

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
Universität des Saarlandes
Homburg / Saar
Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger

**HEPATO-ARTERIELLE INFUSION UND SYSTEMISCHE
APPLIKATION VON CETUXIMAB, OXALIPLATIN UND
IRINOTECAN**

**Ein Vergleich der Wirkung der lokoregionären und der
systemischen Therapie auf CC531 kolorektale
Lebermetastasen im Rattenmodell**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2013

vorgelegt von
Anna Benz-Weißer
geboren am 08.07.1985 in Semipalatinsk/Kasachstan

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
1.1	Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab, Oxaliplatin und Irinotecan in einem Rattenmodell kolorektaler Lebermetastasen	1
2	Abstract	3
2.1	Hepatic arterial infusion and systemic application of cetuximab, oxaliplatin and irinotecan in a rat model of colorectal liver metastases	3
3	Einleitung	5
3.1	Das kolorektale Karzinom	5
3.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Inzidenz	5
3.1.2	Lebermetastasen	5
3.2	Therapieoptionen	6
3.2.1	Leberresektion	6
3.2.2	Systemische Chemotherapie	6
3.2.3	Hepato-arterielle Infusion	7
3.3	Zytostatika	9
3.3.1	Cetuximab	9
3.3.2	Oxaliplatin	14
3.3.3	Irinotecan	17
4	Ziel der Studie	21
4.1	Fragestellungen	21
5	Material und Methoden	23
5.1	Versuchstiere	23
5.2	Tumor	23
5.3	Bindung von Cetuximab an CC531 kolorektale Lebermetastasen	24
5.4	Tumorimplantation	24

INHALTSVERZEICHNIS

5.5	Modell	26
5.5.1	Anästhesie und Laparotomie	26
5.5.2	Chirurgische Präparation und hepato-arterielle Infusion	26
5.5.3	Chirurgische Präparation und systemische Infusion	27
5.6	Zytostatikadosierungen	29
5.6.1	Cetuximab	29
5.6.2	Oxaliplatin	29
5.6.3	Irinotecan	29
5.7	Dreidimensionale (3D) - Sonographie	29
5.8	Untersuchungsmethoden	31
5.8.1	Hämatologische Parameter und Enzymaktivitäten	31
5.8.2	Histologie	32
5.9	Experimentelles Protokoll	36
5.9.1	Protokoll der hepato-arteriellen Infusion	36
5.9.2	Protokoll der systemischen Infusion	37
5.10	Statistik	37
6	Ergebnisse	39
6.1	Bindung von Cetuximab an CC531 kolorektale Lebermetastasen	39
6.2	Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuxi- mab und Oxaliplatin	40
6.2.1	Körpergewicht	40
6.2.2	Tumorvolumen	40
6.2.3	Proliferation	41
6.2.4	Apoptose	42
6.2.5	Angiogenese	43
6.2.6	Blutbild	44
6.2.7	Leukozyteninfiltration	47
6.2.8	Zellschädigung	48
6.2.9	Venolenschädigung	49
6.2.10	Leberenzyme	50
6.3	Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuxi- mab und Irinotecan	54
6.3.1	Körpergewicht	54
6.3.2	Tumorvolumen	54
6.3.3	Proliferation	55
6.3.4	Apoptose	56
6.3.5	Angiogenese	56

6.3.6	Blutbild	57
6.3.7	Leukozyteninfiltration	59
6.3.8	Zellschädigung	60
6.3.9	Venolenschädigung	61
6.3.10	Leberenzyme	62
7	Diskussion	65
7.1	Diskussion von Material und Methoden	65
7.1.1	Chirurgische Präparation und Tumorimplantation	65
7.1.2	Systemische Chemotherapie und hepato-arterielle Infusion	66
7.1.3	Untersuchungsmethoden	69
7.2	Diskussion der Ergebnisse	70
7.2.1	Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab und Oxaliplatin	70
7.2.2	Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab und Irinotecan	74
7.3	Schlussfolgerung	77
	Abkürzungsverzeichnis	79
	Literaturverzeichnis	83
	Danksagung	99
	Publikationen	101

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1 Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab, Oxaliplatin und Irinotecan in einem Rattenmodell kolorektaler Lebermetastasen

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten malignen Erkrankungen in der westlichen Welt. Metastasiert ein kolorektales Karzinom, so ist bevorzugt die Leber betroffen. Das Auftreten von Lebermetastasen bestimmt im Wesentlichen die Prognose des Patienten. Eine R0-Resektion stellt nach wie vor den einzigen kurativen Therapieansatz dar und ist in nur 10%-20% der Fälle möglich. Bei Irresektabilität ist die systemische Chemotherapie (SYS) der Goldstandard in der Behandlung hepatischer Metastasen. Die Verwendung von Oxaliplatin, Irinotecan und Cetuximab bildet dabei einen festen Bestandteil der Therapie. Auch die hepato-arterielle Infusion (HAI) zeigte gute Ergebnisse und könnte eine Alternative zur systemischen Therapie in der Behandlung hepatischer Metastasen werden.

In der vorliegenden Studie wurde die antitumorale Wirkung der Chemotherapeutika Cetuximab, Oxaliplatin und Irinotecan, hepato-arteriell oder systemisch appliziert, auf Lebermetastasen im Rattenmodell untersucht. Hierzu wurde 72 männlichen WAG/Rij Ratten ein Tumor der CC531-Zelllinie subkapsulär in den linken Leberlappen injiziert. Die Tiere wurden in zwei Behandlungsgruppen, HAI und SYS, randomisiert und mit verschiedenen Medikamenten oder Medikamentenkombinationen (Cetuximab, Cetuximab+Oxaliplatin, Cetuximab+Irinotecan, Oxaliplatin und Irinotecan) behandelt. Als Kontrolltiere dienten mit NaCl behandelte Tiere.

Die HAI von Cetuximab führte im Vergleich zur systemischen Applikation zu einer Größenreduktion des Tumors (-11% vs. +53%, $p < 0,05$) und gesteigerter Apoptoseaktivität ($7,1 \pm 0,9$ Zellen/HPF vs. $3,0 \pm 0,9$ Zellen/HPF, $p < 0,05$) sowie einer nicht signifikanten Abnahme der Proliferation. Dagegen war die systemische Gabe von Cetuximab im Vergleich zur HAI von einer signifikant verminderten Angioge-

1. ZUSAMMENFASSUNG

nese begleitet ($3,7 \pm 0,1$ Zellen/HPF vs. $5,1 \pm 0,6$ Zellen/HPF, $p < 0,05$). Die HAI von Oxaliplatin zeigte eine signifikante Verminderung der Angiogenese im Vergleich zur systemischen Infusion ($3,9 \pm 0,5$ Zellen/HPF vs. $6,6 \pm 0,5$ Zellen/HPF, $p < 0,05$). Zusätzlich trat eine Reduktion des Tumorumens und eine tendenzielle Erhöhung der Apoptoserate ein, jedoch ohne Signifikanz zur systemischen Gabe. Verglichen mit einer systemischen Gabe war die HAI der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin mit einer Reduktion der Tumorgröße (-2% vs. +50%, $p < 0,05$) und einer Erhöhung der Apoptoserate assoziiert ($7,4 \pm 2,0$ Zellen/HPF vs. $2,7 \pm 0,5$ Zellen/HPF, $p < 0,05$). Zudem wurde die Angiogenese in beiden Behandlungsformen durch die Kombination am stärksten inhibiert. Die HAI führte zu einem insgesamt höheren Anstieg von γ GT, GLDH, LDH und den Transaminasen, insbesondere nach der Behandlung mit Oxaliplatin und der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin.

Die HAI der Kombination von Cetuximab und Irinotecan führte zu einer Abnahme der Tumorgröße im Vergleich zur systemischen Infusion dieser Kombination (+21% vs. +94%, $p < 0,05$). Dabei erreichte die systemische Infusion von Cetuximab und Irinotecan fast eine Verdopplung des Volumens und somit eine signifikante Größenzunahme im Vergleich zur systemischen Kontrollgruppe (+94% vs. +41%, $p < 0,05$). Zusätzlich war die HAI von Irinotecan sowie der Kombination von Irinotecan und Cetuximab mit einer erhöhten Apoptoserate im Vergleich zur systemischen Gabe dieser Medikamente verbunden, die jedoch nicht signifikant war. Die HAI der Kombination erreichte dabei gering höhere Apoptose-Werte. Auch hier zeigten die Leberenzyme nach einer HAI einen tendenziellen Anstieg.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Studie eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums durch die HAI von Cetuximab und der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin gegenüber der systemischen Applikation gezeigt werden. Die HAI von Irinotecan zeigte keinen, die HAI der Kombination von Cetuximab und Irinotecan einen geringen Vorteil.

2. ABSTRACT

2.1 Hepatic arterial infusion and systemic application of cetuximab, oxaliplatin and irinotecan in a rat model of colorectal liver metastases

The colorectal carcinoma represents one of the most frequent malignancies in the western world. Thereby the liver remains the predominant site of colorectal metastases. The occurrence of liver metastasis essentially affects the prognosis of patients. However, in only 10%-20% of the cases, a R0 resection is feasible. Until today surgical resection represents the only reliable curative approach. In case of inresectable disease systemic chemotherapy is the gold standard in the treatment of hepatic metastases. In this context oxaliplatin, irinotecan and cetuximab form an integral part of the therapy. However, hepatic arterial infusion (HAI) has shown encouraging results and might be an alternative to systemic therapy in the treatment of hepatic metastasis.

In the present study, the antitumor effect of the chemotherapeutic agents cetuximab, oxaliplatin and irinotecan, given either via hepatic arterial infusion or as systemic infusion, was investigated. Therefore, CC531 colorectal cancer cells were injected subcapsularly in the left liver lobe of 72 male WAG/Rij rats. The animals were randomized in two treatment groups, HAI or SYS, and underwent infusion of cetuximab, oxaliplatin or irinotecan alone, or of the combination of cetuximab and oxaliplatin or cetuximab and irinotecan. Saline-treated animals served as controls.

Compared to systemic infusion, HAI of cetuximab reduced the tumor size (-11% vs. +53%, $p < 0,05$), increased the number of apoptotic cells ($7,1 \pm 0,9$ cells/HPF vs. $3 \pm 0,9$ cells/HPF, $p < 0,05$), and reduced tumor proliferation. In contrast, systemic infusion of cetuximab was accompanied by a significantly reduced tumor vascularization compared to HAI ($3,7 \pm 0,1$ cells/HPF vs. $5,1 \pm 0,6$ cells/HPF, $p < 0,05$). HAI of oxaliplatin showed a significant reduction of angiogenesis compared to systemic infusion ($3,9 \pm 0,5$ cells/HPF vs. $6,6 \pm 0,5$ cells/HPF, $p < 0,05$). In addition, there was

2. ABSTRACT

also a slight reduction of tumor size as well as a slight increase of the number of apoptotic cells compared to systemic infusion. HAI of cetuximab and oxaliplatin was associated with a reduction of tumor size (decrease of 2% vs. increase of 50%, $p < 0,05$) and an increase of the number of apoptotic cells ($7,4 \pm 2,0$ cells/HPF vs. $2,7 \pm 0,5$ cells/HPF, $p < 0,05$) compared to systemic infusion. Moreover, angiogenesis was most inhibited by the combination of cetuximab and oxaliplatin in both treatment groups. HAI led to an overall higher increase of γ GT, GLDH, LDH and transaminases, particularly after treatment with oxaliplatin and the combination of cetuximab and oxaliplatin.

HAI of the combination of cetuximab and irinotecan reduced the tumor size compared to systemic infusion (+21% vs. +94%, $p < 0,05$). Of interest, systemic infusion of cetuximab and irinotecan resulted in an almost doubling of the tumor size and thus a significant increase in size when compared to the systemic control group (+94% vs. +41%, $p < 0,05$). Additionally, HAI of irinotecan and of the combination of irinotecan and cetuximab was associated with a slight increase of the number of apoptotic cells compared with systemic infusion. Thereby, HAI of combination of cetuximab and irinotecan achieved higher number of apoptotic cells. Liver enzymes tended to increase after HAI as well.

In summary, the present study demonstrates an advantage of HAI of cetuximab and the combination of cetuximab and oxaliplatin compared to systemic application. HAI of irinotecan showed no benefit and HAI of the combination of cetuximab and irinotecan showed also a slight advantage.

3. EINLEITUNG

3.1 Das kolorektale Karzinom

3.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Inzidenz

In den letzten 50 Jahren stieg die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms beachtlich. Weltweit werden jährlich rund eine Million neuer Fälle diagnostiziert, sowie ca. 500 000 Todesfälle. Das kolorektale Karzinom gehört zu der zweithäufigsten malignen Erkrankung in beiden Geschlechtern. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland wird vom Robert Koch-Institut für Männer auf über 36 000 und für Frauen auf etwa 32 000 geschätzt [Robert Koch-Institut 2010].

Ätiologisch handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Bei der Entstehung eines kolorektalen Karzinoms nehmen vor allem Essgewohnheiten, Konsum von Alkohol/Tabak und genetische Faktoren Einfluss auf die Karzinogenese [Botteri et al. 2008; Ströhle et al. 2007]. Die beiden erblichen Formen sind die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC). Zu den Risikogruppen gehören weiterhin Patienten mit Colitis ulcerosa und Morbus Crohn.

Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt bei einem Alter zwischen 60 und 70 Jahren [Robert Koch-Institut 2010].

3.1.2 Lebermetastasen

Die Leber stellt für das kolorektale Karzinom infolge hämatogener Streuung über die Pfortader den häufigsten Metastasierungsort dar [Kemeny 2006].

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung haben bereits 25% der Patienten synchrone Lebermetastasen. Abhängig vom Stadium des Primärtumors entwickeln 50%-70% aller Betroffenen innerhalb der folgenden drei Jahre ihrer Erkrankung Lebermetastasen [Wanebo et al. 2010]. Bei nahezu 40% der Patienten ist die Leber der einzige Metastasierungsort [Konopke et al. 2003].

3. EINLEITUNG

Unbehandelt beträgt die Überlebenszeit von Patienten mit Lebermetastasen im Mittel zwischen 6 und 12 Monaten. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei $<5\%$ [Wanebo et al. 2010]. Bei inoperablen Lebermetastasen bilden der körperliche Allgemeinzustand, das Ausmaß des Leberbefalls, abnormale Laborwerte und Sitz des Primärtumors unabhängige Prognosefaktoren für den Verlauf der Erkrankung. Demzufolge können bei gutem Allgemeinzustand und normalen Leberwerten 1-Jahres-Überlebensraten von 46% erreicht werden. Die Todesursache liegt meist in einem Leberversagen infolge der hepatischen Metastasierung [Konopke et al. 2003].

3.2 Therapieoptionen

3.2.1 Leberresektion

Die operative Entfernung von Lebermetastasen stellt nach wie vor den einzigen kurativen Therapieansatz dar. Chirurgisch entscheidend ist die Möglichkeit einer R0-Resektion. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei primärer, aber auch bei wiederholter Metastasenresektion weiterhin 27%-41% [Bechstein et al. 2005; Mandalà et al. 2007]. Die operative Mortalität liegt dabei bei 1-2% [Grundmann 2011]. Eine weitere Prognoseverbesserung ist durch eine Konversion irresektabler Metastasen in chirurgisch resezierbare Metastasen zu erreichen. Dafür stehen neoadjuvante Chemotherapiekonzepte sowie zahlreiche regionale Verfahren zur Verfügung. Dennoch kann bei nur 10%-20% der Patienten mit Lebermetastasen eine Resektion durchgeführt werden [Vibert et al. 2005]. Diesem kleinen Teil von Patienten, welcher von einer alleinigen kurativen chirurgischen Therapie profitiert, steht ein Großteil von Patienten gegenüber, der im weiteren Verlauf einer palliativen systemischen oder lokoregionalen Chemotherapie bedarf.

3.2.2 Systemische Chemotherapie

Viele Jahre war Fluorouracil (5-FU) in Kombination mit Leucovorin (LV) die Standardtherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms und erzielte eine Ansprechrate von 20%-30% sowie eine mittlere Überlebenszeit von 11-12 Monaten [Kemeny 2006]. Durch eine Kombination von 5-FU und LV mit neuen Medikamenten, wie Irinotecan (FOLFIRI) und Oxaliplatin (FOLFOX), konnte die Ansprechrate auf 33%-62% angehoben werden. Die mittlere Überlebenszeit stieg auf 18-20 Monate [Cunningham et al. 2004]. Auch die Verwendung monoklonaler Antikörper zusätzlich zur Chemotherapie brachte eine Verbesserung der Ergebnisse. Durch die Zugabe von Cetuximab zu FOLFOX oder FOLFIRI wuchs die Ansprechrate von 33% auf

49% und die Zugabe von Bevacizumab zu Irinotecan/Bolus 5-FU/LV (IFL) ergab einen Anstieg der Ansprechrate von 35% auf 45% [Alberts et al. 2008].

Diese Entwicklungen veränderten die Zielsetzungen der systemischen Chemotherapie in der Behandlung kolorektaler Lebermetastasen. Es wird nun nicht mehr der palliative Ansatz verfolgt, sondern vielmehr die Maximierung des klinischen Benefits, d.h. die Verlängerung der Überlebenszeit, die Verbesserung der Ansprechrate und das Downsizing von Tumoren, welches eine Resektion ermöglichen kann.

Die erste Studie zur Untersuchung des Stellenwertes einer neoadjuvanten Therapie bei nicht resezierbaren Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms führten Bismuth et al. durch. In der retrospektiven Studie wurden 434 Patienten mit nicht resezierbaren Lebermetastasen durch eine systemische Gabe von Oxaliplatin, 5-FU und LV behandelt. Nach der Behandlung konnten 14% der Lebermetastasen sekundär reseziert werden. Die 5-Jahres-Überlebensrate der resezierten Patienten lag bei 40% [Bismuth et al. 1996].

Trotz dieser Fortschritte in der systemischen Therapie bleibt das Gesamtüberleben von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom gering. Weniger als 5% der Patienten leben länger als 5 Jahre [Gallagher et al. 2007]. In Anbetracht dieser Zahlen, sollten weitere Behandlungsalternativen entwickelt werden.

3.2.3 Hepato-arterielle Infusion

Die Hepato-arterielle Infusion (HAI) stellt eine Möglichkeit der regionalen Chemotherapie dar, die sich auf verschiedene Eigenschaften von Lebermetastasen stützt. Zum einen bildet die Leber aufgrund hämatogener Streuung via portaler Zirkulation den häufigsten Metastasierungsort des kolorektalen Karzinoms. Zum anderen werden Metastasen ab einer Größe von 2-3mm hauptsächlich von der A. hepatica versorgt, während die Durchblutung des gesunden Leberparenchyms zu großen Teilen durch die V. porta erfolgt [Breedis et al. 1954]. Diese Tatsache ermöglicht höhere Konzentrationen der über die A. hepatica applizierten Zytostatika ohne gesunde Leberzellen zu schädigen. Zudem minimiert der first-pass Effekt der Leber, durch welchen das infundierte Medikament aus der A. hepatica extrahiert wird, die systemische Toxizität.

Die ersten Bemühungen kolorektale Lebermetastasen mit einer HAI zu therapieren kamen in den frühen 60ern des letzten Jahrhunderts auf. Sullivan et al. behandelten 16 Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinaler Tumore mit einer HAI. Zehn der Patienten sprachen objektiv auf die Therapie an und wiesen einen klinischen Benefit auf [Sullivan et al. 1964]. Die ersten Katheter, die für die HAI verwendet wurden, wurden chirurgisch oder perkutan eingesetzt und an eine exter-

3. EINLEITUNG

ne Infusionspumpe angeschlossen. Diese Behandlung führte allerdings zu verlängerten stationären Aufenthalten und es traten Komplikationen wie katheterassoziierte Thrombosen, Blutungen und Infektionen sowie Katheterdislokationen auf [Doci et al. 1990; Ensminger 2002]. Ein weiterer Ansatz war die Implantation von subkutanen Portsystemen, die aber ebenfalls eine hohe Ausfallquote zur Folge hatte [Wickremsekera et al. 2000]. Mit der Einführung implantierbarer Infusionspumpen in den späten 1970er Jahren konnten viele dieser Probleme gelöst werden. Diese Pumpe besitzt ein Reservoir, das perkutan mit einem großen Volumen gefüllt werden kann und somit eine ambulante Versorgung erlaubt. Heutzutage werden Pumpenkomplikationen in 22% der Fälle beobachtet. Dazu gehören Kathetherthrombosen oder -dislokationen, Infektionen, Thrombosen der A. hepatica, Gerätefehler und gastrische oder duodenale Ulzerationen. Mechanische Komplikationen, wie Pumpendislokationen, können jedoch mit steigender Erfahrung des Chirurgen signifikant verringert werden [Power et al. 2011].

Ursprünglich verwendeten Sullivan et al. Methotrexat als Chemotherapeutikum [Sullivan et al. 1964]. Spätere Untersuchungen konzentrierten sich auf 5-Fluorouracil (5-FU) und Floxuridin (FUDR) als antineoplastisches Agens. Ensminger et al. berichteten über eine höhere Leberextraktion von FUDR im Vergleich zu 5-FU [Ensminger et al. 1978]. Auch andere Chemotherapeutika, wie Mitomycin, Cisplatin und Doxorubicin, wurden mit einer HAI getestet, doch sie alle zeigten eine signifikant geringere Leberextraktion als FUDR und deshalb einen geringeren Vorteil gegenüber der systemischen Gabe [Cohen et al. 2003]. FUDR via HAI besitzt eine 95% Leberextraktionsrate, wodurch im Vergleich zur systemischen Gabe eine 16-fach höhere Konzentration im Tumorgewebe erreicht wird. Aus diesem Grund ist FUDR das meist verwendete Agens, das in Form einer HAI verabreicht wird.

Frühe Phase II Studien mit HAI-Gabe von 5-FU oder FUDR zeigten vielversprechende Resultate mit Ansprechraten von 29% - 88% und einem längeren Überleben im Vergleich zu historischen Kontrollen. Dies führte dazu, dass die HAI in einer Reihe von randomisierten Studien mit einer systemischen Therapie verglichen wurde.

Zwei Metaanalysen fassten die Ergebnisse der ersten sieben Studien zusammen. Fünf Studien verglichen die HAI von FUDR mit einer systemischen Infusion von entweder FUDR, 5-FU oder 5-FU/LV. Zwei europäische Studien verglichen die HAI von FUDR mit einer systemischen Infusion von 5-FU oder mit „Best Supportive Care“. Sie ermittelten einen kleinen, aber signifikanten Überlebensvorteil der HAI gegenüber der systemischen Infusion [Cancer 1996; Harmantas et al. 1996]. Seither wurden drei weitere randomisierte Studien veröffentlicht. Mocellin et al. fassten alle Studien von 1987 bis 2006 zusammen, die die HAI einer systemischen Therapie

gegenüberstellten. Sie zeigten eine höhere Ansprechrate des HAI-Arms (42,9% vs. 18,4%), jedoch keinen Vorteil des HAI-Arms in Bezug auf das Gesamtüberleben [Mocellin et al. 2009].

Die Vorteile einer systemischen Kombinationstherapie mit 5-FU, Irinotecan oder Oxaliplatin der 90er Jahre wurden auch in der regionalen Chemotherapie genutzt. Pasetto et al. liefern einen Überblick über die aktuelle Datenlage. Der Schwerpunkt der gegenwärtigen Forschung liegt bei der Kombination von HAI und systemischer Therapie und der Verwendung neuer Chemotherapeutika, wie z.B. Oxaliplatin und Irinotecan [Pasetto et al. 2006]. So ließ sich die HAI von Oxaliplatin mit i.v. LV und i.v. 5-FU als Bolus und Infusion nach Versagen einer systemischen Therapie durchführen. Nach neun Behandlungszyklen sprachen 62% der Patienten partiell an und 18% unterliefen danach einer R0-Resektion [Boige et al. 2008].

Es ist ersichtlich, dass die Stellung des Verfahrens noch nicht eindeutig geklärt ist. Durch die Einführung neuer Chemotherapeutika entwickeln sich viele neue Ansatzpunkte um die HAI-Ansprechraten und -Überlebenszeiten zu verbessern. In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurden Cetuximab, Oxaliplatin und Irinotecan jeweils hepato-arteriell oder venös appliziert und deren Wirkung auf hepatische Metastasen im Rattenmodell miteinander verglichen.

3.3 Zytostatika

3.3.1 Cetuximab

3.3.1.1 Historie

Monoklonale Antikörper sind Antikörper, die von einer auf einen einzigen B-Lymphozyten zurückgehenden Zelllinie (Zellklon) produziert werden und die sich gegen ein einzelnes Epitop richten.

Das therapeutische Potential von Antikörpern als „magic bullets“ (Zauberkügelchen), welche gezielt Krebszellen und Bakterien erkennen und diese von normalem Gewebe unterscheiden können, wurde von Paul Ehrlich bereits 1908 beschrieben. 1975 gelang Köhler und Milstein die Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit der Hybridomtechnik, wofür sie 1984 den Nobelpreis erhielten [Köhler et al. 1975]. In den ersten therapeutischen Anwendungen wurden monoklonale Antikörper verwendet, die in Mäusen produziert wurden (murine Antikörper). Die Injektion von murinen Antikörpern löste jedoch eine Immunreaktion aus und führte zur Bildung von Mensch anti-Maus Antikörpern (Human Anti-Mouse Antibodies, HAMA). Die Entdeckung der genetischen Basis für die Antikörperdiversität und die rekombinante

3. EINLEITUNG

DNA-Biotechnologie machten es möglich Maus-Antikörper in partiell humanisierte Formen zu bringen. Chimäre (variabler Teil aus Mausprotein), humanisierte (Antigenbindungsstellen aus Mausprotein) oder sogar vollständig humane monoklonale Antikörper sind weniger immunogen und induzieren in der therapeutischen Anwendung nur mit einer geringen Inzidenz anti-Immunglobulin Antikörper [Ross et al. 2003]. Dies führte in den letzten Jahren zur Etablierung monoklonaler Antikörper in der Therapie von Krebserkrankungen, rheumatischen Erkrankungen, Autoimmunität und Transplantatabstoßung.

