

Aus der
Universitätsklinik für Allgemeine, Viszeral- und
Transplantationschirurgie Tübingen

**Experimentelle Evaluation der Verabreichung von
Icodextrin als intraperitoneales Aerosol (PIPAC) und
dessen Effekte**

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

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

**vorgelegt von
Keck, Helen Salome**

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Königsrainer

2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Kommoss

Tag der Disputation: 30.05.2022

Widmung

Für meine Großeltern Wilhelm und Marie, die mich mit ihrem schwäbischen Optimismus „*Des schafftsch du scho*“ stets aufmuntern können.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	7
1.1 Das Peritoneum	7
1.2 Krankheitsbilder des Peritoneums	9
1.2.1 Peritonealmetastasen	9
1.2.2 Adhäsionen	13
1.3 Icodextrin	15
1.3.1 Einsatz Adhäsionsprävention	16
1.3.2 Icodextrin-Einsatz in Kombination mit Chemotherapie	16
1.4 Intraperitoneale Arzneimittelabgabesysteme	16
1.5 Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC)	17
1.5.1 Prinzip	17
1.5.2 Aufbau und Durchführung	17
1.5.3 Evidenz	19
1.6 Fragestellung	19
2. Material und Methoden	21
2.1 Studienaufbau	21
2.2 Ethischer und regulatorischer Hintergrund	21
2.3 Substanz	21
2.4 Granulometrie	22
2.5 Stabilität von Icodextrin vor und nach der Aerosolisierung	23
2.6 Stabilität von Icodextrin in Kombination mit zwei Chemotherapeutika	25
2.7 Zellkultur	27
2.8 Zytotoxizitätsassay	29
2.9 Adhäsionsassay	31
2.10 Maßnahmen zum Arbeitsschutz	32
2.11 Statistische Analyse	32
3. Ergebnisse	33

3.1	Granulometrie	33
3.2	Stabilität von Icodextrin vor und nach Aerosolisierung	34
3.3	Stabilität der Kombination von Icodextrin mit Chemotherapeutika	36
3.4	Zytotoxizitätsassay	41
3.5	Adhäsionsassay	43
4.	Diskussion	47
4.1	Einsatz von Icodextrin als Aerosol	47
4.2	Stabilität der Kombination Cisplatin, Doxorubicin mit Icodextrin.....	48
4.3	Eigenschaften der Kombination Cisplatin, Doxorubicin mit Icodextrin.	49
4.4	Icodextrin als anti-adhäsives Medikament.....	51
4.5	Icodextrin als Trägerlösung chemotherapeutischer Substanzen	53
4.6	Fazit und Ausblick	55
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis.....	59
7.	Erklärung zum Eigenanteil	69
8.	Veröffentlichungen.....	70
9.	Danksagung.....	71

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u> Aufbau der druckinduzierten intraperitonealen Aerosol-Chemotherapie (PIPAC).....	18
<u>Abbildung 2:</u> Aufbau des Spraytec® Spray-Tröpfchengrößenmesssystems....	23
<u>Abbildung 3:</u> Versuchsaufbau in vitro PIPAC Therapie:	29
<u>Abbildung 4:</u> Granulometrische Charakteristika des mit der Capnopen® Technologie generierten Icodextrin-Aerosols.	34
<u>Abbildung 5:</u> RP-HPLC Analyse von Icodextrin vor und nach Aerosolisierung als PIPAC	35
<u>Abbildung 6:</u> Trennung von Icodextrin	36
<u>Abbildung 7:</u> Trennung von Doxorubicin	37
<u>Abbildung 8:</u> Kurzzeitdaten zur Stabilität von Icodextrin.....	38
<u>Abbildung 9:</u> Kurzzeitdaten zur Stabilität von Cisplatin	39
<u>Abbildung 10:</u> Kurzzeitdaten zur Stabilität von Doxorubicin	40
<u>Abbildung 11:</u> Zytotoxische Wirkung von Icodextrin und Chemotherapeutika auf MKN45 unter PIPAC	42
<u>Abbildung 12:</u> Morphologie der MKN45 Zellen im Verlauf der Therapie.....	43
<u>Abbildung 13:</u> Wirkung von Icodextrin, untersucht im Adhäsionsassay.....	44
<u>Abbildung 14:</u> Wirkung von Icodextrin, untersucht im Adhäsionsassay auf Extrazellulärmatrixproteinen.....	45
<u>Tabelle 1:</u> Auf Stabilität getestete Medikamentengruppen	25
<u>Tabelle 2:</u> Auf zytotoxische und anti-adhäsive Wirkungen getestete Medikamentengruppen.....	28

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ANOVA.....	Analysis of Variance
BSA	Bovine serum albumin
C/D	Cisplatin/Doxorubicin
CAF	Karzinom-assoziierte Fibroblasten
CAWS	Closed Aerosol Waste System
CRS.....	Zytoreduktive Chirurgie
EZM.....	Extrazellulärmatrix
HILIC	Hydrophile Interaktionschromatographie
HIPEC	Hypertherme intraperitoneale Chemotherapie
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IDX	Icodextrin
kDa.....	kiloDalton
ns	Nicht signifikant
PCI	Peritoneal Cancer Index
PIPAC	Pressurized intraperitoneal Aerosol-Chemotherapy
RP-HPLC.....	Reverse-Phase Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
UV	Ultraviolett
VCAM-1.....	Vascular cell adhesion molecule 1

1. Einleitung

Das Peritoneum spielt eine wichtige Rolle in der Viszeralchirurgie, da es an viele Organe grenzt, bei nahezu jedem Eingriff tangiert wird und die Erkrankungen des Peritoneums oft schwerwiegend sind (Reymond, 2016).

Das Peritoneum wird häufig nur als Membran wahrgenommen, dabei werden die multiplen Funktionen dieses Organes unterschlagen, wie z.B. die enorme Leistungsfähigkeit des Peritoneums bei der Immunabwehr (Reymond, 2016). Im Vergleich zu anderen Organen, wie z.B. der Haut, sind die Veränderungen des Peritoneums bei pathologischen Prozessen wenig erforscht und verstanden (Reymond, 2016). Dementsprechend begrenzt ist das Therapieangebot bei Erkrankungen des Peritoneums (Reymond, 2016). Es besteht der Bedarf, die vorhandenen Therapieoptionen zu überdenken und weiter zu verbessern, um Betroffenen mehr Lebenszeit oder zumindest Lebensqualität zu ermöglichen (Reymond, 2016).

Im Folgenden wird das Peritoneum näher beschrieben und wichtige peritoneale Krankheitsbilder, wie die Peritonealmetastasen und Adhäsionen, beleuchtet. Daraufhin wird die Substanz Icodextrin und ihr Einsatz als intraperitoneales Medikament näher betrachtet. Außerdem werden intraperitoneale Arzneimittelabgabesysteme beschrieben, zu denen auch die Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) zählt. Daraus ergibt sich dann schlussendlich die Fragestellung dieser Arbeit.

1.1 Das Peritoneum

Das Peritoneum ist eine zwei Quadratmeter große, seröse Haut (van Baal et al., 2017), die in zwei Blätter unterteilt wird:

- Das parietale Blatt des Peritoneums kleidet die Bauchhöhle aus und begrenzt sie nach außen hin zur Rumpfwand. Das parietale Blatt wird vom Nervus phrenicus und den Spinalnerven innerviert und ist schmerzempfindlich (Blackburn and Stanton, 2014).
- Das viszerale Blatt bedeckt alle intraperitonealen Organe in der Bauchhöhle, also Leber, Gallenblase, Teile des Ösophagus, Magen, Teile

des Dick- und Dünndarms, Milz und bei Frauen außerdem Ovarien, Tuben und einen Teil des Uterus (Blackburn and Stanton, 2014). Über die Tuben besteht außerdem eine Verbindung des Peritoneums mit den äußeren Genitalen. Das viszerale Blatt des Peritoneums ist im Gegensatz zum parietalen Blatt nahezu schmerzunempfindlich (Blackburn and Stanton, 2014).

Das viszerale und das parietale Blatt des Peritoneums gehen an der Stelle, an der die Organe über Bindegewebsplatten, sogenannte Mesenterien, an der Rumpfwand aufgehängt sind, ineinander über (Rau et al., 2018). Beim Dünndarm wird diese Stelle als Radix mesenterii bezeichnet. Durch das Peritoneum und seinen serösen Flüssigkeitsfilm wird eine Verschieblichkeit der Organe gegeneinander und in der Peritonealhöhle gewährleistet (Rau et al., 2018). Im Gesunden ist die Peritonealhöhle nur ein mit einigen Millilitern Peritonealflüssigkeit gefüllter Spaltraum, dessen Druckverhältnisse durch die Atmung stetig beeinflusst werden (Rau et al., 2018). Histologisch gesehen ist das Peritoneum ein Mesothel, ein einschichtiges Plattenepithel, welches einer Basalmembran aufliegt (van Baal et al., 2017). Die Mesothelzellen sind mit einer Glykokalyx bedeckt, die als ergänzende Schutzschicht dient (van Baal et al., 2017). Zusätzlich sind an verschiedenen Stellen im Mesothel lymphatische Stomata enthalten (Wang et al., 2010). Das sind direkte Einmündungsöffnungen von Lymphkapillaren, die eine wichtige Rolle für die Clearance von Flüssigkeiten, aber auch Erregern und Tumorzellen spielen (Wang et al., 2010). Über eine submesotheliale Schicht mit Nerven, Blut- und Lymphgefäßen besteht die Verbindung zum umliegenden Gewebe. In dieser Schicht sind die sogenannten „Milky spots“ (Maculae lactae) zu finden, das sind Ansammlungen von lymphatischem Gewebe mit Makrophagen und Lymphozyten, die für die Immunabwehr in der serösen Höhle bereitstehen (Liu et al., 2016). Das Peritoneum bildet eine große Resorptionsfläche. Diese Fläche wird beispielsweise bei der Peritonealdialyse benutzt, um harnpflichtige Stoffe aus dem Blut über das Peritoneum als semipermeable Membran in eine Dialyselösung abzugeben (Mehrotra et al., 2016). Jedoch können sich über die große Fläche des Peritoneums auch Erreger und Entzündungen sowie

Tumorzellen leicht ausbreiten, weswegen das Peritoneum häufig auch Ort pathologischer Geschehen ist (van Baal et al., 2017).

1.2 Krankheitsbilder des Peritoneums

Die große Fläche des Peritoneums bietet einen breiten Angriffsort für verschiedene Pathologien. Entlang der serösen Haut können sich Erreger und Entzündungen leicht im gesamten Bauchraum ausbreiten (van Baal et al., 2017). Die Erkrankungen des Peritoneums lösen entsprechende, heftige systemische Reaktionen aus, die oft lebensbedrohlich sind (Reymond, 2016). Wichtige Krankheitsbilder des Peritoneums sind Peritonealmetastasen, Peritonitis mit oder ohne Abszessbildung, Aszites, Endometriose, Sklerosierung, primäre Tumore (Mesotheliome) und Adhäsionen (van Baal et al., 2017, Stommel et al., 2014).

1.2.1 Peritonealmetastasen

Nun werden die Peritonealmetastasen näher erläutert. Dabei wird auf ihre Pathophysiologie, Symptomatik, Diagnostik und Therapie eingegangen.

1.2.1.1 Pathophysiologie

Peritonealmetastasen können die Folge verschiedener maligner Geschehen im Bauchraum sein. Die Peritonealhöhle ist typischerweise der primäre Metastasierungsort vom Ovarialkarzinom, aber auch vom Magen-, Pankreas- und kolorektalen Karzinom (Stommel et al., 2014). Die Metastasen im Peritoneum verbreiten sich intrakavitär per continuitatem, im Unterschied zu hämatogenen Metastasen, das heißt, die Tumorzellen des Primärtumors müssen nicht in den Körperkreislauf gelangen (Stommel et al., 2014).

Bei der Verbreitung der Tumorzellen im Peritoneum wurden mehrere Schritte zur Bildung einer Implantationsmetastase identifiziert. Zuerst erreichen die Tumorzellen das Peritoneum, meist nach der Invasion des viszeralen Peritoneums durch den Primärtumor oder nach einer Perforation der Organe (Eriksen et al., 2004). Während der Verbreitung im Peritonealraum müssen die Zellen eine Resistenz gegen Apoptose („Anoikis“) entwickeln, indem sie ihren Energiemetabolismus der hypoxischen Umgebung anpassen (Wilson et al., 2019). Die Tumorzellen müssen auch der Beseitigung durch das Lymphsystem

entgehen (Stommel et al., 2014). Um zu überleben und sich weiter zu vermehren, müssen die Tumorzellen im Peritonealraum an das beschädigte Mesothel, die lymphatischen Stomata oder an freiliegende Extrazellulärmatrix anhaften (Stommel et al., 2014). Die Vielzahl an Mechanismen der Adhäsion sind nur teilweise verstanden. Ein Faktor ist die Expression von Oberflächenmolekülen durch die Tumorzellen, die eine Adhäsion begünstigen. Zum Beispiel ermöglichen Integrine (van Baal et al., 2017) die Adhäsion der Tumorzellen an das Peritoneum, indem sie an verschiedene Extrazellulärmatrixbestandteile wie Kollagen, Laminin, Fibronectin, Fibrinogen und Vitronectin, aber auch an Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und VCAM-1, die von Mesothelzellen exprimiert werden, binden (Alkhamesi et al., 2005, Slack-Davis et al., 2009). Die Adhäsion der Tumorzellen wird noch verstärkt durch die Anregung von Mesothelzellen zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und Produktion von Fibronectin (Kenny et al., 2014, Klein et al., 1995).

Neben den Oberflächenmolekülen spielen auch zelluläre Komponenten wie die karzinom-assoziierten Fibroblasten (CAF) eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Peritonealmetastasen. Die CAF, die über mesothelial-mesenchymale Transition entstehen (Sandoval et al., 2013), tragen zur Entstehung einer sogenannten „prämetastatischen Nische“ bei, indem sie ein tumorfreundliches Mikroenvironment schaffen. Zum Beispiel regen CAF die Neoangiogenese über die Produktion von Wachstumsfaktoren an (Orimo and Weinberg, 2006). Da die Peritonealmetastasen bevorzugt an peritonealen Neogefäßen haften (Solass et al., 2016), erscheint die Neoangiogenese zur Tumorversorgung und zum Tumorwachstum essenziell.

Innerhalb des Peritonealraumes siedeln sich Metastasen besonders häufig im Omentum, auf dem Diaphragma, am Mesenterium, im Douglas-Raum, und in der rechten parakolischen Rinne an (Klaver et al., 2012). Diese Lokalisationen werden durch eine hohe Dichte an lymphatischen Stomata und Milky spots charakterisiert, was auf eine mögliche Rolle der Milky spots in der frühen Tumorabwehr, aber vielleicht auch in der Entwicklung einer zunehmenden Immuntoleranz in der Progression von Peritonealmetastasen hinweist (Liu et al., 2016).

1.2.1.2 Symptomatik

Die Symptome von Peritonealmetastasen sind unspezifisch, Bauchschmerzen und Obstipation, aber auch allgemeinere Symptome maligner Erkrankungen wie Übelkeit, Gewichtsverlust und Fatigue können auftreten (Rau et al., 2018). Mit dem weiteren Fortschreiten der Erkrankung kann die Funktion intraabdomineller Organe beeinträchtigt werden, es kann zu Harnleiter- und Gallengangsstenosen sowie Darmverschlüssen kommen (Lambert and Wiseman, 2018). Vor allem bei gynäkologischen Tumoren, wie z.B. dem Ovarialkarzinom, entwickelt sich oft maligner Aszites, der bei Zunahme zu einer erheblichen Einschränkung der respiratorischen Funktion, des Eiweißhaushaltes und der Lebensqualität führt (Cavazzoni et al., 2013).

1.2.1.3 Diagnostik

Peritonealmetastasen können manchmal im Rahmen von radiologischen Untersuchungen (wie z.B. CT-Abdomen) diagnostiziert werden (Coccolini et al., 2013). Allerdings ist die Sensitivität des CT bei kleinknotigen Peritonealmetastasen begrenzt, sodass die Diagnose oft intraoperativ während einer Laparoskopie oder Laparotomie gestellt wird (Coccolini et al., 2013). Die Ausdehnung der Peritonealmetastasen lässt sich mithilfe verschiedener Scores quantifizieren. Am gebräuchlichsten ist der Peritoneal Cancer Index (PCI) nach Sugarbaker (Jacquet and Sugarbaker, 1996), der die abdominale Tumorlast betrachtet. Der PCI beschreibt die Präsenz und die Größe der Peritonealmetastasen in 13 abdominalen Regionen. Es kann maximal ein PCI von 39 erreicht werden, wobei ein höherer Score mit schlechterer Resektabilität und damit auch schlechterer Prognose assoziiert ist (Llueca et al., 2018, Nagata et al., 2017). Der PCI kann neben der intraoperativen Beurteilung auch präoperativ über radiologische Verfahren grob eingeschätzt werden. In der klinischen Praxis ist der PCI für die Auswahl derjenigen Therapie maßgeblich, die bei der jeweiligen Patientin bzw. dem jeweiligen Patienten den meisten Erfolg verspricht (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, 2019).

1.2.1.4 Therapie

Die Wahl der Behandlung der Peritonealmetastasen hängt vom Primärtumor und den zu diesem Primärtumor veröffentlichten Leitlinien ab. Lange galten Peritonealmetastasen als unheilbar und wurden lediglich mit palliativer systemischer Chemotherapie und Best Supportive Care behandelt, chirurgische Interventionen waren nur akuten Komplikationen vorbehalten (Konigsrainer et al., 2011). Als neue, kurative Therapie wurde eine multimodale Therapie aus systemischer Chemotherapie, zytoreduktiver Chirurgie (CRS), also der maximalen chirurgischen Entfernung des Tumors, kombiniert mit einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie (HIPEC), etabliert (Sugarbaker, 1989). Das Ziel ist die makroskopische Tumorfreiheit durch Resektion sämtlicher peritonealen Metastasen, was oft die Resektion der mit Tumor befallenen Organabschnitte erfordert. Um auch mikroskopische Tumorreste zu entfernen, wird im Anschluss bei offenem oder geschlossenem Abdomen die hypertherme, flüssige Chemotherapie appliziert. Im Vergleich zur systemischen Chemotherapie wird eine höhere intraperitoneale Konzentration der therapeutischen Substanz erreicht, gleichzeitig wird die systemische Toxizität der Chemotherapie vermindert (Steller et al., 1999). Durch den zusätzlichen Einsatz der Hyperthermie soll ein synergistischer zytotoxischer Effekt erreicht werden (Giovannella et al., 1976). CRS und HIPEC werden inzwischen auch in der S3-Leitlinie für das Kolorektale Karzinom neben der systemischen Chemotherapie als chirurgische Therapie unter gewissen Voraussetzungen empfohlen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2019).

Die hohe prognostische Relevanz einer kompletten Zytoreduktion der Peritonealmetastasen ist in verschiedenen Tumortypen, wie z.B. dem high-grade serösen Ovarialkarzinom (du Bois et al., 2009) oder dem kolorektalen Karzinom (Quenet et al., 2021), sehr gut belegt (van de Vlasakker et al., 2021). Hingegen ist die Evidenzbasis für die zusätzliche HIPEC dünn. Insbesondere beim kolorektalen Karzinom waren die Ergebnisse von drei kürzlich publizierten randomisierten Studien enttäuschend (Quenet et al., 2021, Goere et al., 2020, Klaver et al., 2019). Außerdem ist die CRS in Kombination mit HIPEC ein

radikales Vorgehen mit signifikanter perioperativer Morbidität und Letalität (Boerner et al., 2016). Auch die Rezidivrate der Peritonealmetastasen nach CRS mit HIPEC ist mit einer medianen Zeit von 12 Monaten hoch (Gamboa et al., 2020). Für viele Patientinnen und Patienten, insbesondere solche, die schwer betroffen sind (mit hohem PCI) oder ein hohes Operationsrisiko mitbringen, kommt CRS und HIPEC nicht in Frage.

Es besteht also ein Bedarf nach neuen Therapieoptionen für Patientinnen und Patienten, die einer zytoreduktiven Chirurgie nicht zugänglich sind. Diese Therapielücke könnte durch die druckinduzierte intraperitoneale Aerosol-Chemotherapie (PIPAC) gefüllt werden. Die PIPAC ist ein neues, schonendes Verfahren mit viel Potenzial zur Lebensverlängerung und Verbesserung der Lebensqualität (Solass et al., 2014). Auf die PIPAC-Therapie mit ihrem Wirkprinzip, ihrer Durchführung sowie ihren Chancen und Herausforderungen bzw. Limitationen wird unter Kapitel 1.5 eingegangen.

1.2.2 Adhäsionen

Ein weiteres Krankheitsbild des Peritoneums sind Adhäsionen. Nach abdominalen Eingriffen ist die Entwicklung von peritonealen Adhäsionen häufig und tritt in bis zu 54% aller Fälle auf (Okabayashi et al., 2014). Die Bildung von Adhäsionen kann zu schwerwiegenden Komplikationen führen, wie beispielsweise Infertilität, chronischen Bauchschmerzen, Passagestörungen bis hin zu Darmverschlüssen (Diamond and Freeman, 2001). Adhäsionen haben auch Konsequenzen für spätere Folgeeingriffe, da die Operationsbedingungen beim Situs mit Adhäsionen erschwert sind und Organstrukturen schlechter erreicht werden können. Auch sind die ökonomischen Folgen weitreichend, bedingt durch höhere Kosten im Rahmen des chirurgischen Eingriffs, längere Krankenhausaufenthalte und die prolongierte Heilungszeit (Ray et al., 1998, Arung et al., 2011). Im Folgenden wird auf die Pathophysiologie, Therapie und Prophylaxe der Adhäsionen eingegangen.

