexen Zusammenhänge von Tumor und Immunsystem zu liefern und Grundlagen für Erforschung weiterer Therapieansätze zu schaffen.



## 3 Material

---

### 3.1 Laborgeräte

---

Absaugsystem Vacusip	Integra Bioscience GmbH, Biebertal
Analysenwaage BP 110 S	Sartorius AG, Göttingen
CO <sub>2</sub> -Inkubator CB 150	Binder GmbH, Tuttlingen
Chirurgisches Operationsbesteck: Schere, Pinzette, Nadelhalter	Aesculap, Tuttlingen
Digitalwaage PT1200	Sartorius AG, Göttingen
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson, Franklin Lakes und New Jersey, USA
Eismaschine Manitowoc	Foodservice, New Port Richey (USA)
Infrarotlichtlampe LPB 300	interHeat, Seongnam (Korea)
Kamera Canon Ixus 10x	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Kryotom Kryostat CM3050 S	Leica, Wetzlar
Mikroskop Leica DFC 480 DM IL	Leica, Wetzlar
Mikroskop Kyence Bioevo BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Pipetten	
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rüttler S 410	VEB MLW Prüfgeräte, Medingen/Freital
Sterilwerkbank	
Herasafe KSP	Thermo Scientific, Langenselbold
Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mausinkubator Scantainer	Scanbur-BK, Karlslunde(Dänemark)
VetScan HM5™	Abraxis, Union City, USA
Vortex Mixer Merck Eurolab	VWR International GmbH, Darmstadt
Wärmeunterlage Thermolux	Witte + Sutor, Murrhardt
Zentrifugen	
Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Function Line Labofuge 400R	Heraeus Instruments, Osterode

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

24 Well Cell Culture Plate	Cellstar®, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
96 Well Cell Culture Plate, U-bottom	Cellstar®, Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
BD 1 ml Spritze Luer-Lok™ Tip	BD, Franklin Lakes, USA
BD 1 ml Spritze Plastipak	BD, Franklin Lakes, USA
BD TruCOUNT™ Tubes (14164)	BD, Heidelberg
EDTA-Röhrchen (1,6 mg EDTA/ml Blut)	Sarstedt, Nümbrecht
Einbettkassetten	R. Langenbrinck, Labor- und Medizintechnik, Emmendingen
Einmalspritze Inject (5 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen Polystyrol	Corning Science, Reynosa, Mexiko
Falcon Röhrchen (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Röhrchen (50 ml)	BD, Heidelberg
Heparin-Röhrchen (25 I.E./ml Blut)	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen 25G, 27G Microlance™ 3	BD, Heidelberg
Kapillaren End-to-End 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Kompressen (5 x 5 cm)	Fuhrmann, Much
Leukoplast	BSN medical GmbH, Hamburg
Nahtmaterial	
Polyester weiß 4/0	Catgut GmbH, Markneukirchen
Coated Vicryl™ 5/0	Ethicon Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Neubauer-Zählkammer C-Chip DHC-N01	NanoEnTek, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pasteurpipetten 150 mm	VWR International GmbH, Darmstadt
Petrischalen	
100 x 20 mm	Sarstedt, Nümbrecht
35 x 10 mm	Falcon, BD, Franklin Lakes, USA
Pipettenspitzen epT.I.P.S.®	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	
0,5 - 5 ml	Eppendorf, Hamburg
1,5 ml, schwarz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Skalpell (10er)	Feather, Osaka, Japan

Tierfutter (M-Z Extrudat V1126)	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Tissue-Tek Cryomold Einbettgeschälchen	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen
Wattestäbchen, steril	Meditrade, London, UK
Wägeschalen, Einmalgebrauch	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellkulturflaschen, belüftet, Schräghals, 75 cm <sup>2</sup>	Corning, Corning, USA
Zellsieb Falcon (70 µm)	BD, Heidelberg

### 3.3 Reagenzien und Chemikalien

A. bidest. (Milli-Q® Integral Water Purification System for Ultrapure Water)	MilliQ, Merck Millipore, Darmstadt
BD CompBeads™	Becton Dickinson, New Jersey, USA
BD FACS Flow™ Sheath Fluid	Becton Dickinson, San Jose, USA
BD FACS™ Clean Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
BD FACS™ Rinse Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Brefeldin A Solution (1000x)	BioLegend, San Diego, USA
Distilled Water	Gibco by life technologies, USA
Ethanol 70 %, MEK-vergällt	Universitätsapotheke, Greifswald
FCS	Biochrom GmbH, Berlin
Formalin 4,5%	Universitätsapotheke, Greifswald
IL-12	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
IL-18 (Lot: 108)	MBL by life technologies, Frederick, USA
IL-2	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
LPS E.coli 055:B5	Sigma Aldrich/Merck, Darmstadt
Matrigel® Matrix	BD Bioscience, Erembodegem, Belgien
Natriumchlorid-Lösung (0,9 %)	B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen
PBS (DPBS) w/o Calcium w/o Magnesium	PAN™ Biotech, Aidenbach
RBC Lyse-Puffer (10x)	BioLegend, San Diego, USA
100 mg/ml (Tramadolhydrochlorid)	Tramal® Tropfen, Grünenthal GmbH, Aachen

Trypan Blue 0,4 % Solution	Lonza, Bio Withaker
Trypsin-EDTA	Gibco by life technologies, USA

### 3.4 Puffer, Medien und Lösungen

#### Erythrozytenlyse

1 ml RBC Lysis Buffer (10x)	BioLegend, San Diego, USA
9 ml A. dest.	Gibco by life technologies, USA

#### Injektionsnarkose

0,5 ml Xylazinhydrochlorid	Xylasel, Selectavet, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling
1 ml Ketaminhydrochlorid	Ketamin 10 %, Selectavet, Dr. Otto Fischer GmbH, Weyarn-Holzolling
8,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung	B. Braun Melsungen GmbH, Melsungen

#### FACS-Puffer

A.bidest.	MilliQ, Merck Millipore, Darmstadt
10 % PBS w/o Ca, Mg (10x)	PAN™ Biotech, Aidenbach
1 % EDTA-Dinatriumsalz (0,2 mol/l)	Neolab, Heidelberg
2 % FCS	Biochrom GmbH, Berlin

#### Medium (PDA 6606-Zellkultur)

DMEM + GlutaMAX™	Gibco by life technologies, USA
10 % FCS	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin/Streptomycin	Pen Strep, Gibco by life technologies, USA

#### Medium (Splenozytenstimulation mit LPS)

RPMI 1640 + GlutaMAX™	Gibco by life technologies, USA
10 % FCS	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin/Streptomycin	Pen Strep, Gibco by life technologies, USA
0,1 % 2-Mercaptoethanol	Gibco by life technologies, USA

#### Medium (Vollblutstimulation mit LPS)

RPMI 1640 + GlutaMAX™	Gibco by life technologies, USA
10 % FCS	Biochrom GmbH, Berlin
50 µg/ml Penicillin/Streptomycin	Pen Strep, Gibco by life technologies, USA
0,05 mM 2-Mercaptoethanol	Gibco by life technologies, Pailey, UK

#### Medium (Übernachtstimulation der Splenozyten mit LPS/Zytokinen)

RPMI 1640 + GlutaMAX™	Gibco by life technologies, USA
10 % FCS	Biochrom GmbH, Berlin
1 % Penicillin/Streptomycin	Pen Strep, Gibco by life technologies, USA

#### Transportmedium für die Milzen

PBS w/o Ca, Mg	PAN™ Biotech, Aidenbach
----------------	-------------------------

10 % FCS

Biochrom GmbH, Berlin

### 3.5 Kits

Kit	Charge	Hersteller
BD™ CBA Mouse IFN-γ FlexSet	6281562	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-1β FlexSet	6291571	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-2 FlexSet	6211731	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-4 FlexSet	6229836	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-6 FlexSet	6333835	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-10 FlexSet	6465900	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-12p70 FlexSet	6172543	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-13 FlexSet	6232540	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse IL-21 FlexSet	7009524/7111537	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse MCP-1 FlexSet	6281937	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse TNF FlexSet	6354856	BD, San Diego, USA
BD™ CBA Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit	6336557	BD, San Diego, USA
Foxp3 Staining Puffer Set	4320252	eBioscience, San Diego, USA
AbsoluteIDQ®p180 Kit		BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck

### 3.6 Antikörper

Spezifität - Konjugat	Host	Isotyp	Klon	Hersteller (Charge)	Konzentration	Verdünnung
7-AAD	-	-	-	BioLegend (B135413)	50 µl/ml	1:10
CD107a-APC	mouse	Rat IgG2a, K	1D4B	BioLegend (B188604)	0,2 mg/ml	1:200
CD11b-BV650	mouse	Rat IgG2a, K	M1/70	BioLegend (B215475)	60 mg/ml	1:500
CD19-V450	mouse	Rat IgG2a, K	1D3	BD	0,2 mg/ml	1:1000
CD19-V450	mouse	Rat IgG 2a, K	1D3	BD Pharm. (6112902, 6238592)	0,2 mg/ml	1:200
CD3e-V500	mouse	Syrian hamster IgG2	500A2	BD Horizon™ (6056938)	0,2 mg/ml	1:80

CD3-FITC	mouse	Armenian hamster IgG	145-2c11	eBioscience (898277D)	0,5 mg/ml	1:100
CD45-APC/Cy7	mouse	Rat IgG2a, K	30F11	BD Biosciences (7013668)	0,2 mg/ml	1:500
CD45-PerCP	mouse	Rat IgG2b, K	30F11	BioLegend (B138276, B214531)	0,2 mg/ml	1:200
CD4-Alexa700	mouse	rat IgG2a, K	RM4-5	BioLegend (B223385)	0,5 mg/ml	1:200
CD69-FITC	mouse	armenian hamster IgG	H1.2F3	BioLegend (B139052, B205097)	0,5 mg/ml	1:50
CD8a-PE/Cy7	mouse	rat IgG2a, K	53-6.7	BioLegend (B142512, B222016)	0,2 mg/ml	1:80
Fc-Block (CD16/32)	mouse		93	BioLegend (B165985)	0,5 mg/ml	1:50
IFN $\gamma$ -BV650	mouse	Rat IgG1, K	XMG1.2	BioLegend (B226407)	50 $\mu$ g/ml	1:50
IFN $\gamma$ -Isotyp-BV650	mouse	Rat IgG1, K	RTK2071	BioLegend (B232420)	50 $\mu$ g/ml	1:50
Ly6G-Alexa647	mouse	Rat IgG2a, K	1A8	BioLegend (B204928, B24927, B171586)	0,5 mg/ml	1:200
Ly6G-PE-Cy7	mouse	Rat IgG 2a, K	1A8	BD Pharm. (6084894, 6349906)	0,2 mg/ml	1:200
NKp46-PE	mouse	Rat	29A1.4.	Miltenyi (5161109039, 5160622039)	0,03 mg/ml	1:10, 1:20
Zombie NIR <sup>TM</sup> Fixable Viability Kit				BioLegend (B219592)		1:100

### 3.7 Software

EndNote X7	Clarivate Analytics,
FACS Diva Software v6.2	BD BioSciences, San Jose, USA
FCAP Array v3.0.1	Soft Flow, Pécs, Ungarn
FlowJo v10	Tree Star Inc, Oregon, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software Inc., CA, USA
Microsoft Exel 2003, 2010, 2016, 2019	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
Microsoft Word 2003, 2010, 2016, 2019	Microsoft Cooperation, Redmond, USA
MiPAV	<a href="https://mipav.cit.nih.gov/index.php">https://mipav.cit.nih.gov/index.php</a>

## 4 Methoden

---

### 4.1 Methodik der in vivo Untersuchungen: Tierexperimentelle Vorgehensweisen

---

#### 4.1.1 Genehmigung

---

Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens gemäß Tierschutzgesetz ist vor dem Beginn aller Arbeiten durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern erteilt worden und unter dem Aktenzeichen LALLF M-V/TSD/7221.3-1-038/16 (Nachbeantragung LALLF M-V/TSD/7221.3-1-038/16-1) verzeichnet.

#### 4.1.2 Tiere

---

Für die Versuche wurden Tiere des Mausstammes C57BL/6N verwendet. Wir bezogen die Tiere von der Firma Charles River Laboratories, Sulzfeld. Die ausschließlich männlichen Tiere wiesen zu Versuchsbeginn ein Alter von ca. neun Wochen und ein Anfangsgewicht von circa 20 bis 25 g (Mittelwert) auf.

#### 4.1.3 Tierhaltung

---

Die Tiere befanden sich zunächst im Tierversuchsraum des Chirurgischen Forschungslabores der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie und wurden dann im Verlauf in die Tierhaltung des Kleintier-MRT überführt. Beide Haltungen befinden sich in der zentralen Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin im BioTechnikum (Biomedizin- und Biotechnologiezentrum) in Greifswald. Die Tierhaltung erfolgte unter konventionellen Bedingungen bei einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C, einer relativen Luftfeuchte von 50 – 60 % und einem Tag-/Nachtrhythmus von 12 Stunden. Je zwei bzw. drei Tiere wurden in offenen Polycarbonatkäfigen auf Einstreu aus Naturholzfäsern gehalten und erhielten angesäuertes Wasser und Pressfutter ad libitum. Um die Eingewöhnung der Tiere im Vorfeld zu gewährleisten, wurden die Tiere bereits im Alter von acht Wochen in ihren jeweiligen Kleingruppen eingestallt. Alle Versuche wurden unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt.

#### 4.1.4 Versuchsgruppen und Tierzahl

---

Für die vorliegende Arbeit wurden sechs Gruppen miteinander verglichen. Die Tiere dreier Versuchsgruppen erhielten zu Beginn einen Tumor und wurden anschließend in eine der drei „Operationsgruppen“ (SID, Laparotomie, keine) eingeteilt. Die Tiere der anderen drei Versuchsgruppen wurden nur nach der jeweiligen Operationsgruppe unterschieden (siehe Abbildung 1). So ergaben sich folgende Gruppen: ‚SID/Tumor‘, ‚Laparotomie/Tumor‘, ‚keine

OP/Tumor', ‚SID', ‚Laparotomie' und die native ‚Kontrolle'. Jede einzelne der Versuchsgruppen bestand zu Beginn aus 15 Tieren.

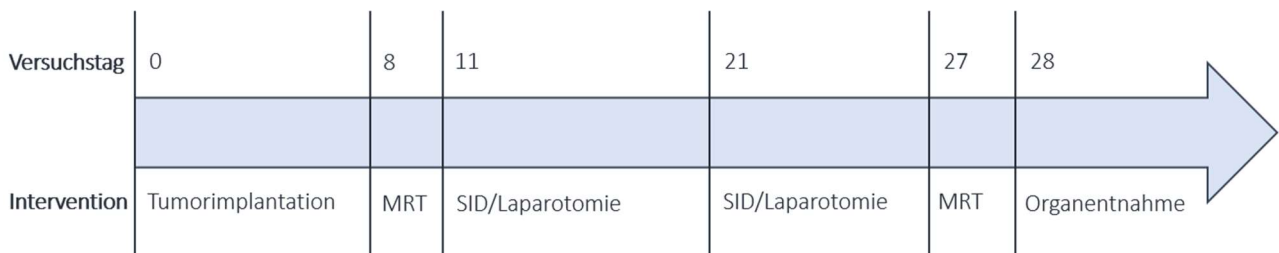
	SID	Laparotomie	Keine OP
Tumor	SID/Tumor	Laparotomie/Tumor	Keine OP/Tumor
Kein Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle

**Abbildung 1 Versuchsgruppen**

Untersucht wurden sechs Versuchsgruppen, die sich darin unterschieden, ob die Mäuse einen Tumor implantiert bekamen (Tumor/kein Tumor) und welcher Operation sie unterzogen wurde (SID, Laparotomie, keine).

**4.1.5 Versuchsaufbau**

Es wurde ein Versuchsaufbau über 28 Tage gewählt (siehe Abbildung 2). Der Versuch begann an Tag 0 mit der Tumorimplantation bei den dafür vorgesehenen Tieren. An Tag 8 und 27 wurde das Tumorstadium mittels Magnetresonanztomografie dokumentiert. An Tag 11 und 21 wurden die Tiere der jeweiligen Versuchsgruppen ihrer jeweiligen Operationsmethode unterzogen (Laparotomie oder SID). An Tag 28 erfolgte die Blutabnahme und die Organexplantation.



**Abbildung 2 Versuchsaufbau**

Der Versuch erstreckte sich über 28 Tage. Versuchsbeginn an Tag 0: Tumorimplantation. Tag 8 und 27: magnetresonanztomographische Untersuchung des Tumorstadiums. Tag 11 und 21: Operation nach SID bzw. Laparotomie. Tag 28: Organentnahme.

**4.1.6 Anästhesie**

Alle operativen Eingriffe (Tumorimplantation, Laparotomie, SID) erfolgten unter intraperitoneal applizierter Allgemeinnarkose. Verwendet wurde eine Kombination aus Ketanest® und Xylasel® (100 mg/kg Ketanest und 10 mg/kg Xylazin). Die Narkotisierung erfolgte adaptiert an das Körpergewicht der einzelnen Maus (10 µl pro g Körpergewicht).

Bei den magnetresonanztomografischen Untersuchungen wurden die Tiere initial über ein spezielles Veterinärnarkosesystem mit 1-2 % Isofluran (Narkosegas) narkotisiert. Im MRT wurde die Narkose über eine Nasenmaske (1-2 % Isofluran und hochkonzentrierter Sauerstoff) aufrechterhalten.



Die Aufwachphase der Mäuse fand zu Erhaltung der Körpertemperatur unter Rotlicht in einem kontrollierten Temperaturbereich um 37 °C statt.

#### **4.1.7 Tumorimplantation**

---

##### **4.1.7.1 Vorbereitung der Tumorzellen**

Für diesen Versuch wurden 6606-PDA-Zellen verwendet. Diese Zelllinie stammt aus einem duktalem Adenokarzinom des Pankreas von transgenen C57BL6/N-Mäusen, die Träger des Kras<sup>G12D</sup>-Allels waren. Diese Zelllinie wurde von Professor Tuveson (damals Cambridge, Vereinigtes Königreich) zur Verfügung gestellt [37].

Bis zur Überführung in die Zellkultur waren die Zellen bei -80°C kryokonserviert. Die Zellen (1 ml Zellsuspension) wurden bei 37°C aufgetaut, in 20 ml Medium (DMEM) mit 10%-igem FCS und 1%-igem Penicillin/Streptomycin aufgenommen und in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gegeben.

Die Zellsuspension inkubierte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bis die Zellkulturflaschen zu circa 80 % konfluent bewachsen waren (Dauer: 3 bis 4 Tage). Um die Zellen 1:10 zu splitten, wurde das vorhandene Medium abgesaugt, die Flaschen mit PBS gewaschen und die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert (3 min, 37°C) und abgelöst. Die so gewonnenen Zellen wurden in 20 ml Medium aufgenommen und zentrifugiert (300 g, 3 min). Das entstandene Zellpellet wurde erneut in 1 ml Medium aufgenommen. Je 100 µl dieser Zellsuspension wurde in eine mit 20 ml Medium befüllte neue Zellkulturflasche gegeben.

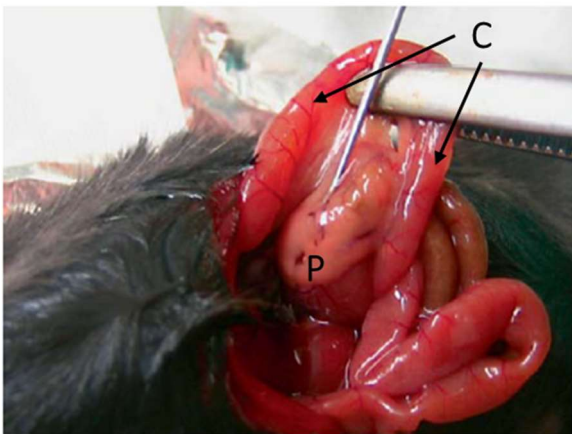
Dieser Vorgang wurde entweder ein weiteres Mal wiederholt oder die Zellen wurden für die Implantation vorbereitet. Dafür wurden die Zellen wie oben beschrieben von der Zellkulturflasche gelöst und gewaschen, um dann über eine Zellzählung  $2 \times 10^6$  Zellen pro 1 ml Medium einzustellen. Unmittelbar vor der Implantation wurden die Zellen nochmals zentrifugiert (300 g, 3 min) und  $2 \times 10^6$  Zellen in 80 µl PBS und 80 µl Matrigel aufgenommen.

##### **4.1.7.2 Implantation der Tumorzellen**

Die Tumorimplantation erfolgte direkt in das später tumortragende Pankreas (orthotop) nach dem etablierten murinen Pankreaskarzinommodell in der immunkompetenten Maus [8]. Die Implantation wurde von Dr. rer. nat. Matthias Sandler aus einer Forschungsgruppe der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A der Universitätsmedizin Greifswald übernommen.

Die Implantation fand unter i.p.-Narkose wie in 4.1.6 beschrieben statt. Auf einer Operationsunterlage wurde die Maus in Rückenlage gebracht und an den Gliedmaßen fixiert. Nach der Desinfektion mit 70 %-igem Ethanol wurde das Abdomen der Maus mittels einer queren Laparotomie eröffnet und das Duodenum und das Pankreas mit Hilfe von mit 0,9 %-iger Natrium-

Chlorid-Lösung angefeuchteten Wattestäbchen exponiert. Dann wurden mit einer Mikrokaliberspritze (27 Gauge)  $2,5 \times 10^5$  Pankreaskarzinomzellen in PBS und Matrigel in den Pankreaskopf injiziert (siehe Abbildung 3). Auf eine Blutstillung im Operationsgebiet wurde mittels Wattestäbchen geachtet. Nachdem die Organe in die Bauchhöhle zurückverlagert wurden, wurde die Bauchdecke der Maus schichtweise mit einer fortlaufenden Naht wieder verschlossen. Nach der Adaptierung des Peritoneums mit resorbierbarem 5/0 Faden, erfolgte der Verschluss der Bauchdecke mit nicht-resorbierbarem 4/0 Faden. Postoperativ erfolgte eine Analgesie (siehe Abschnitt 4.1.11).



**Abbildung 3 Injektion der 6606-PDA-Zellen in das Pankreas**

Eröffnung der Bauchdecke mittels querer Oberbauchlaparotomie. Exponieren des duodenalen C's (C). Injektion der Karzinomzellen in den Pankreaskopf (P). Es erfolgte ein zweischichtiger Bauchdeckenverschluss. [Modifiziert nach 8]

## 4.1.8 Operationsmethoden

### 4.1.8.1 Laparotomie

Nach erfolgreicher i.p.-Narkose (siehe 4.1.6.) wurden die Mäuse aus der ‚Laparotomie‘-Gruppe in Rückenlage auf einer Wärmeplatte fixiert und das Abdomen mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert. Der Zugang zur Bauchhöhle erfolgte entlang der Linea alba. Nach circa 1,5 – 2 cm großer Schnittführung blieb das Abdomen der Mäuse 10 min unberührt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden 500 µl 0,9%-iger Natrium-Chlorid-Lösung in die Bauchhöhle appliziert.

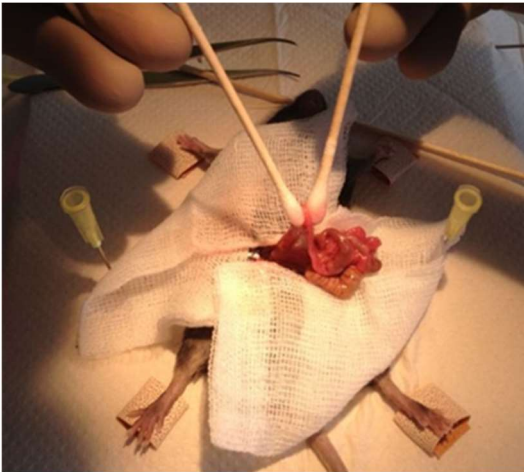
Anschließend wurde die Bauchdecke der Tiere mit einer fortlaufenden Naht zweischichtig verschlossen (Peritoneum: 5/0 Faden, resorbierbar; Hautnaht: 4/0 Faden, nicht resorbierbar.)

### 4.1.8.2 Surgically-induced Immune Dysfunction (SID)

Die Operationsmethode der SID wurde nach einer Technik der Arbeitsgruppe um Professor Kalff der Universität Bonn abgewandelt und an den Versuch angepasst [27, 28].

Narkose und Lagerung sowie das Eröffnen der Maus erfolgten analog zur Laparotomie (siehe 4.1.8.1). Nachfolgend wurde das Operationsfeld mit 0,9 %-iger Natrium-Chlorid-Lösung angefeuchteten Mullkompressen abgedeckt und der Dünndarm vorsichtig mit ebenfalls angefeuchteten Wattestäbchen (0,9 %-ige Natrium-Chlorid-Lösung) exponiert (siehe Abbildung 4). Daraufhin wurde der Dünndarm anterograd von Duodenum bis Zäkum in einer zueinander hin rollenden Bewegung

mit den Wattestäbchen ausgestrichen. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt. In regelmäßigen Abständen wurden der Darm und die Wattestäbchen neu befeuchtet. Nach dem dritten Ausstreichen wurde der Darm vorsichtig in die Bauchhöhle zurückverlagert. Auch das Substituieren von 500 µl NaCl-Lösung und das zweischichtige Vernähen erfolgten analog zur Laparotomie. Der gesamte Eingriff dauert circa 18 bis 20 Minuten.



**Abbildung 4 Operation nach der Methode der Surgically induced Immune Dysfunction**

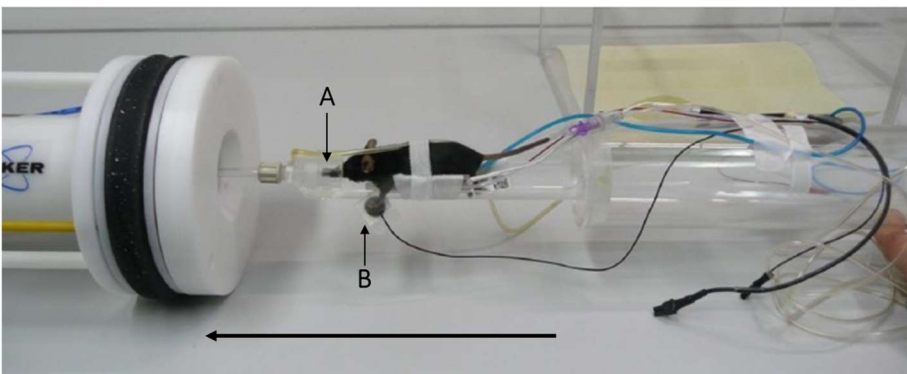
Eröffnung der Bauchdecke mittels Längslaparotomie. Exponieren des Dünndarms. Dreimaliges Durchstreichen mit angefeuchteten Wattestäbchen. Zurückverlagern des Dünndarm. Flüssigkeitssubstitution. Zweischichtiger Verschluss der Bauchdecke. (Aufnahme der Arbeitsgruppe)

#### 4.1.9 Magnetresonanztomografie

Wie in 4.1.6 beschrieben wurden die Mäuse vor der Untersuchung mittels Isofluran narkotisiert. Zum Einsatz kam ein 7 Tesla MRT für Kleintiere von Bruker. Die Mäuse wurden nach der initialen Narkose in einer speziellen Spule gelagert, die dann im Gerät positioniert werden konnte (siehe Abbildung 5). Während der gesamten Untersuchung wurde die Atemfrequenz der Mäuse über einen Sensor, welcher unter den Bauch der Maus platziert wurde, gemessen und daran orientiert die Narkosetiefe reguliert. Die Atemfrequenz wurde konstant zwischen 30 und 40 Atemzügen pro Minute gehalten, so dass in den Atempausen die Messung stattfinden konnte.

Es wurden T2-gewichtete koronare und axiale Bilder des Abdomens angefertigt.

Die Auswertung der Bilder hinsichtlich der Tumorausdehnung erfolgte mit der Software MIPAV.



**Abbildung 5: Lagerung der Maus im MRT**

Spule zur Lagerung der Mäuse in der MRT mit der Möglichkeit zur kontinuierlichen Isofluranzufuhr (A) und Sonde zur Überwachung der Herz- und Atemfrequenz (B). [Modifiziert nach 44]

#### 4.1.10 Beurteilung des Zustandes der Mäuse

Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Mäuse täglich begutachtet und das Erscheinungsbild mit Hilfe eines Score Sheets schriftlich festgehalten (siehe Tabelle 1). Beurteilt wurden folgende Parameter: Erscheinungsbild, Atmung, Spontanverhalten und provoziertes Verhalten. Jeder Parameter kann mit einem Scorewert von 0 – 3 bewertet werden. Jede Begutachtung endet mit dem Errechnen eines Summenbelastungsscores für jedes Tier und jeden Tag. Beim Erreichen eines Wertes  $\geq 7$  wurde dieses Tier aus dem Versuch genommen.

Bei der täglichen Begutachtung der Tiere wurde außerdem für jeden Versuchstag das Gewicht der Tiere bestimmt und ebenfalls tabellarisch aufgezeichnet.

Parameter	Bewertung	Punkte
Erscheinungsbild	- normal, sauber gepflegtes Fell	0
	- gestäubtes Fell	1
	- nasses Fell	2
	- schleimige Augen	3
Atmung	- normal	0
	- beschleunigt	1
	- schwer	2
	- schwach	3
Spontanverhalten	- normal, lebhaft, neugierig	0
	- verlangsamt, sitzende Haltung	1
	- träge, buckelige Haltung, schwankender Gang	2
	- Seitenlage	3
Provoziertes Verhalten	- Maus flieht bei Käfigöffnung	0
	- Maus flieht bei Annäherung der Hand	1
	- Maus flieht erst bei Berührung	2
	- Maus flieht gar nicht	3

**Tabelle 1 Score Sheet zur Beurteilung des Zustandes der Tiere**

Parameter zur Beurteilung des Zustandes der Versuchstiere. Die vergebenen Punkte werden addiert. Bei einem Wert  $\geq 7$  wurden die Tiere aus dem Versuch genommen.

#### 4.1.11 Schmerzmanagement

Um die Belastung der Mäuse durch Schmerzen so gering wie möglich zu halten, wurden die Tiere für drei Tage nach den operativen Eingriffen (Tumorimplantation, SID, Laparotomie) mit Tramadolhydrochlorid im Trinkwasser (250 mg/100 ml) behandelt. Das Ausmaß der Beeinträchtigung wurde mit Hilfe des Score Sheet ermittelt (siehe 4.1.10.)

#### 4.1.12 Organentnahme

Die Organentnahme am Tag 28 erfolgte ebenfalls nach i.p.-Narkose-Gabe und Bestätigung der tiefen Narkose durch Setzen eines Schmerzreizes, welcher unbeantwortet blieb. Nach der retrobulbären Blutabnahme wurde der Tod der Maus durch eine zervikale Dislokation herbeigeführt. Nach der

Öffnung der Bauchhöhle wurde die Milz explantiert und zum Transport auf Eis in 1 ml PBS + 10 % FCS gelagert.

## 4.2 Methodik der ex vivo Untersuchungen

---

### 4.2.1 Aufarbeitung und Analyse der Milz

---

#### 4.2.1.1 Aufarbeitung der Milz und Bestimmung der Zellzahl

Die Milz befand sich nach der Organentnahme in 1 ml PBS mit 10 % FCS auf Eis. Dies wurde dann als Ganzes über ein 70- $\mu$ l-Zellsieb gegeben und die Milz vorsichtig mit dem Stempel einer 5 ml Einmalspritze durch das Sieb gedrückt. Der Vorgang erfolgte unter Spülen mit PBS mit 10 % FCS. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen und im Anschluss bei 300 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen. Das Zellpellet wurde dann in 5 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und unter gelegentlichem Schütteln bzw. Vortexen für 5 min bei 4 °C inkubiert.

Nach Ablauf der 5 Minuten wurde die Suspension mit mindestens 20 ml PBS mit 10 % FCS gewaschen und danach wieder zentrifugiert (300 g, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet in 5 ml FACS-Puffer aufgenommen.

Die Einstellung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe von TruCOUNT™-Beads: zu 200  $\mu$ l einer Lösung aus FACS-Puffer und TruCOUNT™-Beads mit definierter Beadzahl wurden 20  $\mu$ l der Zellsuspension gegeben und am Durchflusszytometer gezählt. Aus der gemessenen Beadzahl, der gemessenen Zellzahl und der definierten Beadzahl konnte dann die Zellzahl pro Milliliter und die Gesamtzellzahl der Milz errechnet werden.

#### 4.2.1.2 Durchflusszytometrie: Übersicht über die Zellpopulationen der Milz

Prinzip der Durchflusszytometrie: Das Durchflusszytometer ist ein Messgerät mit dessen Hilfe man Zellen und andere Kleinstpartikel quantifizieren und anhand ihrer Eigenschaften, wie z.B. Größe, Form, Oberflächenstruktur, Granularität etc. unterscheiden kann. Es besteht aus einem optischen System aus Linsen, Spiegel, Filtern und Detektoren. Die Herzstücke sind Laser aus monochromatischem Licht verschiedener Wellenlänge. Die Zellen aus einer Probe werden nun in einem laminaren Strom an diesen Lasern vorbeigeführt, so dass jede Zelle einzeln charakterisiert werden kann. Die einfachste Charakterisierungsmöglichkeit der einzelnen Zelle erfolgt über Brechung des Lichtes an ihrer Oberfläche bzw. an anderen Strukturen wie z.B. dem Zellkern, Vesikeln oder anderen prominenten Zellbestandteilen. Nach vorn abgelenkte Strahlen, auch Vorwärtsstreulicht oder Forward Scatter (FSC) genannt, werden in der FSC-Diode detektiert und geben so Auskunft über

Volumen bzw. Größe der Zelle. Im 90°-Winkel abgelenkte Strahlen (Seitwärtsstreulicht/Side Scatter) zeigen hingegen die Granularität der Zelle an. Markiert man zusätzlich die Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen mit Hilfe von Antikörpern gegen Oberflächenmarker bzw. intrazelluläre Bestandteile der einzelnen Zelle, können weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Dazu zählen u.a. die Darstellung bestimmter Eigenschaften und die genaue Festlegung auf eine Zellart. Über die jeweiligen Laser werden die dazu passenden Fluoreszenzen zur Emission des Lichtes angeregt. Über verschiedene Filter wird dieses Lichtsignal nach den Wellenlängen aufgespalten und den richtigen Detektoren zugeleitet. Die erhaltenen Signale werden über eine Software verstärkt, verrechnet und abgebildet [38]. Im Rahmen dieser Studie wurde die Software Diva eingesetzt. Die Auswertung aller durchflusszytometrischen Daten erfolgen mit der Software FlowJo V10.

Färbung durch Antikörperbindung: Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, wurden  $2 \times 10^6$  Zellen für die Übersichtsfärbung in ein FACS-Röhrchen überführt und auf  $2 \times 10^6$  Zellen/ 50  $\mu$ l FACS-Puffer eingestellt.

Nun wurde 1  $\mu$ l Fc-Block (CD16/32) hinzugefügt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden 50  $\mu$ l des Master-Mix (siehe Tabelle 2) hinzugegeben. Während der 20 min andauernden Inkubation waren die Proben im Dunklen bei 4 °C aufzubewahren.

Der Master-Mix besteht aus den errechneten Antikörper-Volumen und Puffervolumen. Ziel war es zu jedem Reagenzgefäß ein Volumen von 50  $\mu$ l Master-Mix hinzuzugeben, welcher alle nötigen Antikörper enthielt. Das Gesamtvolumen ergab sich aus der Anzahl der Proben multipliziert mit 50  $\mu$ l. Das Antikörpervolumen wurde aus der notwendigen Verdünnung auf 100  $\mu$ l (Gesamtprobenvolumen) errechnet. Die Differenz zwischen Antikörpergesamt volumen und dem bestimmten Gesamtvolumen wurde mit Puffer ausgeglichen.

Nach der Inkubation mit dem Master-Mix erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml FACS-Puffer. Im Anschluss an die Zentrifugation (300 g, 5min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Vor der Messung der Proben wurden die Proben für 5 bis 10 min mit 5  $\mu$ l 7-AAD im Dunklen bei 4 °C inkubiert.

Die Messungen erfolgten am Durchflusszytometer. Es wurden 200.000 Events aufgenommen.

Antikörper	Host	Isotyp	Clone	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Menge für 100 $\mu$ l
Ly6G-Alexa647	mouse	Rat IgG2a, K	1B8	BioLegend	0,5 mg/ml	1:200	0,5 $\mu$ l
CD3e-V500	mouse	Syrian hamster IgG2	500A2	BD H.	0,2 mg/ml	1:80	1,25 $\mu$ l

CD19-V450	mouse	Rat IgG2a, K	1D3	BD	0,2 mg/ml	1:1000	0,5 µl
CD45-APC/Cy7	mouse	Rat IgG2a, K	30F11	BD	0,2 mg/ml	1:500	0,5 µl
CD4-Alexa700	mouse	rat IgG2a, K	RM4-5	BioLegend	0,5 mg/ml	1:200	0,5 µl
CD8a-PE/Cy7	mouse	rat IgG2a, K	53-6.7	BioLegend	0,2 mg/ml	1:80	1,25 µl
CD11b-BV650	mouse	Rat IgG2a, K	M1/70	BioLegend	60 mg/ml	1:500	0,5 µl
NKp46-PE	mouse	Rat	29A1.4.	Miltenyi	0,03mg/ml	1:10	10 µl
CD69-FITC	mouse	armenian hamster IgG	H1.2F3	BioLegend	0,5 mg/ml	1:50	2 µl
7-AAD	mouse	-	-	BioLegend	50 µl/ml	1:10	10 µl

**Tabelle 2 Antikörper für den Master-Mix**

#### 4.2.1.3 Splenozytenstimulation mit LPS bzw. mit IL-2, IL-12 und IL-18 und intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung

Für die **Stimulation** wurden sechs Ansätze je Maus benötigt (6 Wells in der 24-Well-Platte). Je Ansatz wurde die Zellzahl auf  $4 \times 10^6$  Zellen / 500 µl Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % PenStrep) eingestellt. Pro Maus wurden nun Zellen in 6 Wells ausgesät, jeweils mit  $4 \times 10^6$  Zellen. Verwendet wurde eine 24-Well-Flachbodenplatte.

Zwei Ansätzen (Ansatz 1 und 2) wurde nun IL-2 hinzugefügt. Die IL-2-Stocklösung wurde in 500 µl Medium eingestellt. Den Ansätzen 3 und 4 wurde 1 µl LPS und 500 µl Medium hinzugefügt. Ansatz 5 und 6 stellten die Negativkontrolle dar, ihnen wurden nur weitere 500 µl Medium hinzugegeben.

Alle Ansätze inkubierten bei 37 °C und 5 % CO $_2$  für 18 Stunden im Brutschrank. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Platten um circa 25° schräg standen, um der Verdunstung durch eine kleinere Oberfläche entgegenzuwirken.

Nach 18 Stunden wurde allen Ansätzen 1 µl Brefeldin A (1000x) hinzugefügt. Die Ansätze 1 und 2 wurden zusätzlich mit 4 µl IL-18 und 2 µl IL-12 versetzt. Danach wurden die Platten für weitere 4 Stunden bei gleichen Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf dieser 4 Stunden wurden die Zellsuspensionen für die **intrazelluläre Färbung** in FACS-Röhrchen überführt. Dabei wurden die Ansätze 1 und 2, 3 und 4 sowie 5 und 6 zunächst in einem Röhrchen zusammengeführt. Die Wells wurden dann noch einmal mit je 1 ml PBS gespült und nach gleichem Muster in das jeweilige Röhrchen überführt. Im Anschluss wurden die vorher zusammengeführten Röhrchen auf zwei aufgeteilt, so dass wieder die ursprüngliche Aufteilung auf

sechs Ansätze vorlag. Diese sechs Ansätze spiegelten drei unterschiedliche Stimulationsarten (Zytokine, LPS, Kontrolle) und je eine normale und eine Isotyp-Färbung wider.

Nach der Aufteilung wurden die Röhrchen zentrifugiert (300 g, 5 min, 4 °C) und im Anschluss zwei Mal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Nach den Zentrifugationen wurde der Überstand verworfen.

So blieb eine kleine Flüssigkeitsmenge von circa 50 µl im Röhrchen zurück, dieser wurde dann 1 µl Zombi-NIR hinzugegeben und der Inhalt der Röhrchen auf dem Vortexer vermengt. Es folgte eine 30 min andauernde Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunklen.

Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 300 g, 5 min, 4 °C) und danach mit 1 µl Fc-Block (CD16/32) bei 4 °C für 10 min inkubiert.

Dann wurden 50 µl des ersten Master-Mix (siehe Tabelle 3) hinzugegeben, um diesen 20 min bei 4 °C zu inkubieren. Der Master-Mix berechnet sich wie unter 4.2.1.2 bereits beschrieben.

Antikörper	Host	Isotyp	Clone	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Menge für 100 µl
NKp46-PE	mouse	Rat IgG 2a, K	29A1.4.	Miltenyi	0,5 mg/ml	1:20	5
CD3-FITC	mouse	Armenian hamster IgG	145-2c11	eBioscience	0,5 mg/ml	1:100	1
CD19-V450	mouse	Rat IgG 2a, K	1D3	BD Pharm.	0,2 mg/ml	1:200	0,5
CD45-PerCP	mouse	Rat IgG2b, K	30F11	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200	0,5
Ly6G-PE/Cy7	mouse	Rat IgG 2a, K	1A8	BD Pharm.	0,2 mg/ml	1:200	0,5
CD107a-APC	mouse	Rat IgG 2a, K	1D4B	BioLegend	0,2 mg/ml	1:200	0,5
Zombie				BioLegend		1:100	1

**Tabelle 3 Antikörper für Master-Mix 1**

Es folgte ein weiterer Waschschrift (2 ml FACS-Puffer; 300 g, 5 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Fixation Buffer resuspendiert und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer hinzugegeben und die Proben zentrifugiert (300 g, 6 min, 4 °C). Wieder erfolgte die Hinzugabe von Fc-Block (1 µl; 10 min Inkubation bei 4 °C). Im Anschluss wurden die Proben mit dem jeweils zweiten Antikörper-Mix versetzt (IFN $\gamma$ -Mix oder Isotyp-Mix, siehe Tabelle 4 und 5) und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es wurde ein weiteres Mal mit 2 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen.

Antikörper	Host	Isotyp	Clone	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Menge für 100 µl
NKp46-PE	mouse	Rat IgG 2a, K	29A1.4.	Miltenyi	0,5 mg/ml	1:20	5
IFN $\gamma$ -BV650	mouse	Rat IgG1, K	XMG1.2	BioLegend	50µg/ml	1:50	2

**Tabelle 4 Antikörper für den IFN $\gamma$ -Mix**



Antikörper	Host	Isotyp	Clone	Hersteller	Konzentration	Verdünnung	Menge für 100 µl
NKp46-PE	mouse	Rat IgG 2a, K	29A1.4.	Miltenyi	0,5 mg/ml	1:20	5
IFN $\gamma$ -Isotyp-BV650	mouse	Rat IgG1, K	XMG1.2	BioLegend	50µg/ml	1:50	2

Tabelle 5 Antikörper für den IFN $\gamma$ -Isotyp-Mix

Zum Schluss wurden die Zellen in 100 bis 150 µl FACS-Puffer wieder aufgenommen und anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Es wurden zwischen 50.000 und 200.000 Zellen aufgenommen.

#### 4.2.1.4 Stimulation der Splenozyten mit LPS zur Bestimmung der Zytokinproduktion

Nach der Milzaufarbeitung wurden  $7 \times 10^6$  Zellen für diese Methode in 700 µl Medium (RPMI1640, 10 % FCS, 1 % PenStrep, 0,1 % Mercapto) aufgenommen und dann je 100 µl in ein Well einer 96-Well-Platte ausgesät. So entstanden pro Maus sechs Ansätze, von diesen wurde die Hälfte mit LPS stimuliert. Zu den 100 µl der Zellsuspension wurden weitere 100 µl Medium oder Medium mit LPS versetzt hinzugegeben. Die LPS-Konzentration erreichte im Well 1 µg/ml. Dafür wurden von einer LPS-Stammlösung (1000 µg/ml PBS) 20 µl in 10 ml Medium gelöst. Die Zellsuspensionen wurden für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Platten bei 300 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Zuletzt wurden die Überstände der stimulierten Zellen bzw. der nicht stimulierten Zellen zusammengeführt und auf 50 µl aliquotiert. Bis zur Messung mit einem Cytometric Bead Array (siehe 4.2.3) wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 4.2.2 Analyse und Aufarbeitung des Blutes

#### 4.2.2.1 Blutbildbestimmung

Zur Blutbildbestimmung wurde ein dafür vorgesehenes Gerät, der VetScan HM5, verwendet. Bei der Organ- bzw. Blutentnahme wurden 40 µl EDTA-Blut gewonnen, welches über eine Kapillare in das Gerät aufgenommen und analysiert wurde.