Cetuximab ist ein chimärer Maus/Mensch-Antikörper und wurde erstmals 2004 für die Therapie von Patienten mit metastasierten und therapierefraktären kolorektalen Karzinomen zugelassen. Seit November 2008 ist Cetuximab zudem sowohl für die Behandlung von lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopfes und Halses (Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, SCCHN) als auch für die Behandlung von rezidivierten und/oder metastasierten SCCHN zugelassen.

3.3.1.2 Biochemie und Physiologie

3.3.1.2.1 Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Cetuximab ist ein monoklonaler chimärer Maus/Mensch-Antikörper, der mit hoher Affinität an die extrazelluläre Domäne des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) bindet und diesen hemmt. EGFR, eine Tyrosinkinase, ist ein Mitglied der ErbB-Familie, zu der neben HER1 (EGFR, ErbB 1) auch HER2/neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4) gezählt werden [Ng et al. 2004]. EGFR wurde als erstes ErbB-Familienmitglied beschrieben und ist bis heute der bestcharakterisierte Rezeptor dieser Familie. Epithelzellen und maligne Tumore epithelialen Ursprungs exprimieren EGFR. Im Gegensatz dazu wird EGFR nicht auf reifen hämatopoetischen Zellen exprimiert [Camp et al. 2005]. Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und der transformierende Wachstumsfaktor alpha (TGF α) bilden die wichtigsten Liganden des EGFR [Herbst 2004]. Eine Bindung der Liganden führt zu einer Dimerisierung des Rezeptors und einer Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Aktivität, die eine Autophosphorylierung des Rezeptors verursacht (Abb. 3.1). Darauf folgend können second-messenger gebunden werden. Dieser Vorgang regt eine intrazelluläre Signalkaskade an, die in einer Gen-Transkription endet. EGFR ist in der Lage sowohl eine Homodimerisierung als auch eine Heterodimerisierung mit einem anderen Mitglied der ErbB-Familie einzugehen. Die Heterodimerisierung erfolgt vorzugsweise mit HER2. Diese Verbindung ist stärker und mitogener [Graus-Porta et al. 1997]. Zu den am besten untersuchten intrazellulären Signalwegen gehören der Rat Sarcoma/mitogenaktivierte Proteinkinase-Weg (RAS/MapK), der

Phosphatidylinositol-3'-Kinase/Akt-Weg (PI3-K/Akt), Signal Transducers and Activators of Transkription (STAT)-Signalweg und der Phospholipase C-Proteinkinase-Weg (PLC_{γ}) [Marmor et al. 2004]. Die Aktivierung dieser Wege beeinflusst die Zellproliferation, Apoptose, Motilität und Angiogenese mit ansteigender Produktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), welche letztendlich das maligne Zellwachstum und die Metastasierung fördern [Chan et al. 1999].

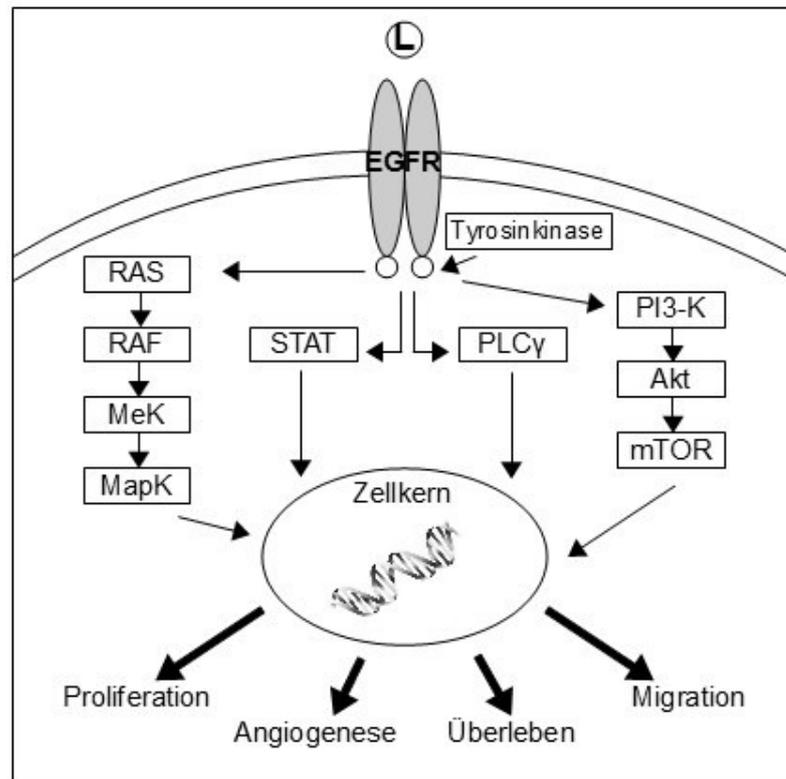


Abb. 3.1: Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR). Die Bindung eines Liganden bewirkt eine Homo- oder Dimerisierung des EGFR und aktiviert intrazelluläre Signalwege. L=Ligand, MapK=mitogenaktivierte Proteinkinase, PI3-K=Phosphatidylinositol-3'-Kinase, PLC γ =Phospholipase C γ , STAT=Signal Transducers and Activators of Transkription; RAS=Rat Sarcoma.

EGFR hemmt durch multiple Mechanismen die Apoptose. Der EGFR-vermittelte Signalweg via PI3-K/Akt führt zu einer Aktivierung von Mdm2, einem wichtigen Inhibitor des Tumorsuppressorgens p53, und somit zu einer reduzierten p53-Aktivität [Haupt et al. 2003]. Die Aktivierung des PI3-K/Akt-Weges steigert ebenfalls die Expression des Hypoxie-induzierten Faktors-1 α , welcher wiederum die Expression des anti-apoptotischen Proteins Survivin erhöht. Dieser Effekt wurde in Brustkrebszellen, jedoch nicht in normalen Brustepithelzellen nachgewiesen [Peng et al. 2006]. Eine EGFR-abhängige MapK-Aktivierung beeinflusst auch die Balance

3. EINLEITUNG

der Bcl-2 Familienmitglieder indem es die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-x_L erhöht und das proapoptotische Protein BAD inaktiviert [Kari et al. 2003].

EGFR reguliert auch das DNA-Reparatursystem. Es stimuliert via des PI3-K-Weges die Phosphorylierung der DNA-abhängigen Proteinkinase, welche die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch nicht-homologe Rekombination vermittelt. Zusätzlich reguliert EGFR die Expression des DNA-Reperaturenzyms XRCC1 (X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1), welches an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt ist [Rodemann et al. 2007].

In Tumorzellen konnte eine Dysregulation im EGFR-Signalnetzwerk nachgewiesen werden, die Zellwachstum, Invasion, Zelladhäsion, Metastasierung und Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie steigert und dadurch das Tumorwachstum anregt. Als mögliche Mechanismen für eine verstärkte EGFR-Aktivität werden eine Überproduktion von EGFR, eine erhöhte Konzentration der Liganden, eine Abnahme des Rezeptorumsatzes und mutierte Rezeptoren mit Eigenaktivität diskutiert [Ng et al. 2004; Starling et al. 2004].

Das metastasierte kolorektale Karzinom exprimiert in 60%-80% der Fälle vermehrt EGFR. Diese Überexpression steht mit einer schlechteren Prognose, einem kürzeren progressionsfreien Intervall und einer Resistenz gegen Chemo- und Radiotherapie in Zusammenhang [Goldstein et al. 2001; Nicholson et al. 2001]. Es konnte auch eine Verbindung zwischen einer Überexpression von HER2 und einer geringeren Überlebensrate hergestellt werden [Nicholson et al. 2001].

EGFR stellt deshalb ein vielversprechendes Ziel in der Behandlung von kolorektalen Metastasen dar. In den letzten Jahren wurden einige Behandlungsalternativen, die in das EGFR-Signalnetzwerk eingreifen, entwickelt. Monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor gehören inzwischen zu den etabliertesten Behandlungsstrategien.

3.3.1.2.2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene (KRAS)

Das KRAS-Protein gehört zur RAS (Rat Sarkoma)-Proto-Onkogen-Familie, die aus kleinen GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) besteht. Drei verschiedene RAS-Proteine (HRAS [Harvey-RAS], KRAS [Kirsten-RAS], NRAS [Neuroblastom-RAS]) sind heute bekannt und ihre Expression ist gewebsspezifisch [Finkelstein et al. 1993]. Das für den EGFR wichtige KRAS-Protein ist an der inneren Membran lokalisiert und besitzt GTPase-Aktivität. Die Bindung eines Liganden am EGF-Rezeptor führt zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Aktivität, welche wiederum das KRAS-Protein durch Phosphorylierung aktiviert. Die Signaltransduktion erfolgt dann über RAF (Roof Abundant Factor), MeK (MAP-Kinase-ERK-Kinase) und

MapK (mitogenaktivierte Proteinkinase) und führt zur Transkription von Genen, die zu einer malignen Progression der Tumoren führen (Abb. 3.1).

Onkogene KRAS-Mutationen werden in etwa 40% der nicht familiär bedingten kolorektalen Karzinome (90% aller kolorektaler Karzinome) gefunden [Finkelstein et al. 1993]. Untersuchungen an Familien mit HNPCC zeigten, dass die Häufigkeit einer KRAS-Mutation bei hereditär bedingten Kolonkarzinom mit dem sporadisch auftretenden Kolonkarzinom vergleichbar ist [Oliveira et al. 2004]. Metastasen kolorektaler Karzinome weisen mit einer hohen Übereinstimmung dieselben Mutationen auf wie ihre dazugehörenden Primärtumore. Die Mutationen reduzieren oder heben die intrinsische GTPase Aktivität, die für die Transformation vom aktiven in den inaktiven Zustand notwendig ist, auf. Dies führt zu einer dauerhaften Autoaktivierung des dem KRAS-Protein nachgeschalteten Signalweges [Ramos et al. 2008].

Im Jahre 2008 konnte gezeigt werden, dass 35-45% der kolorektalen Tumore eine KRAS-Mutation aufweisen und, dass diese Patienten nicht von einer Cetuximab-Therapie profitieren. Da eine Wirksamkeit von Cetuximab nur bei Tumoren mit einem KRAS-Wildtyp erwartet werden kann, ist die Analyse des KRAS-Mutationsstatus vor Beginn einer Cetuximab-Therapie sinnvoll [Garcia-Saenz et al. 2009].

3.3.1.3 Klinische und experimentelle Untersuchungen

In vitro Zellkultur-Experimente mit Cetuximab konnten zeigen, dass die Bindung an den EGFR die Tyrosinkinase-Aktivität und die davon abhängige Signaltransduktion hemmt. Auf diese Weise kommt es zur Hemmung der Proliferation und Migration sowie zu einer Steigerung der Apoptose in den Tumorzellen. Zusätzlich besitzt Cetuximab immunmodulierende Eigenschaften, wie die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität und die Komplementaktivierung [Lee et al. 2007]. In umfangreichen Studien an menschlichen Tumor Xenografts zeigte Cetuximab eine deutliche Verbesserung des Effektes von Chemo- und Radiotherapie [Mendelsohn et al. 2003].

Der Einsatz von Cetuximab allein oder in Kombination mit Irinotecan erbrachte erstmals in der BOND-Studie bei Irinotecan-resistenten Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom einen signifikanten klinischen Benefit [Cunningham et al. 2004]. Basierend auf dieser Pivot-Studie wurden weitere Studien gestartet, die zum Ziel hatten die Rolle von Cetuximab in der Behandlung des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms zu untersuchen. Diese Studien sind in einer Arbeit von Lee und Chu zusammengefasst [Lee et al. 2007]. Sie zeigen, dass Cetuximab effektiv und sicher für den Patienten mit einer Irinotecan- und Oxaliplatin-basierten Chemotherapie im Sinne einer first-line-Therapie kombiniert werden kann. Eine Arbeit von

3. EINLEITUNG

Gerber und Choy legt ihren Schwerpunkt auf die Kombination von Cetuximab mit first-line-Chemotherapeutika. Die Kombination verbessert die Wirkung der Therapie des kolorektalen Karzinoms, des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des rezidivierenden und/oder metastasierten Plattenepithelkarzinoms im Kopf-Halsbereich [Gerber et al. 2010].

Die häufigste Nebenwirkung ist ein akneähnlicher Ausschlag. Patienten, die diesen Ausschlag entwickeln sprechen besser auf die Therapie an und zeigen ein längeres Überleben [Ng et al. 2004].

Poggi et al. beobachteten 12 Patienten mit einem Sorafenib-refraktären fortgeschrittenen hapatozellulären Karzinom, die 4 Monate lang alle 14 Tage eine HAI mit Cetuximab, 5-Fluorouracil und Cisplatin erhielten. Es zeigten sich 5 partielle Remissionen, 5 stabile Erkrankungen und 2 Progressionen [Poggi et al. 2011]. Zudem wiesen sie eine gute Verträglichkeit der HAI von Cetuximab nach. In Bezug auf die Behandlung hepatischer Metastasen des kolorektalen Karzinoms lassen sich in der aktuellen Literatur keine Informationen zur hepato-arteriellen Infusion mit Cetuximab finden. Aufgrund seiner guten antitumorösen Wirkung stellt Cetuximab einen aussichtsreichen Ansatzpunkt zur Verbesserung der Behandlung des hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinoms dar.

3.3.2 Oxaliplatin

3.3.2.1 Historie

Oxaliplatin wurde in den 1970ern als eines von Dutzenden 1,2-diaminocyclohexan (1,2-DACH)-Platinverbindungen, mit der Absicht Platinanaloge mit einer besseren therapeutischen Breite zu finden, hergestellt [Connors et al. 1972]. Das Interesse an diesen Verbindungen wuchs weiter als Burchenal et al. die Wirkung von 1,2-DACH-Platinverbindungen an Cisplatin-resistenten L-1210 Leukämiezellen nachwiesen [Burchenal et al. 1977]. Kidani et al. gelang es die Verbindungen in geometrische Isomere, cis und trans, zu überführen und sie trennten darauf die trans-Form in zwei optische Isomere, trans-d und trans-l [Kidani et al. 1980]. Oxaliplatin, die trans-l DACH-Platinverbindung, war hydrophil und aktiv im L-1210 Tumormodell [Mathe et al. 1985]. Oxaliplatin wurde daraufhin in vielen europäischen Phase I und II Studien evaluiert. Die in vivo und in vitro Ergebnisse zeigten eine breite antiproliferative Wirkung [Caussanel et al. 1990; Extra et al. 1990; Rixe et al. 1996; Soulie et al. 1997]. Oxaliplatin wurde 1999 für die first-line-Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms in Deutschland zugelassen.

3.3.2.2 Biochemie und Physiologie

Oxaliplatin ist eine antineoplastische Substanz und gehört zu einer neuen Klasse von Platin-Derivaten, bei denen das Platin-Atom mit 1,2-Diaminocyclohexan (DACH) und einer Oxalatgruppe komplexiert ist. Die zytotoxische Wirkung von Oxaliplatin ist hauptsächlich auf die Bildung von DNA-Addukten zurückzuführen. Infolge der hohen Nukleophilie des Imidazolrings kommt es an der DNA bevorzugt zu Wechselwirkungen zwischen dem N7 des Guanins oder Adenins. Aufgrund der bifunktionalen Struktur der Mono- und Diaquakomplexe sind diese in der Lage zwei Nukleotide auf einem oder zwei DNA-Strängen miteinander zu vernetzen, wie in der Abbildung 3.2 dargestellt ist. Überwiegend werden Vernetzungen zwischen zwei benachbarten Guaninbasen innerhalb eines Stranges (Pt-GG) (Intrastrand) induziert. Ein geringerer Teil der DNA-Platinierung entfällt auf Addukte zwischen Guanin und Adenin (Pt-AG), noch weniger häufig werden Guaninbasen, die durch ein oder mehrere Nukleotide voneinander getrennt auf einem Strang (G-Pt-G) oder auf komplementären Strängen liegen (Interstrand), miteinander verknüpft [Raymond et al. 1998].

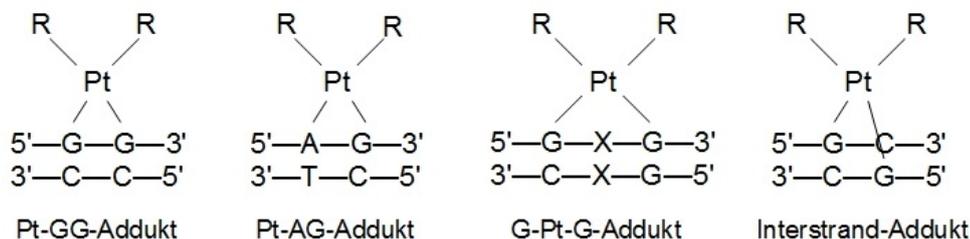


Abb. 3.2: Schematische Struktur der Platinaddukte.

Durch diese DNA-Platin-Quervernetzungen kommt es zum Abbruch der Replikation und Transkription, was schließlich zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose führt [Di Francesco et al. 2002].

Gourdier et al. konnten in ihrer Arbeit auch in enukleierten Zellen eine Oxaliplatin-vermittelte Apoptose auslösen, welche sie durch eine Bax/Bak-abhängige mitochondriale Apoptose begründeten. Das bedeutet, dass für die Wirkung von Oxaliplatin neben der DNA auch andere zelluläre Komponenten eine Rolle spielen könnten [Gourdier et al. 2004].

Oxaliplatin weist ein breiteres antitumoröses Spektrum als die Platin-Derivate Carboplatin und Cisplatin auf [Rixe et al. 1996]. Dieses lässt sich durch die Anwesenheit des DACH-Liganden erklären. Bei Oxaliplatin fungiert DACH als Carrierligand. Die DACH-Platin-Addukte sind sperriger als die Cisplatin-Addukte, wodurch

3. EINLEITUNG

eine Umgehung des Adduktes bei der Replikation erschwert wird. Dies hat eine effektivere Hemmung der DNA-Synthese zur Folge [Berg 2003]. Das im Vergleich zu Carboplatin und Cisplatin veränderte Aktivitätsspektrum wird auch auf die fehlende Interaktion mit dem DNA-Mismatch-Reparatur-System (MMR) zurückgeführt. Störungen im MMR-System, wie sie in Tumorzellen, insbesondere beim kolorektalen Karzinom häufig vorkommen, gelten als mögliche Ursache für Cis- und Carboplatin-Resistenzen. Oxaliplatin ist dagegen auch bei Tumoren mit MMR-Defekt aktiv [Raymond et al. 2002].

3.3.2.3 Klinische und experimentelle Untersuchungen

Fünf Phase II Studien evaluierten die antitumoröse Aktivität und Sicherheit von Oxaliplatin als Monotherapie. Es wurden sowohl chemotherapienaive als auch vorbehandelte Patienten mit einem metastasierten kolorektalen Karzinom eingeschlossen. Sie zeigten Ansprechraten von 10%-24% und ein mittleres Überleben von 8-14,5 Monaten [Becouarn et al. 1998; Diaz-Rubio et al. 1998; Levi et al. 1993; Machover et al. 1996]. Trotz dieser relativ guten Ergebnisse wird Oxaliplatin als Monopräparat nicht in der Behandlung des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms empfohlen, da LV, 5-FU oder Oxaliplatin in Kombination mit 5-FU oder Irinotecan eine größere antitumoröse Effektivität zeigen [Raymond et al. 2002].

Zwei europäische, multizentrische, randomisierte klinische Studien demonstrieren die Wirksamkeit von Oxaliplatin in Kombination mit 5-FU/LV im Vergleich zu 5-FU/LV in der Behandlung des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms. Giacchetti et al. konnten eine Erhöhung der Ansprechrate von 16% auf 53% zeigen. Auch das progressionsfreie Überleben verlängerte sich von 6,1 Monate auf 8,7 Monate. Das mittlere Überleben änderte sich nicht (19,9 Monate vs. 19,4 Monate). Dies lässt sich durch die Möglichkeit zum Gruppenwechsel erklären, da 57% der Patienten des 5-FU/LV-Arms in der second-line-Therapie eine Oxaliplatin-basierte Behandlung erhielten [Giacchetti et al. 2000]. Gramont et al. kamen im selben Jahr auf ähnliche Ergebnisse. Sie verglichen ebenfalls eine 5-FU/LV Therapie mit der Kombination von 5-FU/LV und Oxaliplatin. Die Ansprechraten (22% vs. 50%) und das progressionsfreie Überleben (6,2 Monate vs. 9 Monate) stiegen signifikant. Die Erhöhung des mittleren Überlebens war nicht signifikant (14,7 Monate vs. 16,2 Monate). Auch hier wechselten 37% der Patienten die Versuchsgruppe [Gramont et al. 2000]. Auffällig in beiden Studien war die schlechtere Verträglichkeit der 5-FU/LV/Oxaliplatin-Arms. Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe waren in beiden Studien die häufigsten Nebenwirkungen. Gramont et al. verzeichneten zusätzlich Neutropenie, Mukositis und reversible periphere Neuropathien. Allerdings konnten diese Nebenwirkungen

leicht gelindert werden, sodass die Behandlung mit Oxaliplatin eine gut verträgliche Option zur Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms darstellt.

Dzodic et al. führten im Tiermodell eine hepato-arterielle Infusion mit Oxaliplatin durch und stellten eine signifikante Erhöhung von Oxaliplatin im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Lebergewebe fest [Dzodic et al. 2004]. Dieses günstige pharmakokinetische Profil der HAI mit Oxaliplatin, wodurch die lokale Oxaliplatinkonzentration im Tumor erhöht wird, könnte die Wirksamkeit der Behandlung von Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms verbessern. Zudem beobachteten sie eine geringere Akkumulation von Oxaliplatin im peripheren Gewebe nach einer HAI im Vergleich zur i.v. Gabe. Durch die niedrigen peripheren Spiegel könnten die Nebenwirkungen gesenkt werden. Erste Vorstudien der HAI mit Oxaliplatin an Patienten waren vielversprechend, besonders in der Wirksamkeit und der fehlenden Hepatotoxizität [Ducreux et al. 2005; Kern et al. 2001]. In einer Studie von Boige et al. konnten 18% der initial inoperablen Patienten nach einer HAI mit Oxaliplatin und systemischer Gabe von 5-FU und LV reseziert werden [Boige et al. 2008].

3.3.3 Irinotecan

3.3.3.1 Historie

Irinotecan (CPT-11) gehört zu der Gruppe der Topoisomerase-Hemmer und ist ein semi-synthetisches Derivat des natürlich vorkommenden Pflanzeninhaltsstoffes Camptothecin. Camptothecin ist ein Alkaloid, welches aus dem chinesischen Straßenbaum *Camptotheca acuminata* isoliert und im Jahre 1966 von Wall et al. zum ersten Mal beschrieben wurde [Wall et al. 1966]. Aufgrund starker Nebenwirkungen wurden die klinischen Studien bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts eingestellt [Moertel et al. 1972; Muggia et al. 1972]. Wie sich erst später zeigte, war die Hydrophobie des Camptothecins ein wichtiger Grund für diese Nebenwirkungen. In den 1980ern führte diese Erkenntnis zu erneutem Interesse an diesem Medikament [Hsiang et al. 1985]. Zudem wurde eine erhöhte Topoisomerase I Konzentration im kolorektalen Karzinom im Vergleich zur Kolonmukosa gefunden [Giovannella et al. 1989]. Daraufhin wurden einige hydrophilere Derivate synthetisiert und klinisch getestet. Unter den gegenwärtig verfügbaren Camptothecin-Analoga wies Irinotecan in verschiedenen experimentellen Tumormodellen eine starke antitumoröse Wirkung auf bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zur original isolierten Struktur [Kunimoto et al. 1987]. Irinotecan ist seit 1998 in Deutschland für die first-line-Behandlung des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms zugelassen.

3.3.3.2 Biochemie und Physiologie

Irinotecan ist ein Prodrug und wird in der Leber von der Carboxylesterase (CE) in einen sehr aktiven Metaboliten 7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin (SN-38) hydrolysiert. Für SN-38 konnte in vitro eine bis zu 1000-fach stärkere Hemmung der DNA-Topoisomerase I nachgewiesen werden [Hofmann et al. 2005]. Jonsson et al. zeigten jedoch in einer Vergleichsstudie von Topotecan, Irinotecan und SN-38, dass nur Irinotecan in kolorektalen Karzinom-Proben Wirkung besaß. In vivo war SN-38 in soliden gastrointestinalen Tumoren nahezu wirkungslos [Jonsson et al. 2000].

Irinotecan und SN-38 interagieren mit dem Topoisomerase I-DNA Komplex und haben eine S-Phasen-spezifische Zytotoxizität. Die Topoisomerase wirkt dem Supercoiling der DNA bei der Transkription und Replikation entgegen, indem es Einzelstrangbrüche verursacht. Der reversible Topoisomerase I-Irinotecan-DNA Komplex ist allein nicht letal für die Zelle. Erst die Kollision des Komplexes mit der Replikationsgabel während der Replikation führt zu einem irreversiblen DNA-Doppelstrangbruch [Liu et al. 2000] und einem G2-Zellzyklusarrest [Shao et al. 1999]. Dies führt zur Apoptose. In hohen Konzentrationen kann Irinotecan auch Zellen, die sich nicht in der S-Phase befinden, schädigen. Die Wirkung scheint in der Schädigung der DNA während der Transkription und der dadurch resultierenden Apoptose zu liegen [Morris et al. 1996].