1.2.2.1 Pathophysiologie

Adhäsionen sind pathologische Verbindungen zwischen Organen (enteroenteral) und der Bauchwand (enteroparietal). Die genauen Entstehungsmechanismen

der Adhäsionen sind komplex und auch oft widersprüchlich dargestellt. Durch peritoneale Verletzungen wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, in deren Rahmen auch die Gerinnungskaskade aktiviert wird (Arung et al., 2011). Über Thrombin wird aus Fibrinogen Fibrin synthetisiert. Im Gegensatz zur physiologischen Wundheilung wird dieses bei der Adhäsionsbildung nur unzureichend im Rahmen der plasmin-vermittelten Fibrinolyse abgebaut (Okabayashi et al., 2014), es entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Koagulation und Fibrinolyse. Als Folge der überwiegenden Koagulation bildet das verbleibende Fibrin Brücken zwischen bisher unverbundenen Gewebeteilen (Diamond and Freeman, 2001) und damit ein Gerüst, in welches Fibroblasten einwandern können und Extrazellulärmatrix (EZM) produzieren. Gegenregulierende Mechanismen wie die Plasminogen-Aktivierung und Matrix-Metallo-Proteasen, die die EZM abbauen, werden gehemmt (Cheong et al., 2001), sodass sich das entstehende Bindegewebe innerhalb von fünf bis sieben Tagen weiter organisieren kann und Blutgefäße über angiogenese-induzierende Faktoren einsproßen (Arung et al., 2011).

1.2.2.2 Therapie und Prophylaxe

Die Therapieoptionen sind bei vorhandenen Adhäsionen limitiert. Eine laparoskopische Adhäsiolektomie, also die Bekämpfung von Adhäsionen durch die chirurgische Lösung, führt bei hoher Verletzungsgefahr von intraperitonealen Strukturen nicht immer zur Besserung der Symptomatik (Paajanen et al., 2018, Molegraaf et al., 2017). Außerdem kommt es häufig zur Reformation von Adhäsionen (Diamond and Freeman, 2001).

Die Prävention der Adhäsionen ist ein altes Anliegen der abdominalen Chirurgie. Das Auftreten von postoperativen Adhäsionen kann im Allgemeinen chirurgisch durch die Einhaltung der Halsted'schen Prinzipien (W.S. Halsted 1852-1922) verringert werden (Arung et al., 2011). Die Halsted'schen Prinzipien beinhalten unter anderem möglichst atraumatisches Operieren, das Vermeiden von Fremdmaterial, und strengere Asepsis (Arung et al., 2011). Es wurden auch verschiedenste präventive Therapiestrategien für Risikoeingriffe und Risikogruppen in Erwägung gezogen. Flüssigkeiten, Gele oder Membranen

sollen in der Bauchhöhle, also intraperitoneal, eingesetzt werden und dort die Entwicklung postoperativer Adhäsionen vorbeugen. Diskutiert wird unter anderem die Substanz Icodextrin (siehe 1.3), die als instillierte Flüssigkeit das Gewebe sowie Organe separieren soll und so die Bildung von Adhäsionen verhindern soll (Hydroflotation) (van den Tol et al., 2005). Auch Gele aus Hyaluronsäure (Carta et al., 2004) und Polyethylenglycol (Ferland et al., 2001) sollen die Berührung der Peritonealwände verhindern. Es wurden immunmodulatorische Substanzen wie Steroide oder Antihistaminika zur Adhäsionsprävention eingesetzt, weil sie die Fibrinolyse fördern (Risberg, 1997, Ahmad et al., 2020b). Weitere mechanische Barrieren sind eine resorbierbare Schutzschicht aus oxidiert regenerierter Zellulose (Shimanuki et al., 1987) und eine Hyaluronsäure-Carboxymethylzellulosemembran (Diamond, 1996). Die Übersichtsarbeiten zur Adhäsionspräventionsstudien zeigen nur mäßige Erfolge (Ahmad et al., 2020a, Robb and Mariette, 2014, Ten Broek et al., 2014, Ahmad et al., 2020b).

Anti-adhäsiven Substanzen werden im klinischen Alltag weiterhin mit Skepsis betrachtet und finden nur selten Anwendung. Es wird keine medikamentöse präventive Strategie gegen Adhäsionen empfohlen (Arung et al., 2011). Weitere Forschungsanstrengungen sind notwendig, um peritoneale Adhäsionen wirksam vorzubeugen.

1.3 Icodextrin

Eine Substanz, deren Einsatz als anti-adhäsives Medikament diskutiert wird, ist Icodextrin. Icodextrin ist ein Kolloidosmotikum, welches bereits routinemäßig in der Peritonealdialyse genutzt wird (Htay et al., 2018). Icodextrin ist ein Gemisch verschiedener Glucosepolymere mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 17 kDa (Frampton and Plosker, 2003). Gemäß der Hydroflotation soll die instillierte Icodextrin-Lösung die Peritonealwände separieren und so die Bildung von Adhäsionen verhindern (van den Tol et al., 2005). Aufgrund des hohen Molekulargewichts verbleibt Icodextrin lange im Bauchraum, bevor es resorbiert wird, und kann deswegen auch lange wirken.

1.3.1 Einsatz Adhäsionsprävention

In präklinischen Studien erzielte Icodextrin vielversprechende Ergebnisse in der Prävention von postoperativen Adhäsionen (Klink et al., 2013, van den Tol et al., 2005). Die peritoneale Wundheilung wird von Icodextrin nicht beeinträchtigt (Matsumoto et al., 2012). Auch steigert Icodextrin die postoperativen Nebenwirkungen nicht (Sakari et al., 2016). Jedoch konnte in einer randomisierten kontrollierten Studie keine signifikante Reduktion von postoperativen Adhäsionen (de novo) durch Icodextrin als flüssige Lösung belegt werden (Trew et al., 2011). So bleibt der klinische Nutzen von Icodextrin umstritten (Robb and Mariette, 2014, Ten Broek et al., 2014).

1.3.2 Icodextrin-Einsatz in Kombination mit Chemotherapie

Im Tiermodell konnte die Kombination von Icodextrin mit zytotoxisch wirksamen Substanzen (Mitomycin-C) das Auftreten postoperativer Adhäsionen reduzieren (Urkan et al., 2017). Auch wurde die peritoneale Tumorimplantation mit einer lokalen Applikation von Icodextrin mit Oxaliplatin und 5-Fluoruracil reduziert (Jouvin et al., 2017). Außerdem wird vermutet, dass Icodextrin die mesothelial-mesenchymale Transition hemmt (Klink et al., 2013) und somit die Entwicklung von karzinom-assoziierten Fibroblasten und deren Effekte auf den Tumorprogress einschränkt. Im Mausmodell hemmte Icodextrin die Tumorzelladhäsion an beschädigte Bereiche der Peritonealwand *in vivo* (Al Dybiat et al., 2020). So könnte Icodextrin (allein oder in Kombination mit Chemotherapie) neben der Adhäsionsprävention auch das Wachstum peritonealer Metastasen reduzieren.

1.4 Intraperitoneale Arzneimittelabgabesysteme

Es stehen verschiedene Systeme zur Verfügung, um Medikamente intraperitoneal abzugeben. Am häufigsten werden Medikamente in die Bauchhöhle über einen sogenannten „Peritonealdialysekatheter“ verabreicht (Van Oudheusden et al., 2015). Die Wahl eines geeigneten Arzneimittelabgabesystems muss sowohl die Charakteristiken der zu verabreichenden Lösung (Viskosität, Lipophilie, usw.) als auch die des Zielorgans, des Peritoneums, berücksichtigen. Das Peritoneum ist eine mit

Glykolipiden bedeckte, wasserabweisende Membran, die den Austausch von großen Molekülen zwischen der Peritonealhöhle und dem Rest des Körpers streng reguliert. So ist die transperitoneale Aufnahme von makromolekularen Substanzen sehr begrenzt (Steuperaert et al., 2017). Zudem verteilen sich Flüssigkeiten entlang des Weges mit dem geringsten Widerstand. Deswegen ist bei der intraperitonealen Applikation von flüssigen Medikamentenlösungen die Bedeckung des Peritoneums unvollständig (Flessner, 2016).

1.5 Pressurized IntraPeritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC)

1.5.1 Prinzip

Die wichtigsten Limitationen der intraperitonealen Chemotherapie sind also die eingeschränkte Medikamentenaufnahme über die semipermeable Membran, die das Peritoneum darstellt, und die ungleichmäßige Verteilung des Medikamentes im Peritonealraum. Die PIPAC wurde als Methode entwickelt, um diese Limitationen zu überwinden (Reymond et al., 2000, Solass et al., 2012). Während der PIPAC werden chemotherapeutische Substanzen laparoskopisch in ein Capnoperitoneum als Aerosole vernebelt. Die Absicht dieser Methode ist es, sich physikalische Gesetzmäßigkeiten zunutze zu machen, um über Druck und die Vernebelung den Effekt auf das Zielgewebe zu verbessern (Nadiradze et al., 2019).

1.5.2 Aufbau und Durchführung

Die druckinduzierte Aerosol-Chemotherapie wird in einem Operationssaal mit laufender Hochfluss-Luftfilterung durchgeführt. Der Patient bzw. die Patientin befindet sich in einer Allgemeinanästhesie. Bei Operationsbeginn wird ein Capnoperitoneum bei Körpertemperatur und einem Druck von 12 mmHg hergestellt. Der Zugang zur Peritonealhöhle wird über einen 5 mm Ballontrokar für die Kamera und einen 12 mm Ballontrokar für den Vernebler geschaffen. Es folgt die Durchführung einer explorativen Laparoskopie und die Bestimmung des PCI. Während der Operation können peritoneale Biopsien und im Fall von Aszites auch eine Zytologie entnommen werden.

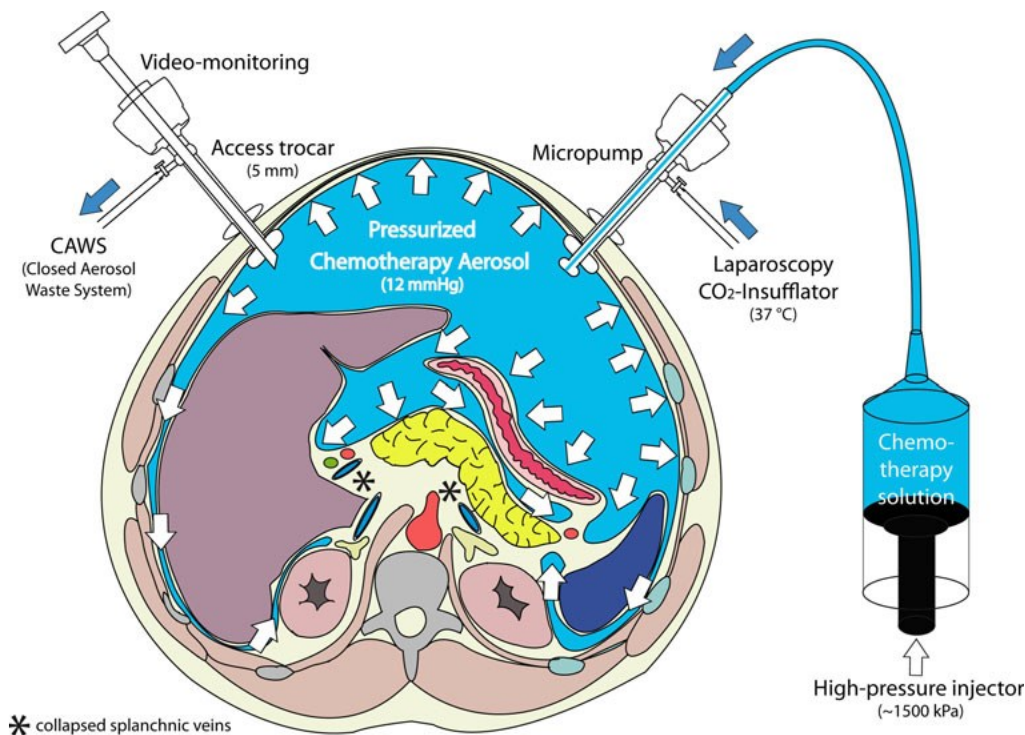


Abbildung 1: Aufbau der PIPAC. Es wird ein normothermes Capnoperitoneum mit einem Druck von 12 mmHg hergestellt. Unter Video-Überwachung wird die chemotherapeutische Substanz mithilfe eines Hochdruckinjektors in die dicht verschlossene Peritonealhöhle vernebelt. Nach dreißig Minuten wird das toxische Aerosol über ein geschlossenes System entsorgt. Aus Solass et al. (2014).

Im Anschluss wird der Vernebler (z.B. Capnopen, Capnomed, Zimmern o.R.) in den Trokar eingeführt und mit einem Hochdruck-Angioinjektor verbunden (z.B. Accutron HP Thera, Medtron, Saarbrücken). Nach luftdichter Versiegelung des gesamten Systems mitsamt der Peritonealhöhle wird die PIPAC mit den chemotherapeutischen Substanzen ferngesteuert appliziert. Die jeweiligen Substanzen werden je nach Tumorursprung und chemotherapeutischer Vorbehandlung ausgewählt. Zum Beispiel kann eine Kombination von Cisplatin und Doxorubicin aerosolisiert werden (Alyami et al., 2019). Die Flussrate beträgt in der Regel 30 ml/min, der vorgelagerte Druck ist maximal 300 psi, das entspricht in etwa 20 bar (Cazauran et al., 2018). Der intraabdomineller Befund wird während der Behandlung via Video überwacht. Nach dreißig Minuten Beibehaltung des Aerosol-Gleichgewichtszustandes wird das toxische Aerosol über ein spezielles geschlossenes Aerosol-Entsorgungssystem (CAWS) sicher

entsorgt. Die Behandlung kann nach einer kurzen laparoskopischen Kontrolle der Peritonealhöhle abgeschlossen werden (Cazauran et al., 2018). Die PIPAC Prozedur kann mehrfach im Abstand von je sechs bis acht Wochen durchgeführt werden.

1.5.3 Evidenz

In präklinischen (Eveno et al., 2017, Khosrawipour et al., 2017, Davigo et al., 2020, Giger-Pabst et al., 2019) und klinischen (Solass et al., 2014, Tempfer et al., 2018) Studien zeigten sich bei der PIPAC im Vergleich zur flüssigen Therapie überlegene pharmakologische Eigenschaften, insbesondere eine höhere Konzentration und Eindringtiefe der Medikamente in das Zielgewebe sowie eine verbesserte räumliche Verteilung (Shariati et al., 2019). Nach zahlreichen Prozeduren weltweit hat sich bestätigt, dass PIPAC durchführbar und sicher ist. Die Daten zum objektiven Ansprechen auf die Therapie und Verbesserung der Lebensqualität sind vielversprechend. Deswegen kann PIPAC als Behandlungsoption für weit fortgeschrittene, refraktäre und isolierte Peritonealmetastasen unterschiedlicher Herkunft in Betracht gezogen werden (Alyami et al., 2019). Die PIPAC kann auch als Neoadjuvans wirkungsvoll eingesetzt werden (Girshally et al., 2016). Weitere Indikationen, zum Beispiel die Anwendung als Prophylaxe der Peritonealmetastasen, werden klinisch noch evaluiert (Alyami et al., 2019).

1.6 Fragestellung

Die Therapie mit anti-adhäsiven Substanzen, so auch Icodextrin, ist in präklinischen Studien vielversprechend. Dennoch ist die Wirkung in klinischen Studien umstritten und so wird Icodextrin kaum im Klinikalltag angewandt. Eine potenzielle Erklärung ist, dass die Anwendung vom flüssigen Icodextrin durch eine eingeschränkte Verteilung des Medikaments im Peritonealraum und eine inkomplette Bedeckung des Peritoneums limitiert ist (Argentino et al., 2014). Dem könnte entgegengewirkt werden, indem Icodextrin als PIPAC verabreicht wird. Auch wenn die PIPAC initial für die Applikation chemotherapeutischer Substanzen ausgelegt wurde, könnte sie auch für andere Medikamente angewendet werden, wie z.B. anti-adhäsive Substanzen. Da Icodextrin eine

polymerische Lösung mit geringer Viskosität ist, könnte die PIPAC Technologie für eine Aerosolisierung dieser Lösung geeignet sein. So könnte der Einsatz von Icodextrin zur Prävention von postoperativen Adhäsionen effektiver werden. Außerdem könnte Icodextrin so auch als Trägerlösung für Chemotherapie dienen, um Synergien zwischen deren zytotoxischen Effekten und der anti-adhäsiven Wirkung gegenüber Tumorzellen zu generieren. Voraussetzung für eine Medikamentenkombination aus Trägerlösung und Chemotherapie ist allerdings die Stabilität der einzelnen Substanzen in der Kombination (Rau et al., 2018).

Das Ziel ist es, mit einem Icodextrin-Aerosol sowohl die Bildung von Adhäsionen als auch die Adhäsion von Tumorzellen an das Peritoneum, also die Entwicklung peritonealer Metastasen, effektiver bekämpfen zu können, als es mit einer flüssigen Lösung möglich ist.

In dieser experimentellen Arbeit wird gezeigt, dass die molekulare Struktur von Icodextrin bei der Aerosolisierung durch die PIPAC-Technologie intakt bleibt und ein passendes Aerosol hergestellt werden kann. Eine Kombination von Cisplatin und Doxorubicin mit Icodextrin als Trägerlösung für die Substanzen war über neunzig Tage bei Temperaturen von 4°C stabil. Außerdem wird bewiesen, dass diese Medikamentenkombination die Adhäsion von der Zelllinie MKN45, also humanen Siegelringkarzinomzellen *in vitro* reduziert, ohne an zytotoxischer Wirkung zu verlieren.

2. Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Es wurde eine experimentelle Studie durchgeführt, die eine technische Durchführbarkeit der Herstellung von Icodextrin als unter Druck stehendes, therapeutisches Aerosol und dessen Charakteristiken testet. Die Pharmakologie von Icodextrin wurde bei der Applikation mit einem Hochdruckinjektor/Vernebler sowie in Kombination mit chemotherapeutischen Medikamenten untersucht. Des Weiteren erfolgte die Betrachtung biologischer Effekte von Icodextrin auf humane Siegelringkarzinomzellen *in vitro*. Dabei wurden sowohl die Effekte der alleinigen Anwendung von Icodextrin wie auch die Anwendung als Kombination mit chemotherapeutischen Substanzen untersucht.

Alle Experimente und Messungen wurden in dreifacher Ausfertigung durchgeführt. Wenn möglich, fand die Untersuchung der Proben verblindet statt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte gemäß den Empfehlungen zur Führung eines Forschungs-Protokollbuches der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen und unterlag den Standards der Good Scientific Practice der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Forschungsgemeinschaft, 2019). Die Aufzeichnungen der Experimente, inkl. Rohdaten, sind auf dem Server des Nationalen Zentrums für Pleura und Peritoneum (NCP) gespeichert.

2.2 Ethischer und regulatorischer Hintergrund

Keine lebendigen Tiere wurden für die Zwecke dieser Studie verwendet oder eingeschläfert. Keine vom Menschen abstammenden Proben wurden einbezogen. Die humane Zelllinie MKN45 ist käuflich erworben worden (DSMZ, Braunschweig, Germany). Nach deutschem Gesetz war keine Autorisierung durch eine Ethikkommission oder Tierschutzkommission notwendig.

2.3 Substanz

Als anti-adhäsive Substanz wurde Icodextrin 7,5% solution (Extraneal®, Baxter, Wien, Österreich) genutzt, einer Konzentration von 7,5 mg/ml entsprechend. Die Substanz Icodextrin ist für die intraperitoneale Anwendung in Deutschland bereits zugelassen. Die Herstellerlösung wurde mit H₂O (Ampuwa, Fresenius, Bad

Homburg, Deutschland) auf 5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1 mg/ml verdünnt. Als Chemotherapeutika wurden Doxorubicinhydrochlorid 2 mg/ml (DOXO-cell®, 150 mg, Cell pharm GmbH, Hannover, Deutschland) und Cisplatin 1 mg/ml (Cisplatin Teva®, 100 mg, TEVA GmbH, Ulm, Deutschland) verwendet, da sie routinemäßig gemeinsam für die intraperitoneale Anwendung bei Magen- und Ovarialkarzinom genutzt werden (Van der Speeten et al., 2017). Cisplatin ist ein Derivat von Platin und wirkt zytotoxisch über eine Hemmung der DNA-Replikation. Doxorubicin gehört zu den Anthrazyklinen, wirkt direkt auf die Zelloberfläche (Triton and Yee, 1982) und hat sich bei der intraperitonealen Anwendung als vorteilhaft erwiesen, da es aufgrund seines hohen Molekulargewichts nur langsam aus dem Peritoneum absorbiert wird (Van der Speeten et al., 2009).

2.4 Granulometrie

Mit granulometrischen Messungen können die Eigenschaften eines Aerosols näher untersucht werden. Dafür wurden Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen von Icodextrin (7,5 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1 mg/ml) mit einem Hochdruck-Kontrastmittelinjektor (Accutron HP-D®, Medtron AG, Saarbrücken, Deutschland) und dem laparoskopischen Vernebler Capnopen® (Capnomed, Zimmern o.R., Deutschland) bei einem vorgelagerten Druck von über 11 bar und einer Flussrate von 0,6-0,7 ml/s aerosolisiert. Dabei wurde ein Gesamtvolumen von 200 ml je Probe von den vier unterschiedlichen Verdünnungen (mit verschiedener Viskosität) versprüht.

Die granulometrischen Messungen der Tropfenpartikel der Icodextrinlösung wurden mittels Laserdiffraktometrie (Spraytec® Malvern, Herrenberg, Deutschland) bei den verschiedenen Verdünnungen durchgeführt (Abb. 2). Dabei werden die statistischen Tropfengrößen aus dem Aerosol während der Sprühphase bestimmt und die Verteilung der verschiedenen Größen analysiert (Malvern, 2007). Ein Helium-Neon Laser wird auf das entstehende Aerosol projiziert und von den einzelnen Aerosolpartikeln abgelenkt. In einem Empfängermodul des Geräts wird das durch das Aerosol entstandene Lichtbeugungsmuster in ein elektrisches Signal umgewandelt und über die

Analysesoftware ausgewertet. Dabei wird die Mie Theorie angewandt, die vorhersagt, wie das Licht von sphärischen Partikeln gestreut wird (Malvern, 2007). Spraytec® berechnet damit über das gemessene Volumen des Partikels den Durchmesser eines imaginären volumen-äquivalenten sphärischen Partikels.

