

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie

(Direktor: Prof. Dr. med. univ. Roland S. Croner)

der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Machbarkeit einer Druckaerosolchemotherapie
(PILAC) im distalen Ösophagus unter Verwendung
von Dbaits (siDNA): ein Tierexperiment**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von Nadja Khalili Harbi

aus München

Magdeburg 2019

Dokumentationsblatt

Titel	Machbarkeit einer Druckaerosolchemotherapie (PILAC) im distalen Ösophagus unter Verwendung von Dbaits (siDNA): ein Tierexperiment
Person(en)	Khalili Harbi, Nadja
Ausgabe	1.Auflage
Verleger	Magdeburg: Otto-von-Guericke-Universität
Erscheinungsjahr	2019
Umfang/Format	64 Seiten/ A4, 16 Abbildungen, 3 Tabellen
Anmerkungen	97 Literaturangaben
ISBN/Einband/Preis	---
EAN	---
Schlagwörter	Endoskopie; Verdauungstrakt; Barrett-Ösophagus; Nebulizer; Pneumoperitoneum; medikamentöses Aerosol; Dbaits; Tierexperiment; siDNA, PILAC; Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy; PIPAC; Pressurized IntraPeritoneal Chemotherapy
Kurzreferat	Tierexperimentelle Studie zum Einsatz eines therapeutischen Aerosols im distalen Ösophagus. Untersuchung der Verteilung und der Penetration eines Chemotherapeutikums in die Ösophagus Schleimhaut für eine effektive, pharmakologische Therapie des Barrett-Ösophagus.

Schlüsselwörter

Endoskopie, Verdauungstrakt

Barrett-Ösophagus

Nebulizer

Pneumoperitoneum

medikamentöse Aerosol Therapie

Tierexperiment

Dbaits

siDNA

PILAC: Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy

PIPAC: Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	2
Schlüsselwörter.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungen.....	8
Einleitung.....	9
Einteilung und Klassifikation des Barrett-Ösophagus.....	10
Aktuelle Therapie des Barrett-Ösophagus.....	11
Behandlungsoptionen der niedriggradigen Ösophagusdysplasie.....	12
Endoskopische Mukosaresektion (EMR).....	13
Radiofrequenzablation (RFA).....	13
Andere Verfahren.....	14
Behandlungsoptionen der hochgradigen Ösophagusdysplasie.....	15
Chirurgische Ösophagusresektion.....	15
Klassifikation des Ösophaguskarzinoms.....	16
Tumorprogression beim Barrett-Ösophagus.....	17
Kombinierte und sequentielle Therapien.....	18
Komplikationsvermeidung nach interventioneller Therapie.....	20
Pharmakologische Interventionen als neue Therapieansätze.....	20
Arbeitshypothese.....	21
Optimierung der lokalen medikamentösen Therapie durch den Einsatz eines Aerosols unter Druck.....	22
Neuer Ansatz: die „Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy“ (PILAC) ...	24
Ziele der vorliegenden Arbeit.....	25
Material und Methoden.....	27
Studiendesign.....	27
Zeitraum und Ort der Experimente.....	27
Regulatorische Rahmenbedingungen.....	27
Technologie.....	28
Tiere und Narkose.....	29
Chirurgischer Eingriff.....	30
Testsubstanzen: Methylenblau und Dbait (siDNA).....	33
Durchführung des Experiments.....	35

Mikroskopische Analyse des Zielgewebes.....	36
Messungen im Zielgewebe.....	36
Ergebnisse	37
Makroskopische Verteilung und mikroskopische Penetration von siDNA in das Zielgewebe.....	39
Diskussion.....	41
Die Experimente deuten auf mögliche Vorteile der PILAC vs. der bisherigen Ablationsverfahren.....	42
Aktuelle medikamentöse Therapieansätze in der Behandlung vom Barrett- Karzinom	44
Patientensicherheit.....	44
Arbeitssicherheit.....	45
Aerosolisierung eines Chemotherapeutikums als neuer Therapieansatz des Barrett-Ösophagus.....	45
Ungelöste Fragestellungen.....	46
Ausblick	47
Zusammenfassung	48
Literaturverzeichnis.....	49
Danksagungen	60
Erklärung	61
Darstellung des Bildungsweges.....	62

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überlebenschancen nach Erstdiagnose eines Ösophaguskarzinoms	10
Abbildung 2: Endoskopische Prager Klassifikation des Barrett-Ösophagus	11
Abbildung 3: Von der gastro-ösophagealen Refluxkrankheit (GERD) zum Barrett-Karzinom	17
Abbildung 4: Prinzip der PIPAC (Pressurized intraPeritoneal Aerosol Chemotherapy)	23
Abbildung 5: Prinzip der PILAC (Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy)	25
Abbildung 6: Prototyp des Capnoflex®	28
Abbildung 7: Die Capnoflex® Düse	29
Abbildung 8: Lagerung und Operationsbedingungen	30
Abbildung 9: Position der chirurgischen Zugänge (Trokare).....	31
Abbildung 10: Platzierung der Capnoflex® unter Sicht während einer Ösophagogastroskopie	32
Abbildung 11: Darstellung des Capnoflex® in situ.	33
Abbildung 12: Aktionsmechanismus der therapeutischen Substanz (siDNA)	35
Abbildung 13: Intraluminale Applikation von Dbait mittels Caponoflex®.	37
Abbildung 14: Granulometrische Analyse des Aerosols	38
Abbildung 15: Makroskopie des ösophagogastralen Überganges nach PILAC.....	39
Abbildung 16: Verteilung und Eindringtiefe der siDNA im Zielgewebe	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms.....	16
Tabelle 2: Rezidivraten und definitive Sanierung beim Barrett-Ösophagus..	19
Tabelle 3: Narkoseparameter.....	30

Abkürzungen

Abkürzungen	Beschreibung
APC	Argon-Plasma-Koagulation
CY5	Cyanine 5
CO ₂	Kohlendioxid
Capnoflex®	Mikropumpe
EMR	Endoskopische Mukosaablation
ESD	Endoskopische Submukosadisektion
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGD	Hochgradige Dysplasie
HIPEC	Hyperthermic Intra Peritoneal Chemotherapy
LGD	Niedriggradige Dysplasie
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PILAC	Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy
PIPAC	Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy
RFA	Radiofrequenzablation
SVF	Stroma vascular fraction

Einleitung

Der sogenannte Barrett-Ösophagus ist eine Metaplasie der Mukosa des distalen Ösophagus. Es wird als neoplastisches Epithel ohne Anhalt für ein infiltratives Wachstum definiert (1). In einer populationsbasierten Endoskopiestudie konnte gezeigt werden, dass 1-2% der erwachsenen Bevölkerung an einem Barrett-Ösophagus erkrankt ist (2). Zu den Risikofaktoren, die einen Barrett-Ösophagus begünstigen, gehören der Tabakgenuss, die abdominale Adipositas, das männliche Geschlecht, ein Alter über 50 Jahre, die Schwangerschaft, eine Achalasie sowie eine familiäre Vorbelastung (3-6).

Charakteristisch für den Barrett-Ösophagus ist die Umwandlung von normaler Plattenepithelschleimhaut zu einer Mukosa vom intestinalen Typ, die typischerweise Becherzellen enthält (7,8). Als Ursache für diese Metaplasie wird allgemein eine gastro-ösophageale Refluxerkrankung mit darauffolgender chronischer Ösophagitis verdächtigt. Die gastro-ösophageale Refluxerkrankung ist eine häufige Erkrankung in der westlichen Welt und trifft jeden fünften Erwachsenen (9,10).

Besteht eine chronische Refluxösophagitis über einen Zeitraum von mehreren Jahren, so kann es zu Zylinderepithelmetaplasien führen, gefolgt von einer niedriggradigen und dann eventuell zu einer hochgradigen Dysplasie. Aus der hochgradigen Dysplasie kann sich dann ein Adenokarzinom des Ösophagus entwickeln. So handelt es sich beim Barrett-Ösophagus um eine fakultative präkanzeröse Läsion. Das Risiko einer Karzinomprogression ist jedoch gering und liegt zwischen 0,10-0,15% *per annum* (11). So bleibt das Barrett-Karzinom selten, im Vergleich zu den häufigsten Tumorerkrankungen in Deutschland. Das Lebenszeitrisko beträgt 0,9 % bei Männern und von 0,3 % bei Frauen (9).

Das Adenokarzinom des Ösophagus gehört zu den Tumorerkrankungen mit den höchsten Inzidenzsteigerungsraten in der westlichen Welt (3,5 % bis 8,1% pro Jahr) (7). Entsprechend hat sich in den letzten Jahrzehnten der

Anteil des Adenokarzinoms verdreifacht und das Verhältnis zu den bislang häufigeren Plattenepithelkarzinomen annähernd umgekehrt (8).

Kommt es auf dem Boden eines Barrett-Ösophagus zur Entstehung eines Ösophaguskarzinoms, geht dieser mit einer sehr schlechten Prognose einher (9). Die absoluten 5-Jahres-Überlebensraten liegen für Männer wie Frauen bei etwa 20%.

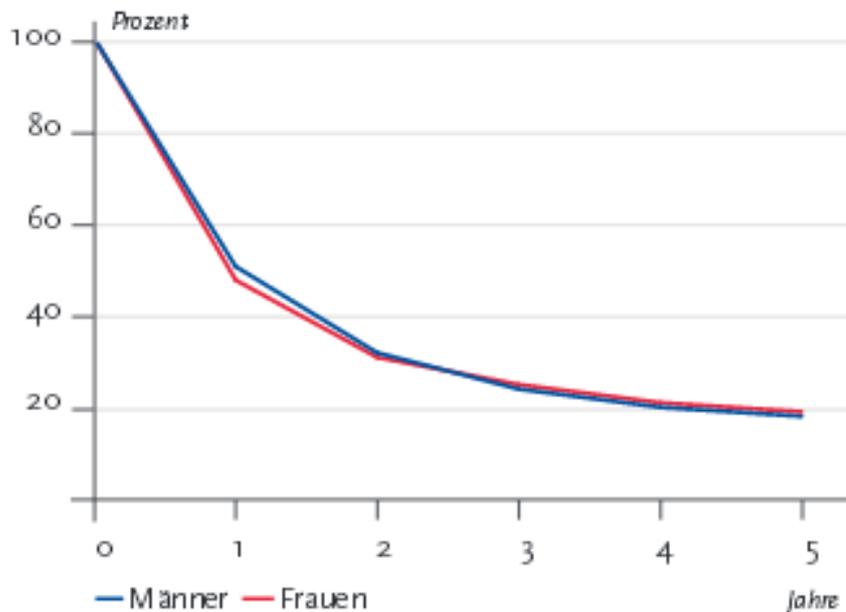


Abbildung 1: Überlebenschancen nach Erstdiagnose eines Ösophaguskarzinoms (ICD 10 C15), nach Geschlecht, in Deutschland 2009–2010 (9)

Diese schlechte Prognose liegt vor allem an den fehlenden Möglichkeiten der Frühdiagnose. Das Fehlen von spezifischen Symptomen und Zeichen erklärt die verspätete Diagnose. Charakteristische klinische Symptome, wie z.B. eine Dysphagie, treten selten und spät auf.

Einteilung und Klassifikation des Barrett-Ösophagus

Der Barrett-Ösophagus wird makroskopisch nach seiner Ausdehnung in einen Langsegment-Typ (metaplastisches Segment > 3cm), einen Kurzsegment-Typ (1-3cm) und einen ultrakurzem-Typ (<1cm) eingeteilt. Der ultrakurze Barrett-Ösophagus hat die höchste Prävalenz in der Bevölkerung.

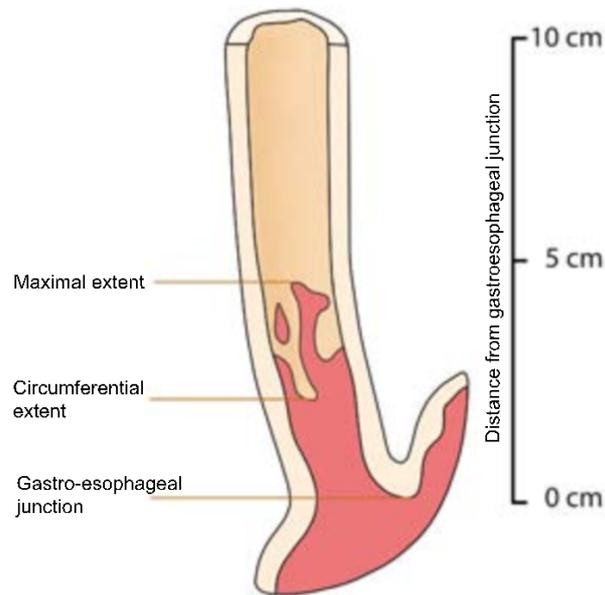


Abbildung 2: Endoskopische Prager Klassifikation des Barrett-Ösophagus

C&M Kriterien: C:Circumferenz ; M: maximale Ausdehnung der Barrettzungen.

Endoskopisch wird der Barrett-Ösophagus nach der Prager Klassifikation nach Zirkumferenz (C) und maximaler Ausdehnung (M) (12) eingeteilt.

Ein besonderes Merkmal der Barrett-Läsionen ist, dass sie sich unterhalb der normal aussehenden Ösophagusschleimhaut ausbreiten und verstecken können. Die Diagnosesicherung erfordert also multiple gestufte Biopsien (13, 14). Da die histopathologische Begutachtung dieser Biopsien anspruchsvoll sein kann, wird eine Zweitbegutachtung in einer Referenzpathologie allgemein empfohlen (3).

Aktuelle Therapie des Barrett-Ösophagus

Der Barrett-Ösophagus ist in den letzten Jahren wegen seiner Häufigkeit und wegen des fakultativen Krebsvorläuferläsion-Charakters zunehmend in den Fokus der Forschung geraten. Es wird nach Therapieverfahren gesucht, die die Ursache (also die gastroösophageale Refluxerkrankung) behandeln und

gleichzeitig auch die Konsequenzen (in diesem Fall die maligne Entartung) vorbeugen.