Irinotecan unterliegt komplexen Metabolisierungsvorgängen in der Leber. Es wird von der Carboxylesterase zu SN-38 hydrolysiert. SN-38 kann von der hepatischen UDP-Glucuronosyltransferase (UDP-GT, UGT1A1) zu SN-38G glucuronidiert und dadurch inaktiviert werden. Im Darm kann SN-38G durch von Bakterien produzierte β -Glucuronidase wieder aktiviert und durch den enterohepatischen Kreislauf reabsorbiert werden. Das im Darm entstehende SN-38 ist toxisch für die Darmepithelien und führt zur Diarrhoe [Gupta et al. 1994]. Zusätzlich kann Irinotecan von dem Enzym CYP3A4 zu verschiedenen pharmakologisch inaktiven Oxidationsprodukten umgewandelt werden. Die Mitwirkung von verschiedenen Enzymen in der Metabolisierung von Irinotecan, wie den UGT-Isoformen und CYP3A4, stellt einen wichtigen Grund für die interindividuellen Nebenwirkungen und Resistenzen dar [Mathijssen et al. 2001]. Die häufigsten Nebenwirkungen sind Diarrhoe und Leukopenie. Zu den Risikofaktoren für die Entwicklung einer schwerwiegenden Leukopenie wird der homozygote Genotyp der UGT1A1*28 gezählt. Eine dadurch resultierende verminderte Glucuronidierung führt zur erhöhten Exposition des Patienten mit dem toxischen SN-38 [Innocenti et al. 2009].

3.3.3.3 Klinische und experimentelle Untersuchungen

Die antitumoröse Wirkung von Irinotecan wurde, wie in der Historie dargestellt, in vielen experimentellen und klinischen Studien nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe um Rothenberg konnte eine Signifikanz im Hinblick auf die Einzelaktivität des Irinotecans gegen das kolorektale Karzinom, welches trotz einer Behandlung mit 5-FU fortschritt, feststellen [Rothenberg et al. 1996]. Zwei große multinationale, randomisierte, kontrollierte klinische Studien zeigten die Überlegenheit von Irinotecan in Kombination mit 5-FU gegenüber 5-FU alleine. In der Studie von Douillard et al. stieg die Ansprechrate durch Zugabe von Irinotecan zu 5-FU/LV von 22% auf 35%. Das progressionsfreie Intervall (4,4 Monate vs. 6,7 Monate) sowie das mittlere Überleben (14,1 Monate vs. 17,4) wuchsen ebenfalls [Douillard et al. 2000]. Fünf Jahre später bestätigten Kohne et al. diese Ergebnisse. Die Ansprechrate stieg in der Gruppe, die zusätzlich mit Irinotecan behandelt wurde, auf 62,2%. Im 5-FU/LV-Arm betrug sie lediglich 34,4%. Das progressionfreie Intervall im 5-FU/LV-Arm war 6,4 Monate, in der Irinotecan-Gruppe 8,5 Monate. Das mittlere Überleben stieg von 16,9 Monate auf 20,1 Monate [Kohne et al. 2005].

In einer Studie von 2004 verlängerte die Infusion einer Kombination von 5-FU/LV und Oxaliplatin (FOLFOX, FOL=folnic acid (Leukovorin, LV), F=Fluorouracil (5-FU), OX=Oxaliplatin) im Vergleich zur Bolusgabe von 5-FU/LV und Irinotecan (IFL) das mittlere Überleben signifikant [Goldberg et al. 2004]. Diese Ergebnisse führten dazu, dass in vielen Ländern das FOLFOX-Regime als first-line-Therapie präferiert wurde. Allerdings wurde das Studiendesign kritisiert, da die Patienten im FOLFOX-Arm mit 5-FU/LV-Infusionen behandelt wurden und die Patienten im IFL-Arm eine wöchentliche Bolusgabe von 5-FU/LV erhielten. Um diesen Kritikpunkt direkt zu untersuchen, führten Tournigand et al. eine weitere Studie durch. Die Patienten erhielten in jeder Versuchsgruppe 5-FU/LV-Infusionen und Oxaliplatin (FOLFOX) oder Irinotecan (FOLFIRI, FOL=folnic acid (Leukovorin, LV), F=Fluorouracil (5-FU), IRI=Irinotecan). Das mittlere Überleben, das progressionsfreie Überleben und die Ansprechrate waren in der FOLFOX- und in der FOLFIRI-Gruppe vergleichbar [Tournigand et al. 2004]. Es unterschieden sich lediglich die Toxizitätsprofile. Im FOLFIRI-Arm überwog Mukositis, Übelkeit/Erbrechen und Alopezie, im FOLFOX-Arm Neutropenie und sensorische Neuropathien. Basierend auf diesen Ergebnissen und denen anderer vergleichbarer Studien kann geschlossen werden, dass weder Irinotecan noch Oxaliplatin einen Vorrang in Bezug auf die Wirksamkeit in der first-line-Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms besitzt. Heute gilt sowohl das FOLFOX- als auch das FOLFIRI-Schema als Goldstandard in der first-line-Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms

3. EINLEITUNG

[Koopman et al. 2009].

Die hepato-arterielle Infusion von Irinotecan wurde in ersten Studien untersucht. Die Daten zeigten eine gute antitumoröse Wirkung mit niedriger Toxizität [Pasetto et al. 2006]. Es sind jedoch noch weitere Studien erforderlich, die die Wirkung von Irinotecan via HAI eruieren.

4. ZIEL DER STUDIE

4.1 Fragestellungen

Das Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, den Effekt der hepatoarteriellen Infusion (HAI) bzw. der systemischen Infusion (SYS) an einem Lebertumormodell in WAG/Rij-Ratten vergleichend zu untersuchen. Auf folgende Punkte wurde besonders eingegangen:

1. Welches Modell (HAI vs. SYS) ist technisch besser durchführbar und besitzt die geringeren systemischen Nebenwirkungen?
2. Besitzt die Gabe von Cetuximab in Form einer HAI bzw. SYS eine antitumoröse Wirkung auf CC531 kolorektale Lebermetastasen?
3. Ist eine HAI mit Cetuximab im Hinblick auf die Verträglichkeit und Hepatotoxizität durchführbar?
4. Besteht ein Unterschied in Bezug auf die antitumoröse Wirkung zwischen den beiden Applikationsmodellen?
5. Beeinflusst die Kombination von Cetuximab mit Oxaliplatin oder Irinotecan den antitumorösen Effekt?

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Behandelt wurden 72 männliche WAG/Rij Ratten (Charles River, Sulzfeld, BRD) mit einem Gewicht von 300-350g, welches einem Alter von 10-12 Wochen entsprach. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Tiere in der konventionellen Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar bei 22°C Raumtemperatur und 55% ± 10% Luftfeuchtigkeit gehalten. Dort waren sie einem 12 Stunden Hell-Dunkelrhythmus ausgesetzt und wurden mit Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, BRD) und Wasser ad libitum versorgt.

5.2 Tumor

Es wurden Tumorzellen der Zelllinie CC531 (CLS; Cell Lines Service and Tumor-Cellbank; Heidelberg, BRD) verwendet. Dabei handelt es sich um ein rattenspezifisches Kolonkarzinom.

Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei -180°C in 1,8ml Kryogefäßen (Nunc, Roskilde, DK) asserviert. Zur Kultivierung wurden sie in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach einer Desinfektion der Oberfläche des Gefäßes mit 70% Isopropanol erfolgte die Übertragung der Zellen in ein 50ml Zentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe, BRD), das FCS-haltiges Nährmedium (FCS; Foetal Calf Serum; Gold, PAA, Cölbe, BRD) enthielt. Die Zellen wurden zwei mal bei 1600U/min für fünf Minuten zentrifugiert (Universal 30 F; Hettich, Tuttlingen, BRD), in eine Petrischale überführt und im Brutschrank bei 37°C in RPMI 1640 Medium (PAA) und unter 5% CO₂-Atmosphäre verwahrt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag erneuert. Die Passagierung erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 70% - 80%.

Vor der Verwendung der Zellen für die Tumorimplantation mussten sie folgendermaßen aufbereitet werden:

5. MATERIAL UND METHODEN

Die Zellen wurden zunächst von der Petrischale gelöst, indem sie mit 3ml Trypsin/EDTA-Lösung (PAA) für fünf Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die gelösten Zellen wurden anschließend in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben, das eine bereits vorgelegte Lösung mit 10ml 10% PBS (Phosphat Buffered Solution; PAA) und 10% FCS enthielt. Es folgte ein Waschen der Zellen, d.h. Zentrifugation bei 2000 U/min für fünf Minuten, Absaugen des Überstandes, Resuspension des Zellpellets mit 10ml PBS und nochmaliger fünfminütiger Zentrifugation bei 2000 U/min. Die Vitalität der Zellen wurde mit Trypanblau geprüft. Trypanblau dringt durch die geschädigte Zellmembran toter Zellen ein und färbt das Zytoplasma und den Kern blau an. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Leica DMIL, Solms, BRD) bei einer 100×Vergrößerung (Objektiv Leica C Plan 10×/0,22, PH1, Okular Leica 10×/18) in der Neubauer-Zählkammer, die auf $5 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$ PBS eingestellt war.

5.3 Bindung von Cetuximab an CC531 kolorektale Lebermetastasen

Vor der Verwendung des chimären Antikörpers Cetuximab im Rattenmodell wurde die Bindung des Antikörpers auf der Oberfläche der Tumorzellen der Zelllinie CC531 durch eine immunzytochemische Fluoreszenzfärbung überprüft. Hierfür wurden CC531-Zellen zunächst mit 4%igem phosphatgepuffertem Formalin fixiert und zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen mit 1%igem Eselserum inkubiert. Daraufhin folgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper Cetuximab für 2 Stunden bei 37°C. Als Sekundärantikörper diente ein Cy-3-konjugierter Esel anti-Human IgG Antikörper, mit welchem für 30 Minuten bei einer Konzentration von 1:50 inkubiert wurde (Jackson by Dianova GmbH, Hamburg, BRD). Die Zellkerne wurden mit $2 \mu\text{g/ml}$ Bisbenzimid angefärbt (Sigma, Taufkirchen, BRD). Die Darstellung der Zellen erfolgte durch ein Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX60, Olympus Optical, Company Ltd., Japan).

5.4 Tumorimplantation

Die Implantation der Tumorzellen fand in Äthernarkose statt (Äther für Narkose, Hoechst, Frankfurt/Main, BRD). Die Tiere wurden zunächst am Abdomen rasiert (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, BRD), gewogen und in Rückenlage mittels Pflasterstreifen auf einer Operationsplatte fixiert. Nach einer medianen Laparotomie wurde der linke Leberlappen mobilisiert und in die Transversalebene gebracht.

Eine Fixierung der Leber erreichte man mit Hilfe einer befeuchteten Kompresse, die unter der Leber platziert wurde. Danach erfolgte die Injektion der Tumorzellen mit einer 27G-Kanüle (Omnicon F, Braun, Melsungen, BRD) subkapsulär in die dorsale Seite des linken Leberlappens. Jede Injektion enthielt 5×10^5 Tumorzellen. Die Blutstillung gelang durch eine leichte Kompression der Einstichstelle mit einem Wattestäbchen (Fink&Walter GmbH, Merchweiler, BRD). Nach Reposition der Leber wurden die Wundränder mit einer fortlaufenden Hautnaht verschlossen (PDS 4-0, Ethicon/Johnson&Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, BRD) (Abb. 5.1). Nach 10 Tagen hatte der Tumor eine Größe von ca. 5mm erreicht (Abb. 5.2).

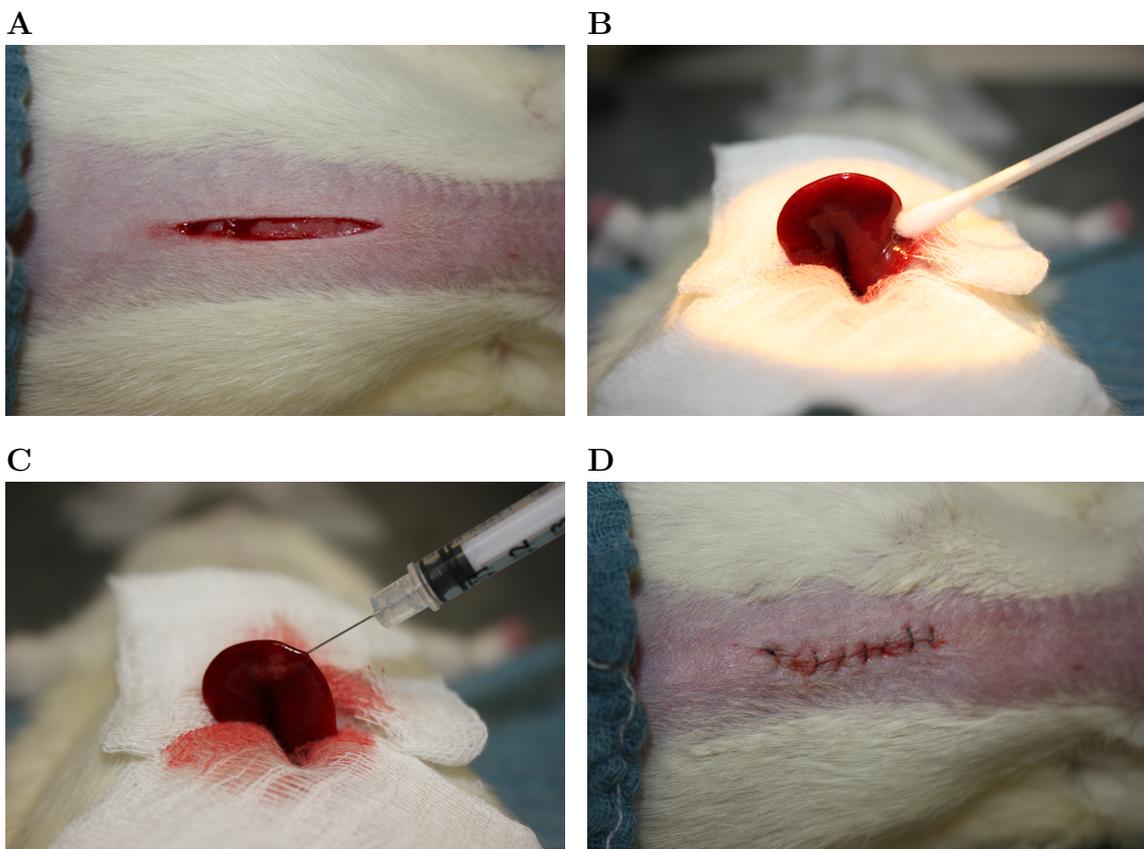


Abb. 5.1: Tumorimplantation. Nach medianer Laparotomie (A) und Aufrichtung der Leber mit Hilfe eines Wattestäbchens (B) erfolgte die Injektion der Tumorzellen (C). Muskulatur und Haut wurden mit einer fortlaufenden Naht verschlossen (D).

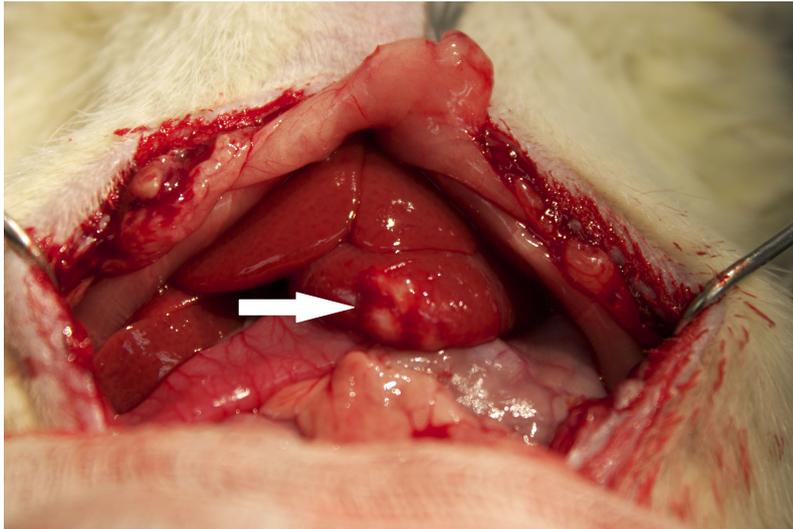


Abb. 5.2: Tumor in situ (Pfeil) 10 Tage nach Implantation.

5.5 Modell

5.5.1 Anästhesie und Laparotomie

10 Tage nach der Tumorimplantation wurden die Lebermetastasen entweder durch die hepato-arterielle Infusion (HAI) oder eine intravenöse Infusion (SYS) behandelt. Beide Eingriffe fanden in Äthernarkose statt.

Zu Beginn wurden die Tiere anästhesiert, gewogen und in der Bauchregion rasiert. Nach der Befestigung des Tieres auf dem Operationstisch in Rückenlage wurde das Abdomen mittels einer medianen Laparotomie wiedereröffnet. Sowohl der Dick- als auch der Dünndarm wurden vor die Bauchdecke mobilisiert und zur Vermeidung einer Austrocknung mit Kochsalz getränkten Kompressen abgedeckt. Nach der Behandlung wurde das Darmpaket wieder reponiert und das Abdomen mit einer fortlaufenden Naht verschlossen.

5.5.2 Chirurgische Präparation und hepato-arterielle Infusion

Für die Durchführung der hepato-arteriellen Infusion wurde die A. gastroduodenalis dargestellt und zweifach mit 6-0 Seide angeschlungen. Im Anschluss daran wurde das Gefäß inzidiert und ein dünner heparinisierte Katheter (PE-50, ID 0,28mm, Portex, Hythe, UK) eingeführt, dessen Spitze bis zur A. hepatica vorgeschoben wurde. Mit einem vorgelegten Faden wurde der Katheter fixiert. Über einen Dreiwegehahn am Katheter erfolgte die Applikation des jeweiligen Zytostatikums mit einer 1ml Spritze

(Abb. 5.3). Während der HAI war die A. hepatica frei und wies einen orthograden Fluss auf. Nach Beendigung der Infusion wurde die A. gastroduodenalis ligiert.

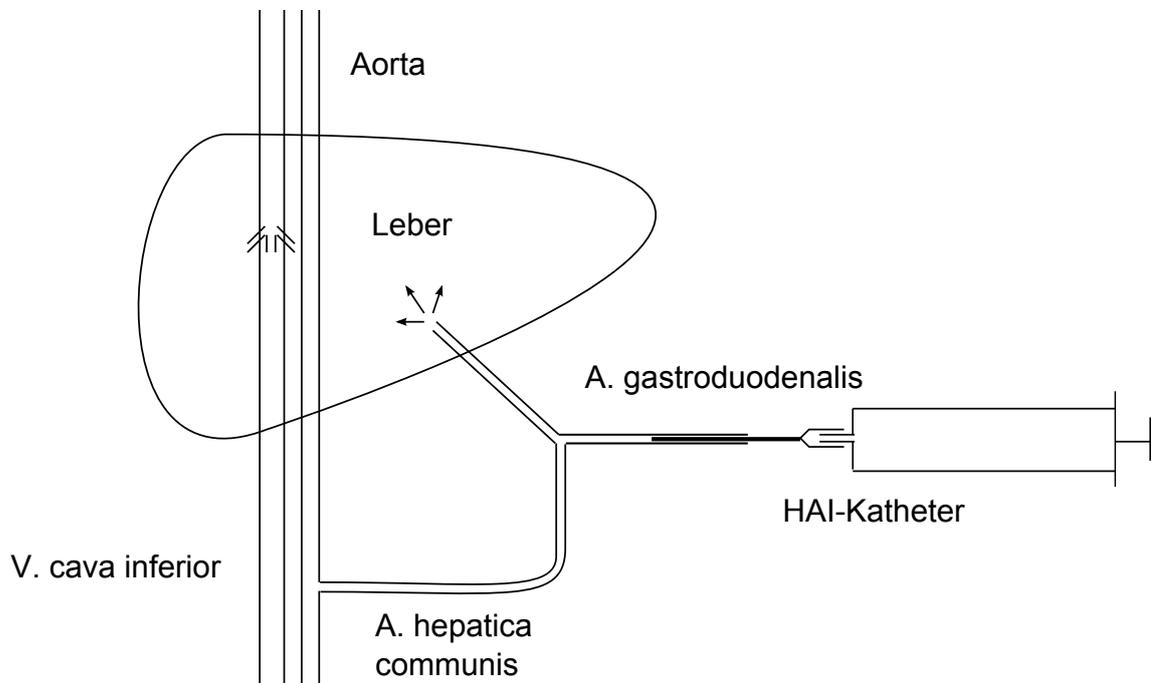


Abb. 5.3: Schema der hepato-arteriellen Infusion. Die Pfeile geben die Flussrichtung des Medikaments an.

5.5.3 Chirurgische Präparation und systemische Infusion

Die venöse Infusion erfolgte über die subhepatische V. cava inferior mit Hilfe einer Butterfly 23G-Kanüle (Troge Medical GmbH, Hamburg, Germany), an die eine 1ml Spritze angeschlossen wurde. Die Punktion fand am distalen Ende der V. cava inferior nahe der iliakalen Bifurkation statt. Dabei wurde zunächst nur das Peritoneum in der iliakalen Bifurkation punktiert und die Nadel ca. 5 mm subperitoneal vorgeschoben, bevor die Punktion der Gefäßwand erfolgte. Dadurch blieb das Peritoneum, das die Punktionsstelle bedeckte, intakt (Abb. 5.4). Nach der Infusion wurde die Kanüle herausgezogen und die Einstichstelle durch das intakte Peritoneum verschlossen. Zur Unterstützung der Blutstillung wurde ein leichter Druck mit einem Wattestäbchen auf die Punktionsstelle ausgeübt.

5. MATERIAL UND METHODEN

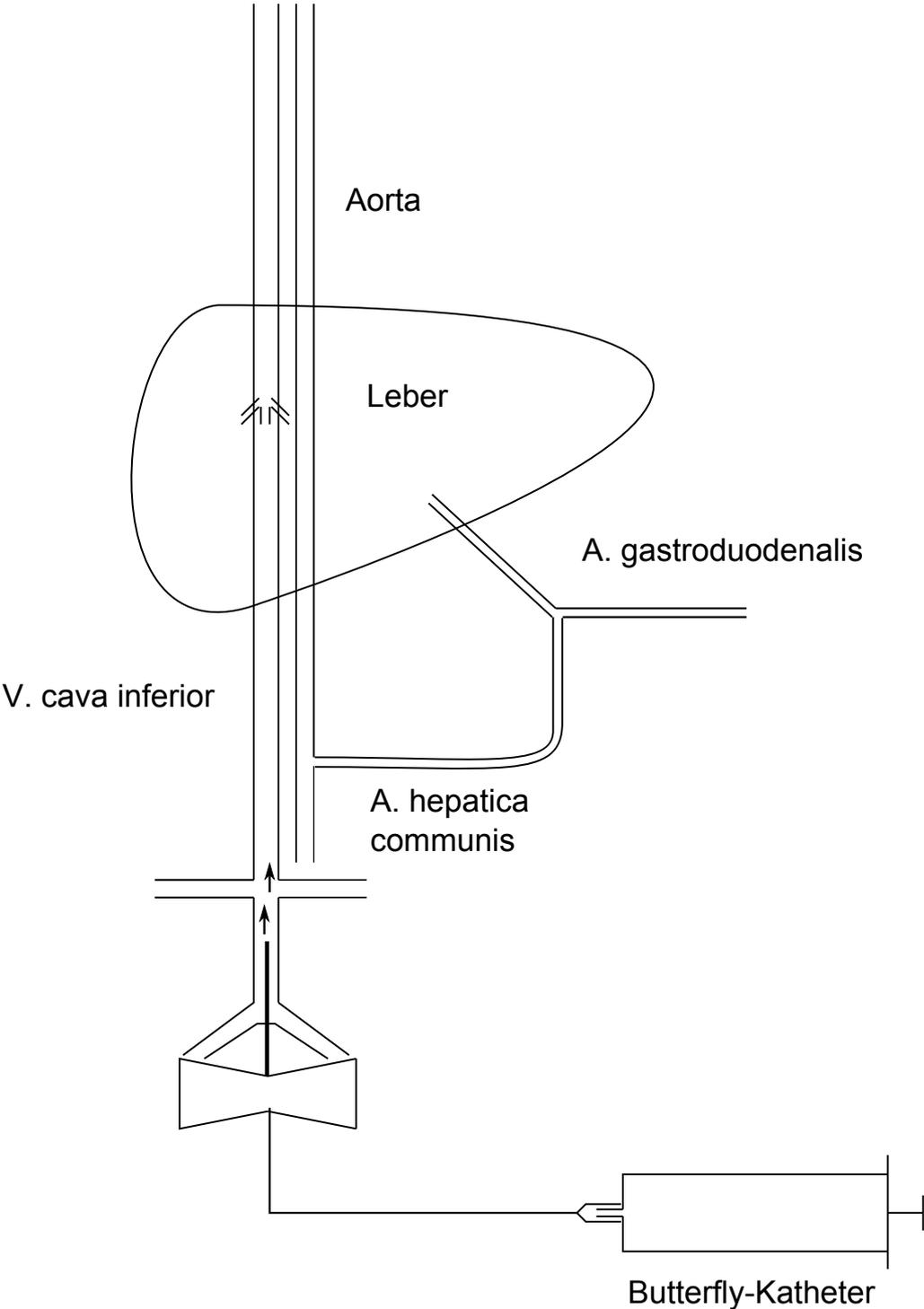


Abb. 5.4: Schema der systemischen Infusion. Die Pfeile geben die Flussrichtung des Medikamentes an.

5.6 Zytostatikadosierungen

5.6.1 Cetuximab

Cetuximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1, der an den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bindet. Cetuximab wurde mit einer Dosierung von $125\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche appliziert.

5.6.2 Oxaliplatin

Oxaliplatin gehört zu der Gruppe der Platin-Derivate und hemmt durch seine Platin-Addukte die DNA-Synthese der Zellen. Oxaliplatin wurde mit einer Dosierung von $85\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche appliziert.