#### 4.2.2.2 Gewinnung von Serum für die Zytokinbestimmung

Im Rahmen der Blutentnahme wurden 100 µl Vollblut in einem nicht beschichteten Gefäß aufgefangen, welches im Folgenden zur Serumgewinnung genutzt wurde. Die Proben wurden zentrifugiert und der abgenommene Überstand dann ein zweites Mal bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Zum Schluss wurden circa 40 µl für spätere Messungen mit einem Cytometric Bead Array (siehe 4.2.3) aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### 4.2.2.3 Vollblutstimulation mit LPS

Pro Maus wurden zwei Mal je 100 µl heparinisieretes Vollblut in eine 96-Well-Platte (Rundboden) gegeben. Ein Well wurde mit 25 µl RPMI mit LPS und das andere mit 25 µl RPMI ohne LPS versetzt. In

dem stimulierten Well lag insgesamt eine LPS-Konzentration von 1 µg/ml vor. Die Proben wurden über Nacht für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Platten bei 1881 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein zweites Eppendorfgefäß überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Zum Schluss wurden 30 µl des Überstands aliquotiert und bis zur Messung mit einem Cytometric Bead Array (siehe 4.2.3) bei - 80 °C gelagert.

#### **4.2.2.4 Massenspektrometrische Untersuchung von EDTA-Plasma - Metabolom**

Prinzip der Massenspektrometrie: Mit Hilfe eines Massenspektrometers lassen sich über das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis Rückschlüsse auf die untersuchte Substanz ziehen. In der Vorbereitung wird die zu untersuchende Substanz (Proteinmischung) in einen gasförmigen Zustand versetzt und aufgetrennt. Eine Ionenquelle im Massenspektrometer löst über das Aussenden von Elektronen die Bindungen in den Molekülstrukturen und ionisiert die Proben. Der ionisierte Probenstrom wird dann durch verschiedene Magnetfelder geleitet und abhängig von Masse und Ladung abgelenkt und daraufhin aufgetrennt. Ein Detektor bestimmt die Molekülmasse. So lassen sich aus Stoffgemischen einzelne Substanzen quantifizieren und identifizieren [39]. So wurden in dieser Studie einzelne Metabolite aus dem Blutplasma der Versuchstiere bestimmt.

Vorgehen: Für die Untersuchung der EDTA-Plasma-Proben wurde das AbsoluteIDQ<sup>®</sup>p180 Kit von Biocrates verwendet. Für die Messung wurde ein Probenvolumen von 10 µl eingesetzt. Mit diesem Kit können 186 verschiedene Metabolite gemessen werden. Zu den messbaren Metaboliten zählen die Substanzklassen Acylcarnitine, Aminosäuren, Sphingo- und Phospholipide, biogene Amine sowie Hexosen. Die Bearbeitung und das Messen der Proben übernahm freundlicherweise das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald. Besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Theresa Winter und Dr. rer. nat. Ann-Kristin Henning.

#### **4.2.3 Messung der Zytokinkonzentration im Serum bzw. im Überstand von stimulierten Splenozyten bzw. Blutzellen mit Hilfe eines Cytometric Bead Array**

Prinzip eines Cytometric Bead Array: Ein CBA ist ein Immunoassay, welcher mit Hilfe von Beads und Fluoreszenzfarbstoffen das Detektieren und Quantifizieren von Proteinen, wie z.B. Zytokinen in Serum, Plasma oder Zellkulturüberständen ermöglicht. Antikörper-gekoppelte Beads binden dabei an den passenden Zielanalyten. Es werden nun die Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Detektionsantikörper hinzugegeben, die wiederum am Zielanalyten binden. Diese Komplexe können dann anhand ihrer Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie identifiziert werden [40].

Aufarbeitung der Proben: Um die Zytokinkonzentration im Serum oder im Überstand der mit LPS stimulierten Splenozyten bzw. Blutzellen zu messen, wurde das Mouse CBA Flex-Kit verwendet und gemäß den Herstellerangaben eingesetzt. Mit diesem können die ausgewählten elf Zytokine (siehe Abschnitt 3.5.) gleichzeitig gemessen werden. Im Vorfeld wurde die Standardreihe nach entsprechend der Vorgaben angesetzt.

Im ersten Schritt wurden 25 µl Probenvolumen im CBA-Röhrchen mit 25 µl Capture-Bead-Mix (enthält 11 Beadpopulationen für die jeweiligen Zytokine) für 1 Stunde auf dem Schüttler bei niedrigster Stufe und bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 25 µl PE-Detection-Reagenz (PE-gekoppelte Detektionsantikörper) hinzugefügt und eine weitere Stunde bei gleichen Bedingungen inkubiert. Zum Schluss wurde mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und nach der Zentrifugation (200 g, 5 min, 4 °C) mit einer speziellen Pumpvorrichtung der Überstand abgesaugt. Jede Probe wurde dann mit 100 µl Waschpuffer aufgefüllt.

Am Durchflusszytometer wurden wie vom Hersteller empfohlen pro Zytokin 300 Beads gemessen, sodass für jede Probe insgesamt 3300 Events gemessen wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Software FCAP Array™.

### 4.3 Statistik

---

Die Daten wurden mit der Software GraphPadPrism ausgewertet. Zunächst wurden die Daten mit dem Shapiro-Wilks-Normality-Test auf Normalverteilung geprüft.

Lag eine Normalverteilung vor, wurden die Varianzen mit dem Bartlett's-Test verglichen. Fiel dieser nicht signifikant ( $p > 0,05$ ) aus, wurden die Gruppen mit einer One-way-ANOVA untersucht. Lag keine Normalverteilung vor oder ergab der Bartlett's-Test signifikante Unterschiede beim Vergleich der Varianzen, wurde der Kruskal-Wallis für die Auswertung genutzt. Wenn eine One-way-ANOVA zur Analyse eingesetzt wurde, wurden die Gruppen anschließend mit dem Tukey's post test for selected pairs (bei mehr als zwei Gruppen) verglichen.

Nicht parametrische Gruppen wurden mit dem Dunn's post test for selected pairs (bei mehr als zwei Gruppen) auf Signifikanz hin untersucht. Werte, die auffallend weit über oder unter dem Mittelwert lagen, sogenannte Ausreißer, wurden über die Methode nach ROUT ( $Q = 0,01$  bzw. 1 %) identifiziert und ausgeschlossen.

Ab einem p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde dies durch einen Asteriskus (\*) dargestellt und als signifikant betrachtet. Gruppenunterschiede mit einem p-Wert  $\leq 0,01$  werden demnach mit zwei Asterisken (\*\*) bzw. drei Asterisken (\*\*\*) bei  $p \leq 0,001$  gekennzeichnet. Die höchste Kategorie (vier Asterisken, \*\*\*\*) wird ab einem p-Wert von  $\leq 0,0001$  vergeben.

## 5 Ergebnisse

---

Ziel der Arbeit war es, die Einflüsse einer operativ induzierten Immundysfunktion auf den Verlauf des Pankreaskarzinoms genauer darzustellen. Genutzt wurden dafür das SID-Modell und das Pankreastumor-Modell, welche beide für den Mausstamm C57BL/6N etabliert wurden. Während des zuvor beschriebenen Versuchsablaufs wurden Verhalten und Zustand der Tiere genau dokumentiert und das Tumorwachstum in der MRT beobachtet. Nach Ende des Versuchs wurden insbesondere die zellulären Komponenten des Immunsystems in verschiedenen Kompartimenten (Blut, Milz) betrachtet, aber auch nach Veränderungen im Zytokinhaushalt gesucht. Inwieweit das operative Trauma oder die Tumorerkrankung zu einer veränderten Stoffwechsellage führte, wurde über die massenspektrometrische Messung verschiedener Metabolite im Serum der Versuchstiere untersucht.

### 5.1 Überlebenskinetik

---

Im ersten Schritt galt es zu eruieren, ob die postoperativen Veränderungen im Immunsystem einen Einfluss auf das Überleben der Tiere im Verlauf der Tumorerkrankung haben.

Der gesamte Versuch dauerte 28 Tage und endete mit der Tötung aller Tiere, die bis dahin überlebt hatten. Wie viele Tiere bis zu diesem Zeitpunkt verstarben bzw. aufgrund eines zu schlechten Zustandes aus dem Versuch genommen werden mussten, zeigt die Abbildung 6. In der Obduktion zeigte sich bei diesen Tieren in den meisten Fällen ein massiver Dünndarmileus.

Zur Analyse des Überlebens wurde das Kaplan-Mayer-Verfahren angewendet. Die Kurven wurden durch den Logrank-Test miteinander verglichen. Für den 28 Tage dauernden Versuch ließen sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

In allen Gruppen, in denen den Tieren zu Versuchsbeginn ein Tumor implantiert wurde, zeigte sich allerdings ein tendenziell niedrigeres Überleben. Auch die Operation nach SID alleine führte schon zu einer leicht erhöhten Mortalität. Bei allen Tieren, die nur laparotomiert wurden und bei den Kontrolltieren war das Überleben nicht reduziert.

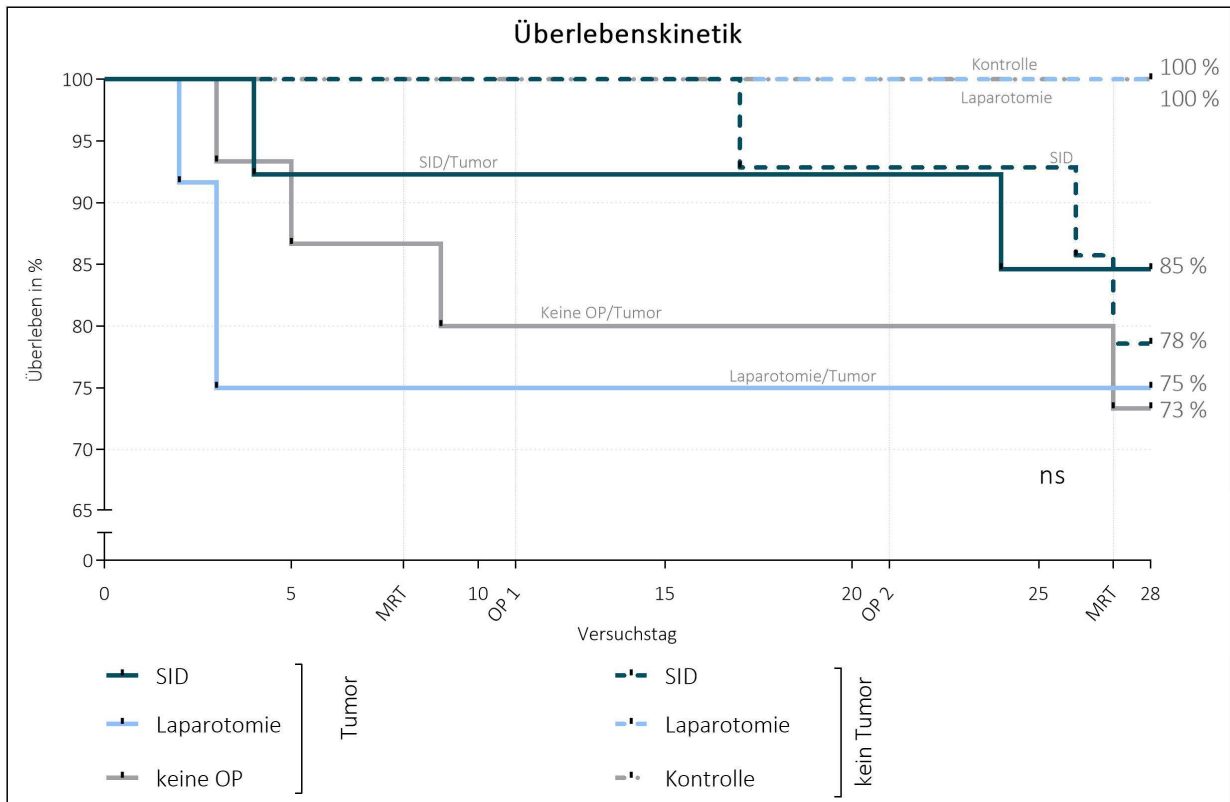


Abbildung 6 Überlebenskinetik

Es zeigte sich ein tendenziell niedrigeres Überleben in den Tumor-tragenden Gruppen sowie bei den SID-operierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen, hier überlebten 100% der Tiere.

Auswertung nach Kaplan-Meier. Vergleiche mittels Logrank-Tests. ns...nicht signifikant

$n = 13$  (SID/Tumor),  $12$  (Laparotomie/Tumor),  $15$  (keine OP/Tumor),  $15$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).

## 5.2 Zustand der Tiere

Um den Zustand der Tiere während des Versuchs standardisiert zu erfassen, wurden diese täglich mit Hilfe eines vorher festgelegten Scoring-Systems begutachtet. Dabei wurden die Parameter Erscheinungsbild, Atmung, Spontanverhalten und provoziertes Verhalten beurteilt. Jeder einzelne Parameter konnte einen Zahlenwert zwischen ,0' und ,3' annehmen. Am Ende jedes Versuchstages wurden diese Werte zu einem Summenbelastungsscore zusammengefasst.

Eine weitere Hilfsgröße zur Beurteilung der Tiere im Verlauf ist das Körpergewicht der Tiere. Auch dieses wurde täglich erfasst.

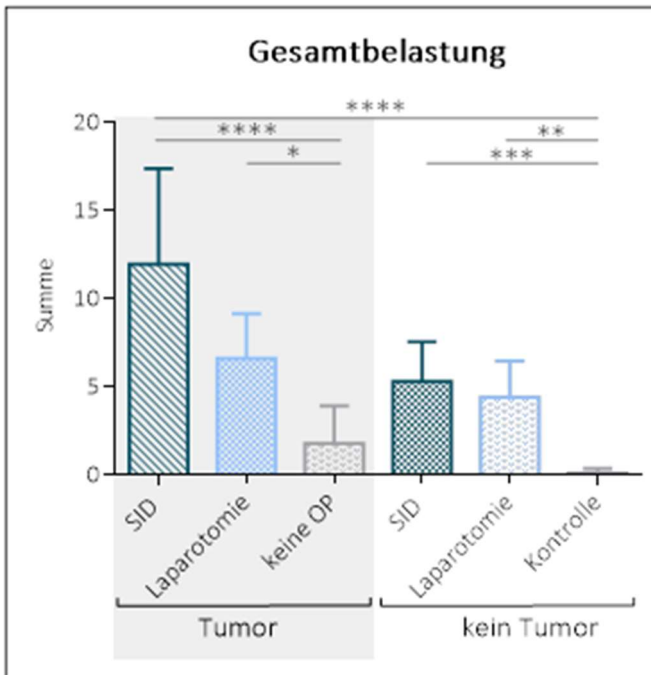
### 5.2.1 Gesamtbelastung

Die Summenbelastungsscores eines jeden Versuchstages wurden zu einer Gesamtbelastung aufsummiert (siehe Abbildung 7).

So zeigten sich die sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere als insgesamt am stärksten belastet und mit signifikant höheren Summen als die Tumor-tragenden Tiere (keine OP) und die

Kontrollen. Die Tumor-tragenden Tiere, die keiner weiteren Operation unterzogen wurden, zeigten sich insgesamt als vergleichsweise wenig beeinträchtigt und signifikant geringer belastet als die sowohl Tumor-tragenden und zugleich laparotomierten Tiere.

Die Tiere beider OP-Gruppen (SID, Laparotomie) zeigten sich deutlich stärker belastet als die Kontrolltiere.



**Abbildung 7 Gesamtbelastung errechnet aus den Summenbelastungsscores**

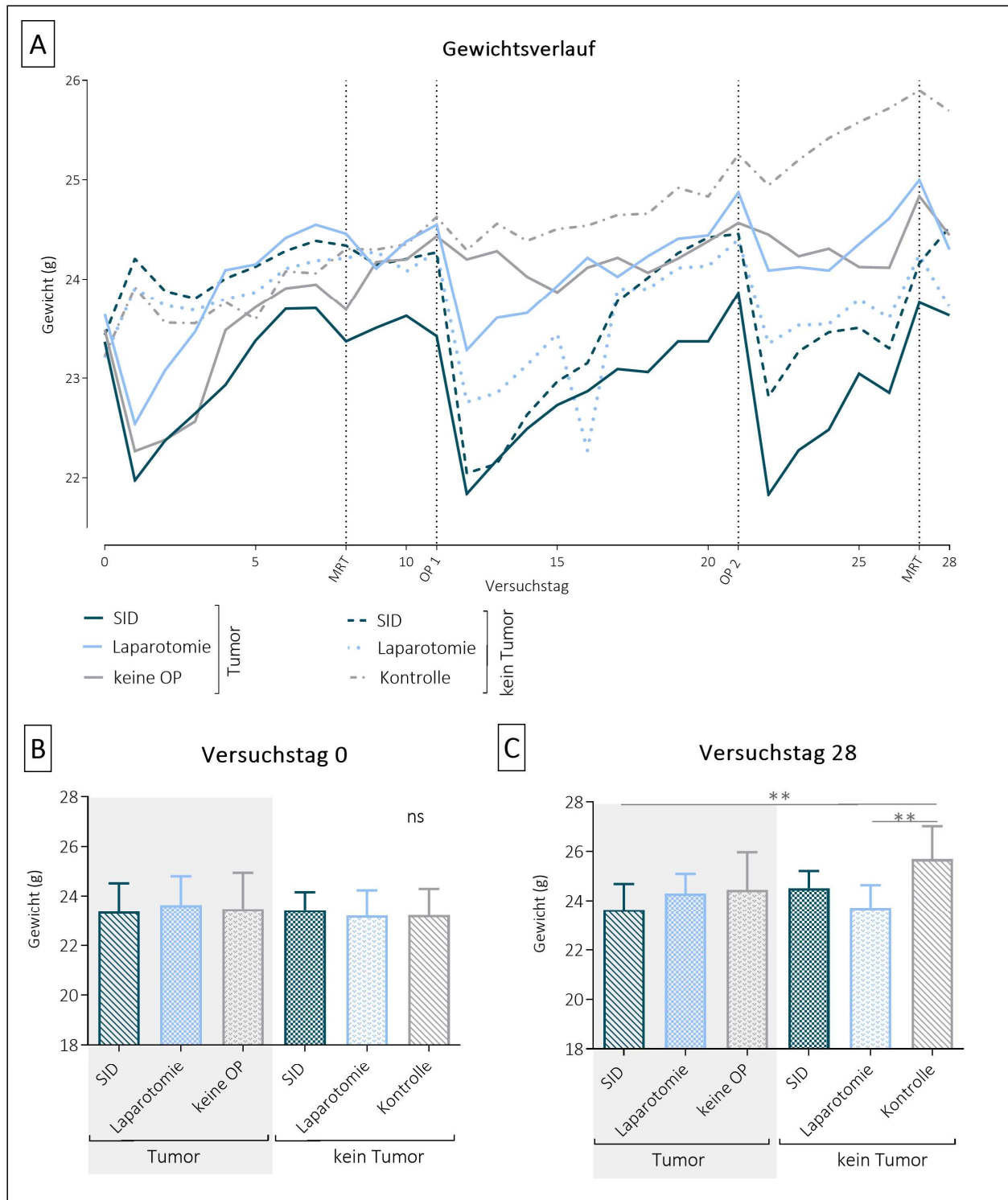
An allen 28 Versuchstagen wurden die Tiere nach einem festen Protokoll beurteilt. Die Tiere, die laparotomiert bzw. SID-operiert wurden, sind signifikant stärker belastet als die Tiere, die keine OP erhielten bzw. als die Kontrolltiere. Dies gilt sowohl für die Gruppen der tumortragenden als auch der nicht tumortragenden Mäuse.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks-Normality-Test), Vergleich der Varianzen (Bartlett's-Test), One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw.  $1\%$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant.  $n = 11$  (SID/Tumor),  $9$  (Laparotomie/Tumor),  $11$  (keine OP/Tumor),  $11$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).*

### 5.2.2 Entwicklung des Körpergewichtes der Versuchstiere

Zur Veranschaulichung der Entwicklung des Körpergewichtes der Tiere ist dieses im Verlauf und an relevanten Zeitpunkten dargestellt (Abbildung 8). Für die einzelnen Versuchsgruppen wurden aus den Messwerten für jeden Versuchstag ein Mittelwert errechnet (siehe Abbildung 8 A).

Zu Versuchsbeginn an Tag 0 (siehe Abbildung 8 B) gab es keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Im Mittel wogen alle Tiere zwischen 23 g und 24 g. Bezogen auf den Anstieg der Kurven konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auffällig sind jedoch die starken Gewichtsverluste der Tiere nach der Tumorimplantation und den operativen Eingriffen (Laparotomie, SID). Vergleich man das Gewicht der Tiere an Versuchstag 28, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren und der Kontrolle sowie zwischen den nur laparotomierten und den Kontrolltieren.



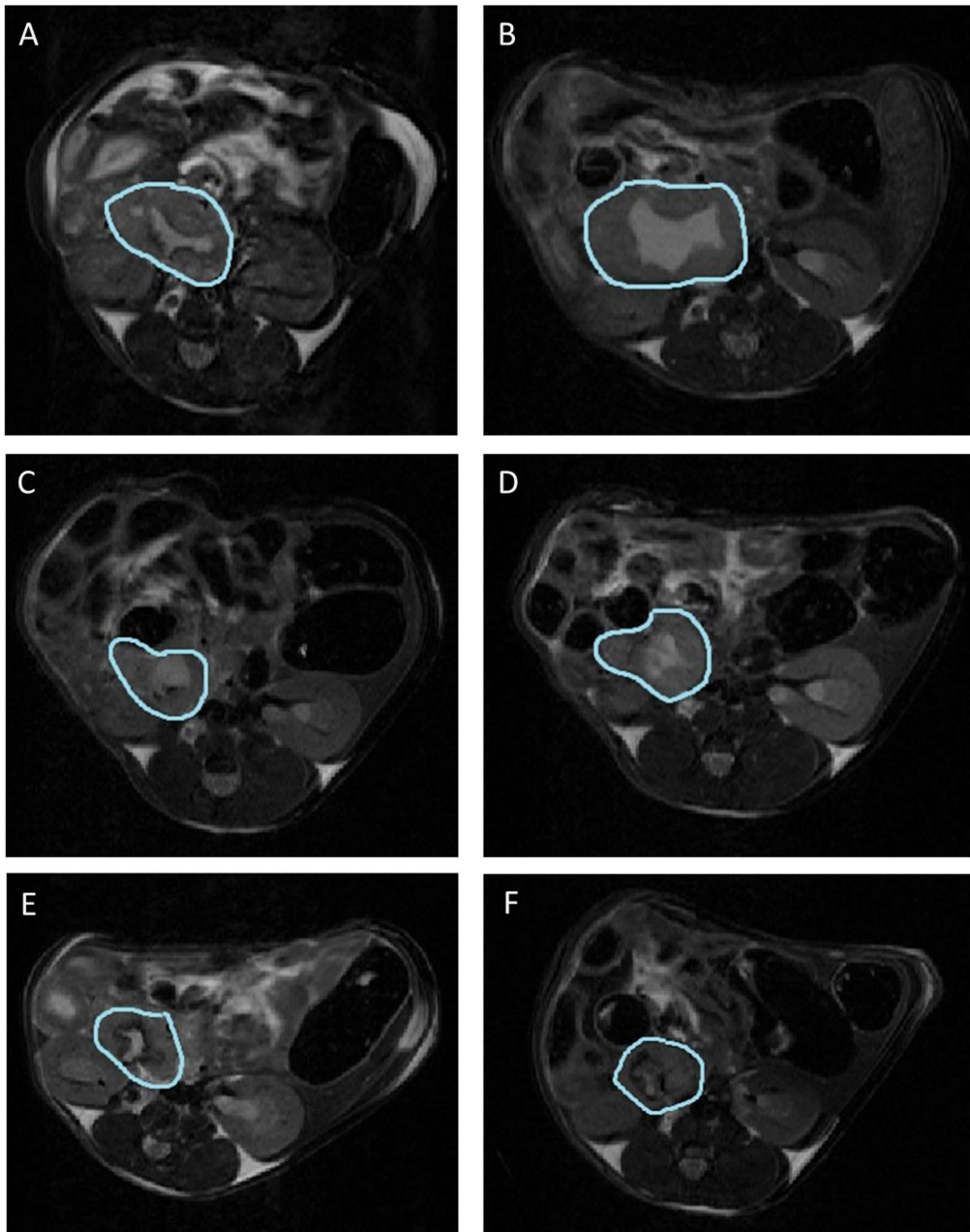
**Abbildung 8 Veränderungen des Körpergewichtes während des Versuchs**

A: Dargestellt sind die Mittelwerte für jeden Versuchstag. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Zu starken Gewichtsverlusten kam es am Tag nach der Tumorimplantation und nach den Operationen (SID, Laparotomie). B: Das Gewicht war zu Versuchsbeginn bei allen Gruppen gleich. C: Signifikante Unterschiede zeigten sich am Versuchsende zwischen SID/Tumor und der Kontrolle sowie Laparotomie und Kontrolle.

A: Vergleich der Anstiege der Kurven, Nichtlineare Regression; B/C: Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks-Normality-Test), Vergleich der Varianzen (Bartlett's-Test), One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw. 1 %). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; ns...nicht signifikant. n bei Versuchsbeginn: 15.

### 5.3 Beurteilung des Tumorwachstums

Mit Hilfe der Magnetresonanztomografie (MRT) wurden im Versuchsverlauf an Tag 8 und 27, also vor und nach den operativen Interventionen, Aufnahmen des Abdomens der Tumor-tragenden Versuchstiere gemacht (Abbildung 9). Dies diente der Beurteilung des Tumorwachstums während des Versuchs.



**Abbildung 9 Tumor-  
ausdehnung in der  
magnetresonanztomographischen  
Untersuchung des  
Abdomens (T2-  
Wichtung)**

Dargestellt sind exemplarisch in A/B: Tumor/SID an Tag 8 und Tag 27, in C/D: Tumor/Laparotomie an Tag 8 und Tag 27 und in D/E: Tumor/keine OP an Tag 8 und 27. Es lagen keine signifikanten Gruppenunterschiede vor. Alle Ausschnitte zeigen in der Transversalebene den Tumor (farblich markiert) ungefähr auf Höhe der Nieren. Dorsal zu erkennen die Wirbelsäule mit der paravertebralen Muskulatur, nach ventral Dün- und Dickdarmsegmente.

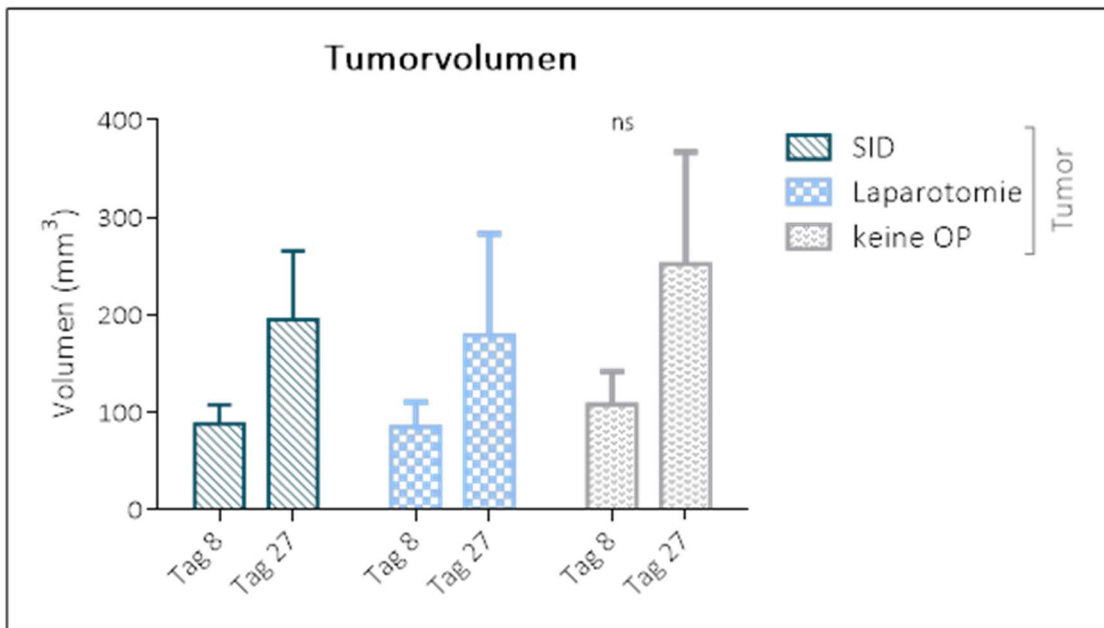
Vor den Interventionen (SID-Operation bzw. Laparotomie) an Tag 8 gab es keine signifikanten Größenunterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Es zeigte sich hier ein tendenziell geringfügig größeres Tumolvolumen bei den Tieren, die nachfolgend keiner OP-Prozedur unterzogen wurden (Abbildung 10). Nach den Eingriffen (Tag 27) zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede



zwischen den Versuchsgruppen, wobei die Tumoren der Tiere, die nur der Tumorimplantation unterzogen wurden, weiterhin tendenziell größer waren.

Auch der Vergleich des prozentualen Wachstums und der Differenz der einzelnen Volumina von Tag 27 und Tag 8 brachte keine nennenswerten oder signifikanten Unterschiede.

Bei Betrachtung aller Messwerte der Tumorummetrie waren vor allem die großen Standardabweichungen auffällig.



**Abbildung 10 Tumorummetrie an Tag 8 und 27**

Messung des Tumorummens in der MRT. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen an Tag 8 und an Tag 27 sowie im Vergleich des prozentualen Wachstums oder der Differenz der Werte von Tag 27 und Tag 8.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks-Normality-Test), Vergleich der Varianzen (Bartlett's-Test), One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw. 1 %). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant.*

*n an Tag 8 = 12. n an Tag 27 = 10 (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor).*

## 5.4 Veränderungen in der Zusammensetzung des zellulären Immunsystems

Für eine effiziente Tumorabwehr ist ein funktionierendes Immunsystem essentiell. Eine große Rolle spielen dabei die verschiedenen Zellarten mit ihren spezifischen Funktionen.

Ziel bei der Erhebung nachfolgender Ergebnisse war es, die zelluläre Komponente des Immunsystems genauer zu beschreiben und Veränderungen in der Zellzahl zu quantifizieren. Um ein möglichst differenziertes Bild zu bekommen, wurden die unterschiedlichen Populationen in verschiedenen Kompartimenten (Blut und Milz) betrachtet.

### 5.4.1 Analyse des Blutbildes

Um den Einfluss der einzelnen Interventionen auf die zelluläre Zusammensetzung des Blutes zu untersuchen, wurde mit dem VetScan HM5 Abraxis (mittels Impedanzmessung) ein Blutbild für jedes Tier erstellt. Die Blutentnahme erfolgte retrobulbär zum Versuchsende am Tag 28. Bei der Analyse wurden sowohl die absoluten Zahlen der Zellreihen als auch ihr prozentualer Anteil betrachtet. Neben den Leukozyten insgesamt wurde auch die lymphatische (Lymphozyten) und die myeloische Reihe (Monozyten, Neutrophile Granulozyten) analysiert. Des Weiteren wurden Erythrozyten- und auch Thrombozytenparameter erfasst.

#### 5.4.1.1 Absolute Zellzahlen

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, war die absolute Zahl der Leukozyten in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant größer. Zwischen allen anderen Gruppen war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

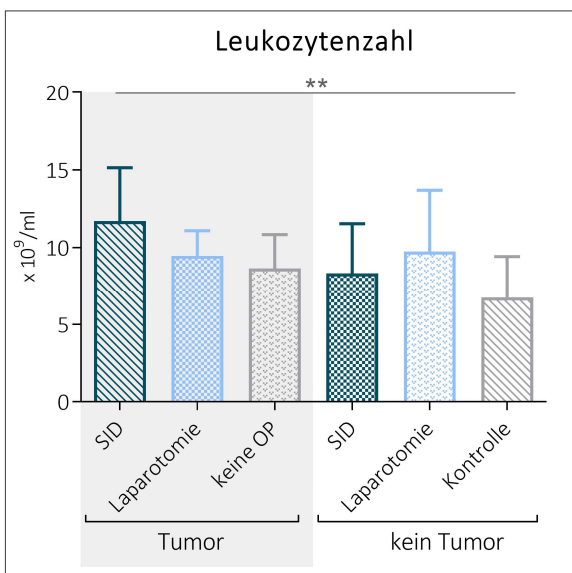


Abbildung 11 Anzahl der Leukozyten im Blut

Es zeigten sich signifikant höhere Leukozytenzahlen bei SID/Tumor vs. Kontrolle.

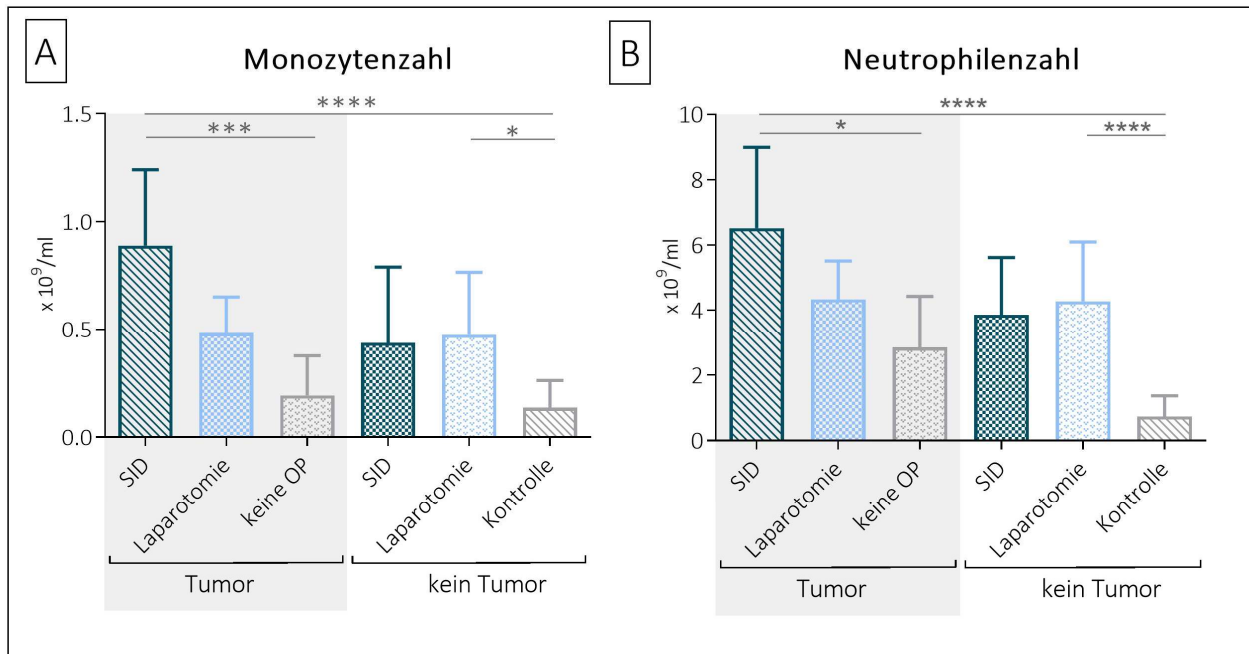
Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks-Normality-Test), Vergleich der Varianzen (Bartlett's-Test), One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw. 1 %). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant

$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Bei den Lymphozyten waren keine Gruppenunterschiede erkennbar (siehe Anhang Tabelle 7).

Sowohl bei den Monozyten als auch bei den Neutrophilen Granulozyten zeigten sich signifikante Veränderungen (siehe Abbildung 12). So lag die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere deutlich höher im Vergleich zur Kontrolle sowie zu den Tumor-tragenden Tieren (ohne weitere Operation).

Auch die Monozytenzahlen zeigten sich bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe und zu den Tumor-tragenden Tieren. Des Weiteren lagen sowohl bei den Monozyten als auch bei den Neutrophilen Granulozyten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der laparotomierten und der Kontrolltiere vor.



**Abbildung 12 Monozyten- und Neutrophilenzahl im Blut**

A/B: Die höchsten Monozyten-/Neutrophilenzahlen zeigten sich in der Gruppe SID/Tumor (signifikant höher als in den Gruppen ‚keine OP/Tumor‘ und ‚Kontrolle‘. Auch die laparotomierten Tiere wiesen signifikant höhere Zahlen auf als die Kontrolltiere.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks-Normality-Test), Vergleich der Varianzen (Bartlett's-Test), One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw.  $1\%$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant

#### 5.4.1.2 Anteil der Immunzellpopulationen an den Leukozyten

Nachfolgend wurden die prozentualen Anteile der Lymphozyten, der Monozyten und der Neutrophilen Granulozyten an den Leukozyten betrachtet (Abbildung 13).

Auch hier zeigte sich in allen drei Zellarten ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere und der Kontrolle.

Während der Anteil der Lymphozyten in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere im Vergleich zur Kontrolle abgenommen hat, ist der Anteil der Monozyten und Neutrophilen Granulozyten gestiegen.

Bei den Lymphozyten erreicht zusätzlich der Vergleich der laparotomierten Tiere versus Kontrolltiere Signifikanz, ebenso bei den Neutrophilen Granulozyten.

Die Leukozyten in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere setzen sich aus  $37,51 \pm 12,14\%$  Lymphozyten,  $7,61 \pm 2,2\%$  Monozyten und  $55,11 \pm 11,54\%$  Neutrophile Granulozyten zusammen. In der Kontrollgruppe liegt der Anteil der Lymphozyten bei  $81,81 \pm 12,59\%$ . Monozyten und Granulozyten machen nur einen sehr kleinen Teil aus.

Insbesondere bei den Lymphozyten und Neutrophilen Granulozyten sieht man deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen, die allerdings kein Signifikanzniveau erreichen.

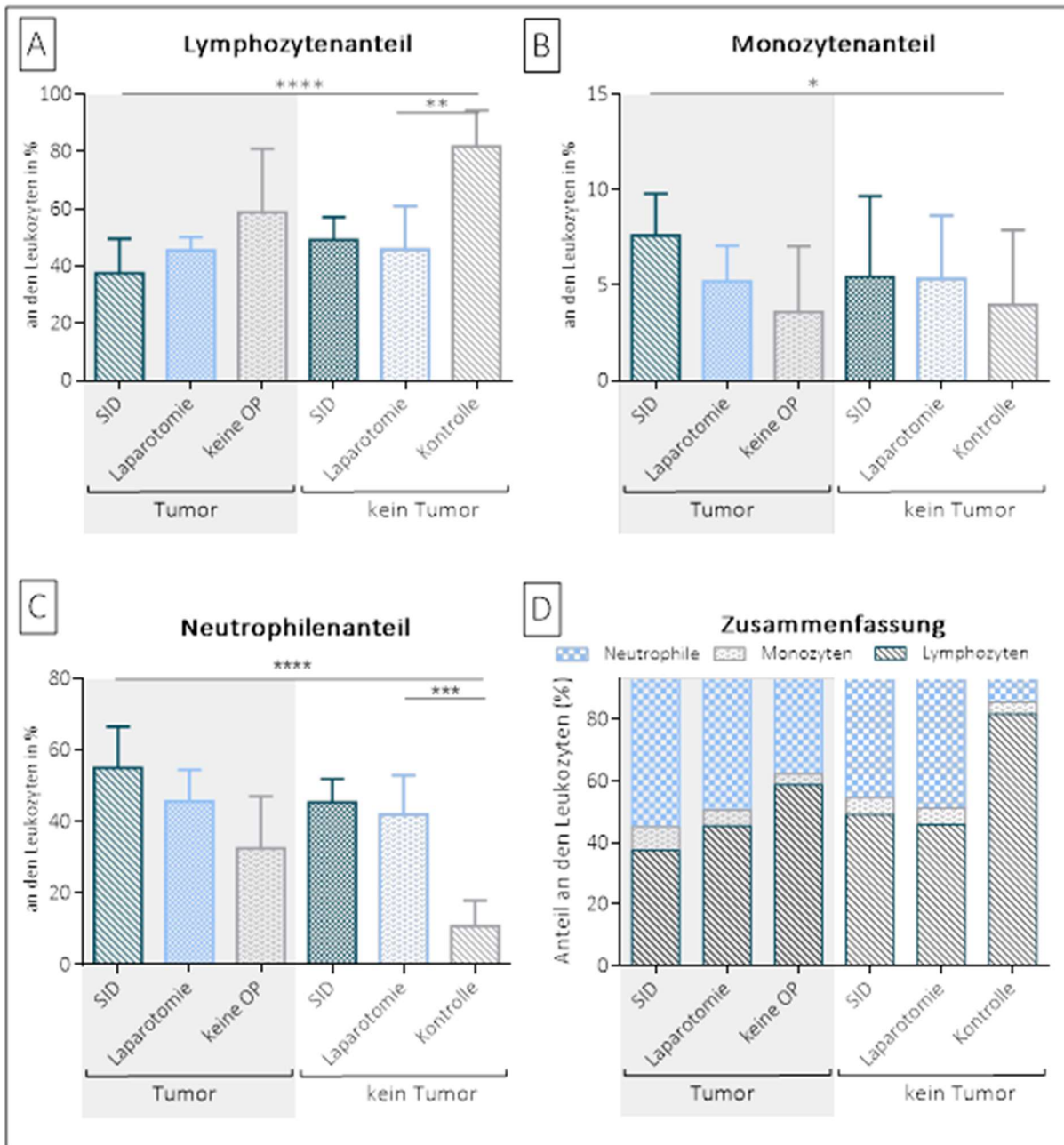


Abbildung 13 Anteile wichtiger Immunzellpopulationen an den Leukozyten im Blut

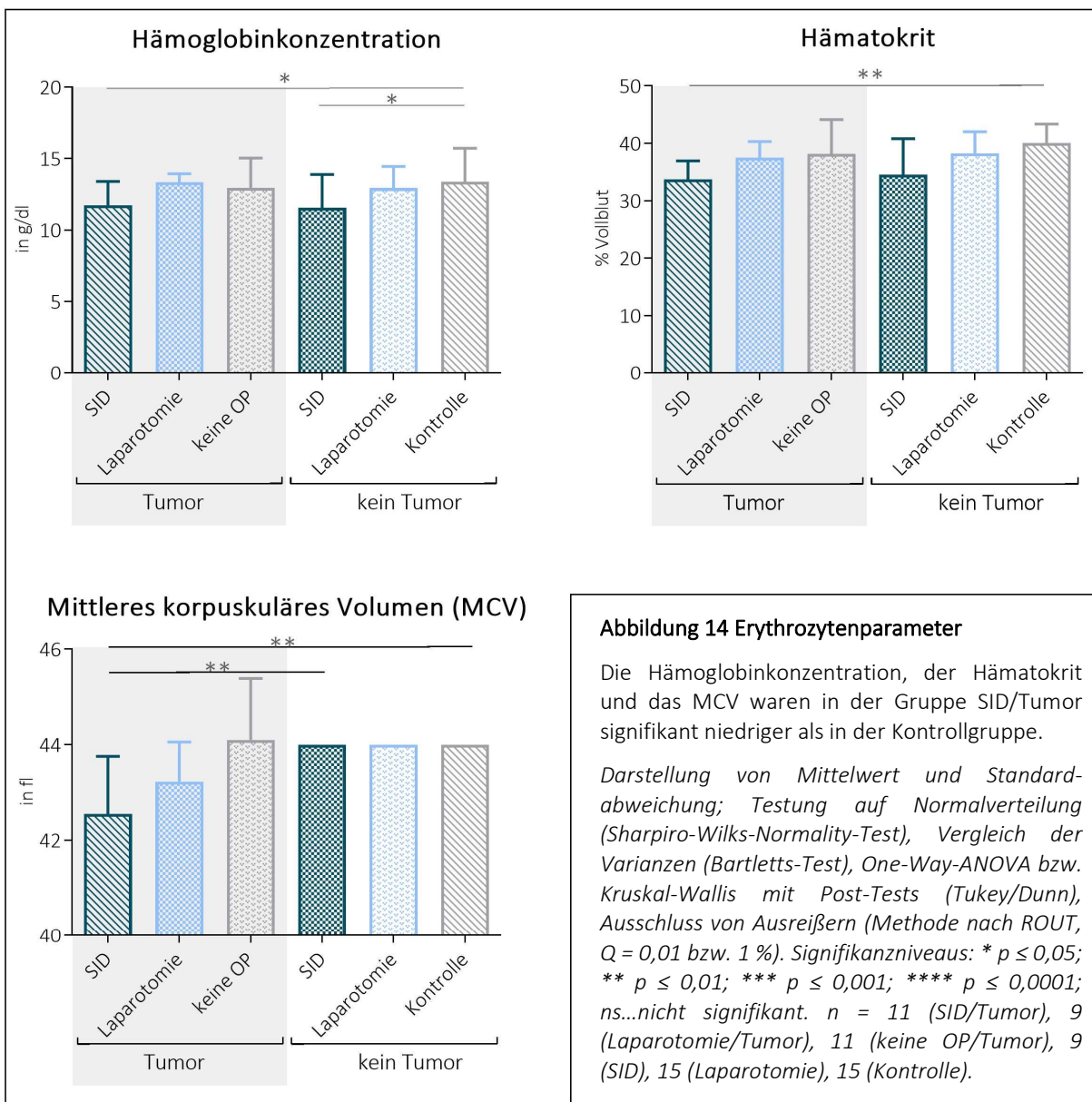
A: Lymphozytenanteil, signifikant höhere Werte bei SID/Tumor vs. Kontrolle und Laparotomie vs. Kontrolle B: Keine signifikanten Veränderungen bei den Lymphozyten. B, C: Der höchste Monozyten-/Neutrophilenanteil zeigt sich in der Gruppe SID/Tumor. D: Anteile der Zellpopulationen an den Leukozyten auf einen Blick.