Allgemeinmaßnahmen für die Therapie des Barrett-Ösophagus sind vor allem konservativ (15). Sie beinhalten zunächst Maßnahmen zur Beseitigung der Risikofaktoren. Zu diesen Maßnahmen gehören Gewichtsnormalisierung, kleine fettarmen Mahlzeiten, Nikotin- und Alkoholkarenz. Bei Refluxbeschwerden kann eine probatorische Protonenpumpeninhibitoren Therapie für 4 bis 6 Wochen versucht werden (16). Bei massivem, volumigem oder kompliziertem Reflux wird ggf. eine Antirefluxchirurgie indiziert, wie z.B. eine Hemifundoplikatio nach Toupet. In Deutschland wird diese chirurgische Therapie für die therapieresistenten Fälle nach PPI-Behandlung aufgehoben (3), während die chirurgische Sanierung des gastro-ösophagealen Reflux in angelsächsischen Ländern wie Großbritannien häufiger zum Einsatz kommt (17). Ob eine Antirefluxoperation die Entwicklung oder die Progression eines Barrett-Ösophagus vorbeugen kann, wird in der Literatur kontrovers diskutiert (18).

Behandlungsoptionen der niedriggradigen Ösophagusdysplasie

Bei der Diagnose einer niedriggradigen intraepithelialen Ösophagusdysplasie empfiehlt die aktuelle deutsche Leitlinie eine medikamentöse Anti-Reflux Therapie, gefolgt von einer Kontrollendoskopie innerhalb von 6 Monaten (3). Bei dieser Endoskopie werden multiple Proben entnommen: zuerst werden alle sichtbaren Läsionen gezielt biopsiert; dann erfolgen alle 1-2 cm Zufallsbiopsien der makroskopisch normalen Mukosa (sog. Quadrantenbiopsien). Bei histologischer Bestätigung einer niedriggradigen intraepithelialen Neoplasie sind jährliche Kontrollendoskopien indiziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Mortalität der Metaplasie-Dysplasie-Karzinom Progression durch diese Kontrollendoskopien verringert werden kann (19).

Endoskopische Mukosaresektion (EMR)

Die endoskopische Mukosaresektion (EMR) stellt ein auf Schlingenresektion basierendes, resezierendes Verfahren dar. Die epitheliale Läsion wird zuerst unterspritzt und dann mittels Koagulation abgetragen. Mittels EMR können Läsionen bis zu 2 cm en bloc abgetragen werden. Die EMR ist nicht komplikationslos: es wurden Strikturen bei 41% und Dysphagie Symptome bei 37% der Patienten beschrieben. Zudem wurden schwere Komplikationen (wie Perforationen) bei ca. 2% beobachtet (20).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Erfolgsraten der EMR. *Konda et al.* beschreiben einen kompletten Rückgang des Barrett-Ösophagus bei 80,4% der Patienten, bei anderen Studien ist die Erfolgsrate mit 91-98% noch höher (21-23). Die effektive Behandlung des Barrett-Ösophagus wird jedoch durch seine besonderen Wachstumseigenschaften erheblich erschwert. Der Barrett-Ösophagus breitet sich hauptsächlich multifokal in der Ösophaguswand aus, was die Bestimmung seiner Ausbreitungsgrenzen erschwert. Deswegen entwickeln innerhalb von zwei Jahren mehr als 30% der Patienten, die mittels EMR behandelt wurden, neue metaplastische Läsionen in dem zuvor behandelten Segment (22, 23).

Läsionen über 2 cm können endoskopisch nur in der sogenannten *Piecemeal* Technik (Entfernung des erkrankten Gewebes in mehreren Stücken) entfernt werden, was bei unklarer Histologie und bei möglichem Karzinom ein Problem bedeuten kann. Daher eignet sich die EMR am besten für metaplastische Läsionen in der Mukosa (*Stadium T1a*).

Radiofrequenzablation (RFA)

Die Alternative zur EMR ist eine Radiofrequenzablation (RFA), vor allem bei Patienten mit einer niedriggradigen Dysplasie, die endoskopisch schlecht lokalisiert werden kann. *Shaheen et al.* konnten zeigen, dass niedriggradige Dysplasien in bis zu 81% der Fälle durch RFA eliminiert werden können und die weitere Progression in ein Karzinom verhindert wird (24). Eine Folgestudie (siehe Tabelle 2) zeigte sogar bei 98% eine komplette Elimination der dysplastischen Zellen (25).

In einer randomisierten Studie bei Patienten mit niedriggradigen Dysplasien wurde gezeigt, dass die RFA das Risiko senkt, in den darauffolgenden 3 Jahren an einem Barrett-Karzinom zu erkranken (26). Jedoch ist eine Ösophagusdysplasie nach RFA nicht immer definitiv saniert. Die SURF Studie zeigte, dass das Fortschreiten von niedriggradigen Dysplasien zu hochgradigen Dysplasien nach RFA noch bei 26,5% lag (26).

Im Vergleich zur EMR erscheint die RFA mit einer Inzidenz von Strikturen von 11,8% im Operationsbereich komplikationsärmer (27). Daher wird die RFA von vielen Gastroenterologen als ablatives Verfahren bevorzugt, da diese Technik relativ wenige Komplikationen aufweist und als sicherste gilt (24).

Eine zusätzliche Einschränkung der RFA gegenüber der EMR ist jedoch, dass das abladierte Gewebe nicht mehr histologisch untersucht werden kann, so dass der definitive Grad der Dysplasie unsicher bleibt und in Einzelfällen ein Karzinom sogar übersehen werden kann.

Andere Verfahren

Neben der EMR und der RFA wurde die Argon-Plasma-Koagulation (APC) als kostengünstige Alternative bei einem Kurzsegment Barrett-Ösophagus vorgeschlagen (28,29). Auch diese zeigte Komplikationen wie Strikturen im behandelten Gebiet (30). Daher wurde die Hybrid-APC erfunden, welche durch Unterspritzung von Kochsalz die tieferen Schichten schützen soll. Hierzu werden noch Langzeitstudien erwartet (31). Insgesamt sind bei diesen beiden Verfahren keine prospektiven randomisierten Studien vorhanden, die die Argon-Plasma-Koagulation mit der RFA vergleichen.

In den USA wurden auch Studien zur Kryotherapie durchgeführt, allerdings ist dieser Therapieansatz aufgrund der spärlichen Datenlage in Deutschland nicht gängig (32, 33).

Behandlungsoptionen der hochgradigen Ösophagusdysplasie

Beim endoskopischen/histologischen Nachweis einer hochgradigen Ösophagusdysplasie wird analog zur Behandlung der niedriggradigen Dysplasie eine endoskopische Ablation (Mukosaablation oder Submukosadisektion) empfohlen (3).

Bei Barrett-Läsionen, die tiefer in die Mukosa reichen, ist die EMR ungenügend und es wird eine Submukosadisektion (SMD) empfohlen. Der Vorteil der SMD ist, dass die gesamte Läsion, auch über 2cm, en bloc reseziert werden kann. Das Verfahren ist technisch anspruchsvoll und sein Erfolg ist von den Fertigkeiten des Operateurs abhängig (34). So war die anfängliche R0 Resektionsrate in den ersten klinischen Studien mit 38,5% ziemlich bescheiden (34). Mit zunehmender Erfahrung haben sich die Ergebnisse deutlich verbessert und die SMD erreicht inzwischen in Deutschland eine R0 Resektionsrate von 84% (35). Auch eine Retrospektive Studie aus Belgien zeigte anhand einer Kohorte von 75 Patienten, dass mittels SMD eine histologisch und klinisch komplette Resektion der hochgradigen Dysplasie in 85% der Fälle möglich ist. Eine nachhaltige, komplette Remission der Ösophagusmetaplasie wurde in 73% der Fälle nach SMD dokumentiert (36). Kommt es zur Entwicklung eines Rezidivs, so kann die SMD bei Bedarf wiederholt werden. Allerdings entwickeln ca. 60% der Patienten Strikturen nach SMD und es wurden vereinzelte Ösophagusperforationen berichtet (37-41).

Chirurgische Ösophagusresektion

Als Alternative zu den endoskopischen Verfahren kommt eine Ösophagusresektion in Frage. Die chirurgische Ösophagusresektion erlaubt die definitive Sanierung der Barrett-Dysplasien. Allerdings ist die chirurgische Ösophagusresektion mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität behaftet (27, 40, 42-44). Deswegen sind die endoskopischen Verfahren (EMD, SMD und/oder RFA) heutzutage die Therapie der Wahl beim Barrett-Ösophagus mit hochgradiger Dysplasie oder sogar bei einem oberflächlichen Barrett-Karzinom (bis Stadium T1b) geworden (45).

Klassifikation des Ösophaguskarzinoms

Die folgende Tabelle zeigt die aktuelle Klassifikation des Ösophaguskarzinoms, wie sie in der 8. Klassifikation der UICC definiert wird (46).

Kategorie	Definition	
T	Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
	T0	Kein Primärtumor nachweisbar
	Tis	Nichtinvasives Karzinom
	T1a	Tumor ist auf die Mukosa begrenzt
	T1b	Tumor infiltriert die Submukosa
	T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
	T3	Tumor infiltriert die Adventitia
	T4	Tumor breitet sich auf extraösophageale Strukturen aus
N	N0	Keine regionären Lymphknoten befallen
	N1	Befall regionaler Lymphknoten (zervikaler Ösophagustumor: tief zervikale und supraclaviculäre Lymphknoten; intrathorakaler Ösophagustumor: mediastinale und perigastrische Lymphknoten)
M	M0	Keine Fernmetastasen
	M1	M1a: zervikale Lymphknoten bei suprabifurkalen / zöliakalen Lymphknoten bei infrabifurkalen Karzinomen M1b: andere Fernmetastasen

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Ösophaguskarzinoms

Bei einem Stadium T1a besteht ein 1-2% Risiko der Lymphknotenmetastasierung (47). Bei einer Submukosa Infiltration (T1b) ist das Risiko der Lymphknotenmetastasierung bereits um ein Vielfaches erhöht und beträgt im Durchschnitt 10-20% (48, 49).

Tumorprogression beim Barrett-Ösophagus

Weniger als die Hälfte der Karzinome entstehen ohne klinische Hinweise auf eine vorbestehende Refluxkrankheit. Die Abbildung 3 zeigt die Progression von der gastro-ösophagealen Refluxkrankheit bis hin zum Barrett-Karzinom.

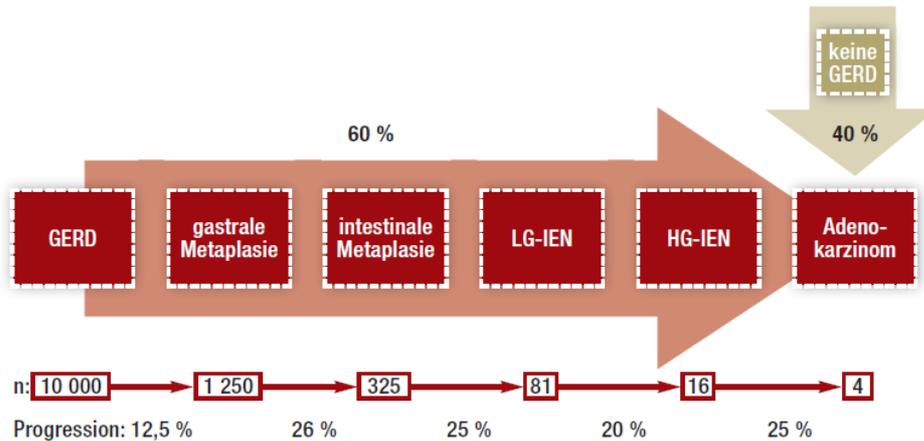


Abbildung 3: Von der gastro-ösophagealen Refluxkrankheit (GERD) zum Barrett-Karzinom (aus 50): LG-IEN, niedriggradige intraepitheliale Neoplasie; HG-IEN, hochgradige intraepitheliale Neoplasie

Die Risikobewertung der Entwicklung eines Adenokarzinoms bei Patienten mit einem Barrett-Ösophagus ist komplex und von mehreren Faktoren abhängig. Zu diesen Faktoren gehören der endoskopische Befund, die Anzahl und Qualität der gewonnenen Biopsien, die Fertigkeiten des Operateurs und die Tumorbiologie.

Es wird versucht, das Fortschreiten der Erkrankung mittels Biomarkern frühzeitig zu erfassen (51, 52). Zum Beispiel könnte die frühzeitige Bestimmung vom p53-Status, z.B. mittels Immunohistochemie, prognostische Bedeutung haben (53). Eine aktuelle Studie konnte auch den Zusammenhang von p53 mit einem höheren Risiko einer Entartung zeigen (54).

Auch wenn Biomarker in der Überwachung der niedrig- und hochgradigen Barrett-Dysplasien potentiell therapierelevant sind, fehlen für deren praktische und therapeutische Anwendungen zum jetzigen Zeitpunkt noch eine ausreichende klinische Evidenz.

Kombinierte und sequentielle Therapien

Eine Wiesbadener Arbeitsgruppe hat in einer retrospektiven Studie festgestellt, dass die Ablation der restlichen, nicht-neoplastischen Barrett Schleimhaut nach vorheriger endoskopischer Resektion einer hochgradigen intraepithelialen Neoplasie mit einer geringeren Karzinom-Progressionsrate einhergeht (22). Diese Beobachtung wurde in einer zweiten Studie bestätigt: mit einer Erfolgsrate von 96% bei einem sequentiellen Einsatz von EMR und RFA (44). Andere Gruppen haben bestätigt, dass ein zweizeitiges Konzept (EMR gefolgt von RFA) am effektivsten und komplikationsärmsten ist (27, 44).