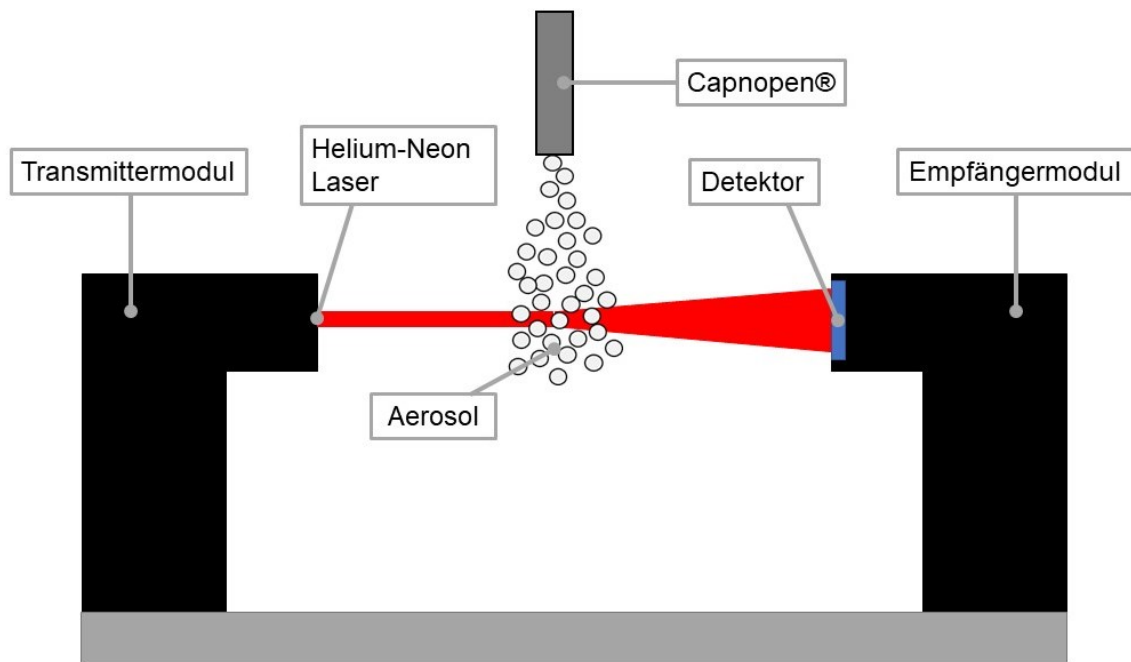


Abbildung 2: Aufbau des Spraytec® Spray-Tröpfchengrößenmesssystems. Das Transmittermodul erzeugt einen Helium-Neon Laserstrahl, der auf das entstehende Aerosol projiziert wird und dabei von den einzelnen Partikeln abgelenkt wird. Das so entstehende Muster der Lichtbeugung wird über einen Detektor gemessen und über das Empfängermodul in ein elektrisches Signal umgewandelt. Eigene Darstellung.

2.5 Stabilität von Icodextrin vor und nach der Aerosolisierung

Um festzustellen, ob die durch die Aerosolisierung erzeugten Scherkräfte die Molekülstruktur von Icodextrin verändern, wurde dieses mithilfe der Reverse-Phase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) vor und nach der Aerosolisierung verglichen. Die RP-HPLC ist eine analytische Methode, mit der Substanzen identifiziert, quantifiziert und getrennt werden können. Die Substanz wird dabei in eine mobile Phase, ein bestimmtes Laufmittel, gegeben. Diese wird mitsamt der Substanz über eine stationäre Phase, eine Trennsäule mit

spezifischen Eigenschaften, gepumpt. Je nach Stärke der Wechselwirkungen dieser Substanz mit der Trennsäule passiert diese die Trennsäule schneller oder langsamer. Am Ende der stationären Phase wird die Substanz über einen UV-Detektor nachgewiesen. Durch den Zeitpunkt des Nachweises ergibt sich eine für die Substanz spezifische Retentionszeit. Bei der RP-HPLC ist die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase meist polar, das heißt, unpolare Substanzen verweilen länger auf der Säule, haben also höhere Retentionszeiten (Zuo, 2014). Die jeweilige Konzentration einer Substanz kann anhand der Peakfläche (Absorption Units x Minute) über eine Quantifizierungstabelle, die vorab mit bekannten Konzentrationen erstellt wurde, bestimmt werden.

Icodextrin-Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen (7,5 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml und 1 mg/ml) wurden mit einem Hochdruck-Kontrastmittelinjektor (Accutron HP Thera ®, Medtron AG, Saarbrücken, Deutschland) und dem laparoskopischen Vernebler Capnopen® (Capnomed, Zimmern o.R., Deutschland) aerosolisiert. Nach Erreichen eines konstanten Druckniveaus wurde das Spray aufgefangen und die entstandene Flüssigkeit in Glasbehältern bei 4°C gelagert bis zur RP-HPLC Analyse. Vor jeder neuen Aerosolisierung wurde die verbleibende Flüssigkeit aus dem System entfernt, um Verdünnungseffekten entgegenzuwirken.

Für die RP-HPLC wurde das Flüssigkeitschromatographiesystem ÄKTAbasic 10 (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mit einer Pumpe P-900, einem Autosampler A-900 mit einer 200 µl Ladeschleife und einem UV-Detektor UV-900 genutzt. Das ganze System wird durch die Datensystemsoftware Unicorn 4.0 (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gesteuert.

Für die Trennung von Icodextrin wurde eine reverse-phase Nucleodur C18 Pyramid Säule mit 125 mm Länge und 4,6 mm Durchmesser, gefüllt mit der stationären Phase, Nucleodur C18 Kieselgel der Korngröße 5 µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland), genutzt. Bei Raumtemperatur und einer UV-Absorption von 210 nm betrug die Retentionszeit von Icodextrin 4,6 Minuten mit einer Flussrate von 0,6 ml/min. Dabei wurde die Substanz in einer isokratischen

mobilen Phase NaCl 0,9% (Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) eluiert. Die gesamte mobile Phase wurde durch einen 0,2µm Nylonfilter (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Deutschland) gefiltert.

Ein externer Standard wurde vorbereitet, indem eine Verdünnungsreihe von Icodextrin 7,5% mit H₂O (Ampuwa, doppelt destilliert und steril, Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und den folgenden Konzentrationen hergestellt wurde: 15,0 mg/ml, 7,5 mg/ml, 3,75 mg/ml, 1,87 mg/ml, 0,93 mg/ml und 0,46 mg/ml. Diese Verdünnungen wurden nacheinander in die 200 µl fassende Ladungsschleife gegeben und gemessen. Die höchste Konzentration (15mg/ml) wurde dabei gemessen, indem 50µl statt 25 µl der 7,5 mg/ml Originallösung hinzugegeben wurden. Im Anschluss wurde die ermittelte Peakfläche der sechs Verdünnungen (mAU*min) gegen die Konzentration (mg/ml) aufgetragen und damit die lineare Regression berechnet. Mithilfe der Unicorn Analysis Module v 4.0 software (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) wurde eine Quantifizierungstabelle erstellt und schließlich verwendet, um die Konzentration der gemessenen Proben zu bestimmen.

2.6 Stabilität von Icodextrin in Kombination mit zwei Chemotherapeutika

Um festzustellen, ob und wie lange eine Kombination von Icodextrin mit Doxorubicin und Cisplatin stabil ist, wurden die Konzentrationen der einzelnen Substanzen in Proben zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 2 h, 6 h, 24 h, 5 d, 10 d, 15 d, 30 d, 60 d, 90 d) bestimmt. Folgende Gruppen wurden dabei getestet:

Tabelle 1: Auf Stabilität getestete Medikamentengruppen

Gruppe	Wirkstoff	Trägerlösung
Test	Doxorubicin [54,2 µg/ml]	Icodextrin [7,27 mg/ml]
Test	Cisplatin [86,2 µg/ml]	Icodextrin [6,71 mg/ml]
Kontrolle	Doxorubicin [54,2 µg/ml]	0,9% NaCl
Kontrolle	Cisplatin [86,2 µg/ml]	0,9% NaCl
Kontrolle	-	Icodextrin [7,5 mg/ml]

Die Proben wurden während des Experiments bei 4°C gelagert und bei Erreichen der spezifischen Zeitpunkte bei -80°C eingefroren. Die Messungen wurden nach dem Auftauen direkt durchgeführt. Doxorubicin und Icodextrin wurden mittels RP-HPLC und Hydrophiler Interaktionschromatographie (HILIC) quantifiziert. Die Hydrophile Interaktionschromatographie (HILIC) ist eine Variante der Normalphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, in der auch polare stationäre Phasen verwendet werden. Die mobile Phase ist bei der HILIC, ähnlich wie bei der RP-HPLC, auch polar. Dadurch ist die Interaktion länger, je polarer eine Substanz ist.

Für die Trennung von Icodextrin und Cisplatin wurde die Nucleodur C18 HILIC Säule mit 125 mm Länge und 4,6 mm Durchmesser, gefüllt mit der stationären Phase, Nucleodur C18 Kieselgel der Korngröße 5 µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Für die Trennung von Icodextrin allein und mit Doxorubicin wurde die reverse-phase Nucleodur C18 Pyramid Säule mit 125mm Länge und 4,6mm Durchmesser, gefüllt mit der stationären Phase, Nucleodur C18 Kieselgel der Korngröße 5 µm (Machery-Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Bei beiden Methoden betrug die Flussrate 0,3 ml/min bei Raumtemperatur. Bei 210 nm UV-Absorption betrug die Retentionszeit von Icodextrin 4,6 min (Nucleodur pyramid) und 4,1 min (Nucleodur HILIC). Dabei wurde bei Icodextrin allein bzw. mit Doxorubicin die Substanz in einer isokratischen mobilen Phase NaCl 0,9% (Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) eluiert. Bei Icodextrin mit Cisplatin wurde die Substanz in einer isokratischen mobilen Phase H₂O (Ampuwa, doppelt destilliert und steril, Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) eluiert. Die gesamte mobile Phase wurde stets durch einen 0,2 µm Nylonfilter (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Deutschland) gefiltert.

Die Konzentrationen der verschiedenen Proben von Icodextrin wurden über die bereits unter 2.5 erläuterten Quantifizierungstabelle berechnet.

Für die Trennung von Doxorubicin wurde eine reverse-phase Nucleodur C18 Pyramid Säule mit 125 mm Länge und 4,6 mm Durchmesser, gefüllt mit der stationären Phase, Nucleodur C18 Kieselgel der Korngröße 5 µm (Machery-

Nagel, Düren, Deutschland) genutzt. Bei Raumtemperatur und einer UV-Absorption von 254 nm betrug die Retentionszeit von Doxorubicin 7,2 min mit einer Flussrate von 0,9 ml/min. Dabei wurde die Substanz in einer mobilen Phase mit 1,44 g SDS/Natriumdodecylsulfat in 500 ml H₂O und 500 ml CH₃CN/Acetonitril eluiert. Die gesamte mobile Phase wurde durch einen 0,2 µm Nylonfilter (Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, Deutschland) gefiltert.

Für die Vorbereitung eines externen Standards wurde eine Verdünnungsreihe von Doxorubicin mit H₂O (Ampuwa, doppelt destilliert und steril, Fresenius KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) und den folgenden Konzentrationen hergestellt und bei 4°C gelagert: 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml, 15,62 µg/ml, 7,81 µg/ml, 3,9 µg/ml. Diese Verdünnungen wurden nacheinander in die 200µl fassende Ladungsschleife gegeben und gemessen. Im Anschluss wurde die ermittelte Peakfläche der Verdünnungen (mAU*min) gegen die Konzentration (µg/ml) aufgetragen und damit die lineare Regression berechnet. Eine Quantifizierungstabelle wurde mithilfe der Unicorn Analysis Module v 4.0 software (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) erstellt und schließlich verwendet, um die Konzentration der gemessenen Proben zu bestimmen.

Cisplatin wurde in einem externen Labor (Dr. Eberhard & Partner, Dortmund) über Atomabsorptionsspektroskopie (AAS; ZEE nit P 650, Analytic Jena AG, Jena, Deutschland) quantifiziert. Die untere Bestimmungsgrenze für Platin betrug 50 ng/ml (Cisplatin 80 ng/ml; Berechnungsfaktor 1,54). In der präanalytischen Validierung konnte in 5% Glucosematrix ein linearer Messbereich zwischen 0,1-100 µg/ml Platin bewiesen werden.

2.7 Zellkultur

Es wurde mit der käuflich erwerblichen, humanen Krebszelllinie MKN45 gearbeitet, die aus einem gering differenzierten Adenokarzinom des Magens einer 62-jährigen Frau isoliert wurde (DSMZ, Braunschweig, Deutschland). Die Magenkrebszelllinie wurde gewählt, weil sie aggressiv metastasierend ist und das Peritoneum mit 32% einer der häufigsten Orte für die Metastasierung von

Magenkrebs ist (Riihimaki et al., 2016). Die Zelllinie wird häufig für verschiedene Modelle der Peritonealmetastasen genutzt (Miwa et al., 2019).

Alle Lösungen und Medien wurden von Gibco/Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland bezogen. Die MKN45 Zellen wurden in 150 cm² Zellkulturflaschen (Falcon, Corning, New York, USA) im Zellkulturmedium RPMI 1640 (1X) + GlutaMax-I mit 10% fetalem Kälberserum (FBS), 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycin und 250 µg/ml Amphotericin B bei 37° C und 5% CO₂ im Inkubator gezüchtet. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums.

An den Zellen wurde die Wirkung der folgenden Medikamentengruppen untersucht:

Tabelle 2: Auf zytotoxische und anti-adhäsive Wirkungen getestete Medikamentengruppen

Gruppe	Wirkstoff	Trägerlösung	Volumen	Wirkstoff	Trägerlösung	Volumen
1	-	0,9% NaCl	50 ml	-	-	-
2	-	Icodextrin [7,5 mg/ml]	50 ml	-	-	-
3	Doxorubicin [54,2 µg/ml]	0,9% NaCl	50 ml	Cisplatin [86,2 µg/ml]	0,9% NaCl	50 ml
4	Doxorubicin [54,2 µg/ml]	Icodextrin [7,5 mg/ml]	50 ml	Cisplatin [86,2 µg/ml]	Icodextrin [7,5 mg/ml]	50 ml

Ausgehend von der gebräuchlichen PIPAC Dosis von Doxorubicin (1,5 mg/m² Körperoberfläche in 50 ml 0,9% NaCl) und Cisplatin (7,5 mg/m² Körperoberfläche in 150ml 0,9% NaCl) kam die in unseren Experimenten verwendete Dosis (s.o.) mit einer Durchschnittskörperoberfläche von 1,76 m² zustande. Diese wurde aus den gemäß der DuBois-Formel errechneten Körperoberflächen einiger Patientinnen und Patienten, die in unserer Klinik behandelt wurden, als Durchschnitt ermittelt. Die Dosis von Cisplatin wurde auf ein Volumen von 50 ml (statt 150 ml) angepasst. Im Sinne des Experiments wurde neben 0,9% NaCl auch Icodextrin [7,5 mg/ml] als Trägerlösung verwendet.

2.8 Zytotoxizitätsassay

Die MKN45 Zellen wurden in 24-Well Mikrotiterplatten (Falcon, Corning, New York, USA) mit einer Konzentration von 6×10^5 Zellen/Well ausgesät und bei 37°C und 5% CO_2 im Inkubator angezüchtet, bis sie zwei Tage später 95%ige Konfluenz erreichten.

Für die Therapie wurde ein 12 mm Doppelballon-Trokar (Kii, Applied Medical, Rancho Santa Margarita, USA) in den Deckel einer Plastikbox mit einem Innenvolumen von etwa drei bis vier Litern eingebaut und befestigt. Die Konstruktion aus Trokar und Plastikbox wurde verschlossen und war komplett isoliert von der Außenatmosphäre, um jegliche externe Kontamination mit Zytostatika zu verhindern (Abb. 3).

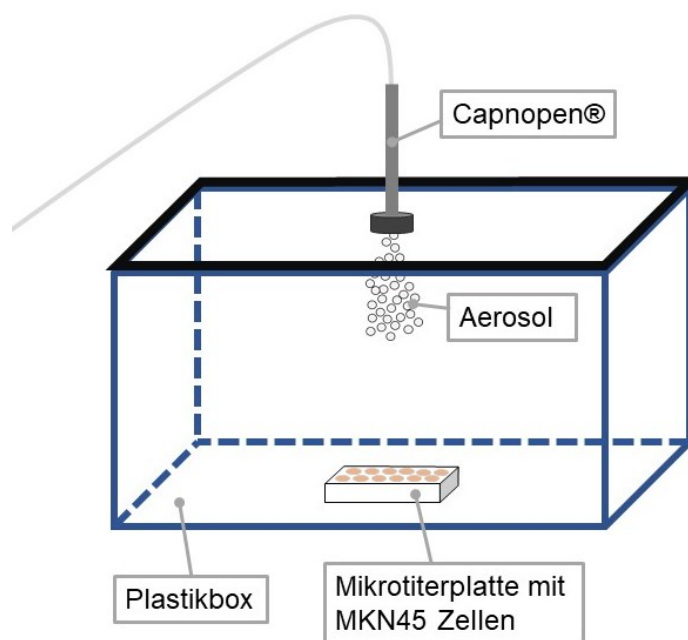


Abbildung 3: Versuchsaufbau *in vitro* PIPAC Therapie: Die Mikrotiterplatte mit den MKN45 Zellen war am Boden der Plastikbox platziert. In der verschlossenen Box erfolgte die Aerosolisierung der jeweiligen Medikamentenkombinationen. Eigene Darstellung.

An Tag 0 wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgesaugt und die Platte mit der Monoschicht Zellen für die PIPAC Therapie am Boden der Plastikbox platziert. Dann wurden 50 ml der Medikamentenlösung mithilfe des Hochdruck-

Kontrastmittelinjektors (Accutron HP-D®, Medtron AG, Saarbrücken, Deutschland) und des laparoskopischen Verneblers Capnopen® (Capnomed, Zimmern o.R., Deutschland) mit einer Flussrate von 0,6 ml/s und einem vorgelagerten Druck von über 11 bar aerosolisiert. Anschließend wurden die behandelten Zellen noch dreißig Minuten bei Raumtemperatur in der verschlossenen Box belassen. In den Gruppen 3 und 4 erfolgte die Behandlung sequenziell, zuerst fand die Aerosolisierung von Doxorubicin statt, im Anschluss folgte Cisplatin. Nach der Behandlung wurden die Mikrotiterplatten gereinigt und überschüssige Flüssigkeit wurde unter einer zytostatischen Schutzhaube abgesaugt. Die Wells wurden erneut mit 2 ml Zellkulturmedium gefüllt, welches an den Tagen 2, 4 und 6 erneuert wurde.

Die Morphologie der behandelten Zellen wurde an den Tagen 2, 4 und 7 mit der Leica MC170 HD-Kamera (Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz) dokumentiert. Die Zellzahl und Zellvitalität wurden an den Tagen 0, 2, 4 und 7 objektiv mithilfe von dem CASY® Cell Counter und Analyzer (Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) ermittelt. Die CASY® Technologie funktioniert nach dem Coulter Prinzip. Das heißt, die Zellzählung erfolgt im Durchflussprinzip durch Messung der Widerstandsänderung beim Durchtritt der Zelle durch eine Kapillare in der elektrisch leitenden CASYton-Flüssigkeit. Die Änderung des elektrischen Widerstands ist dabei proportional zur Größe der Zelle. Wenn Zellen sterben, verliert die Zellmembran an Integrität, die Durchlässigkeit steigt. Damit sinkt der gemessene Widerstand auf das, was die verbleibende Kernhülle der Zelle verdrängt. So können über das Zellvolumen die Zellzahl und Zellvitalität bestimmt werden. Außerdem wird, sofern Aggregate auftreten, auch deren Volumen bestimmt und über das Aggregatvolumen kann auf die wahre Anzahl individueller Zellen zurückgerechnet werden.

Für die CASY-Messung wurden die Zellen an Tag 0 und 2 mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl 0,05% Trypsin-EDTA abtrypsinisiert. An den Tagen 4 und 7 wurden die Zellen zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl 0,05% Trypsin-EDTA vom Boden der Platte gelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde durch das Hinzufügen von 750 µl Zellkulturmedium unterbunden. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 2 ml Polyethylen

Fläschchen überführt und bei niedriger Geschwindigkeit für eine Stunde in einem Überkopffrotator geschüttelt. Dann wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton gelöst. Das Gerät wurde in dem 3 x 400 µl Modus betrieben, das heißt, 400 µl der gelösten Zellsuspension (Verdünnung 1:100 in CASYton) wurden dreimal genutzt, um die Zellzahl in den 24-Well Mikrotiterplatten zu bestimmen. Im Falle eines hohen Aggregationsfaktors der Proben wurde dieser mithilfe eines errechneten, durchschnittlichen Aggregationsfaktor normalisiert. Um die Wirkung der Medikamente auf das Zellüberleben zu evaluieren, erfolgte ein Vergleich des Zellwachstums bei den behandelten Gruppen mit einer Kontrollgruppe, welche sieben Tage im Zellkulturmedium ohne Behandlung gezüchtet wurde.

2.9 Adhäsionsassay

Die MKN45 Zellen einer 150 cm² Zellkulturflasche wurden mit 13 ml PBS gewaschen und anschließend mit 7 ml 0,05% Trypsin-EDTA abgelöst. Nach zehn Minuten wurde das Abtrypsinieren mit RPMI 1640 (1X) + GlutaMax-I Medium + 5% BSA gestoppt. Die Zellsuspension wurde zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden vier verschiedene Zellsuspensionen mit den verschiedenen Medikamentengruppen hergestellt. Mithilfe einer kolorimetrischen Methode wurde die Adhäsion der Zellen untersucht (ECM Cell Adhesion Array Kit, EMD Millipore Corp., Billerica MA, USA). Dafür wurden die vier verschiedenen Zellsuspensionen in der Konzentration 2.0×10^5 Zellen/Well jeweils in eine unbeschichtete 96-Well Mikrotiterplatte und in die mit Extrazellulärmatrixproteinen beschichtete 96-Well Mikrotiterplatte des Herstellers ausgesät. Der Adhäsionsassay wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Das bedeutet, zuerst wurde jede Platte zwei Stunden bei 37°C in einem CO₂ Inkubator inkubiert. Im Anschluss wurde die therapeutische Lösung vorsichtig abgesaugt, jedoch wurde stets ein Rest belassen, damit die Wells nicht trockneten. Danach wurde jedes Well mit 100 µl Testpuffer vorsichtig gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 100 µl Kristallviolett-Zellfärbelösung fünf Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Dann wurde das Färbemittel wieder entfernt und die Wells mit demineralisiertem Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang trockneten die Wells für ein paar Minuten, dann wurden 100 µl Extraktionspuffer hinzugefügt. So wurden die Probestreifen für ca. zehn

Minuten bei Raumtemperatur auf einem Orbitalschüttler inkubiert und geschüttelt, bis die zellgebundene Färbelösung komplett im Extraktionspuffer gelöst war. Die Absorption wurde bei 560 nm mit dem NanoQuant Infinite M200 Pro microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich) bestimmt.