Darstellung von Mittelwert (A-D) und Standardabweichung (A-C); Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks-Normality-Test), Vergleich der Varianzen (Bartlett's-Test), One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw.  $1\%$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant.

$n = 11$  (SID/Tumor),  $9$  (Laparotomie/Tumor),  $11$  (keine OP/Tumor),  $9$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).

### 5.4.1.3 Beurteilung der Erythrozytenparameter

Zusätzlich wurden folgende Erythrozytenparameter bestimmt: Zellzahl, Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), Mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt (MCH) und Mittlere korpuskuläre Hämoglobin-Konzentration (MCHC). Während die Zellzahl, MCH und MCHC ohne signifikante Änderungen blieben (Daten nicht gezeigt), zeigten sich bei den übrigen Parametern (Abbildung 14) signifikante Unterschiede. In der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere war sowohl die Hämoglobinkonzentration als auch der Hämatokrit signifikant niedriger verglichen mit der Kontrolle. Auch die nur SID-operierten Tiere wiesen signifikant niedrigere Konzentrationen an Hämoglobin im Blut auf als die Kontrolltiere. Ähnlich verhielt es sich beim MCV. Hier zeigten sich die Werte für die sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere signifikant niedriger gegenüber der Kontrolle sowie gegenüber der nur SID-operierten Gruppe.



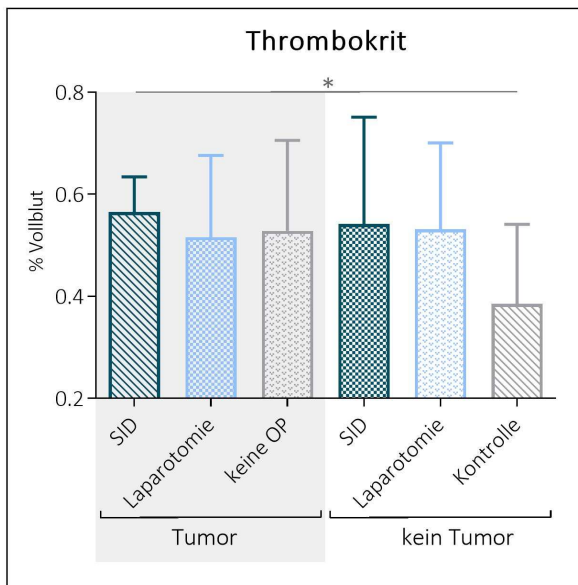
**Abbildung 14 Erythrozytenparameter**

Die Hämoglobinkonzentration, der Hämatokrit und das MCV waren in der Gruppe SID/Tumor signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung auf Normalverteilung (Shapiro-Wilks-Normality-Test), Vergleich der Varianzen (Bartlett's-Test), One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw. 1%). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant.  $n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).*

#### 5.4.1.4 Thrombozytenparameter

Des Weiteren wurden die Thrombozytenparameter „Anzahl“ und „Thrombokrit“ betrachtet. Die Thrombozytenzahl zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (siehe Anhang). Das Thrombokrit (PCT) ist bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren signifikant höher als in der Kontrolle (siehe Abbildung 15). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigt das mittlere Thrombozytenvolumen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 15 Thrombokrit**

Die SID/Tumor-Gruppe wies signifikant ein höheres Thrombokrit auf als die Kontrolle.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw. 1 %). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; ns...nicht signifikant.  
 $n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).*

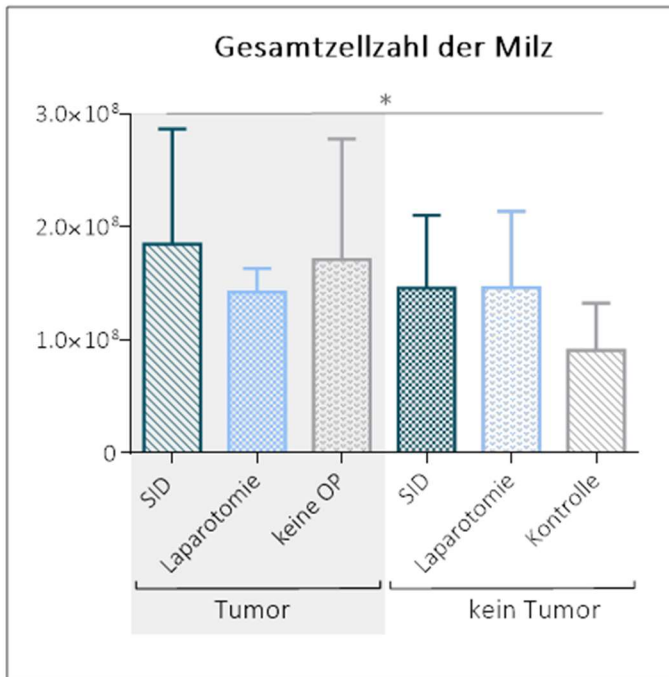
#### 5.4.2 Analyse der Immunzellen der Milz

Um noch weitere Informationen zur zellulären Komponente des Immunsystems zu bekommen, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Leukozytenpopulation in der Milz untersucht. Hierfür wurden die Milzen zu einer Zellsuspension verarbeitet und mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper markiert. Dabei wurden sowohl die absoluten Zellzahlen als auch die Anteile der Zellreihen an der Gesamtzellpopulation gemessen. Betrachtet wurden dabei B- und T-Lymphozyten, ihre Subpopulationen sowie Neutrophile Granulozyten, Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen (Makrophagen oder Dendritische Zellen) und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen).

##### 5.4.2.1 Gesamtzellzahl der Milz

Betrachtet man die Zellzahlen über alle Versuchsgruppen, unterschied sich nur die Zellzahl in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere signifikant zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 16). Diese Gruppe wies auch die höchsten Zellzahlen aller sechs Versuchsgruppen auf. Auch die Zellzahlen der Milzen der Tiere aus den anderen Gruppen waren im Mittel größer als

die der Kontrolle, erreichten aber weder im Vergleich zur Kontrolle noch untereinander ein Signifikanzniveau.



**Abbildung 16 Gesamtzellzahl der Milz**

Messung der Gesamtzahl aller Zellen in der Milz mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Versuchsende: SID/Tumor mit signifikant größerer Zellzahl als die Kontrolle.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$  bzw. 1 %). Signifikanzniveau: \*  $p \leq 0,05$ ; ns...nicht signifikant.*

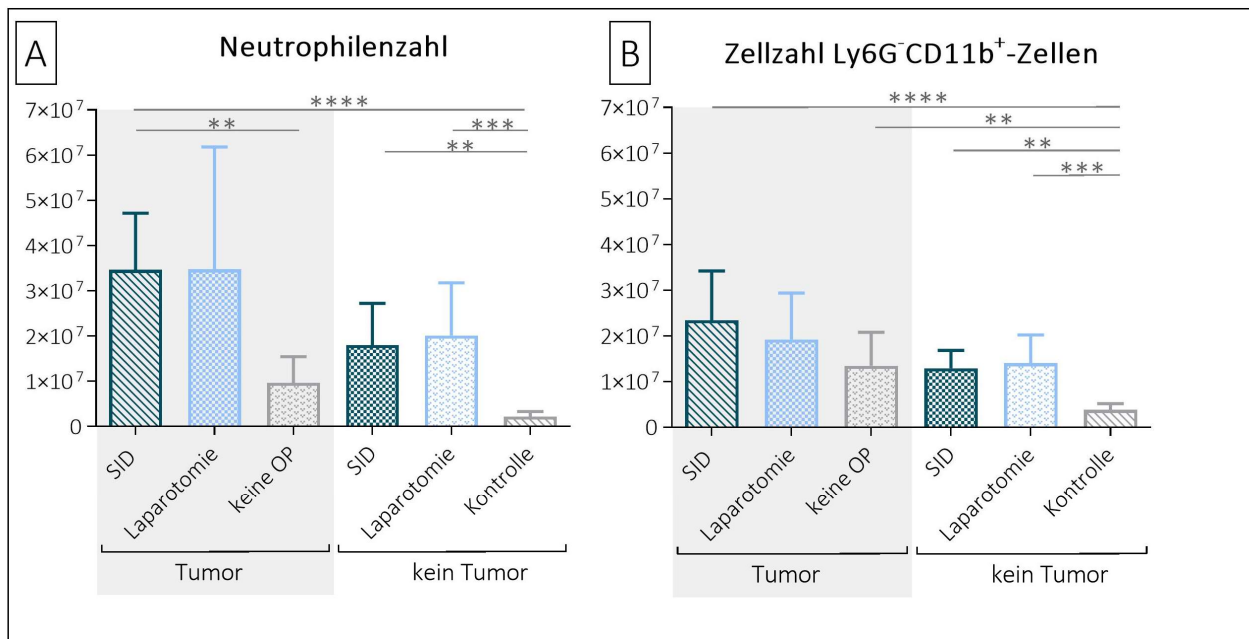
*$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).*

#### 5.4.2.2 Zellzahlen der Immunzellpopulationen in der Milz

Weder die B- noch die T-Lymphozyten wiesen hier signifikante Gruppenunterschiede auf. Auch bei der Messung der NK-Zellen zeigten sich keine signifikanten Abweichungen (Messwerte siehe Anhang).

Die Messung der **Neutrophilen Granulozyten** (Abbildung 17 A) ergab hingegen signifikante Unterschiede beim Vergleich der Werte der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere mit den Tieren, die nur einen Tumor trugen sowie mit den Kontrolltieren. Auch die nur SID-operierten bzw. die nur laparotomierten Tiere zeigten eine signifikant größere Zahl an Neutrophilen Granulozyten in der Milz als die Tiere der Kontrollgruppe.

Bei den **Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen**, welche am ehesten Makrophagen oder Dendritischen Zellen entsprechen wiesen alle Versuchsgruppen (signifikant) erhöhte Zellzahlen auf im Vergleich zu den Werten der Kontrolltiere (Abbildung 17 B).



**Abbildung 17 Zellzahl der Neutrophilen Granulozyten und Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen in der Milz**

Durchflusszytometrische Messung der Anzahl der Neutrophilen Granulozyten (A) und Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen (B) in der Milz. Unter anderem zeigten sich signifikant höhere Zellzahlen in der Gruppe Tumor/SID im Vergleich zur Kontrolle.

*Darstellung: Mittelwert, Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT, Q = 0,01). Signifikanzniveaus: \* p ≤ 0,05; \*\* p ≤ 0,01; \*\*\* p ≤ 0,001; \*\*\*\* p ≤ 0,0001.*

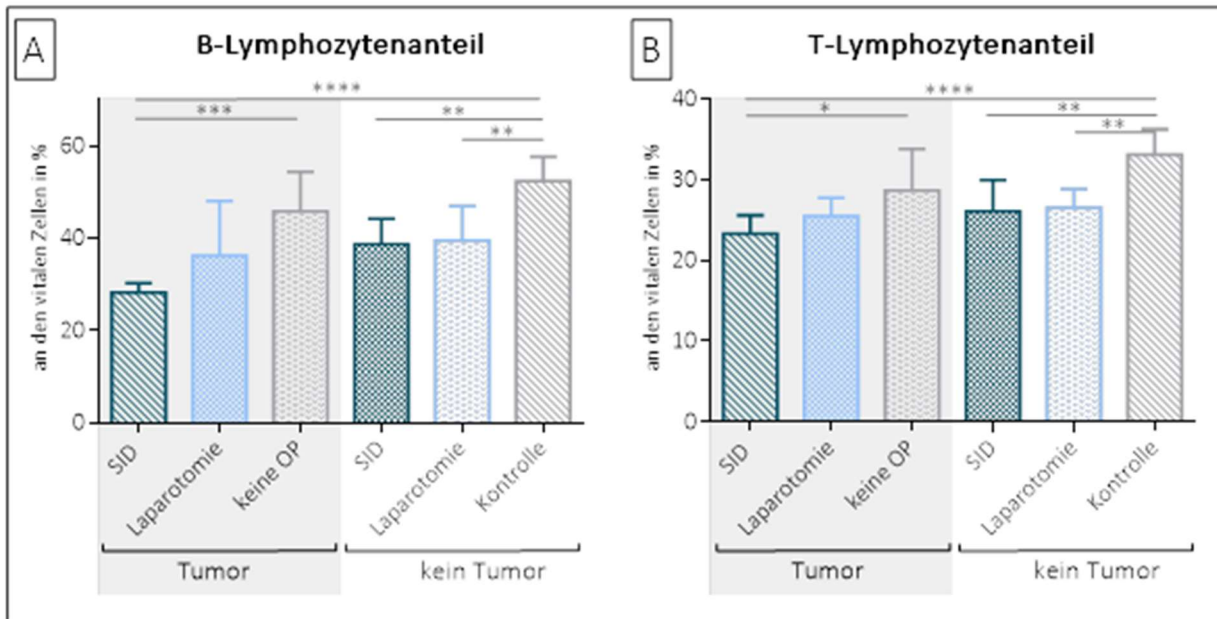
*n = 11 (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).*

### 5.4.2.3 Anteile der Immunzellpopulationen in der Milz

Die veränderten Zellzahlen in allen behandelten Gruppen, insbesondere die der Neutrophilen Granulozyten sowie der Makrophagen, führten zu deutlichen Unterschieden der anteiligen Zusammensetzung der Immunzellpopulationen in der Milz. Die stärkste Abweichung verglichen mit den übrigen Versuchsgruppen war immer in der Gruppe zu finden, in der Tumor-tragende Tiere mit der SID behandelt wurden. Insbesondere der Vergleich dieser Gruppe mit der Kontrollgruppe führte zu hochsignifikanten Ergebnissen.

Bei der Betrachtung der Messwerte der **B-** und **T-Lymphozyten** in Abbildung 18 fällt auf, dass der Anteil dieser Zellreihen in den Versuchsgruppen deutlich unter denen der Kontrollgruppe lag. So zeigten die Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere und die Gruppen der (nur) SID-operierten bzw. laparotomierten Tiere signifikant niedrigere Anteile an Lymphozyten in der Milz. Der Vergleich der Werte der Tumor-tragenden Tiere (keine weitere OP) mit der Kontrolle war statistisch nicht signifikant. Außerdem zeigten sich die Messwerte der Tiere, die sowohl einen Tumor hatten als auch SID-operiert wurden signifikant niedriger im Vergleich mit den Tieren, die außer der Tumorimplantation keiner weiteren Prozedur unterzogen worden waren.





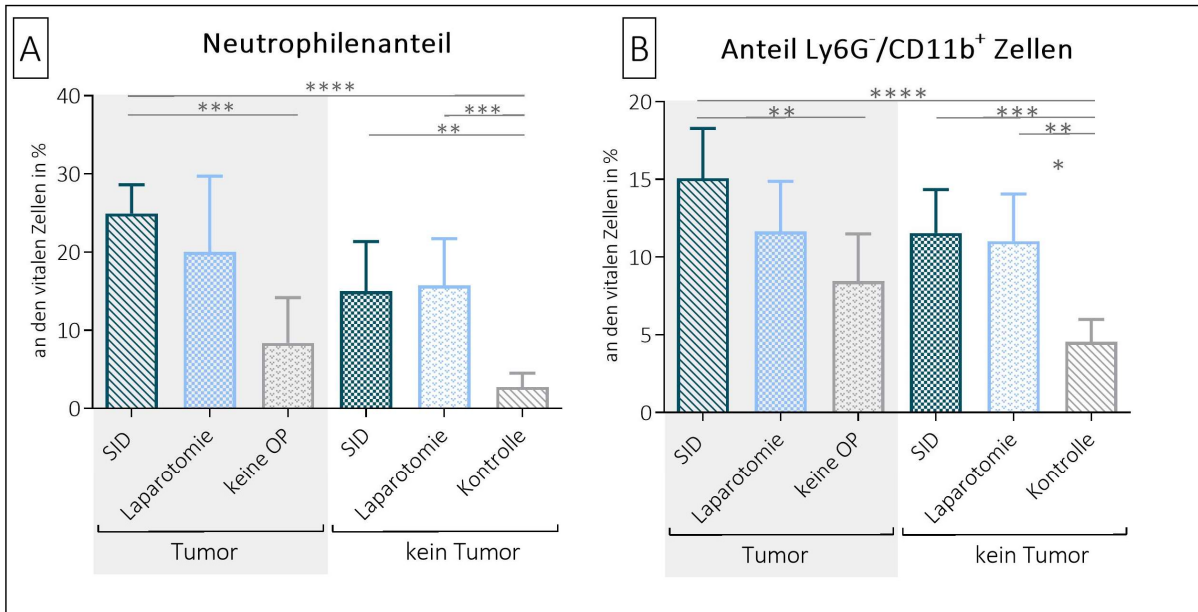
**Abbildung 18 Anteil der B- und T-Lymphozyten an den Zellen der Milz**

Durchflusszytometrische Messung der Anteile B- und T-Lymphozyten (A, B). Es zeigten sich starke Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Der Anteil der **Neutrophilen Granulozyten** und der **Ly6G/CD11b<sup>+</sup> Zellen** (Makrophagen und Dendritische Zellen) war bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren im Vergleich mit der Kontrolle signifikant größer (siehe Abbildung 19). Auch der Vergleich dieser Gruppe mit den alleinig Tumor-tragenden Tieren brachte ein hochsignifikantes Ergebnis. Ebenfalls signifikante Veränderungen zeigten sich im Vergleich der Werte der Tiere, die nur mit der SID behandelt bzw. nur laparotomiert wurden, mit der Kontrolle.

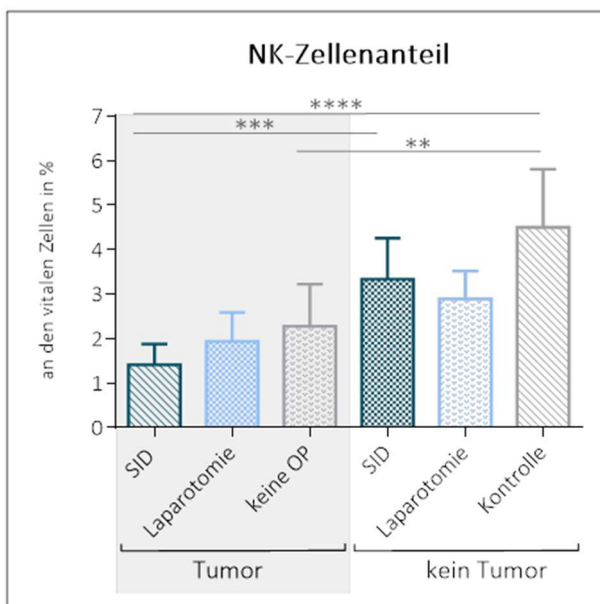


**Abbildung 19 Anteil der Neutrophilen Granulozyten und der Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen an den Zellen der Milz**

Durchflusszytometrische Messung der Anteile Neutrophilen Granulozyten und Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup> Zellen (A, B). Es zeigten sich starke Veränderungen insbesondere bei den Tieren, die neben der Implantation des Tumors noch eine weitere Behandlung erfahren haben.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .  $n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Auch der Anteil der **Natürlichen Killerzellen** (NK-Zellen) zeigte signifikante Veränderungen beim Vergleich der verschiedenen Gruppen (Abbildung 20). So war dieser in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere am geringsten und signifikant niedriger als in den Gruppen der Kontrolltiere und der SID-operierten Tiere. Des Weiteren waren die Werte der Tumor-tragenden Tiere signifikant geringer im Vergleich mit den Kontrolltieren.



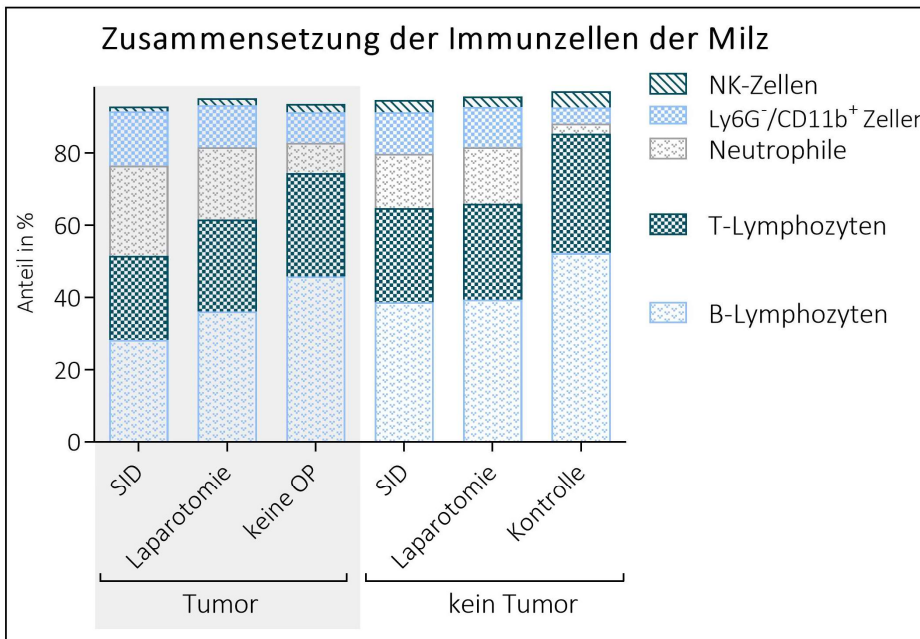
**Abbildung 20 Anteil der Natürlichen Killerzellen an den Zellen der Milz**

Durchflusszytometrische Messung: Es zeigten sich starke Veränderungen insbesondere bei den Tieren, die neben der Implantation des Tumors noch eine weitere Behandlung erfahren haben.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Betrachtet man nun die Anteile aller Zellarten im Zusammenhang, fällt auf, dass es insbesondere die SID-operierten bzw. laparotomierten Tiere (mit und ohne Tumor) waren, deren Messwerte von denen der Kontrolle signifikant abwichen. Die stärksten Veränderungen waren in der Gruppe zu finden, wo Tumor und SID kombiniert wurden. So waren die Anteile der Lymphozyten und der NK-Zellen in den behandelten (SID, Laparotomie) Gruppen niedriger, die Anteile der Neutrophilen Granulozyten und der Makrophagen/Dendritischen Zellen (Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>) dafür größer als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21**  
Zusammensetzung der Immunzellen der Milz

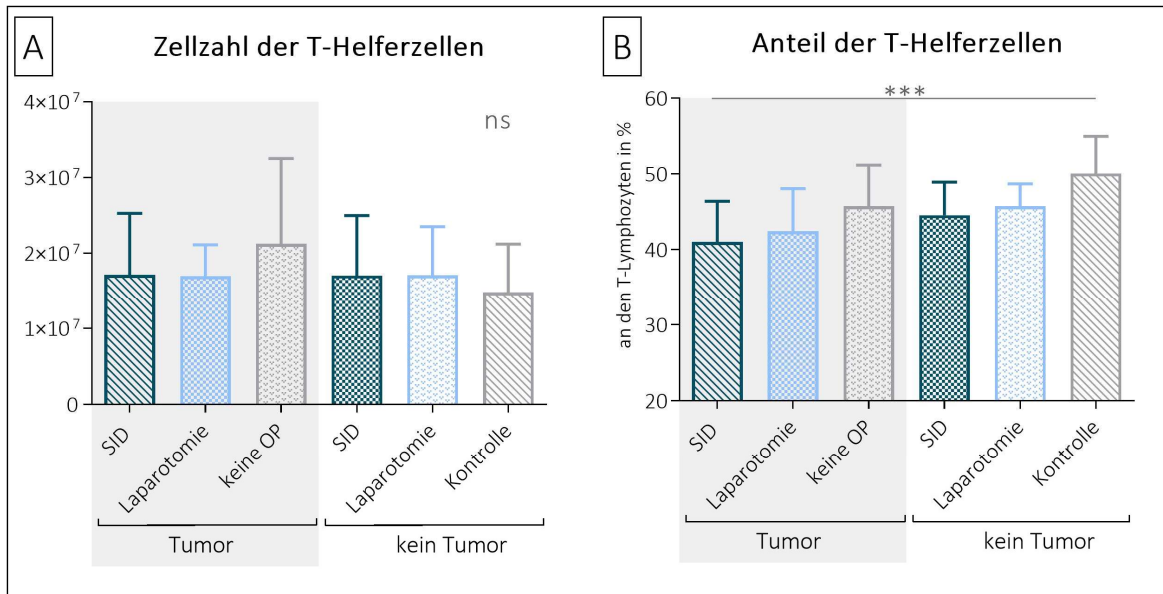
Durchflusszytometrische Messung der Immunzellpopulationen. Dargestellt sind die Anteile der Lymphozyten, der Neutrophilen Granulozyten, der Makrophagen und der Natürlichen Killerzellen.

*Darstellung der Mittelwerte für die Anteile der einzelnen Populationen, dadurch bedingt ergeben ihre Summen nicht genau 100%.*

#### 5.4.2.4 Veränderungen der T-Lymphozytensubpopulationen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden mit geeigneten Markern (CD3, CD4, CD8) die Subpopulationen der T-Lymphozyten weiter differenziert und ihr Anteil an den T-Lymphozyten sowie die absoluten Zellzahlen gemessen.

Die Anzahl der CD4-positiven T-Lymphozyten bzw. der sogenannten **T-Helferzellen** hat sich in den Gruppen nicht signifikant verändert. Bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren war ihr Anteil an den T-Lymphozyten signifikant kleiner verglichen mit der Kontrolle (siehe Abbildung 22).



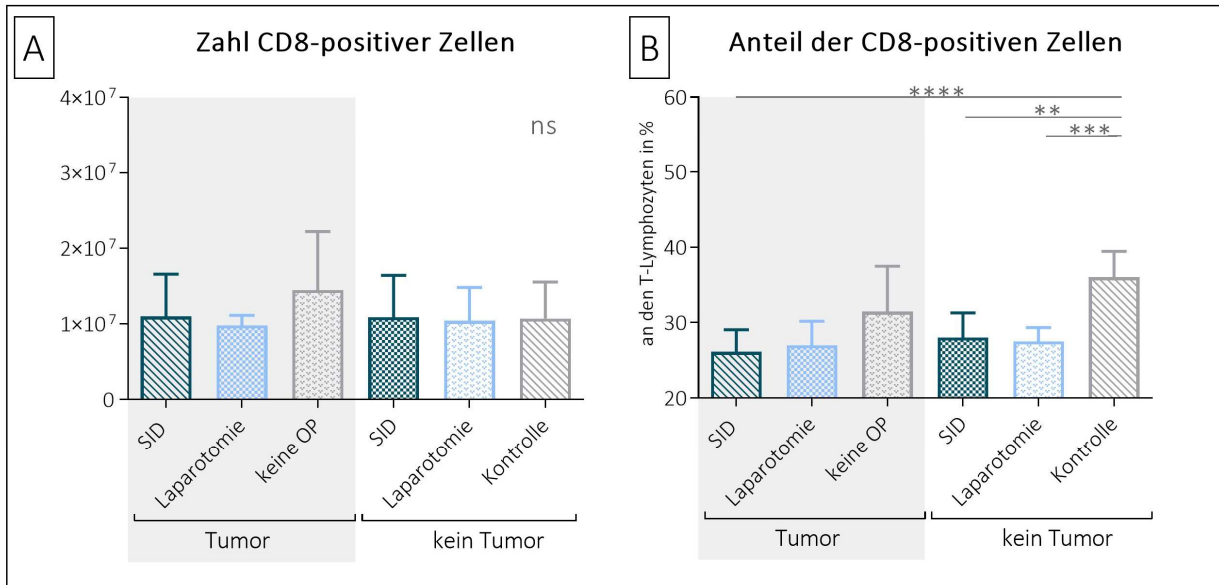
**Abbildung 22 Zellzahl und Anteil der T-Helferzellen an den T-Lymphozyten**

Durchflusszytometrische Messung: Es zeigten sich keine Veränderungen in der Zellzahl, aber anteilig weniger T-Helferzellen bei SID/Tumor.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns...nicht signifikant.

$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Zu den **CD8-positiven T-Lymphozyten** zählten insbesondere Zytotoxische T-Zellen (siehe Abbildung 23). Auch in der Anzahl wiesen die verschiedenen Gruppen keine signifikanten Veränderungen auf. Der Anteil der CD8-positiven T-Zellen war in der Kontrolle signifikant größer als in den Gruppen der Tiere, die sowohl einen Tumor hatten als auch SID-operiert wurden und größer als in den Gruppen der Tiere, die (nur) SID-operiert bzw. nur laparotomiert wurden.

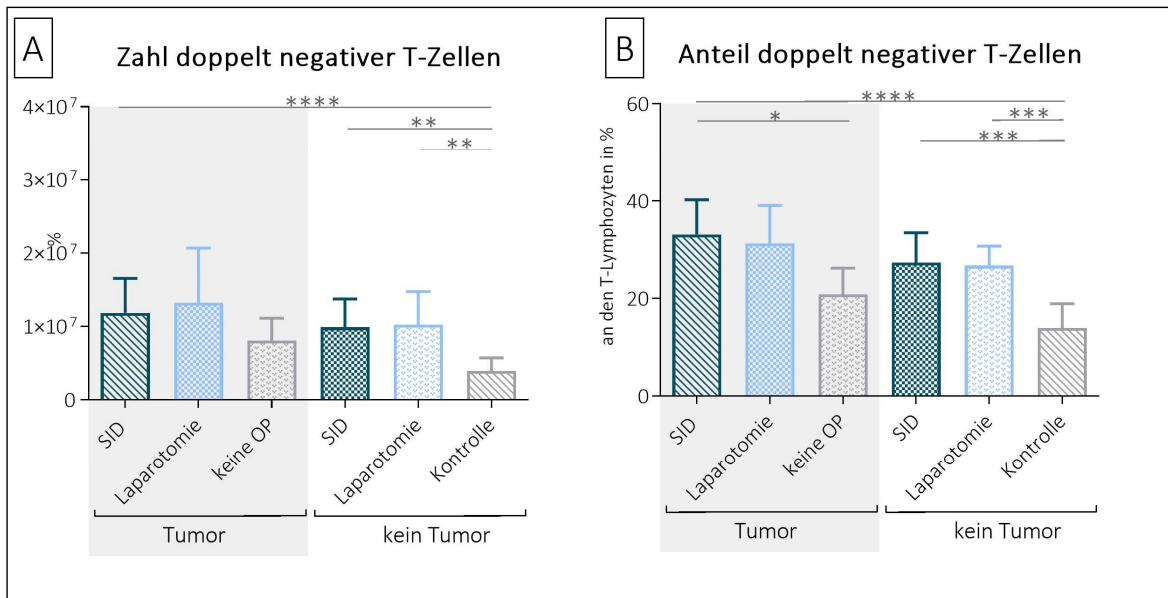


**Abbildung 23 Zellzahl und Anteil der CD8-positiven Zellen an den T-Lymphozyten**

Durchflusszytometrische Messung. Keine Veränderungen in der Zellzahl. Anteilig signifikant weniger CD8-positive Zellen bei SID/Tumor, SID und Laparotomie.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant.  $n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Die meisten Veränderungen zeigten sich jedoch im Anteil und in der Anzahl der **CD4-CD8-negativen T-Lymphozyten** (so genannte doppelt negative T-Lymphozyten; siehe Abbildung 24). Während diese Zellart in der Kontrollgruppe nur  $0,39 \pm 0,18 \times 10^7$  Zellen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) aufwies, lag sie in den anderen Gruppen mitunter deutlich darüber. Im Mittel signifikant größere Zellzahlen (im Vergleich zur Kontrolle) wiesen die Gruppen der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere, der (nur) SID-operierten und der laparotomierten Tiere auf. Aus diesen Werten ergeben sich auch die massiven Erhöhungen des Anteils doppelt negativer T-Lymphozyten. In der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere machten sie mit  $33,1 \pm 7,15$  % den zweitgrößten Anteil unter den Subpopulationen aus (nach CD4-positiven T-Zellen) und hatten damit in dieser Gruppe einen signifikant größeren Anteil an den T-Lymphozyten als in der Kontrolle und als in der Gruppe der Tumor-tragenden (keine weitere OP) Tiere. Die Kontrolle wies den insgesamt niedrigsten Anteil an doppelt negativen T-Zellen auf. Damit sind die Anteile in den Gruppen der SID-operierten bzw. laparotomierten Tiere signifikant größer.



**Abbildung 24 Zellzahl und Anteil der doppelt negativen T-Zellen an den T-Lymphozyten**

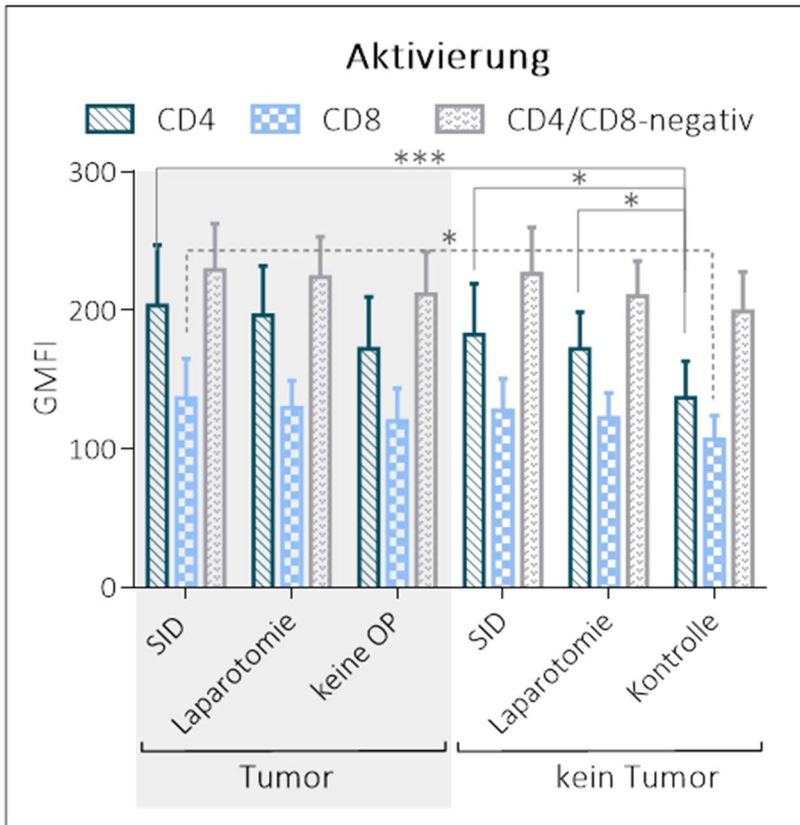
Durchflusszytometrische Messung. Signifikant mehr doppelt negative T-Zellen bei SID/Tumor, SID, Laparotomie im Vergleich zur Kontrolle. Gleiches zeigte sich auch im Anteil an den gesamten T-Lymphozyten, hier wies SID/Tumor außerdem einen signifikant höheren Anteil auf im Vergleich zur Gruppe „keine OP/Tumor“.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .*

*$n = 11$  (SID/Tumor),  $9$  (Laparotomie/Tumor),  $11$  (keine OP/Tumor),  $9$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).*

#### 5.4.2.5 T-Lymphozytenaktivierungsmarker CD69

Im Rahmen dieser durchflusszytometrischen Messung wurde außerdem die GMFI, die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität eines Aktivierungsmarkers (CD69) auf den Subpopulationen der T-Lymphozyten bestimmt, da diese eine entscheidende Rolle bei der Immun- und Tumorabwehr spielen. Im Gegensatz zu den doppelt negativen T-Zellen zeigten sich bei den CD4-positiven T-Helferzellen und bei den CD8-positiven T-Lymphozyten Unterschiede beim Vergleich der Versuchsgruppen (Abbildung 25). Bei beiden Zellarten zeigte sich in der Gruppe, in der die Tiere sowohl einen Tumor trugen als auch SID-operiert wurden, eine signifikant stärkere Aktivierung der Zellen im Vergleich zur nativen Kontrolle. Auch die laparotomierten bzw. SID-operierten Tiere wiesen im Vergleich zur Kontrolle bei den T-Helferzellen eine erhöhte Expression von CD69 auf.



**Abbildung 25** Fluoreszenzintensität von CD69 auf T-Zellen

Durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität auf T-Helferzellen (CD4), CD8-positiven und doppelt negativen Zellen (CD4/CD8-negativ). Man erkennt keine Gruppenunterschiede bei den doppelt negativen T-Zellen. Signifikante Intensitätsunterschiede bestanden zwischen den entsprechend markierten Gruppen.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .*

*$n = 11$  (SID/Tumor),  $9$  (Laparotomie/Tumor),  $11$  (keine OP/Tumor),  $9$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).*

### 5.4.3 Beurteilung der Aktivität der Natürlichen Killer-Zellen anhand von CD107a und der Interferon- $\gamma$ -Produktion

Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) spielen eine wichtige Rolle in der Tumorbabwehr. Um die NK-Zellen weiter zu untersuchen, wurden die Milzen der Versuchstiere aufgearbeitet und die so gewonnenen Splenozyten bzw. Immunzellen mit verschiedenen Zytokinen (IL-2 für 22h; IL-12, IL-18 für 4h), welche insbesondere die NK-Zellen stimulieren, bzw. mit LPS (22h) inkubiert. Zum Vergleich wurden Zellen über den gleichen Zeitraum in Medium gelagert.

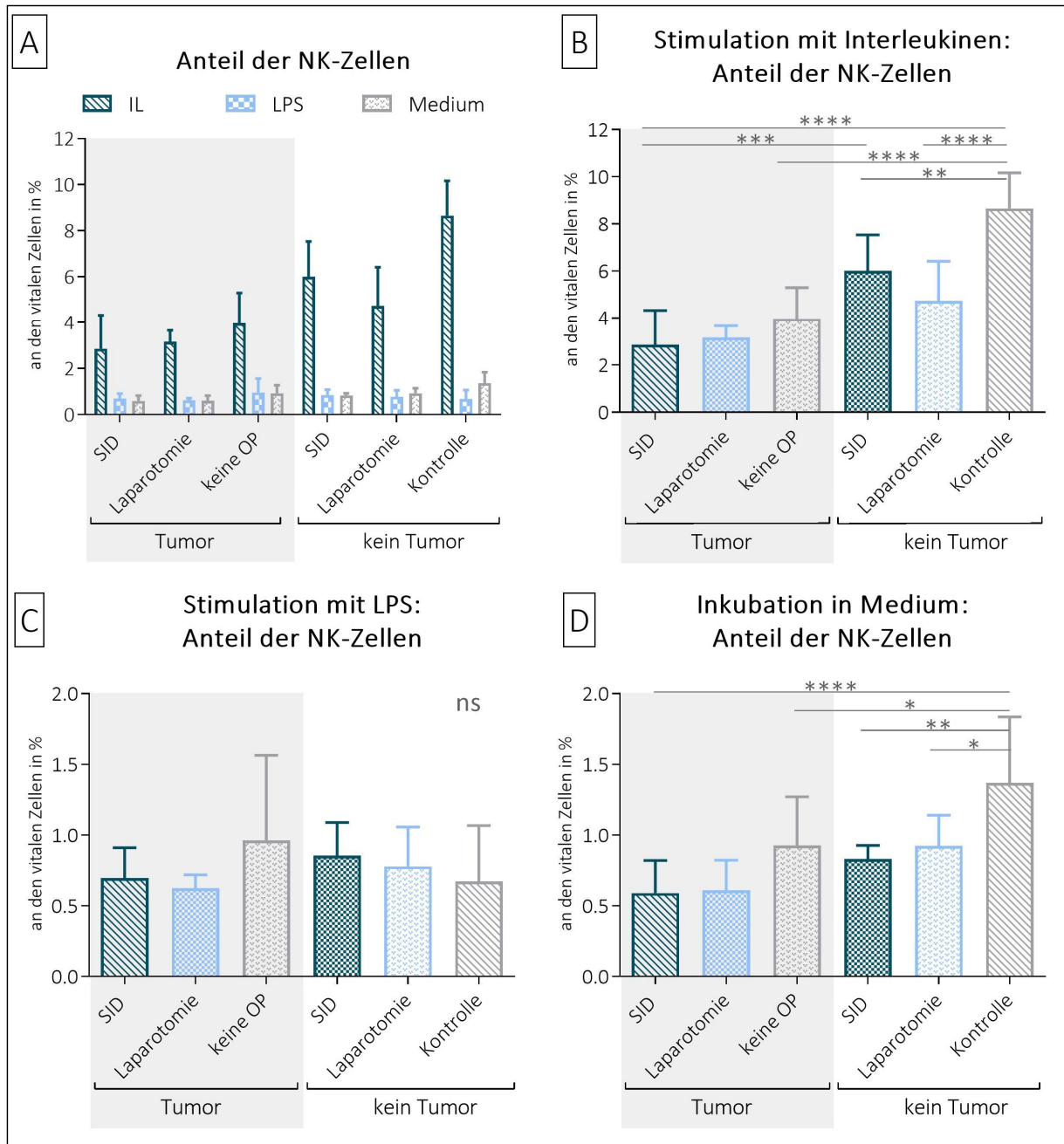
Mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Färbung wurden die NK-Zellen durch geeignete Marker innerhalb der Splenozyten kenntlich gemacht. Es wurde außerdem intrazellulär Interferon- $\gamma$  sowie der Aktivierungsmarker CD107a angefärbt, welcher Hinweise zur Funktionalität der Zellen liefern kann. Es wurde für beide Marker die GMFI, die geometrische mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt.

#### 5.4.3.1 Anteile der NK-Zellen an der Gesamtzahl der vitalen Zellen

Wie in Abbildung 26 (A) erkenntlich, reagierten die NK-Zellen signifikant unterschiedlich auf die verschiedenen Stimulanzen. Die stärksten Veränderungen im Anteil der NK-Zellen an der Gesamtpopulation zeigten sich bei der Stimulation mit den Interleukinen. Hier fielen die Anteile der NK-Zellen insgesamt deutlich größer aus und lagen im Mittel bei allen Gruppen bei deutlich über 2 %, während die NK-Zellen unter LPS und unstimuliert im Mittel nicht mehr als 1,5 % ausmachten ( $p < 0,05$ ). Während es bei der Stimulation mit LPS zu keinen signifikanten Veränderungen bzw. keinen Gruppenunterschieden kam, fielen diese bei der Interleukin-Stimulation sowie nach der Inkubation in Medium sehr deutlich aus (Abbildung 26 B-C). Der größte Anteil an NK-Zellen fand sich in der Kontrollgruppe der Interleukin-stimulierten Splenozytenpopulation und war damit (signifikant) größer als in allen anderen Versuchsgruppen. Die Werte der SID-operierten sowie Tumor-tragenden Tiere waren zusätzlich signifikant kleiner als die Werte der (nur) SID-operierten Tiere.