Diese Studien werden in der Tabelle 2 zusammengefasst. Eine Kombination aus Submukosadissektion oder Mukosaablation zusammen mit einer Radiofrequenzablation des gesamten (distalen) Ösophagus (44) wird empfohlen, um die R0- Resektionsrate zu verbessern. Jedoch sind die Ergebnisse der Studien uneinheitlich (55,56) und Langzeitdaten sind noch nicht verfügbar (57).

Studie	Jahr	Technik	Patientenanzahl	Beobachtungszeit (Monate)	Rezidivrate (%)	Definitive Sanierung (%)
Shaheen et al.(24)	2009	RFA	127	12	k.A.	81 %
Shaheen et al. (25)	2011	RFA	54	36	k.A.	Dysplastische Zellen: 98, % Metaplastische Zellen: 91 %
Gupta et al. (55)	2013	RFA + EMR	448	24	33%	56%
Van Vilsteren et al. (44)	2011	EMR+RFA	47	24	2%	EMR + RFA bei HGD: 96 %
Agoston et al. (56)	2013	EMR+RFA	78	36	22 %	67 %
Konda et al. (97)	2014	EMR	107	48	25 %	80 %
Probst et al. (35)	2015	ESD	60	24	8%	90%
Neuhaus et al. (34)	2012	ESD+ RFA	30	17	61%	96,4 % bei HGD
Chevaux et al. (36)	2014	ESD	75	20	62%	73 %

Tabelle 2: Rezidivraten und definitive Sanierung beim Barrett-Ösophagus

EMR: Endoskopische Mukosaresektion; HGD: hochgradige Dysplasie; RFA: Radiofrequenzablation; ESD: Endoskopische Submukosa Dissektion; K.A. keine Angaben

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die bisherigen Therapieansätze auf mechanischen Konzepten beruhen, die eine Kombination aus einer Ablation von dysplastischen Zellen und Kontrollendoskopien vorsehen. Bei hochgradigen Dysplasien wird zunehmend eine Kombination aus endoskopischer Resektion in Kombination mit einer Radiofrequenzablation angewendet.

Komplikationsvermeidung nach interventioneller Therapie

Es gibt es mittlerweile verschiedene Ansätze, die versuchen die relativ häufigen Komplikationen nach interventioneller Ablation zu vermeiden. Zum Beispiel wurde die endoskopische Injektion von Triamcinolon (ETI) vorgeschlagen, um die Bildung von postinterventionellen Strikturen nach einer Submukosadisektion zu vermeiden (58). Alternativ wurden lokale und systemische Kortisonbehandlungen vorgeschlagen, um die Vernarbung (Fibrose) im operierten Gebiet zu verhindern oder aufzuhalten (59). Auch könnte die Applikation eines hämostatischen Pulvers eine Reepithalisierung des ablatierten Gebietes bewirken (60). Es sind jedoch Folgestudien zur klinischen Wirksamkeit dieser Verfahren notwendig.

Pharmakologische Interventionen als neue Therapieansätze

Aus den obigen Ausführungen ist ersichtlich geworden, dass es ein medizinischer Bedarf an neuen Therapieansätzen bei der Behandlung des Barrett-Ösophagus vorhanden ist. Insbesondere werden Therapien gesucht, die nicht nur die Entartung des Barrett-Ösophagus vorbeugen, sondern auch die Komplikationsraten der endoskopischen Verfahren (wie Blutungen, Perforationen und Strikturen) vermeiden oder mindestens reduzieren. Diese Therapien könnten in Kombination, oder als Ersatz zu den verfügbaren endoskopisch-interventionellen Maßnahmen eingesetzt werden. Es könnten dabei verschiedene Sorten von therapeutischen Substanzen appliziert werden, entweder lokal oder systemisch.

Weitere Argumente für den systemischen Einsatz von Medikamenten zur sekundären Prophylaxe der Barrett-Dysplasie lassen sich indirekt aus der medikamentösen Therapie des invasiven Karzinoms ableiten. Metaanalysen und große Phase III Studien haben gezeigt, dass bei einem fortgeschrittenen Adenokarzinom des Ösophagus eine neoadjuvante Chemotherapie vor chirurgischer Resektion eine objektive histologische Tumorregression induzieren kann (57, 61-63).

Eine Rückbildung der Läsionen könnte im Prinzip in den Vorstufen des invasiven Karzinoms genauso wie beim invasiven Karzinom induziert werden. Es könnten in dieser Indikation epidermale Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren (wie Cetuximab und Panitumumab) eingesetzt werden (57). Auch der Einsatz von Angiogenese-Inhibitoren (wie z.B. Ramucirumab in Kombination mit FLOT) könnte ein interessanter Ansatz werden (64), da die Entwicklung eines invasiven Karzinoms die Neubildung von Gefäßen voraussetzt (65). Auch könnte eine Radio-/Chemotherapie bei der Barrett-Dysplasie wie bei operablen Stadien des fortgeschrittenen Adenokarzinoms (13) eingesetzt werden.

Arbeitshypothese

Wir formulieren die Arbeitshypothese, dass auch lokale, medikamentöse Therapieverfahren eine Rückbildung der Dysplasien induzieren könnten. Zu diesem Zweck könnten antiproliferative Stoffe oberflächlich aufgetragen werden (66,67). Zum Beispiel wäre die Hemmung des Notch Pathways ein interessanter Forschungsansatz, da Notch-Inhibitoren die Proliferationsrate von menschlichen Barrett-Zelllinien reduzieren konnten und dysplastische Zellen in normalen Becherzellen zurückwandeln konnten (68).

Da die Magen- und Gallensäure als Hauptverursacher der Barrett-Dysplasie beim gastroösophagealen Reflux betrachtet werden, wäre der Einsatz von ursodeoxycholschen Säuren (UDCA) sinnvoll, um die ösophagealen Zellen gegen den oxydativen Stress durch die zytotoxischen Gallensäuren zu schützen und die Progression der Inflammation-Metaplasie-Karzinom-Sequenz zu verhindern. Eine chemopräventive Wirkung der Veränderung der Säurezusammensetzung und deren Reduktion auf den Barrett-Ösophagus

wurde dokumentiert (69) und UDCA wurde schon Objekt einer klinischen Pilotstudie in dieser Indikation (70).

Auch pflanzliche Heilmittel (wie schwarze Himbeere) wirken Entzündungshemmend und könnten möglicherweise die Tumorentstehung im Barrett-Ösophagus verlangsamen (71). Der Effekt eines Cck2r Antagonisten ist Gegenstand einer laufenden klinischen Studie (NCT01298999) bei Barrett-Patienten und es wurden bereits präklinische Ergebnisse im Tierversuch an Mäusen publiziert (72).

Theoretisch könnte also die Progression von der niedriggradigen Dysplasie zur hochgradigen Dysplasie und die nachfolgende Entartung in ein Karzinom durch regionale, medikamentöse Therapie aufgehalten werden. Die Voraussetzung hierfür wäre die Verfügbarkeit einer Methode, die eine wirksame lokale medikamentöse Therapie ermöglicht. Insbesondere müsste diese Methode die Behandlung des gesamten krebgefährdeten Gewebes erlauben, was ein tiefes Eindringen der Wirkstoffe bis in die Muskelschicht des Ösophagus voraussetzt. Eine solche Applikationsmethode ist aber bisher nicht gegeben.

Optimierung der lokalen medikamentösen Therapie durch den Einsatz eines Aerosols unter Druck

In dieser Hinsicht könnte der in der abdominalen Chirurgie kürzlich entwickelte Ansatz der intraperitonealen Druck-Aerosolchemotherapie (Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy, PIPAC) (73, 74) hilfreich sein. Es wurde gezeigt, dass die PIPAC überlegene pharmakologische Eigenschaften besitzt, gerade in Hinsicht auf die Eindringtiefe der Medikamente (Abbildung 4).

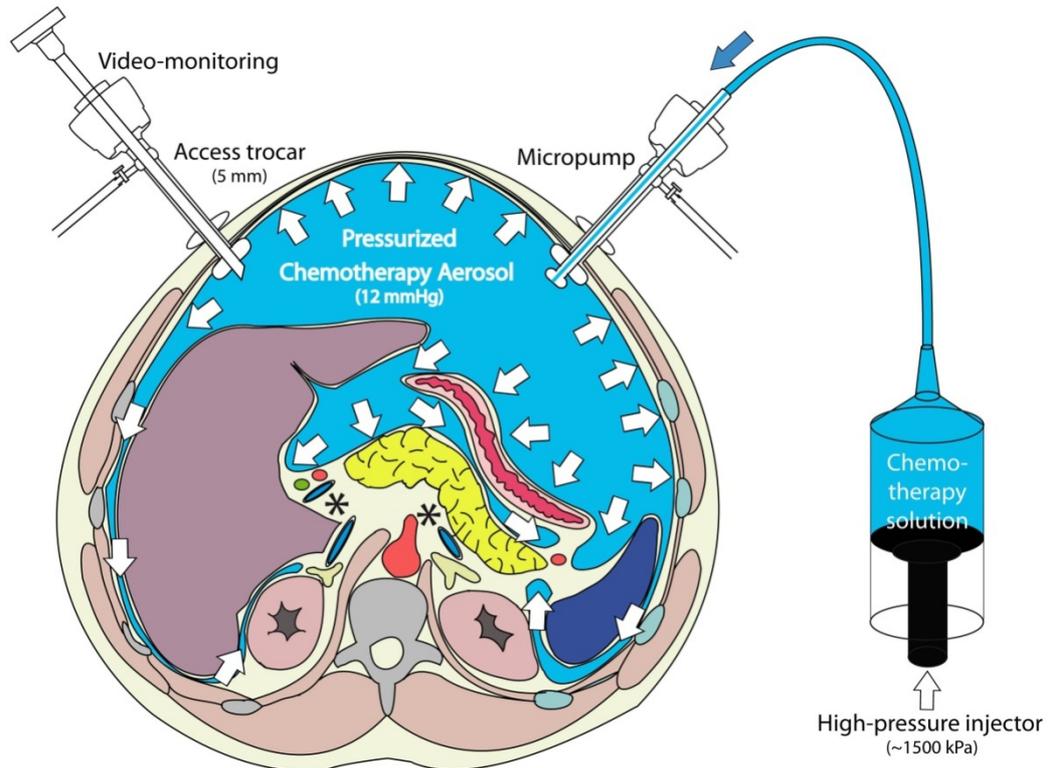


Abbildung 4: Prinzip der PIPAC (Pressurized intraPeritoneal Aerosol Chemotherapy)

Es wird über einen Vernebler und einen marktüblichen Hochdruckinfusionsinjektor ein Chemotherapeutikum (10% der normalen systemischen Dosis) während einer Laparoskopie aerosolisiert und unter Druck in die Peritonealhöhle für 30min appliziert. Über ein geschlossenes Entsorgungssystem wird das Gas nach der Behandlung abgelassen (75).

Technisch gesehen ist die PIPAC-Prozedur einfach und ähnelt einer Bauchspiegelung. Der Eingriff beginnt mit dem Aufblasen des Abdomens mit CO₂ und einer Staging-Laparoskopie. Es wird eine Kamera in das Abdomen eingeführt, der makroskopische Befund wird erhoben und Biopsien entnommen. Danach wird ein Vernebler durch einen Zugangsport eingeführt, an einem Angioinjektor verbunden und die Chemotherapielösung wird vernebelt. Nach einer Wirkungszeit von ca. 30 Minuten wird das therapeutische Aerosol über ein geschlossenes System entsorgt.

Aufgrund des hydrostatischen Druckes, der während einer PIPAC künstlich appliziert wird, wurde erwartet, dass das Medikament tief in das Gewebe eindringen würde. Tatsächlich haben mehrere präklinische Studien bestätigt, dass dieses der Fall ist (76- 78). Am Patienten konnte bestätigt werden, dass

das Eindringen von Doxorubicin (Makromoleküle mit einem Molekulargewicht von 543 g/mol, welches etwa 500-700 µm entspricht) (79) möglich ist. Dieses ist eine deutliche Steigerung gegenüber der intraperitonealen Chemotherapie mit liquiden Lösungen, die lediglich eine Gewebepenetration von wenigen Zellschichten ermöglicht (80).

Die PIPAC nimmt auch Vorteil aus einem zweiten physikalischen Prinzip, nämlich die Applikation des Chemotherapeutikums als Aerosol und nicht - wie gewöhnlich - in Form einer flüssigen Lösung. Ein Aerosol wird als ein heterogenes Gemisch aus flüssigen Schwebeteilchen in einem Gas definiert. Das physikalische Verhalten eines Aerosols nähert sich dem eines Gases, insbesondere expandiert sich ein Gas innerhalb eines geschlossenen Raumes und erreicht eine (relativ) homogene Verteilung. Dieses räumliche Verhalten eines Aerosols unterscheidet sich grundsätzlich vom Verhalten einer flüssigen Lösung, die sich am Boden des Behälters ansammelt und dem Weg des niedrigsten Widerstandes folgend wird. Theoretisch wird sich also ein Aerosol homogener als eine flüssige Lösung verteilen, was auch in der präklinischen Anwendung der PIPAC bestätigt wurde (73, 81).

Neuer Ansatz: die „Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy“ (PILAC)

Aufgrund der obigen Ergebnisse wurde das Prinzip der Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy (PILAC) erfunden, welches in dieser Arbeit zum ersten Mal dargestellt wird. Die PILAC stellt einen nicht invasiven Ansatz dar, die aus den Vorkenntnissen der PIPAC abgeleitet wird. Dieser Ansatz ermöglicht die wirksame lokale Applikation von therapeutischen Substanzen im distalen Ösophagus (z.B. beim Barrett-Ösophagus).