2.10 Maßnahmen zum Arbeitsschutz

Die hier beschriebenen Experimente tragen ein potenzielles Expositionsrisiko gegenüber chemotherapeutischen Substanzen für Mitarbeitende des Labors. Das Labor ist ausgestattet und zertifiziert für die Manipulation toxischer Aerosole, alle miteinbezogenen Mitarbeitenden sind vorab geschult worden. Alle Sprühversuche wurden unter einer Sicherheitsarbeitsbank der Klasse 3, die für die Manipulation toxischer Aerosole zertifiziert ist, durchgeführt. Die Experimente wurden so in Übereinstimmung mit Sicherheitsrichtlinien und gesetzlichen Bestimmungen in Deutschland durchgeführt.

2.11 Statistische Analyse

Die deskriptive Statistik wird dargestellt als Konfidenzintervalle 5-95%. Die komparative Statistik wurde mithilfe nicht-parametrischer Tests und der SPSS software v.25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

Das allgemeine Ziel dieser Studie war es, die Eignung von Icodextrin allein und als Trägerlösung chemotherapeutischer Substanzen für die intraperitoneale Applikation als PIPAC-Aerosol *in vitro* zu prüfen.

Die spezifischen Fragen dabei waren, ob Icodextrin sprühbar ist, welche Eigenschaften das Icodextrin-Aerosol hat und ob das Molekül während der Aerosolisierung und danach stabil bleibt. Außerdem war zu klären, ob und wie lange die Kombination aus Icodextrin mit Cisplatin und Doxorubicin chemisch stabil bleibt und welche zytotoxischen und anti-adhäsiven Einflüsse die Kombination *in vitro* zeigt.

Die Annahme war, dass Icodextrin mit der PIPAC-Technologie aerosolisiert werden kann und Icodextrin als Trägerlösung mit Chemotherapie kombiniert werden kann, um Synergien zwischen seinen anti-adhäsiven und deren zytotoxischen Effekten gegenüber Tumorzellen zu generieren.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Verabreichung von Icodextrin als intraperitoneales Aerosol (PIPAC) möglich und eine Kombination von Icodextrin mit Chemotherapeutika (Cisplatin und Doxorubicin) vielversprechend ist. Nachfolgend werden die Ergebnisse im Einzelnen erläutert.

3.1 Granulometrie

Um die Eigenschaften des Aerosols zu untersuchen, wurden granulometrische Analysen des Aerosols von Icodextrin bei vier verschiedenen Konzentrationen (1%, 2,5%, 5%, 7,5%) mittels Laserdiffraktometrie (Spraytec® Malvern, Herrenberg, Deutschland) durchgeführt.

Die granulometrischen Analysen nach Vernebelung von Icodextrin zeigten bei allen Konzentrationen (1%, 2,5%, 5%, 7,5%) ein monodisperses Aerosol. Das Aerosol von 7,5% Icodextrin hatte einen medianen aerodynamischen Tropfendurchmesser ($Dv(50)$) von 35,7 μm , das heißt, 50% des Gesamtvolumens wurde in Tropfen $<35,7 \mu\text{m}$ versprüht. Die Tropfengröße variierte dabei mit weiterer Verdünnung nicht beachtlich (Abb. 4, Feld a).

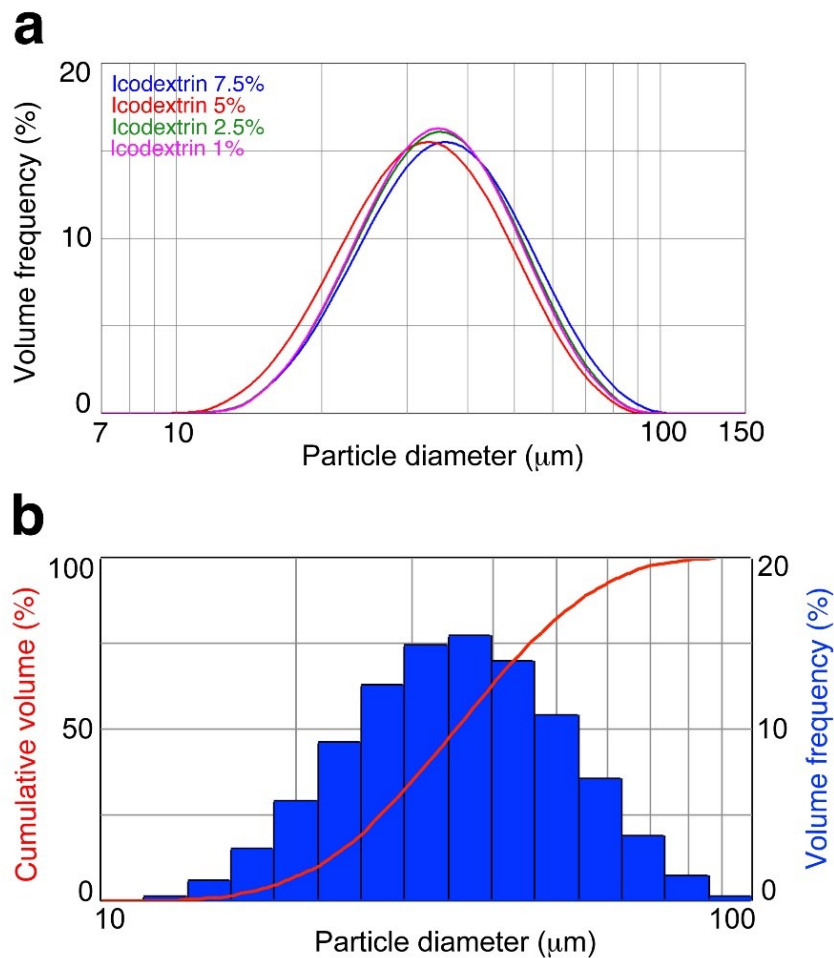


Abbildung 4: Granulometrische Charakteristika des mit der Capnopen® Technologie generierten Icodextrin-Aerosols. Feld a: Medianer Tropfendurchmesser des Aerosols (MAD) verschiedener Icodextrin-Konzentrationen. Der MAD liegt zwischen 32 und 36 μm und variiert nicht beachtlich zwischen den verschiedenen Icodextrin Konzentrationen. **Feld b:** Volumenhäufigkeit bei dem 7,5% Icodextrin-Aerosol abhängig von der Tropfengröße (blaue Säulen) und dem kumulativen Volumen (rote Kurve). Das Aerosol ist monodispers. Aus Keck et al. (2021)

3.2 Stabilität von Icodextrin vor und nach Aerosolisierung

Es wurde untersucht, inwieweit das Polymer Icodextrin durch die Aerosolisierung verloren geht bzw. degradiert wird. Zu diesem Zweck wurde eine semi-quantitative Bestimmung von Icodextrin mittels RP-HPLC vor und nach der Aerosolisierung durchgeführt und die ermittelten HPLC-Profile und Konzentrationen verglichen.

Die HPLC zeigte ein Peak nach 4,54 Minuten Migration, entsprechend der Substanz Icodextrin (Abb. 5, Feld a). Es zeigte sich keine signifikanten Unterschiede in der Icodextrin-Konzentration vor und nach Aerosolisierung, und auch nicht bei unterschiedlichen Konzentrationen (Abb. 5, Feld b).

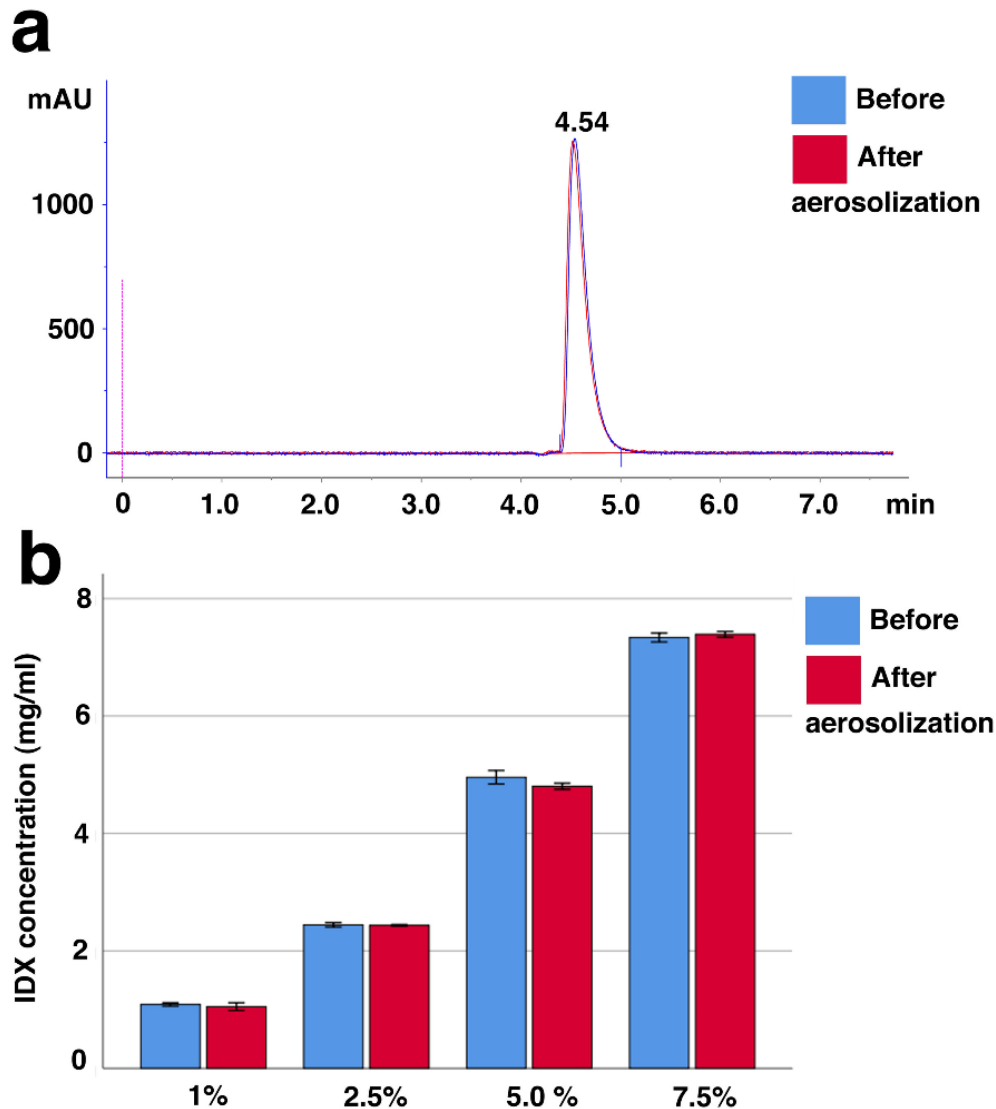


Abbildung 5: RP-HPLC Analyse von Icodextrin vor und nach Aerosolisierung als PIPAC.

Feld a: Qualitative Messung von Icodextrin 7,5%. Exemplarisches HPLC-Profil einer Messung

vor (blau) und nach (rot) der Aerosolisierung. Es gibt keine signifikante Modifikation oder

Degradierung der Substanz. **Feld b:** Quantitative Bewertung. Durchschnittliche Konzentration

(mit 95% Konfidenzintervall) jeder Verdünnung vor (blau) und nach (rot) der Aerosolisierung,

bestimmt via RP-HPLC. Es gibt keinen signifikanten Verlust der Substanz durch Aerosolisierung

($n=3$, ANOVA, $p=0,97$). Aus Keck et al. (2021)

Icodextrin wurde bei den signifikanten Scherkräften, die zur Aerosolisierung ausgeübt wurden, nicht degradiert. Das Icodextrin-Polymer blieb bei den Konzentrationen 7,5%, 5%, 2,5% und 1% während und nach der Aerosolisierung stabil. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Capnopen® Technologie geeignet ist, eine Icodextrin-Lösung wirksam zu aerosolisieren.

3.3 Stabilität der Kombination von Icodextrin mit Chemotherapeutika

Es wurde untersucht, ob eine Kombination von Icodextrin mit Cisplatin und Doxorubicin eine Degradierung des Glucosepolymers Icodextrin oder der chemotherapeutischen Substanzen (Cisplatin und Doxorubicin) verursacht. Dafür wurden Icodextrin und Doxorubicin über Säulentrennung (RP-HPLC und HILIC) quantifiziert und die Konzentration von Cisplatin über Spektrometrie (AAS) bestimmt.

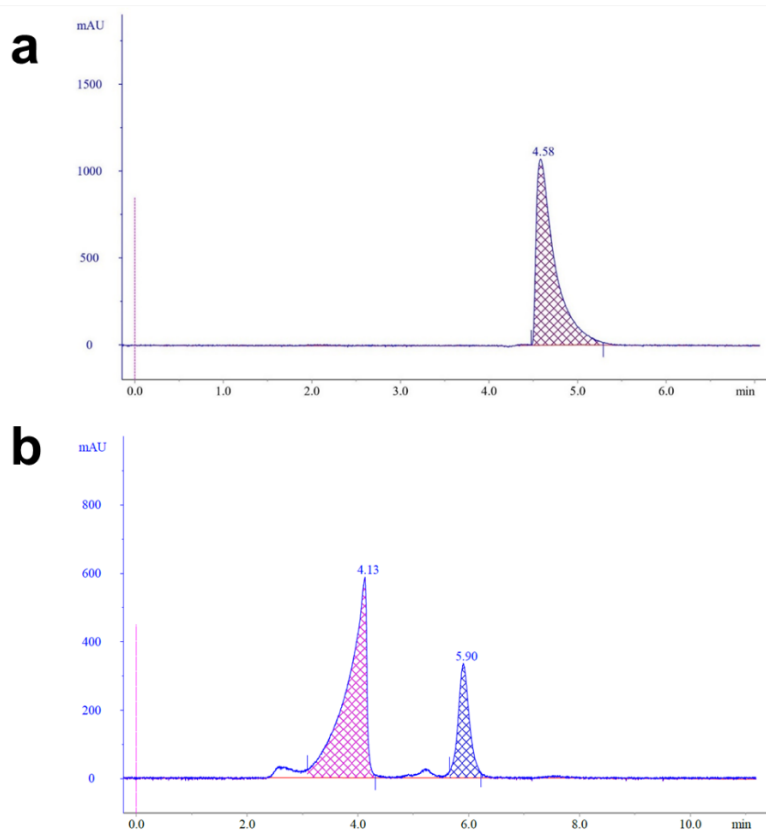


Abbildung 6: Trennung von Icodextrin.

Feld a: Trennung von Icodextrin auf Nucleodur Pyramid Säule bei 210 nm. **Feld b:** Trennung Icodextrin und Cisplatin auf Nucleodur HILIC Säule bei 210 nm. Der erste Peak bei 4,13 min entspricht Icodextrin, der zweite Peak bei 5,9 min entspricht Cisplatin. Eigene Darstellung.

Icodextrin wurde mittels zwei verschiedenen Trennungsmethoden quantifiziert. Dies erfolgte isoliert beziehungsweise mit Doxorubicin auf der Nucleodur C18 Pyramid Säule, sowie in Kombination mit Cisplatin auf der Nucleodur C18 HILIC Säule (Abb. 6). Dem lag zugrunde, dass Icodextrin und Cisplatin beide bei 210 nm UV-Absorption detektiert werden und sich auf der Nucleodur C18 Pyramid Säule übereinander lagerten. Auf der Nucleodur C18 HILIC Säule ließen sich die beiden Substanzen separat darstellen und somit einzeln sicher nachweisen.

In Abb. 7 ist die Quantifizierung von Doxorubicin dargestellt.

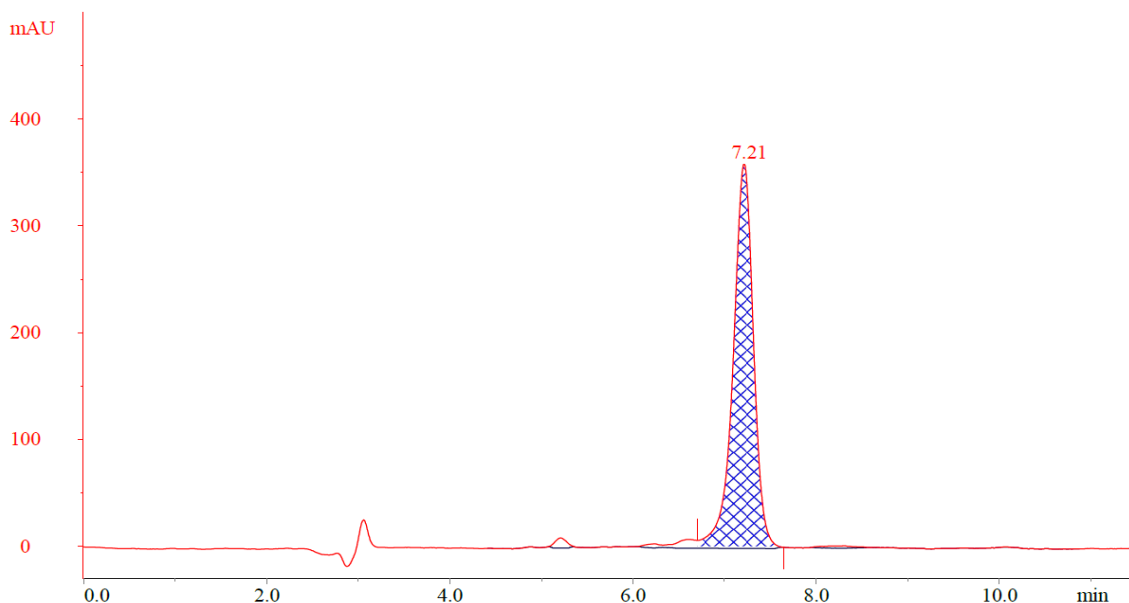


Abbildung 7: Trennung von Doxorubicin. *Doxorubicin ist detektierbar auf der Nucleodur Pyramid Säule bei 254 nm nach 7,21 min. Eigene Darstellung.*

Die Quantifizierung zu den verschiedenen Zeiträumen ergab Konzentrationsverläufe, die nachfolgend dargestellt sind. Da die Ausgangskonzentration teilweise unterschiedlich war, wird zur besseren Anschaulichkeit der Ergebnisse neben der Konzentration in mg/ml bzw. µg/ml die Konzentration auch in Relation zur Ausgangskonzentration dargestellt.

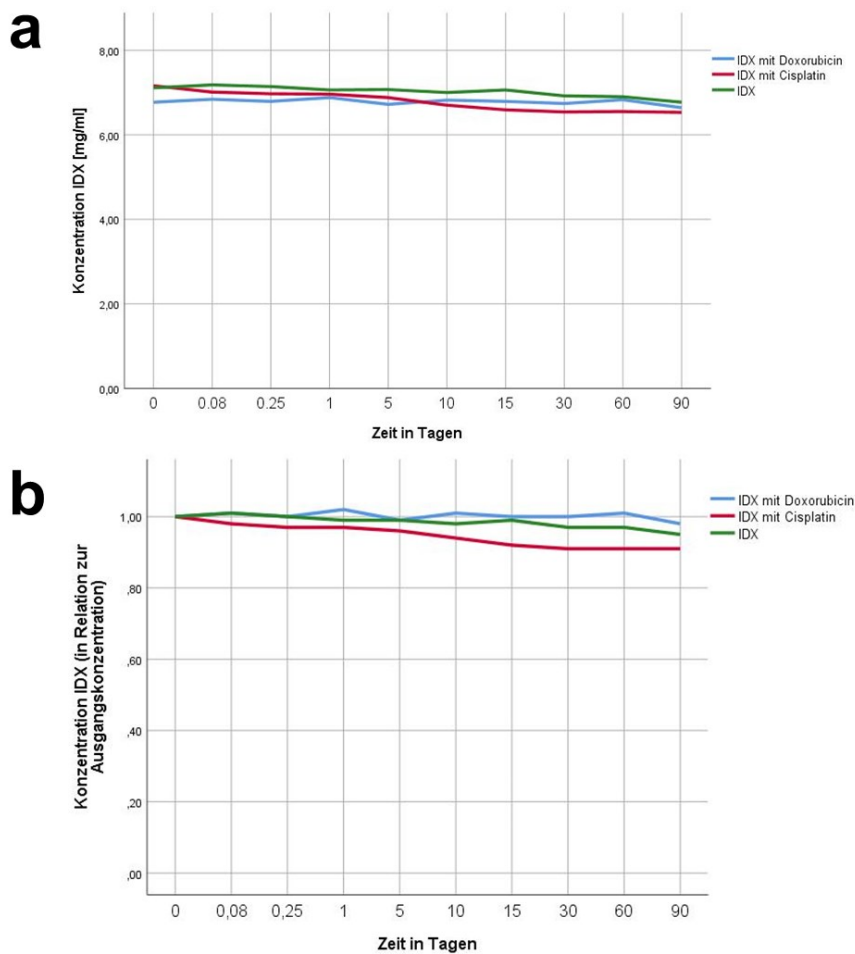


Abbildung 8: Kurzzeitdaten zur Stabilität von IDX (Icodextrin). **Feld a:** Die Daten sind als Konzentration von Icodextrin dargestellt. **Feld b:** Die Daten sind als Konzentration von Icodextrin in Relation zur Ausgangskonzentration der Stammlösung zum Zeitpunkt 0 dargestellt. Die grüne Linie stellt Icodextrin allein dar, die blaue Linie zeigt Icodextrin in Kombination mit Doxorubicin, die rote Linie ist Icodextrin in Kombination mit Cisplatin, jeweils über neunzig Tage bei einer Temperatur von 4°C. In Teilen aus Keck et al. (2021)