Auch bei der in Medium inkubierten Zellen (Abbildung 26 D) gab es ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Hier zeigten sich ebenfalls die Kontrolltiere mit einem signifikant höheren Anteil an NK-Zellen in der Zellsuspension. Auffällig ist, dass der Anteil der Natürlichen Killerzellen nach Inkubation in Medium über Nacht (ohne Stimulanz oder Hemmstoff) insgesamt geringer war als im Vergleich zu der Zellsuspension, die direkt nach Herstellung gemessen wurde (Vergleich hierzu Abbildung 20). Diese in Abschnitt 5.4.2.3. beschriebenen Werte lagen auch bei der Gruppe mit den niedrigsten Werten (SID/Tumor) im Mittel deutlich über 1 %.





**Abbildung 26** Anteile der Natürlichen Killerzellen an den vitalen Zellen nach Stimulation/im Medium

Durchflusszytometrische Messung der Anteile der NK-Zellen an den vitalen Zellen in der Milzzellsuspension nach Stimulation mit den Interleukinen IL-2, IL-12, IL-18 (B) und LPS (C) sowie nach Inkubation in Medium (D).

A: Zusammenfassung. Stimulation mit Interleukinen führte zu signifikant höheren Anteilen an NK-Zellen als Stimulation mit LPS bzw. Inkubation in Medium. B: Anteile variierten im Vergleich der Versuchsgruppen miteinander. C: Keine Gruppenunterschiede (mehr) nach Stimulation mit LPS. D: Deutlich niedrigere Werte in den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ).

A: SID/Tumor: IL vs. LPS: \*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, Laparotomie/Tumor: IL vs. LPS: \*\*, IL vs. Medium: \*, keine OP/Tumor: IL vs. LPS: \*\*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, SID: IL vs. LPS: \*\*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, Laparotomie: IL vs. LPS: \*\*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, Kontrolle: IL vs. LPS: \*\*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*

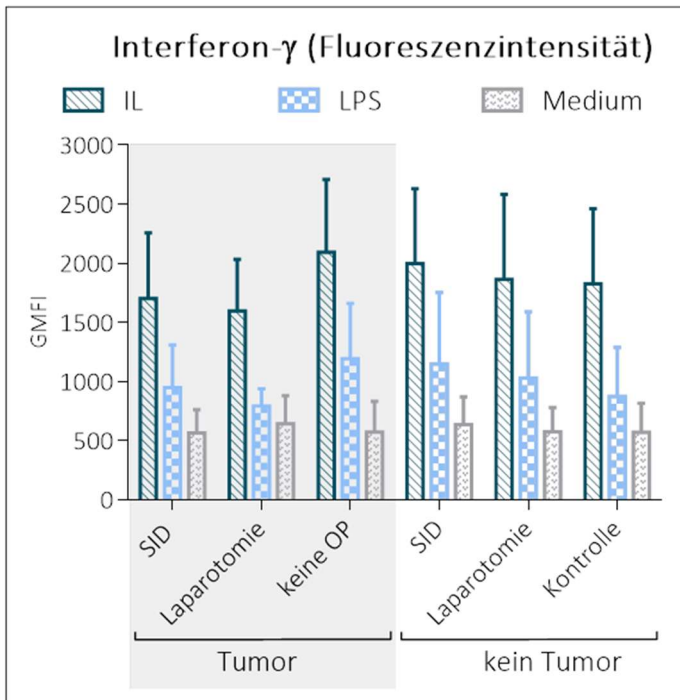
A-D: Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; ns...nicht signifikant.

$n = 9$  (SID/Tumor), 7 (Laparotomie/Tumor), 9 (keine OP/Tumor), 8 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

### 5.4.3.2 Bestimmung der GMFI von Interferon- $\gamma$

Aus den durchflusszytometrischen Daten wurde die geometrisch mittlere Fluoreszenzintensität für das intrazellulär angefärbte Interferon- $\gamma$  bestimmt und anschließend verglichen (Abbildung 27).

Auch hier sprachen die NK-Zellen unterschiedlich gut auf die Stimulationsmedien an. Die höchsten Werte ließen sich mit den Interleukinen erreichen, die niedrigsten wiesen die Zellen aus dem Kontrollmedium auf. Beim Vergleich der Versuchsgruppen miteinander ergaben sich bei keiner der Stimulationsarten signifikante Unterschiede.



**Abbildung 27** Fluoreszenzintensität von Interferon- $\gamma$  in Natürlichen Killerzellen

Durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität von Interferon- $\gamma$  in NK-Zellen nach deren Stimulation mit Interleukinen (IL), LPS und Inkubation im Medium. Keine Gruppenunterschiede innerhalb einer Stimulationsart. Stimulation mit Interleukinen führte mitunter zu signifikant höheren Werten.

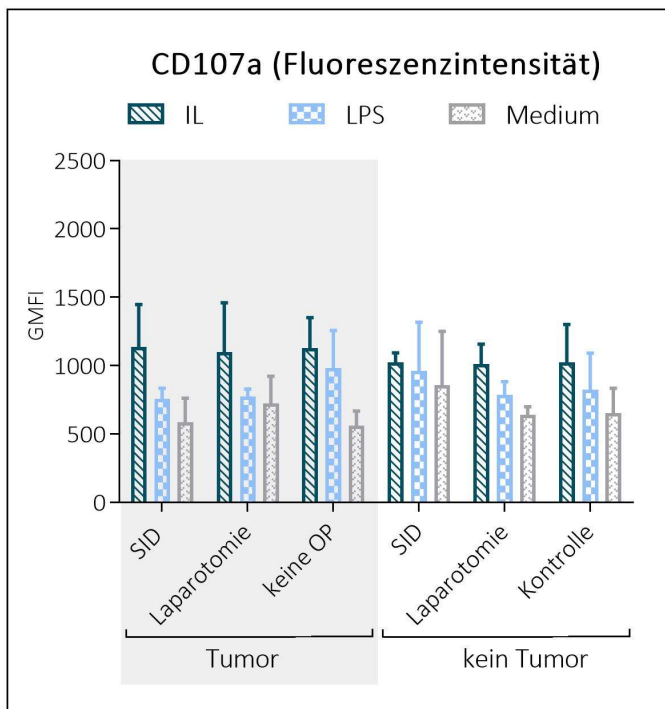
Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One/Two-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 9$  (SID/Tumor),  $7$  (Laparotomie/Tumor),  $9$  (keine OP/Tumor),  $8$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).

SID/Tumor: IL vs. LPS: \*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, Laparotomie/Tumor: IL vs. LPS: \*\*, IL vs. Medium: \*\*\*, keine OP/Tumor: IL vs. LPS: \*\*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, LPS vs. Medium: \*, SID: IL vs. LPS: \*\*, IL vs. Medium: \*\*, Laparotomie: IL vs. LPS: \*\*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, Kontrolle: IL vs. LPS: \*\*\*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*

### 5.4.3.3 Bestimmung von CD107a auf den NK-Zellen

Beim Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität des NK-Zellen-Aktivierungsmarkers CD107a ergaben sich ebenfalls zum Teil Unterschiede im Ansprechen der Zellen auf die verschiedenen Stimulanzen (siehe Abbildung 28). Die höchsten Werte ließen sich in allen Gruppen mit den Interleukinen erzielen. In der Regel erzielte die Stimulation mit Interleukinen eine signifikant höhere CD107a-Fluoreszenzintensität als die Inkubation in Medium. LPS konnte keine signifikant höhere Intensität an CD107a auf den Zellen hervorrufen als die Inkubation in Medium. Keine signifikanten Ergebnisse erbrachte der Vergleich der Versuchsgruppen untereinander innerhalb einer Stimulationsart.



**Abbildung 28 Fluoreszenzintensität von CD107a auf Natürlichen Killerzellen**

Durchflusszytometrische Messung der Fluoreszenzintensität von CD107a auf NK-Zellen nach deren Stimulation mit Interleukinen (IL), LPS und Inkubation im Medium. Keine Gruppenunterschiede innerhalb einer Stimulationsart. Stimulation mit Interleukinen führte im Vergleich zum Medium mitunter zu signifikant höheren Werten.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One/Two-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 9$  (SID/Tumor),  $7$  (Laparotomie/Tumor),  $9$  (keine OP/Tumor),  $8$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).

SID/Tumor: IL vs. LPS: \*\*, IL vs. Medium: \*\*\*\*, LPS vs. Medium: ns. Laparotomie/Tumor: IL vs. LPS: \*, IL vs. Medium: \*, LPS vs. Medium: ns. Keine OP/Tumor: IL vs. LPS: ns, IL vs. Medium: \*\*\*\*, LPS vs. Medium: \*\*. SID: IL vs. LPS: ns, IL vs. Medium: ns, LPS vs. Medium: ns. Laparotomie: IL vs. LPS: ns, IL vs. Medium: \*\*, LPS vs. Medium: ns. Kontrolle: IL vs. LPS: ns, IL vs. Medium: \*\*\*, LPS vs. Medium: ns.

## 5.5 Veränderungen in der Zytokinantwort verschiedener Kompartimente

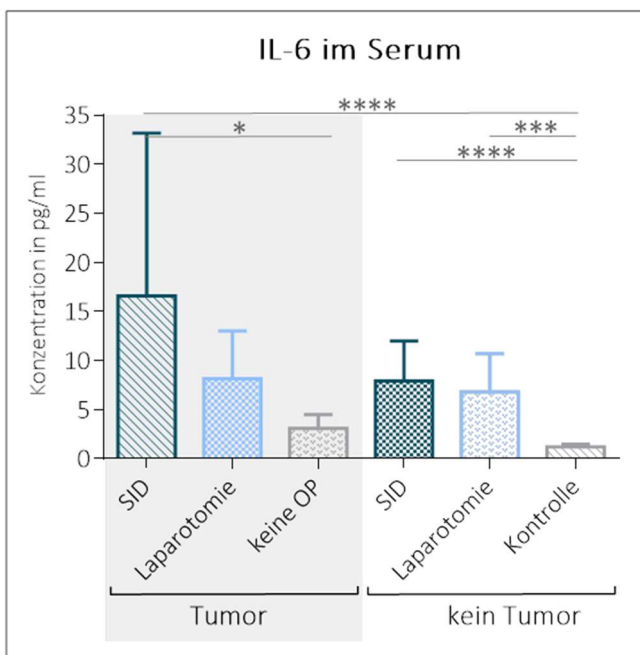
Für die Funktionen (Proliferation, Differenzierung, etc.) der Immunzellen ist es unerlässlich, dass es zwischen ihnen eine Art Informationssystem gibt. Diese Aufgabe kommt den Zytokinen zu. Zu ihnen zählen im Wesentlichen Interferone (IFN), Interleukine (IL), koloniestimulierende Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine. Um ein umfassendes Bild zu bekommen, wurden die ZytokinKonzentrationen direkt nach der Organentnahme im Serum, im Vollblut nach Stimulation mit LPS und im Überstand von nativen und mit LPS-stimulierten Splenozyten bestimmt. Ziel dieser Messung war es, mehr Informationen über die Fähigkeit der Immunzellen Zytokine auszuschütten zu erfahren, insbesondere welche unter den Bedingungen dieses Versuchs in anderer Menge freigesetzt werden und wie sich die Zytokinantwort verändert, wenn man die Zellen mit einem allgemeinen Immunstimulanz wie LPS konfrontiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Cytometric Bead Arrays, bei dem Beads und Fluoreszenzfarbstoffe an Proteine gekoppelt werden können und so die Detektion und Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie möglich ist. So konnten folgende Zytokine gemessen werden: IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-21, TNF- $\alpha$  und MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein).

## 5.5.1 Zytokinkonzentrationen im Blut

### 5.5.1.1 Zytokine im Serum

Im Serum wiesen nur drei der elf gemessenen Zytokine signifikant veränderte Konzentrationen auf. Bei IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12p70, IL-13 und IL-21 war in keiner der Gruppen eine Konzentration messbar (Daten nicht gezeigt). Für IL-1 $\beta$ , IL-4 und MCP-1 konnten Konzentrationen bestimmt werden, es zeigten sich allerdings keine Gruppenunterschiede (Daten nicht gezeigt).

Die SID-operierten und zugleich Tumor-tragenden Tiere wiesen eine signifikant höhere Konzentration an IL-6 im Serum auf (Siehe Abbildung 29) als die Tiere, die nur einen Tumor hatten und als die nativen Kontrolltiere. Der Vergleich dieser Gruppe (SID/Tumor) mit den SID-operierten Tieren ergab keinen signifikanten Unterschied, auch wenn ihr Mittelwert mit  $7,91 \pm 4,1$  pg/ml deutlich niedriger war. Die Tiere der Kontrollgruppe hatten außerdem signifikant niedrigere Konzentrationen an IL-6 im Serum als die Tiere, die nur SID-operiert bzw. nur laparotomiert wurden.



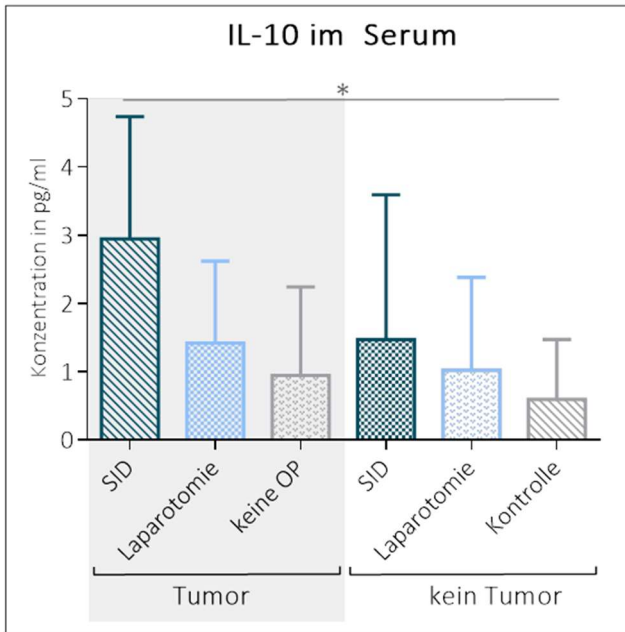
**Abbildung 29** Konzentration von IL-6 im Serum

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentrationen in den Gruppen, in denen die Tiere operiert (SID/Laparotomie) wurden im Vergleich zur Kontrolle sowie SID/Tumor versus keine OP/Tumor.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 10$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 10 (keine OP/Tumor), 10 (SID), 15 (Laparotomie), 11 (Kontrolle).

Die IL-10-Konzentration im Serum (siehe Abbildung 30) lag in allen Gruppen bei einem ähnlichen Wert (Mittelwerte zwischen 0,5955 pg/ml und 1,474 pg/ml), mit Ausnahme der Gruppe, in der die Tiere sowohl einen Tumor trugen als auch SID operiert wurden. Nur hier waren die Werte signifikant höher als in der Kontrollgruppe.



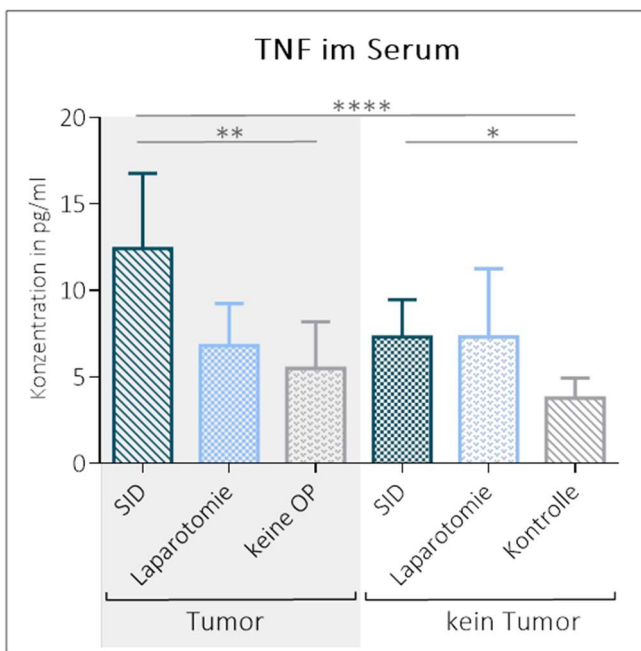
**Abbildung 30 Konzentration von IL-10 im Serum**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentrationen in der Gruppe SID/Tumor im Vergleich zur Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 10$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 10 (keine OP/Tumor), 10 (SID), 15 (Laparotomie), 11 (Kontrolle).

Der Vergleich der **TNF**-Konzentrationen wies wiederum deutlichere Unterschiede auf (siehe Abbildung 31). Die höchste Konzentration an TNF zeigte sich im Serum der SID-operierten und zugleich Tumor-tragenden Tiere und war damit signifikant erhöht gegenüber den Werten der Tiere, die nur einen Tumor aufwiesen und den nativen Kontrolltieren. Auch im Serum der nur SID-operierten Tiere fand sich eine signifikant höhere Konzentration an TNF ( $7,309 \pm 2,145$  pg/ml) als in der diesbezüglichen Kontrolle.



**Abbildung 31 Konzentration von TNF im Serum**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentrationen in den Gruppen, in denen die Tiere operiert (SID) wurden im Vergleich zur Kontrolle sowie ‚SID/Tumor‘ versus ‚keine OP/Tumor‘.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

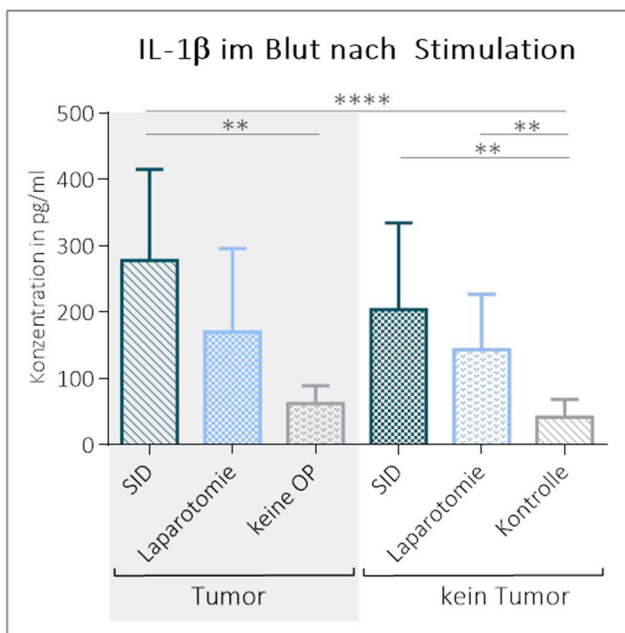
$n = 10$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 10 (keine OP/Tumor), 10 (SID), 15 (Laparotomie), 11 (Kontrolle).

### 5.5.1.2 Zytokinkonzentration im Vollblut nach Stimulation

Um Unterschiede (in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung) in der Fähigkeit der Immunzellen im Blut auf einen Reiz mit einer veränderten Zytokinausschüttung zu reagieren festzustellen, wurden Vollblutproben für 24 h mit dem Entzündungsmarker LPS stimuliert.

Auch hier gab es Zytokine wie IFN- $\gamma$  und IL-2, die in keiner Gruppe messbar waren. Messbare, aber nicht signifikant verschiedene Zytokinkonzentrationen sah man bei IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-21 und auch TNF (gezeigt werden nur die Daten zu TNF).

Nach Stimulation mit LPS wurden bei **IL-1 $\beta$**  deutliche Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt (siehe Abbildung 32). So wies die Gruppe mit den sowohl SID-operierten als auch Tumor-tragenden Tieren die höchsten Konzentrationen an IL-1 $\beta$  auf. Diese waren signifikant höher als in den Gruppen, in denen die Tiere nur einen Tumor erhielten und höher als im Blut der Kontrolltiere. Die Kontrolle zeigte ebenfalls signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den Gruppen ‚SID‘ und ‚Laparotomie‘.



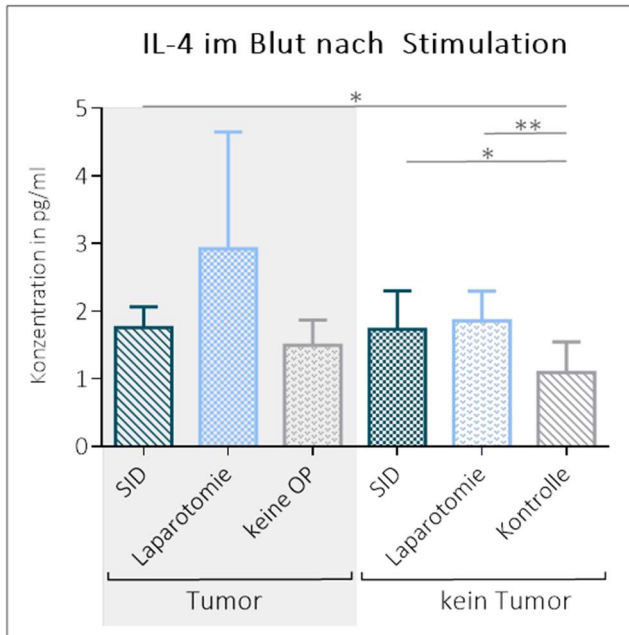
**Abbildung 32** Konzentration von IL-1 $\beta$  im Blut nach Stimulation

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentrationen in den Gruppen, in denen die Tiere operiert (SID) wurden im Vergleich zur Kontrolle sowie SID/Tumor versus keine OP/Tumor und Laparotomie versus Kontrolle.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .*

*n = 11 (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 11 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).*

Die Kontrolltiere wiesen im stimulierten Blut außerdem signifikant niedrigere Konzentrationen an **IL-4** (Abbildung 33) auf als im Vergleich zu den laparotomierten, SID-operierten und zu den sowohl SID-operierten als auch Tumor-tragenden Tieren.

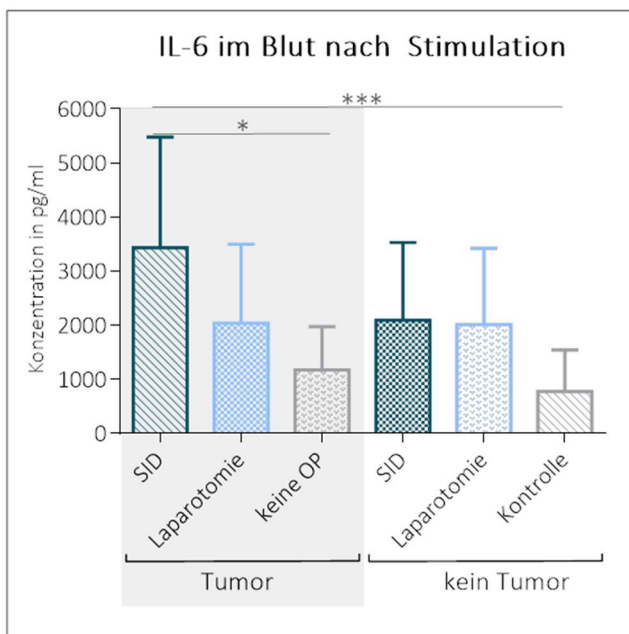


**Abbildung 33 Konzentration von IL-4 im Blut nach Stimulation**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentrationen in den Gruppen, in denen die Tiere operiert (SID/Tumor, SID, Laparotomie) wurden im Vergleich zur Kontrolle sowie Laparotomie versus Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .  $n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 11 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Die sowohl nach der SID-Methode operierten als auch Tumor-tragenden Tiere wiesen die höchsten Konzentrationen an IL-6 (Abbildung 34) im stimulierten Blut auf und hatten damit signifikant höhere Werte als Tiere, die nur einen Tumor implantiert bekamen und als die Kontrolltiere.



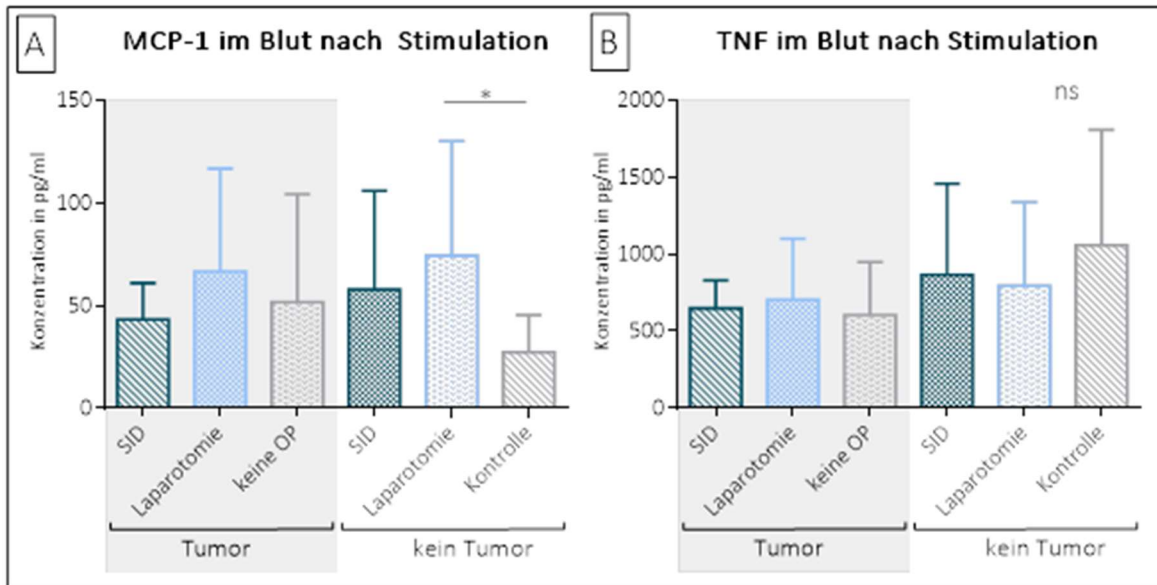
**Abbildung 34 Konzentration von IL-6 im Blut nach Stimulation**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentrationen in der Gruppe SID/Tumor im Vergleich zur Kontrolle und zu den Tumor-tragenden Tieren (keine zusätzliche OP).

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .  $n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 11 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Bei der Messung der **MCP-1**-Konzentration (siehe Abbildung 35 A) zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den laparotomierten und den Kontrolltieren.

Auch wenn die **TNF**-Konzentrationen (Abbildung 35 B) nach der Stimulation über alle Gruppen insgesamt deutlich größer waren als im Serum (Vergleich mit Abbildung 31), konnten bei tendenziell höheren Werten in der Kontrollgruppe keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden.



**Abbildung 35 Konzentration von MCP-1 und TNF im Blut nach Stimulation**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. A: Signifikant erhöhte Konzentrationen in der Laparotomie-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. B: Keine Gruppenunterschiede bei TNF.

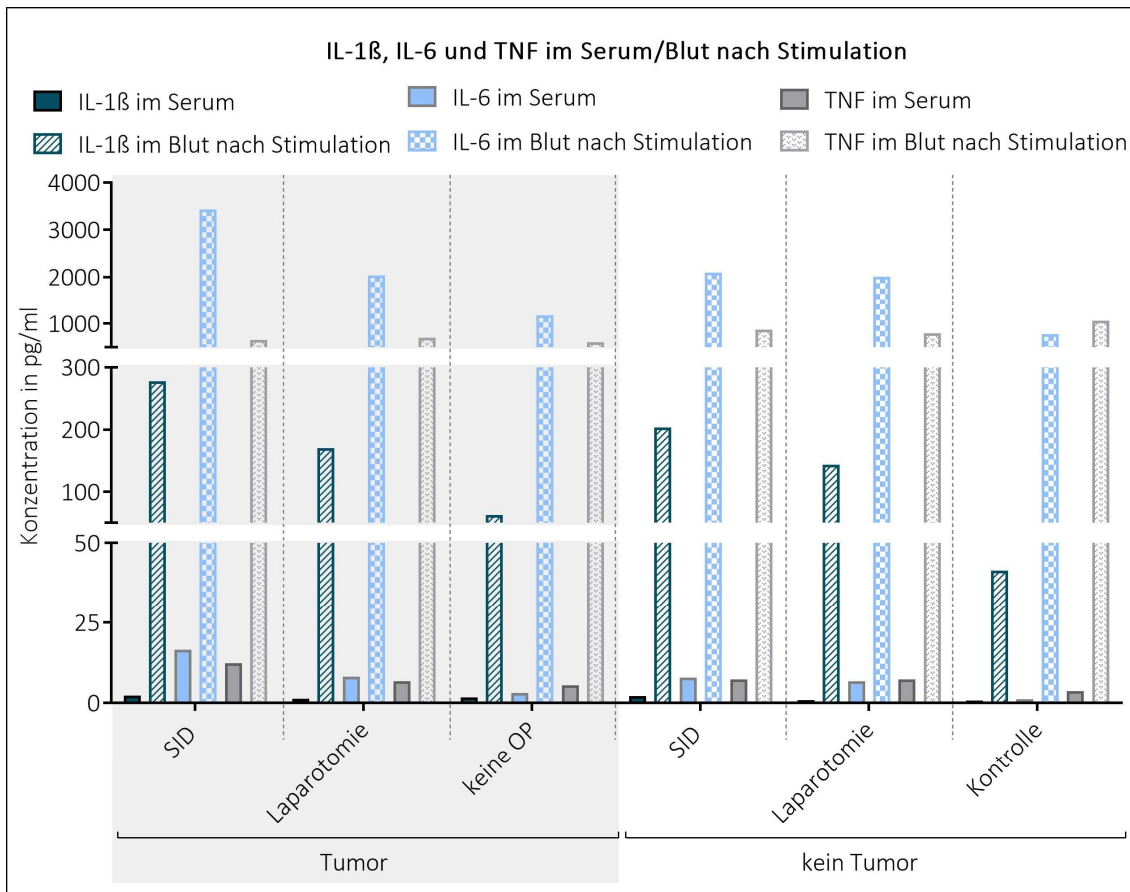
Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveau: \*  $p \leq 0,05$ ; ns...nicht signifikant.

$n = 11$  (SID/Tumor),  $9$  (Laparotomie/Tumor),  $11$  (keine OP/Tumor),  $11$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).

### 5.5.1.3 Zusammenschau

Betrachtet man nun noch einmal die Zytokine mit den stärksten Veränderungen (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF), so zeigten sich deutlich unterschiedliche Konzentrationen vor und nach der Stimulation. Alle drei Zytokine wiesen im Serum noch einstellige bis niedrig zweistellige Konzentrationen auf und waren nach der Stimulation mit LPS deutlich angestiegen (Abbildung 36). Bei IL-1 $\beta$  gab es vor der Stimulation noch keine Gruppenunterschiede, bei IL-6 und TNF fielen diese vorher sehr deutlich aus. Bei IL-1 $\beta$  und IL-6 zeigten sich nach der Stimulation signifikante Unterschiede. Die Werte der SID-operierten Tiere beider Gruppen (Tumor/kein Tumor) wiesen die höchsten Mittelwerte auf. Die Kombination aus Tumor und SID-Operation ergab signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich zur Gruppe „keine OP/Tumor“ und der Kontrolle. Bei TNF ergaben sich vor der Stimulation im Serum, aber nicht mehr danach, signifikante Gruppenunterschiede





**Abbildung 36 Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF im Serum/Blut nach Stimulation**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Nach der Stimulation waren deutlich höhere Konzentrationen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF im Blut messbar.

Darstellung des Mittelwerts. Für weitere Details siehe Abbildung 29, 31, 32, 34 und 35.

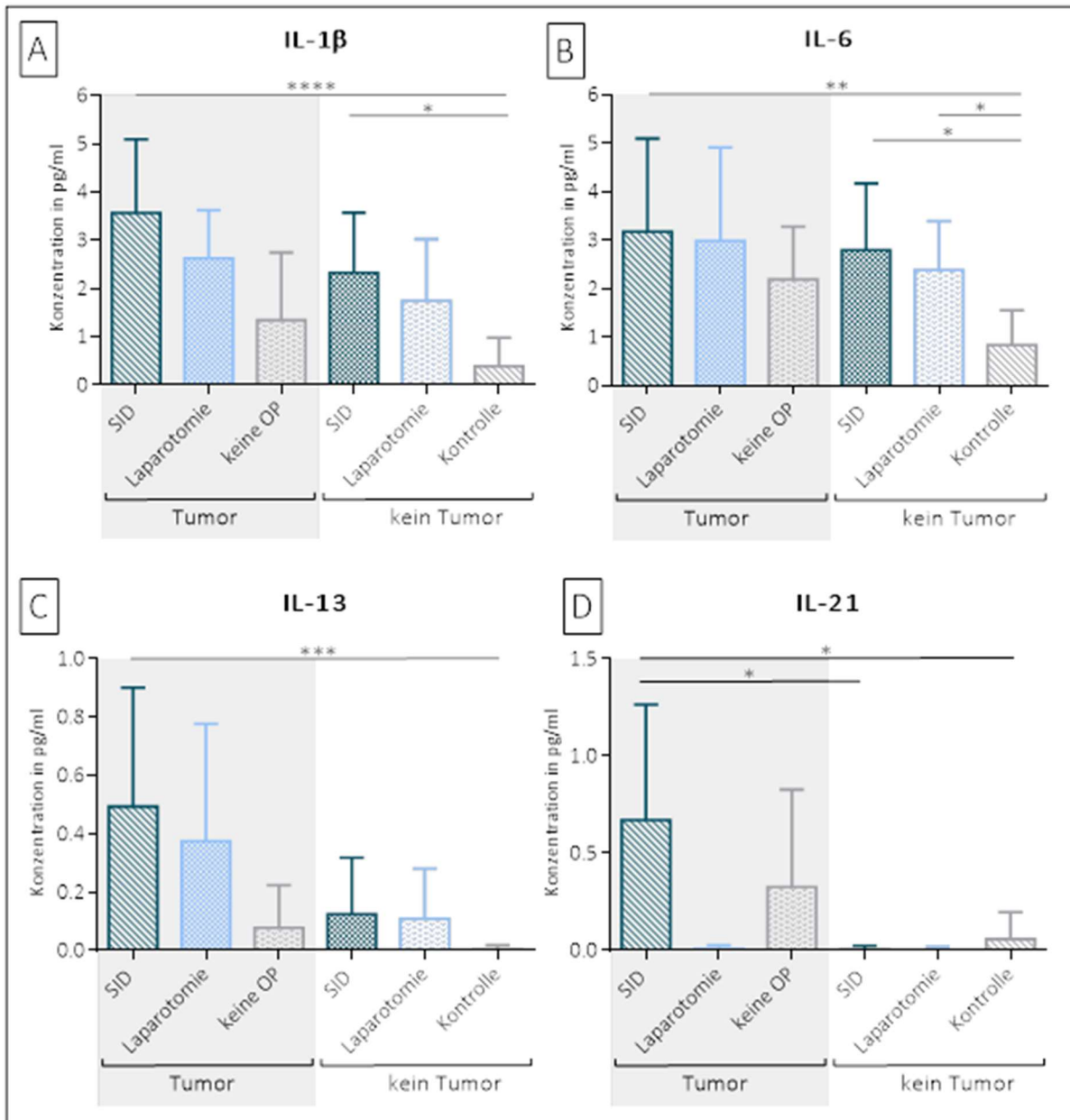
### 5.5.2 Zytokinkonzentration im Splenozytenüberstand ohne und nach Stimulation mit LPS

In der Milz findet sich eine hohe Dichte verschiedener Immunzellen. So bestimmten wir im Splenozytenüberstand die Konzentration verschiedener Zytokine und setzten die Splenozyten durch die Stimulation mit LPS einem zweiten inflammatorischen Reiz aus, um ihre Fähigkeit zur Zytokinausschüttung daraufhin beurteilen zu können.

#### 5.5.2.1 Zytokinkonzentrationen im unbehandelten Splenozytenüberstand

Mit Ausnahme von IL-2, IL-10 und TNF fanden sich bei allen gemessenen Zytokinen signifikante Gruppenunterschiede, insbesondere der Vergleich der Werte der sowohl SID-operierten als auch Tumor-tragenden Tiere im Vergleich zur Kontrolle (signifikant bei IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, IL-21, MCP-1). Bei IL-6 und IL-12p70 zeigte sich außerdem der Vergleich von Laparotomie und Kontrolle signifikant verändert. Zusätzlich wiesen IL-1 $\beta$  und IL-6 in der Gruppe der (nur) SID-operierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant höhere Werte auf. Die Gegenüberstellung der Versuchsgruppen der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere versus SID-Operation

alleine brachte bei IL-21 zusätzlich signifikante Ergebnisse. Da insgesamt nur sehr geringe Konzentrationen gemessen (< 20 pg/ml) wurden, sind in der Abbildung 37 nur die Zytokine gezeigt, bei denen entweder mehr als zwei Gruppenvergleiche signifikant waren bzw. ein höheres Signifikanzniveau (ab  $p \leq 0,01$ ) erreicht wurde. Dies ist bei IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 und IL-21 der Fall.



**Abbildung 37 Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 und IL-21 im unbehandelten Splenozytenüberstand**

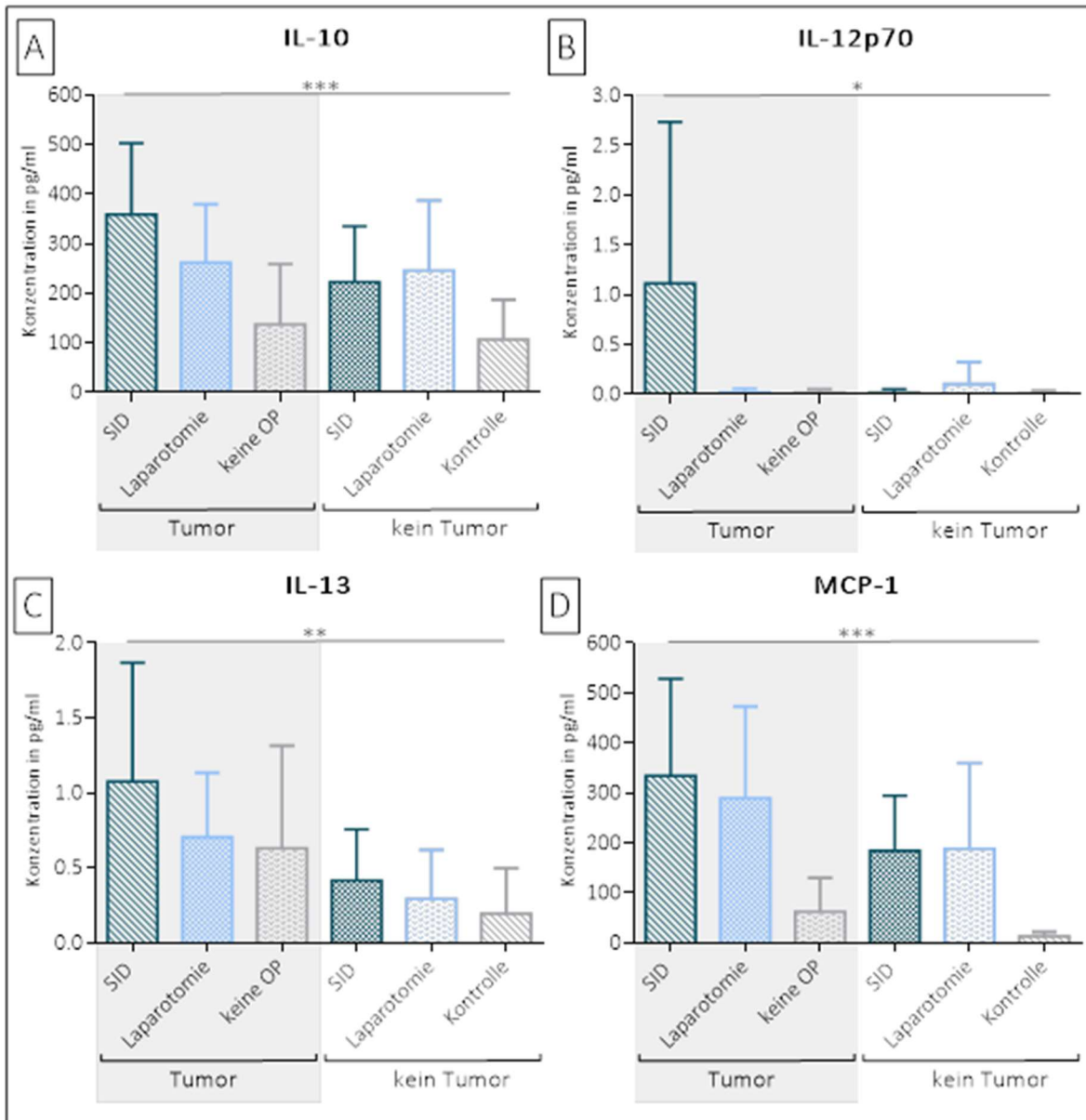
Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. A-D: Signifikant erhöhte Konzentrationen in der Gruppe SID/Tumor im Vergleich zur Kontrolle. A: SID signifikant größer als die Kontrolle. B: Kontrolle im Vergleich zu SID und Laparotomie signifikant geringere Werte. D: SID/Tumor versus SID signifikant größer.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 9$  (SID/Tumor), 7 (Laparotomie/Tumor), 9 (keine OP/Tumor), 8 (SID), 12 (Laparotomie), 12 (Kontrolle).

### 5.5.2.2 Zytokinkonzentrationen im Überstand von mit LPS-stimulierten Splenozyten

Es gab Zytokine, deren Konzentration sich nach Stimulation mit LPS nicht oder nur geringfügig verändert hatte (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4; Daten nicht gezeigt). Bei IL-10, IL-12p70, IL-13 und MCP-1 (Abbildung 38) war die Konzentration nur im Vergleich der Kontrolltiere mit den sowohl SID-operierten als auch Tumor-tragenden Tieren signifikant verschieden. Die Konzentrationen der zuletzt genannten Gruppe waren immer die höchsten. IL-12p70 konnte nur bei den laparotomierten und den sowohl SID-operierten als auch Tumor-tragenden Tieren nachgewiesen werden.

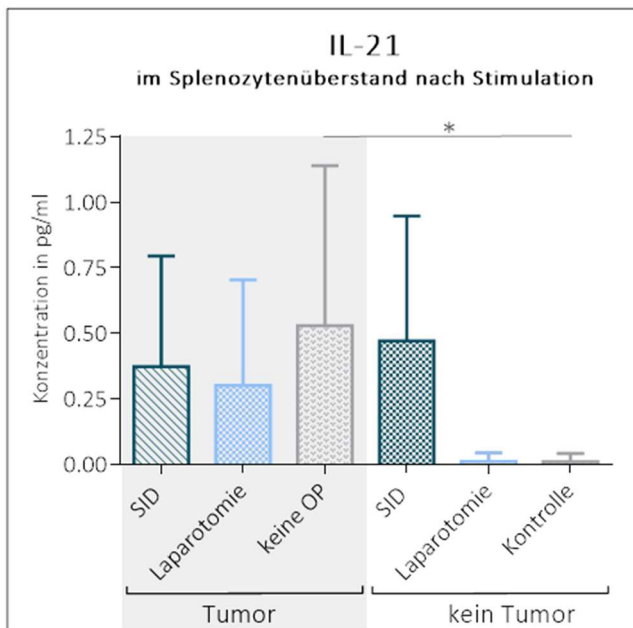


**Abbildung 38** Konzentration von IL-10, IL-12p70, IL-13 und MCP-1 im Splenozytenüberstand nach Stimulation

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. A-D: Signifikant erhöhte Konzentrationen in der Gruppe SID/Tumor im Vergleich zur Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .  $n = 9$  (SID/Tumor), 7 (Laparotomie/Tumor), 9 (keine OP/Tumor), 8 (SID), 11 (Laparotomie), 12 (Kontrolle).

Bei der Messung von **IL-21** im Überstand zeigte sich nur der Vergleich der Konzentrationen bei den rein Tumor-tragenden Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant (siehe Abbildung 39).