Das Prinzip der PILAC wird in der Abbildung 5 grafisch dargestellt. In Analogie zur PIPAC wird zuerst durch das Aufblasen eines distalen und eines proximalen Ballons ein geschlossener Raum geschaffen. In einem zweiten Schritt wird dieser Raum mit CO₂ aufgeblasen. In einem dritten Schritt wird die therapeutische Lösung aerosolisiert und das (geschlossene) System

dann im Equilibrium gehalten. Schlussendlich wird das therapeutische Aerosol über ein geschlossenes Abluftsystem entsorgt.

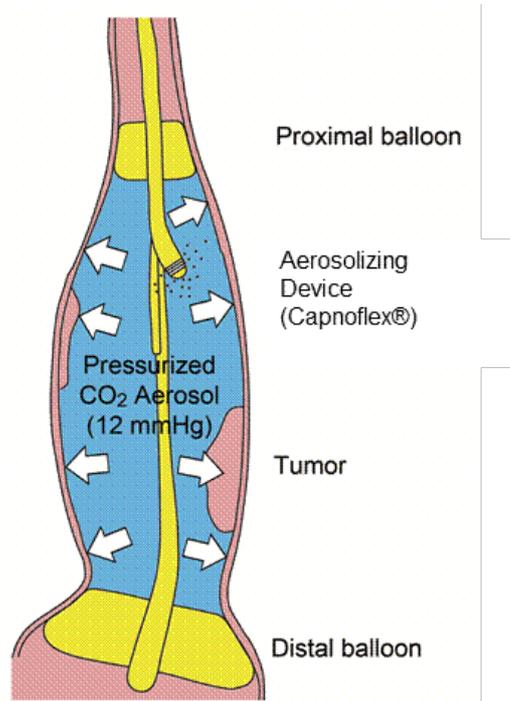


Abbildung 5: Prinzip der PILAC (Pressurized IntraLuminal Aerosol Chemotherapy)

- 1) Unter endoskopischer Kontrolle wird das Capnoflex® Gerät in den distalen Ösophagus platziert
- 2) Ein geschlossener Behandlungsraum wird durch das Aufblasen von zwei Ballonen (einen distal im Magen und einen proximal im Ösophagus) geschaffen
- 3) Dieser Raum wird mit CO₂ expandiert und einem intraluminalen Druck von 12 mmHg ausgesetzt
- 4) Das therapeutische Aerosol wird mittels eines miniaturisierten Verneblers erzeugt
- 5) Das System wird für eine vorbestimmte Zeit im Gleichgewicht gehalten
- 6) Das therapeutische Aerosol wird abgesaugt und die Prozedur nach Ablassen der Ballone und Herausziehen des Capnoflex® beendet.

Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll eruiert werden, ob PILAC zukünftig über pharmakologische Ansätze die Probleme einer effektiven Therapie des Barrett-Ösophagus lösen kann. Dazu soll die technische Funktionsfähigkeit des Instrumentes selbst (Capnoflex®) getestet werden. Des Weiteren soll analysiert werden, ob das im Ingenieur Labor entwickelte System einen luftdichten

Behandlungsraum schaffen kann, um eine lokale medikamentöse Therapie zu ermöglichen.

Die homogene Verteilung des Aerosols und die Eindringtiefe soll mittels Färbemittel beurteilt werden. Schlussendlich solle die Gebrauchstauglichkeit des gesamten Behandlungssystems (Anwendbarkeit, Steuerung und Bedienung) überprüft werden.

Material und Methoden

Studiendesign

Es handelt sich um eine präklinische Arbeit an einem Großtiermodell (deutsches Landschwein). Bei diesem experimentellen Versuch soll die Machbarkeit der PILAC mithilfe eines speziellen Endoskops mit eingebautem Vernebler und Doppelballon untersucht werden. Die Durchführbarkeit soll praktisch geprüft werden. Der Therapieerfolg soll durch die Anwendbarkeit und durch die histologische Auswertung des Gewebes ermittelt werden. Dabei wird die homogene Verteilung der Testsubstanzen beurteilt und die Eindringtiefe der Substanzen in das Gewebe mikroskopisch gemessen.

Zeitraum und Ort der Experimente

Das Studienprotokoll wurde im Januar 2013 verfasst, die Experimente wurden am 25.02.2013 im Operationstrakt der Fördergemeinschaft für innovative Medizin in Beichlingen, Thüringen durchgeführt. Die siDNA-Konzentrationen in den Proben wurden dann beim Institut Curie in Paris gemessen. Das Manuskript wurde im Februar 2016 publiziert (82). Die Technologie wurde Objekt mehrerer Patentmeldungen (z.B. US20150073334A1).

Regulatorische Rahmenbedingungen

Diese Pilotstudie wurde von der Tierbehörde des Landes Thüringen genehmigt. Die Anzahl der Tiere wurde auf ein Minimum von 3 reduziert, den EU Richtlinien 2010/63 entsprechend. Die Experimente wurden unter der Aufsicht eines Tierarztes, Herrn Dr. med. vet. Frank Pölzing, durchgeführt. Die Tiere wurden nach der Prozedur euthanasiert, sofort autopsiert und es folgte eine Fotodokumentation und Probenentnahme.

Technologie

Der erste PILAC-Prototyp bestand aus folgenden Elementen:

- i) die Sengstaken-Blakemore Sonde mit einem proximalen und distalen Doppel-Ballon
- ii) einem Zugang für den Vernebler um das therapeutische Aerosol zu bilden und
- iii) einer Spritze, um die Ballone auf- und abzublasen (Abbildung 6).

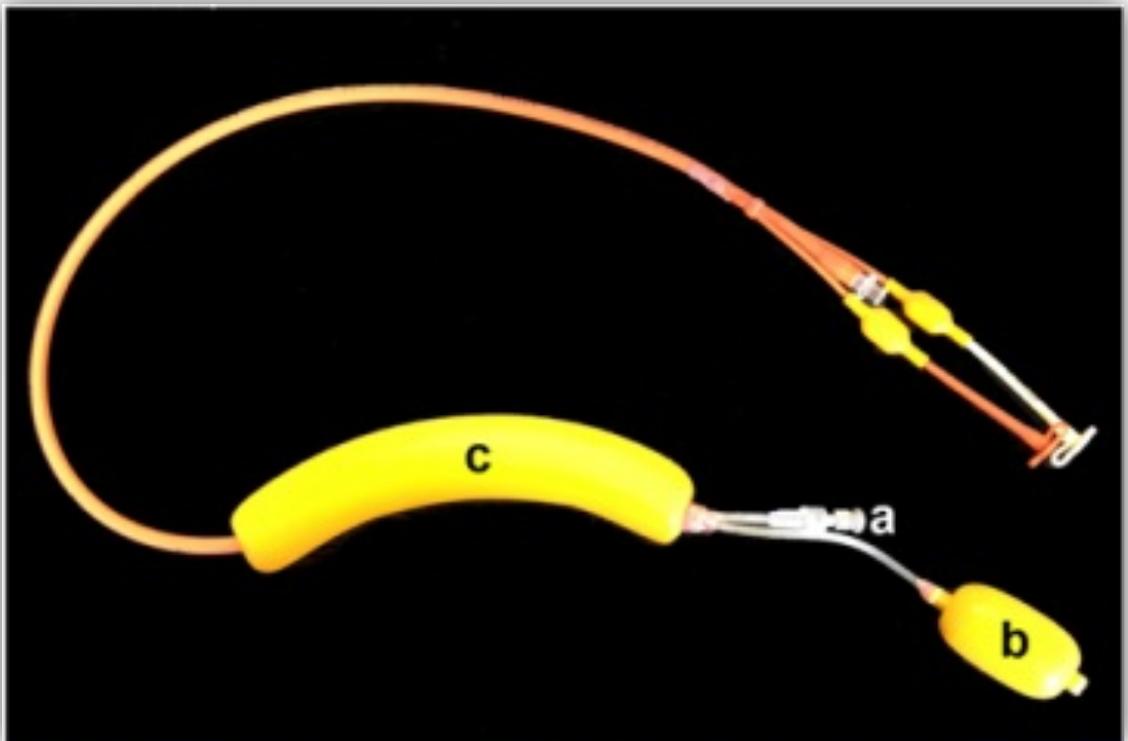


Abbildung 6: Prototyp des Capnoflex®

Der Prototyp besteht aus: a) einem Miniatur-Vernebler b) ein distaler aufblasbaren Ballon und c) ein proximaler aufblasbaren Ballon.

Der Prototyp des Verneblers wurde von der Firma Reger Medizintechnik (Villingendorf, Baden-Württemberg) hergestellt. Er umfasst 15cm und ist kleiner als der bisherige Vernebler, der im Rahmen der PIPAC Behandlung seit 2011 in Benutzung ist. Die Düse produziert ein polydisperses Aerosol mit Mikro-

tropfen von 3-15µm Durchmesser. Der Betriebsdruck der Düse beträgt 200psi (13,7 bar) und das Chemotherapeutikum wird in flüssiger Form in einer Hochdruckspritze bereitgestellt. Die Spritze wird mittels Hochdruckleitung an die PILAC-Einrichtung (jetzt Capnoflex®) angeschlossen (Abbildung 7).

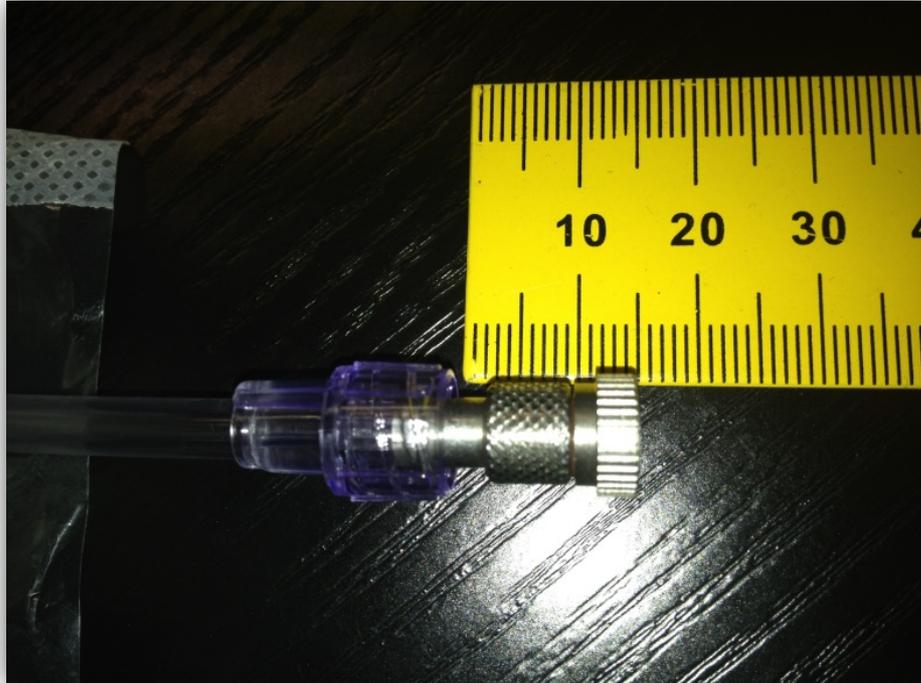


Abbildung 7: Die Capnoflex® Düse

Diese umfasst 15cm und ist speziell für PILAC Prozedur optimiert worden. Die Düse produziert ein polydisperses Aerosol mit Mikrotropfen von 3-15µm Durchmesser.

Tiere und Narkose

Das Experiment wurde mit drei deutschen Landschweinen durchgeführt. Das Geschlecht war indifferent und das Gewicht betrug zwischen 60-70 kg.

Einleitung	Azaperon (Stresnil) i.m. (4mg/kg) Atropin s.c. (0,02-0,05mg/kg) Ketamin 10% i.m. (20mg/kg)
------------	--

Narkose	Sauerstoff/Lachgasgemisch im Verhältnis 1 : 3 Isofluran 1-2 Vol.% assistierte Beatmung intravenösen Bolusgabe von 3-4 mg/kg KG Midazolam und 0,004 mg/kg Fentanyl i.v
Muskelrelaxation	Pancuroniumorganon i.v.(0,02 mg/kg)

Tabelle 3: Narkoseparameter

Chirurgischer Eingriff

Die chirurgischen Eingriffe erfolgten im Operationstrakt der Fördergemeinschaft für innovative Medizin in Beichlingen. Es erfolgte die Narkose (Tabelle 3) und die drei Tiere wurden in Rückenposition für den Eingriff gelagert und desinfiziert (Abbildung 8).



Abbildung 8: Lagerung und Operationsbedingungen

Lagerung des Tieres auf dem OP Tisch

Ein Capnoperitoneum von 12mmHg wurde durch eine Veres-Nadel hergestellt, wie bei einer herkömmlichen Laparoskopie. Dann wurden drei 10-12mm Trocare (Kii®, Applied Medical, Düsseldorf) in die abdominelle Wand eingeführt. Zuerst wurde eine Cholezystektomie durchgeführt und dann der Versuch gestartet (Abbildung 9). Dabei wurden konstant die Kreislaufparameter bestimmt.



Abbildung 9: Position der chirurgischen Zugänge (Trokare)

Nach erfolgreicher Insufflierung des Capnoperitoneums wurden die Instrumente für die Laparoskopie eingeführt. Parallel wurde proximal über eine Ösophagogastroskopie das Capnoflex® System mit den Doppelballonen vorsichtig appliziert (Abbildung 10).



Abbildung 10: Platzierung der Capnoflex® unter Sicht während einer Ösophagogastroskopie

Vom Bauchraum aus wurde unter Sicht mit einer bipolaren Schere eine Gastrotomie durchgeführt, um den distalen Ballon des Capnoflex® Systems an der Kardia zu platzieren. Der Vorgang wurde endoskopisch und videoskopisch intragastral überwacht. So wurde sichergestellt, dass die Ballone an der vorgesehenen Stelle sicher platziert wurden und der Vernebler sich im ösophagogastralen Übergang befand. Daraufhin wurden beide Ballone aufgeblasen, um einen luftdichten Behandlungsraum zu schaffen.