Kurzfristig (nach zwei Stunden) gab es bei Icodextrin sowohl allein als auch in Kombination mit Doxorubicin keine Degradierung, in Kombination mit Cisplatin war eine diskrete Degradierung von 2,09% nachweisbar. Nach 24 Stunden konnte Icodextrin in Kombination mit Doxorubicin weiterhin in gleichbleibenden Konzentrationen bestimmt werden, für Icodextrin allein gab es zu diesem Zeitpunkt lediglich eine minimale Degradierung von 0,7%, für Icodextrin mit Cisplatin konnte zu diesem Zeitpunkt eine Degradierung von 2,8% nachgewiesen werden. Nach dreißig Tagen blieb für Icodextrin mit Doxorubicin die

Degradierung mit 0,44% minimal, für Icodextrin allein war die Degradierung etwas höher (2,7%); für Icodextrin mit Cisplatin betrug die Degradierung 8,7%. Abschließend nach neunzig Tagen betrug die Degradierung für Icodextrin mit Doxorubicin 1,9%, für Icodextrin allein 4,8% und für Icodextrin mit Cisplatin 8,8%. Der Unterschied zwischen den Gruppen war signifikant (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

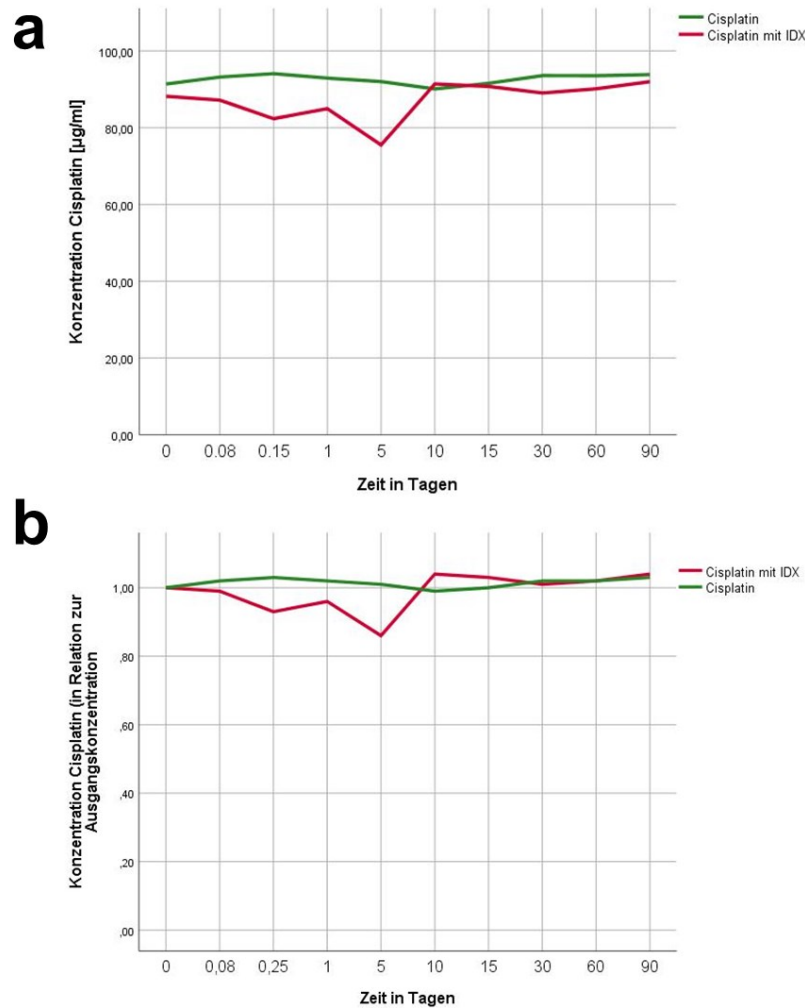


Abbildung 9: Kurzezeitdaten zur Stabilität von Cisplatin.

Feld a: Die Daten sind als Konzentration von Cisplatin dargestellt. **Feld b:** Die Daten sind als Konzentration von Cisplatin in Relation zur Ausgangskonzentration der Stammlösung zum Zeitpunkt 0 dargestellt. Die grüne Linie stellt Cisplatin allein dar, die rote Linie zeigt Icodextrin in Kombination mit Icodextrin, jeweils über neunzig Tage bei einer Temperatur von 4°C. Eigene Darstellung.

Weiter wurde die Degradierung von Cisplatin, in einer Cisplatin-Kochsalzlösung oder in Kombination mit Icodextrin untersucht. Nach zwei Stunden war keine

Degradierung von Cisplatin in 0,9% NaCl nachweisbar. In Kombination mit Icodextrin war die Degradierung nach zwei Stunden mit 1,1% minimal. Nach 24 Stunden war weiterhin keine Degradierung von Cisplatin mit NaCl nachweisbar, in Kombination mit Icodextrin betrug die Degradierung 3,6%. Nach dreißig Tagen sowie nach neunzig Tagen war weder für Cisplatin mit NaCl noch für Cisplatin in Kombination mit Icodextrin eine Degradierung nachweisbar. Insgesamt war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Cisplatin mit oder ohne Icodextrin) nicht signifikant.

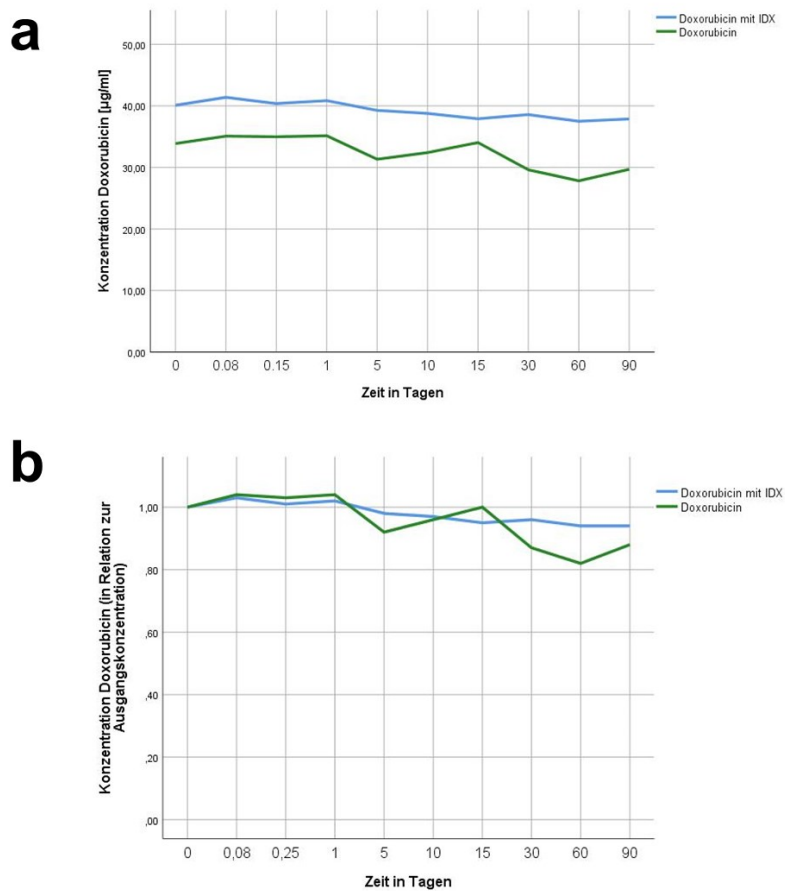


Abbildung 10: Kurzeitdaten zur Stabilität von Doxorubicin.

Feld a: Die Daten sind als Konzentration von Doxorubicin dargestellt. **Feld b:** Die Daten sind als Konzentration von Doxorubicin in Relation zur Ausgangskonzentration der Stammlösung zum Zeitpunkt 0. Die grüne Linie stellt Doxorubicin allein dar, die blaue Linie zeigt Doxorubicin in Kombination mit Icodextrin, jeweils über neunzig Tage bei einer Temperatur von 4°C. Eigene Darstellung.

Es wurde noch die Degradierung einer Doxorubicin-Kochsalzlösung, allein oder in Kombination mit Icodextrin, evaluiert. Wie bei Cisplatin war auch bei Doxorubicin mit NaCl sowie Doxorubicin in Kombination mit Icodextrin nach zwei sowie 24 Stunden keine nennenswerte Degradierung nachweisbar. Nach dreißig Tagen gab es für Doxorubicin allein eine Degradierung von 12,6%, für Doxorubicin mit Icodextrin war die Degradierung mit 3,8% niedriger, was eine stabilisierende Wirkung von Icodextrin suggeriert. Auch nach neunzig Tagen blieb die Degradierung von Doxorubicin in Assoziation mit Icodextrin niedriger (5,6%) als in Kochsalzlösung (12,4%). Insgesamt war der Unterschied zwischen den Gruppen (Doxorubicin mit vs. ohne Icodextrin) nicht signifikant.

3.4 Zytotoxizitätsassay

Neben pharmakologischen Aspekten (siehe oben) wurde auch die biologische Wirkung von Icodextrin, allein oder in Kombination mit Zytostatika, *in vitro* untersucht. Im Rahmen dieses Experimentes wurde ein potenzieller zytotoxischer Effekt verschiedener PIPAC-Aerosole auf eine MKN45 Zellkultur geprüft. Dafür wurde das Zellüberleben sieben Tage lang nach erfolgter PIPAC-Therapie mittels Zellzahl und Zellvitalität gemessen und die Zellmorphologie dokumentiert. Die Zellen wurden dabei mit PIPAC-Aerosolen von NaCl und Icodextrin, mit und ohne Chemotherapeutika (Cisplatin und Doxorubicin), behandelt. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt keine PIPAC-Therapie, gemessen wurde das reine Zellüberleben in Zellkulturmedium.

Nach Aerosolisierung hatte Icodextrin keinen intrinsischen zytotoxischen Effekt auf humane MKN45 Magenkrebszellen. In Kombination mit zwei ausgewählten chemotherapeutischen Substanzen (Doxorubicin und Cisplatin) beeinträchtigte Icodextrin die zytotoxische Wirkung der Substanzen nicht.

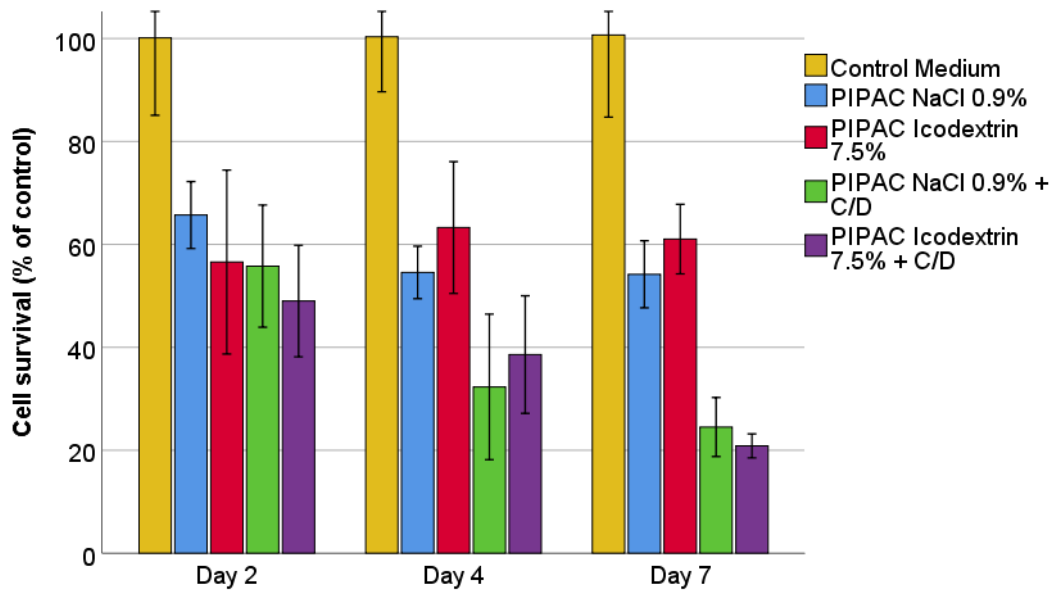


Abbildung 11: Zytotoxische Wirkung von Icodextrin und Chemotherapeutika auf MKN45 unter PIPAC. Das Zellüberleben ist in % des Zellüberlebens in Zellkulturmedium über sieben Tage (Kontrollgruppe, gelb) dargestellt. Die verschiedenen PIPAC Therapiegruppen sind: 1. NaCl [0,9%] (blau) 2. Icodextrin [7,5%] (rot) 3. Doxorubicin [0,054 mg/ml] und Cisplatin [0,09 mg/ml] in NaCl [0,9%] (grün) 4. Doxorubicin [0,054 mg/ml] und Cisplatin [0,09 mg/ml] in Icodextrin [7,5%] (lila). Aus Keck et al. (2021)

Das Zellwachstum nach Behandlung durch Aerosolisierung von NaCl mittels PIPAC (blaue Säule) wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe (gelbe Säulen) signifikant reduziert (ANOVA, $p < 0,001$). Das Icodextrin-Aerosol (rote Säule) hatte im Vergleich zum NaCl-Aerosol (blaue Säule) keinen zusätzlichen zytotoxischen Effekt (ns). Die PIPAC-Therapie mit Cisplatin und Doxorubicin mit NaCl reduzierte das Zellwachstum signifikant (grüne Säule, $p = 0,007$), ebenso wie die Therapie mit Cisplatin, Doxorubicin und Icodextrin als Trägerlösung (lila Säule, $p = 0,002$). Hingegen hatte das Hinzufügen von Icodextrin keine eigene, zusätzliche zytotoxische Wirkung (ns).

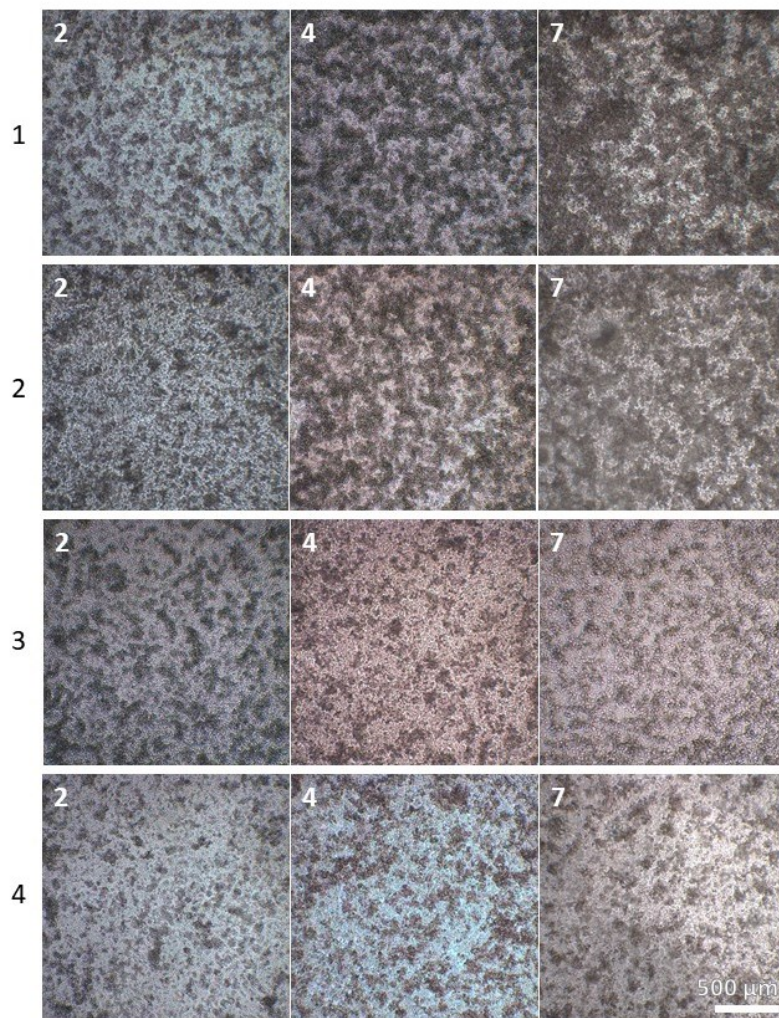


Abbildung 12: Morphologie der MKN45 Zellen im Verlauf der Therapie (Tag 2, 4 und 7). 1. Gruppe 0,9% NaCl: Die Zellzahl nimmt von Tag 2 bis Tag 7 zu. Das Wachstum ist im Verlauf zunehmend dreidimensional. 2. Gruppe 7,5% Icodextrin: Die Zellzahl nimmt von Tag 2 bis Tag 7 zu. Auch hier ist das Wachstum im Verlauf zunehmend dreidimensional. 3. Gruppe Doxorubicin [0,054 mg/ml] und Cisplatin [0,09 mg/ml] in 0,9% NaCl: Kein Zellwachstum in den Tagen 2-7 4. Gruppe Doxorubicin [0,054 mg/ml] and Cisplatin [0,09 mg/ml] in 7,5% Icodextrin: Kein Zellwachstum in den Tagen 2-7. Eigene Darstellung.

3.5 Adhäsionsassay

Die Effekte der Substanz Icodextrin mit und ohne Chemotherapeutika (Cisplatin und Doxorubicin) auf die Adhäsion einer MKN45-Zellkultur wurden mit einem Adhäsionsassay auf einer unbeschichteten Mikrotiterplatte und auf einer mit Extrazellulärmatrixproteinen beschichteten Mikrotiterplatte bestimmt.

Auf der unbeschichteten 96-Well Mikrotiterplatte konnte ein signifikanter anti-adhäsiver Effekt auf die humane MKN45 Magenkrebszellkultur *in vitro* durch Icodextrin im Vergleich zur Kontrolle mit NaCl ($p=0.03$) festgestellt werden. Ebenso wirkte die Kombination Cisplatin, Doxorubicin und Icodextrin im Vergleich zur Kontrolle mit NaCl statt Icodextrin anti-adhäsiv ($p=0.02$). Die anti-adhäsive Wirkung von Icodextrin kam sowohl in der Testgruppe 2 als auch 4 ohne signifikanten Unterschied zur Geltung. Daraus ist zu folgern, dass die Chemotherapeutika Cisplatin und Doxorubicin die anti-adhäsive Wirkung von Icodextrin hier nicht beeinträchtigen.

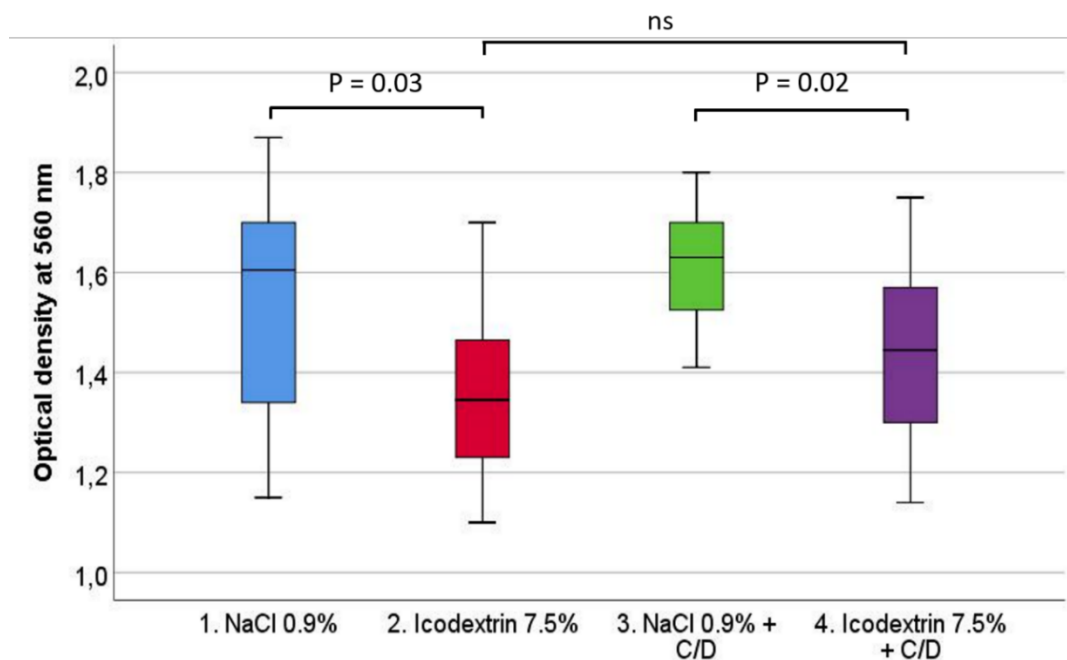


Abbildung 13: Wirkung von Icodextrin, untersucht im Adhäsionsassay. Dargestellt ist die optische Dichte der Wells, die mit dem Mikroplattenreader bestimmt wurde. Diese korreliert mit der Anzahl der adhären, angefärbten Zellen. Icodextrin allein reduzierte die Adhäsion der MKN45 Zellen, ebenso wie Icodextrin als Trägerlösung für die zytotoxische Substanzen C/D (Cisplatin und Doxorubicin). Der Test wurde auf einer unbeschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte mit 16 Messungen pro Gruppe durchgeführt. Aus Keck et al. (2021)

Auf der mit Extrazellulärmatrixproteinen beschichteten Platte waren die Ergebnisse nicht eindeutig. Je nach Protein gab es Unterschiede in der Adhäsion der MKN45 Zellen der unterschiedlichen Therapiegruppen auf der Mikrotiterplatte

beziehungsweise der Extrazellulärmatrix (Abb. 14). Auf Collagen Typ 1 war die Adhäsion der mit Icodextrin behandelten Zellen höher als die der mit NaCl behandelten Zellen. Jedoch war in Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin eine Reduktion der Adhäsion der MKN45 Zellen durch Icodextrin im Vergleich zu NaCl zu sehen. Ähnliche Ergebnisse waren auf Collagen Typ 2 und Typ 4 zu beobachten, sowie auch bei Tenascin, dort jedoch mit geringeren Differenzen. Auf Fibronectin war eine Adhäsionsverstärkung durch Icodextrin im Vergleich zu NaCl, sowohl isoliert als auch in Kombination mit Chemotherapie, auffällig.