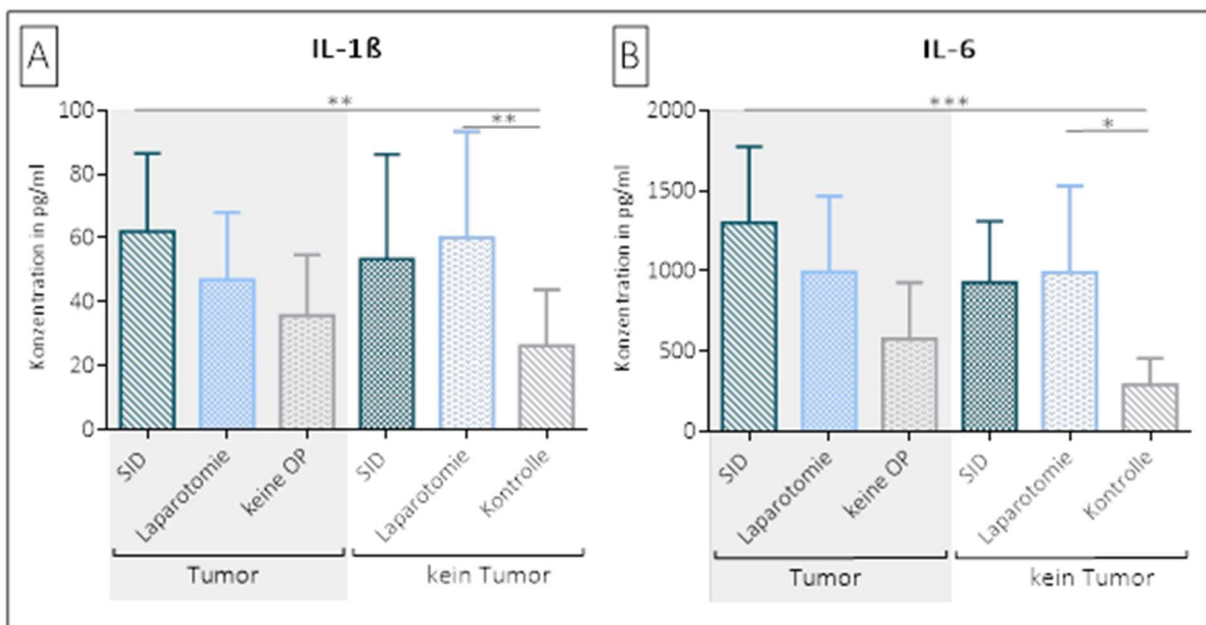
**Abbildung 39 Konzentration von IL-21 im Splenozytenüberstand nach Stimulation**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentration in der Gruppe, in denen die Tiere nur einen Tumor implantiert bekamen im Vergleich zur Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ .

$n = 9$  (SID/Tumor), 7 (Laparotomie/Tumor), 9 (keine OP/Tumor), 8 (SID), 11 (Laparotomie), 12 (Kontrolle).

Bei **IL-1 $\beta$**  und **IL-6** zeigten sich im Vergleich der Zytokinkonzentrationen im Überstand der sowohl SID-operierten als auch Tumor-tragenden sowie der laparotomierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant höhere Werte (siehe Abbildung 40).

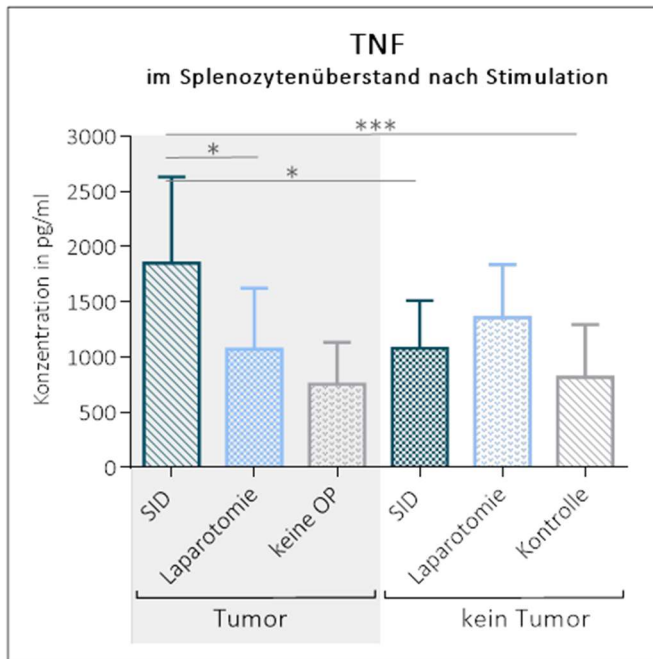


**Abbildung 40 Konzentration von IL-1 $\beta$  und IL-6 im Splenozytenüberstand nach Stimulation**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Signifikant erhöhte Konzentration in der Gruppe SID/Tumor im Vergleich zur Kontrolle und Laparotomie versus Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .  $n = 9$  (SID/Tumor), 7 (Laparotomie/Tumor), 9 (keine OP/Tumor), 8 (SID), 11 (Laparotomie), 12 (Kontrolle).

Die stärksten Veränderungen zeigten sich bei der Messung von **TNF** (siehe Abbildung 41). Hier wiesen die Tiere, die sowohl SID-operiert wurden, als auch einen Tumor trugen die höchsten Konzentrationen dieses Zytokins auf und hatten damit signifikant höhere Werte als die SID-operierten Tiere ohne Tumor, die Tiere die außer der Tumorimplantation nur laparotomiert wurden und der Kontrolltiere ohne Tumor.



**Abbildung 41 Konzentration von TNF im Splenozytenüberstand nach Stimulation**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie. Die Werte der Gruppe SID/Tumor zeigten sich signifikant erhöht verglichen mit den Werten der Gruppe Laparotomie/Tumor, SID und der Kontrolle.

*Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .*

*n = 9 (SID/Tumor), 7 (Laparotomie/Tumor), 9 (keine OP/Tumor), 8 (SID), 11 (Laparotomie), 12 (Kontrolle).*

### 5.5.3 Zusammenfassung

Insgesamt zeichnete sich ein heterogenes Bild bezogen auf die veränderten Zytokine in Milz und Blut ab. Im Überstand der ex vivo inkubierten Splenozyten zeigten sich insgesamt mehr Zytokine mit signifikanten Gruppenunterschieden im Vergleich zu den Messungen im Blut (siehe Tabelle 6). Der am häufigsten signifikant ausfallende Vergleich war der der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere mit den Kontrolltieren. Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die Ergebnisse in allen Kompartimenten.

	<u>Blut</u>		<u>Splenozytenüberstand</u>	
	nicht stimuliert	stimuliert	nicht stimuliert	stimuliert
IFN- $\gamma$	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	signifikant	nicht signifikant
IL-1 $\beta$	nicht signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
IL-2	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht signifikant	nicht signifikant
IL-4	nicht signifikant	signifikant	signifikant	nicht signifikant
IL-6	signifikant	signifikant	signifikant	signifikant

IL-10	signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	signifikant
IL-12p70	nicht nachweisbar	nicht signifikant	signifikant	signifikant
IL-13	nicht nachweisbar	nicht signifikant	signifikant	signifikant
IL-21	nicht nachweisbar	nicht signifikant	signifikant	signifikant
MCP-1	nicht signifikant	signifikant	signifikant	signifikant
TNF	signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant	signifikant

**Tabelle 6 Übersicht über die Ergebnisse der Zytokinmessungen**

Messung mittels Cytometric Bead Array in der Durchflusszytometrie im unstimulierten und stimulierten Blut/Splenozytenüberstand. Tiefe der Blaufärbung spiegelt Grad der Veränderung.

weiß...Zytokin war nicht nachweisbar; hellblau: Zytokin nachweisbar, aber keine Gruppenunterschiede; mittelblau: 1-2 Gruppenvergleiche mit signifikanten Ergebnissen; dunkelblau: 3-4 Gruppenvergleiche mit signifikanten Ergebnissen

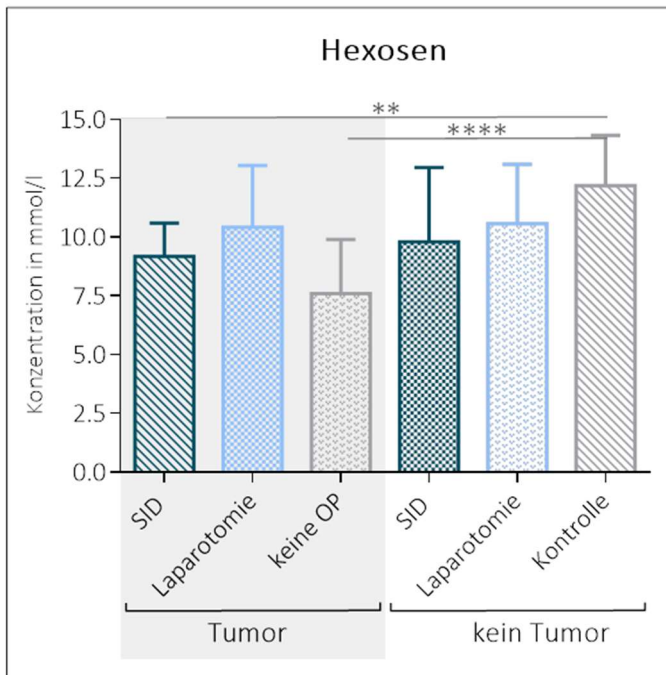
## 5.6 Analyse des Stoffwechsels

Ein maligner Prozess kann zu einer Veränderung des Metabolismus in einem Organismus führen. In diesem Projekt war daher eine durch einen operativen Eingriff möglicherweise veränderte Stoffwechsellage in diesem Zusammenhang Gegenstand der Untersuchung.

Hierfür wurden Blutplasmaproben eines jeden Tieres für die Massenspektrometrie aufgearbeitet und mit einem speziellen Kit (AbsoluteIDQ p180 Kit, Biocrates) gemessen. Mit diesem Kit konnten über 180 verschiedene Metaboliten aus den Stoffklassen der Monosaccharide (Hexosen), Aminosäuren, biogenen Amine, Acylcarnitine, Glycerophospholipide und Sphingolipide bestimmt werden.

### 5.6.1 Hexosen

Zu den Hexosen zählen insbesondere die Glucose und die Fructose sowie Galactose und Mannose und einige weitere (siehe Abbildung 42). Im Plasma der Kontrolltiere fand man den höchsten Spiegel an Hexosen. Dieser lag signifikant über dem der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere und dem der alleinig Tumor-tragenden Tiere. Die sowohl Tumor-tragenden als auch laparotomierten Tiere sowie die nur SID-operierten bzw. nur laparotomierten Tiere wiesen einen Wert um die 10 mmol/l im Plasma auf und waren damit nicht signifikant verändert.



**Abbildung 42** Konzentration an Hexosen im Blutplasma

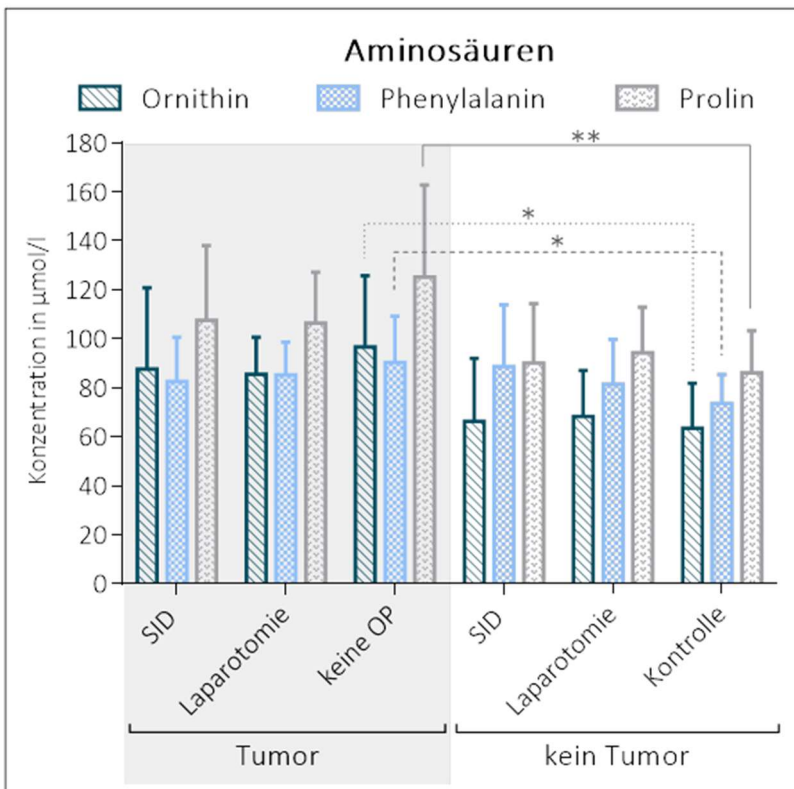
Messung mittels Massenspektrometrie. Die Werte der Gruppe SID/Tumor und keine OP/Tumor zeigten sich signifikant erhöht verglichen mit den Werten der Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

### 5.6.2 Aminosäuren

Es wurden für alle 21 Aminosäuren die Konzentrationen im Blut bestimmt (Abbildung 43). Lediglich bei Ornithin, Phenylalanin und Prolin konnten bei den (nur) Tumor-tragenden Tieren signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Insgesamt lagen die Werte aller Tumor-tragenden Tiere tendenziell über denen der Tiere ohne Tumor.



**Abbildung 43** Konzentration der Aminosäuren Ornithin, Phenylalanin und Prolin im Blutplasma

Messung mittels Massen-spektrometrie. Die Werte der Gruppe keine OP/Tumor zeigten sich signifikant erhöht verglichen mit den Werten der Kontrolle.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

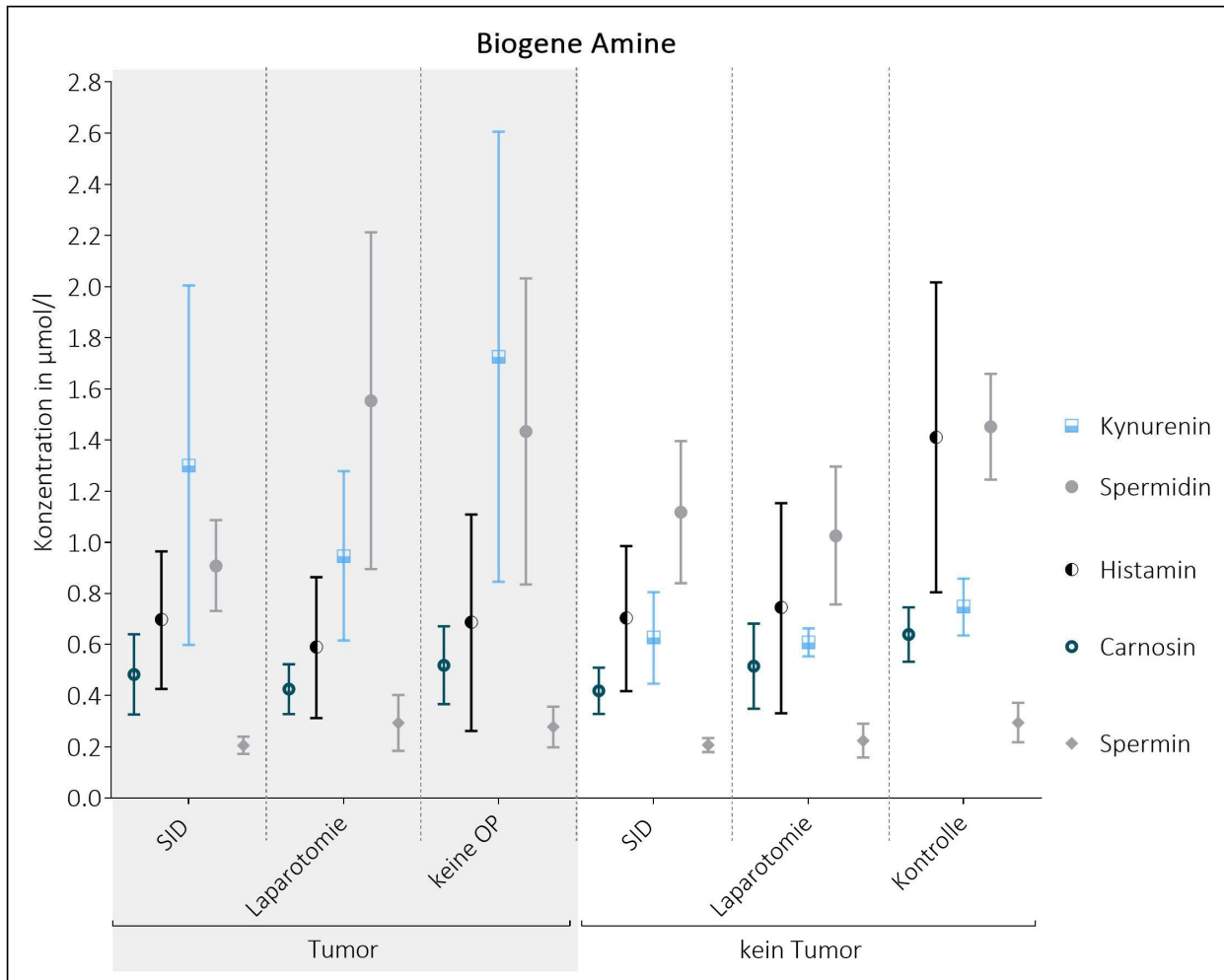
$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

### 5.6.3 Biogene Amine

---

Abgeleitet von Aminosäuren bilden die biogenen Amine u.a. Vorstufen von Hormonen, Neurotransmittern oder Vitaminen. Von den möglichen 21 verschiedenen biogenen Aminen ließen sich bei fünf interessante Ergebnisse beobachten (Abbildung 44). Der Vergleich, der am häufigsten einen signifikanten Unterschied zeigte, war der zwischen den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren und den Kontrolltieren. Der Fall war dies bei Histamin, Spermidin, Carnosin und Spermin. Ebenso der Vergleich der Konzentrationen der (nur) Tumor-tragenden bzw. (nur) SID-operierten Tiere mit der Kontrolle ergab häufig signifikante Ergebnisse. So war dies bei Histamin und Kynurenin bzw. bei Histamin, Carnosin und Spermin. Auch der Vergleich der Konzentrationen der (nur) Tumor-tragenden bzw. (nur) SID-operierten Tiere mit der Kontrolle ergab häufig signifikante Ergebnisse. Dies wurde bei Histamin und Kynurenin bzw. bei Histamin, Carnosin und Spermin beobachtet. Bei der Messung von Histamin, Spermidin und Spermin wiesen die laparotomierten Tiere signifikant niedrigere Konzentrationen auf als die Kontrolltiere. Weitere Vergleiche ergaben ebenfalls signifikante Ergebnisse, welche sich allerdings nur bei einer geringeren Zahl unterschiedlicher biogener Amine zeigten.





**Abbildung 44 Konzentration an biogenen Aminen im Blutplasma**

Messung von T4-OH-Prolin, Kreatinin, Serotonin, Met-SO, Histamin, Spermidin, Kynurenin, Carnosin und Spermin im Blutplasma mittels Massenspektrometrie.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

Kynurenin: SID/Tumor vs. SID: \*\*, keine OP/Tumor vs. Kontrolle: \*\*. Spermidin: SID/Tumor vs. Laparotomie/Tumor: \*, SID/Tumor vs. Kontrolle: \*\*, Laparotomie vs. Kontrolle: \*\*. Histamin: SID/Tumor vs. Kontrolle: \*\*, Keine OP/Tumor vs. Kontrolle: \*\*, SID vs. Kontrolle: \*, Laparotomie vs. Kontrolle: \*. Carnosin: SID/Tumor vs. Kontrolle: \*, SID vs. Kontrolle: \*\*. Spermin: SID/Tumor vs. Kontrolle: \*, SID vs. Kontrolle: \*, Laparotomie vs. Kontrolle: \*.

### 5.6.4 Acylcarnitine

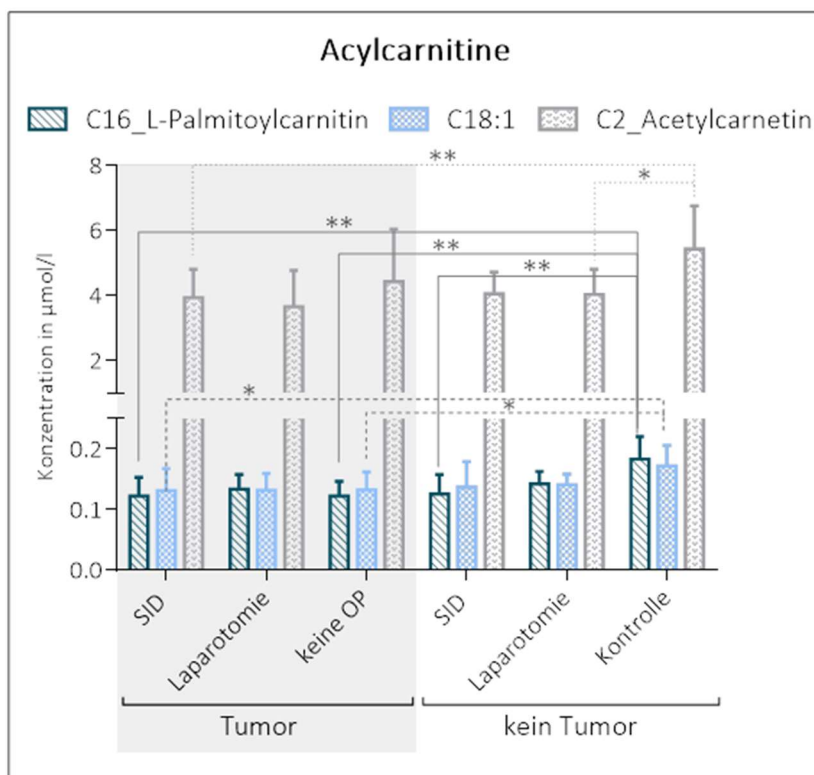
Acylcarnitine spielen eine große Rolle bei dem Transport von Fettsäuren in die Mitochondrien und können somit Hinweise zur  $\beta$ -Oxidation (also dem Abbau der Fettsäuren) liefern. Drei verschiedene Substanzen dieser Stoffklasse wiesen signifikante Unterschiede auf (Abbildung 45).

Sowohl **C16 L-Palmitoylcarnitin** als auch **C18:1** und **C2-Acetylcarnitin** zeigten sich in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere signifikant erniedrigt verglichen mit den Werten der Kontrolltiere.

Die **C16 L-Palmitoylcarnitin**-Konzentration fiel außerdem in der Gruppe der Tumor-tragenden Tiere und der SID-operierten Tiere signifikant geringer aus als in der Gruppe der Kontrolltiere.

Bei der Messung von **C18:1** zeigte außerdem die Gruppe der (nur) Tumor-tragenden Tiere signifikant niedrigere Werte verglichen mit der Gruppe der Kontrolltiere.

**C2-Acetylcarnitin** zeigte zusätzlich bei den laparotomierten Tieren niedrigere Werte als in der Kontrolle.



**Abbildung 45 Konzentration an Acylcarnitinen im Blutplasma**

Messung von C16 L-Palmitoylcarnitin, C18:1 und C2-Acetylcarnitin im Blutplasma mittels Massenspektrometrie. Signifikant veränderte Konzentrationen (im Vergleich zu Kontrolle) insbesondere bei SID/Tumor.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppen-unterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanz-niveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

$n = 11$  (SID/Tumor),  $9$  (Laparotomie/Tumor),  $11$  (keine OP/Tumor),  $9$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).

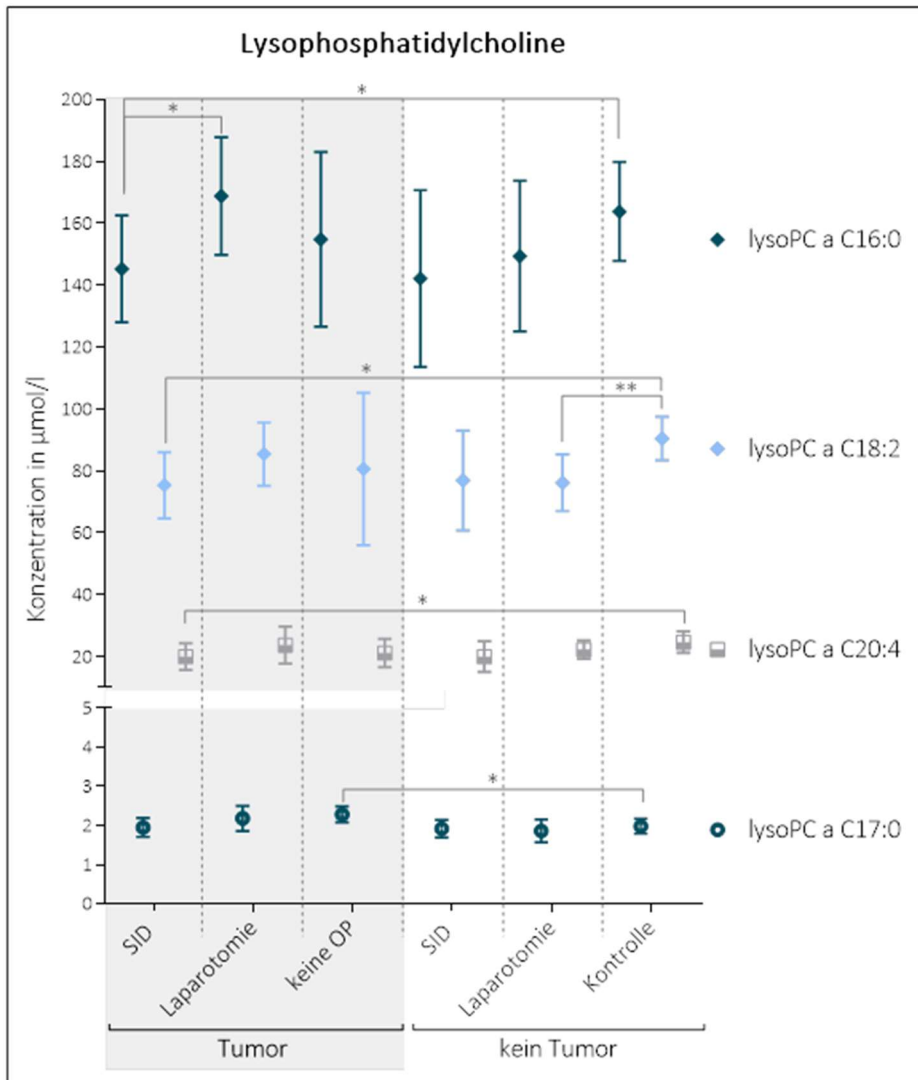
## 5.6.5 Glycerophospholipide

Glycerophospholipide sind am Aufbau von Membranen und der Verankerung von Proteinen in dieser beteiligt. (Lyso)phosphatidylcholine können auch Bestandteil verschiedener Signalwege sein (u.a. Rekrutierung von Phagozyten und Apoptose).

### 5.6.5.1. Lysophosphatidylcholine

Abbildung 46 zeigt, dass drei der vier gemessenen Lysophosphatidylcholine (**lysoPC a C16:0**, **C18:2**, **C20:4**) in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere signifikant niedrigere Konzentrationen aufwiesen als in der Kontrollgruppe. Bei **lysoPC a C16:0** zeigten die

sowohl Tumor-tragenden als auch laparotomierten Tiere signifikant höhere Konzentrationen als die Tumor-tragenden und zugleich SID-operierten Tiere. Die laparotomierten Tiere zeigten außerdem signifikant niedrigere Konzentrationen an lysoPC a C18:2 im Vergleich zur Kontrolle. Die Konzentration an lysoPC a C17:0 lag in der Gruppe der Tumor-tragenden Tiere (keine weitere OP) signifikant über der Kontrolle.



**Abbildung 46** Konzentration von Lysophosphatidylcholinen im Blutplasma

Messung von lysoPC a C16:0, C18:2, C20:4 und C17:0 im Blutplasma mittels Massenspektrometrie.

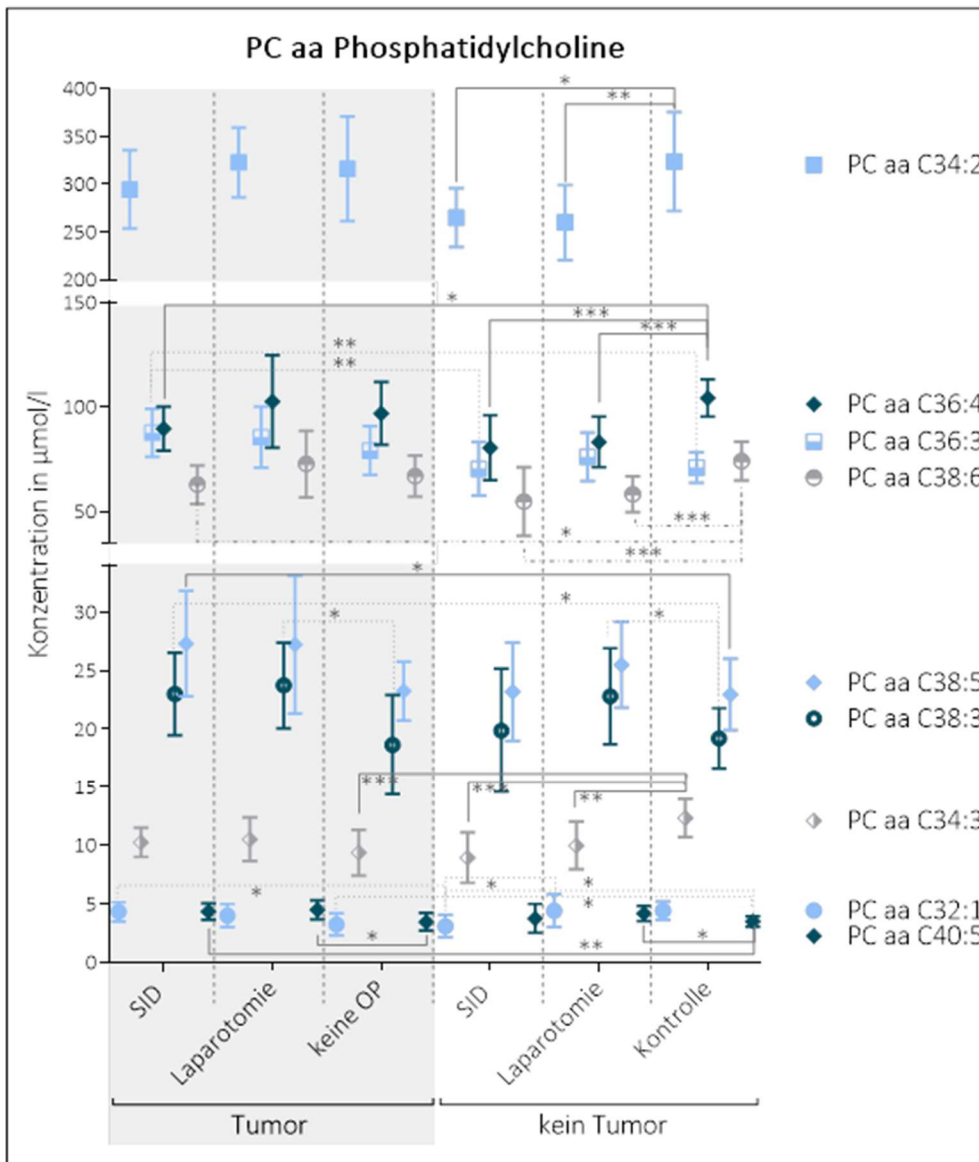
Signifikant veränderte Konzentrationen (im Vergleich zu Kontrolle) insbesondere bei SID/Tumor.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ .

$n = 11$  (SID/Tumor),  $9$  (Laparotomie/Tumor),  $11$  (keine OP/Tumor),  $9$  (SID),  $15$  (Laparotomie),  $15$  (Kontrolle).

### 5.6.5.2 PC-aa-Phosphatidylcholine

Auch hier traten eine Reihe von signifikanten Veränderungen in den Konzentrationen der PC-Phosphatidylcholine zwischen den Versuchsgruppen auf. Am häufigsten zeigten sich Abweichungen bei den Werten der laparotomierten, der SID-operierten und der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 47).



**Abbildung 47**  
**Konzentration von PC aa Phospholipiden im Blutplasma**

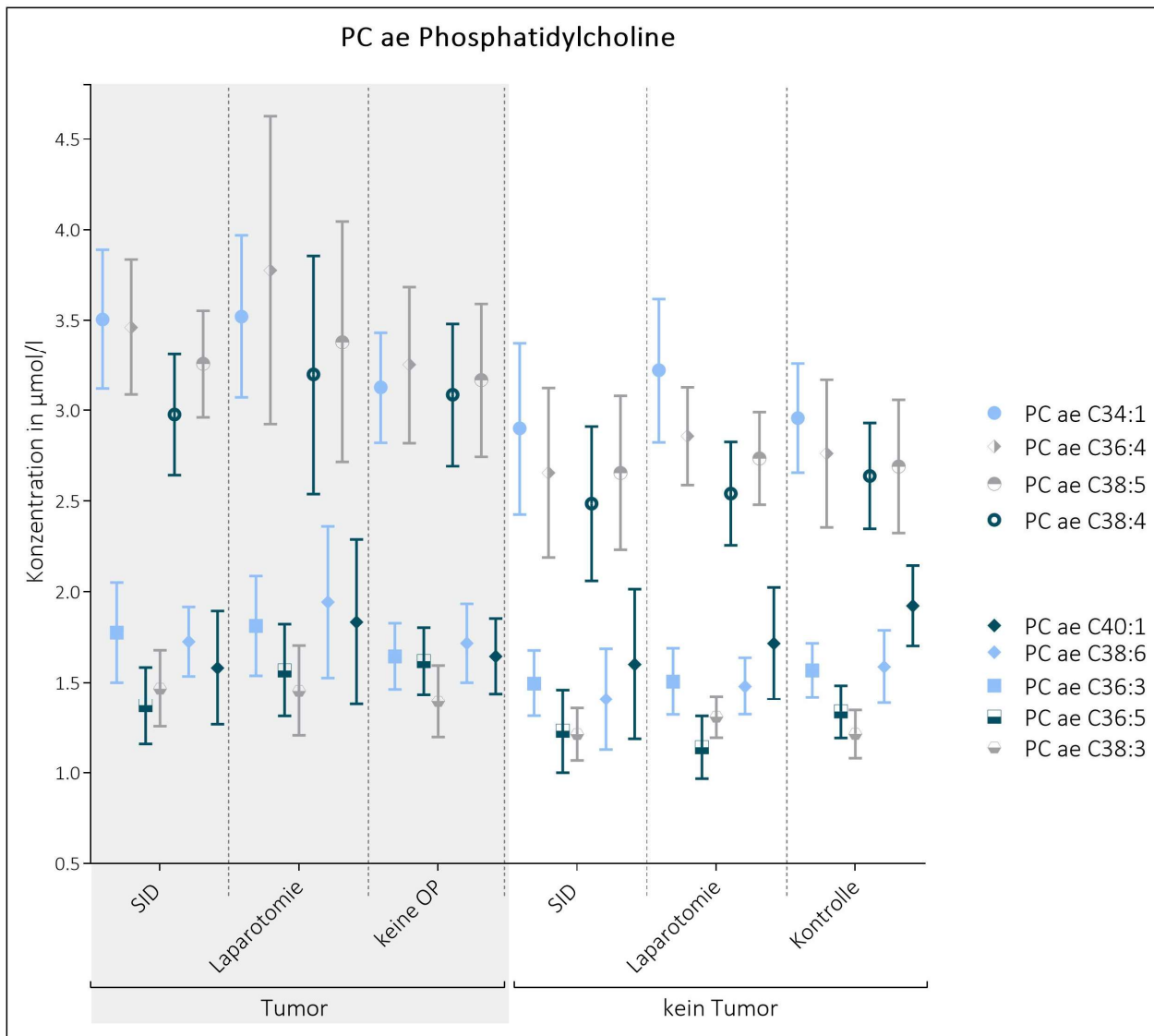
Messung von Phosphatidylcholinen im Blutplasma mittels Massenspektrometrie.

Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

$n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

### 5.6.5.3 PC-ae-Phosphatidylcholine

Gruppenunterschiede gab es auch bei den PC-ae-Phosphatidylcholinen zu beobachten (Abbildung 48). So lagen die gemessenen Konzentrationen vieler Phosphatidylcholinen im Plasma der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere signifikant über denen der nur SID-operierten Tiere (PC ae C38:6, C38:4) und über denen der Kontrolltiere (beide Vergleiche signifikant: PC ae C34:1, C36:4, C38:5, C38:3). Die (nur) Tumor-tragenden Tiere wiesen signifikant höhere Konzentrationen an PC ae C36:4, C38:5, C36:5, C38:3 und C38:4 auf verglichen mit den Messwerten der Kontrolltiere. Lediglich PC ae C40:1 zeigte sich im Blut der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten und der nur Tumor-tragenden Tiere signifikant verringert im Vergleich zur Kontrolle.



**Abbildung 48** Konzentration von PC ae Phospholipiden im Blutplasma

Messung von Phosphatidylcholinen im Blutplasma mittels Massenspektrometrie. Stark veränderte Konzentrationen insbesondere bei SID/Tumor und SID verglichen mit der Kontrolle.

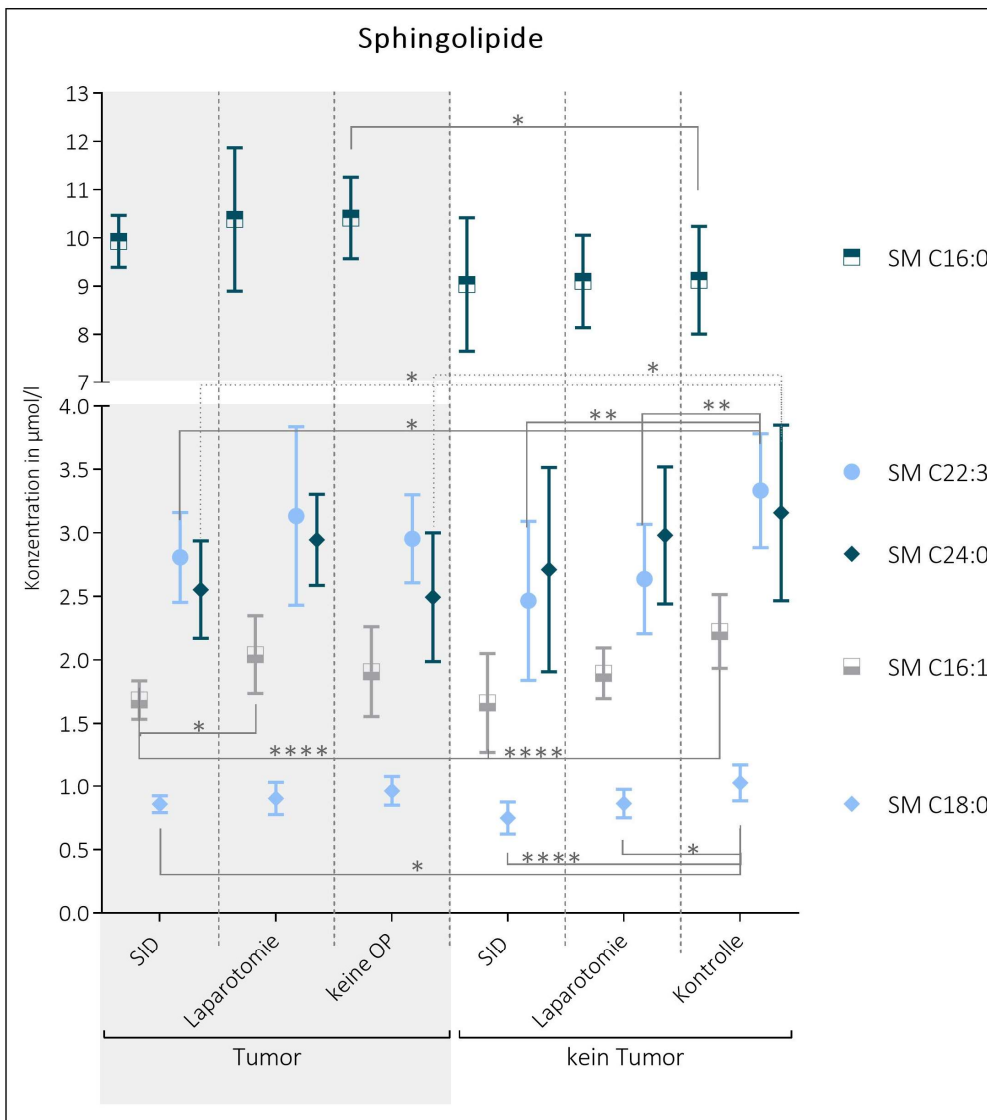
Darstellung von Mittelwert, Standardabweichung. Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .  $n = 11$  (SID/Tumor), 9 (Laparotomie/Tumor), 11 (keine OP/Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

C34:1: SID/Tumor vs. SID \*, SID/Tumor vs. Kontrolle \*\*. C36:4: SID/Tumor vs. Kontrolle \*\*\*, SID/Tumor vs. SID \*\*\*, Keine OP/Tumor vs. Kontrolle \*. C38:5: SID/Tumor vs. Kontrolle \*\*, SID/Tumor vs. SID \*\*, Keine OP/Tumor vs. Kontrolle \*. C38:4: SID/Tumor vs. SID \*, keine OP/Tumor vs. Kontrolle \*. C40:1: SID/Tumor vs. Kontrolle \*, keine OP/Tumor vs. Kontrolle \*. C38:6: SID/Tumor vs. SID \*. C36:3: SID/Tumor vs. Laparotomie/Tumor \*. C36:5: Keine OP/Tumor vs. Kontrolle \*. C38:3: SID/Tumor vs. Kontrolle \*\*\*, SID/Tumor vs. SID \*, Keine OP/Tumor vs. Kontrolle \*.

## 5.6.6 Sphingolipide

Sphingolipide sind ein wichtiger Bestandteil der Zellmembran und spielen bei Prozessen der Zellfunktion (Apoptose, Migration, etc.) eine wichtige Rolle. In diesem Versuch zeigten insbesondere die verschiedenen Sphingomyeline signifikante Unterschiede in den Versuchsgruppen (siehe

Abbildung 49). **SM C16:0** war nur im Blutplasma der Tumor-tragenden Tiere im Vergleich zu Kontrolle signifikant erhöht. Bei **SM C22:3** und **SM C18:0** wiesen die sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere, die nur SID-operierten bzw. nur laparotomierten Tiere signifikant niedrigere Konzentrationen im Blutplasma auf als die Kontrolltiere. Neben dem Vergleich der Konzentrationen an **SM C16:1** im Plasma der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere mit der der Kontrolle, fiel auch der Vergleich mit den sowohl Tumor-tragenden als auch laparotomierten Tieren signifikant aus (SID/Tumor < Laparotomie/Tumor, SID/Tumor < Kontrolle). Auch die Konzentration von **SM C24:0** war bei den sowohl Tumor-tragenden Tieren als auch SID-operierten Tieren signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Auch die (nur) Tumor-tragenden Tiere wiesen signifikant niedrigere Konzentrationen an SM C24:0 als die Kontrolltiere.



**Abbildung 49**  
**Konzentration an Sphingolipiden im Blutplasma**

Messung der Sphingomyeline (SM C16:0, SM C22:3, SM C24:0, SM C16:1, SM C 18:0) im Blutplasma in der MS. Signifikant veränderte Konzentrationen (im Vergleich zur Kontrolle) insbesondere bei SID/Tumor.

Darstellung von Mittelwert ± Standardabweichung; Testung von Gruppenunterschieden mit One-Way-ANOVA bzw. Kruskal-Wallis mit Post-Tests (Tukey/Dunn), Ausschluss von Ausreißern (Methode nach ROUT,  $Q = 0,01$ ). Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ .  $n = 11$  (SID/ Tumor), 9 (Laparotomie/ Tumor), 11 (keine OP/ Tumor), 9 (SID), 15 (Laparotomie), 15 (Kontrolle).

## 6 Diskussion

---

Die Antwort auf die Frage, welche Veränderungen ein Tumor in einem Organismus auslöst, ist äußerst komplex und unterliegt zahlreichsten Einflüssen. Das Modell der SID wurde entwickelt, um die immunologische Reaktion auf ein operatives Trauma standardisiert untersuchen zu können. Es konnten bereits zahlreiche durch die SID modulierte und veränderte Mechanismen beschrieben werden [41]. Diese Arbeit hat zum Ziel, den Einfluss einer veränderten Immunabwehr nach operativem Trauma auf den Tumor-beeinflussten Organismus der Maus herauszustellen.

Die Versuchstiere bekamen zu Beginn Tumorzellen einer Pankreaskarzinomzelllinie implantiert und wurden dann mehrere Male mit der beschriebenen Methode SID einem operativen Trauma ausgesetzt. Als Kontrollen wurden nur Tumor-tragende Tiere sowie Tiere, denen nur das operative Trauma zugefügt wurde und Tiere, die lediglich laparotomiert worden als auch völlig unbehandelte Tiere herangezogen (siehe Abschnitt 4.1.4).

Die Kombination der beiden Modelle birgt die Chance den Einfluss eines chirurgischen Traumas auf das Immunsystem und den Stoffwechsel unabhängig von der Tumorresektion zu betrachten.