Nach dem Aufblasen beider Ballone wurde ein normothermes, therapeutisches Capnoperitoneum von 12mmHg zwischen dem distalen und proximalen Ballon, mittels CO₂ Insufflator hergestellt (Abbildung 11).



Abbildung 11: Darstellung des Capnoflex® in situ. Der distale Ballon verschließt den ösophagogastralen Übergang luftdicht. Dadurch entsteht ein geschlossener Behandlungsraum, der für die Applikation des therapeutischen Aerosols benutzt wird

Testsubstanzen: Methylblau und Dbait (siDNA)

Für die Beurteilung des Effektes der PILAC am Zielgewebe benutzen wir Methylblau als Färbemittel und Dbait. Diese Doppelfärbung ermöglicht sowohl eine makroskopische als auch eine mikroskopische Beurteilung der Verteilung und der Eindringtiefe der Testsubstanz nach PILAC-Applikation.

Dbait stellen eine neue medikamentöse Strategie bei malignen Erkrankungen dar. Sie sind eine neue Klasse an nicht kodierender siDNA, sie bestehen aus 32 Basenpaaren der Desoxyribonukleotidsäure, die Doppelstrangbrüche imitieren und falsche Signale an das Reparatursystem der Tumorzellen geben. Im Gegensatz zu bisherigen Ansätzen der Tumorbekämpfung, greifen Dbait das DNA-Reparatursystem als Ganzes an. Sie verzögern die Aktivierung von Enzymen, die für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen verantwortlich sind (83). Dbait wirken, indem sie die DNA-Proteinkinase aktivieren. Diese DNA-Proteinkinase induziert die Phosphorylierung von H2AX. Dieses wird als das Signal der Aktivierung der DNA-Reparaturmechanismen angesehen. Durch die unspezifische Phosphorylierung mittels Dbait kommt es zur ineffizienten Reparatur von Doppelstrang Mutationen. Doppelstrangbrüche werden als

eine der toxischsten DNA Läsionen betrachtet (74). Doppelstrangbrüche innerhalb der Tumorzelle, welche z.B. nach Bestrahlung oder Chemotherapie (insbesondere bei Anthracyclinen) auftreten, können nun nicht mehr durch die Reparaturmechanismen der Tumorzelle behoben werden. Die Konsequenz ist, dass die Tumorzelle zugrunde geht.

Dbait haben sich bereits in der Strahlen- (84) und Chemotherapie (83) als effektiv erwiesen. In Tierversuchen mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass Dbait in Kombination mit einer Chemotherapie die Tumorgöße effektiv verringern konnte, als eine Chemotherapie alleine (mittlere Tumorgöße: 3.6mm² vs. 10.85mm²). Auch ein verlängertes Überleben der Mäuse, die mit Dbait behandelt wurden konnte gezeigt werden (mittleres Überleben: 210 vs. 194 Tage). Zudem wurden in dem Versuch keine toxischen Nebenwirkungen durch Dbait festgestellt (83). Bei in vivo Experimenten in der Melanom-, Glioblastom- und Darmkrebsbehandlung konnte gezeigt werden, dass Dbait den Effekt auf Bestrahlung erhöhen und somit effektiver in der Kombination mit einer Radiotherapie wirken (84-86).

Ein weiterer Vorteil von Dbait ist, dass sie gesundes Gewebe nicht schädigen. In einer experimentellen Studie an Mäusen konnte gezeigt werden, dass auch die Sensitivität auf Bestrahlung im gesunden Gewebe nicht zunimmt (87).

Aufgrund der positiven präklinischen Ergebnisse wurde die klinische Entwicklung von Dbait unter dem Namen AsiDNA® (Onxeo, Paris, Frankreich) weitergeführt. Es laufen aktuell Phase I- IIa Studien an Menschen. Diese sollen die Effektivität und Sicherheit der Dbait Therapie in Kombination mit einer Radiotherapie bei Hautmetastasen eines malignen Melanoms zeigen (87), und auch im Kombination mit Chemotherapie (Carboplatin ± Paclitaxel) bei soliden Tumoren (www.onxeo.com). Auch die Machbarkeit einer PIPAC mit Dbait konnte vor kurzem gezeigt werden (81).

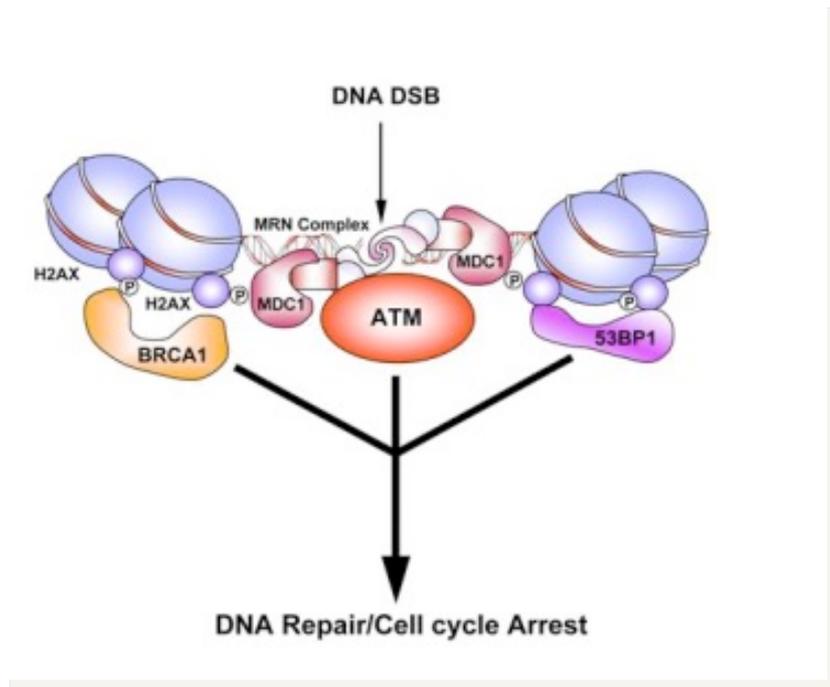


Abbildung 12: Aktionsmechanismus der therapeutischen Substanz (siDNA)

Dbait: siDNA (modifizierte Doppelstrang DNA). Diese Moleküle greifen in DNA Reparaturmechanismen ein, indem sie Doppelstrangbrüche imitieren und somit die DNA Reparatur Mechanismen überfordern. Kommt es zu Doppelstrangbrüchen in einer Zelle wird das Histon H2AX phosphoryliert, welches die Proteinkinasen aktiviert (ATM). Zu den DNA Reparaturmechanismus gehören auch Ko-Komplexe wie das BRCA1 Tumorsuppressor-Gen (88).

Durchführung des Experiments

Zur Bestimmung der Gewebepenetrationstiefe von Substanzen wurden zwei Tracer ausgewählt.

- 1) Methylblau
- 2) Dbait

Diese Substanzen wurden in flüssiger Form in die Hochdruckinjektorspritze gegeben und dann in den Ösophagus aerosolisiert. Das Methylblau wurde für die makroskopische Beurteilung der Schleimhaut verwendet und die Dbait für die mikroskopische Auswertung. In der vorliegenden Studie wurden Dbait an Cholesterin-Moleküle gekoppelt, um die intrazelluläre Aufnahme zu erleichtern und an Cyanine (Cy5) gebunden, um diese durch Fluoreszenz sichtbar zu machen.

Es wurden insgesamt 10 ml versprüht. Das Experiment wurde bei allen drei Tieren nacheinander durchgeführt. Es wurden 1,29g Dbait (*DNA Therapeutics, Evry, France*) in 10ml NaCl 0,9%, angefärbt mit 0,25 ml Methylblau, durch die Capnoflex® bei 37°C und 12mmHg CO₂ vernebelt. Die Applikation von Dbait geschah mithilfe der Capnoflex®, unter einem Injektordruck von 200psi. Das Equilibrium wurde über 30min aufrechterhalten. Danach wurde das Gas über ein geschlossenes System abgelassen (88). Die Proben wurden sofort durch einen Stickstoffschock tiefgefroren. Schlussendlich folgte die Euthanasie des Tieres, sowie die Probenentnahme und Dokumentation.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Zielgewebes

Für die Analysen wurden die Gewebeproben in Formalin eingebettet und mit einer herkömmlichen HE Färbung angefärbt. Für die Fluoreszenz Analyse wurden die Proben mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 20min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Proben mit 0,5%igen Triton bei Raumtemperatur ausgesetzt. Hinterher wurden diese in Stroma vascularfraction (SVF) ausgewaschen und mit einer Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (PBS) verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur belassen. Direkt im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit gamma- H2AXMaus Antikörpern (*Millipore, Billerica, MA, USA*), dann wurden diese 1/200 verdünnt (SVF in PBS) und für zwei Stunden bei Raumtemperatur ausgesetzt. Nach dem Auswaschen wurden die Proben nochmal mit einem zweiten Maus- Antikörper FITC (*Sigma-Aldrich Chimie Sarl, Lyon, Frankreich*) inkubiert, dann 1/100 verdünnt und bei Raumtemperatur für 45 Minuten belassen. Im letzten Schritt wurden die Kerne mit Dapi 0,5µg/ml gegengefärbt und noch ein letztes Mal für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Zum Schluss wurden die Schnitte mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Histologische Analyse des Zielgewebes

Für die histologischen Analysen wurden die Gewebeproben in Formalin eingebettet und mit Hematoxylin-Eosin (HE) angefärbt.

Ergebnisse

Der Prototyp konnte in vivo unter gastrokopischer Kontrolle ohne Probleme in den distalen Ösophagus aller drei Versuchstiere eingeführt werden. Der proximale und distale Ballon wurden aufgeblasen und es konnte ein geschlossener therapeutischer Raum für die Applikation des Aerosols geschaffen werden.

Zuerst wurde die Dichtigkeit des distalen Ösophagus durch die Applikation von Methylblau geprüft. Danach konnten Dbait ohne technische Zwischenfälle in den luftdichten Behandlungsraum aerosolisiert werden.

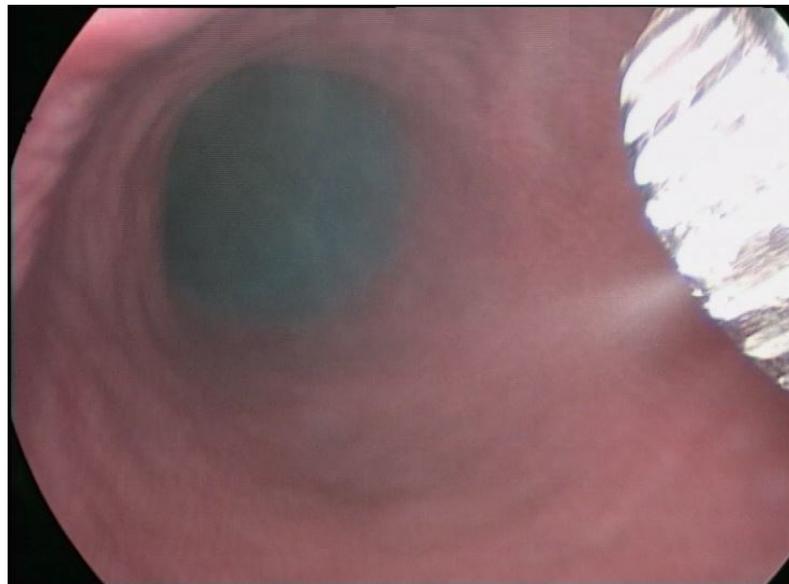


Abbildung 13: Intraluminale Applikation von Dbait mittels Caponoflex®.

Es wurden 10 ml Dbait-Lösung intraluminal versprüht. Das therapeutische Aerosol verteilte sich im gesamten verfügbaren Arbeitsraum homogen (qualitativer und visueller Eindruck). Dann wurde das System über 30min im Equilibrium gehalten. Es kam zu keiner Tropfenbildung oder Flüssigkeitsansammlung während des Experimentes.

Es wurde kein Gasleck während des gesamten Experiments verzeichnet. Die Auswirkungen des Aufblasens des distalen Ösophagus auf den intraperitonealen Druck wurden über die CO₂-Insufflatoranzeige kontrolliert. Es wurden keine messbaren Druckschwankungen intraperitoneal dokumentiert. An-

schließlich konnte die gesamte Menge des intraluminal applizierten Aerosols wieder in die geschlossene Absaugung abgelassen werden.

Die Videoaufnahmen während der Dbait Applikation zeigten nach einer Aufbauphase eine konstante und ununterbrochene Aerosolbildung aus der Düse.

Auch die Bedienung des Prototyps zeigte keine Schwierigkeiten. Im gesamten Prozess kam es zu keinen intraoperativen technischen Schwierigkeiten oder Komplikationen. Kein sekundärer Effekt kardiovaskulärer oder pulmonaler Art konnte festgestellt werden.

Nach Vernebelung durch das Capnoflex® System wurden Mikrotropfen im Durchschnitt von 11 (3-15) μm optisch gemessen (Abbildung14).