5.6.3 Irinotecan

Irinotecan wird den Topoisomerase I-Hemmern zugeordnet. Sein aktiver Metabolit führt durch Anlagerung an die DNA und die DNA-Topoisomerase I zu einem DNA-Doppelstrangbruch und damit zum Abbruch der Replikation. Irinotecan wurde mit einer Dosierung von $90\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche appliziert.

5.7 Dreidimensionale (3D) - Sonographie

Die Sonographie ist ein günstiges und weit verbreitetes bildgebendes Verfahren, das für die Diagnose und das Staging vieler Erkrankungen eingesetzt wird. Die Ursprünge des medizinischen Ultraschalls können bis in die 50er Jahre des letzten Jahrhunderts zurückgeführt werden [Wild et al. 1952]. In den ersten drei Jahrzehnten war der Fortschritt gering und der medizinische Ultraschall wurde außerhalb der Labore nur in der Kardiologie, Geburtshilfe und Gynäkologie eingesetzt. In den darauffolgenden Jahren unterlag die Sonographie vielen großen technischen Entwicklungen und ist bis heute aufgrund ihrer Flexibilität und des nicht-invasiven Charakters unentbehrlich. In den 90er Jahren entwickelten Forscher und kommerzielle Unternehmen die bis dahin zweidimensionale Sonographie zur 3D-Sonographie weiter.

Die 3D-Sonographie diente in dieser Studie dazu, das Tumolvolumen und damit die Wirkung der Therapie zu bestimmen. Die Untersuchungen erfolgten jeweils am 10. Tag (Tag der Therapie) und am 13. Tag nach der Tumorimplantation. Die Ultraschalluntersuchung folgte der Blutentnahme, da durch die Manipulation des Ultraschallkopfes an der Leber die leberspezifischen Plasmawerte gegebenenfalls beeinflusst werden können.

5. MATERIAL UND METHODEN

Die Ultraschalluntersuchung wurde mit Hilfe der Mikro-Ultraschalltechnologie des Vevo 770 (VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Canada) durchgeführt und fand wie alle anderen Eingriffe in Äthernarkose statt. Der Vevo 770 ist eine Weiterentwicklung eines Systems, das bereits beschrieben wurde [Foster et al. 2002]. Die Untersuchung wurde am offenen Abdomen in vivo durchgeführt. Die Leber wurde mit Hilfe von trockenen Wattestäbchen oder Kompressen, die unter die Leber gelegt worden sind, leicht nach kaudal mobilisiert und somit dem Schallkopf (RB 704; 45MHz; VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Canada) zugänglich gemacht. Danach konnte das Ultraschallgel (Aquasonic 100 Ultrasound Transmission Gel, Parker Laboratories, Inc., Fairfield, USA) auf der Leber verteilt und der Schallkopf aufgesetzt werden (Abb. 5.5). Dieser Ultraschallkopf war an einem motorisierten Antrieb befestigt, der ihn horizontal zur Leberoberfläche bewegte. Die Eindringtiefe betrug 6mm. Während der Bildaufnahme wurden parallele 2D-Abbildungen in einem festgelegten Abstand von 0,044mm in der Transversalebene gemacht. Die 3D-Abbildung wurde mit Hilfe einer Software aus diesen parallelen 2D-Abbildungen rekonstruiert.

Die rekonstruierten 3D-Bilder wurden in einem dynamischen Würfelformat als ein Polyeder mit der dazugehörenden Abbildung auf jeder Fläche dargestellt. Der Benutzer konnte den Polyeder in jede beliebige Richtung rotieren und jede der Flächen konnte aus ihrer Ebene hinein- oder herausgezogen werden oder quer eingestellt werden, während die Ultraschalldaten, die auf jeder Fläche gezeigt wurden, in Echtzeit aktualisiert wurden. Die Rekonstruktions- und Auswertungssoftware ist an VisualSonic lizenziert und wird mit der Mikro-Ultraschalltechnologie vertrieben.

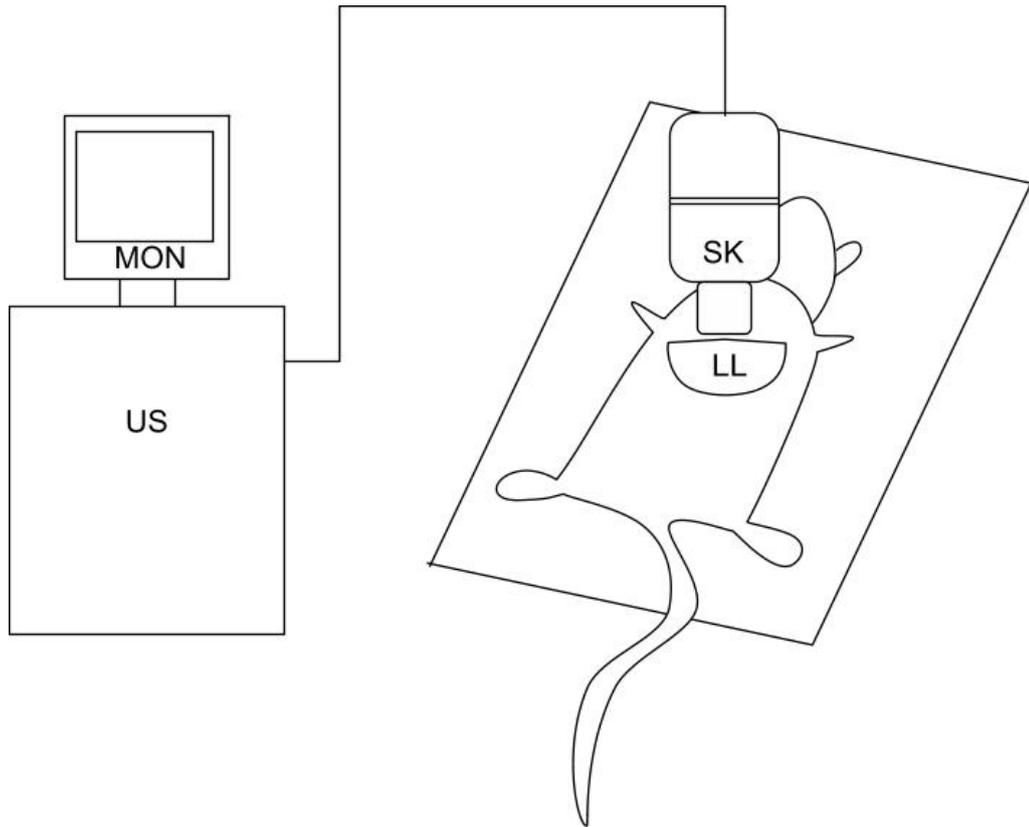


Abb. 5.5: Schematische Darstellung der Sonographie. Der Schallkopf wurde direkt auf den linken Leberlappen aufgebracht. SK = Schallkopf, LL = linker Leberlappen, MON = Monitor, US = Vevo 770.

5.8 Untersuchungsmethoden

5.8.1 Hämatologische Parameter und Enzymaktivitäten

Am 10. und 13. Tag nach der Tumorimplantation wurde den Tieren vor der Sonographie mit einer 24G Kanüle (Sterican, Braun, Melsungen, BRD) 1ml Blut an der subhepatischen V. cava inferior entnommen und in Ca^{2+} -EDTA-beschichteten Röhrchen asserviert. Unmittelbar nach der Entnahme wurde im Blood Cell Counter das Hämoglobin sowie die Leukozyten- und die Thrombozytenzahl bestimmt. Am Ende des Experimentes wurde das im Kühlschrank zwischengelagerte Blut für 3min bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen, BRD), das Plasma abpipettiert und in Eppendorfgefäßen bei -80°C für weitere Untersuchungen aufbewahrt.

Zur Ermittlung des Grades der Leberschädigung wurden die Plasmaaktivitäten der Leberenzyme AST (Aspartat-Aminotransferase), ALT (Alanin-Aminotransferase), GLDH (Glutamat-Dehydrogenase), γ GT (Gamma-Glutamyl-Transferase) und LDH (Laktatdehydrogenase) spektrophotometrisch bestimmt.

5.8.2 Histologie

Am letzten Versuchstag (13. Tag nach der Implantation) wurden die Tiere durch eine Überdosis Narcoren (Merial, Halbergmoos, BRD) eingeschläfert. Es folgte die Entnahme von Tumor und Leber. Jede entnommene Probe wurde mit einem Skalpell in drei gleichgroße Stücke geschnitten. Ein Teil wurde in 4%igem phosphatgepufferten Formalin für etwa 3-4 Tage fixiert und anschließend zur histologischen Untersuchung in Paraffin eingebettet. Ein weiterer Teil wurde in Tissue Tek (Jung Einbettmedium, Leica Instruments GmbH, Nussloch, BRD) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der letzte Teil wurde nativ ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Durchführung immunhistochemischer Untersuchungen bei -80°C zwischengelagert.

5.8.2.1 Standardfärbungen

Von der in Paraffin eingebetteten Leber wurden mit einem Mikrotom $5\mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und AS-D Chloracetatesterase (CAE) gefärbt.

Mit der HE-Färbung wurde die Morphologie der Leber beurteilt (Abb. 5.6). Als Parameter dienten der Vakuolisierungsgrad, die Grobscholligkeit des Zytoplasmas und die Zellkerndeformation. Dazu wurden 25 High Power Fields (HPF) unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX60, Olympus Optical, Company Ltd., Japan) bei $40\times$ Vergrößerung analysiert. Jedem HPF wurde nach eingehender Beurteilung der oben genannten Parameter Grad 0 (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf), Grad 1 ($< 30\%$ der Hepatozyten weisen das Merkmal auf), Grad 2 (40%-70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf) oder Grad 3 ($>70\%$ der Hepatozyten weisen das Merkmal auf) zugeordnet [Calabrese et al. 1997]. Zudem wurden die Gefäße auf Fibrinthromben, Endothelablösung und Erythrozytenwandständigkeit untersucht. Nach diesen Kriterien wurden 25 Gefäße bei $20\times$ Vergrößerung beurteilt. Beide Auswertungen wurden als Prozentwerte angegeben.

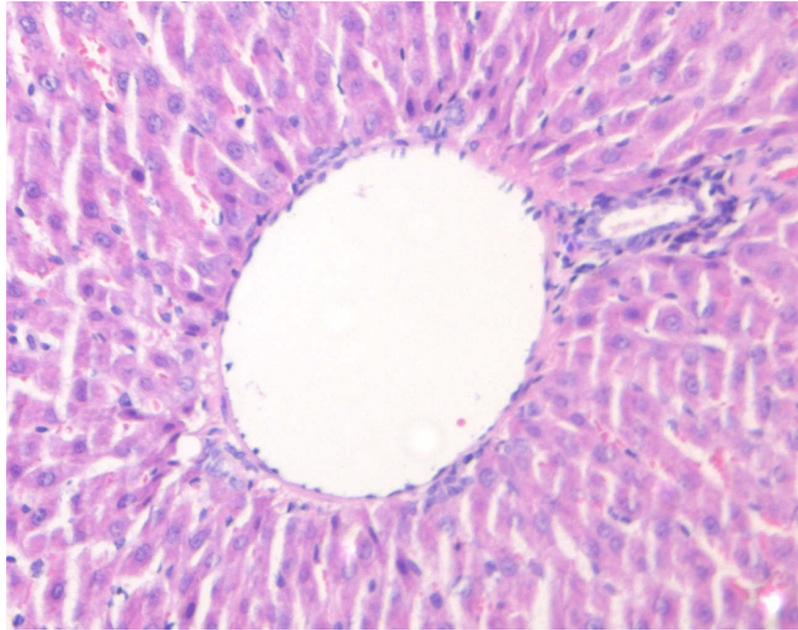


Abb. 5.6: HE-Färbung der gesunden Leber eines NaCl-Kontrolltieres nach einer HAI. Dargestellt ist ein Periportalfeld bei 20× Vergrößerung.

Mit der CAE-Färbung wurde die Leukozyteninfiltration verschiedener Leberbereiche untersucht (Abb. 5.7). Hierfür wurden 30 HPF (10 HPF Sinusoide, 10 HPF Portalfeld, 10 HPF Venolen) bei 40× Vergrößerung ausgezählt und in Absolutwerten angegeben.

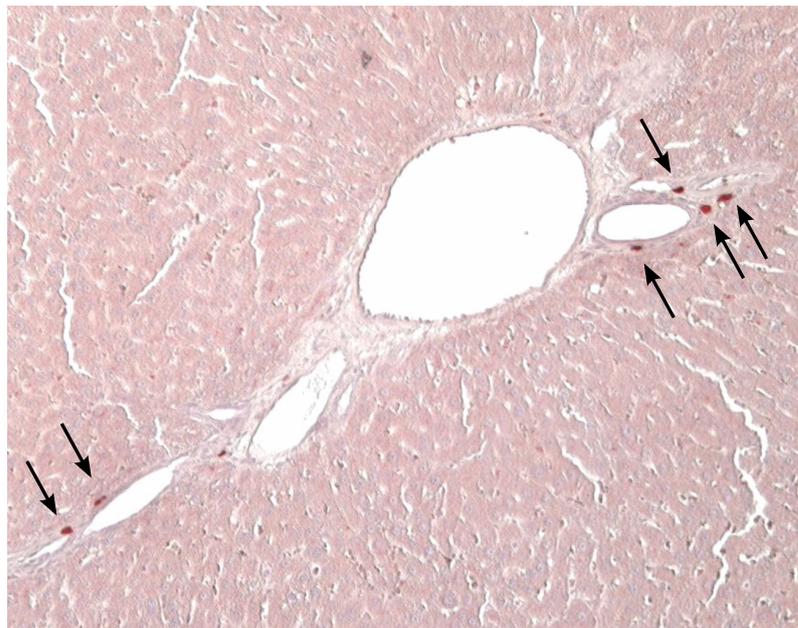


Abb. 5.7: CAE-Färbung einer Leber nach einer systemischen Behandlung mit Oxaliplatin. Dargestellt ist ein Periportalfeld bei 10× Vergrößerung. Leukozyten sind rot angefärbt (Pfeile).

5.8.2.2 Immunhistochemie

Zur Bestimmung der Aktivität des Apoptosemarkers Caspase-3 wurden die 5µm dicken in Paraffin eingebetteten Leber- und Tumorschnitte zunächst im Xylolbad entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%-70% Ethanol) gewässert. Nach dem Blocken der endogenen Peroxidase in 3% H₂O₂ wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank mit einem polyklonalen Kaninchen anti-cleaved Caspase-3 Antikörper (Verdünnung 1:100, Cell Signaling Technology, Frankfurt, BRD) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege anti-Kaninchen Antikörper (Peroxidase-markiert, Verdünnung 1:100) verwendet (Dako-Cytomotion, Hamburg, BRD). Als Chromogen diente 3,3'Diaminobenzidin. Nach der Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert, mit Xylol entparaffiniert und eingedeckt. Von Leber und Tumor wurden jeweils 25 HPF pro Schnitt beurteilt und Caspase-3-positive Zellen ausgezählt (Abb. 5.8).

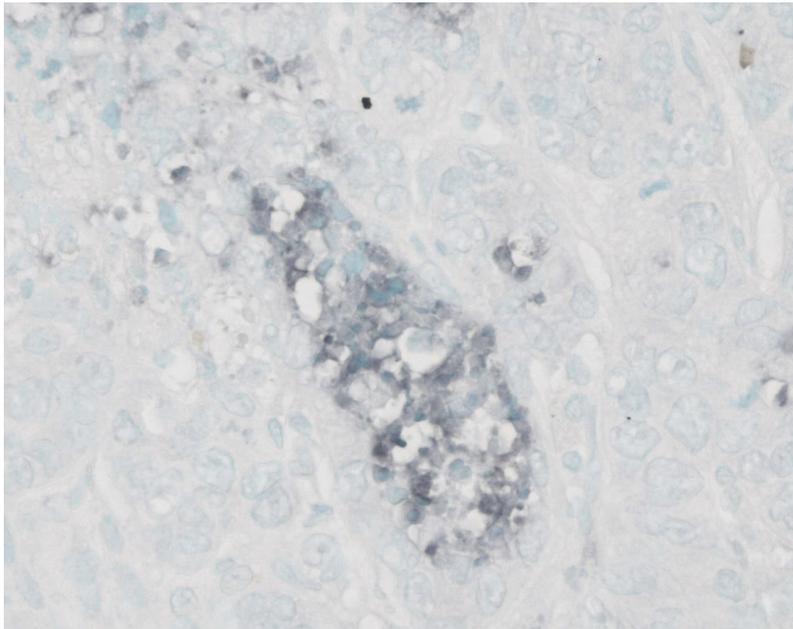


Abb. 5.8: Caspase-3-Färbung des Tumors eines HAI-Oxaliplatin Tieres bei 40× Vergrößerung. Apoptotische Zellen sind grau-schwarz angefärbt.

PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) wird zur Darstellung proliferierender Zellen genutzt. Das immunhistochemische Protokoll gleicht dem der Caspase-3-Färbung, es werden lediglich andere Antikörper genutzt. Als Primärantikörper diente ein Maus anti-PCNA Antikörper (Verdünnung 1:50, Cell Signaling Technology). Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege anti-Maus Antikörper (Verdünnung 1:100, Link, LSAB-HRP, Dako-Cytomotion, Hamburg, BRD) eingesetzt. Auch hier

wurden 25 HPF pro Leber- und Tumorschnitt beurteilt und jedem HPF der Grad 0-4 zugeordnet (0=<1%, 1=1-10%, 2=10-30%, 3=30-50%, 4=>50%, PCNA-positive Zellen in %) (Abb. 5.9).

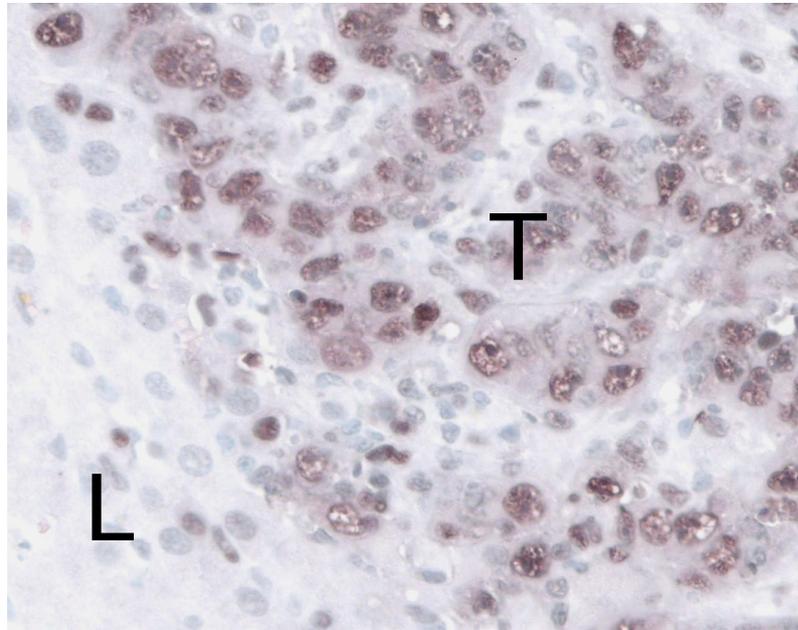


Abb. 5.9: PCNA-Färbung einer Leber aus der HAI-Cetuximab-Gruppe. Dargestellt ist der Übergang von Tumor (T) zu Lebergewebe (L) bei 40× Vergrößerung. PCNA-positive Zellen sind braun angefärbt. Erwartungsgemäß zeigt der Tumor eine starke Proliferation.

PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1) oder CD31 wird unter anderem von Endothelzellen exprimiert und dient im wesentlichen zum Nachweis derselbigen. Dadurch ist eine Beurteilung der Angiogenese in proliferierenden Tumoren möglich. Zur immunhistochemischen Darstellung von PECAM-1 wurden aus den in Tissue Tek eingefrorenen Tumorproben 5µm dicke Gefrierschnitte hergestellt. Das weitere Vorgehen gleicht dem der Caspase-3- und PCNA-Färbung, allerdings mit dem Primärantikörper Maus anti-Ratte CD31 (Verdünnung 1:500) und dem Sekundärantikörper Ziege anti-Maus (Peroxidase-markiert, Verdünnung 1:100, Link, LSAB-HRP, Dako-Cytomotion, Hamburg, BRD). Es wurden 20 HPF pro Schnitt beurteilt und angefärbte Gefäße ausgezählt (Abb. 5.10).

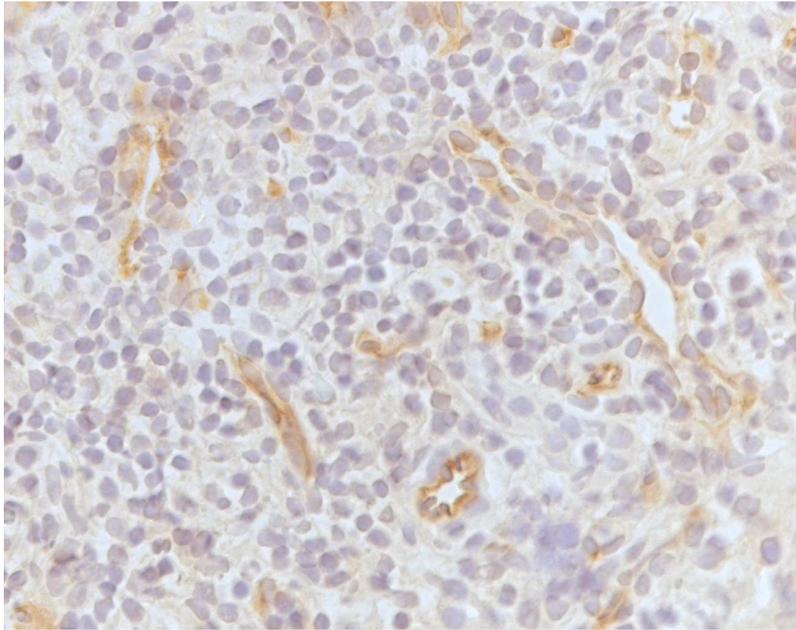


Abb. 5.10: PECAM-1-Färbung des Tumors eines Kontrolltieres bei 20× Vergrößerung. Die Gefäße sind braun angefärbt.

5.9 Experimentelles Protokoll

Ziel der Untersuchung war es, den Einfluss der hepato-arteriellen Infusion (HAI) von Cetuximab, Oxaliplatin und Irinotecan auf das Tumorgewebe kolorektaler Lebermetastasen im Rattenmodell zu untersuchen und diesen mit der systemischen Infusion (SYS) dieser Medikamente zu vergleichen.

Vor der eigentlichen Behandlung wurden den Tieren Tumorzellen der Zelllinie CC531 in den linken Leberlappen implantiert (5.4). Nach 10-tätigem Wachstum wurde der Tumor entweder mit der hepato-arteriellen Infusion (HAI) oder einer systemischen Infusion (SYS) behandelt.

5.9.1 Protokoll der hepato-arteriellen Infusion

Für die Durchführung der HAI wurden 36 männliche WAG/Rij Ratten verwendet, die randomisiert auf 6 Gruppen (n=6) verteilt wurden. Jede Gruppe wurde einer unterschiedlichen Behandlung unterzogen:

- 6 Tiere mit Sham-Behandlung (1ml NaCl)
- 6 Tiere mit Cetuximab (125mg/m²)
- 6 Tiere mit Cetuximab (125mg/m²) + Oxaliplatin (85mg/m²)

- 6 Tiere mit Cetuximab (125mg/m²) + Irinotecan (90mg/m²)
- 6 Tiere mit Oxaliplatin (85mg/m²)
- 6 Tiere mit Irinotecan (90mg/m²)

Die Anästhesie und chirurgische Präparation erfolgte wie in 5.5.1 und 5.5.2 beschrieben. Vor der HAI wurde den Tieren Blut entnommen und zur Ermittlung der Tumorgöße eine Sonographie durchgeführt (5.7). Das aus dem Blut gewonnene Blutplasma diente zur Bestimmung der hämatologischen Parameter und Enzymaktivitäten (5.8.1).

Drei Tage nach dieser Behandlung (13. Tag) wurde das Abdomen nochmals eröffnet um Blut zu gewinnen und darauf folgend die abschließende Sonographie vorzunehmen. Anschließend wurden die in 5.8.2 aufgeführten Proben für histologische Untersuchungen entnommen.

5.9.2 Protokoll der systemischen Infusion

Für die systemische Infusion wurden analog den HAI-Gruppen ebenfalls 36 männliche WAG/Rij Ratten verwendet, die randomisiert auf 6 Gruppen (n=6) verteilt wurden:

- 6 Tiere mit Sham-Behandlung (1ml NaCl)
- 6 Tiere mit Cetuximab (125mg/m²)
- 6 Tiere mit Cetuximab (125mg/m²) + Oxaliplatin (85mg/m²)
- 6 Tiere mit Cetuximab (125mg/m²) + Irinotecan (90mg/m²)
- 6 Tiere mit Oxaliplatin (85mg/m²)
- 6 Tiere mit Irinotecan (90mg/m²)

Die Anästhesie und chirurgische Präparation fand wie in 5.5.1 und 5.5.3 beschrieben statt. Das weitere Vorgehen gleicht dem experimentellen Protokoll der HAI.

5.10 Statistik

Die Datenerfassung erfolgte zunächst handschriftlich und wurde später in ein Tabellenkalkulationsprogramm übertragen (Microsoft Excel 2000, Microsoft Cooperation, USA). Aus diesen Daten wurden die Mittelwerte (MW), sowie die Standardabweichung (SD) und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM, Standard Error of the

5. MATERIAL UND METHODEN

Mean) bestimmt. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen wurden die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mittels ANOVA (One-Way Analysis of Variance) gefolgt von dem Student Newman-Keuls Test ermittelt. Der Vergleich zwischen zwei Versuchsgruppen erfolgte durch den Student's t-Test für unverbundene Stichproben. Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant angenommen. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung kamen die Programme SigmaStat und SigmaPlot (SPSS, San Rafael/CA, USA) zur Anwendung.