### 6.1 Ursachenforschung - mögliche Erklärungen für Mortalität, Gewichtsverlust und Belastungsreaktion der Tiere

---

Im Vorgängerprojekt unserer Arbeitsgruppe von Menges et al., in der nur Tumor-tragende Tiere untersucht wurden, konnte in einer Überlebenskinetik von über 60 Tagen bereits gezeigt werden, dass die Kombination aus Tumor und SID zu einem signifikanten Überlebensnachteil führt [29]. Bis zum Ende dieses Versuchs am Tag 28 konnten noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezogen auf das Überleben festgestellt werden. Alle Gruppen, mit Ausnahme derer, in der die Tiere nur laparotomiert wurden und der Kontrolle, zeigten Verluste.

In der Obduktion der aus dem Versuch ausgeschiedenen Tiere zeigte sich häufig einen massiver Dünndarmileus. Für die Entstehung eines postoperativen Ileus sieht man zwei Mechanismen als ausschlaggebend an. Zum einen kommt es durch den Gebrauch von Anästhetika und Opioiden sowie dem chirurgischen Trauma zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems, welches Motilitätsstörungen des Darms begünstigt. Zum anderen kann es - hervorgerufen durch das Trauma - zu einer inflammatorischen Reaktion des Immunsystems kommen. Die so bedingte Permeabilitätssteigerung der Darmwand begünstigt eine Ödembildung und kann eine bakterielle Translokation erleichtern [42]. Patienten nach Kolektomie, die einen postoperativen Ileus entwickeln, weisen ein höheres Mortalitätsrisiko auf verglichen mit Patienten, bei denen es zu keiner

Motilitätsstörung des Darmes kam [43]. Das *Intestinal Manipulation Model* der Arbeitsgruppe um Professor Kalff wurde genutzt, um das Phänomen des postoperativen Ileus genauer zu untersuchen [28]. Mit der Weiterentwicklung dieses Modells (SID) wurde der Grad der intestinalen Manipulation erhöht. Vorherige Versuche mit der SID legten nahe, dass die immunologische Reaktion dadurch verstärkt und näher an der von chirurgischen Patienten mit Alterationen in der Immunabwehr ist [27]. Denkbar ist, dass ein durch einen Tumor beeinflusstes Immunsystem insgesamt anfälliger für die Ausbildung eines Ileus ist und dieser eine mögliche Erklärung für die erhöhte Mortalität der Kombination aus Tumor und SID sein könnte [29].

Menges et al. untersuchten und diskutierten außerdem eine Korrelation von operativem Trauma, Tumorgröße und Überleben. Die Tumor-tragenden und SID-operierten Mäuse zeigten in der Studie zwar eine signifikant reduzierte Überlebensrate, die SID hatte aber keinen Einfluss auf die Tumorgröße [29]. Bezüglich der Tumorausdehnung gab es auch in diesem Projekt weder prä- noch postoperativ signifikante Gruppenunterschiede. Zu erwähnen sind hier die großen Standardabweichungen der Tumorumfänge innerhalb der Gruppen. Möglicherweise ist dies bedingt durch die große interindividuelle Variabilität der Tumorgröße und die niedrige Tierzahl pro Gruppe. Beides deckt sich mit den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [29, 44]. Auch die dabei aufkommende Frage, ob es andere (morphologische) Veränderungen in den Versuchsgruppen geben könnte, wurde ebenfalls bereits in der Vorstudie untersucht: weder bei der Ausdehnung der zentralen Nekrose der Tumoren, noch der Aszitesmenge oder dem Vorhandensein von Leber- oder Peritonealmetastasen konnten Gruppenunterschiede festgestellt werden [29].

Während des Versuchs im vorliegenden Projekt zeigten die SID-operierten und Tumor-tragenden Tiere außerdem die ausgeprägteste Belastungsreaktion. Dies konnten wir im Rahmen der täglichen standardisierten Beurteilung von Erscheinungsbild, Atmung, Spontanverhalten, provoziertem Verhalten und Gewicht der Tiere feststellen. Auch in Bezug auf das Körpergewicht wiesen die SID-operierten und Tumor-tragenden Tiere am Versuchsende die niedrigsten Werte auf. Insgesamt reagierten alle Tiere, die narkotisiert und je nach Gruppenzugehörigkeit auch operiert bzw. laparotomiert wurden, mit einem Gewichtsabfall am ersten postoperativen Tag sowie einem erhöhten Gesamtbelastungsscore am Ende des Versuchs. Um die Tumor-tragenden Tiere in der MRT untersuchen zu können, wurden sie ebenfalls narkotisiert. Der Gewichtsverlust am Folgetag fiel dabei geringer aus als postoperativ und sie zeigten keine größere Belastungsreaktion. So scheint der Gewichtsabfall vielmehr auf die Operation als auf die Narkose zurückzuführen zu sein. Da wir intraoperativ Flüssigkeitsverluste ausgeglichen haben und die Tiere aufgrund der Analgesie zügig



wieder zu fressen begannen, ist eher von einem zu einem Katabolismus neigenden Stoffwechsel aufgrund des operativen Stresses auszugehen, im Rahmen dessen es u. a. zum Abbau von Muskulatur (weniger Gewicht) kommen kann [45].

Das durch die SID ausgelöste operative Trauma führt bei den Tumor-tragenden Tieren zu einem reduzierten Überleben und trägt zu einem deutlich verringerten Gesamtzustand der Tiere bei [46]. Mögliche durch die SID veränderte Mechanismen in der Immunabwehr und im Stoffwechsel der Tiere könnten dafür verantwortlich sein und werden daher Gegenstand der folgenden Abschnitte sein.

## 6.2 Die Kombination von Tumor und SID führt zu einer starken Reaktion des Immunsystems

---

In der vorliegenden Arbeit wurden Leukozytenpopulationen in den Kompartimenten Blut und Milz quantifiziert. Durch die spezielle Aufbereitung (siehe Abschnitt 4.2.1.1) eignet sich die Milz als großes immunologisches Organ gut, um eine hohe Zahl an Immunzellen zur Untersuchung zu generieren [47]. Darüber hinaus wurden die T-Lymphozyten und die NK-Zellen genauer betrachtet und Zytokinausschüttung von Immunzellen aus Blut und Milz untersucht.

### 6.2.1 Veränderte Zusammensetzung der zellulären Komponenten des Immunsystem bei Tumor und SID

---

Sowohl im Blut als auch in der Milz sah man eine signifikant höhere Gesamtzahl der Leukozyten bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die übrigen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich miteinander.

Eine Erhöhung der **Leukozytenzahl** im Blut ist ein gängiger Marker in der klinischen Diagnostik. Sie steigt beispielsweise im Rahmen von entzündlichen Prozessen oder ausgeprägten Stressreaktionen, wie körperlicher Überanstrengung oder Krampfanfällen an [48]. Interessanterweise kam es in diesem Versuch aber nur bei den Tieren zu einem signifikanten Anstieg, die sowohl einen Tumor trugen als auch nach der SID-Methode operiert wurden. Die SID alleine führte nicht zu signifikant erhöhten Werten. In Vorstudien zur *Surgically-induced Immune Dysfunction* konnten 6 h nach operativem Trauma (somit zu einem sehr viel früheren Zeitpunkt) sogar signifikant niedrigere Leukozytenzahlen im Blut festgestellt werden [41]. Die SID scheint die Tumor-tragenden Tiere stärker bzw. über einen längeren Zeitraum zu beeinträchtigen als Tiere ohne Tumor. Die deutlich stärker ausgeprägte Belastungsreaktion der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere kann als Argument für diese These gewertet werden. Eine andere Möglichkeit ist eine verstärkte durch die SID bedingte Inflammation bei den Tumor-tragenden Tieren, da diese schon vor der Behandlung mit der SID einem inflammatorischen Reiz durch den Tumor ausgesetzt waren.

Nun stellt sich die Frage, welche der Populationen für den Anstieg der Leukozytenzahl verantwortlich ist. So zeigten sich in Blut und Milz sehr ähnliche Ergebnisse. Sowohl bei den **Monozyten** bzw. bei den **Makrophagen/Dendritischen Zellen** (Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>-Zellen) als auch bei den **Neutrophilen Granulozyten** erkennt man die deutlichste Erhöhung der Zellzahl in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere (signifikant vs. Kontrolle, vs. Tumor-tragende Tieren). Aber auch die anderen Gruppen zeigen höhere, wenn auch nicht immer signifikant höhere Zellzahlen als die Kontrolltiere.

**Neutrophile Granulozyten** sind eine der ersten Zellreihen, die auf eine Gewebeschädigung oder eingedrungene Pathogene reagieren. Sie können in die Subtypen N1 oder N2 differenziert werden. Dem N1-Subtyp werden Tumor-abwehrende Eigenschaften zugesprochen, dem N2-Subtypen Tumor-unterstützende. Beispielsweise können N2-Neutrophile über die Freisetzung oder Nutzung von bestimmten Enzymen die Anheftung von Pankreaskarzinomzellen an Endothelien begünstigen, die Proliferation von Tumorzellen anregen oder die Apoptose hemmen. Über die Freisetzung von ROS oder RNS können DNA-Schäden hervorgerufen werden [49]. Welcher Subtyp vorliegt, kann mit reiner Bestimmung der Zellzahl natürlich nicht differenziert werden. Es kann aber festgestellt werden, dass gerade die SID-operierten Tumor-tragenden Tiere die höchsten Neutrophilenzahlen aufwiesen. Da sich die Tumorgröße zum Messzeitpunkt nicht signifikant von der der anderen Gruppen unterschied, steht die direkte Einwirkung auf die Tumorzellproliferation vermutlich nicht im Vordergrund und wirft den Blick eher auf die immunologische Seite. Möglicherweise sind die Neutrophilen Granulozyten trotz ihrer vermehrten Ausschüttung in ihrer Funktion eingeschränkt und können so ihren Aufgaben in der Immunabwehr nicht adäquat nachkommen. So wurde bereits beschrieben, dass, wenn es nach einem Trauma, einer ausgedehnten Operation oder einer Sepsis zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion im Körper kommt, dies zu einer Dysfunktion der Neutrophilen Granulozyten führen kann. So kann beispielsweise die Bekämpfung einer bakteriellen Infektion beeinträchtigt sein [50]. Dysfunktionale Neutrophile Granulozyten sind also womöglich Teil des Ursachengeflechtes für die erhöhte Mortalität in der Gruppe der Tumor-tragenden und SID-operierten Tiere. Möglicherweise ist diese Mortalität weniger durch den Tumor selbst als durch eine gewisse Funktionseinschränkung des Immunsystems bedingt.

**Monozyten** übernehmen ebenfalls wichtige Aufgaben in der initialen Pathogenabwehr. In Abhängigkeit vom inflammatorischen Milieu können sie ins Gewebe einwandern und sich weiter zu Makrophagen (oder dendritischen Zellen) differenzieren. Durch ein breites Spektrum an Pathogen Recognition Receptors sind sie besonders gut in der Lage, Pathogene zu erkennen und zu

phagozytieren [51]. In der Literatur wird aber auch immer häufiger von Tumor-assoziierten Makrophagen berichtet. Dabei sind mittlerweile unterschiedliche Mechanismen für verschiedene Tumorentitäten bekannt. Auch können wieder Tumor-unterstützende von Tumorwachstum-hemmenden Vorgängen unterschieden werden und so in die Subtypen M1 und M2 differenziert werden [52]. Leukozyten, in der Regel vor allem Lymphozyten und Makrophagen, machen zum Teil 50 % der Tumormasse aus. Im Gegensatz zu einem besseren Outcome bei hoher Lymphozytenzahl (beschrieben für kolorektale und Ovarialkarzinome), korreliert eine hohe Dichte an Makrophagen mit einer erhöhten Tumorangiogenese oder einem schlechteren Outcome. Es konnte mittlerweile beschrieben werden, dass Tumorzellen über die Ausschüttung von Botenstoffen, wie MCP-1, -5, -7 oder M-CSF im Blut zirkulierende Monozyten rekrutieren können. Auch Zytokine, wie IL-10 oder TGF- $\beta$ , ausgeschüttet von Tumorzellen, führen zu einer M2-Differenzierung, während hohe Spiegel an IFN- $\gamma$  oder LPS eher eine M1-Differenzierung hervorrufen [53]. So ist es gut möglich, dass es bei den SID-operierten als auch Tumor-tragenden Tieren zu einer vermehrten M2-Differenzierung gekommen ist, denn auch bei dieser Gruppe lag eine dafür förderliche Konstellation vor (erhöhte IL-10- und MCP-1-Konzentration, IFN- $\gamma$  nicht nachweisbar) vor. Weiterhin unterstützt eine Studie unserer Arbeitsgruppe diese These: so wurde der Überstand, der in diesem Versuch genutzten Pankreaskarzinomzelllinie (6606PDA) in vitro mit naiven Peritonealmakrophagen zusammengebracht und es konnte eine Differenzierung der Makrophagen zum M2-Subtypen beobachtet werden. Ferner wurden weitere 6606PDA-Zellen mit dem Überstand von M2-Makrophagen kultiviert und folgend eine Tumorzellvermehrung registriert werden [54]. So scheint es sinnvoll, in Folgestudien die Makrophagen in der direkten Tumorumgebung genauer zu analysieren.

Durch die Ergebnisse im Blut dieser Studie und die bereits herausgestellte Relevanz der Makrophagen im genutzten Tumormodell [54] ist auch bei den Ly6G<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>-Zellen in der Milz von einem vorrangigen Einfluss der Makrophagen auf die erhöhte Zellzahl auszugehen. Außerdem konnte unsere Arbeitsgruppe bereits feststellen, dass die SID eher zu einer Abnahme der Dendritischen Zellen in der Milz führt [55]. Die Klärung dieser Frage wird Gegenstand zukünftiger Projekte sein.

Bei den **T-** wie auch **B-Lymphozyten** kam es weder im Blut noch in der Milz zu signifikanten Gruppenunterschieden bei Betrachtung der absoluten Zellzahlen. In beiden Kompartimenten zeigten sich deutliche Veränderungen im Anteil der Lymphozyten an der Gesamtzellzahl. Dies ist jedoch am ehesten auf die reell erhöhten Zahlen an Neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen zurückzuführen.

Es wurden außerdem ein Teil der Subpopulationen der T-Lymphozyten in der Milz betrachtet. Bei den **T-Helferzellen** und den **Zytotoxischen Zellen** waren keine signifikante Gruppenunterschiede hinsichtlich der Zellzahl auszumachen. Padoan et al. fassen in ihrem Review zusammen, dass es in der Mikroumgebung von duktalem Adenokarzinomen des Pankreas beim Menschen zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zu eher immunsuppressiven Zellpopulationen, wie M2-Makrophagen und regulatorischen T-Zellen auf Kosten von M1-Makrophagen, Dendritischen Zellen sowie T-Helfer-Zellen und Zytotoxischen T-Zellen kommt [56]. Auch wenn die Übertragbarkeit zu diesem Versuch aufgrund von verschiedenen Faktoren, wie der Spezies und den untersuchten Kompartimenten eingeschränkt ist, so scheinen die durch die SID im Tumororganismus der Maus ausgelösten immunologischen Prozesse in eine ähnliche Richtung zu weisen.

Alterationen zeigten sich bei den **doppelt-negativen** (für CD4, CD8) **T-Lymphozyten**. Hier waren die Zellzahlen in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren, bei den lediglich SID-operierten Tieren sowie bei den laparotomierten Tieren signifikant im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Rolle doppelt-negativer T-Lymphozyten ist bisher nicht vollends geklärt. Der doppelt-negative Phänotyp von T-Lymphozyten im menschlichen Thymus ist typisch für einen noch unreifen T-Zell-Differenzierungsgrad. Normalerweise ist nur ein geringer Anteil reifer doppelt-negativer T-Zellen im peripheren Blut zu finden. Einen erhöhten Anteil konnte man unter anderem bei Autoimmunerkrankungen nachweisen [57]. Möglicherweise sind auch entzündliche Prozesse für eine Entstehung außerhalb des Thymus ursächlich. So wurde bereits eine Akkumulation von doppelt-negativen T-Lymphozyten in der Bauchhöhle von mit Listerien (*Listeria monocytogenes*) infizierten Mäusen gefunden [58]. Für einen solchen entzündlichen Auslöser spricht die erhöhte Zellzahl in beiden SID-operierten Gruppen. Eine Frage, die letztendlich offen bleibt, ist, welcher Funktion diese Zellen nachkommen und ob sie womöglich im Verlauf noch zu T-Helfer-, Zytotoxischen oder zu Regulatorischen T-Zellen differenzieren würden. Da ihre Zahl auch in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere erhöht ist, liegt der Schluss nahe, dass sie eine wichtige Rolle im Geflecht der veränderten Funktionsfähigkeit des Immunsystems einnehmen.

### **6.2.2 Operativer Stress führt zu einer Aktivierung von T-Helfer- und Zytotoxischen T-Zellen**

Aufgrund der großen Relevanz von T-Lymphozyten in der Tumorummunologie entschieden wir uns, die Subpopulationen noch hinsichtlich ihrer Expression von CD69 zu untersuchen. CD69 ist eines der ersten Oberflächenantigene, welches nach Aktivierung von reifen T-Zellen exprimiert wird [59]. Bei den Versuchen ergaben sich teil hochsignifikante Unterschiede. Bei den SID-operierten Tieren (Tumor/SID, SID) sowie in der Laparotomie-Gruppe wiesen sowohl die T-Helferzellen als auch die

Zytotoxischen T-Zellen eine signifikant stärkere Expression von CD69 auf als die Kontrolltiere. Signalwege über CD69 sind an der Steuerung der Zytokinausschüttung oder der T-Helferzell-Differenzierung beteiligt [60]. Die tendenziell stärkste Expression von CD69 auf T-Helferzellen und Zytotoxischen T-Zellen sah man bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren. Versuche von Esplugues et al. konnten zeigen, dass CD69-defiziente Mäuse, welche unterschiedliche Karzinomzelllinien (u.a. Prostatakarzinom und Lymphom) implantiert bekamen, ein reduziertes Tumorstadium, weniger Lungenmetastasen und ein verlängertes Überleben zeigten verglichen mit dem Wildtyp. Dies wurde unter anderem auf eine verstärkte Toxizität der NK-Zellen gegenüber den Tumorzellen, eine reduzierte TGF- $\beta$ -Produktion und verringerte Apoptose der Immunzellen sowie eine höhere Zahl an T-Lymphozyten und NK-Zellen im Peritoneum (Ort der Tumorimplantation) zurückgeführt [61]. CD69 ist also nicht nur als bloßer Aktivierungsmarker zu betrachten, sondern es darf von einem direkten Einfluss auf tumorimmunologische Prozesse ausgegangen werden. Ein operatives Trauma, wie in diesem Versuch durch die SID ausgelöst, führte zu einer vermehrten Expression insbesondere bei den T-Helferzellen. Es ist also möglich, dass dadurch tumorabwehrende Mechanismen gestört wurden.

### **6.2.3 Spielen die Natürlichen Killerzellen in diesem Modell tatsächlich eine untergeordnete Rolle?**

---

Um die Rolle der Natürlichen Killerzellen in diesem Versuch innerhalb der Splenozyten zu untersuchen, wurden diese mit einem auf sie abgestimmten Zytokingemisch aus IL-2, IL-12 und IL-18 bzw. LPS sowie unbehandeltem Zellkulturmedium über Nacht inkubiert und im Anschluss durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Expression von CD107a und der Produktion von IFN- $\gamma$  untersucht.

CD107a kann u.a. als Aktivierungsmarker für Natürliche Killerzellen genutzt werden. Stimulierte und so aktivierte Zellen weisen eine mehrfach erhöhte CD107a-Expression auf als nicht aktivierte. Mitunter können über die Bestimmung von CD107a mehr aktivierte Zellen erkannt werden als über die alleinige Messung der IFN- $\gamma$ -Produktion. Eine erhöhte Expression korreliert aber meist mit einer ebenfalls erhöhten IFN- $\gamma$ -Produktion. Die biologische Funktion ist dabei bisher nicht vollends geklärt [62]. Es ist aber bekannt, dass die CD107a-Expression mit der Zytotoxizität der Natürlichen Killerzellen korreliert [63].

Ein Ergebnis dieses Versuchs ist, dass die Natürlichen Killerzellen der einzelnen Gruppen unterschiedlich gut auf die verschiedenen Stimulationsmedien ansprachen. So konnte in den Zellkulturen ein signifikant höherer Anteil an Natürlichen Killerzellen in allen Versuchsgruppen

gefunden werden, wenn das Zellkulturmedium mit oben genannten Zytokinen versetzt wurde statt mit LPS oder reinem Medium.

Die genutzten Zytokine sind essentiell für die Natürlichen Killerzellen. IL-2 ist mit verantwortlich für die Differenzierung, Proliferation und Aktivierung. IL-12 und IL-18 induzieren die Produktion von IFN- $\gamma$  und bestimmen die Zytotoxizität [64]. Die Stimulation mit Zytokinen, aber auch die reine Inkubation in Medium über Nacht führte zu signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Anteils der Natürlichen Killerzellen an den Splenozyten. Die Zellen der verschiedenen Versuchsgruppen sprachen dabei unterschiedlich gut auf die jeweilige Stimulation an. Die sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere wiesen beispielsweise den geringsten Anteil an Natürlichen Killerzellen auf. Eine denkbare Erklärung wäre eine durch ein operatives Trauma oder einen Tumor eingeschränkte Proliferationsfähigkeit oder eine veränderte Reaktion auf eine Zytokinstimulation durch intra-/extrazelluläre Veränderungen, wie Rezeptorendichte oder Signalkaskaden [65].

Es muss erwähnt werden, dass zu Beginn des Versuchs immer eine bestimmte Zahl an Splenozyten in die Zellkultur gegeben wurden mit einem jeweils vorher nicht einheitlichen Anteil an NK-Zellen. Auffällig ist auch, dass die Anteile der Natürlichen Killerzellen nach Inkubation in Medium über Nacht (ohne Stimulanz) insgesamt geringer sind als im Vergleich zu der Zellsuspension, die direkt nach Herstellung dieser gemessen wurde. Womöglich ist eine vorherige Isolation der Natürlichen Killerzellen aus den Splenozyten für künftige Projekte sinnvoll, um eine einheitliche Zellzahl in die Kultur zu geben und so eine höhere Aussagekraft über die Proliferationsfähigkeit zu erhalten. Entgegenzusetzen sind dabei die in 5.4.2.2 dargelegten Ergebnisse: bei direkter durchflusszytometrischer Ermittlung der Zellzahl der Natürlichen Killerzellen in der Milz ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Daher konnte in vorliegendem Projekt auf diesen Isolationsschritt verzichtet werden.

Weder bezüglich der IFN- $\gamma$ -Produktion noch der Expression von CD107a konnten nach Stimulation (unabhängig von der Stimulationsart) Gruppenunterschiede festgestellt werden.

Für den gesamten Versuch gilt, dass wir im Vorfeld von einer wichtigen Rolle der NK-Zellen ausgegangen waren, da sie in der Tumorabwehr von immenser Bedeutung sind [18]. Möglicherweise spielen auch freie/periphere NK-Zellen eine geringere Rolle als die NK-Zellen in der direkten Umgebung des Tumors. Die signifikanten Gruppenunterschiede im Anteil und demnach das versuchsgruppenspezifische Ansprechen der Natürlichen Killerzellen auf eine Stimulation lassen in künftigen Projekten eine Überprüfung der Ergebnisse bezüglich der IFN- $\gamma$ -Produktion und Expression

von CD107a als auch die Betrachtung der NK-Zellen in der direkten Umgebung des Tumors interessant und sinnvoll erscheinen.

#### **6.2.4 Insgesamt verstärkte Zytokinausschüttung bei Tumor und SID messbar**

---

Dass die SID zu einer veränderten Zytokinausschüttung führt und dabei der beobachteten Immunreaktion bei Patienten nach chirurgischen Eingriffen stark ähnelt, konnte bereits in vorherigen Veröffentlichungen gezeigt werden [27]. Ziel dieser Arbeit war es, die Zytokinantwort auf ein operatives Trauma im von einem Tumor beeinflussten Immunsystem zu untersuchen. Hierzu wurden die Zytokinkonzentrationen im Serum, im Vollblut nach Stimulation mit LPS sowie im Splenozytenüberstand vor und nach Stimulation mit LPS gemessen. So konnte auch die Funktionalität der Immunzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Zytokinproduktion auf einen zweiten Stimulus hin betrachtet werden. Insgesamt zeichnete sich ein heterogenes Bild bezogen auf die veränderten Zytokine in Blut und Milz. Mitunter zeigten sich im nicht-stimulierten Überstand noch signifikante Unterschiede, die nach Stimulation nicht mehr nachweisbar waren. Andersherum konnte auch die Stimulation zu signifikanten Gruppenunterschieden führen, die vorher im nicht-stimulierten Überstand nicht zu Tage traten. In der Regel führte eine Stimulation mit LPS zu einer höheren Freisetzung der gemessenen Zytokine aus den Zellen als diese im nicht-stimulierten Zustand freisetzen. So scheinen sowohl die Blutzellen als auch die Splenozyten durch die OP-Prozeduren oder den Tumor nicht beeinträchtigt zu sein in ihrer Fähigkeit zur Produktion und Freisetzung von Zytokinen. Daher liegt der Schluss nahe, dass die Art und die Versuchsgruppen-spezifischen Unterschiede der ausgeschütteten Zytokine von höherer Relevanz für die Veränderungen in der Immunantwort sind, als die Fähigkeit (oder Unfähigkeit) der Zellen Zytokine freizusetzen. Der am häufigsten signifikant ausfallende Vergleich war der der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere mit den Kontrolltieren. Aber auch die anderen Gruppen, die einer OP-Prozedur (SID/Laparotomie) unterzogen worden waren, reagierten mit einer erhöhten Zytokinausschüttung. Die SID und in geringerem Maße auch die Laparotomie scheinen ein potenter Stimulator einer verstärkten Zytokinausschüttung zu sein. Dies betraf sowohl die als primär proinflammatorisch (wie IL-6 und IL-1 $\beta$ ) als auch die als antiinflammatorisch (wie IL-10) bekannten Zytokine [66]. So lässt sich vermuten, dass durch die SID die im Normalfall auf einen inflammatorischen Reiz gut abgestimmte und ausgewogene Zytokinausschüttung aus dem Gleichgewicht gebracht wird. Es lohnt sich also, zukünftig auf die einzelnen Zytokine zu fokussieren und zu analysieren welche Auswirkungen eine dysregulierte Ausschüttung haben könnte.

Schon in vorherigen Untersuchungen konnte eine nach SID deutlich angestiegene **IL-6**-Konzentration beobachtet werden [27]. Als proinflammatorisches Zytokin ist es eines der Initiatoren der Entzündungsreaktion. Bei einem normalen Entzündungsverlauf nimmt die IL-6-Produktion nach begonnenen Reparaturmechanismen des geschädigten Gewebes wieder ab [67]. Die SID sorgt für eine höhere Ausschüttung von IL-6. Möglicherweise liegt dadurch auch über einen längeren Zeitraum eine erhöhte Konzentration bei den Tumor-tragenden Tieren vor. Durch eine dauerhafte entzündliche Reaktion in der Umgebung von Tumoren kann IL-6 als Wachstumsfaktor für Tumorzellen fungieren [68]. Studien lassen außerdem einen Zusammenhang zwischen erhöhten IL-6-Werten und der postoperativen Morbidität und Komplikationsrate vermuten. So traten postoperativ bei karzinombedingt gastrektomierten Patienten mit erhöhten IL-6-Konzentrationen im Blut häufiger Komplikationen, wie z.B. eine Anastomoseninsuffizienz, ein Ileus, eine Pneumonie, Nachblutungen oder Wundinfektionen auf [69].

Auch für **TNF**, einem weiteren proinflammatorischem Zytokin scheint die SID der entscheidende Reiz zur Ausschüttung zu sein. Es erleichtert den Immunzellen das Vordringen ins Gewebe, sorgt für die Rekrutierung weiterer Immunzellen und für die Ausschüttung von Zytokinen. Gleichzeitig übernimmt es regulatorische Funktionen: so sorgt es für die Entwicklung einer gewissen Toleranz bei Makrophagen, beeinflusst die Makrophagen-/Monozytendifferenzierung und leitet die Apoptose von Immunzellen ein. In Bezug auf Karzinome zeigt TNF ambivalente Eigenschaften. So sind zytostatische Effekte und Tumorzellnekrosen-auslösende Prozesse beschrieben worden, genauso wie eine erhöhte Proliferations- und Metastasierungsrate unter TNF [70, 71]. Über die Rolle Tumor-assoziiertes Makrophagen wurde schon im Abschnitt 6.2.1 ausführlich berichtet. TNF wird vorrangig durch aktivierte Monozyten, Makrophagen und Kupffer-Zellen (leberspezifische Makrophagen) ausgeschüttet [72]. Diese Zellen machten einen erhöhten Anteil im Blut und der Milz bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren aus. Daher kann man vermuten, dass TNF in diesem Modell eher Mechanismen unterstützt, die der Tumoreliminierung entgegenwirken.

Viele exogene oder endogene Noxen führen zur Freisetzung des proinflammatorischen **IL-1 $\beta$**  vor allem aus vor allem Monozyten und Makrophagen [73]. Ein Anstieg von IL-1 $\beta$  hat Einfluss auf die Differenzierung von Immunzellen und triggert die Freisetzung von IL-6 [73 - 75]. In drei der vier untersuchten Kompartimente konnten vorrangig in den Gruppen, die der SID unterzogen worden waren, höhere Konzentrationen gemessen werden. Die höchsten Konzentrationen wiesen zumeist die Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere auf. So kann die SID,



vermutlich über die Freisetzung von DAMPs wieder als starker Stimulator angesehen und IL-1 $\beta$  so als Teil der Tumor-fördernden Entzündungsreaktion gewertet werden.

**IL-10** wird als ein Teil der Feedback-Schleife angesehen, der eine (ausufernde) Immunreaktion wieder eindämmt [76]. So scheint die SID im Tumor-beeinflussten Organismus auch den Anstieg antiinflammatorischer Zytokine zu fördern. Möglicherweise kann dies als ein Gegensteuern zu der starken, bereits beschriebenen Bildung proinflammatorischer Zytokine (insb. IL-6) verstanden werden [27]. Dies bekräftigt die These einer insgesamt verstärkten, aber möglicherweise aus dem Gleichgewicht geratenen Reaktion des Immunsystems. In der Tumorummunologie verhält IL-10 sich ambivalent. IL-10 kann zu einer reduzierten Antigenpräsentation über die Herunterregulation der MHC-Klassen führen und es so den Tumorzellen erleichtern, sich den Zellen des Immunsystems zu entziehen [77]. Andererseits stimuliert IL-10 die Funktion und die Proliferationsrate der Zytotoxischen T-Zellen [76].

**IL-12** ist ein weiteres Beispiel für die starke Aktivierung des Immunsystems durch die Kombination von SID und Tumor. Im Überstand der mit LPS stimulierten Splenozyten konnte lediglich in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere eine erhöhte Konzentration gemessen werden. Weder die SID allein noch der Tumor an sich waren ein ausreichender Reiz zur Produktion. IL-12 wirkt bei der Differenzierung von T-Zellen mit und wird von verschiedenen Antigen-präsentierenden Zellen sezerniert. IL-12 kann die zytotoxischen Effekte von NK-Zellen oder CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten durch eine erhöhte Produktion bestimmter Enzyme, wie Perforin, potenzieren. IL-12 werden somit in der Literatur insgesamt Tumorstadium-hemmende Eigenschaften nachgesagt [78]. Allerdings werden die Effekte häufig über IFN- $\gamma$  vermittelt, welches in diesem Versuch nur im unbehandelten Splenozytenüberstand signifikante Gruppenunterschiede aufwies [78].

**IFN- $\gamma$**  wird vorrangig durch T- und NK-Zellen gebildet. IFN- $\gamma$  moderiert zahlreiche Prozesse in der Tumoralabwehr, wie das Induzieren des Zellzyklus-Arrest der Tumorzellen, die Apoptose oder einer reduzierten Vaskularisation. Es aktiviert außerdem Antigen-präsentierende Zellen, verstärkt die Funktion der Zytotoxischen T-Zellen und inhibiert die regulatorischen T-Zellen oder die Tumor-assoziierten Makrophagen [79]. Im Serum oder im Vollblutüberstand war IFN- $\gamma$  in diesem Versuch nicht nachweisbar. Möglicherweise spielt zirkulierendes IFN- $\gamma$  in diesem Modell nur eine untergeordnete Rolle. Andererseits darf nicht außer Acht gelassen werden, dass für IFN- $\gamma$  nur eine sehr geringe Halbwertszeit vermutet wird [80, 81].

Die bekannten Effekte von **IL-4** und **IL-13** innerhalb der Immunantwort überschneiden sich. Eine Überexpression ist häufig mit einem Tumorprogress und dem Auftreten von Metastasen assoziiert.

Beispielsweise können sie die Ausbildung des Makrophagen-Subtyp M2 fördern. Es konnte nachgewiesen werden, dass das Vorhandensein von IL-4 bei verschiedenen Karzinomen zu einer erhöhten Proliferation der Tumorzellen führt. Mitunter werden die Zytokine auch durch die Karzinomzellen selbst gebildet und führen so zu einer autokrinen Wachstumsverstärkung [82, 83]. Die höchste Konzentration an IL-13 wurde vor und nach Stimulation im Splenozytenüberstand der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere gemessen. Die SID bzw. der Tumor allein führten meist nicht zu erhöht gemessenen Konzentrationen. So scheint erst die Kombination beider Stressoren die Zytokinausschüttung signifikant zu erhöhen.

Auch bei **MCP-1** findet sich die höchste Konzentration im Splenozytenüberstand ebenfalls bei den sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tieren. Es handelt sich bei MCP-1 um ein Zytokin, welches Monozyten aus dem Blut rekrutiert. Diese Art der Rekrutierung können auch Tumorzellen nutzen [84]. In vitro Versuche konnten außerdem zeigen, dass MCP-1 unter bestimmten Bedingungen den Wechsel zum M2-Subtypen fördern kann [85]. Warum gerade die mit LPS stimulierten Splenozyten ein Makrophagen-rekrutierendes Zytokin ausschütten, ist nicht abschließend zu erklären. Im Serum konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden. Womöglich gehört auch dies zur allgemein verstärkten Zytokinausschüttung auf den Reiz der SID hin.

Einige der gemessenen Zytokine scheinen eine eher untergeordnete Rolle in diesem Modell zu spielen. In der Literatur sind viele Effekte von **IL-21** auf Zellen der angeborenen sowie erworbenen Immunität beschrieben worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zu diesem Zytokin liefern kein eindeutiges Bild. Im Blut konnten keine relevanten Konzentrationen oder Gruppenunterschiede gemessen werden. Im nicht-stimulierten Splenozytenüberstand weist nur die Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere eine signifikant höhere Konzentration (vs. Kontrolle, vs. SID) an IL-21 auf, während nach Stimulation nur der Vergleich der Gruppen ‚Tumor‘ und ‚Kontrolle‘ signifikante Ergebnisse hervorbringt. Da **IL-2** weder im Serum noch im Blut nach Stimulation nachweisbar war und sich auch im Splenozytenüberstand der einzelnen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bildung von IL-2 fanden, kann davon ausgegangen werden, dass IL-2 in diesem Modell eine eher untergeordnete Rolle spielt.

Für die abschließende Betrachtung ist es von Bedeutung, zusätzlich die Halbwertszeit der einzelnen Zytokine im Serum oder Medium zu bedenken. Einige Zytokine sind stabiler als andere [86]. So ist relevant, wann nach dem Reiz zur Sezernierung die Organ-/bzw. Blutentnahme erfolgte und wie stabil die einzelnen Zytokine ex vivo sind. Hinzu kommt, dass die Immunreaktion nach Trauma einer

gewissen Dynamik unterliegt (siehe Abschnitt 1.4) und so vermutlich nicht für jedes Zytokin der Zeitpunkt der höchsten Ausschüttung gewählt wurde. Für die SID konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, dass auch die Zytokinfreisetzung zu verschiedenen Zeitpunkten und Phasen der Immunreaktion unterschiedlich hoch ausfällt. So erklärt sich auch, dass mitunter die Laparotomie allein als Auslöser zur erhöhten Sekretion eines bestimmten Zytokins ausreichend war. Vorherige Ergebnisse legen aber nahe, dass der Zeitraum der Aktivierung durch die Laparotomie allein kürzer und weniger ausgeprägt ist [27]. Weiterhin zu bedenken ist, dass immer die Zytokinausschüttung von Zellgemischen untersucht wurde. So dürfte nicht verwunderlich sein, wenn in einem Kompartiment (Blut, Milz) beispielsweise ein hoher Anteil an Makrophagen vorliegt, auch die von Makrophagen ausgeschütteten Zytokine in größerer Menge vorliegen, wie dies z.B. bei IL-1 $\beta$  der Fall sein könnte. Insgesamt konnte festgestellt werden, dass zum Zeitpunkt der Organentnahme der immunologische Reiz durch die SID oder den Tumor allein keine so deutlichen signifikanten Unterschiede messbar macht. Trifft aber der immunologische Reiz der SID auf den Tumororganismus, so zeigen sich teils hochsignifikante Veränderungen. Dies unterstreicht die Vermutung, dass die Kombination beider Stressoren (Tumor + SID) zu einer verstärkten und möglicherweise prolongierten sowie dysregulierten Aktivierung des Immunsystems führt. Es kommt dabei zu einer gesteigerten Sekretion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine sowie auch zur Sezernierung von Zytokinen, die eher Tumorwachstum-hemmende bzw. -steigernde Mechanismen steuern. In dem hier abgebildeten komplexen Immungeschehen beeinflussen sich Tumor und postoperative Immunsuppression somit wechselseitig.

### **6.3 Begünstigt die SID eine Anämie und Thrombozytose bei den Tumor-tragenden Tieren?**

---

Im Rahmen einer Tumorerkrankung eine Anämie zu entwickeln ist keine Seltenheit [87]. Zum Zeitpunkt der Organentnahme ist in diesem Versuch jedoch noch keine Tumorsignatur in Bezug auf den Hämoglobin-Wert erkennbar. Signifikant niedrigere Werte verzeichneten die SID-operierten Tiere beider Gruppen. In der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere lag außerdem ein gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigter Hämatokrit sowie ein erniedrigtes Mittleres korpuskuläres Volumen der Erythrozyten vor. Diese erniedrigten Parameter weisen am ehesten in die Richtung einer mikrozytären Anämie. Deren Ursache wird im Allgemeinen im Verlust von Erythrozyten (Blutung) oder der verminderten Bildung (z.B. bei Eisenmangel) gesehen [88]. Ein Blutverlust während der SID-Prozedur muss also diskutiert werden. Bei der SID wird der Dünndarm

mit Hilfe zweier angefeuchteter Wattestäbchen in antegrader Richtung dreimalig sanft durchgewalkt. Das Abdomen wurde dabei entlang der Linea alba (vergleichsweise gefäßarm) zur Längslaparotomie eröffnet. Eine Blutung aus großen Gefäßen ist dabei bisher nicht aufgetreten. Sehr selten kam es zu makroskopisch sichtbaren Einblutungen in die Darmwand. Kleinere Einblutungen in der Darmwand sowie Blutungen aus dem Hautrand sind möglich, sind aber nicht ausreichend für die Entwicklung einer Anämie, da diese Blutungen durch die Kompression der Naht am Ende der Prozedur zügig sistierten. Auch im Rahmen von entzündlichen Prozessen kann eine Anämie entstehen. Inflammatorische Zytokine (u.a. IL-6, TNF) können beispielsweise zu einer Erhöhung des Hepsidins führen, welches in den Eisenstoffwechsel eingreift und die Erythropoese stören kann [89]. Für messbare Auswirkungen einer gestörten Erythropoese ist die Versuchsdauer nicht lang genug, auch wenn die Lebensdauer von murinen Erythrozyten deutlich unter denen humaner liegt [90]. Eine wahrscheinlichere Ursache scheint die durch inflammatorische Prozesse herabgesetzte Membranstabilität von Erythrozyten zu sein, denn diese führt zu einer reduzierten Lebensdauer der Zellen [91]. Tendenziell erhöhte Thrombozytenzahlen zeigten sich in allen Gruppen außer in der Kontrolle. Die Thrombozyten der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere wiesen einen signifikant erhöhten Thrombokrit (Thrombozytenvolumen im Verhältnis zum Blutvolumen) im Vergleich mit der Kontrolle auf. Eine Verschiebung des Thrombokrit entsteht bei Veränderungen in Größe oder Anzahl der Thrombozyten oder bei einer Veränderung des Verteilungsvolumens [92]. Es wurden bereits zahlreiche Mechanismen beschrieben, die zu einer reaktiven Thrombozytose führen können. Dazu zählen unter anderem Infektionen, Gewebeschädigungen (inklusive chirurgisch hervorgerufene) und maligne Prozesse [93]. Bis auf die Kontrolle hat jede Versuchsgruppe mindestens einen dieser Auslöser erfahren, sodass diese Beobachtung gut erklärbar scheint.

## **6.4 Anzeichen für einen katabolen Stoffwechsel im Mausmodell**

---

Dass Karzinomzellen Veränderungen in Art und Umfang ihrer metabolischen Prozesse zeigen, ist weithin bekannt. So konnten Unterschiede in der Verstoffwechslung von Kohlenhydraten, Proteinen und Fetten im Vergleich zu gesundem Gewebe festgestellt werden. Ein veränderter Metabolismus wird als ein zentrales Merkmal einer Neoplasie angesehen [31, 94]. Mit Hilfe der Messung der Hexosen im Blutplasma konnten wir einen groben Eindruck über den Kohlenhydratstoffwechsel gewinnen. Im genutzten Kit konnten die Hexosen nur im Gesamten bestimmt werden. Glukose stellt dabei die wichtigste und am häufigsten vorkommende Hexose dar. Andere wichtige und im Organismus vorkommende Hexosen sind Fruktose, Mannose und Galaktose [95]. Im Plasma der

sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere sowie der alleinig Tumor-tragenden Tiere fanden sich signifikant niedrigere Konzentrationen als in der Kontrollgruppe. Da in der Gruppe der SID-operierten Tiere keine erniedrigten Konzentrationen gemessen wurden, liegt der Schluss nahe, dass die erniedrigten Konzentrationen vor allem durch den Tumor bedingt sind.

Von Patienten mit Malignomen weiß man, dass sie trotz Erhöhung der Kalorienzufuhr zu Untergewicht neigen. Dies wird vor allem auf den durch die Erkrankung bedingten erhöhten Energiebedarf zurückgeführt [96]. Eine Erklärung ist die wesentlich ineffizientere Energiegewinnung von Tumorzellen. Tumorzellen metabolisieren Glukose unabhängig vom Sauerstoffgehalt häufig über die Glykolyse statt der oxidativen Phosphorylierung, bei der gerade einmal zwei (statt über 30) ATP Moleküle sowie Laktat entstehen. Die Tumorzellen reagieren mit einer erhöhten Expression an Glukose-Transportern, vermehrter Glykogenolyse sowie Glukoneogenese [97]. So ist die signifikant reduzierte Konzentration an Hexosen womöglich darauf zurückzuführen, dass diese bei den Tumor-tragenden Tieren bereits vermehrt verstoffwechselt wurden.

Auch bei der Messung der Acylcarnitine konnten interessante Ergebnisse beobachtet werden. Acylcarnitine dienen als Transportform langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien, um dort der  $\beta$ -Oxidation und somit zur Energiegewinnung zur Verfügung stehen. Bei drei signifikant veränderten Acylcarnitinen liegen in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen vor als in der Kontrolle. Mitunter wiesen auch die alleinig Tumor-tragenden als auch die lediglich SID-operierten Tiere signifikant niedrigere Konzentrationen auf. Durch die SID und den Tumor kann ein Hypermetabolismus bedingt durch den vermehrten Stress der Tiere vorliegen. Eine mögliche Interpretation der erniedrigten Plasmakonzentrationen ist ein vermehrter Umsatz dieser Acylcarnitine in der  $\beta$ -Oxidation zur Energiegewinnung. Dies scheint vor allem durch den Tumor bedingt, aber zum Teil auch durch die SID. Dafür spricht auch, dass in verschiedenen Karzinomen bereits eine Überexpression von für die  $\beta$ -Oxidation relevanten Enzymen beobachtet werden konnte und so gilt eine vermehrte Fettsäureoxidation als ein typisches Merkmal des Tumormetabolismus [98]. Ein enger Zusammenhang besteht zwischen dem erhöhten Energiebedarf und der Entwicklung einer Kachexie [96]. So konnte man ebenfalls in der Gruppe der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere ein signifikant reduziertes Körpergewicht beobachten. Auch dies stützt die Vermutung über das Vorliegen eines katabolen Stoffwechsels in diesem Modell.