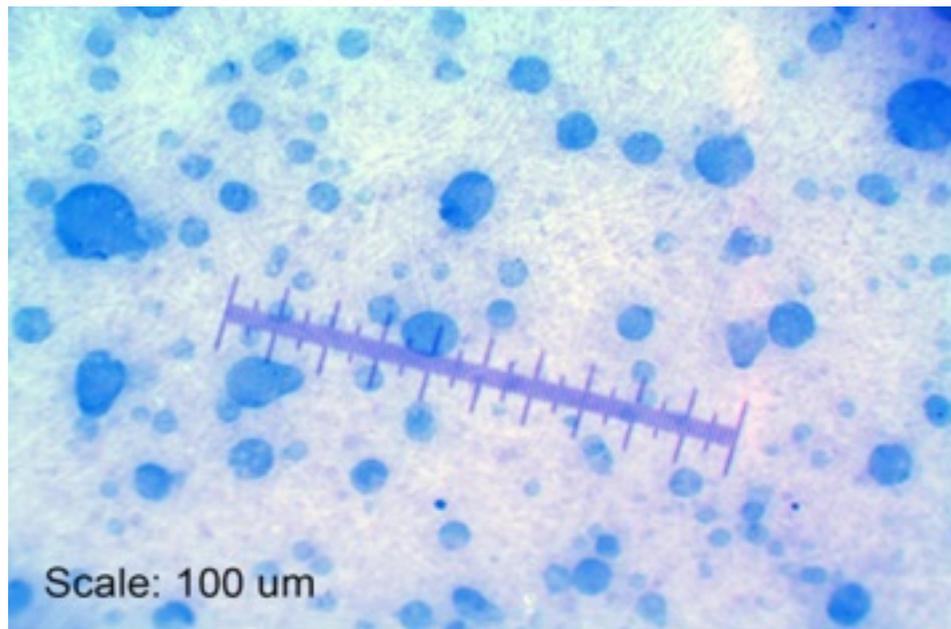


Abbildung 14: Granulometrische Analyse des Aerosols

Die Tropfen, die durch das Capnoflex® produziert werden haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 11 (3-15) μm .

Im Anschluss an das durchgeführte Experiment wurden die Tiere durch den Tierarzt euthanasiert. Unmittelbar danach erfolgten die Autopsien und die Befunderhebung.

Makroskopische Blaufärbung (Verteilung) und mikroskopische Penetration von siDNA in das Zielgewebe

Der Ösophagus konnte nach der Euthanasie als Ganzes aus allen drei Tieren problemlos entnommen werden und das Gewebe wurde longitudinal aufgeschnitten, um die Mukosa zu untersuchen (Abbildung 15).



Abbildung 15: Makroskopie des ösophagogastralen Überganges nach PILAC.

Probenentnahme als Ganzes und die Sicht auf die Schleimhaut. Bild oben: der Ösophagus als Ganzes, Bild unten: Blick auf die Mukosa, man sieht eine leichte Blaufärbung durch das Färbemittel Methylenblau.

Makroskopisch konnten wir eine homogene Färbung durch das aerosolisierte Methylenblau der ganzen Schleimhautschicht, bis in die muskuläre Schicht des distalen Ösophagus feststellen (Abbildung 16, Feld a). Es wurden keinerlei Läsionen oder Verletzungen durch die Anwendung festgestellt.

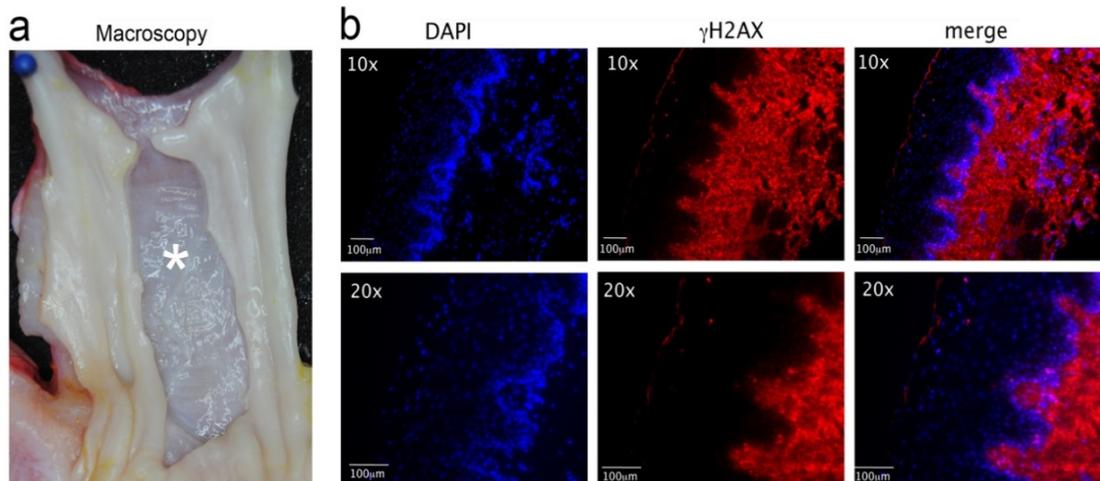


Abbildung 16: Verteilung und Eindringtiefe der siDNA im Zielgewebe

Bild a: Makroskopische Analyse des Gewebes, direkt nach Autopsie **Bild b:** Mikroskopisch-morphologische Analyse anhand Immunfluoreszenz: eine homogene Verteilung von Dbait-Cy5 in der Ösophaguswand und die intranukleäre Phosphorylierung von H2AX, bis zur Muskelschicht wird gezeigt. DAPI: Gegenfärbung der Kerne (blau).

Auch die morphologische Analyse unter einem Fluoreszenzmikroskop zeigte eine homogene Verteilung der Dbait-Cy5 Moleküle, bis zu 400-600 µm tief in die Ösophaguswand. Biologische Ergebnisse zeigten eine intranukleäre Phosphorylierung des Histon Proteins H2AX in den Zellkernen der Mukosa und der Submukosa bis tief in die innerste, zirkuläre Muskelschicht des Ösophagus (Abbildung 16, Feld b). Der Nachweis des phosphorylierten Histon-Proteins H2AX zeigt die Aktivierung der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PK) durch Dbait (d.h. die Aktivierung der DNA-Reparatur infolge der induzierten Genotoxizität).

Diskussion

Das vorliegende Experiment untersucht die Machbarkeit einer medikamentösen Aerosol Drucktherapie im distalen Ösophagus in einem Großtiermodell in Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten des Barrett-Ösophagus. Dabei sollen ähnlich anatomische Verhältnisse wie im menschlichen Körper simuliert werden.

Die Arbeitshypothese war, dass sich die gefärbten therapeutischen Substanzen homogen bis in die Muskelschicht der Ösophaguswand nachweisen lassen werden. Diese Hypothese wurde in Analogie zu den vorherigen Erkenntnissen in der Peritonealhöhle (73) aufgestellt. Für die Beurteilung des Effektes im Zielgewebe wurde eine doppelte Färbung eingesetzt:

- 1) zur makroskopischen Beurteilung eine färbende Lösung mit Methylblau,
- 2) zum mikroskopischen Nachweis zusätzlich Fluoreszenz-markierten Dbait-Moleküle (81,87).

Eine wichtige Voraussetzung war, dieselben oder ähnliche Rahmenbedingungen wie auch in der klinischen Praxis zu schaffen. Zur diesen Bedingungen gehörten insbesondere denselben Druck wie bei einem therapeutischen Capnoperitoneum im klinischen Alltag herzustellen, dieselbe Verdünnung der Substanzen und dieselben chirurgischen Instrumente zu verwenden. Außerdem wurden auch ähnliche anatomische Verhältnisse des therapeutischen Gebiets angestrebt, indem ein Großtiermodell für das Experiment ausgewählt wurde.

Besonders interessierte uns:

1. Die technische Durchführbarkeit der PILAC-Verfahrens
2. Die Homogenität der Verteilung der Testsubstanzen
3. Die Eindringtiefe der Substanzen
4. Eine mögliche Aktivierung der DNA Reparatur-Mechanismen

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen die Machbarkeit der PILAC Prozedur und bestätigen unsere Arbeitshypothese. Es war möglich, das Instrument korrekt zu platzieren und die Testsubstanzen im distalen Ösophagus zu aerosolisieren. Zudem wurden keine Verletzungen der Ösophaguswand durch das Instrument bzw. den Doppelballon beobachtet. Auch wurde das Insufflieren des CO₂ Gas, bei 12mmHg von den Tieren unter Narkose problemlos toleriert. Das komplette Volumen der Testflüssigkeit konnte aerosolisiert werden. Es wurden keine Druckschwankungen oder Überkonzentrierung der Substanzen festgestellt.

Die Makroskopie zeigte eine qualitativ homogene Verteilung der Substanzen. Die Fluoreszenz-Mikroskopie zeigte eine Eindringtiefe ins Gewebe von bis zu 600µm, in die muscularis propria reichend in allen entnommenen Proben. Außerdem konnte die Aktivierung der DNA Reparatur Mechanismen durch Dbait gezeigt werden.

Diese präklinischen Voruntersuchungen liefern also keinen Hinweis, dass PILAC in der klinischen Praxis ineffektiv oder gefährlich sein könnte und rechtfertigen weitere Forschungsarbeiten mit diesem innovativen therapeutischen Ansatz.

Die Experimente deuten auf mögliche Vorteile der PILAC vs. der bisherigen Ablationsverfahren

Zu den Grenzen und nicht gelösten Einschränkungen der verfügbaren Ablationsverfahren gehören:

1. Das multifokale Wachstum des Barrett-Ösophagus
2. Die Grenzen der endoskopischen Resektion
3. Häufige Rezidive nach Resektion
4. Schwere Komplikationen der mechanischen Ansätze

Bereits 1950 wurde erkannt, dass die Grenzen der Ausbreitung des Barrett-Ösophagus durch sein multifokales Wachstum schwierig zu bestimmen sind

(89). Dieses erschwert die bisherige Behandlung und die Progression in ein Frühkarzinom. Daher ist bereits zum Diagnosezeitpunkt bei 30% der Patienten mit einem Barrett Frühkarzinom zu rechnen (89).

Vorausgegangene Studien zeigen, dass mechanische ablativ Therapieansätze keinen befriedigenden Therapieerfolg beim Barrett-Ösophagus erzielen können. Zwar haben die endoskopische Mukosaresektion und endoskopische Submukosadisektion in Kombination mit oder ohne Radiofrequenzablation die aggressive Ösophagektomie weitgehend bei einer hochgradigen Dysplasie abgelöst (27, 40, 42-44), jedoch erreichen diese Verfahren schnell ihre Grenzen, sobald eine Submukosa Infiltration vorliegt.

So kann der Patient nach einem endoskopischen Ablationsverfahren nicht davon ausgehen, sicher geheilt zu sein. Die Rezidivrate ist mit mindestens 30% (Tabelle 2) als hoch oder sogar inakzeptabel einzuschätzen und dieses Risiko erfordert eine langjährige endoskopische Überwachung (57). Die Ursache der Rezidive liegt in der inkompletten Resektion des erkrankten Gewebes, die wiederum durch das multifokale Wachstum und/oder an der herausfordernden histopathologischen Analyse und der schwierigen Beurteilung der Resektionsränder erklärt wird (91).

Letztendlich dürfen die Komplikationen der endoskopischen Ablationsverfahren nicht unterschätzt werden. Der Versuch, die Barrett Mukosa breitflächig zu reseziieren führt bei etwa der Hälfte der Patienten zu klinisch bedeutsamen Stenosen (92), und auch selten zu schweren Komplikationen wie hämodynamisch relevante Blutungen und Perforationen mit dem Risiko einer Mediastinitis mit Sepsis.

Es gibt deswegen einen Bedarf an neuen Therapieansätzen bei der Behandlung des Barrett-Ösophagus. Unsere Experimente deuten auf mögliche Vorteile der PILAC vs. den bisherigen Ablationsverfahren bei der Therapie des Barrett-Ösophagus, weil das gesamte Zielvolumen des potentiell erkrankten Gewebes durch eine therapeutische Substanz erreicht werden kann. Würde es eine wirksame medikamentöse Therapie zur sekundären Prophylaxe der

Entartung beim Barrett-Ösophagus geben, so könnte die PILAC ein adäquates Medikamentenabgabesystem sein, um diese Therapie einzusetzen.

Aktuelle medikamentöse Therapieansätze in der Behandlung vom Barrett-Karzinom

Kombinierte Chemotherapie-Schemata haben sich bei der Therapie des Barrett-Karzinoms etabliert. Als Beispiele wären die Therapie mit Cetuximab und Panitumumab (57) oder der perioperative Einsatz von Ramucirumab in Kombination mit FLOT oder alleiniger Gabe von FLOT (64) zu nennen.

Auch gibt es innovative Ansätze wie die potentiellen positiven Effekte der siDNA Therapie (Dbait) bei Karzinomen (86). In einem kolorektalen-Tumormodell konnte gezeigt werden, dass Dbait in Kombination mit Radiofrequenz Ablation das Ansprechen des Tumors auf die Therapie verbesserte (93). Zudem wurde in einer weiteren präklinischen Studie die Wirksamkeit von Dbait beim hepatozellulären Karzinom (HCC) (94) gezeigt (95). Es wurden kürzlich die Ergebnisse der ersten Phase I-IIa Studien an Menschen, und die Effektivität und Sicherheit der Dbait in Kombination mit einer Radiotherapie bei Hautmetastasen eines malignen Melanoms wurde gezeigt (96).

Wir konnten in unserem Experiment Dbait bis in die Submukosa des Ösophagus nachweisen. Auch wenn diese Ergebnisse experimentell und präliminär sind, öffnen sie den Weg für weitere Forschungen von zielgerichteten medikamentösen Ansätzen bei der Behandlung des Barrett-Ösophagus und dessen Progression in ein Adenokarzinom.

Patientensicherheit

Während der Versuche ist es zu keiner Beeinträchtigung des kardiopulmonalen Zustandes der Tiere gekommen. Auch wurde postoperativ keine Läsion der Ösophaguswand bei den angewandten Drücken und Volumina festgestellt. Bei einer Applikationszeit von 30 Minuten ist das postoperative Auftre-

ten von Ösophagusnekrosen – wie sie historisch bei der Anwendung von Sengstaken-Blakemore Sonden berichtet– unwahrscheinlich. Allerdings haben wir keinen Überlebensversuch durchgeführt und diese potentielle Komplikation müsste noch experimentell ausgeschlossen werden, bevor eine Anwendung am Menschen erfolgt.