6. ERGEBNISSE

6.1 Bindung von Cetuximab an CC531 kolorektale Lebermetastasen

Die immunzytochemische Fluoreszenzfärbung zeigte, dass Cetuximab an die Oberfläche von CCC531-Zellen bindet (Abb. 6.1).

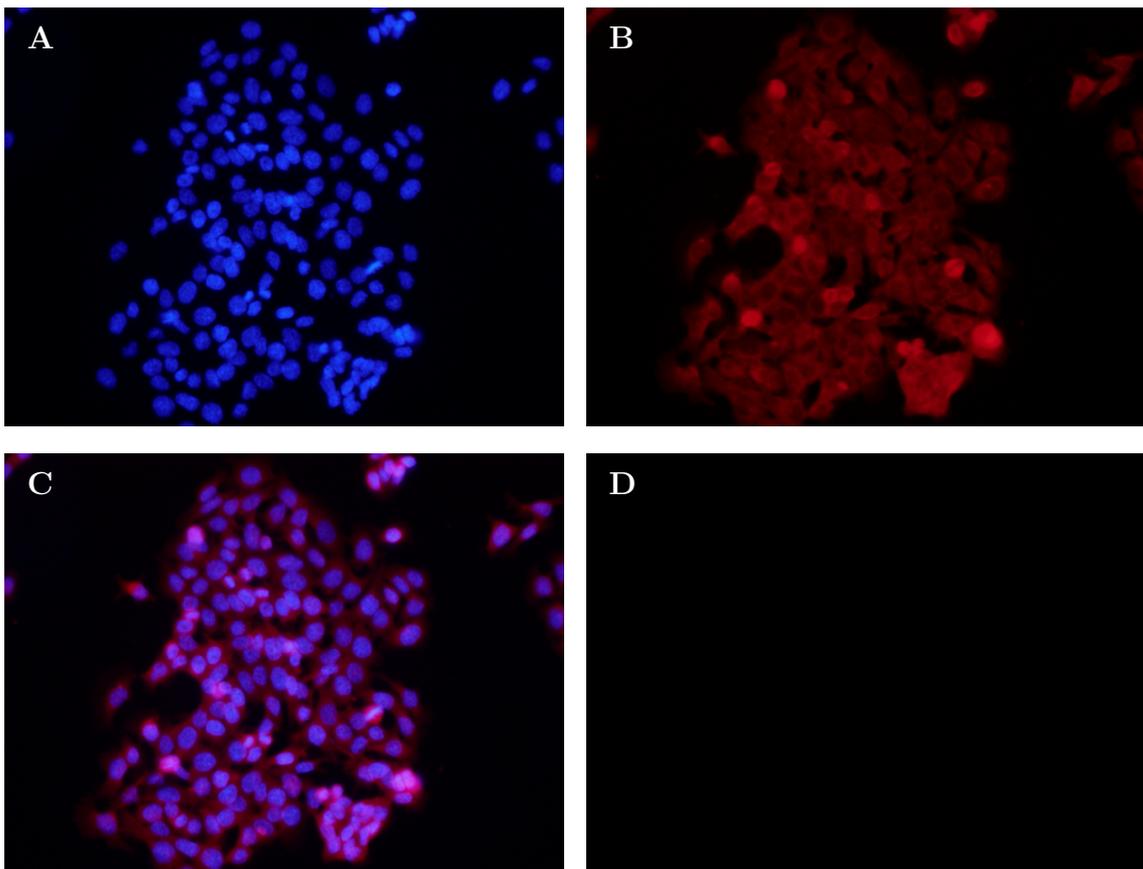


Abb. 6.1: Immunzytochemische Fluoreszenzmikroskopie von CC531 Zellen *in vitro* bei 20× Vergrößerung. A zeigt die Färbung der Zellkerne (blau). B zeigt die Bindung von Cetuximab an der Zelloberfläche der CC531 Zellen (rot) und C die Kombination aus A und B. D zeigt die Negativkontrolle.

6.2 Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab und Oxaliplatin

6.2.1 Körpergewicht

Alle Tiere wurden am Tag der Implantation (Tag 0) sowie an Tag 10 und Tag 13 gewogen. Die Graphiken zeigen die Veränderungen des Gewichts von Tag 0 bis Tag 13. In der HAI-Gruppe nahm nur das Gewicht der Oxaliplatin-behandelten Tiere signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ab. Die mit Cetuximab behandelten Tiere nahmen sogar an Gewicht zu, allerdings ohne signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Abb. 6.2 A). Im Gegensatz dazu verloren alle systemisch mit Cetuximab und Cetuximab+Oxaliplatin behandelten Tiere signifikant an Gewicht (Abb. 6.2 B). Der Gewichtsverlust zur Kontrollgruppe betrug 7-11%.

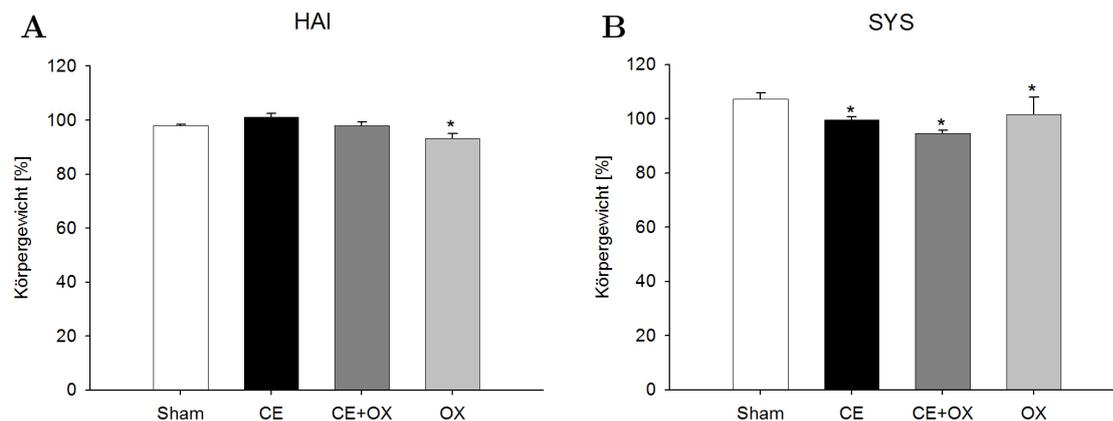


Abb. 6.2: Prozentuale Änderung des Körpergewichts zwischen Tag 0 und Tag 13 nach einer HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100 % entsprechen dem Gewicht an Tag 0. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

6.2.2 Tumervolumen

Das Tumervolumen wurde an Tag 10 und Tag 13 mittels Sonographie ermittelt. 100% entsprechen der Tumorgöße am 10. Tag, d.h. der Tumorgöße vor der Behandlung. In der HAI-Gruppe fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Cetuximab und Cetuximab+Oxaliplatin behandelten Tieren zur Kontrollgruppe (Sham-Gruppe) (Abb. 6.3 A). Im Vergleich zu den systemisch behandelten Tieren war die Hemmung des Tumorwachstums ebenfalls statistisch signifikant. Beachtlicherweise führte die HAI von Cetuximab und Cetuximab+Oxaliplatin sogar zu einer Reduktion der Tumorgöße unter den Ausgangswert an Tag 10 (Abb. 6.3 A).

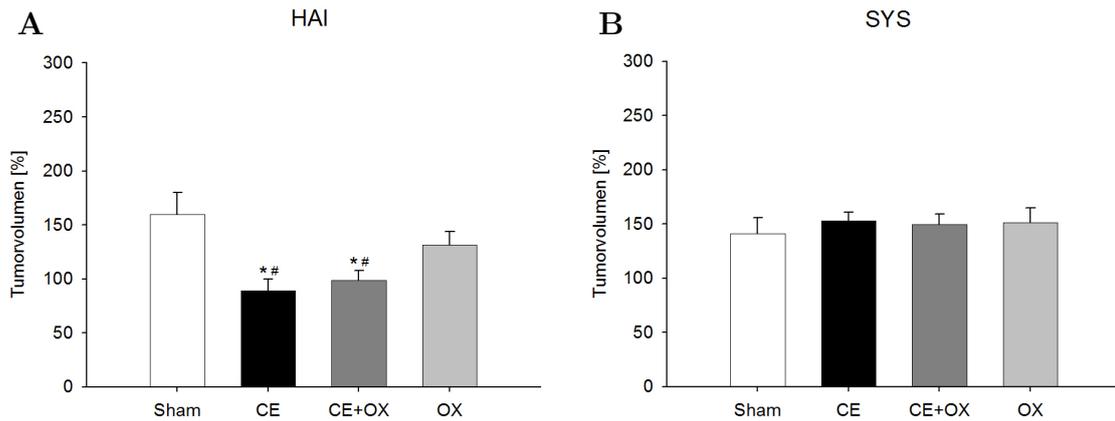


Abb. 6.3: Prozentuale Änderung des Tumolvolumens zwischen Tag 10 und Tag 13 nach einer HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.2.3 Proliferation

Die Proliferation wurde mit Hilfe der PCNA-Färbung untersucht (Abb. 6.5). Erwartungsgemäß befanden sich im gesunden Lebergewebe nur wenig, im Tumor ausgeprägt viele proliferierende Zellen. Interessanterweise war die Proliferation in der HAI-Kontrollgruppe signifikant geringer als in der systemischen Kontrollgruppe (Abb. 6.4). Die Proliferation in der HAI-Cetuximab Gruppe zeigte eine sinkende Tendenz, jedoch ohne Signifikanz.

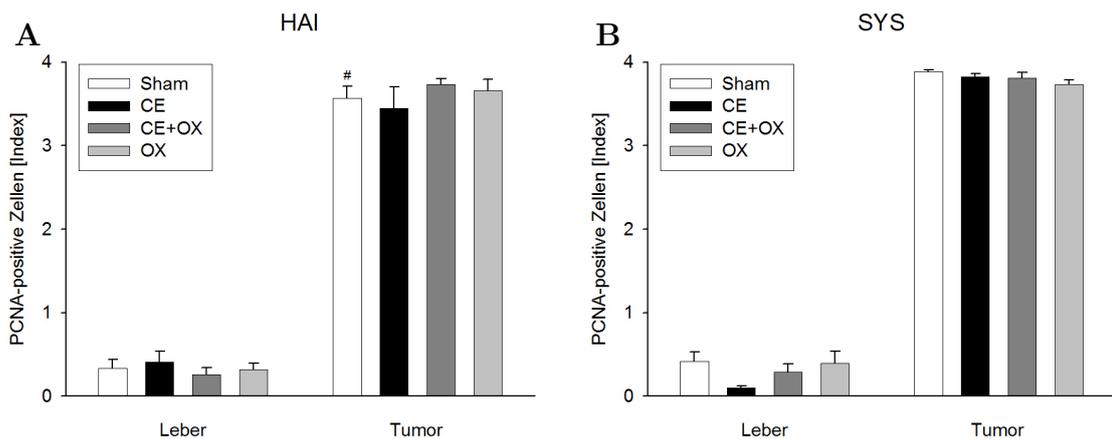


Abb. 6.4: PCNA-positive Zellen in Leber und Tumor nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B), als Index dargestellt (0= $<1\%$, 1=1-10%, 2=10-30%, 3=30-50%, 4= $>50\%$, PCNA-positive Zellen in %). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

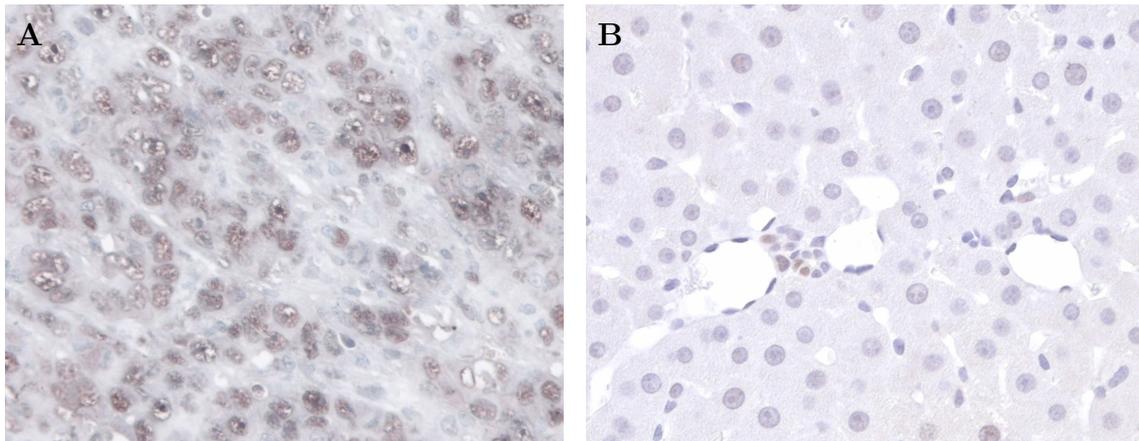


Abb. 6.5: PCNA-Färbung eines Tumors mit dem Proliferationsindex 4 bei 40× Vergrößerung (A). PCNA-Färbung der Leber eines Kontrolltieres mit dem Proliferationsindex 0 bei 40× Vergrößerung (B).

6.2.4 Apoptose

Immunhistochemische Caspase-3-Färbungen dienten dazu die Apoptoserate im Leber- und Tumorgewebe zu bestimmen (Abb. 6.7). Insgesamt fand sich eine niedrige Zahl apoptotischer Zellen in der Leber und eine erhöhte Apoptoserate im Tumor. Signifikante Unterschiede ergaben sich in der HAI-Gruppe zwischen den Cetuximab und Cetuximab+Oxaliplatin behandelten Tieren sowie der Sham-Gruppe. Auch die HAI von Oxaliplatin führte zu einem Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen im Tumor, welcher jedoch nicht signifikant war (Abb. 6.6 A). In der systemischen Versuchsgruppe nahm durch eine Behandlung mit Cetuximab, Cetuximab+Oxaliplatin und Oxaliplatin die Apoptoserate gering zu, jedoch ohne Signifikanz zur Kontrollgruppe (Abb. 6.6 B). Bei Vergleich von HAI und systemischer Infusion fand sich eine signifikant höhere Anzahl apoptotischer Zellen im Tumor nach HAI mit Cetuximab und HAI mit Cetuximab und Oxaliplatin (Abb. 6.6).

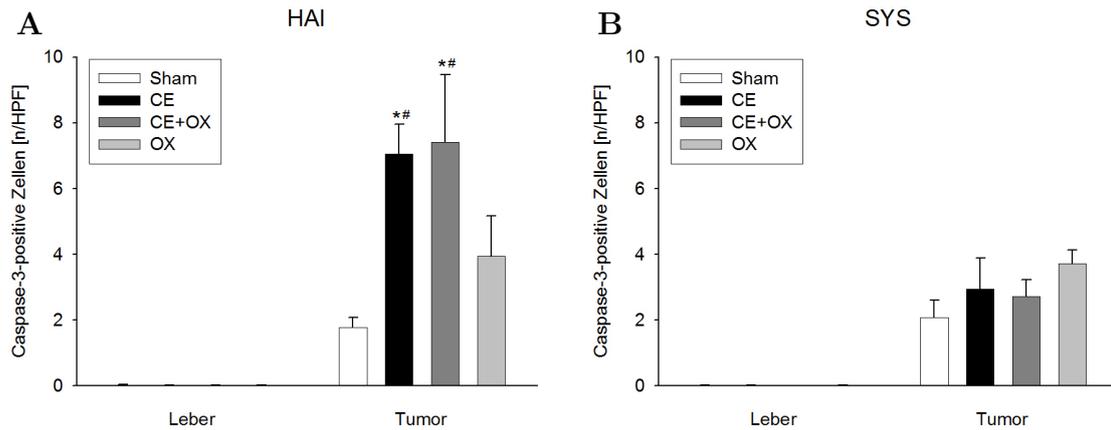


Abb. 6.6: Quantitative Analyse Caspase-3-positiver Zellen in Leber und Tumor nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

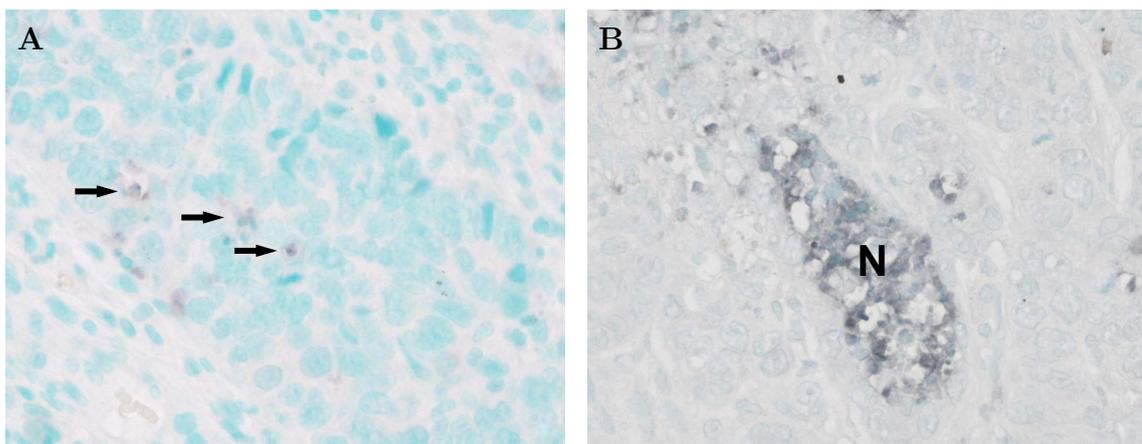


Abb. 6.7: A zeigt eine Caspase-3-Färbung des Tumors eines Kontrolltieres mit vereinzelt apoptotischen Zellen (Pfeile) bei $40\times$ Vergrößerung. B zeigt eine Caspase-3-Färbung des Tumors nach HAI von Oxaliplatin mit Nekrosezone (N) bei $40\times$ Vergrößerung.

6.2.5 Angiogenese

Zur Beurteilung der Tumorangiogenese wurden mit Hilfe der PECAM-1-Färbung die Endothelzellen der Tumorgefäße angefärbt (Abb. 6.9). In der HAI- und systemischen Gruppe ergab sich ein signifikanter Rückgang der Tumorgefäße nach allen drei Behandlungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Zusätzlich zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Applikationsformen. Die HAI von Oxaliplatin führte im Vergleich zu venöser Infusion zu einer signifikanten Abnahme der Tumorgefäße. Die systemische Applikation von Cetuximab senkte dagegen die Anzahl der Tumorgefäße signifikant zur HAI von Cetuximab. In beiden Be-

6. ERGEBNISSE

handlungsformen zeigte die Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin die beste antiangiogene Wirkung (Abb. 6.8).

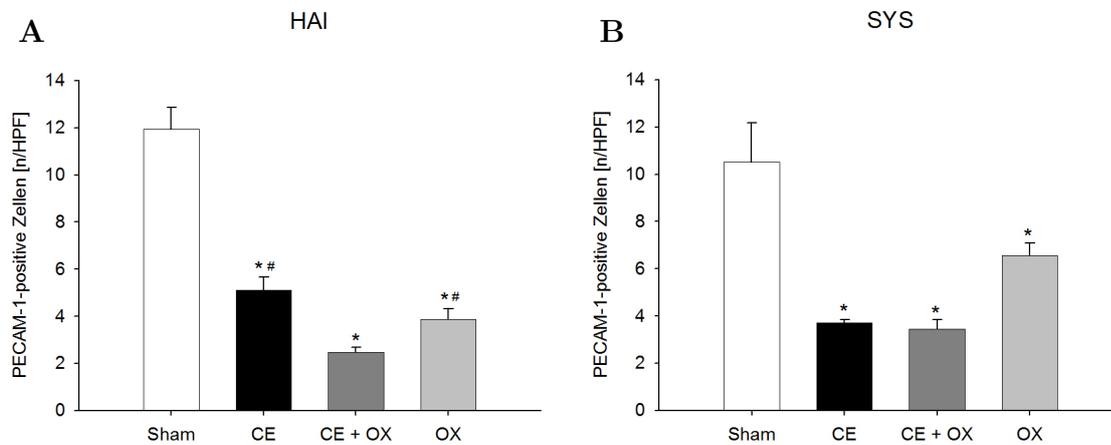


Abb. 6.8: Quantitative Analyse PECAM-1-positiver Zellen in Tumoren nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

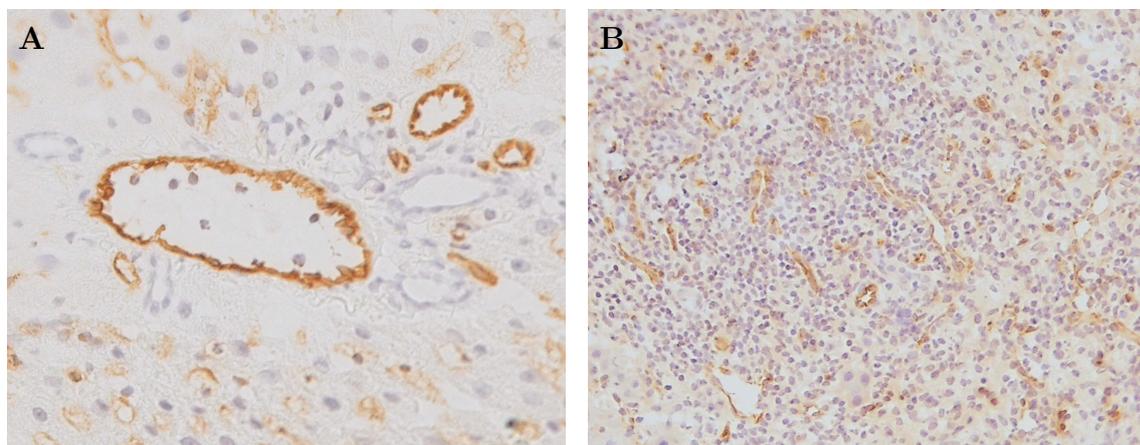


Abb. 6.9: A zeigt eine PECAM-1-Färbung der Leber eines Kontrolltieres bei 40 \times Vergrößerung. Dargestellt ist ein Portalfeld mit deutlicher Anfärbung der Venolen. B zeigt eine PECAM-1-Färbung des Tumors eines Kontrolltieres bei 20 \times Vergrößerung.

6.2.6 Blutbild

Das Blutbild wurde bestimmt, um die systemischen Auswirkungen der Chemotherapie zu eruieren. Die Blutentnahme erfolgte an Tag 10 und Tag 13 aus der Vena cava inferior.

6.2.6.1 Hämoglobin

Im Vergleich zur ersten Blutentnahme an Tag 10 sank der Hämoglobinwert aller Versuchsgruppen (Abb. 6.10). Bei Vergleich von HAI und systemischer Infusion fand sich ein signifikanter Hämoglobin-Abfall während der systemischen Behandlung mit Cetuximab sowie Oxaliplatin. Zudem fand sich in der systemischen Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion des Hämoglobinwertes der Tiere, die mit Cetuximab behandelt wurden (Abb. 6.10 B). Insgesamt sanken die Werte der systemisch behandelten Tiere stärker.

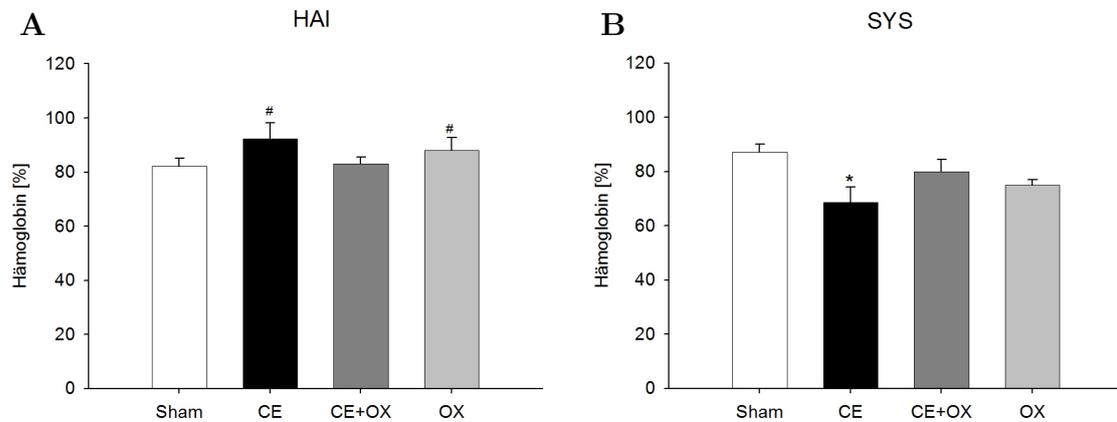


Abb. 6.10: Prozentuale Änderung des venösen Hämoglobinwertes zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Absolutwert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (NaCl, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.2.6.2 Thrombozyten

Die Versuchsgruppen, die eine systemische Infusion erhielten, wiesen insgesamt eine stärkere Verminderung der venösen Thrombozytenzahl auf (Abb. 6.11 B). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsformen ermittelt werden. Auffallend war der Verlust der Thrombozyten in der systemischen Kontrollgruppe gegenüber der HAI-Kontrollgruppe. In der HAI-Gruppe zeigten dagegen nur die Cetuximab+Oxaliplatin behandelten Tiere einen Thrombozytenabfall (Abb. 6.11 A).