## 6.5 Welche Rolle spielen einzelne Metabolite im Tumorgeschehen?

---

Nicht für alle in dieser Studie gemessenen Metabolite gibt es bereits hinreichende Erkenntnisse über ihre Funktion im Tumor-beeinflussten Organismus. Auch über den Einfluss der postoperativen Immundysfunktion auf den Metabolismus verschiedener Stoffgruppen ist wenig bekannt.

In der vorliegenden Studie wurden im Plasma der Mäuse die Konzentrationen von 21 verschiedenen Aminosäuren bestimmt. Doch nur für *Ornithin*, *Phenylalanin* und *Prolin* zeigten sich signifikant höhere Konzentrationen im Serum der alleinig Tumor-tragenden Tiere im Vergleich zur Kontrolle. Im Serum der SID-operierten Tiere fanden sich tendenziell ähnlich niedrige Konzentrationen wie bei den Kontrolltieren. Möglicherweise hebt hier ein operatives Trauma den Effekt des Tumors wieder auf. Was offen bleibt ist, ob diese Aminosäuren bei den Tumor-tragenden Tieren vermehrt anfallen und durch die operativen Eingriffe womöglich einer erhöhten Verstoffwechslung unterliegen.

**Prolin** spielt in zahlreichen Stoffwechselprozessen, wie Proteinsynthese, Signalprozessen, Oxidation-Reduktion-Gleichgewicht und der Apoptose eine wichtige Rolle [99]. Es kann unter anderem eine erhöhte Proteinsynthese in Tumorzellen unterstützen [100]. **Phenylalanin** wird hauptsächlich durch die Phenylalaninhydroxylase zu Tyrosin umgewandelt [101]. Für dieses Enzym wurde bereits bei entzündlichen oder malignen Prozessen eine veränderte Aktivität festgestellt [102]. Tumoren weisen eine stärkere Akkumulation von Aminosäuren (Phenylalanin) auf als andere (insbesondere entzündete) Gewebe [103]. Möglicherweise würde sich für Phenylalanin ein entgegengesetztes Bild zeigen, wenn man die Konzentration in der direkten Tumorumgebung (statt im Plasma) messen würde, wenn die SID eine Aufnahme in die Tumorzellen begünstigt. **Ornithin** entsteht im Harnstoffzyklus [104]. Seine Funktion im Tumormetabolismus ist nur in Teilen bekannt. Ornithin scheint in engem Zusammenhang mit der Funktion der Makrophagen zu stehen. Während der M1-Subtyp Arginin eher zu NO (Stickstoffmonoxid) verstoffwechselt, stellen M2-Makrophagen vorrangig Ornithin her [105]. Ornithin selbst stellt eine Vorstufe für verschiedene Polyamine dar [106].

Zu den Polyaminen (biogene Amine) zählen u.a. **Spermin** und **Spermidin**, deren Synthese in Tumorzellen häufig dysreguliert und mit einem Tumorprogress assoziiert ist [107]. Über die Bindung an Nukleinsäuren haben sie direkten Einfluss auf die Genexpression und beeinflussen darüber essentielle Funktionen wie Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose [108]. Im Plasma der SID-operierten als auch Tumor-tragenden Tiere zeigten sich signifikant niedrigere Konzentrationen als in der Kontrolle. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der erhöhte Stoffwechsel im Tumor sein, der einen erniedrigten Umsatz in der Peripherie (z.B. durch weniger Ausgangsstoff) zur Folge hat.

Ein Stoffwechselfvorgang, für den bereits einige Erkenntnisse vorliegen ist der Tryptophan/**Kynurenin**-Stoffwechsel. Kynurenin entsteht durch enzymatische Umwandlungen (u.a. Indolamin-2,3-Dioxygenase) aus Tryptophan. Während der vermehrte Tryptophanmetabolismus lokal auf ein bestimmtes Gewebe beschränkt sein kann, wandert Kynurenin in die Blutbahn und ist dann in erhöhter Konzentration messbar [109]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Kynurenin immunsuppressive und dadurch Tumorwachstum-fördernde Mechanismen bedingt [110]. In den Gruppen der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere sowie der alleinig Tumor-tragenden Tiere zeigten sich signifikant höhere Kynurenin-Konzentrationen im Blutplasma (vs. SID bzw. vs. Kontrolle). Möglicherweise ist die erhöhte periphere Kynurenin-Konzentration ein Hinweis darauf, dass auch in diesem Modell in den Tumoren ein erhöhter Tryptophan-Stoffwechsel vorliegt. Auch wenn u.a. für proinflammatorische Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-1 $\beta$ ) bereits nachgewiesen ist, dass sie zu einer vermehrten Expression des betreffenden Enzyms führen, scheint das operative Trauma durch die SID keinen zusätzlichen Einfluss zu haben [111].

**Histamin** ist ein potenter Modulator der Immunreaktion. Die Wirkungsweise des Histamins wird maßgeblich dadurch bestimmt, auf welchen der vier Rezeptoren (H1R-H4R) das Histamin auf der Zielzelle trifft. Auch auf Tumorzellen lassen sich verschiedene Histaminrezeptoren finden [112]. So gibt es Versuche, bei denen über einen Agonismus als auch Antagonismus an den verschiedenen Histaminrezeptoren ein Einfluss auf das Tumorwachstum oder das Tumormikromilieu genommen worden ist [113]. Über den Histaminrezeptorstatus der Zellreihe der Tumoren dieses Versuchs ist bisher nichts bekannt. Entgegen der Erwartung, dass ein operatives Trauma (inflammatorischer Reiz), ein Tumor oder die Narkose zu einer erhöhten Histaminfreisetzung führt, wurden in allen Versuchsgruppen niedrigere Plasmakonzentrationen gemessen als in der Kontrolle. Möglicherweise war der Stimulus zur Histaminfreisetzung zum Zeitpunkt der Organentnahme bereits zu lange her. So wären aber eher Werte auf Normalniveau zu erwarten gewesen. Letztmöglich ist eine Art Gegenregulation anzunehmen [114].

Auf die **Carnosin**konzentration scheint die SID einen entscheidenden Einfluss zu haben. Beide SID-operierten Gruppen wiesen signifikant niedrigere Werte auf als die Kontrolle. Durch unterschiedlichste Mechanismen, wie das Abfangen von ROS oder RNS ist Carnosin in der Lage, die Lebensdauer von Zellen positiv zu beeinflussen [115]. Auf Tumorzellen scheint Carnosin hingegen einen gegenteiligen Effekt zu haben. Möglicherweise durch die in der Literatur beschriebene Inhibition der Glykolyse [116]. So könnte der Tumorwachstum-hemmende Effekt des Carnosins durch den Einfluss der SID reduziert sein. Eine denkbare Erklärung könnte eine verstärkte Aktivität der

Serumcarnosinase (abbauendes Enzym) sein, die auch bei Einsatz des Carnosins als Therapeutikum für eine reduzierte Bioverfügbarkeit verantwortlich ist [116]. Auch bei inflammatorischen Prozessen wird Carnosin ein protektiver Effekt zugesprochen [117]. So könnte dieser Effekt ebenfalls bei den SID-operierten Tieren reduziert sein.

Auch für **Lysophosphatidylcholine** wurden sowohl entzündungshemmende (z.B. Lyso PC a C20:4) als auch -fördernde (Lyso PC a C16:0) Effekte beobachtet. Sie sind also ebenfalls an einer Regulation der Immunantwort beteiligt [118, 119]. Häufig führte die SID bei den Tumor-tragenden Tieren zu signifikant niedrigeren Plasmaleveln. Interessanterweise konnte bereits festgestellt werden, dass eine postoperativ erniedrigte Konzentration an Lysophosphatidylcholinen mit einer verstärkten postoperativen Entzündungsreaktion und erhöhten Komplikationsrate bei kolorektalen Eingriffen (Karzinomoperationen) assoziiert ist [120]. So stellen auch die Lysophosphatidylcholine in diesem Modell möglicherweise einen Teil des Ursachengeflechtes für die erhöhte Mortalität der sowohl Tumor-tragenden als auch SID-operierten Tiere dar.

## **6.5 Beeinflussen Tumor und SID sogar den Metabolismus von Membranbestandteilen?**

---

Phosphatidylcholin ist das am häufigsten vorkommende Phospholipid in der Zellmembran von Säugetieren [121]. Ein erhöhter Fettsäuremetabolismus zur Energiegewinnung und Sicherstellung von ausreichend Baumaterial für Zell- und Zellmembransynthese ist charakteristisch für schnell proliferierendes Gewebe wie Tumoren [122]. Bei den PC-ae-Phosphatidylcholine fällt auf, dass es vorrangig die Gruppen der Tumor-tragenden Tiere sind, die tendenziell höhere Plasmakonzentrationen aufweisen als die Kontroll- oder SID-operierten Tiere (Ausnahme PC ae 40:1). Da die nur SID-operierten Tiere Plasmakonzentrationen nahe denen der Kontrolltiere aufwiesen, scheint das operative Trauma hier eine untergeordnete Rolle einzunehmen. Ein anderes und etwas heterogeneres Bild ergibt sich bei den PC-aa-Phosphatidylcholinen. Hier lässt sich auch ein Einfluss der SID (und auch der Laparotomie) allein beobachten.

Sphingomyelin (ein Sphingolipid) ist Bestandteil verschiedener Zellorganellen, wie beispielsweise dem Golgi-Apparat sowie der Plasmamembran. Sphingomyelinreiche Abschnitte der Membran unterliegen zahlreichen Regulationsmechanismen, da sie ein Ort der vermehrten Expression von Rezeptoren darstellt. So hat eine Veränderung in der Biosynthese und dem Einbau der Sphingomyeline auch einen Einfluss auf die Expression von Rezeptoren [123]. Der Sphingomyelinmetabolismus wird durch eine Vielzahl an Stimuli modelliert, darunter Zytokine oder Wachstumsfaktoren [124]. Es zeigt sowohl die SID als auch der Tumor einen gewissen Einfluss auf die



Plasmakonzentration der einzelnen Metabolite. Die Plasmakonzentrationen der SID-operierten Tiere beider Gruppen fallen meist niedriger aus als in der Kontrollgruppe (Ausnahme SM C16:0). Möglicherweise hat die SID also einen negativen Effekt auf die Sphingomyelinsynthese an sich oder es hat in diesen Gruppen bereits eine vermehrte Verstoffwechslung stattgefunden. Insgesamt kann festgestellt werden, dass sowohl die SID als auch der Tumor nicht nur einen Einfluss auf rein immunologische Prozesse, sondern auch auf die für die Zellmembran relevanten Metabolite hat.

## **6.6 Ergänzungen und Ausblick**

---

Retrospektiv bietet die Kombination beider Modelle eine sehr gute Möglichkeit, den Einfluss der postoperativen Immundysfunktion auf immunologische wie metabolische Vorgänge im Tumororganismus abzubilden und wichtige Erkenntnisse über dieses komplexe Geschehen zu generieren. Eine zu diskutierende Idee ist die Reduzierung der Versuchsgruppen auf drei (Tumor/SID, Tumor/Laparotomie, Tumor) wie schon in früheren Projekten [29]. So kann die Charakterisierung der postoperativen Immunsuppression allein von der Untersuchung ihres Einflusses auf einen Tumororganismus zur Steigerung der Aussagekraft getrennt werden. Das würde die Durchführung insgesamt erleichtern (weniger Tiere gleichzeitig in einem Versuchsdurchlauf, geringere Stallkapazität pro Durchlauf, Aufarbeitung der Proben weniger zeit- und personalaufwändig, dadurch weniger fehleranfällig, je nach verwendetem statistischen Test einfachere Auswertung). Für das vorliegende Projekt stellten die sechs Versuchsgruppen aber eine gute Möglichkeit dar, den Einfluss des einzelnen Stressors besser herauszuarbeiten. Eine weitere mehrfach angesprochene Auffälligkeit dieses Versuchs sind die mitunter signifikanten Veränderungen in der Auswertung der Daten der lediglich laparotomierten Tiere im Vergleich zu Kontrolle. Dies konnte auch schon in vorherigen Projekten zur Untersuchung der postoperativen Immunsuppression festgestellt werden. Allerdings zeigten sich die langfristigen Effekte meist weniger ausgeprägt und die Werte normalisierten sich in der Regel zügiger. Ebenso wurde durch die Laparotomie keine erhöhte Sterblichkeit festgestellt [27, 29]. Interessant dürften auch hier eine Betrachtung des zeitlichen Verlaufs und der Dauer der Beeinträchtigung sein. Nachdem nun gezeigt werden konnte, dass die Kombination beider Modelle einen wichtigen Beitrag zur Erforschung des Einflusses der postoperativen Immundysfunktion auf die Tumorentwicklung leisten kann, können weitere Herangehensweisen erarbeitet werden, wie eine genauere Untersuchung des Tumorgewebes, der -zellen und des -mikromilieus (z.B. weitere Funktionstests der einzelner Zellreihen). Dabei dürften insbesondere die Natürlichen Killerzellen, die Makrophagen und die Neutrophilen Granulozyten von hoher Relevanz sein.

## 7 Zusammenfassung

---

Trotz allen wissenschaftlichen Fortschritts und verbesserter Therapien bleibt das Pankreaskarzinom eine äußerst schwerwiegende Erkrankung und ist gekennzeichnet durch eine späte Diagnosestellung, eine - sofern noch möglich - anspruchsvolle und risikoreiche Operation zur Resektion und eine trotz aller Bemühungen niedrige Überlebensrate.

Die körpereigene Tumorabwehr umfasst eine Vielzahl an ineinandergreifenden immunologischen Prozessen und unterliegt der Beeinflussung durch zahlreiche Faktoren. Gerade für den Verlauf nach einer ausgedehnten Operation ist ein intaktes Immunsystem von ganz besonderer Bedeutung.

So ist es unabdingbar, die Kenntnisse über den Einfluss einer operativ ausgelösten Immundysfunktion auf den Verlauf des Pankreaskarzinoms zu erweitern und die Mechanismen dezidiert zu untersuchen.

Die Kombination beider Mausmodelle stellt dafür eine ausgezeichnete Möglichkeit dar.

Die Kombination von Tumor und SID löst eine starke Aktivierung des Immunsystems aus. In Blut und Milz konnte eine ausgeprägte Verschiebung der zellulären Zusammensetzung zugunsten der Neutrophilen Granulozyten und der Monozyten beobachtet werden. T-Helfer- und Zytotoxische T-Zellen zeigten eine verstärkte Aktivierung. Sowohl pro- (z.B. IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF) als auch antiinflammatorische (z.B. IL-10) Zytokine waren im Serum bzw. im Splenozytenüberstand in erhöhter Konzentration messbar. Dies unterstreicht die Vermutung, dass die Kombination beider Stressoren (Tumor + SID) zu einer verstärkten und möglicherweise prolongierten sowie dysregulierten Aktivierung des Immunsystems führt. Wesentliche Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im August 2022 im *Cancers* (Basel) veröffentlicht.

Zusätzlich konnte durch die Bestimmung verschiedenster Metabolite gezeigt werden, dass die Kombination von Tumor und SID einen katabolen Stoffwechsel hervorruft. Viele Metabolite, wie Spermin, Spermidin oder Carnosin, die das Tumorstadium beeinflussende Eigenschaften aufweisen, zeigten sich durch die Kombination der beiden Stressoren signifikant verändert. Nicht zuletzt wurde der Einfluss von Tumor und SID sogar auf den Stoffwechsel von Plasmamembranbestandteilen sichtbar.

Die Kombination dieser beiden Modelle bietet viel Potential für wichtige Erkenntnisse in Bezug auf den Einfluss der postoperativen Immundysfunktion auf den Verlauf des Pankreaskarzinoms und kann einen bedeutenden Beitrag zum Verständnis der immunologischen wie metabolischen Mechanismen leisten. Nur so besteht die Möglichkeit, in Zukunft vielversprechende Therapieansätze entwickeln zu können.

## 8 Literaturverzeichnis

---

1. Garrison, FH. The History of Cancer. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*. 1926, pp. 179-185.
2. (Destatis), Statistisches Bundesamt. *Gestorbene: Deutschland, Jahre, Todesursachen, Geschlecht (Todesursachenstatistik 2019)*. 2021.
3. pubmed.gov. [Online] National Library of Medicine. [Cited: Oktober 19, 2021.] [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=cancer&sort=pubdate&sort\\_order=asc](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=cancer&sort=pubdate&sort_order=asc).
4. Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A, Christ M, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Krebs. Krebs in Deutschland für 2015/2016. [ed.] Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Robert Koch-Institut. 2019, 12.
5. Chari ST, Kelly K, Hollingsworth MA, Thayer SP, Ahlquist DA, Andersen DK, Batra SK, Brentnall TA, Canto M, Cleeter DF, Firpo MA, Gambhir SS, Go VL, Hines OJ, Kenner BJ, Klimstra DS, Lerch MM, Levy MJ, Maitra A, Mulvihill SJ, Petersen GM, Rhim AD, Simeone DM, Srivastava S, Tanaka M, Vinik AI, Wong D. Early Detection of Sporadic Pancreatic Cancer. *Pancreas*. 2015, Vol. 44, pp. 693-712.
6. Keane MG, Horsfall L, Rait G, Pereira SP. A case-control study comparing the incidence of early symptoms in pancreatic and biliary tract cancer. *BMJ Open*. 2014, Vol. 4, p. e005720.
7. McGuigan A, Kelly P, Turkington RC, Jones C, Coleman HG, McCain RS. Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*. 2018, Vol. 24, pp. 4846-4861.
8. Partecke LI, Sendler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, Nguyen TD, Albers N, Speerforck S, Lerch MM, Heidecke CD, von Bernstorff W, Stier A. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *European Surgical Research*. 2011, Vol. 47, pp. 98-107.
9. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. 2011.
10. Yatim KM, Lakkis FG. A Brief Journey through the Immune System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2015, Vol. 10, pp. 1274-1281.
11. McComb S, Thiriou A, Akache B, Krishnan L, Stark F. Introduction to the Immune System. 2019, Vol. 2024, pp. 1-24.
12. Mishalian I, Granot Z, Fridlender Z. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiology*. 2017, Vol. 222, pp. 82-88.
13. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy Sciences of the USA*. 2006, Vol. 103, pp. 122493-12498.
14. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology*. 2015, Vol. 36, pp. 229-239.
15. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *International immunology*. 2016, Vol. 28, pp. 163-171.
16. Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell research*. 2017, Vol. 27, pp. 109-118.
17. Raskov H, Orhan A, Christensen JP, Gögenur I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer*. Vol. 124, pp. 359-367.
18. Wu SY, Fu T, Jiang YZ, Shao ZM. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*. 2020, Vol. 19, p. 120.
19. Sarvaria, A., Madrigal J.A., Saudemont, A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2017, Vol. 14, pp. 662 - 674.
20. Kalvakolanu DV. The "Yin-Yang" of cytokines in cancer. 2019, Vol. 118, pp. 1-2.

21. Zindel J, Kubes P. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual review of pathology*. 2020, Vol. 15, pp. 493-518.
22. Ritzel RM, Doran SJ, Barrett JP, Henry RJ, Ma EL, Faden AI, Loane DJ. Chronic Alterations in Systemic Immune Function after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*. 2018, Vol. 35, pp. 1419-1436.
23. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*. 2005, Vol. 36, pp. 691-709.
24. Kimura, F., Shimizu, H., Yoshidome, H., Ohtsuka, M., Miyazaki, M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surgery today*. 2010, Vol. 40, pp. 793-808.
25. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after Trauma. *Injury*. 2007, Vol. 38, pp. 1336-1345.
26. Angele MK, Chaudry IH. Surgical Trauma and Immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2005, Vol. 390, pp. 333-341.
27. Koerner P, Busemann A, Traeger T, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Kloecker C, Jack R, Heidecke CD, Maier S. Postoperative immune suppression in visceral surgery: characterisation of an intestinal mouse model. *European Surgical Research*. 2011, Vol. 47, pp. 260-266.
28. Kalff JC, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Surgical manipulation of the gut elicits an intestinal muscularis inflammatory response resulting in postsurgical ileus. *Annals of surgery*. 1998, Vol. 228, pp. 652-663.
29. Menges P, Klöcker C, Diedrich S, Sendler M, Maier S, Weiss FU, Heidecke CD, von Bernstorff W, Partecke LI. Surgical trauma leads to a shorter survival in a murine orthotopic pancreatic cancer model. *European Surgical Research*. 2015, Vol. 54, pp. 87-94.
30. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000, Vol. 100, pp. 57 - 70.
31. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011, Vol. 144, pp. 646 - 674.
32. Warburg O, Wind F, Negelein E. The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*. 1927, Vol. 8, pp. 519-530.
33. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. 2016, Vol. 41, pp. 211-218.
34. Mazurek S, Eigenbrodt E, Failing K, Steinberg P. Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathways after malignant transformation of rat liver oval cells. *Journal of cellular physiology*. 1999, Vol. 181, pp. 136-146.
35. Pacheco R, Gallart T, Lluís C, Franco R. Role of glutamate on T-cell mediated immunity. *Journal of Neuroimmunobiology*. 2007, Vol. 185, pp. 9-19.
36. Gottfried E, Kreutz M, Mackensen A. Tumor metabolism as a modulator of immune response and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*. 2012, Vol. 22, pp. 335-341.
37. Tuveson DA, Zhu L, Gopinathan A, Willis NA, Kachatrian L, Grochow R, Pin CL, Mitin NY, Taparowsky EJ, Gimotty PA, Hruban RH, Jacks T, Konieczny SF. Mist1-KrasG12D knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*. 2006, Vol. 66, pp. 242-247.
38. AL, Givan. Flow cytometry: an introduction. *Methods in molecular biology*. 2011, Vol. 699, pp. 1-29.
39. Matthiesen R, Bunkenborg J. Introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Methods in molecular biology*. 2013, Vol. 1007, pp. 1-45.
40. Medeiros NI, Gomes JAS. Cytometric Bead Array (CBA) for Measuring Cytokine Levels in Chagas Disease Patients. *Methods in molecular biology*. 2019, Vol. 1955, pp. 309-314.
41. Menges P, Kessler W, Kloecker C, Feuerherd M, Gaubert S, Diedrich S, Van der Linde J, Hegenbart A, Busemann A, Traeger T, Cziupka K, Heidecke CD, Maier S. Surgical Trauma and Postoperative Immune Dysfunction. *European Surgical Research*. 2012, Vol. 48, pp. 180-186.

42. Venara A, Neunlist M, Slim K, Barbieux J, Colas PA, Hamy A, Meurette G. Postoperative ileus: Pathophysiology, incidence, and prevention. *Journal of visceral surgery*. 2016, Vol. 153, pp. 439-446.
43. Tevis SE, Carchman EH, Foley EF, Harms BA, Heise CP, Kennedy GD. Postoperative Ileus--More than Just Prolonged Length of Stay? *Journal of gastrointestinal surgery*. 2015, Vol. 19, pp. 1684-1690.
44. Partecke IL, Kaeding A, Sendler M, Albers N, Kühn JP, Speerforck S, Roese S, Seubert F, Diedrich S, Kuehn S, Weiss UF, Mayerle J, Lerch MM, Hadlich S, Hosten N, Heidecke CD, Puls R, von Bernstorff W. In vivo imaging of pancreatic tumours and liver metastases using 7 Tesla MRI in a murine orthotopic pancreatic cancer model and a liver metastases model. *BMC Cancer*. 2011, Vol. 11, p. 40.
45. Finnerty CC, Mabvuure NT, Ali A, Kozar RA, Herndon DN. The surgically induced stress response. *Journal of parenteral and enteral nutrition*. 2013, Vol. 37, pp. 215-295.
46. Loening F, Kleinwort A, Partecke LI, Schulze T, Menges P. Visceral Surgery Profoundly Affects the Cellular and Humoral Components of the Anti-Tumour Immune Response in a Murine Pancreatic Adenocarcinoma Model. *Cancers (Basel)*. 2022, Vol. 14, p. 3850.
47. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nature reviews. Immunology*. 5, 2005, pp. 606-616.
48. Abramson N, Melton B. Leukocytosis: basics of clinical assessment. *American family physician*. 2000, Vol. 62, pp. 2053-2060.
49. Treffers LW, Hiemstra IH, Kuijpers TW, van den Berg TK, Matlung HL. Neutrophils in cancer. *Immunological Reviews*. 2016, Vol. 273, pp. 312-328.
50. Leliefeld PH, Wessels CM, Leenen LP, Koenderman L, Pillay J. The role of neutrophils in immune dysfunction during severe inflammation. *Critical Care*. 2016, Vol. 20, p. 73.
51. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010, Vol. 327, pp. 656-661.
52. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of cell physiology*. 2018, Vol. 233, pp. 6425-6440.
53. Sica A, Allavena P, Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer letters*. 2008, Vol. 264, pp. 204-215.
54. Partecke LI, Günther C, Hagemann S, Jacobi C, Merkel M, Sendler M, van Rooijen N, Käding A, Nguyen Trung D, Lorenz E, Diedrich S, Weiss FU, Heidecke CD, von Bernstorff W. Induction of M2-macrophages by tumour cells and tumour growth promotion by M2-macrophages: a quid pro quo in pancreatic cancer. *Pancreatology*. 2013, Vol. 13, pp. 508-516.
55. L, Hundt. *Analyse des Zeitverlaufs der postoperativen Immundysfunktion nach viszeralchirurgischen Eingriffen anhand des Mausmodells der surgically-induced immune dysfunction*. 2022.
56. Padoan A, Plebani M, Basso D. Inflammation and Pancreatic Cancer: Focus on Metabolism, Cytokines, and Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, Vol. 20, p. 676.
57. Liapis K, Tsagarakis NJ, Panitsas F, Taparkou A, Liapis I, Roubakis C, Tsokanas D, Vasileiou P, Grigoriou E, Kakiopoulos G, Psarra K, Farmaki E, Paterakis G. Causes of double-negative T-cell lymphocytosis in children and adults. *Journal of clinical pathology*. 2020, Vol. 73, pp. 431-438.
58. D'Acquisto F, Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochemical pharmacology*. 2011, Vol. 82, pp. 333-340.
59. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem cells*. 1994, Vol. 12, pp. 456-465.
60. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *European Journal of Immunology*. 2017, Vol. 47, pp. 946-953.

61. Esplugues E, Sancho D, Vega-Ramos J, Martínez C, Syrbe U, Hamann A, Engel P, Sánchez-Madrid F, Lauzurica P. Enhanced antitumor immunity in mice deficient in CD69. *The Journal of experimental medicine*. 2003, Vol. 197, pp. 1093-1106.
62. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods*. 2004, Vol. 294, pp. 15-22.
63. Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cellular immunology*. 2009, Vol. 254, pp. 149-154.
64. Pahl JHW, Cerwenka A, Ni J. Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors. *Frontiers in immunology*. 2018, Vol. 9, p. 2796.
65. Hennessy RJ, Pham K, Delconte R, Rautela J, Hodgkin PD, Huntington ND. Quantifying NK cell growth and survival changes in response to cytokines and regulatory checkpoint blockade helps identify optimal culture and expansion conditions. *Journal of leukocyte biology*. 2019, Vol. 105, pp. 1341-1354.
66. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*. 2007, Vol. 45, pp. 27-37.
67. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014, 6(10):a016295.
68. Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in Immunity and Diseases. *Advances in experimental medicine and biology*. 2016, Vol. 941, pp. 79-88.
69. Szczepanik AM, Scislo L, Scully T, Walewska E, Siedlar M, Kolodziejczyk P, Lenart M, Rutkowska M, Galas A, Czupryna A, Kulig J. IL-6 serum levels predict postoperative morbidity in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2011, Vol. 14, pp. 266-273.
70. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews. Rheumatology*. 2016, Vol. 12, pp. 49-62.
71. Fernández-Ruiz M, Aguado JM. Risk of infection associated with anti-TNF- $\alpha$  therapy. *Expert review of anti-infective therapy*. 2018, Vol. 16, pp. 939-956.
72. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy research and technique*. 2000, Vol. 50, pp. 184-195.
73. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*. 2010, Vol. 6, pp. 323-241.
74. Lukens JR, Gross JM, Kanneganti TD. IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease. *Frontiers in immunology*. 2012, Vol. 3, p. 315.
75. Bent R, Moll L, Grabbe S, Bros M. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, Vol. 19, p. 2155.
76. Oft, M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunology Research*. 2014, Vol. 2, pp. 194-199.
77. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer letters*. 2015, Vol. 367, pp. 103-107.
78. Tugues S, Burkhard SH, Ohs I, Vrohings M, Nussbaum K, Vom Berg J, Kulig P, Becher B. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell death and differentiation*. 2015, Vol. 22, pp. 237-246.
79. Ni L, Lu J. Interferon gamma in cancer immunotherapy. *Cancer medicine*. 2018, Vol. 7, pp. 4509-4516.
80. Miyakawa N, Nishikawa M, Takahashi Y, Ando M, Misaka M, Watanabe Y, Takakura Y. Prolonged circulation half-life of interferon  $\gamma$  activity by gene delivery of interferon  $\gamma$ -serum albumin fusion protein in mice. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011, Vol. 100, pp. 2350-2357.
81. Gonias SL, Pizzo SV, Hoffman M. Clearance and distribution of recombinant murine gamma-interferon in mice. *Cancer research*. 1988, Vol. 48, pp. 2021-2024.

82. Shi J, Song X, Traub B, Luxenhofer M, Kornmann M. Involvement of IL-4, IL-13 and Their Receptors in Pancreatic Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2021, Vol. 22, p. 2998.
83. Formentini A, Prokopchuk O, Sträter J, Kleeff J, Grochola LF, Leder G, Henne-Bruns D, Korc M, Kornmann M. Interleukin-13 exerts autocrine growth-promoting effects on human pancreatic cancer, and its expression correlates with a propensity for lymph node metastases. *International journal of colorectal disease*. 2009, Vol. 24, pp. 57-67.
84. T, Yoshimura. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cellular & molecular immunology*. 2018, Vol. 15, pp. 335-345.
85. Sierra-Filardi E, Nieto C, Domínguez-Soto A, Barroso R, Sánchez-Mateos P, Puig-Kroger A, López-Bravo M, Joven J, Ardavín C, Rodríguez-Fernández JL, Sánchez-Torres C, Mellado M, Corbí AL. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. *Journal of immunology*. 2014, Vol. 192, pp. 3858-3867.
86. Aziz N, Detels R, Quint JJ, Li Q, Gjertson D, Butch AW. Stability of cytokines, chemokines and soluble activation markers in unprocessed blood stored under different conditions. *Cytokine*. 2016, Vol. 84, pp. 17-24.
87. Gilreath JA, Stenehjem DD, Rodgers GM. Diagnosis and treatment of cancer-related anemia. *American Journal of Hematology*. 2014, Vol. 89, pp. 203-212.
88. Broadway-Duren JB, Klaassen H. Anemias. *Critical care nursing clinics of North America*. 2013, Vol. 25, pp. 411-426.
89. Gangat N, Wolanskyj AP. Anemia of chronic disease. *Seminars in hematology*. 2013, Vol. 50, pp. 232-238.
90. An X, Schulz VP, Mohandas N, Gallagher PG. Human and murine erythropoiesis. *Current Opinion in hematology*. 2015, Vol. 22, pp. 206-211.
91. Dinkla S, van Eijk LT, Fuchs B, Schiller J, Joosten I, Brock R, Pickkers P, Bosman GJ. Inflammation-associated changes in lipid composition and the organization of the erythrocyte membrane. *BBA clinical*. 2016, Vol. 5, pp. 186-192.
92. Gressner AM, Gressner OA. Thrombokrit. [ed.] Springer Medizin. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 2019.
93. Appleby N, Angelov D. Clinical and laboratory assessment of a patient with thrombocytosis. *British journal of hospital medicine (London)*. 2017, Vol. 78, pp. 558-564.
94. Vander Heiden MG, DeBerardinis RJ. Understanding the Intersections between Metabolism and Cancer Biology. *Cell*. 2017, Vol. 168, pp. 657-669.
95. Mu W, Yu L, Zhang W, Zhang T, Jiang B. Isomerases for biotransformation of D-hexoses. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015, Vol. 99, pp. 6571-6584.
96. Schcolnik-Cabrera A, Chávez-Blanco A, Domínguez-Gómez G, Dueñas-González A. Understanding tumor anabolism and patient catabolism in cancer-associated cachexia. *American journal of cancer research*. 2017, Vol. 7, pp. 1107-1135.
97. Bose S, Le A. Glucose Metabolism in Cancer. *Advances in experimental medicine and biology*. 2018, Vol. 1063, pp. 3-12.
98. Ma Y, Temkin SM, Hawkridge AM, Guo C, Wang W, Wang XY, Fang X. Fatty acid oxidation: An emerging facet of metabolic transformation in cancer. *Cancer letters*. 2018, Vol. 435, pp. 92-100.
99. Arentson BW, Sanyal N, Becker DF. Substrate channeling in proline metabolism. *Frontiers in biosciences (Landmark edition)*. 2012, Vol. 17, pp. 375-388.
100. JM, Phang. Proline Metabolism in Cell Regulation and Cancer Biology: Recent Advances and Hypotheses. *Antioxidants & redox signaling*. 2019, Vol. 30 (4), pp. 635-649.

101. DE, Matthews. An overview of phenylalanine and tyrosine kinetics in humans. *The Journal of nutrition*. 2007, Vol. 137 (6 Suppl 1), pp. 1549S-1555S.
102. Wiggins T, Kumar S, Markar SR, Antonowicz S, Hanna GB. Tyrosine, phenylalanine, and tryptophan in gastroesophageal malignancy: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 2015, Vol. 24(1), pp. 32-38.
103. Samnick S, Romeike BF, Kubuschok B, Hellwig D, Amon M, Feiden W, Menger MD, Kirsch CM. p-[123I]iodo-L-phenylalanine for detection of pancreatic cancer: basic investigations of the uptake characteristics in primary human pancreatic tumour cells and evaluation in in vivo models of human pancreatic adenocarcinoma. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2004, Vol. 31(4), pp. 532-541.
104. Sivashanmugam M, Jaidev J, Umashankar V, Sulochana KN. Ornithine and its role in metabolic diseases: An appraisal. *Biomedicine and pharmacotherapy*. 2017, Vol. 86, pp. 185-194.
105. Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Critical reviews in immunology*. 2012, Vol. 32(6), pp. 463-488.
106. Mills CD, Shearer J, Evans R, Caldwell MD. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *Journal of immunology*. 1992, Vol. 149(8), pp. 2709-2714.
107. Gerner EW, Meyskens FL Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature reviews. Cancer*. 2004, Vol. 4, pp. 781-792.
108. Amendola R, Cervelli M, Fratini E, Polticelli F, Sallustio DE, Mariottini P. Spermine metabolism and anticancer therapy. *Current cancer drug targets*. 2009, Vol. 9, pp. 118-130.
109. Kolodziej LR, Paleolog EM, Williams RO. Kynurenine metabolism in health and disease. *Amino Acids*. 2011, Vol. 41, pp. 1173-1183.
110. Zhai L, Bell A, Ladomersky E, Lauing KL, Bollu L, Sosman JA, Zhang B, Wu JD, Miller SD, Meeks JJ, Lukas RV, Wyatt E, Doglio L, Schiltz GE, McCusker RH, Wainwright DA. Immunosuppressive IDO in Cancer: Mechanisms of Action, Animal Models, and Targeting Strategies. *Frontiers in immunology*. 2020, Vol. 11, p. 1185.
111. Wirthgen E, Hoeflich A. Endotoxin-Induced Tryptophan Degradation along the Kynurenine Pathway: The Role of Indolamine 2,3-Dioxygenase and Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Immunosuppressive Effects in Endotoxin Tolerance and Cancer and Its Implications for Immunoparalysis. *Journal of amino acids*. 2015, Vol. 2015, p. 973548.
112. Branco ACCC, Yoshikawa FSY, Pietrobon AJ, Sato MN. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. *Mediators in inflammation*. 2018, Vol. 2018, p. 9524075.
113. Losurdo G, Principi M, Girardi B, Pricci M, Barone M, Lerardi E, Di Leo A. Histamine and Histaminergic Receptors in Colorectal Cancer: From Basic Science to Evidence-based Medicine. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2018, Vol. 18, pp. 15-20.
114. Fayaz KM, Pugh S, Balachandran S, Sudheer PS, Hall JE. Histamine release during adult cardiopulmonary bypass. *Anaesthesia*. 2005, Vol. 60, pp. 1179-1184.
115. Hipkiss AR, Cartwright SP, Bromley C, Gross SR, Bill RM. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? *Chemistry central journal*. 2013, Vol. 7, p. 38.
116. Gaunitz F, Hipkiss AR. Carnosine and cancer: a perspective. *Amino Acids*. 2012, Vol. 43, pp. 135-142.
117. Tanaka KI, Sugizaki T, Kanda Y, Tamura F, Niino T, Kawahara M. Preventive Effects of Carnosine on Lipopolysaccharide-induced Lung Injury. *Scientific reports*. 2017, Vol. 7, p. 42813.
118. Hung ND, Sok DE, Kim MR. Prevention of 1-palmitoyl lysophosphatidylcholine-induced inflammation by polyunsaturated acyl lysophosphatidylcholine. *Inflammation research*. 2012, Vol. 61, pp. 473-483.



119. Liu P, Zhu W, Chen C, Yan B, Zhu L, Chen X, Peng C. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases. *Life sciences*. 2020, Vol. 247, p. 117443.
120. Matsuda A, Yamada M, Matsumoto S, Sakurazawa N, Yamada T, Matsutani T, Miyashita M, Uchida E. Lysophosphatidylcholine as a predictor of postoperative complications after colorectal cancer surgery. *Surgery today*. 2018, Vol. 48, pp. 936-943.
121. Sonkar K, Ayyappan V, Tressler CM, Adelaja O, Cai R, Cheng M, Glunde K. Focus on the glycerophosphocholine pathway in choline phospholipid metabolism of cancer. *NMR in biomedicine*. 2019, Vol. 32, p. e4112.
122. ND, Ridgway. The role of phosphatidylcholine and choline metabolites to cell proliferation and survival. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. 2013, Vol. 48, pp. 20-38.
123. D'Angelo G, Moorthi S, Luberto C. Role and Function of Sphingomyelin Biosynthesis in the Development of Cancer. *Advances in cancer research*. 2018, Vol. 140, pp. 61-96.
124. GF, Nixon. Sphingolipids in inflammation: pathological implications and potential therapeutic targets. *British journal of pharmacology*. 2009, Vol. 158, pp. 982-939.