Arbeitssicherheit

Die Anwendung eines toxischen Aerosols birgt das potentielle Risiko einer unerwünschten Exposition des beteiligten Behandlungsteam während der Prozedur. Dieses Risiko kann jedoch aufgrund der mit der PIPAC gemachten Erfahrungen relativiert werden. Um die Sicherheit- und Gesundheitsrisiken für das Personal zu minimieren, wurde ein umfassendes Sicherheitskonzept für die PIPAC entwickelt, das für die PILAC übernommen werden könnte. Sämtliche bisherige Arbeitsplatzmessungen bei der PIPAC konnten eine Belastung der Umluft mit Platinspuren mit einer hohen Sensitivität ausschließen (88).

Aerosolisierung eines Chemotherapeutikums als neuer Therapieansatz des Barrett-Ösophagus

Die genannten Resultate der vorliegenden Arbeit weisen eine Übereinstimmung mit den bisherigen Beobachtungen klinischer Studien auf. In drei verschiedenen Modellen wurden die überlegenen pharmakologischen Eigenschaften der Aerosol Druckchemotherapie gezeigt. Zum einem in Modellen an Zell-Linien (74), in Großtiermodellen(73), menschlichem Gewebe, ex vivo (81) und zum anderen während ersten klinischen Applikationen (79). Wir konnten zeigen, dass unser Vorhaben im porcinen Ösophagus durchführbar ist und auch hier eine verbesserte Aufnahme des Chemotherapeutikums durch eine Aerosol Drucktherapie möglich ist. Ein anderer Vorteil von PILAC ist, dass die Anwendungen wiederholt werden können, z.B. während einer Endoskopie bei Patienten mit hochgradigen Dysplasien oder einem Karzinoma in situ.

Ungelöste Fragestellungen

Unsere Versuche wurden zunächst nur im gesunden Großtiermodell getestet. Es müssen weitere Studien an pathologischem, menschlichem Gewebe folgen, um die Wirksamkeit des PILAC-Verfahrens zu prüfen. Insbesondere muss untersucht werden, ob das menschliche Gewebe das Chemotherapeutikum genauso aufnimmt, wie das Gewebe der Schweine und ob das Chemotherapeutikum im pathologischen Barrett-Gewebe nachweisbar ist. Der Effekt von Dbait ist dosisabhängig und für die klinische Anwendung müssen noch weitere Experimente folgen (97). Vor allem in Bezug auf die Dauer der Aerosolbehandlung, der Dosierung, der Temperatur und der Druckapplikation.

Um die Sicherheit des Verfahrens zu evaluieren müssen die systemischen und lokalen Nebenwirkungen in einem Überlebensversuch (Toxizitätsstudie) untersucht werden. Der Ösophagus ist anatomisch gut durchblutet und ein venöses Gefäßnetz sorgt für den Abfluss. Daher müssen pharmakokinetische und pharmakodynamische Studien die lokale und systemische Medikamentenkonzentration über die Zeit evaluieren. Gleichzeitig muss man bedenken, dass die lokale Biodisponibilität des Medikamentes durch die gute Durchblutung gegebenenfalls die lokal gewünschte Medikamentenkonzentration reduzieren könnte. Auch sollte in einem Überlebensversuch ermittelt werden, ob die Applikation von PILAC postoperative Komplikationen wie Strikturen, chronische Fibrose, Schmerzen, Entzündungen, Nekrosen oder auch Perforation im Anwendungsgebiet verursacht.

Zudem müssten auch für die PILAC Prozedur Arbeitsplatzmessungen erfolgen, um die Wirksamkeit der für die PIPAC entwickelten Arbeitssicherheitsmaßnahmen zu prüfen.

Ausblick

Am Anfang der vorliegenden Arbeit wurde der Bedarf an neuen, effektiven und nicht-invasiven Therapiestrategien des Barrett-Ösophagus gezeigt. Der von uns vorgeschlagene Therapieansatz hat einen hohen innovativen Wert und wir sind zu unserer Kenntnis die ersten, die ein solches therapeutisches Verfahren mit dem dazugehörigen Prototyp vorschlagen.

Unsere Ergebnisse zeigen neue moderne Behandlungswege in der Therapie des Barrett-Ösophagus auf. PILAC distanziert sich von mechanischen Ansätzen und orientiert sich an nicht-invasiven pharmakologischen Strategien. Daher erscheint es legitim, auf den vorliegenden Ergebnissen aufbauend, weitere Forschung zum PILAC Verfahren zu unternehmen.

Der nächste Schritt wird sein, menschliches Barrett Gewebe zu behandeln. Für dieses Vorhaben soll das Gewebe ex vivo direkt nach chirurgischer Resektion mit Dbait aerosolisiert werden. Dabei soll getestet werden, welche Effekte die Aerosolisierung auf das pathologische Gewebe zeigt (Eindringtiefe und Verteilung). Des Weiteren muss die Genotoxizität des Medikamentes im pathologischen Gewebe gezeigt werden und die Harmlosigkeit für das gesunde umgebende Gewebe bewiesen werden.

Zudem muss die Art und die Dosierung der angewandten Substanzen, die Dauer der Anwendung und interferierende Parameter wie Temperatur und die Druckapplikation bestimmt werden.

Würden die folgenden experimentellen Ergebnisse unsere ersten Messungen am gesunden Ösophagus am Schweinmodell bestätigen, dann könnte das PILAC-Verfahren ein Fortschritt in der bisher noch unbefriedigenden Behandlung des Barrett-Ösophagus werden.

Zusammenfassung

Es besteht ein signifikanter Bedarf an effektiver Therapie des Barrett-Ösophagus. In dieser experimentellen Arbeit wird ein neues therapeutisches Konzept zur Behandlung des Barrett-Ösophagus vorgestellt, die PILAC (Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy). Im Gegensatz zu den verfügbaren endoskopischen Behandlungen des Barrett-Ösophagus ist die PILAC kein ablatives Verfahren.

Zur Umsetzung des PILAC-Konzeptes wurde ein neues Instrument entwickelt, das Capnoflex®. Darüber hinaus wurde die technische Machbarkeit der PILAC in einem Tiermodell, welches den anatomischen Verhältnissen im Menschen ähnelt, gezeigt.

Es war möglich, biologisch aktive Substanzen im ganzen Gewebe des distalen Ösophagus zu applizieren, ohne Entstehung von nachweisenden Schäden. Gleichzeitig konnte eine überlegene medikamentöse Eindringtiefe in die Ösophaguswand gezeigt werden. Die Ergebnisse zeigen eine homogene Färbung von der Mukosa bis tief in die Submukosa hinein.

Das Konzept der PILAC, das hier zum ersten Mal vorgestellt wird, erscheint spannend, da es sich um ein minimal-invasives, generisches Verfahren mit überlegenen pharmakologischen Eigenschaften handelt. Prinzipiell eröffnet die PILAC neue moderne Behandlungswege in der Therapie: weg von den mechanischen Ansätzen zu neuen nicht-invasiven pharmakologischen Ansätzen. Die hier vorgestellten ersten Ergebnisse rechtfertigen weitere Forschungen zur PILAC. Wären diese nächsten Schritte erfolgreich, so könnte die PILAC mit den bisher verfügbaren, ablativen Therapiestrategien des Barrett-Ösophagus in Konkurrenz treten oder sogar zum Teil ablösen.

Literaturverzeichnis

1. Bosman FT, et al. WHO classification of tumours of the digestive system. No. Ed. 4. World Health Organization, 2010.
2. Ronkainen J, et al. "Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study." *Gastroenterology* 129.6 (2005): 1825-1831.
3. Koop H, et al. "S2k Leitlinie: Gastroösophageale Refluxkrankheit." *Z Gastroenterol* 52.11 (2014): 1299-346.
4. Chak A, et al. "Familiality in Barrett's esophagus, adenocarcinoma of the esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 15.9 (2006): 1668-1673.
5. Lepage C, et al. "Epidemiology and risk factors for oesophageal adenocarcinoma." *Digestive and Liver Disease* 45.8 (2013): 625-629.
6. Pennathur A, et al. "Oesophageal carcinoma." *The Lancet* 381.9864 (2013): 400-412.
7. Bollschweiler E, et al. "Prävalenz von Refluxbeschwerden in der Kölner Normalbevölkerung." *Zeitschrift für Gastroenterologie* 45.02 (2007): 177-181.
8. Edgren G, et al. "A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic." *Gut* (2012): gutjnl-2012.
9. RKI and GEKID, Krebs in Deutschland 2009/2010: http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2013.pdf%3F__blob%3DpublicationFile, besucht am 20.9.2017
10. Nocon M, et al. "Lifestyle factors and symptoms of gastroesophageal reflux—a population based study." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 23.1 (2006): 169-174

11. De Jonge PJ, et al. "Barrett's oesophagus: epidemiology, cancer risk and implications for management." *Gut* (2013): gutjnl-2013.
12. Sharma P, et al. "The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria." *Gastroenterology* 131.5 (2006): 1392-1399.
13. Porschen R, et al. "S3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus (Langversion 1.0–September 2015, AWMF-Registernummer: 021/023OL)." *Zeitschrift für Gastroenterologie* 53.11 (2015): 1288-1347.
14. Harrison R, et al. "Detection of intestinal metaplasia in Barrett's esophagus: an observational comparator study suggests the need for a minimum of eight biopsies." *The American journal of gastroenterology* 102.6 (2007): 1154.
15. Schlottmann F, et al. "Current concepts in treatment of Barrett's esophagus with and without dysplasia." *Journal of Gastrointestinal Surgery* 21.8 (2017): 1354-1360.
16. Pech O, et al. "Gastroesophageal reflux disease and Barrett's dysplasia." *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946) 140.20 (2015): 1533-1536.
17. National Institute for Clinical Excellence. "Gastroesophageal reflux disease and dyspepsia in adults: investigation and management." NICE guideline (cg184) (2014). <https://www.nice.org.uk/guidance/CG184/chapter/1-Recommendations#laparoscopic-fundoplication>, besucht am 20.9.2017
18. Parrilla P, et al. "Long-term results of a randomized prospective study comparing medical and surgical treatment of Barrett's esophagus." *Annals of surgery* 237.3 (2003): 291.

19. Spechler SJ, et al. "Barrett esophagus and risk of esophageal cancer: a clinical review." *Jama* 310.6 (2013): 627-636.
20. Konda VJA, et al. "Complete endoscopic mucosal resection is effective and durable treatment for Barrett's-associated neoplasia." *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12.12 (2014): 2002-2010.
21. Ciocirlan M, et al. "Endoscopic mucosal resection for squamous premalignant and early malignant lesions of the esophagus." *Endoscopy* 39.01 (2007): 24-29.
22. Pech O, et al. "Long-term results and risk factor analysis for recurrence after curative endoscopic therapy in 349 patients with high-grade intraepithelial neoplasia and mucosal adenocarcinoma in Barrett's oesophagus." *Gut* 57.9 (2008): 1200-1206.
23. May A, et al. "Local endoscopic therapy for intraepithelial high-grade neoplasia and early adenocarcinoma in Barrett's oesophagus: acute-phase and intermediate results of a new treatment approach." *European journal of gastroenterology & hepatology* 14.10 (2002): 1085-1091.
24. Shaheen NJ, et al. "Radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia." *New England Journal of Medicine* 360.22 (2009): 2277-2288.
25. Shaheen NJ, et al. "Durability of radiofrequency ablation in Barrett's esophagus with dysplasia." *Gastroenterology* 141.2 (2011): 460-468.
26. Phoa KN, et al. "Radiofrequency ablation vs endoscopic surveillance for patients with Barrett esophagus and low-grade dysplasia: a randomized clinical trial." *Jama* 311.12 (2014): 1209-1217.
27. Pouw RE, et al. "Efficacy of radiofrequency ablation combined with endoscopic resection for Barrett's esophagus with early neoplasia." *Clinical gastroenterology and hepatology* 8.1 (2010): 23-29.

28. Van JL Laethem, et al. "Argon plasma coagulation in the treatment of Barrett's high-grade dysplasia and in situ adenocarcinoma." *Endoscopy* 33.3 (2001): 257-261.
29. Rangunath K, et al. "Endoscopic ablation of dysplastic Barrett's oesophagus comparing argon plasma coagulation and photodynamic therapy: a randomized prospective trial assessing efficacy and cost-effectiveness." *Scandinavian journal of gastroenterology* 40.7 (2005): 750-758.
30. Manner H, et al. "Ablation of residual Barrett's epithelium after endoscopic resection: a randomized long-term follow-up study of argon plasma coagulation vs. surveillance (APE study)." *Endoscopy* 46.01 (2014): 6-12.
31. Hamade N, et al. "Ablation Therapy for Barrett's Esophagus: New Rules for Changing Times." *Current gastroenterology reports* 19.10 (2017): 48.
32. Dumot JA, et al. "An open-label, prospective trial of cryospray ablation for Barrett's esophagus high-grade dysplasia and early esophageal cancer in high-risk patients." *Gastrointestinal endoscopy* 70.4 (2009): 635-644.
33. Shaheen NJ, et al. "Safety and efficacy of endoscopic spray cryotherapy for Barrett's esophagus with high-grade dysplasia." *Gastrointestinal endoscopy* 71.4 (2010): 680-685.
34. Neuhaus H, et al. "Endoscopic submucosal dissection plus radiofrequency ablation of neoplastic Barrett's esophagus." *Endoscopy* 44.12 (2012): 1105-1113.
35. Probst A, et al. "Early esophageal cancer in Europe: endoscopic treatment by endoscopic submucosal dissection." *Endoscopy* 47.02 (2015): 113-121.
36. Chevaux JB, et al. "Clinical outcome in patients treated with endoscopic submucosal dissection for superficial Barrett's neoplasia." *Endoscopy* 47.02 (2015): 103-112.