6. ERGEBNISSE

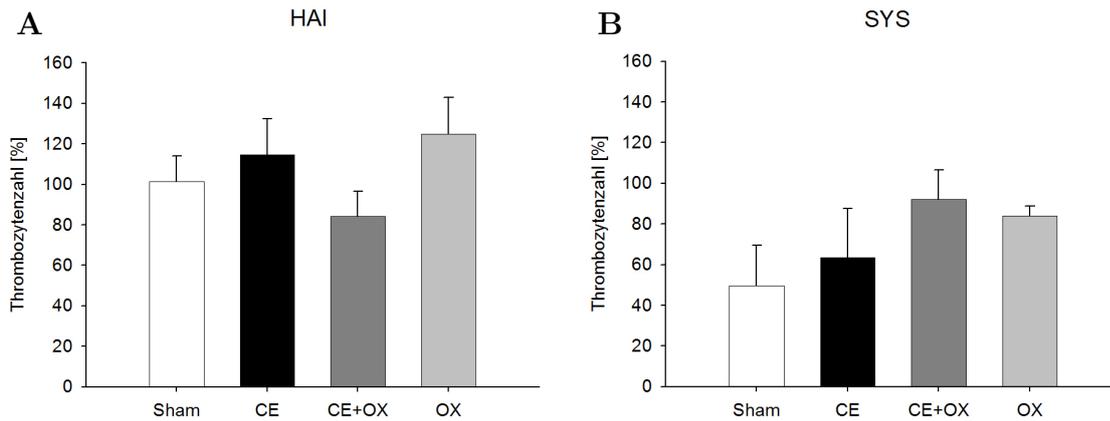


Abb. 6.11: Prozentuale Änderung der venösen Thrombozytenzahl zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Absolutwert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau).

6.2.6.3 Leukozyten

Beide Sham-Gruppen zeigten im Verlauf eine Erhöhung der Leukozytenzahl. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die HAI von Cetuximab+Oxaliplatin sowie von Oxaliplatin zu einer signifikanten Reduktion der Leukozytenzahl (Abb. 6.12 A). In der systemischen Gruppe reagierten die Oxaliplatin-behandelten Tiere mit einem signifikanten Abfall der Leukozytenzahl verglichen mit der Sham-Gruppe (Abb. 6.12 B). Die systemische Infusion von Oxaliplatin führte gegenüber der HAI von Oxaliplatin zu einem signifikanten Abfall der Leukozytenzahl (Abb. 6.12).

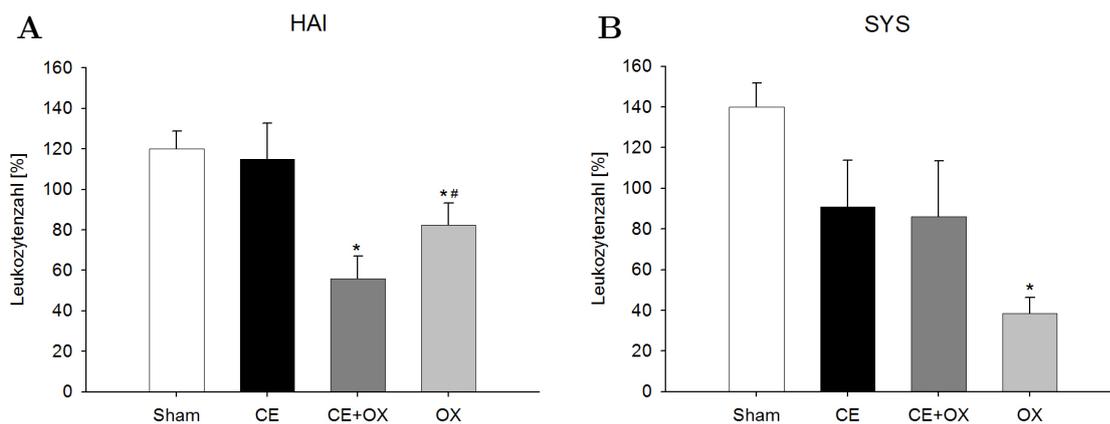


Abb. 6.12: Prozentuale Änderung der venösen Leukozytenzahl zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Absolutwert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.2.7 Leukozyteninfiltration

Mit Hilfe der CAE-Färbung wurde die Leukozyteninfiltration verschiedener Leberbereiche durch quantitative Auszählung untersucht (Abb. 6.13). Der Einsatz von Cetuximab+Oxaliplatin führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Leukozyteninfiltration (Tabelle 6.3). Insgesamt fanden sich vermehrt Leukozyten in der Nähe der Portalfelder. Die HAI von Cetuximab bewirkte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Erhöhung der Anzahl der infiltrierenden Leukozyten in den Portalfeldern (extravasal) (Tabelle 6.2). In der systemischen Gruppe befanden sich nach einer Behandlung mit Cetuximab signifikant mehr Leukozyten in der Nähe der Venolen (Tabelle 6.2) und nach einer Behandlung mit Oxaliplatin erhöhte sich in den Portalfeldern (extravasal) die Anzahl der Leukozyten signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 6.4).

Sham	HAI	SYS
Sinusoide	1,06 ($\pm 0,59$)	0,77 ($\pm 0,27$)
Portalfeld intravasal	0,14 ($\pm 0,04$)	0,13 ($\pm 0,08$)
Portalfeld extravasal	2,56 ($\pm 0,59$)	3,68 ($\pm 0,85$)
Venole intravasal	0,04 ($\pm 0,02$)	0,10 ($\pm 0,04$)
Venole extravasal	1,14 ($\pm 0,45$)	0,60 ($\pm 0,07$)

Tabelle 6.1: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit NaCl (Sham). Mittelwert \pm SEM.

CE	HAI	SYS
Sinusoide	1,07 ($\pm 0,18$)	1,12 ($\pm 0,17$)
Portalfeld intravasal	0,02 ($\pm 0,02$)	0,05 ($\pm 0,03$)
Portalfeld extravasal	5,12 ($\pm 0,34$)*	3,95 ($\pm 0,45$)
Venole intravasal	0,03 ($\pm 0,02$)	0,05 ($\pm 0,03$)
Venole extravasal	1,22 ($\pm 0,18$)	1,33 ($\pm 0,13$)*

Tabelle 6.2: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit Cetuximab (CE). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. NaCl.

CE+OX	HAI	SYS
Sinusoide	0,95 ($\pm 0,16$)	1,07 ($\pm 0,31$)
Portalfeld intravasal	0,12 ($\pm 0,07$)	0,03 ($\pm 0,02$)
Portalfeld extravasal	3,57 ($\pm 0,79$)	3,12 ($\pm 0,37$)
Venole intravasal	0,22 ($\pm 0,10$)	0,08 ($\pm 0,04$)
Venole extravasal	0,87 ($\pm 0,20$)	1,20 ($\pm 0,26$)

Tabelle 6.3: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit Cetuximab und Oxaliplatin (CE+OX). Mittelwert \pm SEM.

6. ERGEBNISSE

OX	HAI	SYS
Sinusoide	0,95 ($\pm 0,13$)	1,07 ($\pm 0,15$)
Portalfeld intravasal	0,15 ($\pm 0,08$)	0,18 ($\pm 0,07$)
Portalfeld extravasal	2,13 ($\pm 0,55$)	1,6 ($\pm 0,26$)*
Venole intravasal	0,10 ($\pm 0,04$)	0,03 ($\pm 0,02$)
Venole extravasal	0,77 ($\pm 0,17$)	1,03 ($\pm 0,19$)

Tabelle 6.4: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit Oxaliplatin (OX). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

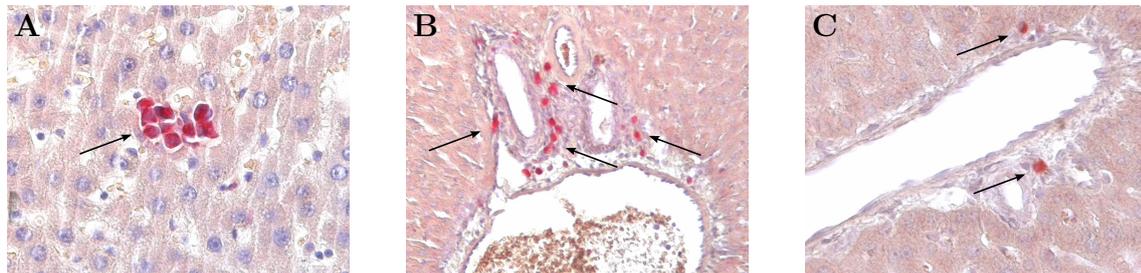


Abb. 6.13: CAE-Färbung der Leber. A zeigt eine Leukozytenansammlung in den Sinusoiden (Pfeil) bei 40 \times Vergrößerung. B zeigt mehrere Leukozyten in einem Periportalfeld (extravasal) (Pfeile) bei 20 \times Vergrößerung. C zeigt zwei Leukozyten extravasal einer Venole (Pfeile) bei 40 \times Vergrößerung.

6.2.8 Zellschädigung

Die Zellschädigung der Leber wurde mit Hilfe der HE-Färbung bestimmt (Abb. 6.15). Grobscholligkeit und Vakuolisierung dienten dabei als Parameter. In der HAI-Gruppe war kein Einfluss der Behandlung auf die Zellmorphologie erkennbar (Abb. 6.14 A). Die systemische Infusion von Oxaliplatin führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer signifikanten Verstärkung der Grobscholligkeit und zu einer Zunahme des Vakuolisierungsgrades. Die systemische Gabe von Cetuximab+Oxaliplatin verstärkte ebenfalls die Grobscholligkeit der Leber signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 6.14 B). Zwischen den beiden Kontrollgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Grobscholligkeit.

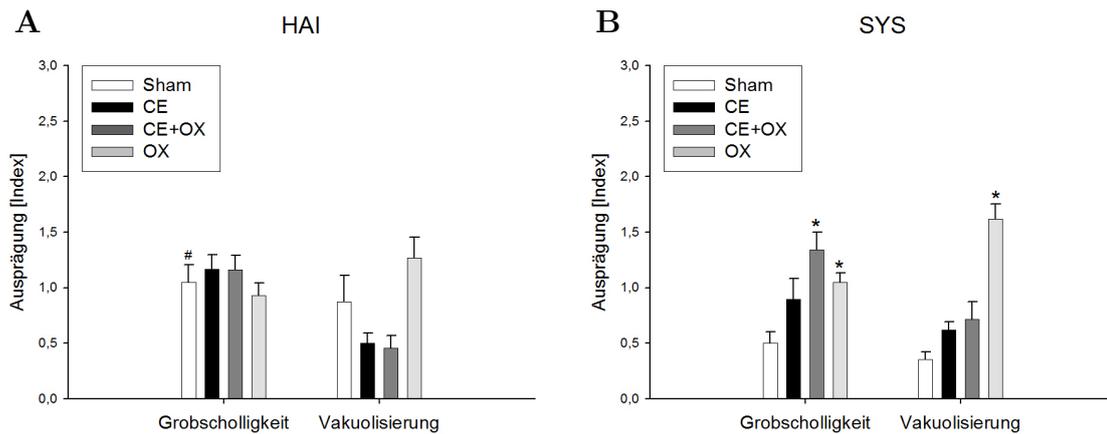


Abb. 6.14: Grobscholligkeit und Vakuolisierung des Zytoplasmas von Hepatozyten nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B), als Index dargestellt (0=0%, 1=< 30%, 2=40-70%, 3=>70%). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * p <0.05 vs. NaCl. # p <0.05 vs. systemische Infusion.

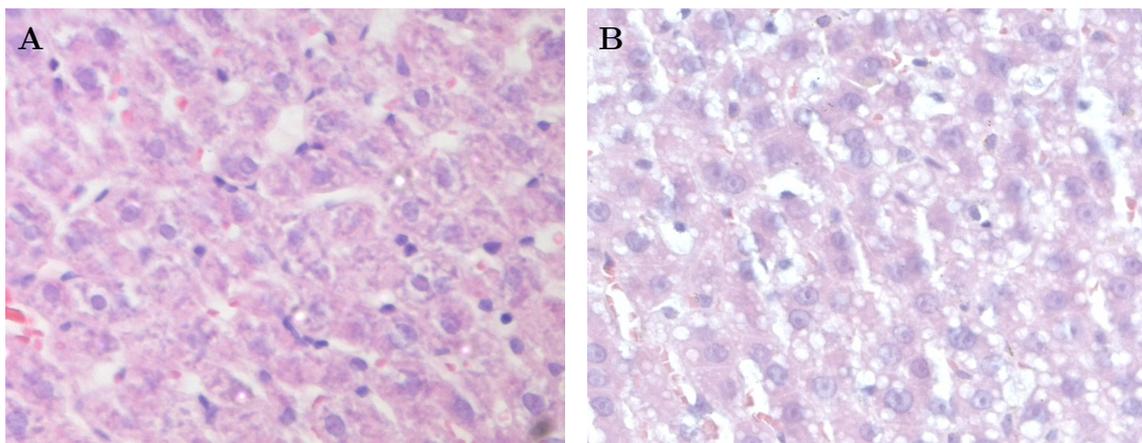


Abb. 6.15: HE-Färbung der Leber. A zeigt eine Grobscholligkeit Grad 3 bei 40 \times Vergrößerung. B zeigt eine ausgeprägte Vakuolisierung Grad 3 bei 40 \times Vergrößerung.

6.2.9 Venolenschädigung

Die Venolenschädigung wurde ebenfalls anhand von HE-Schnitten untersucht. Es wurden jeweils 25 Gefäße ausgezählt und nach Endothelablösung, intraluminale Fibrinablagerung und Erythrozytenwandständigkeit beurteilt (Abb. 6.17). Zu erkennen ist, dass weder die HAI noch die systemische Infusion von allen drei Behandlungsformen zu einer Venolenschädigung führten. Die HAI und systemische Infusion von Oxaliplatin führten sogar zu einer geringeren Erythrozytenwandständigkeit im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 6.16).

6. ERGEBNISSE

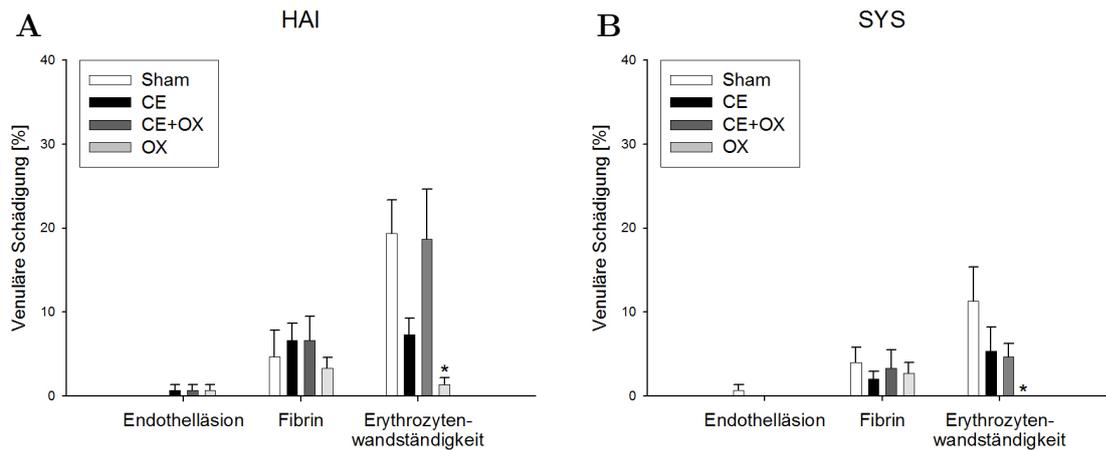


Abb. 6.16: Prozentuale venuläre Schädigung nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

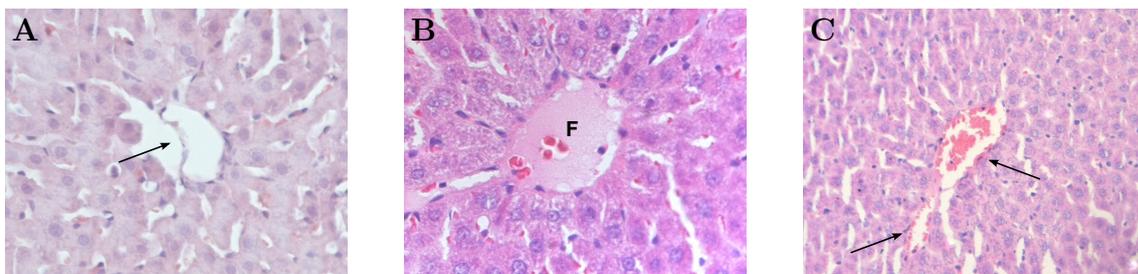


Abb. 6.17: HE-Färbung der Leber. A zeigt eine Endothelablösung (Pfeil) in einer Venole bei 40 \times Vergrößerung. B zeigt eine Fibrinablagerung (F) in einer Venole bei 40 \times Vergrößerung. C zeigt eine Erythrozytenwandständigkeit (Pfeile) in beiden Venolen bei 20 \times Vergrößerung.

6.2.10 Leberenzyme

Um den Grad der Leberschädigung einschätzen zu können, wurden aus dem Blutplasma die Aktivitäten der Leberenzyme γ GT, GLDH, AST, ALT und LDH spektrophotometrisch bestimmt.

6.2.10.1 γ GT

Die Analyse der Plasmaaktivität von γ GT zeigte einen insgesamt höheren Anstieg in der HAI-Gruppe. In der HAI-Kontrollgruppe nahm der Wert gegenüber dem der systemischen Kontrollgruppe signifikant zu. In beiden Versuchsgruppen lies Oxaliplatin die Werte am stärksten ansteigen, jedoch ohne Signifikanz. Im Gegensatz dazu stiegen die Werte bei der Behandlung mit der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin in beiden Versuchsgruppen am geringsten an (Abb. 6.18).

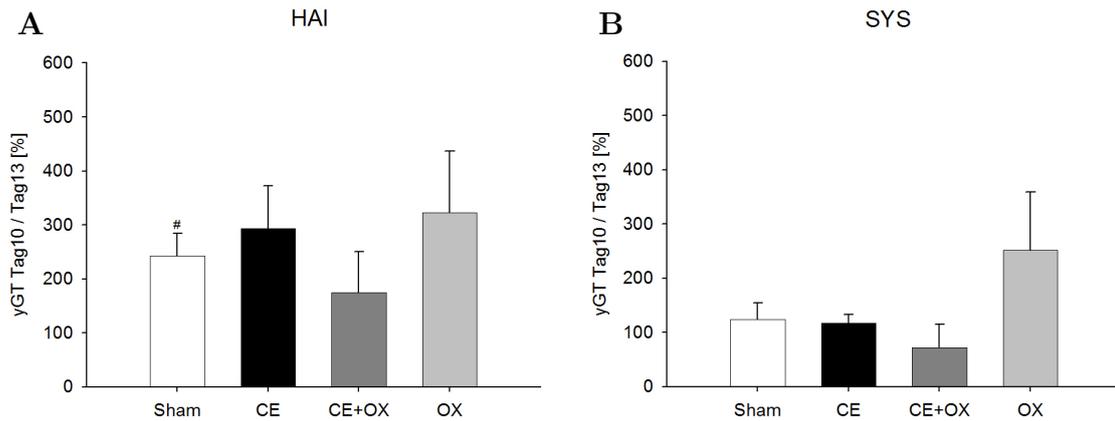


Abb. 6.18: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von γ GT zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.2.10.2 GLDH

Insgesamt war ein Anstieg der GLDH in der HAI-Gruppe zu beobachten, während die Werte in der systemischen Gruppe stagnierten oder sanken. Die HAI von Cetuximab+Oxaliplatin führte im Vergleich zur systemischen Infusion zu einem signifikanten Anstieg der Plasmaaktivität von GLDH (Abb. 6.19).

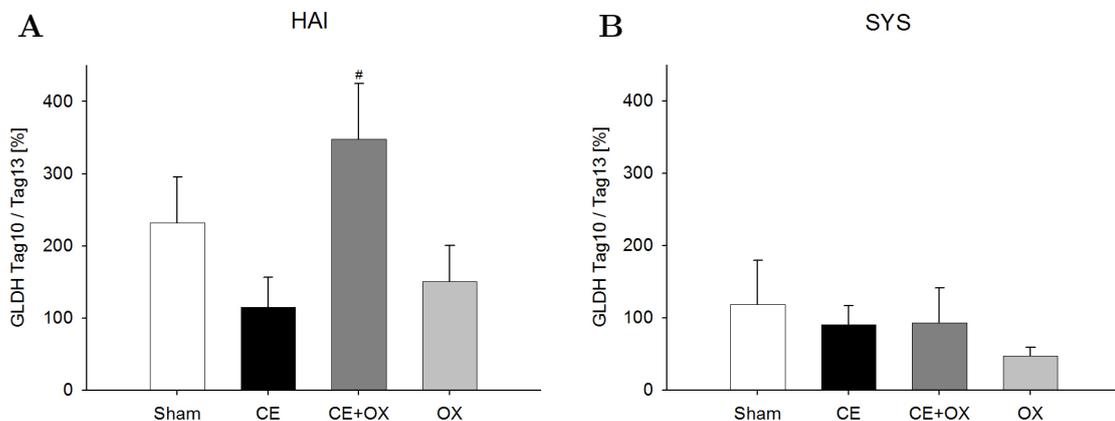


Abb. 6.19: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von GLDH zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.2.10.3 AST

Die Plasmaaktivität der AST wurde durch die Behandlungen nur geringfügig beeinflusst. Auch hier ist ein nicht signifikanter Anstieg der Plasmaaktivitäten in der

6. ERGEBNISSE

HAI-Gruppe erkennbar (Abb. 6.20). In der systemischen Versuchsgruppe erreichten nur die Oxaliplatin-behandelten Tiere ähnlich hohe Werte (Abb. 6.20 B).

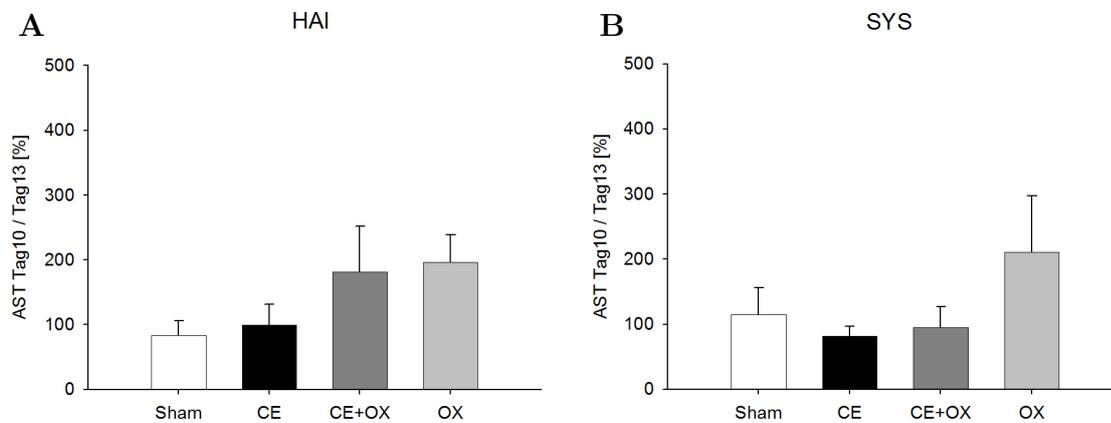


Abb. 6.20: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von AST zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM.

6.2.10.4 ALT

Die Aktivität der ALT wurde durch die Behandlungen ebenfalls unwesentlich verändert. Auffällig war, dass die systemische Kontrollgruppe einen stärkeren Anstieg der Plasmakonzentration zeigte als die HAI Kontrollgruppe. In der systemischen Versuchsgruppe stieg sie nur in den Oxaliplatin-behandelten Tieren. Neben der Oxaliplatin-Behandlung führte in der HAI-Gruppe auch die Kombination von Oxaliplatin und Cetuximab zu einer leichten Erhöhung der ALT-Werte. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich jedoch nicht (Abb. 6.21).

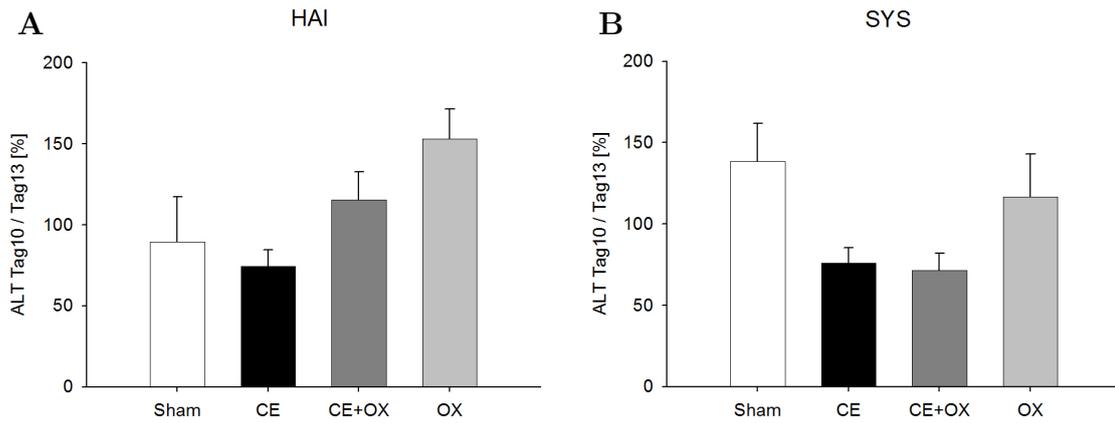


Abb. 6.21: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von ALT zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM.

6.2.10.5 LDH

Die LDH-Aktivität war in der HAI-Versuchsgruppe gering höher als in der systemischen Gruppe. Es fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 6.22).