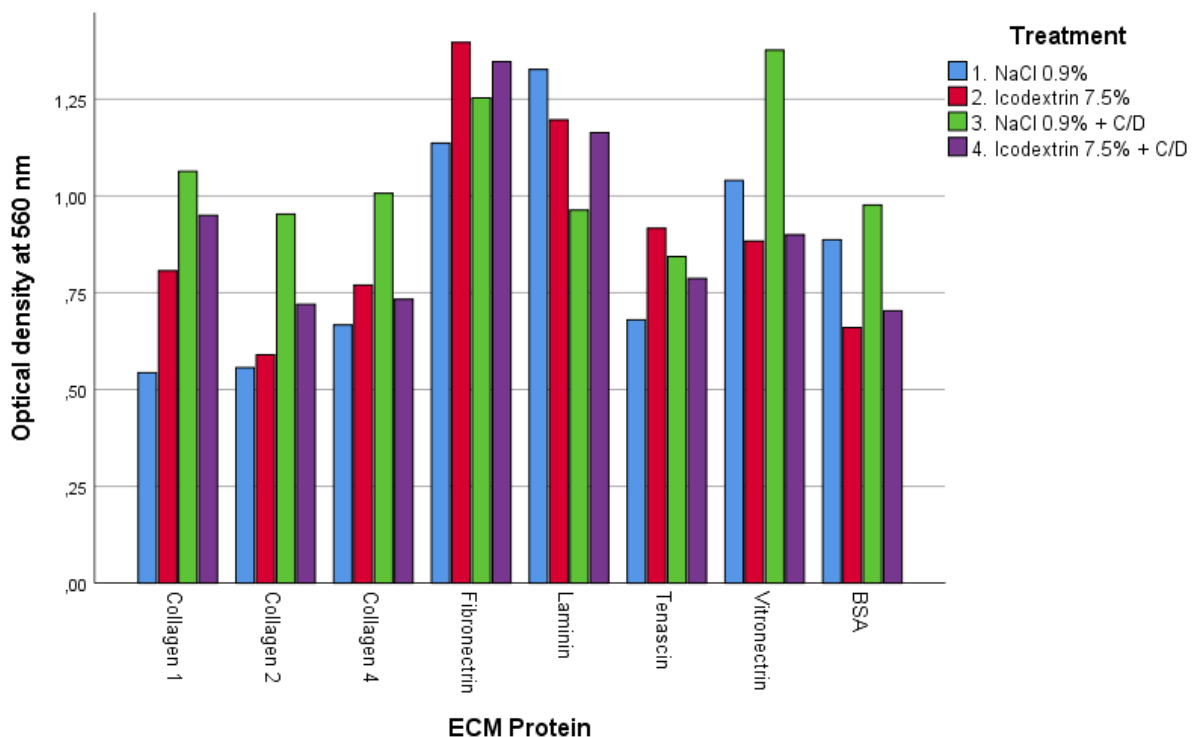


Abbildung 14: Wirkung von Icodextrin, untersucht im Adhäsionsassay auf Extrazellulärmatrixproteinen. Dargestellt ist die optische Dichte der Wells, die mit dem Mikroplattenreader bestimmt wurde. Diese korreliert mit der Anzahl der adhären, angefärbten Zellen. Der Test wurde auf einer beschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte mit drei Messungen pro Gruppe durchgeführt. Eigene Darstellung.

Auf Laminin war die Adhäsion der mit Icodextrin behandelten Zellen niedriger als die der mit NaCl behandelten Zellen. Dagegen war in Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin eine Steigerung der Adhäsion der MKN45 Zellen durch Icodextrin im Vergleich zu NaCl erkennbar. Auf Vitronectin und BSA wurde die Adhäsion der MKN45 Zellen durch Icodextrin sowohl allein als auch in Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin im Vergleich zu NaCl reduziert. Die

Ergebnisse auf der mit Extrazellulärmatrixproteinen beschichteten Mikrotiterplatte sind nur teilweise kohärent zu den Ergebnissen auf der unbeschichteten Mikrotiterplatte. Darauf wird in der Diskussion näher eingegangen.

4. Diskussion

In dieser Studie wurde die Eignung von Icodextrin allein und als Trägerlösung chemotherapeutischer Substanzen für die intraperitoneale Applikation als PIPAC analysiert. Die Sprühbarkeit von Icodextrin bei verschiedenen Konzentrationen wurde geprüft und das Aerosol auf seine Eigenschaften untersucht. Außerdem wurde die Stabilität des Moleküls nach Aerosolisierung kontrolliert. Weiterhin wurde die chemische Stabilität von Icodextrin, Cisplatin und Doxorubicin je allein und in der Kombination getestet. Die Eigenschaften dieser Kombination wurden untersucht. Eine mögliche Synergie der Effekte vom aerosolisierten Icodextrin in Kombination mit zwei gängigen zytotoxischen Substanzen (Cisplatin und Doxorubicin) wurde erforscht. Die Wirkung von Icodextrin mit und ohne Chemotherapeutika (Doxorubicin und Cisplatin) auf die Adhäsion humaner Magenkrebszellen *in vitro* auf eine unbeschichtete Mikrotiterplatte und auf verschiedene Extrazellulärmatrixproteine wurde evaluiert.

4.1 Einsatz von Icodextrin als Aerosol

Bisherige Arbeiten legen nahe, dass PIPAC eine generische Applikationsform für Medikamente ist, die ein breites Spektrum von Substanzen abgeben kann. Bei der PIPAC wurden bislang hauptsächlich zwei verschiedene Medikamente in der Klinik angewendet: Cisplatin in Kombination mit Doxorubicin und Oxaliplatin als Monotherapie (Alyami et al., 2019). Inzwischen gibt es auch die ersten Studien zur Aerosolisierung von Biomolekülen wie mRNA (Shariati et al., 2019) und sogar lebende Organismen wie Bakterien (Mikolajczyk et al., 2018). Die Substanz Icodextrin wurde bisher in flüssiger Form eingesetzt, zum Einsatz als Aerosol bzw. PIPAC gibt es bislang keine Untersuchungen. In dieser Arbeit wird eine Aerosolisierung von Icodextrin zum ersten Mal demonstriert.

Die Datenlage aus vorangegangenen Studien zu verschiedenen Flüssigkeiten zeigt, dass das Aerosol, das mit der Capnopen® Technologie generiert wird, aus einem bimodalen, volumengewichteten Partikelgrößenverteilung mit einem medianen Tropfendurchmesser von $x_{50,3} = 25 \mu\text{m}$ besteht, also 50% der Tropfen unter und 50% der Tropfen über diesem Wert liegen (Gohler et al., 2017). Die mediane Tropfengröße ist relevant, da sie die Art und Weise der Ablagerung und

die Homogenität der Verteilung der therapeutischen Substanz in der Peritonealhöhle bestimmt (Gohler et al., 2017). Unsere Experimente zeigen, dass es möglich war, die Icodextrin Lösung bei verschiedenen Konzentrationen (1%, 2,5%, 5%, 7,5%) zu aerosolisieren. Das generierte Icodextrin-Aerosol erfüllt die Erwartungen an die mediane Tropfengröße. Diese verändert sich nicht signifikant bei steigender Konzentration, was den klinischen Einsatz verschiedener Konzentrationen prinzipiell ermöglicht. Außerdem hält Icodextrin den durch den Vernebler hervorgerufenen Scherkräften stand und bleibt nach der Aerosolisierung als Polymer stabil. Es kommt nicht zum Verlust oder zur Degradierung des Icodextrin-Polymers durch den Sprühvorgang. Deswegen kann die Substanz nach dem Sprühvorgang ihre Wirkungen uneingeschränkt entfalten. Damit sind erste Voraussetzungen der Anwendung von Icodextrin als Aerosol im Rahmen von PIPAC erfüllt.

4.2 Stabilität der Kombination Cisplatin, Doxorubicin mit Icodextrin

Cisplatin und Doxorubicin wurden als chemotherapeutische Substanzen für die Kombination mit Icodextrin gewählt, weil diese beiden Wirkstoffe sowohl bei HIPEC (Van der Speeten et al., 2017) und auch bei PIPAC (Alyami et al., 2019) etabliert sind. Voraussetzung für eine Medikamentenkombination aus Trägerlösung und Chemotherapie muss jedoch stets die Stabilität der einzelnen Substanzen in der Kombination sein (Rau et al., 2018). Andere Medikamente, die häufig mit Icodextrin kombiniert werden, sind vor allem Antibiotika, zu denen bereits einige Stabilitätsstudien vorliegen (Ranganathan et al., 2016). Die Stabilität von Icodextrin wurde in diesen Studien bislang jedoch nicht untersucht, weswegen auch der Konzentrationsnachweis von Icodextrin über HPLC im Rahmen dieser Studie zum ersten Mal erbracht wurde. Die Stabilität von Doxorubicin und Cisplatin wurde vor allem in Kurzzeitstudien (unter dreißig Tage) schon genauer untersucht, für Doxorubicin liegen auch Langzeitdaten (124 Tage in Polypropylen-Behältern) vor (Vigneron et al., 2013). Die Kombination von Icodextrin mit Doxorubicin und Cisplatin wurde bislang noch nie auf ihre Stabilität geprüft.

In unserer Studie wurde die Stabilität aller drei Substanzen einzeln und in Kombination über neunzig Tage untersucht. Bei den Messungen von Icodextrin fällt nach neunzig Tagen eine Degradierung von 8,8% in Kombination mit Cisplatin auf, wohingegen diese bei Icodextrin allein nur 4,78% betrug. Im Gegensatz dazu scheint die Kombination mit Doxorubicin auf Icodextrin einen stabilisierenden Effekt zu haben, hier betrug die Degradierung nach neunzig Tagen nur 1,92%. Cisplatin war sowohl mit NaCl als auch in Kombination mit Icodextrin über neunzig Tage ohne Degradierung nachweisbar. Bei Doxorubicin war die Degradierung nach neunzig Tagen mit Icodextrin 5,6%, mit NaCl 12,4%. Insgesamt war der statistische Unterschied zwischen der Gruppe Doxorubicin mit NaCl und Doxorubicin mit Icodextrin nicht signifikant. Es sind teilweise Schwankungen innerhalb der neunzig Tage zu beobachten, die sich durch Ungenauigkeiten bei der Vorbereitung und Messung der Proben erklären lassen. Die Substanzen Cisplatin und Doxorubicin zeigten sich mit Icodextrin als Trägerlösung genauso stabil wie in der Verdünnung mit NaCl. Für die Substanz Icodextrin konnte eine signifikante Degradierung mit Cisplatin, aber auch eine signifikante Stabilisierung mit Doxorubicin festgestellt werden. Als nächsten Schritt in der Untersuchung der Stabilität der Kombination wäre es interessant zu sehen, wie sich die Kombination von Icodextrin mit beiden Zytostatika gleichzeitig auswirkt. Die Degradierung von Icodextrin mit Cisplatin betrug jedoch nach neunzig Tagen weniger als 10%, was trotzdem noch als stabil betrachtet werden kann. Für den Einsatz der Kombination als PIPAC, wo die Behandlungsdauer dreißig Minuten beträgt, ist die Degradierung absolut tolerierbar. Es ist anzunehmen, dass eine solche geringfügige Degradierung die zu erwartenden Effekte der Kombination nicht wesentlich schmälern wird. Im Folgenden wird auf die zytotoxischen und anti-adhäsiven Effekte der Kombination Cisplatin, Doxorubicin und Icodextrin näher eingegangen.

4.3 Eigenschaften der Kombination Cisplatin, Doxorubicin mit Icodextrin

Die Kombination von Cisplatin und Doxorubicin mit Icodextrin als Trägerlösung wurde im Rahmen dieser Arbeit neben ihrer pharmakologischen Evaluierung auch auf ihre biologischen Effekte untersucht. Die zytotoxischen und anti-

adhäsiven Effekte wurden zuerst an Zellkultur *in vitro* getestet, um erste Erkenntnisse zu sammeln.

Cisplatin und Doxorubicin werden als intraperitoneale Therapie vor allem für Peritonealmetastasen, die von Magen- und Ovarialkarzinomzellen stammen, eingesetzt (Van der Speeten et al., 2017). Diese Magenkrebszelllinie MKN45 wird häufig für verschiedene Modelle der Peritonealmetastasen genutzt (Miwa et al., 2019) und wurde deswegen auch für unsere *in vitro* Versuche verwendet.

Icodextrin selbst hatte in diesem *in vitro* PIPAC Modell als PIPAC-Aerosol keine zytotoxische Wirkung auf die MKN45 Zellkultur im Vergleich zu Kochsalzlösung. Icodextrin steigert die Zytotoxizität von Cisplatin und Doxorubicin, der gebräuchlichsten Medikamentenkombination bei PIPAC (Nowacki et al., 2018), nicht, schränkt die zytotoxischen Effekte im Vergleich zur Gruppe Cisplatin und Doxorubicin mit Kochsalzlösung aber auch nicht ein. Bei der Kontrollgruppe, die nur mit einem PIPAC-Aerosol bestehend aus Kochsalzlösung behandelt wurde, zeigte sich überraschenderweise auch ein zytotoxischer Effekt. Dieser ist möglicherweise bedingt durch einen relativen Mangel an Zellkulturmedium, welches im Zeitraum der PIPAC Therapie (30 min) mit Kochsalzlösung ersetzt wurde. Ein Einfluss des Drucks beziehungsweise ein reiner mechanischer Effekt des Aerosols auf die Tumorzellen können auch nicht ausgeschlossen werden und müssten ggf. in weiterreichenden Versuchen genauer untersucht werden. Solche physikalischen, nicht-medikamentösen Eigenschaften der PIPAC Therapie sind bisher nicht beschrieben worden und könnten das anti-tumoröse Wirkspektrum der Therapie potenziell erweitern.

Icodextrin reduzierte *in vitro* allein signifikant die Adhäsion der MKN45 Zellen auf der unbeschichteten Mikrotiterplatte. Diese anti-adhäsive Wirkung wurde durch die Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin nicht signifikant eingeschränkt. Die Ergebnisse der mit Extrazellulärmatrixproteinen beschichteten Mikrotiterplatte und die Ergebnisse der unbeschichteten Platte waren nur teilweise kohärent. Auf BSA und Vitronectin bestätigte sich die anti-adhäsive Wirkung von Icodextrin. Auf Collagen Typ 1, 2 und 4 sowie Tenascin war die anti-adhäsive Wirkung von Icodextrin nur in Kombination mit Cisplatin und

Doxorubicin zu beobachten. Auf Laminin zeigte sich eine anti-adhäsive Wirkung von Icodextrin allein, jedoch nicht in Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin. Auf Fibronectin war eine Steigerung der Adhäsion der MKN45 Zellen durch Icodextrin zu beobachten. Hervorgehoben werden muss, dass für die Messungen auf den Extrazellulärmatrixproteinen die Anzahl der Messungen pro Gruppe und Protein nur jeweils drei betrug. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Messungen pro Gruppe auf der unbeschichteten Platte 16. Da Adhäsionsassays ein besonderes Handling der Zellen und hohe Präzision beim Pipettieren erfordern, sind Ergebnisse mit höherer Anzahl der Messungen zuverlässiger, so auch die Ergebnisse der Adhäsion auf der unbeschichteten Mikrotiterplatte. Für die genauere Kenntnis und bessere Vergleichbarkeit des Einflusses von Icodextrin auf die Adhäsion der MKN45 Zellen an unterschiedliche Extrazellulärmatrixbestandteile wären in Zukunft weitere Untersuchungen mit höherer Anzahl an Messungen nötig. Für die Beurteilung der Beeinflussung der Adhäsion der MKN45 Zellen durch Icodextrin haben wir uns deswegen auf die Ergebnisse auf der unbeschichteten Platte berufen, die eine anti-adhäsive Wirkung von Icodextrin sowohl allein als auch in Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin zeigen.

Diese ersten Beobachtungen der zytotoxischen und anti-adhäsiven Effekte sprechen für die Möglichkeit eines klinischen Einsatzes von Icodextrin als Trägerlösung der Kombination Cisplatin und Doxorubicin. Weitere Versuche *ex vivo* und im Tiermodell sind für einen solche klinischen Einsatz aus wissenschaftlichen und regulatorischen Gründen unerlässlich. Vorab soll entschieden werden, ob die Zielgröße solcher Versuche die erweiterte Zytotoxizität oder der antiadhäsive Effekt ist. Nach unseren Untersuchungen sind wir der Meinung, dass der antiadhäsive Effekt gewählt werden sollte.

4.4 Icodextrin als anti-adhäsives Medikament

Die anti-adhäsiven Eigenschaften von Icodextrin beruhen auf der sogenannten Hydroflotation, einer chirurgischen Technik, bei der die Installation einer Flüssigkeit in der Bauchhöhle das Gewebe separieren soll, um so die Bildung von Adhäsionen zu verhindern. Nach intraperitonealer Gabe verbleibt Icodextrin

3-4 Tage im Bauchraum, hält das Gewebe so während des Heilungsprozesses auseinander und vermeidet damit den Kontakt und die Adhäsion von Gewebeschichten (Ahmad et al., 2020b). Präklinisch wurden die anti-adhäsiven Eigenschaften von Icodextrin detailliert untersucht. Am Hasenmodell hemmte Icodextrin die Adhäsionsbildung (Ntourakis et al., 2016) und in Kombination mit Dimetindenmaleat reduzierte Icodextrin das Ausmaß und die Schwere der Adhäsionen (Bouliaris et al., 2019). Auf die peritoneale Wundheilung der Mesothelzellen hatte Icodextrin *in vitro* aber keine beeinträchtigenden Effekte (Matsumoto et al., 2012). In einem Modell an Ratten beugte Icodextrin in Kombination mit Fibrinkleber Adhäsionen vor, Icodextrin allein jedoch nicht (Gruber-Blum et al., 2017). Eine weitere Studie an Ratten zeigte wiederum eine Reduktion der postoperativen Adhäsionen (van den Tol et al., 2005) und eine Verbesserung der lokalen Gewebereaktion durch Icodextrin (Klink et al., 2013). Bei Mäusen reduzierte Icodextrin allein und in Kombination mit Taurolidine die postoperative Adhäsionsbildung (Kurt et al., 2017). Diese Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich, was mit einer unterschiedlichen methodischen Qualität der verschiedenen Tiermodelle und der Heterogenität der Studienmerkmale erklärt wird (Strik et al., 2019).

In der klinischen Anwendung wurde die Sicherheit von Icodextrin in einer randomisierten Studie belegt, die keine Steigerung der unerwünschten Wirkungen bei 300 eingeschriebenen Patientinnen und Patienten zeigte (Sakari et al., 2016). Eine randomisierte kontrollierte Studie zeigte, dass Icodextrin die intra-abdominale Adhäsionsbildung reduziert (Catena et al., 2012). Jedoch konnte dieser anti-adhäsive Effekt von Icodextrin in anderen Studien nicht reproduziert werden (Trew et al., 2011), und eine Meta-Analyse zeigte keine Reduktion der Reoperationsrate für adhäsive Dünndarmobstruktion nach prophylaktischer Icodextrin-Behandlung (Ten Broek et al., 2014). Nach vielen, teilweise widersprüchlichen Ergebnissen bleibt die klinische Wirksamkeit von Icodextrin als anti-adhäsive Substanz weiterhin unklar (Robb and Mariette, 2014, Ten Broek et al., 2014). Weitere randomisierte Studien mit hoher Fallzahl wären notwendig, die weitere Parameter wie den Einfluss von Icodextrin auf Schmerzen und Lebensqualität untersuchen (Hindocha et al., 2015).

Ein ungelöstes Problem ist, dass die Gewebeabdeckung nach der intraperitonealen Applikation von Icodextrin als flüssige Lösung inhomogen bleibt (Argentino et al., 2014). Jene inkomplette Gewebeabdeckung könnte eine Erklärung für die verschiedenen klinischen Ergebnisse sein. Unsere Hypothese ist es, dass die Verabreichung von Icodextrin als PIPAC das klinische Outcome von Icodextrin verbessert. Rationale für unsere Hypothese ist, dass PIPAC eine Applikationsform für Medikamente ist, die deren räumliche Verteilung optimiert (Nadiradze et al., 2019).

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnten wir die anti-adhäsive Wirkung von Icodextrin *in vitro* bestätigen. Jedoch lag der Fokus bei unserem Versuch eher auf der Anwendung von Icodextrin (in Kombination mit Chemotherapie) als anti-adhäsives Medikament, als auf der anti-adhäsiven Wirkung des alleinigen Icodextrin Aerosols. Diese anti-adhäsive Wirkung eines Icodextrin Aerosols, das die räumliche Verteilung optimiert und für eine bessere Gewebeabdeckung sorgt, muss noch in weiteren Arbeiten untersucht werden.

4.5 Icodextrin als Trägerlösung chemotherapeutischer Substanzen

Im Rattenmodell zeigte sich durch Icodextrin eine Reduktion der durch intraperitoneale Chemotherapie hervorgerufenen Adhäsionsbildung (Conroy et al., 2003). In der Kombination von Icodextrin mit Mitomycin-C zeigte sich an Ratten eine Adhäsionsprävention (Urkan et al., 2017). Im Kontext der PIPAC, eine Therapie, die selbst kaum postoperative Adhäsionen hervorruft, ist der zusätzliche Effekt von Icodextrin, postoperative Adhäsionen zu verhindern, voraussichtlich nicht entscheidend. Im Gegensatz dazu könnte der hemmende Einfluss Icodextrins auf die Tumorzellimplantation ins Peritoneum den Effekt der intraperitonealen Chemotherapie potenzieren (Jouvin et al., 2017).

Klinische Studien haben den Gebrauch sowie die Verträglichkeit von Icodextrin als Trägerlösung für intraperitoneale Chemotherapie beschrieben. Zwei Studien haben die katheterbasierte intraperitoneale Therapie mit 5-Fluorouracil und Icodextrin an Patientinnen und Patienten mit Peritonealmetastasen erprobt. Dabei war es in der ersten Studie möglich, eine Dosis von 300 mg/m² 5-Fluorouracil (5 Tage pro Woche) über zwölf Wochen zu verabreichen,

limitierende Komplikationen waren abdominelle Schmerzen und infektiöse Peritonitis (Kerr et al., 1996). In der späteren Studie wurde die Durchführbarkeit, Toxizität und Toleranz von einer solchen von zu Hause durchgeführten adjuvanter Chemotherapie nach Tumorresektion untersucht. Schmerzbedingt und infektionsbedingt (bakterielle Peritonitis bei zwei Behandelten) konnten nur 2 von 10 Patientinnen und Patienten alle 6 Zyklen durchlaufen (Hosie et al., 2003). Die erreichten intraperitonealen Konzentrationen waren bei beiden Studien tausendfach höher als die systemischen, intravenösen Konzentrationen. Die in diesen Studien aufgetretenen, kathetergebundenen Komplikationen sind im Rahmen einer PIPAC Therapie mit Icodextrin aufgrund der viel kürzeren Kathetereinlage nicht zu erwarten. Eine andere Studie zeigte ein höheres Verteilungsvolumen des Chemotherapeutikums Oxaliplatin mit Icodextrin als mit Dextrose, auch wenn die klinische Relevanz dessen noch unklar ist (Perez-Ruixo et al., 2014).