37. Peters FP, et al. "Stepwise radical endoscopic resection is effective for complete removal of Barrett's esophagus with early neoplasia: a prospective study." *The American journal of gastroenterology* 101.7 (2006): 1449.
38. Larghi A, et al. "Long-term follow-up of complete Barrett's eradication endoscopic mucosal resection (CBE-EMR) for the treatment of high grade dysplasia and intramucosal carcinoma." *Endoscopy* 39.12 (2007): 1086-1091.
39. Lopes CV, et al. "Circumferential endoscopic resection of Barrett's esophagus with high-grade dysplasia or early adenocarcinoma." *Surgical endoscopy* 21.5 (2007): 820-824.
40. Chennat J, et al. "Complete Barrett's eradication endoscopic mucosal resection: an effective treatment modality for high-grade dysplasia and intramucosal carcinoma—an American single-center experience." *The American journal of gastroenterology* 104.11 (2009): 2684.
41. Pouw RE, et al. "Stepwise radical endoscopic resection for Barrett's esophagus with early neoplasia: report on a Brussels' cohort." *Endoscopy* 40.11 (2008): 892-898.
42. Pech O, et al. "Long-term efficacy and safety of endoscopic resection for patients with mucosal adenocarcinoma of the esophagus." *Gastroenterology* 146.3 (2014): 652-660.
43. Moss A, et al. "Endoscopic resection for Barrett's high-grade dysplasia and early esophageal adenocarcinoma: an essential staging procedure with long-term therapeutic benefit." *The American journal of gastroenterology* 105.6 (2010): 1276.
44. Van Vilsteren FGI, et al. "Stepwise radical endoscopic resection versus radiofrequency ablation for Barrett's oesophagus with high-grade dysplasia or early cancer: a multicentre randomised trial." *Gut*. 2011 Jun;60(6):765-73

45. Spechler SJ, et al. Barrett's esophagus. *The New England Journal of Medicine*. 2014;371(9):836–845.
46. Wittekind C, et al. *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. John Wiley & Sons, 2016.
47. Dunbar KB, et al. "The risk of lymph-node metastases in patients with high-grade dysplasia or intramucosal carcinoma in Barrett's esophagus: a systematic review." *The American journal of gastroenterology* 107.6 (2012): 850.
48. Leers JM, et al. "The prevalence of lymph node metastases in patients with T1 esophageal adenocarcinoma: a retrospective review of esophagectomy specimens." *Annals of surgery* 253.2 (2011): 271-278.
49. Feith M, et al. "Pattern of lymphatic spread of Barrett's cancer." *World journal of surgery* 27.9 (2003): 1052-1057.
50. Labenz J, et al. "The epidemiology, diagnosis, and treatment of Barrett's carcinoma." *Deutsches Ärzteblatt International* 112.13 (2015): 224.
51. Chandrasekar VT, et al. "Management of Barrett's esophagus: Screening to newer treatments." *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)* 81.2 (2016): 91-102.
52. Schulmann K, et al. "Inactivation of p16, RUNX3, and HPP1 occurs early in Barrett's-associated neoplastic progression and predicts progression risk." *Oncogene* 24.25 (2005): 4138.
53. Kastelein F, et al. "Aberrant p53 protein expression is associated with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett's oesophagus." *Gut*. 2013 Dec; 62(12):1676-83.
54. Janmaat VT, et al. "Use of immunohistochemical biomarkers as independent predictor of neoplastic progression in Barrett's oesophagus surveillance: A systematic review and meta-analysis." *PloS one* 12.10 (2017): e0186305.

55. Gupta M, et al. "Recurrence of esophageal intestinal metaplasia after endoscopic mucosal resection and radiofrequency ablation of Barrett's esophagus: results from a US Multicenter Consortium." *Gastroenterology* 145.1 (2013): 79-86.
56. Agoston T, et al. "Predictors of treatment failure after radiofrequency ablation for intramucosal adenocarcinoma in Barrett esophagus: A multi-institutional retrospective cohort study." *The American journal of surgical pathology* 40.4 (2016): 554-562.
57. Kiesslich, R., et al. "Diagnosis and treatment of esophageal cancer." *Der Internist* 53.11 (2012): 1315-27.
58. Hashimoto S, et al. "The efficacy of endoscopic triamcinolone injection for the prevention of esophageal stricture after endoscopic submucosal dissection." *Gastrointestinal endoscopy* 74.6 (2011): 1389-1393.
59. Ohki T, et al. "Application of regenerative medical technology using tissue engineered cell sheets for endoscopic submucosal dissection of esophageal neoplasms." *Digestive Endoscopy* 27.2 (2015): 182-188.
60. Beye B, et al. "Topical hemostatic powder promotes reepithelialization and reduces scar formation after extensive esophageal mucosal resection." *Diseases of the Esophagus* 29.6 (2016): 520-527.
61. Stahl M, et al. "Esophageal cancer: Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Annals of oncology* 21.suppl_5 (2010): v46-v49.
62. Ychou M, et al. "Perioperative chemotherapy compared with surgery alone for resectable gastroesophageal adenocarcinoma: an FNCLCC and FFCD multicenter phase III trial." *Journal of clinical oncology* 29.13 (2011): 1715-1721.
63. Cunningham D, et al. "Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer." *New England Journal of Medicine* 355.1 (2006): 11-20.

64. Arbeitsgemeinschaft in der Internistischen Onkologie in der Deutschen-Krebsgesellschaft e.V: AIO-STO-0315: Perioperative Ramucirumab in combination with FLOT versus FLOT alone for resectable esophagogastric adenocarcinoma - A phase II/III trial of the AIO (RAMSES / FLOT7) <http://www.aio-portal.de/index.php/studien-183.html>
65. Hanahan D, et al. "Hallmarks of cancer: the next generation." *cell* 144.5 (2011): 646-674.
66. Mori H, et al. "Steroid permeation into the artificial ulcer by combined steroid gel application and balloon dilatation: prevention of esophageal stricture." *Journal of gastroenterology and hepatology* 28.6 (2013): 999-1003.
67. Hayashi K, et al. "A neo-esophagus reconstructed by cultured human esophageal epithelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, and collagen." *Asaio Journal* 50.3 (2004): 261-266.
68. Menke V, et al. "Conversion of metaplastic Barrett's epithelium into post-mitotic goblet cells by γ -secretase inhibition." *Disease models & mechanisms* 3.1-2 (2010): 104-110.
69. Ojima E, et al. "Chemoprevention of esophageal adenocarcinoma in a rat model by ursodeoxycholic acid." *Clinical and experimental medicine* 15.3 (2015): 343-350.
70. Banerjee B, et al. "Clinical study of ursodeoxycholic acid in Barrett's esophagus patients." *Cancer Prevention Research* (2016).
71. Peiffer DS, et al. "Chemoprevention of esophageal cancer with black raspberries, their component anthocyanins, and a major anthocyanin metabolite, protocatechuic acid." *Cancer Prevention Research* (2014): canprevres-0003.

72. Lee Y, et al. "Gastrin stimulates a cholecystokinin-2-receptor-expressing cardia progenitor cell and promotes progression of Barrett's-like esophagus." *Oncotarget* 8.1 (2017): 203.
73. Solaß W, et al. "Description of a novel approach for intraperitoneal drug delivery and the related device." *Surgical endoscopy* 26.7 (2012): 1849-1855.
74. Helleday T, et al. "DNA repair pathways as targets for cancer therapy." *Nature Reviews Cancer* 8.3 (2008): 193.
75. Tempfer CB, et al. "Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy as an innovative approach to treat peritoneal carcinomatosis." *Medical hypotheses* 85.4 (2015): 480-484.
76. Jacquet P, et al. "Effects of intra-abdominal pressure on pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin after intraperitoneal administration." *Anti-cancer drugs* 7.5 (1996): 596-603
77. Esquis P, et al. "High intra-abdominal pressure enhances the penetration and antitumor effect of intraperitoneal cisplatin on experimental peritoneal carcinomatosis." *Annals of surgery* 244.1 (2006): 106.
78. Eveno C, et al. "Experimental pharmacokinetics evaluation of chemotherapy delivery by PIPAC for colon cancer: first evidence for efficacy." *Pleura and Peritoneum* 2.2 (2017): 103-109.
79. Solass W, et al. "Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinoma using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy." *Annals of surgical oncology* 21.2 (2014): 553-559.
80. De Bree E, et al. "Pharmacological principles of intraperitoneal and bidirectional chemotherapy." *Pleura and Peritoneum* 2.2 (2017): 47-62.
81. Solass W, et al. "Therapeutic approach of human peritoneal carcinomatosis with Dbait in combination with capnoperitoneum: proof of concept." *Surgical endoscopy* 26.3 (2012): 847-852.

82. Khalili-Harbi N, et al. „Pressurized intraluminal aerosol chemotherapy with Dbait in the distal esophagus of swine. *Endoscopy*. 2016 Feb;48(2):184-7“
83. Devun F, et al. "Preclinical study of the DNA repair inhibitor Dbait in combination with chemotherapy in colorectal cancer." *Journal of gastroenterology* 47.3 (2012): 266-275.
84. Dutreix, M, et al. "Molecular therapy in support to radiotherapy." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704.1 (2010): 182-189.
85. Rofstad EK, et al. "Radiation sensitivity in vitro of primary tumors and metastatic lesions of malignant melanoma." *Cancer research* 52.16 (1992): 4453-4457.
86. Coquery N, et al. "Distribution and radiosensitizing effect of cholesterol-coupled Dbait molecule in rat model of glioblastoma." *PloS one* 7.7 (2012): e40567.
87. Biau J, et al. "Dbait: An innovative concept to inhibit DNA repair and treat cancer." *Bulletin du cancer* 103.3 (2016): 227-235.
88. Solaß W, et al. "Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PI-PAC): occupational health and safety aspects." *Annals of surgical oncology* 20.11 (2013): 3504-3511.
89. Barrett NR, Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg* 1950; 38:175- 82; PMID:14791960
90. Altorki NK, et al. "Multifocal neoplasia and nodal metastases in T1 esophageal carcinoma: implications for endoscopic treatment." *Annals of surgery* 247.3 (2008): 434-439.
91. Vieth M, et al. "Histological analysis of endoscopic resection specimens from 326 patients with Barrett's esophagus and early neoplasia." *Endoscopy* 36.09 (2004): 776-781.

92. Pouw RE, et al. "Stepwise radical endoscopic resection for eradication of Barrett's oesophagus with early neoplasia in a cohort of 169 patients." *Gut* 59.9 (2010): 1169-1177.
93. Devun F, et al. "Colorectal cancer metastasis: the DNA repair inhibitor Dbait increases sensitivity to hyperthermia and improves efficacy of radiofrequency ablation." *Radiology* 270.3 (2013): 736-746.
94. Herath NI, et al. "Potentiation of doxorubicin efficacy in hepatocellular carcinoma by the DNA repair inhibitor DT01 in preclinical models." *European radiology* 27.10 (2017): 4435-4444.
95. Herath NI, et al. "The DNA repair inhibitor DT01 as a novel therapeutic strategy for chemosensitization of colorectal liver metastasis." *Molecular cancer therapeutics* 15.1 (2016): 15-22.
96. Le Tourneau C, et al. "First-in-human phase I study of the DNA-repair inhibitor DT01 in combination with radiotherapy in patients with skin metastases from melanoma." *British journal of cancer* 114.11 (2016): 1199.
97. Quanz M, et al. "Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy." *Clinical Cancer Research* 15.4 (2009): 1308-1316.

Danksagungen

Ich möchte mich bei Prof. Dr. med. Prof. h.c. Marc A. Reymond sehr bedanken für das interessante Promotionsthema, die gute Betreuung und Geduld mit meiner Arbeit und dass er mir die Möglichkeit gegeben hat diese als Erstautorin zu publizieren.

Des Weiteren auch bei der Chirurgischen Abteilung des Marienhospitals Herne, vor allem bei Dr. med. Urs Pabst, für die Hilfe bei der Durchführung des Experimentes.

Zudem ein Dank an Herrn Dr. med. vet. Frank Pölzing, der die Experimente überwacht und möglich gemacht hat.

Auch geht mein Dank an die Medizintechnik Reger, vor allem an Herrn Dipl.-Ing. Alexander Hetzel und Frau Tina Schwarz, M.Sc., ohne Sie wäre die Technische Umsetzung nicht möglich gewesen.

Danke auch an die Forscher des Département de Mécanismes moléculaires et oncogénèse des Institut Curie in Paris, vor allem an Fr. Marie Dutreix, Ph.D. und an Fr. Nirmitha Herath, Ph.D von DNA Therapeutics, Orsay, Paris. Marie Dutreix ist die Erfinderin der Dbaits, die hat uns die Moleküle zu Verfügung gestellt und hat die histologischen Analysen durchgeführt.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten.

Zuletzt bedanke ich mich bei meinem wundervollen Freund Philipp, der mich die ganze Zeit über motiviert und unterstützt hat.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Machbarkeit einer Druckchemotherapie (PILAC) im distalen Ösophagus unter Verwendung von Dbaits (siDNA): ein Tierexperiment

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. univ. Roland S. Croner) der Medizinischen Fakultät, der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

- mit Unterstützung durch:
- Prof. Dr. med. Prof. h.c. Marc A. Reymond, Dept. of Surgery and Transplantation, Director, National Center for Pleura and Peritoneum Comprehensive Cancer Center SW Germany, Universitätsklinikum Tübingen.
- Herrn Dipl.-Ing. Alexander Hetzel, Reger Medizintechnik GmbH, Villigendorf.
- Dr. med. vet. Frank Pölzing, Fördergemeinschaft für Innovative Medizin, Beichlingen.
- Marie Dutreix, Institut Curie Paris.
- Nirmitha Herath, DNA Therapeutics Orsay.

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den

Unterschrift

Darstellung des Bildungsweges

"Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten."