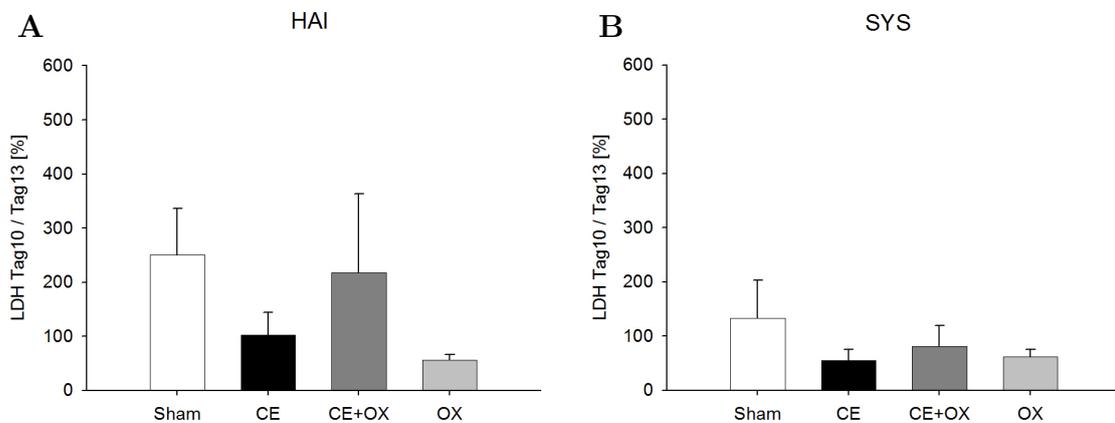


Abb. 6.22: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von LDH zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+OX, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM.

6.3 Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab und Irinotecan

6.3.1 Körpergewicht

In der systemischen Gruppe verloren alle Tiere, die eine medikamentöse Behandlung bekamen, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant Gewicht. Der Gewichtsverlust betrug 9%-10% (Abb. 6.23 B). In der HAI-Gruppe blieb das Gewicht unverändert, mit Ausnahme der Cetuximab-behandelten Tiere. Diese nahmen sogar verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant an Gewicht zu (Abb. 6.23 A).

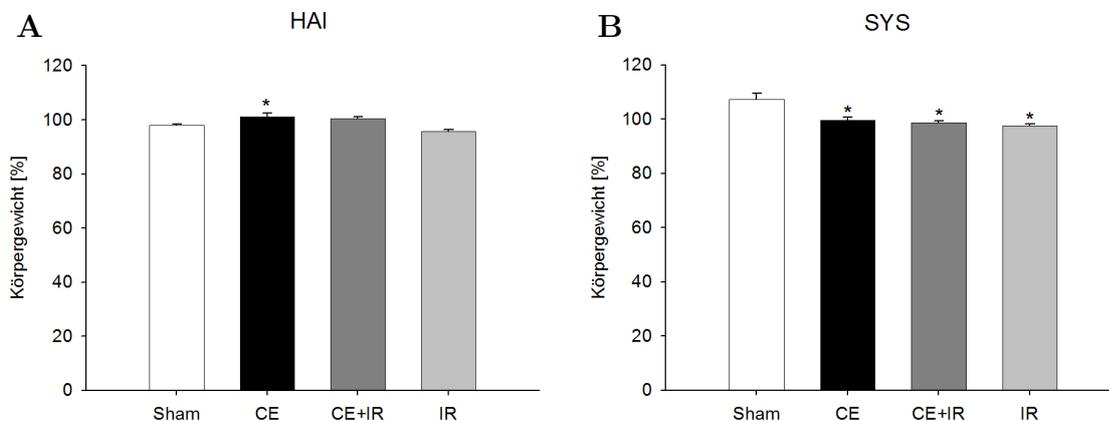


Abb. 6.23: Prozentuale Änderung des Körpergewichts zwischen Tag 0 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Gewicht an Tag 0. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

6.3.2 Tumorzvolumen

Bezüglich der Tumorgöße konnte ein Unterschied zwischen der HAI und systemischen Gruppe festgestellt werden. Tiere, die mit HAI von Cetuximab sowie Cetuximab+Irinotecan behandelt wurden, wiesen ein signifikant geringeres Tumorzvolumen auf (Abb. 6.24). Insgesamt war nach einer HAI ein niedrigeres Tumorzvolumen zu erkennen. Insbesondere zeigte sich nach HAI-Cetuximab eine signifikante Reduktion des Tumorzvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 6.24 A). In der systemischen Versuchsgruppe stieg das Tumorzvolumen nach der Behandlung mit Cetuximab+Irinotecan im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar signifikant an (Abb. 6.24 B).

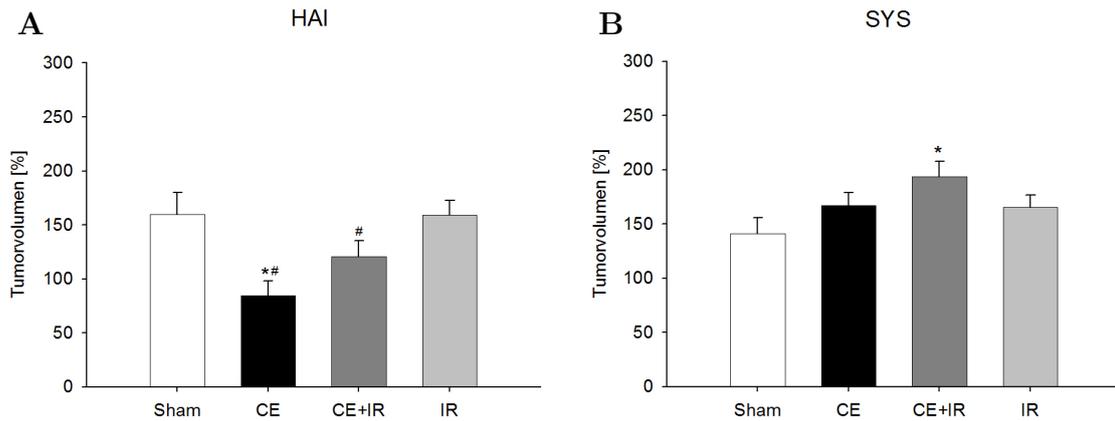


Abb. 6.24: Prozentuale Änderung des Tumorvolumens zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Tumorvolumen an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.3.3 Proliferation

Erwartungsgemäß wiesen gesunde Leberabschnitte einen geringen Proliferationsindex auf, im Tumor war die Proliferationsrate dagegen sehr hoch. Wie schon beschrieben, zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der HAI- und der systemischen Kontrollgruppe. Zudem sank die Proliferationsrate der Leber nach einer systemischen Behandlung mit der Kombination von Cetuximab und Irinotecan signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 6.25).

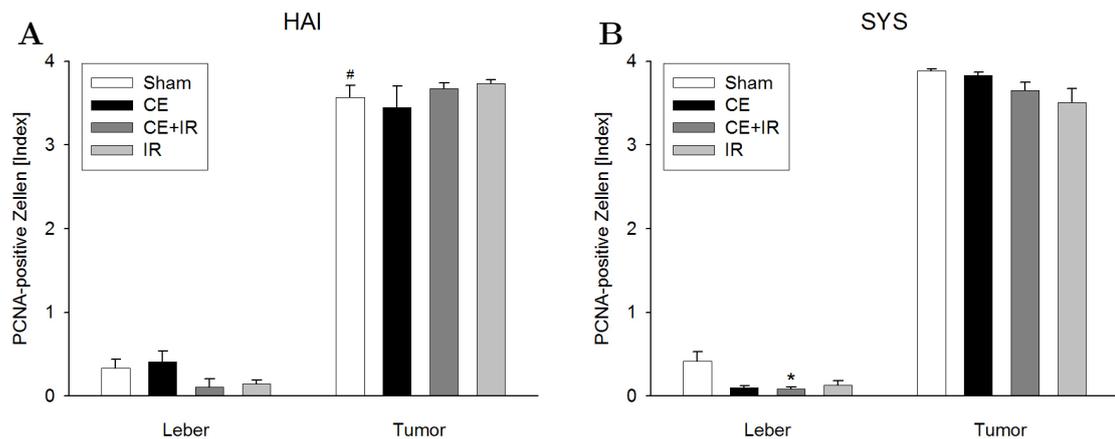


Abb. 6.25: PCNA-positive Zellen in Leber und Tumor nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B), als Index dargestellt (0= $<1\%$, 1=1-10%, 2=10-30%, 3=30-50%, 4= $\geq 50\%$, PCNA-positive Zellen in %). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.3.4 Apoptose

Insgesamt wurden in der Leber kaum apoptotische Zellen gefunden. Die HAI-Behandlung mit Cetuximab führte zu einer signifikanten Steigerung apoptotischer Zellen sowohl im Vergleich zur Kontrollgruppe als auch zur systemischen Behandlung. Insgesamt war in der HAI-Gruppe verglichen mit der systemischen Infusion ein stärkerer Anstieg der Anzahl Caspase-3-positiver Zellen zu verzeichnen (Abb. 6.26).

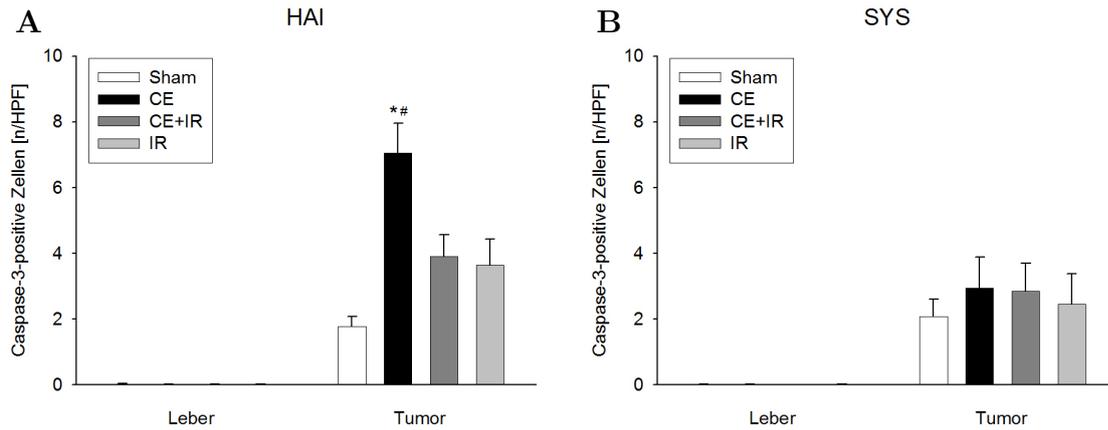


Abb. 6.26: Quantitative Analyse Caspase-3-positiver Zellen in Leber und Tumor nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.3.5 Angiogenese

In beiden Versuchsgruppen nahm die Zahl der Tumorgefäße durch alle drei Behandlungen im Vergleich zu den Kontrollgruppen signifikant ab. Zusätzlich zeigte die systemische Infusion von Cetuximab eine signifikante Abnahme der Anzahl der Tumorgefäße gegenüber der HAI-Behandlung (Abb. 6.27).

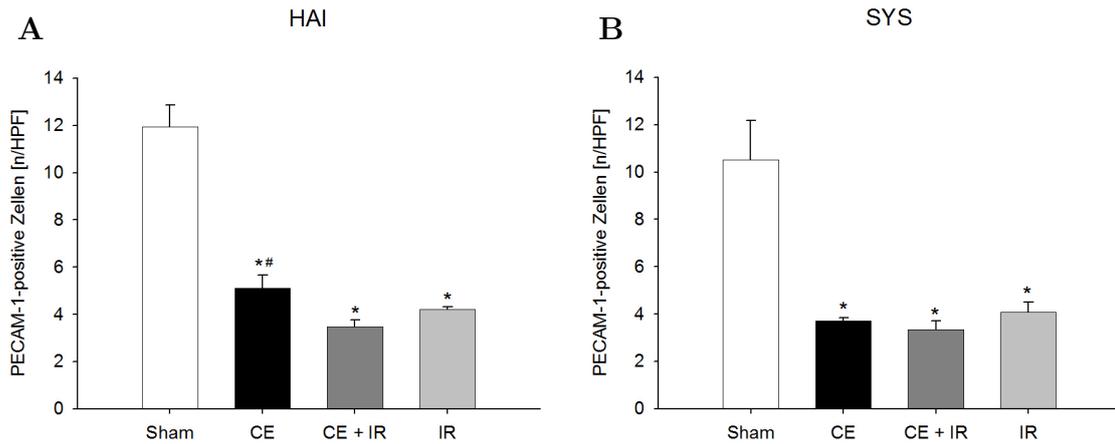


Abb. 6.27: Quantitative Analyse PECAM-1-positiver Zellen in Tumoren nach einer HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. $*p < 0.05$ vs. NaCl. $\#p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.3.6 Blutbild

6.3.6.1 Hämoglobin

Sowohl die HAI als auch die systemische Behandlung beeinflussten die Hämoglobinwerte kaum. Es fand sich lediglich in der systemischen Gruppe eine signifikante Senkung des Hämoglobinwertes der Cetuximab-behandelten Tiere gegenüber der systemischen Kontrollgruppe sowie der HAI von Cetuximab (Abb. 6.27). Insgesamt konnte ein allgemeiner Abfall des Hämoglobinwertes zwischen Tag 10 und Tag 13 verzeichnet werden.

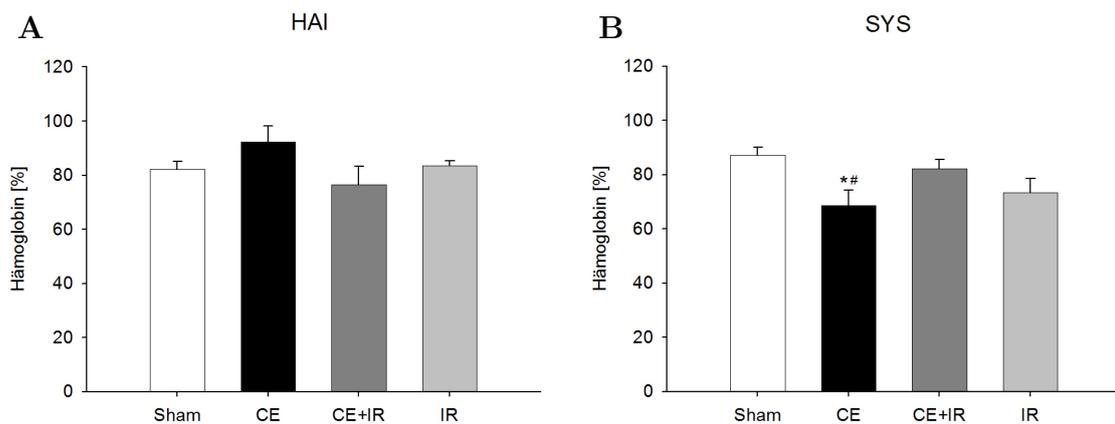


Abb. 6.28: Prozentuale Änderung des venösen Hämoglobinwertes zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Absolutwert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. $*p < 0.05$ vs. NaCl. $\#p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6. ERGEBNISSE

6.3.6.2 Thrombozyten

Durch die Behandlungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der systemischen Thrombozytenzahl. Insgesamt war in der HAI-Gruppe der Verlust der Thrombozyten geringer (Abb. 6.29).

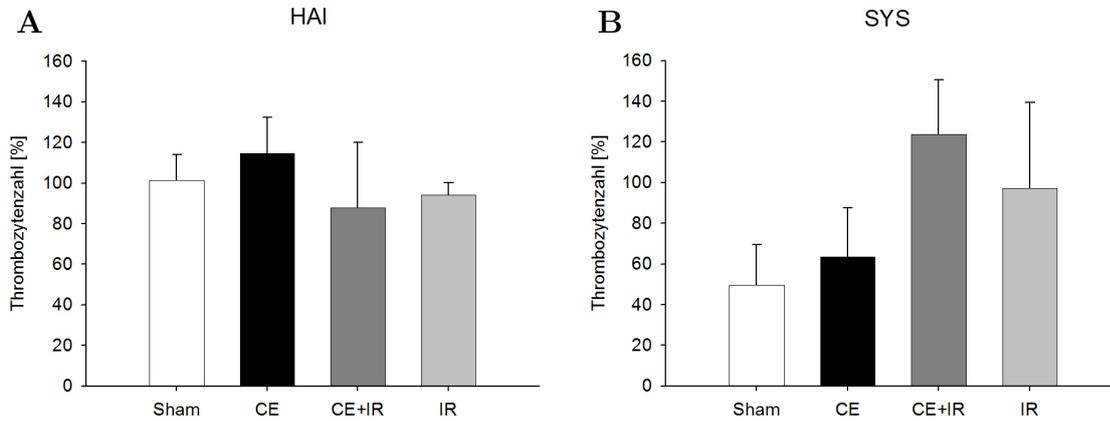


Abb. 6.29: Prozentuale Änderung der venösen Trombozytenzahl zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Absolutwert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM.

6.3.6.3 Leukozyten

Auch die Leukozytenzahl wurde kaum von den Behandlungen beeinflusst. Einzig in der HAI-Gruppe führte die Applikation von Irinotecan zu einer signifikanten Erhöhung der Leukozytenzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der systemischen Gruppe zeigte Irinotecan eine ähnliche nicht signifikante Erhöhung (Abb. 6.30).

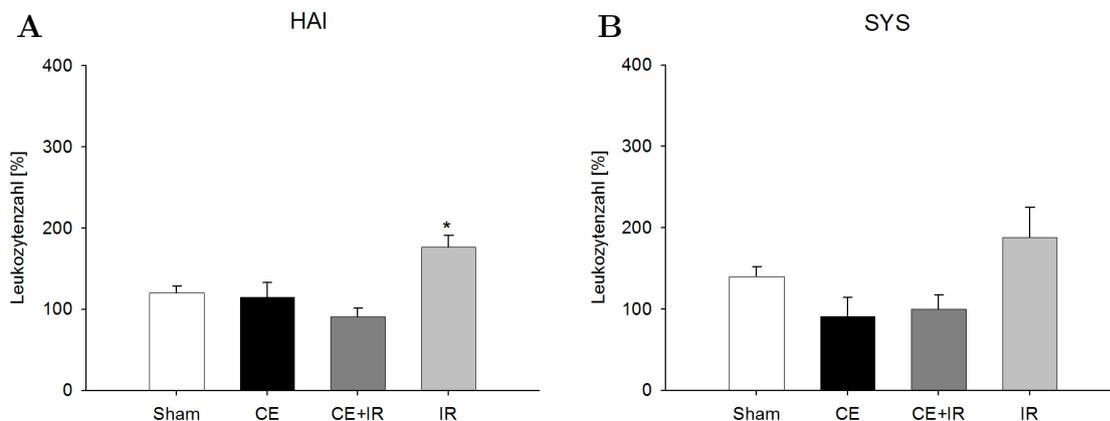


Abb. 6.30: Prozentuale Änderung der venösen Leukozytenzahl zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion (B). 100% entsprechen dem Absolutwert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

6.3.7 Leukozyteninfiltration

Die Leukozyteninfiltration in den NaCl-Kontroll- und den Cetuximab-Gruppen wurde bereits in 6.2.7 dargestellt. Die Werte sind in der Tabelle übersichtshalber nochmals dargestellt und werden an dieser Stelle nicht mehr beschrieben. Auch hier fällt auf, dass sich die meisten Leukozyten in der Nähe des Portalfeldes fanden. Die HAI mit Cetuximab+Irinotecan führte zu einem signifikanten Anstieg der Leukozyteninfiltration in den Portalfeldern (extravasal), die systemische Infusion zu einer vermehrten Leukozyteninfiltration an den Venolen (extravasal) im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe (Tabelle 6.7). Die HAI von Irinotecan zeigte eine Verminderung der Leukozyteninfiltration in den Sinusoiden gegenüber der venösen Gabe. Die systemische Infusion von Irinotecan wies im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung der Leukozytenzahl in den Sinusoiden und an den Venolen (extravasal) auf (Tabelle 6.8).

Sham	HAI	SYS
Sinusoide	1,06 ($\pm 0,59$)	0,77 ($\pm 0,27$)
Portalfeld intravasal	0,14 ($\pm 0,04$)	0,13 ($\pm 0,08$)
Portalfeld extravasal	2,56 ($\pm 0,59$)	3,68 ($\pm 0,85$)
Venole intravasal	0,04 ($\pm 0,02$)	0,10 ($\pm 0,04$)
Venole extravasal	1,14 ($\pm 0,45$)	0,60 ($\pm 0,07$)

Tabelle 6.5: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit NaCl (Sham). Mittelwert \pm SEM.

CE	HAI	SYS
Sinusoide	1,07 ($\pm 0,18$)	1,12 ($\pm 0,17$)
Portalfeld intravasal	0,02 ($\pm 0,02$)	0,05 ($\pm 0,03$)
Portalfeld extravasal	5,12 ($\pm 0,34$)*	3,95 ($\pm 0,45$)
Venole intravasal	0,03 ($\pm 0,02$)	0,05 ($\pm 0,03$)
Venole extravasal	1,22 ($\pm 0,18$)	1,33 ($\pm 0,13$)*

Tabelle 6.6: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit Cetuximab (CE). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

6. ERGEBNISSE

CE+IR	HAI	SYS
Sinusoide	1,55 ($\pm 0,20$)	1,53 ($\pm 0,18$)
Portalfeld intravasal	0,03 ($\pm 0,03$)	0,12 ($\pm 0,10$)
Portalfeld extravasal	4,68 ($\pm 0,61$)*	4,62 ($\pm 0,21$)
Venole intravasal	0,03 ($\pm 0,03$)	0,08 ($\pm 0,08$)
Venole extravasal	1,28 ($\pm 0,18$)	1,20 ($\pm 0,18$)

Tabelle 6.7: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit Cetuximab und Irinotecan (CE+IR). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl.

IR	HAI	SYS
Sinusoide	1,00 ($\pm 0,18$)#	2,20 ($\pm 0,38$)*
Portalfeld intravasal	0,08 ($\pm 0,05$)	0,03 ($\pm 0,03$)
Portalfeld extravasal	3,27 ($\pm 0,41$)	4,08 ($\pm 0,09$)
Venole intravasal	0,13 ($\pm 0,05$)	0,08 ($\pm 0,05$)
Venole extravasal	0,85 ($\pm 0,21$)	1,40 ($\pm 0,25$)

Tabelle 6.8: Leukozyteninfiltration der Leber nach einer Behandlung mit Irinotecan (IR). Mittelwert \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. NaCl. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.3.8 Zellschädigung

Die Zellschädigung wurde anhand der HE-Färbung ermittelt. Die HAI von NaCl und Cetuximab+Irinotecan ergab im Vergleich zur systemischen Infusion eine signifikant geringere Grobscholligkeit. Die HAI von Cetuximab+Irinotecan wies zudem auch eine signifikant geringere hepatozelluläre Vakuolisierung im Vergleich zur venösen Applikation auf. In der systemischen Gruppe führte die Kombination von Cetuximab und Irinotecan zu einer signifikanten Steigerung der Vakuolisierung sowie der Grobscholligkeit gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 6.31).

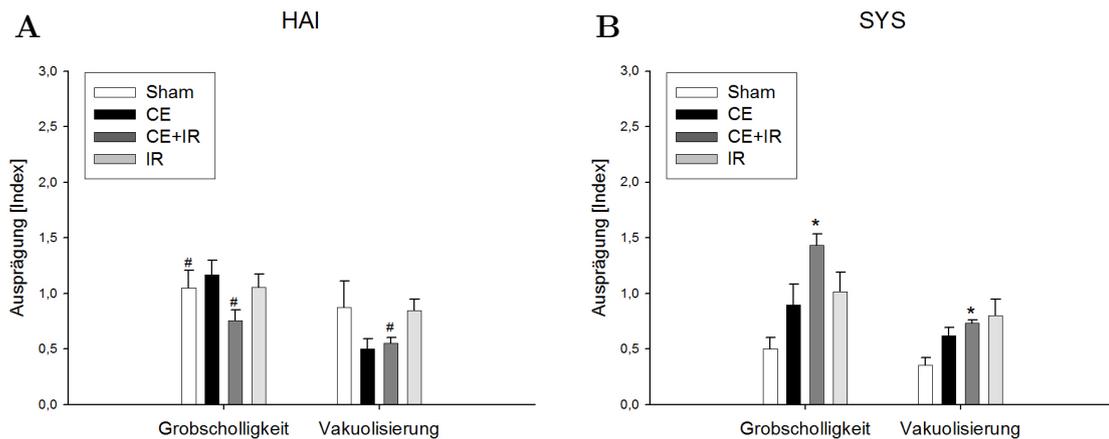


Abb. 6.31: Grobscholligkeit und Vakuolisierung des Zytoplasmas von Hepatozyten nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B), als Index dargestellt (0=0%, 1=< 30%, 2=40-70% , 3=>70%). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * p <0.05 vs. NaCl. # p <0.05 vs. systemische Infusion.

6.3.9 Venolenschädigung

Die Venolenschädigung wurde anhand der Endothelmorphologie, der Fibrinablagerungen in den Venolen und der Erythrozytenwandständigkeit beurteilt. Es ergaben sich nur geringe Unterschiede in den beiden Versuchgruppen. Die HAI von Irinotecan zeigte eine signifikant geringere Erythrozytenwandständigkeit zur Kontrollgruppe. Die Kombination von Cetuximab und Irinotecan via HAI führte dagegen zu einer Steigerung der Erythrozytenwandständigkeit, die jedoch nicht signifikant im Vergleich zur venösen Applikation war (Abb. 6.32).