Im Tiermodell hatte die Verwendung von Icodextrin einen synergistischen Effekt mit der Chemotherapie in der Reduzierung von Peritonealmetastasen (Jouvin et al., 2017) und hemmte die Tumorzelladhäsion an beschädigte Zonen der Peritonealwand (Al Dybiat et al., 2020). Icodextrin konnte postoperative Adhäsionen reduzieren, ohne die Tumorreduktion zu fördern (van den Tol et al., 2005) und hemmt die mesothelial-mesenchymale Transition, ein kritischer Prozess in der Entwicklung einer prämetastatischen Nische im Peritoneum (Klink et al., 2013). Es steigert außerdem die therapeutischen Effekte einer neuen intraperitonealen Virotherapie für Ovarialkarzinome (Rocconi et al., 2006). Es gibt also schon erste Erkenntnisse zum Einsatz von Icodextrin als Trägerlösung chemotherapeutischer Substanzen, die Hoffnung wecken, dass Icodextrin nicht nur in der Adhäsionsprävention, sondern auch in der Vorbeugung intraperitonealer Rezidive in der onkologischen Chirurgie nützlich sein könnte. Interessant an den Ergebnissen dieser Studie ist, dass sie zu bisherigen anderen Studien kohärent sind, da sich in der Kombination von Icodextrin mit Cisplatin und Doxorubicin weiterhin die anti-adhäsiven Effekte von Icodextrin und die zytotoxischen Effekte der Chemotherapie zeigten. Jedoch sind unsere Erkenntnisse, wie oben unter 4.3 hervorgerufen, durch die Konzentration auf *in*

vitro Untersuchungen an Zellkultur noch limitiert und es bedarf zukünftig weiterreichenden Studien *in vivo*.

4.6 Fazit und Ausblick

In dieser experimentellen Studie *in vitro* wurde die Möglichkeit der Verwendung von Icodextrin, allein und in Kombination mit Chemotherapie, als PIPAC Aerosol erforscht. Es konnte zum ersten Mal eine physikalische als auch pharmakologische Durchführbarkeit dieses kombinierten Ansatzes demonstriert werden. Die vorgeschlagene Kombination zweier Chemotherapeutika mit einer adhäsionshemmenden Trägerlösung und einer fortgeschrittenen Medikamentenapplikationsform (PIPAC) führt *in vitro* zu potenten Synergien. Die Medikamentenkombination zeigte sich über neunzig Tage als weitestgehend stabil. Icodextrin ist für die intraperitoneale Anwendung aufgrund der Nutzung zur Peritonealdialyse bereits zugelassen. Damit sind essenzielle Voraussetzungen für eine rasche Umsetzung des experimentellen Ansatzes in die klinische Anwendung erfüllt.

Im nächsten Forschungsschritt sollte die Gewebekonzentration der Medikamente sowie die Tiefe der Gewebepenetration der Medikamente in einem etablierten *ex-vivo* Modell des Peritoneums (Schnelle et al., 2017, Sautkin et al., 2019) im Vergleich zu Kochsalzlösung untersucht werden. Dies ist notwendig, um ausschließen zu können, dass der oberflächliche, das Peritoneum bedeckende Icodextrin-Flüssigkeitsfilm die Aufnahme der Medikamente durch das Peritoneum durch Konvektion behindert (Steuperaert et al., 2017). Weiterhin muss die tumorizide Wirkung der festen Kombination von Cisplatin und Doxorubicin in Icodextrin, verabreicht als PIPAC, *in vivo* in adäquaten Tiermodellen bewiesen werden. Eine denkbare Option wäre beispielsweise ein Peritonealmetastasen-Modell in einem Tier, welches großemäßig für PIPAC unter Realbedingungen geeignet wäre. Genutzt werden könnten zum Beispiel die VX2 Tumorzelllinie beim Hasen (Pascale et al., 2017). Ähnliche Studien könnten auch mit anderen chemotherapeutischen Medikamenten, hier genannt seien beispielhaft Taxane, durchgeführt werden, um die möglichen Einsatzbereiche von Icodextrin als Trägerlösung zur Prävention von postoperativer

Tumorrekurrenz und Peritonealmetastasen zu erweitern. Die Hoffnung ist, dass die optimierte Gewebebedeckung die Effekte gegen die Tumorzellen, wie die Adhäsionsprävention und die Zytotoxizität *in vivo*, maximieren wird und so zu einer niedrigen postoperativen Tumorrekurrenz führen wird.

5. Zusammenfassung

Icodextrin ist ein Polymer, was prophylaktisch als flüssige Lösung intraperitoneal eingesetzt wird, um Adhäsionen zu vermeiden. Jedoch ist der klinische Gebrauch von Icodextrin zur Adhäsionsprävention wegen un schlüssigen Studienergebnissen umstritten. Dank einer besseren räumlichen Verteilung und der darauffolgenden kompletten Oberflächenbehandlung könnte die Verabreichung von Icodextrin als Aerosol unter Druck (sog. PIPAC), die antiadhäsive Wirkung von Icodextrin steigern. Außerdem könnte Icodextrin auch als Trägerlösung für Chemotherapie dienen, um Synergien aus der Kombination zytotoxischer Effekte und anti-adhäsiver Wirkung zu generieren.

In dieser Arbeit wurde die Eignung von Icodextrin als Träger von Cisplatin und Doxorubicin für die intraperitoneale Verabreichung als PIPAC untersucht. Die Sprühbarkeit von Icodextrin wurde getestet, außerdem wurden die Charakteristiken des Aerosols mittels Granulometrie ermittelt und die Stabilität des Moleküls über einen RP-HPLC Nachweis vor und nach der Aerosolisierung überprüft. Die chemische Stabilität von Icodextrin, Cisplatin und Doxorubicin in Kombination wurde mittels RP-HPLC, HILIC und AAS nach drei Monaten getestet. Die Wirkung von Icodextrin auf die Adhäsion von einer humanen Magenkrebszellkultur *in vitro* und die Effekte des aerosolisierten Icodextrins in Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin auf das Zellüberleben wurden ausgewertet.

Die Verabreichung von Icodextrin mittels PIPAC ist ohne besondere Einschränkungen durchführbar. Die mittlere Tropfengröße des Aerosols verändert sich nicht mit steigenden Konzentrationen. Das Icodextrin Polymer hält den durch den Vernebler verursachten Scherkräften stand und bleibt nach Aerosolisierung ohne Verlust oder Degradierung des Polymers stabil. Als Trägerlösung für Cisplatin und Doxorubicin degradierte Icodextrin in der Kombination bei 4°C über drei Monate hinweg nicht mehr als 10% und kann deswegen als stabil betrachtet werden. Auch wurde bei 4°C über drei Monate eine Degradierung der Substanzen Cisplatin und Doxorubicin ausgeschlossen.

Die zytotoxische Wirkung von Cisplatin und Doxorubicin *in vitro* als PIPAC-Aerosol auf eine MKN45 Zellkultur war in Kombination mit Icodextrin nicht beeinträchtigt. Icodextrin hatte einen signifikanten anti-adhäsiven Effekt auf die MKN45 Zellkultur, allein und in Kombination mit Cisplatin und Doxorubicin.

Zusammenfassend nutzt die hier vorgeschlagene Kombination die anti-adhäsiven Eigenschaften von Icodextrin, die zytotoxischen Wirkungen von Doxorubicin und Cisplatin und die Vorteile einer fortgeschrittenen Medikamentenapplikationsform. Die optimale medikamentöse Gewebebedeckung, die Adhäsionsprävention und die Zytotoxizität steigern den tumoriziden Effekt *in vitro*. Diese Synergie könnte in der Klinik zu einer niedrigeren postoperativen Tumorrezidivrate führen. Im nächsten Forschungsschritt soll diese Hypothese zuerst in einem geeigneten funktionellen Modell getestet werden.

6. Literaturverzeichnis

- AHMAD, G., KIM, K., THOMPSON, M., AGARWAL, P., O'FLYNN, H., HINDOCHA, A. & WATSON, A. 2020a. Barrier agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database Syst Rev*, 3, CD000475.
- AHMAD, G., THOMPSON, M., KIM, K., AGARWAL, P., MACKIE, F. L., DIAS, S., METWALLY, M. & WATSON, A. 2020b. Fluid and pharmacological agents for adhesion prevention after gynaecological surgery. *Cochrane Database Syst Rev*, 7, CD001298.
- AL DYBIAT, I., MIRSHAHI, S., BELALOU, M., ABDELHAMID, D., SHAH, S., ULLAH, M., SORIA, J., POCARD, M. & MIRSHAHI, M. 2020. Injured tissues favor cancer cell implantation via fibrin deposits on scar zones. *Neoplasia*, 22, 809-819.
- ALKHAMESI, N. A., ZIPRIN, P., PFISTERMULLER, K., PECK, D. H. & DARZI, A. W. 2005. ICAM-1 mediated peritoneal carcinomatosis, a target for therapeutic intervention. *Clin Exp Metastasis*, 22, 449-59.
- ALYAMI, M., HUBNER, M., GRASS, F., BAKRIN, N., VILLENEUVE, L., LAPLACE, N., PASSOT, G., GLEHEN, O. & KEPENEKIAN, V. 2019. Pressurised intraperitoneal aerosol chemotherapy: rationale, evidence, and potential indications. *Lancet Oncol*, 20, e368-e377.
- ARGENTINO, G., RUSSO, R., MARESCA, I. D., STRAZZULLO, T., MEMOLI, A., SODO, M., CELENTANO, L. & MEMOLI, B. 2014. Imaging of the peritoneum evaluated by 99mTc-icodextrin scintigraphy in peritoneal dialysis patients: preliminary data. *Blood Purif*, 38, 219-23.
- ARUNG, W., MEURISSE, M. & DETRY, O. 2011. Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World J Gastroenterol*, 17, 4545-53.
- BLACKBURN, S. C. & STANTON, M. P. 2014. Anatomy and physiology of the peritoneum. *Semin Pediatr Surg*, 23, 326-30.
- BOERNER, T., GRAICHEN, A., JEITER, T., ZEMANN, F., RENNER, P., MARZ, L., SOEDER, Y., SCHLITT, H. J., PISO, P. & DAHLKE, M. H. 2016. CRS-HIPEC Prolongs Survival but is Not Curative for Patients with Peritoneal Carcinomatosis of Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*, 23, 3972-3977.
- BOULIARIS, K., ASPRODINI, E., LIAKOS, P., DIAMANTIS, A., KOUKOULIS, G., BEFANI, C., TZIKA, S. & TEPETES, K. 2019. Adhesion Prevention to Polypropylene Meshes Using Combined Icodextrin Four Percent and Dimetindene Maleate. *J Surg Res*, 234, 325-333.
- CARTA, G., CERRONE, L. & IOVENITTI, P. 2004. Postoperative adhesion prevention in gynecologic surgery with hyaluronic acid. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 31, 39-41.
- CATENA, F., ANSALONI, L., DI SAVERIO, S., PINNA, A. D. & WORLD SOCIETY OF EMERGENCY, S. 2012. P.O.P.A. study: prevention of postoperative abdominal adhesions by icodextrin 4% solution after laparotomy for adhesive small bowel obstruction. A prospective randomized controlled trial. *J Gastrointest Surg*, 16, 382-8.

- CAVAZZONI, E., BUGIANTELLA, W., GRAZIOSI, L., FRANCESCHINI, M. S. & DONINI, A. 2013. Malignant ascites: pathophysiology and treatment. *Int J Clin Oncol*, 18, 1-9.
- CAZAURAN, J. B., ALYAMI, M., LASSEUR, A., GYBELS, I., GLEHEN, O. & BAKRIN, N. 2018. Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC) Procedure for Non-resectable Peritoneal Carcinomatosis (with Video). *J Gastrointest Surg*, 22, 374-375.
- CHEONG, Y. C., LAIRD, S. M., LI, T. C., SHELTON, J. B., LEDGER, W. L. & COOKE, I. D. 2001. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Hum Reprod Update*, 7, 556-66.
- COCCOLINI, F., GHEZA, F., LOTTI, M., VIRZI, S., IUSCO, D., GHERMANDI, C., MELOTTI, R., BAIOCCHI, G., GIULINI, S. M., ANSALONI, L. & CATENA, F. 2013. Peritoneal carcinomatosis. *World J Gastroenterol*, 19, 6979-94.
- CONROY, S. E., BAINES, L., RODGERS, K., DEVIREN, F. & VERCO, S. J. 2003. Prevention of chemotherapy-induced intraperitoneal adhesion formation in rats by icodextrin at a range of concentrations. *Gynecol Oncol*, 88, 304-8.
- DAVIGO, A., PASSOT, G., VASSAL, O., BOST, M., TAVERNIER, C., DECULLIER, E., BAKRIN, N., ALYAMI, M., BONNET, J. M., LOUZIER, V., PAQUET, C., ALLAOUCHICHE, B., GLEHEN, O. & KEPENEKIAN, V. 2020. PIPAC versus HIPEC: cisplatin spatial distribution and diffusion in a swine model. *Int J Hyperthermia*, 37, 144-150.
- DIAMOND, M. P. 1996. Reduction of adhesions after uterine myomectomy by Seprafilm membrane (HAL-F): a blinded, prospective, randomized, multicenter clinical study. Seprafilm Adhesion Study Group. *Fertil Steril*, 66, 904-10.
- DIAMOND, M. P. & FREEMAN, M. L. 2001. Clinical implications of postsurgical adhesions. *Hum Reprod Update*, 7, 567-76.
- DU BOIS, A., REUSS, A., PUJADE-LAURAIN, E., HARTEP, P., RAY-COQUARD, I. & PFISTERER, J. 2009. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: by the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer*, 115, 1234-44.
- ERIKSEN, M. T., WIBE, A., SYSE, A., HAFFNER, J., WIIG, J. N., NORWEGIAN RECTAL CANCER, G. & NORWEGIAN GASTROINTESTINAL CANCER, G. 2004. Inadvertent perforation during rectal cancer resection in Norway. *Br J Surg*, 91, 210-6.
- EVENO, C., HAIDARA, A., ALI, I., PIMPIE, C., MIRSHAHI, M. & POCARD, M. 2017. Experimental pharmacokinetics evaluation of chemotherapy delivery by PIPAC for colon cancer: first evidence for efficacy. *Pleura Peritoneum*, 2, 103-109.
- FERLAND, R., MULANI, D. & CAMPBELL, P. K. 2001. Evaluation of a sprayable polyethylene glycol adhesion barrier in a porcine efficacy model. *Hum Reprod*, 16, 2718-23.

- FLESSNER, M. F. 2016. Pharmacokinetic problems in peritoneal drug administration: an update after 20 years. *Pleura Peritoneum*, 1, 183-191.
- FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, D. 2019. Guidelines for Safeguarding Good Research Practice. Code of Conduct.
- FRAMPTON, J. E. & PLOSKER, G. L. 2003. Icodextrin: a review of its use in peritoneal dialysis. *Drugs*, 63, 2079-105.
- GAMBOA, A. C., ZAIDI, M. Y., LEE, R. M., SPEEGLE, S., SWITCHENKO, J. M., LIPSCOMB, J., CLOYD, J. M., AHMED, A., GROTZ, T., LEITING, J., FOURNIER, K., LEE, A. J., DINEEN, S., POWERS, B. D., LOWY, A. M., KOTHA, N. V., CLARKE, C., GAMBLIN, T. C., PATEL, S. H., LEE, T. C., LAMBERT, L., HENDRIX, R. J., ABBOTT, D. E., VANDE WALLE, K., LAFARO, K., LEE, B., JOHNSTON, F. M., GREER, J., RUSSELL, M. C., STALEY, C. A. & MAITHEL, S. K. 2020. Optimal Surveillance Frequency After CRS/HIPEC for Appendiceal and Colorectal Neoplasms: A Multi-institutional Analysis of the US HIPEC Collaborative. *Ann Surg Oncol*, 27, 134-146.
- GIGER-PABST, U., BUCUR, P., ROGER, S., FALKENSTEIN, T. A., TABCHOURI, N., LE PAPE, A., LERONDEL, S., DEMTRODER, C., SALAME, E. & OUAISSI, M. 2019. Comparison of Tissue and Blood Concentrations of Oxaliplatin Administered by Different Modalities of Intraperitoneal Chemotherapy. *Ann Surg Oncol*, 26, 4445-4451.
- GIOVANELLA, B. C., STEHLIN, J. S., JR. & MORGAN, A. C. 1976. Selective lethal effect of supranormal temperatures on human neoplastic cells. *Cancer Res*, 36, 3944-50.
- GIRSHALLY, R., DEMTRODER, C., ALBAYRAK, N., ZIEREN, J., TEMPFER, C. & REYMOND, M. A. 2016. Pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) as a neoadjuvant therapy before cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *World J Surg Oncol*, 14, 253.
- GOERE, D., GLEHEN, O., QUENET, F., GUILLOIT, J. M., BEREDER, J. M., LORIMIER, G., THIBAudeau, E., GHOUTI, L., PINTO, A., TUECH, J. J., KIANMANESH, R., CARRETIER, M., MARCHAL, F., ARVIEUX, C., BRIGAND, C., MEEUS, P., RAT, P., DURAND-FONTANIER, S., MARIANI, P., LAKKIS, Z., LOI, V., PIRRO, N., SABBAGH, C., TEXIER, M., ELIAS, D. & GROUP, B.-R. 2020. Second-look surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus surveillance in patients at high risk of developing colorectal peritoneal metastases (PROPHYLOCHIP-PRODIGE 15): a randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 21, 1147-1154.
- GOHLER, D., KHOSRAWIPOUR, V., KHOSRAWIPOUR, T., DIAZ-CARBALLO, D., FALKENSTEIN, T. A., ZIEREN, J., STINTZ, M. & GIGER-PABST, U. 2017. Technical description of the microinjection pump (MIP((R))) and granulometric characterization of the aerosol applied for pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC). *Surg Endosc*, 31, 1778-1784.
- GRUBER-BLUM, S., FORTELYNY, R. H., KEIBL, C., BRAND, J., LECHNER, M., REDL, H. & PETTER-PUCHNER, A. H. 2017. Liquid antiadhesive agents for intraperitoneal hernia repair procedures: Artiss((R)) compared to

- CoSeal((R)) and Adept((R)) in an IPOM rat model. *Surg Endosc*, 31, 4973-4980.
- HINDOCHA, A., BEERE, L., DIAS, S., WATSON, A. & AHMAD, G. 2015. Adhesion prevention agents for gynaecological surgery: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*, 1, CD011254.
- HOSIE, K. B., KERR, D. J., GILBERT, J. A., DOWNES, M., LAKIN, G., PEMBERTON, G., TIMMS, K., YOUNG, A. & STANLEY, A. 2003. A pilot study of adjuvant intraperitoneal 5-fluorouracil using 4% icodextrin as a novel carrier solution. *Eur J Surg Oncol*, 29, 254-60.
- HTAY, H., JOHNSON, D. W., WIGGINS, K. J., BADVE, S. V., CRAIG, J. C., STRIPPOLI, G. F. & CHO, Y. 2018. Biocompatible dialysis fluids for peritoneal dialysis. *Cochrane Database Syst Rev*, 10, CD007554.
- JACQUET, P. & SUGARBAKER, P. H. 1996. Clinical research methodologies in diagnosis and staging of patients with peritoneal carcinomatosis. *Cancer Treat Res*, 82, 359-74.
- JOUVIN, I., NAJAH, H., PIMPIE, C., CANET JOURDAN, C., KACI, R., MIRSHAHI, M., EVENO, C. & POCARD, M. 2017. Reduction of carcinomatosis risk using icodextrin as a carrier solution of intraperitoneal oxaliplatin chemotherapy. *Eur J Surg Oncol*, 43, 1088-1094.
- KECK, H. S., WEINREICH, F. J., SHEGOKAR, R., KONIGSRAINER, A., REYMOND, M. A. & NADIRADZE, G. 2021. Experimental evaluation of icodextrin delivery as pressurized aerosol (PIPAC): Antiadhesive and cytotoxic effects. *Eur J Surg Oncol*, 47, 1434-1440.
- KENNY, H. A., CHIANG, C. Y., WHITE, E. A., SCHRYVER, E. M., HABIS, M., ROMERO, I. L., LADANYI, A., PENICKA, C. V., GEORGE, J., MATLIN, K., MONTAG, A., WROBLEWSKI, K., YAMADA, S. D., MAZAR, A. P., BOWTELL, D. & LENGYEL, E. 2014. Mesothelial cells promote early ovarian cancer metastasis through fibronectin secretion. *J Clin Invest*, 124, 4614-28.
- KERR, D. J., YOUNG, A. M., NEOPTOLEMOS, J. P., SHERMAN, M., VAN-GEENE, P., STANLEY, A., FERRY, D., DOBBIE, J. W., VINCKE, B., GILBERT, J., EL EINI, D., DOMBROS, N. & FOUNTZILAS, G. 1996. Prolonged intraperitoneal infusion of 5-fluorouracil using a novel carrier solution. *Br J Cancer*, 74, 2032-5.
- KHOSRAWIPOUR, V., DIAZ-CARBALLO, D., ACIKELLI, A. H., KHOSRAWIPOUR, T., FALKENSTEIN, T. A., WU, D., ZIEREN, J. & GIGER-PABST, U. 2017. Cytotoxic effect of different treatment parameters in pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) on the in vitro proliferation of human colonic cancer cells. *World J Surg Oncol*, 15, 43.
- KLAVER, C. E. L., WISSELINK, D. D., PUNT, C. J. A., SNAEBJORNSSON, P., CREZEE, J., AALBERS, A. G. J., BRANDT, A., BREMERS, A. J. A., BURGER, J. W. A., FABRY, H. F. J., FERENSCHILD, F., FESTEN, S., VAN GREVENSTEIN, W. M. U., HEMMER, P. H. J., DE HINGH, I., KOK, N. F. M., MUSTERS, G. D., SCHOONDERWOERD, L., TUYNMAN, J. B., VAN DE VEN, A. W. H., VAN WESTREENEN, H. L., WIEZER, M. J., ZIMMERMAN, D. D. E., VAN ZWEEDEN, A. A., DIJKGRAAF, M. G. W.,

- TANIS, P. J. & GROUP, C. C. 2019. Adjuvant hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with locally advanced colon cancer (COLOPEC): a multicentre, open-label, randomised trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 4, 761-770.
- KLAVER, Y. L., LEMMENS, V. E., NIENHUIJS, S. W., LUYER, M. D. & DE HINGH, I. H. 2012. Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: Incidence, prognosis and treatment options. *World J Gastroenterol*, 18, 5489-94.
- KLEIN, C. L., BITTINGER, F., SKARKE, C. C., WAGNER, M., KOHLER, H., WALGENBACH, S. & KIRKPATRICK, C. J. 1995. Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells. *Pathobiology*, 63, 204-12.
- KLINK, C. D., SCHICKHAUS, P., BINNEBOSEL, M., JOCKENHOEVEL, S., ROSCH, R., TOLBA, R., NEUMANN, U. P. & KLINGE, U. 2013. Influence of 4% icodextrin solution on peritoneal tissue response and adhesion formation. *BMC Surg*, 13, 34.
- KONIGSRAINER, I., BECKERT, S., LEHMANN, T., LADURNER, R., BRUCHER, B. & KONIGSRAINER, A. 2011. [Peritoneal carcinomatosis]. *Chirurg*, 82, 375-80; quiz 381.
- KURT, N., SIKAR, H. E., KAPTANOGLU, L. & KUCUK, H. F. 2017. Separate and synergistic effects of taurolidine and icodextrin in intra-abdominal adhesion prevention. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 23, 377-382.
- LAMBERT, L. A. & WISEMAN, J. 2018. Palliative Management of Peritoneal Metastases. *Ann Surg Oncol*, 25, 2165-2171.
- LEITLINIENPROGRAMM ONKOLOGIE (DEUTSCHE KREBSGESELLSCHAFT, D. K., AWMF). 2019. *S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1* [Online]. Available: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [Accessed 10.11.2020].
- LIU, J., GENG, X. & LI, Y. 2016. Milky spots: omental functional units and hotbeds for peritoneal cancer metastasis. *Tumour Biol*, 37, 5715-26.
- LLUECA, A., ESCRIG, J. & GROUP, M. W. 2018. Prognostic value of peritoneal cancer index in primary advanced ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol*, 44, 163-169.
- MALVERN 2007. *Spraytec User Manual: MAN0368 Issue 3.0*, Worcestershire, Malvern Instruments Ltd.
- MATSUMOTO, M., TAMURA, M., MIYAMOTO, T., FURUNO, Y., KABASHIMA, N., SERINO, R., SHIBATA, T., KANEGAE, K., TAKEUCHI, M., ABE, H., OKAZAKI, M. & OTSUJI, Y. 2012. Impacts of icodextrin on integrin-mediated wound healing of peritoneal mesothelial cells. *Life Sci*, 90, 917-23.
- MEHROTRA, R., DEVUYST, O., DAVIES, S. J. & JOHNSON, D. W. 2016. The Current State of Peritoneal Dialysis. *J Am Soc Nephrol*, 27, 3238-3252.
- MIKOLAJCZYK, A., KHOSRAWIPOUR, V., SCHUBERT, J., CHAUDHRY, H., PIGAZZI, A. & KHOSRAWIPOUR, T. 2018. Particle Stability During Pressurized Intra-peritoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *Anticancer Res*, 38, 4645-4649.