## 9 Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 1 Versuchsgruppen.....	16
Abbildung 2 Versuchsaufbau.....	16
Abbildung 3 Injektion der 6606-PDA-Zellen in das Pankreas.....	18
Abbildung 4 Operation nach der Methode der Surgically induced Immune Dysfunction.....	19
Abbildung 5 Lagerung der Maus im MRT.....	19
Abbildung 6 Überlebenskinetik.....	30
Abbildung 7 Gesamtbelastung errechnet aus den Summenbelastungsscores.....	31
Abbildung 8 Veränderungen des Körpergewichtes während des Versuchs.....	32
Abbildung 9 Tumor-ausdehnung in der magnetresonanztomographischen Untersuchung des Abdomens (T2-Wichtung).....	33
Abbildung 10 Tumolvolumen an Tag 8 und 27.....	34
Abbildung 11 Anzahl der Leukozyten im Blut.....	35
Abbildung 12 Monozyten- und Neutrophilenzahl im Blut.....	36
Abbildung 13 Anteile wichtiger Immunzellpopulationen an den Leukozyten im Blut.....	37
Abbildung 14 Erythrozytenparameter.....	38
Abbildung 15 Thrombokrit.....	39
Abbildung 16 Gesamtzellzahl der Milz.....	40
Abbildung 17 Zellzahl der Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der Milz.....	41
Abbildung 18 Anteil der B- und T-Lymphozyten an den Zellen der Milz.....	42
Abbildung 19 Anteil der Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen an den Zellen der Milz.....	43
Abbildung 20 Anteil der Natürlichen Killerzellen an den Zellen der Milz.....	43

Abbildung 21 Zusammensetzung der Immunzellen der Milz.....	44
Abbildung 22 Zellzahl und Anteil der T-Helferzellen an den T-Lymphozyten.....	45
Abbildung 23 Zellzahl und Anteil der CD8-positiven Zellen an den T-Lymphozyten.....	46
Abbildung 24 Zellzahl und Anteil der doppelt negativen T-Zellen an den T-Lymphozyten.....	47
Abbildung 25 Fluoreszenzintensität von CD69 auf T-Zellen.....	48
Abbildung 26 Anteile der Natürlichen Killerzellen an den vitalen Zellen nach Stimulation/im Medium...	50
Abbildung 27 Fluoreszenzintensität von Interferon- $\gamma$ in Natürlichen Killerzellen.....	51
Abbildung 28 Fluoreszenzintensität von CD107a auf Natürlichen Killerzellen.....	52
Abbildung 29 Konzentration von IL-6 im Serum.....	53
Abbildung 30 Konzentration von IL-10 im Serum.....	54
Abbildung 31 Konzentration von TNF im Serum.....	54
Abbildung 32 Konzentration von IL-1 $\beta$ im Blut nach Stimulation.....	55
Abbildung 33 Konzentration von IL-4 im Blut nach Stimulation.....	56
Abbildung 34 Konzentration von IL-6 im Blut nach Stimulation.....	56
Abbildung 35 Konzentration von MCP-1 und TNF im Blut nach Stimulation.....	57
Abbildung 36 Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF im Serum/Blut nach Stimulation.....	58
Abbildung 37 Konzentration von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-13 und IL-21 im unbehandelten Splenozytenüberstand.	59
Abbildung 38 Konzentration von IL-10, IL-12p70, IL-13 und MCP-1 im Splenozytenüberstand nach Stimulation.....	60
Abbildung 39 Konzentration von IL-21 im Splenozytenüberstand nach Stimulation.....	61
Abbildung 40 Konzentration von IL-1 $\beta$ und IL-6 im Splenozytenüberstand nach Stimulation.....	61
Abbildung 41 Konzentration von TNF im Splenozytenüberstand nach Stimulation.....	62
Abbildung 42 Konzentration an Hexosen im Blutplasma.....	64
Abbildung 43 Konzentration der Aminosäuren Ornithin, Phenylalanin und Prolin im Blutplasma.....	64
Abbildung 44 Konzentration an biogenen Aminen im Blutplasma.....	66
Abbildung 45 Konzentration an Acylcarnitinen im Blutplasma.....	67
Abbildung 46 Konzentration von Lysophosphatidylcholin im Blutplasma.....	68
Abbildung 47 Konzentration von PC aa Phospholipiden im Blutplasma.....	69
Abbildung 48 Konzentration von PC ae Phospholipiden im Blutplasma.....	70
Abbildung 49 Konzentration an Sphingolipiden im Blutplasma.....	71
Abbildung 50 Gatingstrategie zur Differenzierung der Immunzellen der Milz.....	VI
Abbildung 51 Gatingstrategie Splenozytenstimulation mit LPS bzw. mit IL-2, IL-12 und IL-18 und intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung.....	VII

## 10 Tabellenverzeichnis

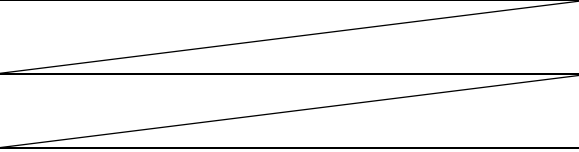
Tabelle 1 Score Sheet zur Beurteilung des Zustandes der Tiere.....	20
Tabelle 2 Antikörper für den Master-Mix.....	22
Tabelle 3 Antikörper für Master-Mix 1.....	24
Tabelle 4 Antikörper für den IFN $\gamma$ -Mix.....	24
Tabelle 5 Antikörper für den IFN $\gamma$ -Isotyp-Mix.....	25
Tabelle 6 Übersicht über die Ergebnisse der Zytokinmessungen.....	62
Tabelle 7 Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der vorliegenden Daten.....	IV

## 11 Abkürzungsverzeichnis

<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomycin D		stimulierender Faktor
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>GMFI</b>	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenzintensität
<b>A. dest</b>	Aqua destillata	<b>HLA-DR</b>	Human leukocyte antigen-DR isotype
<b>ANOVA</b>	Analysis of variance	<b>HMGB1</b>	High-mobility-group-box-1 protein
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>IDO</b>	Indolamin-2,3-desoxygenase
<b>ca.</b>	Circa	<b>I.E.</b>	Internationale Einheit
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium	<b>INF</b>	Interferon
<b>CBA</b>	Cytometric Bead Array	<b>IL</b>	Interleukin
<b>CCL</b>	CC-chemokine ligand	<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>CD</b>	Cluster of differentiation	<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>CARS</b>	Compensatory anti-inflammatory response syndrome	<b>LALLF</b>	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4	<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>DAMP</b>	Damage-associated molecular patterns	<b>LY6G</b>	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<b>MCH</b>	mean corpuscular haemoglobin
<b>DC</b>	Dendritische Zellen	<b>MCHC</b>	Mean corpuscular haemoglobin concentration
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	<b>MCP</b>	monocyte chemoattractant/chemotactic protein
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>MCV</b>	mean corpuscular volume
<b>et al.</b>	Et alii (und andere)	<b>M-CSF</b>	Macrophage colony-stimulating factor
<b>etc.</b>	et cetera	<b>MHC</b>	Major histocompatibility complex class
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting	<b>MODS</b>	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
<b>Fc</b>	Fragment crystallizable	<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>FCS</b>	Fetal calf serum	<b>MS</b>	Massenspektrometrie/-meter
<b>FoxP3</b>	Forkhea-Box Protein 3	<b>NaCl</b>	Natrium-Chlorid
<b>FSC</b>	Forward scatter	<b>NK</b>	Natürliche Killerzellen
<b>g</b>	Gravity, Erdbeschleunigung	<b>NLR</b>	Neutrophilen-Lymphozyten-Ratio
<b>G</b>	Gauge		
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Monozyten Kolonie-		

<b>ns</b>	nicht signifikant	<b>SIRS</b>	Systemic inflammatory response syndrome
<b>PAMP</b>	Pathogene-associated molecular patterns	<b>Th</b>	T-Helferzelle
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung	<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>PDA</b>	Pancreatic ductal adenocarcinoma	<b>TPO</b>	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
<b>PE/Cy7</b>	Phycoerythrin/Cyanine7	<b>TRAIL</b>	TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>PRR</b>	Pattern Recognition Receptors	<b>Treg</b>	Regulatorische T-Zellen
<b>RBC</b>	Red blood cells	<b>TCR</b>	T-cell receptor
<b>RNS</b>	reactive nitrogen species	<b>usw.</b>	und so weiter
<b>ROS</b>	reactive oxygen species	<b>vs.</b>	Versus
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute	<b>w/o</b>	without
<b>RT</b>	Raumtemperatur	<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>SID</b>	Surgically-induced immune dysfunction		

Tabelle 7 Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der vorliegenden Daten

	SID/ Tumor	Laparotomie/ Tumor	Keine OP/ Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle
<b>Abbildung 6 Überlebenskinetik (in %)</b>						
	84,62	75	73,33	78,57	100	100
<b>Abbildung 7 Gesamtbelastung errechnet aus den Summenbelastungsscores (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung)</b>						
	11,91 $\pm$ 5,45	6,56 $\pm$ 2,56	1,727 $\pm$ 2,15	5,27 $\pm$ 2,24	4,33 $\pm$ 2,09	0,06 $\pm$ 0,25
<b>Abbildung 8 Veränderungen des Körpergewichtes während des Versuchs</b>						
<b>A</b>	<b>Gewichtsverlauf (Mittelwert, in g)</b>					
<b>B</b>	<b>Versuchstag 0 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	23,37 $\pm$ 1,06	23,65 $\pm$ 1,16	23,49 $\pm$ 1,46	23,43 $\pm$ 0,73	23,21 $\pm$ 1,03	23,22 $\pm$ 1,08
	<b>Versuchstag 1 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	21,97 $\pm$ 1,45	22,54 $\pm$ 1,38	22,27 $\pm$ 1,43	24,21 $\pm$ 1,15	23,91 $\pm$ 1,12	23,92 $\pm$ 1,14
	<b>Versuchstag 8 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	23,37 $\pm$ 1,49	24,46 $\pm$ 0,89	23,69 $\pm$ 2,12	24,34 $\pm$ 0,99	24,21 $\pm$ 1,24	24,31 $\pm$ 0,98
	<b>Versuchstag 9 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	23,51 $\pm$ 1,33	24,11 $\pm$ 0,82	24,18 $\pm$ 1,56	24,15 $\pm$ 0,97	24,28 $\pm$ 1,42	24,30 $\pm$ 1,11
	<b>Versuchstag 11 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	23,42 $\pm$ 0,96	24,55 $\pm$ 0,95	24,43 $\pm$ 1,38	24,27 $\pm$ 0,92	24,28 $\pm$ 1,19	24,63 $\pm$ 0,92
	<b>Versuchstag 12 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	21,84 $\pm$ 1,21	23,28 $\pm$ 1,07	24,20 $\pm$ 1,49	22,05 $\pm$ 1,14	22,76 $\pm$ 1,27	24,29 $\pm$ 0,94
	<b>Versuchstag 21 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	23,86 $\pm$ 1,32	24,88 $\pm$ 1,32	24,57 $\pm$ 1,46	24,46 $\pm$ 0,67	24,40 $\pm$ 1,1	25,25 $\pm$ 1,42
	<b>Versuchstag 22 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	21,83 $\pm$ 1,31	24,09 $\pm$ 1,48	24,45 $\pm$ 1,46	22,82 $\pm$ 1,01	23,35 $\pm$ 1,14	24,95 $\pm$ 1,48
	<b>Versuchstag 27 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	23,76 $\pm$ 1,22	25,00 $\pm$ 1,28	24,84 $\pm$ 1,68	24,16 $\pm$ 0,92	24,25 $\pm$ 1,24	25,90 $\pm$ 1,38
<b>C</b>	<b>Versuchstag 28 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in g)</b>					
	23,63 $\pm$ 1,06	24,3 $\pm$ 0,8	24,44 $\pm$ 1,52	24,53 $\pm$ 0,68	23,72 $\pm$ 0,92	25,69 $\pm$ 1,33
<b>Abbildung 10 Tumolvolumen an Tag 8 und 27 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in mm<sup>3</sup>)</b>						
	<b>Tag 8</b>					
	87,7 $\pm$ 19,76	85 $\pm$ 25,02	103,2 $\pm$ 29,88			
	<b>Tag 27</b>					
	194,9 $\pm$ 70,78	178,9 $\pm$ 104,2	252,3 $\pm$ 114,9			
<b>Prozentuales Tumorstadium (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in %)</b>						
	118,2 $\pm$ 108	131,8 $\pm$ 127	132,7 $\pm$ 104,9			
<b>Differenz Tumorstadium Tag 27 - Tag 8 (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, in mm<sup>3</sup>)</b>						
	100,4 $\pm$ 77,27	103,7 $\pm$ 96,94	125,7 $\pm$ 89,52			
<b>Abbildung 11 Anzahl der Leukozyten im Blut (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, x10<sup>9</sup>/ml)</b>						
	11,7 $\pm$ 3,43	9,48 $\pm$ 1,62	8,66 $\pm$ 2,18	8,34 $\pm$ 3,2	9,76 $\pm$ 3,94	6,76 $\pm$ 2,66
<b>Lymphozytenzahl</b>						
	3,85 $\pm$ 1,16	4,18 $\pm$ 0,79	5,08 $\pm$ 1,96	4,44 $\pm$ 1,22	4,26 $\pm$ 1,27	5,1 $\pm$ 1,98
<b>Abbildung 12 Monozyten- und Neutrophilenzahl im Blut (Mittelwert <math>\pm</math> Standardabweichung, x10<sup>9</sup>/ml)</b>						
<b>A</b>	<b>Monozytenzahl</b>					
	0,89 $\pm$ 0,35	0,482 $\pm$ 0,17	0,19 $\pm$ 0,18	0,44 $\pm$ 0,35	0,47 $\pm$ 0,29	0,14 $\pm$ 0,13
<b>B</b>	<b>Neutrophilenzahl</b>					
	6,52 $\pm$ 2,47	4,33 $\pm$ 1,17	2,85 $\pm$ 1,57	3,86 $\pm$ 1,76	4,28 $\pm$ 1,82	0,73 $\pm$ 0,63

## Anhang

	SID/ Tumor	Laparotomie/ Tumor	Keine OP/ Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle
<b>Abbildung 13 Anteile wichtiger Immunzellpopulationen an den Leukozyten im Blut (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>						
<b>A</b>	<b>Lymphozytenanteil</b>					
	37,51 ± 12,14	45,47 ± 4,75	58,77 ± 22,27	49,17 ± 7,96	45,83 ± 15,22	81,81 ± 12,59
<b>B</b>	<b>Monozytenanteil</b>					
	7,61 ± 2,2	5,19 ± 1,87	3,59 ± 3,46	5,43 ± 4,24	5,33 ± 3,32	3,97 ± 3,93
<b>C</b>	<b>Neutrophilenanteil</b>					
	55,11 ± 11,54	45,74 ± 8,84	32,59 ± 14,58	45,53 ± 6,43	42,02 ± 11,03	10,86 ± 7,16
<b>D</b>	<b>Zusammenfassung</b>					
<b>Abbildung 14 Erythrozytenparameter</b>						
	<b>Hämoglobinkonzentration (Mittelwert ± Standardabweichung, in g/dl)</b>					
	11,75 ± 1,66	13,33 ± 0,61	12,96 ± 2,07	11,58 ± 2,31	12,94 ± 1,51	13,39 ± 2,34
	<b>Hämatokrit (Mittelwert ± Standardabweichung, in %<sub>vollblut</sub>)</b>					
	33,74 ± 3,21	37,46 ± 2,84	38,20 ± 5,95	34,53 ± 6,28	38,23 ± 3,79	40,07 ± 3,28
	<b>Mittleres korpuskuläres Volumen (Mittelwert ± Standardabweichung, in fl)</b>					
	42,55 ± 1,21	43,22 ± 0,83	44,10 ± 1,29	44 ± 0	44 ± 0	44 ± 0
<b>Abbildung 15 Thrombokrit (Mittelwert ± Standardabweichung, in %<sub>vollblut</sub>)</b>						
	0,57 ± 0,07	0,52 ± 0,16	0,53 ± 0,18	0,54 ± 0,21	0,53 ± 0,17	0,39 ± 0,16
	<b>Thrombozytenzahl (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>9</sup>/l)</b>					
	836,5 ± 149,3	791,9 ± 242,4	760,4 ± 220,2	823,1 ± 330,3	794,9 ± 258,8	597,1 ± 244,0
<b>Abbildung 16 Gesamtzellzahl der Milz (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>8</sup>)</b>						
	1,85 ± 1,02	1,42 ± 0,21	1,71 ± 1,07	1,46 ± 0,64	1,46 ± 0,68	0,91 ± 0,42
<b>Zellzahlen der B-, T-Lymphozyten und der Natürlichen Killerzellen</b>						
<b>A</b>	<b>B-Lymphozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>8</sup>)</b>					
	0,56 ± 0,31	0,57 ± 0,21	0,82 ± 0,59	0,56 ± 0,22	0,57 ± 0,25	0,49 ± 0,27
<b>B</b>	<b>T-Lymphozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>8</sup>)</b>					
	0,42 ± 0,2	0,36 ± 0,03	0,41 ± 0,19	0,38 ± 0,17	0,38 ± 0,15	0,29 ± 0,12
<b>C</b>	<b>NK-Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>6</sup>)</b>					
	2,85 ± 1,42	3,17 ± 0,16	3,47 ± 1,79	4,8 ± 2,27	4,12 ± 1,82	3,87 ± 1,83
<b>Abbildung 17 Zellzahl der Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in der Milz</b>						
<b>A</b>	<b>Zellzahl Neutrophile Granulozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>7</sup>)</b>					
	3,46 ± 1,25	3,47 ± 2,71	0,97 ± 0,58	1,79 ± 0,92	2,01 ± 1,17	0,22 ± 0,11
<b>B</b>	<b>Zellzahl Makrophagen (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>7</sup>)</b>					
	2,34 ± 1,08	1,92 ± 1,02	1,34 ± 0,74	1,29 ± 0,39	1,4 ± 0,62	0,38 ± 0,13
<b>Abbildung 18 Anteil der B- und T-Lymphozyten an den Zellen der Milz</b>						
<b>A</b>	<b>Anteil B-Lymphozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>					
	28,22 ± 1,98	36,12 ± 11,86	45,74 ± 8,55	38,65 ± 5,51	39,41 ± 7,45	52,28 ± 5,3
<b>B</b>	<b>Anteil T-Lymphozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>					
	23,28 ± 2,31	25,48 ± 2,27	28,66 ± 5,16	26,04 ± 3,88	26,51 ± 2,31	33,09 ± 3,13
<b>Abbildung 19 Anteil der Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen an den Zellen der Milz</b>						
<b>A</b>	<b>Anteil Neutrophile Granulozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>					
	24,95 ± 3,66	20,02 ± 9,69	8,39 ± 5,8	15,03 ± 6,32	15,71 ± 5,97	2,74 ± 1,76
<b>B</b>	<b>Anteil Makrophagen (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>					
	15,07 ± 3,2	11,63 ± 3,24	8,45 ± 3,04	11,54 ± 2,79	11,03 ± 3,02	4,54 ± 1,46
<b>Abbildung 20 Anteil der Natürlichen Killerzellen an den Zellen der Milz (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>						
	1,41 ± 0,47	1,94 ± 0,65	2,28 ± 0,95	3,34 ± 0,92	2,83 ± 0,63	4,5 ± 1,31

## Anhang

	SID/ Tumor	Laparotomie/ Tumor	Keine OP/ Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle
<b>Abbildung 22 Zellzahl und Anteil der T-Helferzellen an den T-Lymphozyten</b>						
<b>A</b>	<b>Zellzahl T-Helferzellen (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>7</sup>)</b>					
	1,71 ± 0,81	1,69 ± 0,42	2,13 ± 1,13	1,71 ± 0,79	1,71 ± 0,64	1,48 ± 0,64
<b>B</b>	<b>Anteil T-Helferzellen an den T-Lymphozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>					
	41,03 ± 5,36	42,41 ± 5,63	45,71 ± 5,46	44,56 ± 4,37	45,72 ± 2,96	50,03 ± 4,9
<b>Abbildung 23 Zellzahl und Anteil der CD8-positiven Zellen an den T-Lymphozyten</b>						
<b>A</b>	<b>Zellzahl CD8-positiver Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>7</sup>)</b>					
	1,09 ± 0,56	0,98 ± 0,14	1,45 ± 0,77	1,09 ± 0,55	1,04 ± 0,44	1,07 ± 0,48
<b>B</b>	<b>Anteil der CD8-positiven Zellen an den T-Lymphozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>					
	26,1 ± 2,94	26,99 ± 3,19	31,45 ± 6,04	28,02 ± 3,27	27,47 ± 1,88	36 ± 3,45
<b>Abbildung 24 Zellzahl und Anteil der doppelt negativen T-Zellen an den T-Lymphozyten</b>						
<b>A</b>	<b>Zellzahl doppelt negativer T-Zellen (Mittelwert ± Standardabweichung, x10<sup>7</sup>)</b>					
	1,19 ± 0,49	1,32 ± 0,75	0,81 ± 0,30	0,99 ± 0,38	1,02 ± 0,46	0,39 ± 0,18
<b>B</b>	<b>Anteil doppelt negativer T-Zellen an den T-Lymphozyten (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>					
	33,1 ± 7,15	31,26 ± 7,83	20,82 ± 5,4	27,3 ± 6,16	26,73 ± 3,99	13,94 ± 5
<b>Abbildung 25 Fluoreszenzintensität von CD69 auf T-Zellen</b>						
	<b>GMFI von CD69 auf CD4<sup>+</sup>-Zellen</b>					
	203,4 ± 43,75	196,3 ± 35,44	172,1 ± 37,52	182,5 ± 36,69	172,1 ± 26,65	136,5 ± 26,54
	<b>GMFI von CD69 auf CD8<sup>+</sup>-Zellen</b>					
	136,5 ± 28,64	129,3 ± 19,78	119,8 ± 23,91	127,5 ± 22,8	122,1 ± 17,89	106,9 ± 17,04
	<b>GMFI von CD69 auf CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>-Zellen</b>					
	228,8 ± 33,59	223,9 ± 28,99	211,3 ± 30,88	226,1 ± 33,45	210,0 ± 25,30	199,1 ± 28,6
<b>Abbildung 26 Anteile der Natürlichen Killerzellen an den vitalen Zellen nach Stimulation/im Medium (Mittelwert ± Standardabweichung, in %)</b>						
<b>B</b>	<b>Stimulation mit Interleukinen: Anteil der NK-Zellen</b>					
	2,86 ± 1,47	3,15 ± 0,51	3,96 ± 1,33	6,00 ± 1,53	4,74 ± 1,68	8,65 ± 1,51
<b>C</b>	<b>Stimulation mit LPS: Anteil der NK-Zellen</b>					
	0,7 ± 0,22	0,62 ± 0,1	0,96 ± 0,60	0,86 ± 0,23	0,78 ± 0,28	0,67 ± 0,4
<b>D</b>	<b>Inkubation im Medium: Anteil der NK-Zellen</b>					
	0,59 ± 0,23	0,61 ± 0,21	0,93 ± 0,34	0,83 ± 0,1	0,92 ± 0,22	1,37 ± 0,47
<b>Abbildung 27 Fluoreszenzintensität von Interferon-γ in Natürlichen Killerzellen (Mittelwert ± Standardabweichung, GMFI)</b>						
	<b>Fluoreszenzintensität von Interferon-γ nach Stimulation mit Interleukinen</b>					
	1705 ± 554,5	1595 ± 437,6	2093 ± 614,5	2000 ± 631,7	1865 ± 719,3	1826 ± 635,3
	<b>Fluoreszenzintensität von Interferon-γ nach Stimulation mit LPS</b>					
	949,7 ± 358,4	792,7 ± 145,6	1193 ± 468,6	1149 ± 603,9	1029 ± 559,6	873,8 ± 415,2
	<b>Fluoreszenzintensität von Interferon-γ nach Inkubation im Medium</b>					
	505,9 ± 80,18	643,0 ± 237,8	443,4 ± 39,12	636,1 ± 234,7	493,1 ± 45,25	571,8 ± 244,6
<b>Abbildung 28 Fluoreszenzintensität von CD107a auf Natürlichen Killerzellen (Mittelwert ± Standardabweichung, GMFI)</b>						
	<b>Fluoreszenzintensität von CD107a nach Stimulation mit Interleukinen</b>					
	1136 ± 310,2	1100 ± 360,4	1126 ± 224,6	1021 ± 72,57	1012 ± 145,3	1021 ± 279,3
	<b>Fluoreszenzintensität von CD107a nach Stimulation mit LPS</b>					
	758,3 ± 75,24	773,8 ± 54,37	982,6 ± 274,3	960,0 ± 357,3	785,3 ± 97,38	821,4 ± 270,2
	<b>Fluoreszenzintensität von CD107a nach Inkubation im Medium</b>					
	586,4 ± 175,9	724,2 ± 197,8	560,4 ± 107,2	854,8 ± 396,8	639,4 ± 59,4	603,0 ± 92,13

## Anhang

	SID/ Tumor	Laparotomie/ Tumor	Keine OP/ Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle
<b>Abbildung 29 Konzentration von IL-6 im Serum (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	16,59 ± 16,6	8,15 ± 4,88	3,11 ± 1,39	7,91 ± 4,1	6,80 ± 3,92	1,21 ± 0,29
<b>Abbildung 30 Konzentration von IL-10 im Serum (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	2,95 ± 1,79	1,42 ± 1,19	0,95 ± 1,29	1,47 ± 2,12	1,02 ± 1,36	0,59 ± 0,88
<b>Abbildung 31 Konzentration von TNF im Serum (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	12,43 ± 4,34	6,81 ± 2,43	5,5 ± 2,69	7,31 ± 2,15	7,31 ± 3,96	3,77 ± 1,17
<b>Abbildung 32 Konzentration von IL-1β im Blut nach Stimulation (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	277,7 ± 137,2	170,2 ± 125,3	62,49 ± 26,61	203,5 ± 130,8	143,2 ± 83,79	41,38 ± 27,32
<b>Abbildung 33 Konzentration von IL-4 im Blut nach Stimulation (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	1,76 ± 0,31	2,921 ± 1,73	1,5 ± 0,37	1,73 ± 0,57	1,86 ± 0,44	1,09 ± 0,45
<b>Abbildung 34 Konzentration von IL-6 im Blut nach Stimulation (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	3431 ± 2046	2037 ± 1461	1171 ± 801,5	2095 ± 1433	2012 ± 1412	772,2 ± 769,7
<b>Abbildung 35 Konzentration von MCP-1 und TNF im Blut nach Stimulation (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
<b>A</b>	<b>MCP-1 im Blut nach Stimulation</b>					
	43,13 ± 17,83	66,62 ± 50,06	51,51 ± 52,68	57,83 ± 48,1	74,15 ± 55,91	27,37 ± 18,06
<b>B</b>	<b>TNF im Blut nach Stimulation</b>					
	647,5 ± 181,5	703,5 ± 395,8	604,8 ± 344,2	866,5 ± 591,4	793,5 ± 545	1060 ± 750,2
<b>Abbildung 37 Konzentration von IL-1β, IL-6, IL-13 und IL-21 im unbehandelten Splenozytenüberstand (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
<b>A</b>	<b>IL-1β</b>					
	3,57 ± 1,53	2,63 ± 0,99	1,35 ± 1,40	2,33 ± 1,25	1,75 ± 1,27	0,39 ± 0,59
<b>B</b>	<b>IL-6</b>					
	3,17 ± 1,92	2,98 ± 1,93	2,19 ± 1,09	2,79 ± 1,38	2,38 ± 1,01	0,83 ± 0,71
<b>C</b>	<b>IL-13</b>					
	0,49 ± 0,41	0,38 ± 0,40	0,08 ± 0,15	0,13 ± 0,19	0,11 ± 0,17	0,004 ± 0,01
<b>D</b>	<b>IL-21</b>					
	0,67 ± 0,6	0,008 ± 0,02	0,33 ± 0,50	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,02	0,06 ± 0,14
<b>Konzentration von IFN-γ im unbehandelten Splenozytenüberstand (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	0,16 ± 0,15	0,15 ± 0,21	0,01 ± 0,29	0,18 ± 0,15	0,13 ± 0,15	0,02 ± 0,04
<b>Konzentration von IL-4 im unbehandelten Splenozytenüberstand (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	0,66 ± 0,24	0,48 ± 0,41	0,53 ± 0,59	0,33 ± 0,27	0,21 ± 0,22	0,25 ± 0,23
<b>Konzentration von MCP-1 im unbehandelten Splenozytenüberstand (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	8,28 ± 3,86	7,9 ± 3,98	11,03 ± 13,43	4,56 ± 4,28	3,78 ± 3,79	1,91 ± 2,55
<b>Konzentration von IL-12p70 im unbehandelten Splenozytenüberstand (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	0,03 ± 0,09	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,27 ± 0,41	0 ± 0
<b>Abbildung 38 Konzentration von IL-10, IL-12p70, IL-13 und MCP-1 im Splenozytenüberstand nach Stimulation (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
<b>A</b>	<b>IL-10</b>					
	359,1 ± 143,6	262,3 ± 117,3	137,1 ± 122	222,8 ± 112,6	245,9 ± 141,5	106,6 ± 80,7



## Anhang

	SID/ Tumor	Laparotomie/ Tumor	Keine OP/ Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle
<b>B</b>	<b>IL-12p70</b>					
	1,11 ± 1,62	0,02 ± 0,04	0,01 ± 0,04	0,01 ± 0,04	0,10 ± 0,22	0,01 ± 0,03
<b>C</b>	<b>IL-13</b>					
	1,08 ± 0,79	0,70 ± 0,43	0,63 ± 0,68	0,41 ± 0,34	0,29 ± 0,33	0,19 ± 0,30
<b>D</b>	<b>MCP-1</b>					
	334,3 ± 194	289,3 ± 183,3	62,21 ± 67,68	183,6 ± 110,6	188,3 ± 171,3	12,84 ± 9,08
<b>Abbildung 39 Konzentration von IL-21 im Splenozytenüberstand nach Stimulation (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	0,37 ± 0,42	0,30 ± 0,40	0,53 ± 0,61	0,47 ± 0,47	0,1 ± 0,03	0,01 ± 0,03
<b>Abbildung 40 Konzentration von IL-1β und IL-6 im Splenozytenüberstand nach Stimulation (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
<b>A</b>	<b>IL-1β</b>					
	62,08 ± 24,5	46,99 ± 20,98	35,74 ± 18,98	53,36 ± 32,85	60,15 ± 33,26	26,2 ± 17,6
<b>B</b>	<b>IL-6</b>					
	1301 ± 474,2	995,4 ± 472,8	577,7 ± 350,7	929,7 ± 382	993,1 ± 539,5	293 ± 162,9
<b>Abbildung 41 Konzentration von TNF im Splenozytenüberstand nach Stimulation mit LPS (Mittelwert ± Standardabweichung, in pg/ml)</b>						
	1851 ± 780,2	1070 ± 553,2	752,6 ± 380,7	1078 ± 433,9	1355 ± 482,4	817,1 ± 476,6
<b>Abbildung 42 Konzentration an Hexosen im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in mmol/l)</b>						
	9,17 ± 1,42	10,42 ± 2,62	7,59 ± 2,31	9,79 ± 3,16	10,57 ± 2,52	12,18 ± 2,14
<b>Abbildung 43 Konzentration der Aminosäuren Ornithin, Phenylalanin und Prolin im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in μmol/l)</b>						
	<b>Ornithin</b>					
	87,62 ± 33,18	85,55 ± 15,01	96,64 ± 29,15	66,34 ± 25,67	68,15 ± 18,89	63,47 ± 18,28
	<b>Phenylalanin</b>					
	82,58 ± 18	85,27 ± 13,32	90,35 ± 18,93	88,49 ± 25,34	81,36 ± 18,33	73,53 ± 11,86
	<b>Prolin</b>					
	107,4 ± 30,48	106,3 ± 20,89	125,1 ± 37,68	90,01 ± 24,29	94,21 ± 18,71	86,04 ± 17,28
<b>Abbildung 44 Konzentration an biogenen Aminen im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in μmol/l)</b>						
	<b>Histamin</b>					
	0,7 ± 0,27	0,59 ± 0,28	0,69 ± 0,42	0,70 ± 0,28	0,74 ± 0,41	1,4 ± 0,61
	<b>Spermidin</b>					
	0,91 ± 0,18	1,55 ± 0,66	1,43 ± 0,6	1,12 ± 0,28	1,03 ± 0,27	1,45 ± 0,21
	<b>Kynurenin</b>					
	1,3 ± 0,7	0,95 ± 0,33	1,73 ± 0,88	0,63 ± 0,18	0,61 ± 0,05	0,75 ± 0,11
	<b>Carnosin</b>					
	0,48 ± 0,16	0,42 ± 0,1	0,52 ± 0,15	0,42 ± 0,09	0,51 ± 0,17	0,64 ± 0,11
	<b>Spermin</b>					
	0,21 ± 0,03	0,29 ± 0,11	0,28 ± 0,08	0,21 ± 0,03	0,22 ± 0,07	0,29 ± 0,08
<b>Abbildung 45 Konzentration an Acylcarnitinen im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in μmol/l)</b>						
	<b>C16 L-Palmitoylcarnitin</b>					
	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,18 ± 0,04
	<b>C18:1</b>					
	0,13 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,17 ± 0,03

## Anhang

	SID/ Tumor	Laparotomie/ Tumor	Keine OP/ Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle
<b>C2_Acetylcarnetin</b>						
	3,93 ± 0,87	3,66 ± 1,11	4,43 ± 1,62	4,05 ± 0,67	4,03 ± 0,78	5,42 ± 1,33
<b>Abbildung 46 Konzentration von Lysophosphatidylcholinen im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in µmol/l)</b>						
<b>lysoPC a C16:0</b>						
	145,2 ± 17,22	168,8 ± 18,98	154,8 ± 28,22	142,1 ± 28,61	149,3 ± 24,38	163,8 ± 15,95
<b>lysoPC a C18:2,</b>						
	75,31 ± 10,7	85,38 ± 10,17	80,55 ± 24,55	76,85 ± 16,14	76,09 ± 9,14	90,38 ± 7,06
<b>lysoPC a C20:4</b>						
	19,92 ± 4,35	23,59 ± 5,98	21,06 ± 4,59	19,89 ± 4,94	22,17 ± 2,99	24,55 ± 3,49
<b>lysoPC a C17:0</b>						
	1,95 ± 0,24	2,18 ± 0,32	2,28 ± 0,2	1,92 ± 0,23	1,86 ± 0,29	1,98 ± 0,19
<b>Abbildung 47 Konzentration von PC aa Phospholipiden im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in µmol/l)</b>						
<b>PC aa C34:2</b>						
	294,5 ± 40,87	322,8 ± 36,47	316,3 ± 54,71	265,1 ± 30,80	260,0 ± 39,29	323,7 ± 51,57
<b>PC aa C36:4</b>						
	89,62 ± 10,59	102,6 ± 22,09	96,90 ± 14,93	80,38 ± 15,56	83,18 ± 12,11	104,2 ± 8,81
<b>PC aa C36:3</b>						
	87,65 ± 11,43	85,55 ± 14,57	79,08 ± 11,66	70,40 ± 12,74	76,10 ± 11,60	70,98 ± 7,24
<b>PC aa C38:6</b>						
	62,80 ± 9,11	72,71 ± 15,94	66,93 ± 9,74	54,77 ± 16,44	58,22 ± 8,61	74,08 ± 9,29
<b>PC aa C38:5</b>						
	27,31 ± 4,51	27,23 ± 5,9	23,25 ± 2,51	23,19 ± 4,20	25,49 ± 3,66	22,96 ± 3,06
<b>PC aa C38:3</b>						
	23,00 ± 3,54	23,73 ± 3,65	18,65 ± 4,26	19,87 ± 5,28	22,81 ± 4,10	19,21 ± 2,57
<b>PC aa C34:3</b>						
	10,25 ± 1,25	10,50 ± 1,87	9,369 ± 1,96	8,937 ± 2,15	9,968 ± 2,04	12,33 ± 1,65
<b>PC aa C32:1</b>						
	4,31 ± 0,82	3,99 ± 0,98	3,24 ± 0,94	3,09 ± 0,94	4,41 ± 1,396	4,39 ± 0,76
<b>PC aa C40:5</b>						
	4,33 ± 0,68	4,47 ± 0,80	3,44 ± 0,75	3,74 ± 1,24	4,17 ± 0,66	3,48 ± 0,43
<b>Abbildung 48 Konzentration von PC ae Phospholipiden im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in µmol/l)</b>						
<b>PC ae C34:1</b>						
	3,51 ± 0,38	3,52 ± 0,45	3,13 ± 0,3	2,9 ± 0,47	3,22 ± 0,4	2,96 ± 0,3
<b>PC ae C36:4</b>						
	3,46 ± 0,37	3,78 ± 0,85	3,25 ± 0,43	2,66 ± 0,47	2,86 ± 0,27	2,76 ± 0,41
<b>PC ae C38:5</b>						
	3,26 ± 0,3	3,38 ± 0,67	3,17 ± 0,42	2,66 ± 0,42	2,73 ± 0,26	2,69 ± 0,37
<b>PC ae C38:4</b>						
	2,98 ± 0,33	3,2 ± 0,66	3,09 ± 0,39	2,49 ± 0,42	2,54 ± 0,28	2,64 ± 0,29
<b>PC ae C40:1</b>						
	1,58 ± 0,31	1,83 ± 0,46	1,65 ± 0,21	1,6 ± 0,41	1,71 ± 0,31	1,92 ± 0,22
<b>PC ae C38:6</b>						
	1,73 ± 0,19	1,94 ± 0,42	1,72 ± 0,22	1,41 ± 0,28	1,48 ± 0,16	1,59 ± 0,20

## Anhang

	SID/ Tumor	Laparotomie/ Tumor	Keine OP/ Tumor	SID	Laparotomie	Kontrolle
<b>PC ae C36:3</b>						
	1,78 ± 0,28	1,81 ± 0,27	1,65 ± 0,18	1,5 ± 0,18	1,51 ± 0,18	1,57 ± 0,15
<b>PC ae C36:5</b>						
	1,37 ± 0,21	1,57 ± 0,26	1,62 ± 0,18	1,23 ± 0,23	1,14 ± 0,17	1,34 ± 0,15
<b>PC ae C38:3</b>						
	1,47 ± 0,21	1,46 ± 0,25	1,4 ± 0,2	1,21 ± 0,15	1,31 ± 0,12	1,21 ± 0,13
<b>Abbildung 49 Konzentration an Sphingolipiden im Blutplasma (Mittelwert ± Standardabweichung, in μmol/l)</b>						
<b>SM C16:0</b>						
	9,93 ± 0,54	10,38 ± 1,49	10,41 ± 0,84	9,04 ± 1,38	9,1 ± 0,96	9,12 ± 1,12
<b>SM C22:3</b>						
	2,81 ± 0,35	3,13 ± 0,7	2,95 ± 0,35	2,47 ± 0,63	2,64 ± 0,43	3,33 ± 0,45
<b>SM C24:0</b>						
	2,55 ± 0,38	2,95 ± 0,36	2,49 ± 0,51	2,71 ± 0,8	2,98 ± 0,54	3,16 ± 0,69
<b>SM C16:1</b>						
	1,69 ± 0,15	2,04 ± 0,31	1,91 ± 0,35	1,66 ± 0,39	1,9 ± 0,2	2,22 ± 0,29
<b>SM C18:0</b>						
	0,86 ± 0,07	0,9 ± 0,13	0,96 ± 0,11	0,75 ± 0,13	0,86 ± 0,11	1,03 ± 0,14

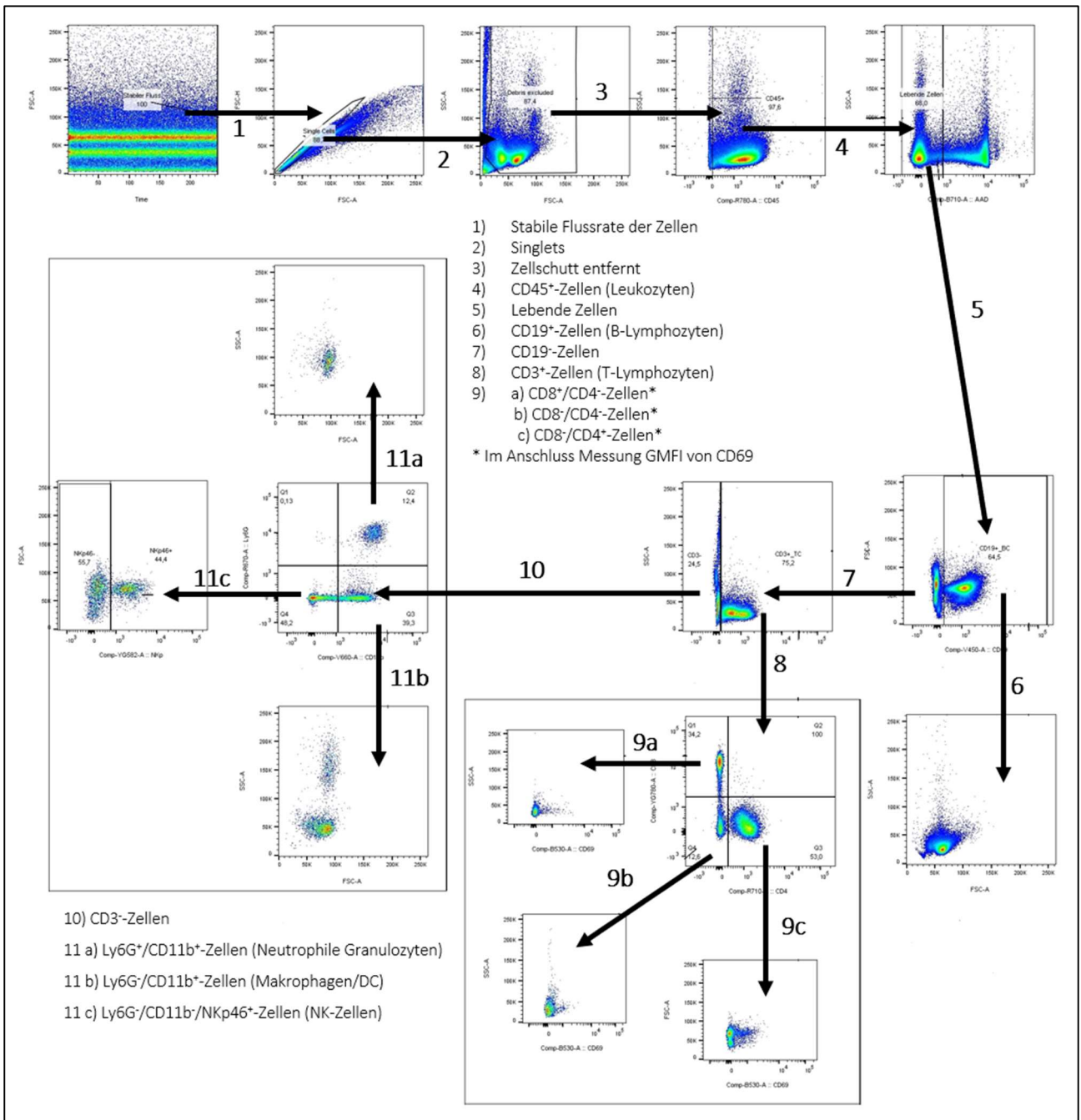
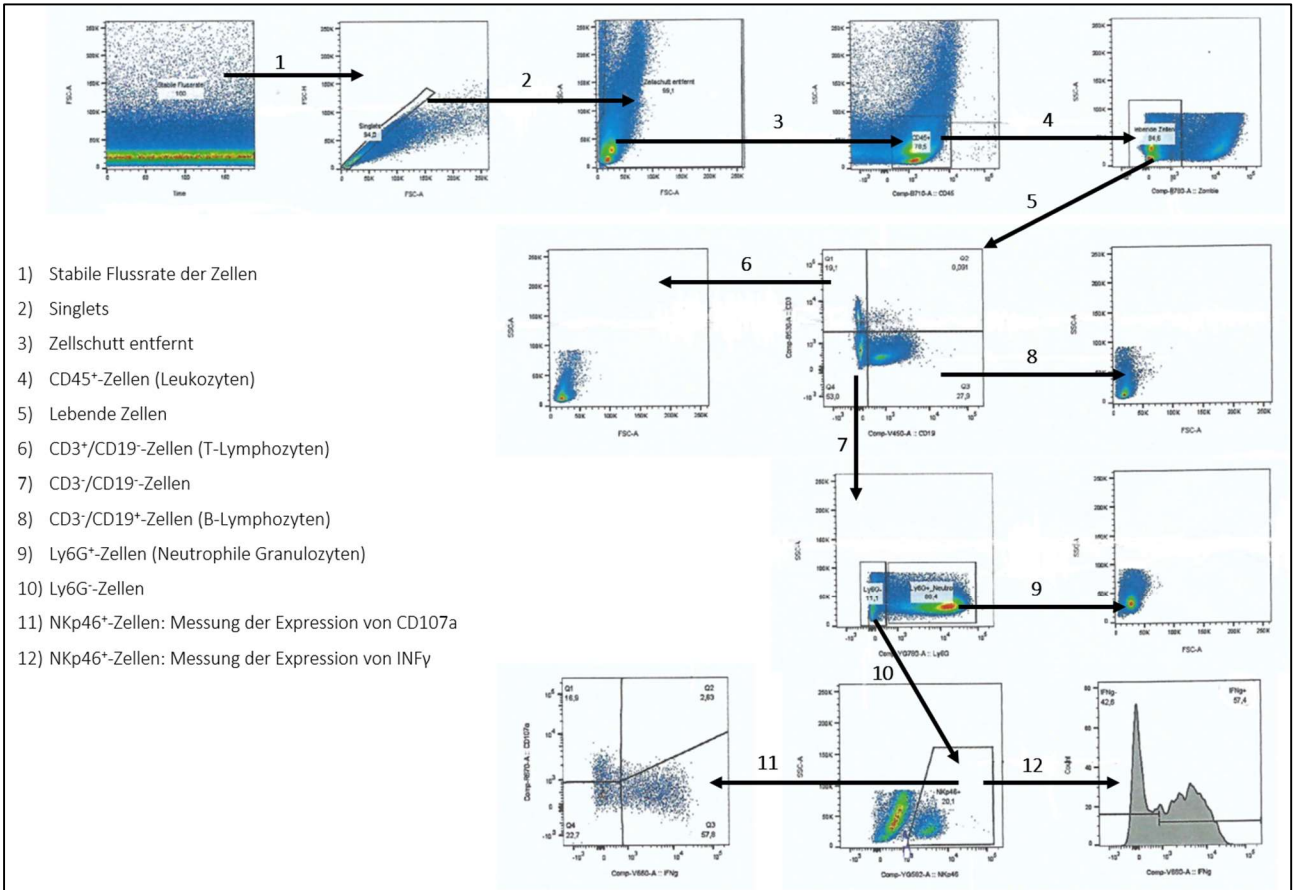


Abbildung 50 Gatingstrategie zur Differenzierung der Immunzellen der Milz

Analyse der Immunzellen der Milz mit Hilfe der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper CD45, CD19, CD3, CD8, CD4, Ly6G, CD11b und NKp46. Detektion toter Zellen mit Hilfe von 7-AAD. Bestimmung der T-Lymphozytenaktivierung mit Hilfe von CD69.

# Anhang



**Abbildung 51 Gatingstrategie Splenozystenstimulation mit LPS bzw. mit IL-2, IL-12 und IL-18 und intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung**

Analyse der NK-Zellen der Milz mit Hilfe der Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper CD45, CD19, CD3, CD8, Ly6G und NKp46. Ausschluss toter Zellen mit Hilfe von Zombie Fixable Viability Kit. Bestimmung der Expression von CD107a und IFN $\gamma$  (intrazellulär) auf den/in den Nk-Zellen.

## Eidesstattliche Erklärung

---

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

### Danksagung

---

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Doktormutter PD Dr. med. Pia Menges für das interessante Thema sowie die Möglichkeit zur Arbeit im Chirurgischen Forschungslabor bedanken. Bei Fragen und Problemen traf ich stets auf ein offenes Ohr. Eine so enge und unkomplizierte Betreuung durch die Doktormutter ist nicht selbstverständlich.

Auch für die Nähe zur Chirurgischen Klinik unter Professor Heidecke bin ich dankbar. Es ermöglichte mir neben der Arbeit im Labor auch praktische chirurgische Fähigkeiten zu trainieren, von denen ich bis heute in meiner Weiterbildung zur Chirurgin profitiere.

Das chirurgische Forschungslabor, damals vor allem geprägt durch Christine Hackbarth, Julia Klauke und Antje Janetzko bot mir ein Umfeld, dass die Durchführung der Versuche erst möglich machte. Ohne ihren Einsatz – ob in den frühesten Morgen- oder den späten Abendstunden – wäre die Arbeit nicht zu bewältigen gewesen.

Ich bedanke mich bei allen Personen und Abteilungen, die das Gelingen dieser Arbeit möglich gemacht haben. Zu Ihnen zählen Matthias Sandler für die Implantation der Tumoren, die Immunologie, die klinische Chemie, die Versuchstierhaltung und das Kleintier-MRT.

Für die praktische Unterstützung während der Versuchsreihen danke ich all meinen Mitdoktoranden aus dieser Zeit. Im Besonderen Annabel Kleinwort und Bastian Wenke – aus Anleitung und Einarbeitung ist Freundschaft entstanden. Aber vor allen danke ich Laura Hundt. Ohne deine Hilfe, dein offenes Ohr und deine Unterstützung in dieser Zeit wäre diese Arbeit wohl nie fertig geworden. In der Zeit von der Auswahl des Themas, über erste Hindernisse bis zur fertigen Doktorarbeit konnten wir uns auf den Rat des anderen verlassen. Diese Zeit hat unsere Freundschaft gefestigt und geprägt. Meiner Familie – allen voran meinen Eltern und meiner Schwester - danke ich für ihre Unterstützung, derer ich mir immer sicher war. Nicht nur in der Zeit der Doktorarbeit, sondern auch für alle anderen Dinge im Leben.

Mein größter Dank gilt meinem Mann. Natürlich für alle aufbauenden Worte und den Halt den Du mir gegeben hast. Aber am dankbarsten bin ich, weil Du ein ‚Aufgeben‘ kritisch hinterfragt, aber bei einem Scheitern zu jeder Zeit hinter mir gestanden hättest.

Vielen Dank!