- MIWA, T., KANDA, M., UMEDA, S., TANAKA, H., SHIMIZU, D., TANAKA, C., KOBAYASHI, D., HAYASHI, M., YAMADA, S., NAKAYAMA, G., KOIKE, M. & KODERA, Y. 2019. Establishment of Peritoneal and Hepatic Metastasis Mouse Xenograft Models Using Gastric Cancer Cell Lines. *In Vivo*, 33, 1785-1792.
- MOLEGRAAF, M. J., TORENSMA, B., LANGE, C. P., LANGE, J. F., JEEKEL, J. & SWANK, D. J. 2017. Twelve-year outcomes of laparoscopic adhesiolysis in patients with chronic abdominal pain: A randomized clinical trial. *Surgery*, 161, 415-421.
- NADIRADZE, G., HORVATH, P., SAUTKIN, Y., ARCHID, R., WEINREICH, F. J., KONIGSRAINER, A. & REYMOND, M. A. 2019. Overcoming Drug Resistance by Taking Advantage of Physical Principles: Pressurized Intraperitoneal Aerosol Chemotherapy (PIPAC). *Cancers (Basel)*, 12.
- NAGATA, H., ISHIHARA, S., HATA, K., MURONO, K., KANEKO, M., YASUDA, K., OTANI, K., NISHIKAWA, T., TANAKA, T., KIYOMATSU, T., KAWAI, K., NOZAWA, H. & WATANABE, T. 2017. Survival and Prognostic Factors for Metachronous Peritoneal Metastasis in Patients with Colon Cancer. *Ann Surg Oncol*, 24, 1269-1280.
- NOWACKI, M., ALYAMI, M., VILLENEUVE, L., MERCIER, F., HUBNER, M., WILLAERT, W., CEELLEN, W., REYMOND, M., PEZET, D., ARVIEUX, C., KHOMYAKOV, V., LAY, L., GIANNI, S., ZEGARSKI, W., BAKRIN, N. & GLEHEN, O. 2018. Multicenter comprehensive methodological and technical analysis of 832 pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) interventions performed in 349 patients for peritoneal carcinomatosis treatment: An international survey study. *Eur J Surg Oncol*, 44, 991-996.
- NTOURAKIS, D., KATSIMPOULAS, M., TANOGLIDI, A., BARBATIS, C., KARAYANNACOS, P. E., SERGENTANIS, T. N., KOSTOMITSOPOULOS, N. & MACHAIRAS, A. 2016. Adhesions and Healing of Intestinal Anastomoses: The Effect of Anti-Adhesion Barriers. *Surg Innov*, 23, 266-76.
- OKABAYASHI, K., ASHRAFIAN, H., ZACHARAKIS, E., HASEGAWA, H., KITAGAWA, Y., ATHANASIOU, T. & DARZI, A. 2014. Adhesions after abdominal surgery: a systematic review of the incidence, distribution and severity. *Surg Today*, 44, 405-20.
- ORIMO, A. & WEINBERG, R. A. 2006. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*, 5, 1597-601.
- PAAJANEN, P., FAGERSTROM, A. & PAAJANEN, H. 2018. Laparoscopic Adhesiolysis in Chronic Abdominal Pain: 15-Year Follow-up Study. *J Clin Gastroenterol*, 52, e32-e36.
- PASCALE, F., FAZEL, A., NAMUR, J., GHEGEDIBAN, S. H., D'INCA, H., WASSEF, M., MOINE, L. & LAURENT, A. 2017. Laparoscopic subperitoneal injection of chemo-loaded particles lowers tumor growth on a rabbit model of peritoneal carcinomatosis. *Tumour Biol*, 39, 1010428317698381.
- PEREZ-RUIXO, C., PERIS, J. E., ESCUDERO-ORTIZ, V., BRETCHA-BOIX, P., FARRE-ALEGRE, J., PEREZ-RUIXO, J. J. & VALENZUELA, B. 2014. Rate and extent of oxaliplatin absorption after hyperthermic

- intraperitoneal administration in peritoneal carcinomatosis patients. *Cancer Chemother Pharmacol*, 73, 1009-20.
- QUENET, F., ELIAS, D., ROCA, L., GOERE, D., GHOUTI, L., POCARD, M., FACY, O., ARVIEUX, C., LORIMIER, G., PEZET, D., MARCHAL, F., LOI, V., MEEUS, P., JUZYNA, B., DE FORGES, H., PAINEAU, J., GLEHEN, O., GROUP, U.-G. & GROUP, B. I. G. R. 2021. Cytoreductive surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus cytoreductive surgery alone for colorectal peritoneal metastases (PRODIGE 7): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 22, 256-266.
- RANGANATHAN, D., NAICKER, S., WALLIS, S. C., LIPMAN, J., RATANJEE, S. K. & ROBERTS, J. A. 2016. Stability of Antibiotics for Intraperitoneal Administration in Extraneal 7.5% Icodextrin Peritoneal Dialysis Bags (STAB Study). *Perit Dial Int*, 36, 421-6.
- RAU, B., PISO, P. & KÖNIGSRÄINER, A. 2018. *Peritoneale Tumoren und Metastasen. Operative, intraperitoneale und systemische Therapie*, Berlin, Springer-Verlag GmbH.
- RAY, N. F., DENTON, W. G., THAMER, M., HENDERSON, S. C. & PERRY, S. 1998. Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *J Am Coll Surg*, 186, 1-9.
- REYMOND, M. A. 2016. Pleura and Peritoneum: the forgotten organs. *Pleura Peritoneum*, 1, 1-2.
- REYMOND, M. A., HU, B., GARCIA, A., RECK, T., KOCKERLING, F., HESS, J. & MOREL, P. 2000. Feasibility of therapeutic pneumoperitoneum in a large animal model using a microvaporisator. *Surg Endosc*, 14, 51-5.
- RIIHIMAKI, M., HEMMINKI, A., SUNDQUIST, K., SUNDQUIST, J. & HEMMINKI, K. 2016. Metastatic spread in patients with gastric cancer. *Oncotarget*, 7, 52307-52316.
- RISBERG, B. 1997. Adhesions: preventive strategies. *Eur J Surg Suppl*, 32-9.
- ROBB, W. B. & MARIETTE, C. 2014. Strategies in the prevention of the formation of postoperative adhesions in digestive surgery: a systematic review of the literature. *Dis Colon Rectum*, 57, 1228-40.
- ROCCONI, R. P., NUMNUM, M. T., ZHU, Z. B., LU, B., WANG, M., RIVERA, A. A., STOFF-KHALILI, M., ALVAREZ, R. D., CURIEL, D. T. & MAKHIJA, S. 2006. Icodextrin enhances survival in an intraperitoneal ovarian cancer murine model utilizing gene therapy. *Gynecol Oncol*, 103, 985-9.
- SAKARI, T., SJODAHL, R., PAHLMAN, L. & KARLBOM, U. 2016. Role of icodextrin in the prevention of small bowel obstruction. Safety randomized patients control of the first 300 in the ADEPT trial. *Colorectal Dis*, 18, 295-300.
- SANDOVAL, P., JIMENEZ-HEFFERNAN, J. A., RYNNE-VIDAL, A., PEREZ-LOZANO, M. L., GILSANZ, A., RUIZ-CARPIO, V., REYES, R., GARCIA-BORDAS, J., STAMATAKIS, K., DOTOR, J., MAJANO, P. L., FRESNO, M., CABANAS, C. & LOPEZ-CABRERA, M. 2013. Carcinoma-associated fibroblasts derive from mesothelial cells via mesothelial-to-mesenchymal transition in peritoneal metastasis. *J Pathol*, 231, 517-31.
- SAUTKIN, I., SOLASS, W., WEINREICH, F. J., KONIGSRÄINER, A., SCHENK, M., THIEL, K. & REYMOND, M. A. 2019. A real-time ex vivo model

- (eIBUB) for optimizing intraperitoneal drug delivery as an alternative to living animal models. *Pleura Peritoneum*, 4, 20190017.
- SCHNELLE, D., WEINREICH, F. J., KIBAT, J. & REYMOND, M. A. 2017. A new ex vivo model for optimizing distribution of therapeutic aerosols: the (inverted) bovine urinary bladder. *Pleura Peritoneum*, 2, 37-41.
- SHARIATI, M., ZHANG, H., VAN DE SANDE, L., DESCAMPS, B., VANHOVE, C., WILLAERT, W., CEELLEN, W., DE SMEDT, S. C. & REMAUT, K. 2019. High Pressure Nebulization (PIPAC) Versus Injection for the Intraperitoneal Administration of mRNA Complexes. *Pharm Res*, 36, 126.
- SHIMANUKI, T., NISHIMURA, K., MONTZ, F. J., NAKAMURA, R. M. & DIZEREGA, G. S. 1987. Localized prevention of postsurgical adhesion formation and reformation with oxidized regenerated cellulose. *J Biomed Mater Res*, 21, 173-85.
- SLACK-DAVIS, J. K., ATKINS, K. A., HARRER, C., HERSHEY, E. D. & CONAWAY, M. 2009. Vascular cell adhesion molecule-1 is a regulator of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Cancer Res*, 69, 1469-76.
- SOLASS, W., HERBETTE, A., SCHWARZ, T., HETZEL, A., SUN, J. S., DUTREIX, M. & REYMOND, M. A. 2012. Therapeutic approach of human peritoneal carcinomatosis with Dbait in combination with capnoperitoneum: proof of concept. *Surg Endosc*, 26, 847-52.
- SOLASS, W., HORVATH, P., STRULLER, F., KONIGSRAINER, I., BECKERT, S., KONIGSRAINER, A., WEINREICH, F. J. & SCHENK, M. 2016. Functional vascular anatomy of the peritoneum in health and disease. *Pleura Peritoneum*, 1, 145-158.
- SOLASS, W., KERB, R., MURDTER, T., GIGER-PABST, U., STRUMBERG, D., TEMPFER, C., ZIEREN, J., SCHWAB, M. & REYMOND, M. A. 2014. Intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis using pressurized aerosol as an alternative to liquid solution: first evidence for efficacy. *Ann Surg Oncol*, 21, 553-9.
- STELLER, M. A., EGORIN, M. J., TRIMBLE, E. L., BARTLETT, D. L., ZUHOWSKI, E. G., ALEXANDER, H. R. & DEDRICK, R. L. 1999. A pilot phase I trial of continuous hyperthermic peritoneal perfusion with high-dose carboplatin as primary treatment of patients with small-volume residual ovarian cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, 43, 106-14.
- STEUPERAERT, M., DEBBAUT, C., SEGERS, P. & CEELLEN, W. 2017. Modelling drug transport during intraperitoneal chemotherapy. *Pleura Peritoneum*, 2, 73-83.
- STOMMEL, M. W., STRIK, C. & VAN GOOR, H. 2014. Response to pathological processes in the peritoneal cavity--sepsis, tumours, adhesions, and ascites. *Semin Pediatr Surg*, 23, 331-5.
- STRIK, C., WEVER, K. E., STOMMEL, M. W. J., GOOR, H. V. & TEN BROEK, R. P. G. 2019. Adhesion reformation and the limited translational value of experiments with adhesion barriers: A systematic review and meta-analysis of animal models. *Sci Rep*, 9, 18254.
- SUGARBAKER, P. H. 1989. Surgical treatment of peritoneal carcinomatosis: 1988 Du Pont lecture. *Can J Surg*, 32, 164-70.
- TEMPFER, C. B., HILAL, Z., DOGAN, A., PETERSEN, M. & REZNICZEK, G. A. 2018. Concentrations of cisplatin and doxorubicin in ascites and

- peritoneal tumor nodules before and after pressurized intraperitoneal aerosol chemotherapy (PIPAC) in patients with peritoneal metastasis. *Eur J Surg Oncol*, 44, 1112-1117.
- TEN BROEK, R. P. G., STOMMEL, M. W. J., STRIK, C., VAN LAARHOVEN, C., KEUS, F. & VAN GOOR, H. 2014. Benefits and harms of adhesion barriers for abdominal surgery: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 383, 48-59.
- TREW, G., PISTOFIDIS, G., PADOS, G., LOWER, A., METTLER, L., WALLWIENER, D., KORELL, M., POULY, J. L., COCCIA, M. E., AUDEBERT, A., NAPPI, C., SCHMIDT, E., MCVEIGH, E., LANDI, S., DEGUELDRE, M., KONINCXK, P., RIMBACH, S., CHAPRON, C., DALLAY, D., ROEMER, T., MCCONNACHIE, A., FORD, I., CROWE, A., KNIGHT, A., DIZEREGA, G. & DEWILDE, R. 2011. Gynaecological endoscopic evaluation of 4% icodextrin solution: a European, multicentre, double-blind, randomized study of the efficacy and safety in the reduction of de novo adhesions after laparoscopic gynaecological surgery. *Hum Reprod*, 26, 2015-27.
- TRITON, T. R. & YEE, G. 1982. The anticancer agent adriamycin can be actively cytotoxic without entering cells. *Science*, 217, 248-50.
- URKAN, M., OZERHAN, I. H., UNLU, A., CAN, M. F., OZTURK, E., GUNAL, A. & YAGCI, G. 2017. Prevention of Intraabdominal Adhesions: An Experimental Study Using Mitomycin-C and 4% Icodextrin. *Balkan Med J*, 34, 35-40.
- VAN BAAL, J. O., VAN DE VIJVER, K. K., NIEUWLAND, R., VAN NOORDEN, C. J., VAN DRIEL, W. J., STURK, A., KENTER, G. G., RIKKERT, L. G. & LOK, C. A. 2017. The histophysiology and pathophysiology of the peritoneum. *Tissue Cell*, 49, 95-105.
- VAN DE VLASAKKER, V. C. J., LURVINK, R. J., CASHIN, P. H., CEELLEN, W., DERACO, M., GOERE, D., GONZALEZ-MORENO, S., LEHMANN, K., LI, Y., MORAN, B., MORRIS, D. L., PISO, P., QUADROS, C. A., RAU, B., SOMASHEKHAR, S. P., SOMMARIVA, A., VAN DER SPEETEN, K., SPILLOTIS, J., SUGARBAKER, P. H., TEO, M. C. C., VERWAAL, V. J., YONEMURA, Y., GLEHEN, O. & DE HINGH, I. 2021. The impact of PRODIGE 7 on the current worldwide practice of CRS-HIPEC for colorectal peritoneal metastases: A web-based survey and 2021 statement by Peritoneal Surface Oncology Group International (PSOGI). *Eur J Surg Oncol*.
- VAN DEN TOL, P., TEN RAA, S., VAN GREVENSTEIN, H., MARQUET, R., VAN EIJCK, C. & JEEKEL, H. 2005. Icodextrin reduces postoperative adhesion formation in rats without affecting peritoneal metastasis. *Surgery*, 137, 348-54.
- VAN DER SPEETEN, K., LEMOINE, L. & SUGARBAKER, P. 2017. Overview of the optimal perioperative intraperitoneal chemotherapy regimens used in current clinical practice. *Pleura Peritoneum*, 2, 63-72.
- VAN DER SPEETEN, K., STUART, O. A., MAHTEME, H. & SUGARBAKER, P. H. 2009. A pharmacologic analysis of intraoperative intracavitary cancer chemotherapy with doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 63, 799-805.

- VAN OUDHEUSDEN, T. R., GRULL, H., DANKERS, P. Y. & DE HINGH, I. H. 2015. Targeting the peritoneum with novel drug delivery systems in peritoneal carcinomatosis: a review of the literature. *Anticancer Res*, 35, 627-34.
- VIGNERON, J., ASTIER, A., TRITTLER, R., HECQ, J. D., DAOUPHARS, M., LARSSON, I., POURROY, B., PINGUET, F., FRENCH SOCIETY OF HOSPITAL, P. & EUROPEAN SOCIETY OF ONCOLOGY, P. 2013. SFPO and ESOP recommendations for the practical stability of anticancer drugs: an update. *Ann Pharm Fr*, 71, 376-89.
- WANG, Z. B., LI, M. & LI, J. C. 2010. Recent advances in the research of lymphatic stomata. *Anat Rec (Hoboken)*, 293, 754-61.
- WILSON, R. B., SOLASS, W., ARCHID, R., WEINREICH, F. J., KONIGSRAINER, A. & REYMOND, M. A. 2019. Resistance to anoikis in transcoelomic shedding: the role of glycolytic enzymes. *Pleura Peritoneum*, 4, 20190003.
- ZUO, Y. 2014. *High-performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures*, Nova Publishers.

7. Erklärung zum Eigenanteil

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

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. Marc Reymond, Arbeitsgruppenleitung, Dr. med. Giorgi Nadiradze, Oberarzt, Herrn Dr. rer. nat. Frank-Jürgen Weinreich, Laborleitung und Frau Dr. rer. nat. Ranjita Shegokar, Pharmakologin.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig mit Unterstützung durch Herrn Dr. Frank-Jürgen Weinreich durchgeführt. Die Atomabsorptionsspektroskopie von Cisplatin wurde in einem externen Labor (Dr. Eberhard & Partner, Dortmund) durchgeführt.

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

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

Tübingen, den 28. September 2021

Helen Keck

8. Veröffentlichungen

Teile der Dissertation wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Keck, H. S., Weinreich, F. J., Shegokar, R., Konigsrainer, A., Reymond, M. A., & Nadiradze, G. (2021). Experimental evaluation of icodextrin delivery as pressurized aerosol (PIPAC): Antiadhesive and cytotoxic effects. *Eur J Surg Oncol*, 47(6), 1434-1440. doi:10.1016/j.ejso.2021.02.012

9. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. med Alfred Königsrainer für die Möglichkeit der Mitarbeit in diesem interessanten wissenschaftlichen Projekt und für die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere Prof. Dr. med. Marc Reymond für das zu Wege bringen dieses Projekts, die methodologische Planung und vor allem auch strukturierte und aufmerksame Betreuung dieser Dissertation. Die Einbindung in die interdisziplinäre Arbeitsgruppe des Nationalen Zentrums für Pleura und Peritoneum (NCP) gab mir viele interessante Einblicke in die translationale Forschung, dabei fühlte ich mich als Mitglied stets wertgeschätzt.

Für die wissenschaftliche Mitbetreuung, die gewissenhafte Einarbeitung im Labor und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Frank-Jürgen Weinreich bedanken. Insbesondere war seine Kompetenz als Biochemiker und seine lange Erfahrung in zellbiologischen Versuchen in Kombination mit Zytostatika für den Erfolg meiner Experimente entscheidend.

Außerdem möchte ich meinen Dank gegenüber Dr. rer. nat. Ranjita Shegokar aussprechen, die als Pharmakologin bei der Planung der Experimente stets hilfreiche Ratschläge hatte und für Fragen immer verfügbar war.

Vielen Dank auch an Oberarzt Dr. med. Giorgi Nadiradze, der die Brücke zu Patientinnen und Patienten für mich gebaut hat, und mich in meiner Motivation, Chirurgin zu werden, bestärkt hat.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie sowie Freundinnen und Freunden, die mich durch diese oft herausfordernde Zeit getragen haben, offene Ohren für meine Sorgen und Bedenken hatten und mich immer ermutigt haben, weiterzumachen.