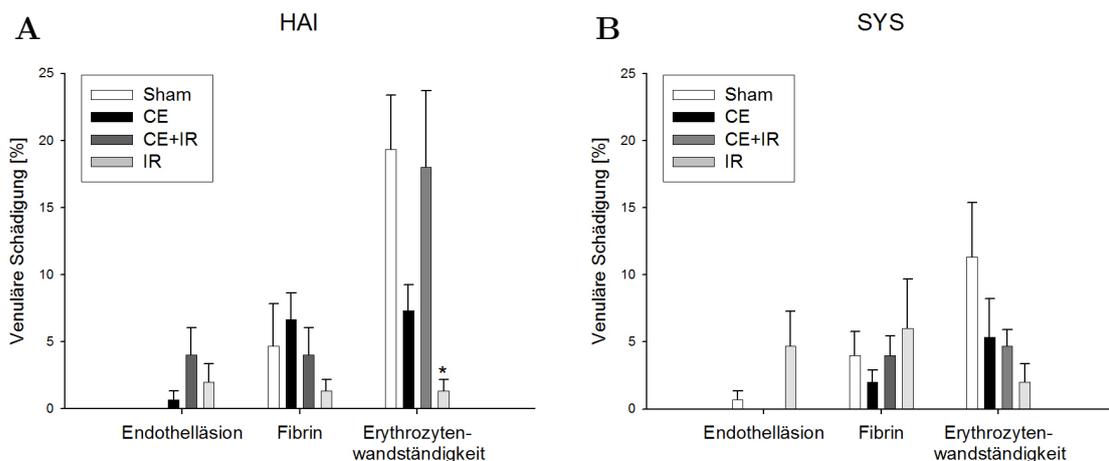


Abb. 6.32: Prozentuale venuläre Schädigung nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Oxaliplatin (CE+IR, dunkelgrau), Oxaliplatin (OX, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. * p <0.05 vs. NaCl.

6.3.10 Leberenzyme

6.3.10.1 γ GT

Die Bestimmung der Plasmaaktivität von γ GT ergab insgesamt höhere γ GT-Werte in der HAI-Gruppe. Zwischen den beiden Kontrollgruppen bestand ein signifikanter Unterschied, die systemische Kontrollgruppe zeigte signifikant geringere γ GT-Werte. Auffallend war, dass die HAI von Irinotecan als einziges Medikament in der HAI-Gruppe niedrigere γ GT-Werte aufwies als die systemische Infusion von Irinotecan (Abb. 6.33).

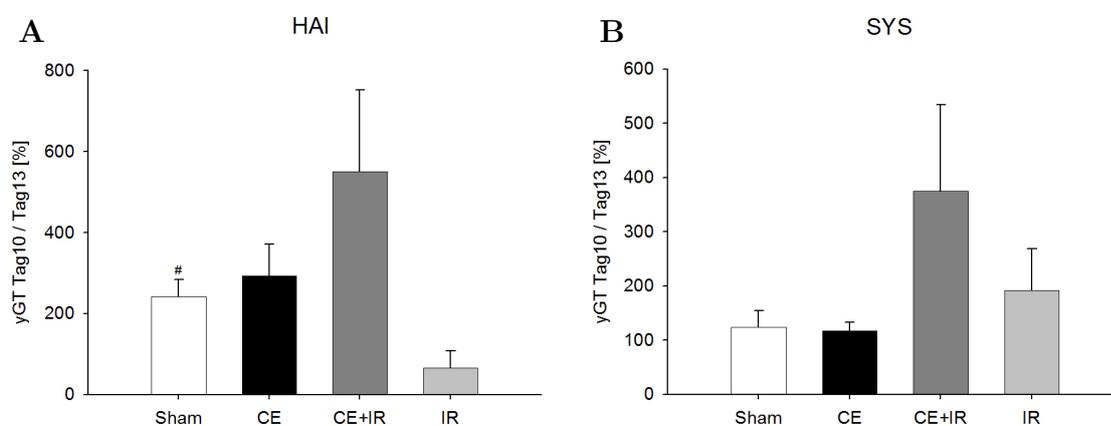


Abb. 6.33: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von γ GT zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. # $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.3.10.2 GLDH

Die HAI führte insgesamt zu einer stärkeren Erhöhung der Plasmaaktivität der GLDH. Es ergaben sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Kombination von Cetuximab und Irinotecan zeigte in beiden Applikationsformen die höchsten Werte (Abb. 6.34).

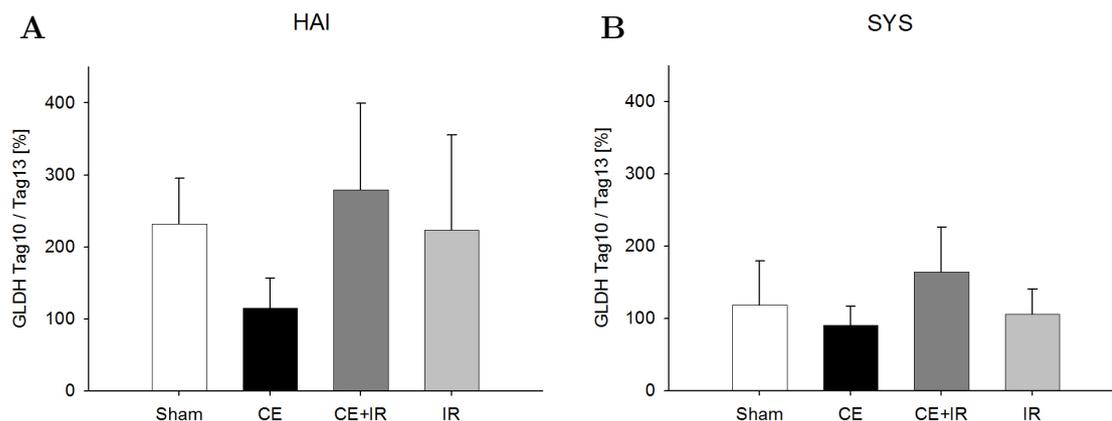


Abb. 6.34: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von GLDH zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM.

6.3.10.3 AST

Beide Behandlungsformen beeinflussten die Plasmaaktivität der AST kaum und führten zu vergleichbaren Ergebnissen.

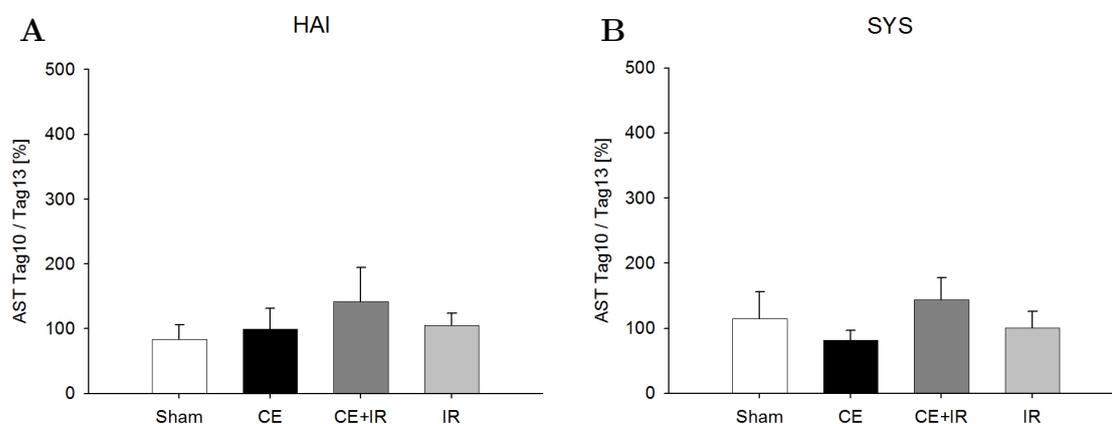


Abb. 6.35: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von AST zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM.

6.3.10.4 ALT

Die HAI von Irinotecan führte im Vergleich zur systemischen Infusion zu einem signifikant höheren Anstieg des ALT-Wertes (Abb. 6.36). Des Weiteren ergaben sich kaum Unterschiede in Bezug auf die Aktivität der ALT.

6. ERGEBNISSE

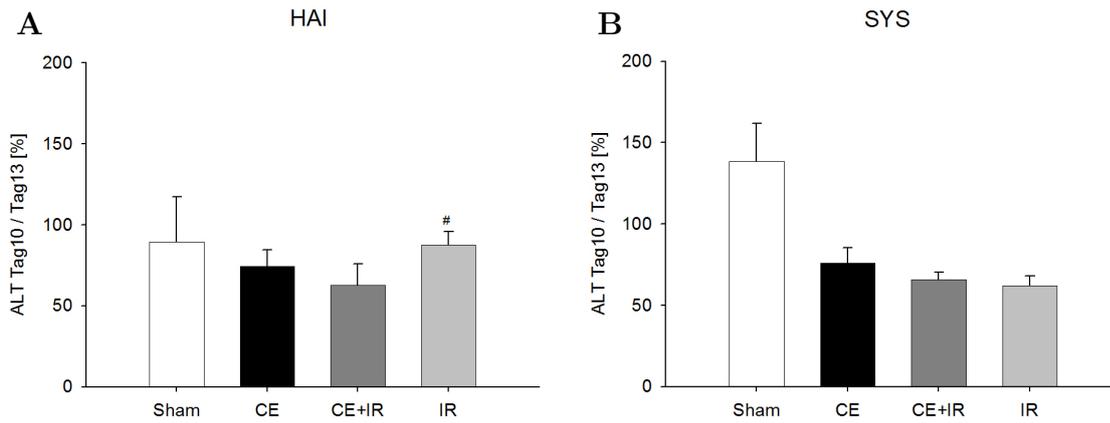


Abb. 6.36: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von ALT zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und einer systemischen Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM. [#] $p < 0.05$ vs. systemische Infusion.

6.3.10.5 LDH

Die Messung der LDH ergab keinerlei signifikante Unterschiede sowohl zwischen als auch innerhalb der beiden Behandlungsgruppen (Abb. 6.37).

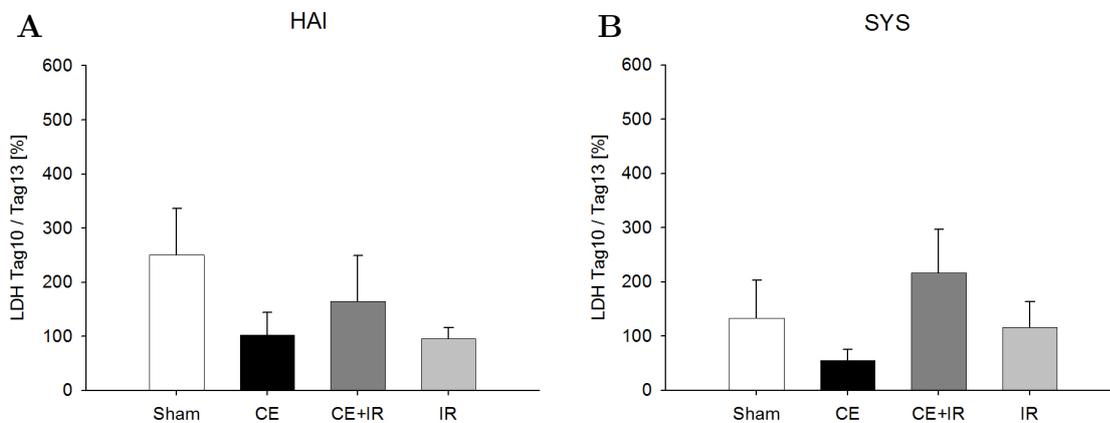


Abb. 6.37: Prozentuale Änderung der Plasmaaktivität von LDH zwischen Tag 10 und Tag 13 nach HAI (A) und systemischer Infusion, SYS (B). 100% entsprechen dem Wert an Tag 10. Behandlung mit NaCl (Sham, weiß), Cetuximab (CE, schwarz), Cetuximab+Irinotecan (CE+IR, dunkelgrau), Irinotecan (IR, hellgrau). Mittelwert \pm SEM.

7. DISKUSSION

7.1 Diskussion von Material und Methoden

7.1.1 Chirurgische Präparation und Tumorimplantation

In der vorliegenden Studie wurden als Versuchstiere WAG/Rij Ratten verwendet, denen syngene Zellen der Zelllinie CC531 subkapsulär in den linken Leberlappen implantiert wurden.

In der Literatur finden sich einige Tumormodelle, die der Erzeugung von Lebermetastasen dienen. Dazu gehört die Implantation von Tumorfragmenten unter die Leberkapsel [Kuo et al. 1995], die portalvenöse Injektion von Tumorzellen [Steinbauer et al. 2003] und die, in der vorliegenden Untersuchung verwendete Methode, der direkten subkapsulären Injektion von Tumorzellen in die Leber [Duijnhoven et al. 2005; Sperling et al. 2012]. Die portalvenöse Injektion eignet sich vor allem dazu, frühe Schritte der komplexen Metastasierungskaskade zu verfolgen. Es handelt sich um ein diffuses Tumormodell mit variabler Größe und Lokalisierung des Tumors. In der vorliegenden Studie wurde mittels Ultraschall das Tumolvolumen bestimmt, weshalb man einen einzelnen Tumor in definierter Position in der Leber produzieren wollte, um einen leichten Zugang für den Schallkopf zum Tumor zu schaffen. Die Implantation von Tumorfragmenten ermöglicht zwar die Reproduktion eines festgelegten Tumolvolumens, berücksichtigt aber kaum die physiologischen Bedingungen von Tumorwachstum, Angiogenese und Vaskularisierung. Mit der Methode der direkten Injektion von Tumorzellen in die Leber lässt sich ebenfalls eine festgelegte Tumorgröße reproduzieren. Sie wurde in der Arbeit von Kollmar et al. ausführlich beschrieben [Kollmar et al. 2004]. Diese Methode ermöglicht unter anderem auch die Analyse von Angiogenese und Wachstum, die in der vorliegenden Studie von besonderer Bedeutung war. Die Methode der subkapsulären Injektion von Tumorzellen wurde also gewählt, um einerseits ein einheitliches Tumolvolumen und andererseits eine möglichst physiologische Situation zu erreichen.

Die WAG-Ratten erwiesen sich in der Studie als gut geeignete Versuchstiere. Sie

wogen 300-350g und boten dadurch ideale Bedingungen für die mikrochirurgische Präparation. Zudem sind WAG-Ratten sehr stressresistent, was den Versuchsablauf erleichterte. Die syngene Zelllinie CC531 weist gleiche Verteilungsmuster von Immunzellen und Matrixproteinen auf, wie sie auch bei dem humanen kolorektalen Karzinom beschrieben wurden, und stellt aus diesem Grund ein sinnvolles Modell zur Erprobung neuer therapeutischer Ansätze dar [Hagenaars et al. 2000; Havenith et al. 1988; Ljubimov et al. 1992].

7.1.2 Systemische Chemotherapie und hepato-arterielle Infusion

Als first-line-Behandlung von unresektablen Lebermetastasen gilt bis heute die systemische Chemotherapie. Durch die Einführung neuer Chemotherapeutika, wie Oxaliplatin und Irinotecan, konnte die mittlere Überlebenszeit von 12 Monaten auf über 20 Monate gesteigert werden. Regionale Behandlungsverfahren, wie die hepato-arterielle Infusion (HAI), werden eingesetzt, um Lebermetastasen zu kontrollieren, um lokale Rezidive zu verhindern, um die Progression der Erkrankung aufzuhalten oder zu verzögern, um damit das Überleben zu verlängern [Kulaylat et al. 2010].

Die systemische Chemotherapie konnte an den Versuchstieren problemlos durchgeführt werden und wurde gut von ihnen vertragen. Es wurde eine Punktionsstechnik gewählt, bei der eine Strecke von 5mm subperitoneal überbrückt wurde, bevor es zur Punktion der Gefäßwand kam, sodass sich nach der Infusion das intakte Peritoneum über die Punktionsstelle legte. Die Vorteile dieser Technik liegen in der sofortigen Blutstillung, im Idealfall ohne Blutverlust. Erfolgte der Verschluss der Punktionsstelle durch das Peritoneum nicht sofort, entstanden retroperitoneale Hämatome. Insgesamt stellten die retroperitonealen Hämatome jedoch eine seltene und sicher beherrschbare Komplikation dar.

Die hepato-arterielle Infusion an Ratten ist ein erprobtes Modell und wird auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt [Duijnhoven et al. 2005]. Die Präparation und Kanülierung der A. gastroduodenalis verlief unkompliziert und stellte für die Tiere keine größere Belastung dar.

Vorab sollte festgehalten werden, dass die intrahepatischen vaskulären Strukturen der Ratten mit denen des Menschen vergleichbar sind [Gonda et al. 2000].

Die Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen mittels hepato-arterieller Infusion basiert einerseits auf der einzigartigen dualen Blutversorgung der Leber und der Metastasen. Andererseits nimmt auch die Pharmakokinetik des applizierten Medikaments Einfluss. Metastasen von einer Größe von über 3 mm beziehen ihre Blutversorgung aus der A. hepatica, während das restliche Lebergewebe zu großen Teilen

portalvenös versorgt wird [Breedis et al. 1954].

Sigurdson et al. bestimmten, auf der Suche nach der besseren regionalen Methode, im Jahre 1987 Floxuridin (FUDR)-Spiegel im Tumor und im Lebergewebe von Patienten, die entweder mit einer HAI oder einer portalvenösen Infusion behandelt wurden. Die FUDR-Spiegel im Lebergewebe unterschieden sich nicht. Im Tumor fanden sie dagegen eine signifikant höhere FUDR-Konzentration nach der HAI im Vergleich zur portalvenösen Applikation [Sigurdson et al. 1987]. Aus der geringen tumoralen Medikamentenaufnahme nach einer portalvenösen Infusion schlossen die Autoren auf geringe Ansprechraten. Sie empfahlen die HAI als regionale Therapie für Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms. 1998 zeigten Okuno et al. ähnliche Ergebnisse mit Fluorouracil (5-FU). Sie verglichen die Infusion dieses Medikamentes via A. hepatica mit einer portalvenösen Infusion und einem Zugang über eine periphere Schwanzvene bei Wistar-Ratten. Die Konzentration von 5-FU wurde mithilfe der Signalstärke in der ^{19}F -NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy) bestimmt. Nach Applikation via A. hepatica konnte 5-FU über einen deutlich längeren Zeitraum in hoher Konzentration in der Leber nachgewiesen werden. Der initiale Signalanstieg war in allen drei Versuchsgruppen ähnlich hoch, sank aber nach der portalvenösen und der Schwanzvenen-Infusion stärker ab. Diese Tatsache erklärten die Autoren durch einen längeren Verbleib von 5-FU im peribiliären Plexus nach einer HAI [Okuno et al. 1998]. Denn bereits im Jahre 1970 zeigte Burkel, dass die Äste der Pfortader direkt in die Sinusoide drainieren, die Äste der A. hepatica dagegen zunächst teils in den peribiliären Plexus und erst darauf in die Sinusoide fließen [Burkel 1970]. Diese Erkenntnis könnte einen weiteren Vorteil der HAI gegenüber der systemischen Infusion darstellen. Gonda et al. fanden zusätzlich heraus, dass neue Gefäße in 80% der Lebermetastasen aus dem peribiliären Plexus hervorgehen. Dies bedeutet, dass Lebermetastasen einen Großteil ihres Blutvolumens aus dem peribiliären Plexus beziehen und nur ein kleiner Teil direkt arteriell versorgt wird [Gonda et al. 2000].

Durch die HAI werden also einerseits verlängerte intratumorale Konzentrationen des applizierten Medikamentes erreicht, wobei das normale Leberparenchym ausgespart wird. Andererseits resultieren durch den first-pass Effekt hohe Extraktionsraten des Medikamentes aus dem hepato-arteriellen Kreislauf, die hohe lokale Tumor-Konzentrationen bei gleichzeitig geringen systemischen Konzentrationen zur Folge haben.

Die systemische Chemotherapie hat gegenüber der arteriellen Infusion den Vorteil sowohl die portalvenös-versorgten Bereiche der Leber als auch extrahepatische Mikrometastasen zu erreichen. Bei 20% der Patienten findet man zum Zeitpunkt der

7. DISKUSSION

Diagnosestellung synchrone Lebermetastasen [Midgley et al. 1999]. Durch eine systemische Chemotherapie können somit gleichzeitig der Primärtumor und Metastasen behandelt werden.

Zusammenfassend stellt die HAI eine vorteilhafte Methode in der Behandlung hepatischer Metastasen dar. Eine systemische Chemotherapie kann sowohl bei hepatischen Metastasen als auch bei extrahepatischen Metastasen eingesetzt werden.

Über die hepato-arterielle Infusion von Cetuximab in der Behandlung hepatischer Metastasen des kolorektalen Karzinoms liegen derzeit keine Daten vor. Fest steht, dass Cetuximab venös verabreicht eine antitumoröse Wirkung besitzt [Lee et al. 2007; Mendelsohn et al. 2003]. Diese Tatsache bildete den Ausgangspunkt für die hepato-arterielle Anwendung von Cetuximab. Eine weitere Voraussetzung, die ein Zytostatikum erfüllen sollte, ist das Vorliegen in aktiver Form oder eine Aktivierung desselbigen in der Tumorzelle [Link et al. 2006]. Als monoklonaler Antikörper erfordert Cetuximab keinerlei Aktivierung. In einer immunzytochemischen Fluoreszenzfärbung der vorliegenden Arbeit wurde zudem nachgewiesen, dass Cetuximab an den EGFR von CC531-Zellen bindet. Somit liegen beste Bedingungen vor, um die hepato-arterielle Wirkung von Cetuximab experimentell zu eruieren.

Oxaliplatin stellt aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (HWZ) von 15 Minuten [Jerremalm et al. 2009] ein geeignetes Medikament für den Einsatz über eine HAI dar. Durch die kurze HWZ werden systemische Nebenwirkungen minimiert. Klinische Studien zur hepato-arteriellen Infusion von Oxaliplatin erzielten vielversprechende Resultate. Sie sind in der Arbeit von Kulaylat und Gibbs zusammengefasst [Kulaylat et al. 2010]. Angesichts seines erfolgreichen Einsatzes über die HAI wurde Oxaliplatin als Zytostatikum in die vorliegende tierexperimentelle Studie aufgenommen, um einerseits die antitumoröse Wirkung gegen CC531 kolorektale Metastasen via HAI zu erforschen und um andererseits die Wirkung der Kombination mit Cetuximab zu untersuchen.

Die hepato-arterielle Wirkung von Irinotecan wurde lange Zeit nicht untersucht, da Irinotecan keinen signifikanten first-pass Effekt besitzt und andere Medikamente, wie z.B. FUDR, für den Einsatz über eine HAI für geeigneter gehalten wurden [Saenger et al. 2004]. FUDR wird aufgrund seines hohen first-pass Effektes vermehrt von der Leber aufgenommen und führt zu hohen Medikamentenkonzentrationen im Tumor. Erste Phase I Studien wiesen jedoch auf eine Zytotoxizität von Irinotecan hin, wenn es über eine HAI verabreicht wird [Pasetto et al. 2006]. Da noch weitere Untersuchungen zur HAI von Irinotecan benötigt werden und keine Studien zur HAI der Kombination von Irinotecan und Cetuximab in der Behandlung kolorektaler Lebermetastasen veröffentlicht wurden, waren diese Untersuchungen ein wichtiger

Bestandteil der Arbeit.

7.1.3 Untersuchungsmethoden

Das Tumolvolumen wurde mittels 3D-Sonographie bestimmt. Es befinden sich eine Vielzahl von präklinischen bildgebenden Verfahren in Entwicklung, wie die Magnetresonanztomographie (MRT), die Computertomographie (CT), die Positron-Emissions-Tomographie (PET) und Markierungsmethoden, wie die Fluoreszenz und die Biolumineszenz.

In der vorliegenden Studie gehören zu den wünschenswerten Eigenschaften eines nicht invasiven bildgebenden Verfahrens eine hohe Auflösung, um auch minimale Läsionen aufzudecken, Kosteneffizienz, eine schnelle Datenverarbeitung sowie ein hoher adhärenter Kontrast. Das MRT besitzt zwar eine hohe Auflösung und einen hohen adhärenten Kontrast, ist aber mit einem hohen Zeitaufwand und Kosten verbunden. Das CT weist ebenfalls eine hohe Auflösung auf, doch der schlechte Weichteilkontrast macht die Anwendung von Kontrastmitteln notwendig. Die Auflösung des PET kommt nicht an die des MRT und CT heran, zudem kann die Produktion und Aufbewahrung der Radionuklide die Kosten untragbar machen [Weissleder 2002]. Die Verwendung von fluoreszierenden und biolumineszierenden Farbstoffen stellt einen relativ kosteneffizienten Weg der Abbildung von Lebermetastasen dar, besitzt allerdings eine schlechte Auflösung. Zudem bedarf es einer Transfizierung endogener Reportergene in die Zelllinie, die untersucht werden soll [Khanna et al. 2005]. Die Sonographie ist aufgrund seiner Zeit- und Kosteneffizienz eine attraktive Methode. Die Entwicklung der Mikro-Ultraschalltechnologie des Vevo 770 ermöglichte in der vorliegenden Studie die Berechnung des Tumolvolumens. Die Detektierung der Lebermetastasen benötigte keinerlei Kontrastmittel. Um einen Verlust der Auflösung zu vermeiden wurde die Leber direkt bei offenem Abdomen geschallt. Graham et al. verwendeten in ihrer Studie ebenfalls die dreidimensionale Hochfrequenz-Sonographie um Lebermetastasen von Mäusen zu vermessen [Graham et al. 2005]. Ihre Ergebnisse zeigten, dass diese Methode besonders für die quantitative Messung der Metastasenprogression und für die Evaluation chemotherapeutischer Agenzien in präklinischen Lebermetastasenmodellen geeignet ist. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte mit der Mikro-Ultraschalltechnologie des Vevo 770 eine standardisierte Messung der Metastasen erfolgen, welche eine Vergleichbarkeit der gemessenen Tumore ermöglichte.

Insgesamt stellt die 3D-Sonographie, dank ihrer leichten und schnellen Durchführbarkeit, ihres hohen adhärenten Kontrastes und schnellen Datenverarbeitung, die beste bildgebende Methode für die vorliegende experimentelle Studie dar.

7.2 Diskussion der Ergebnisse

7.2.1 Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab und Oxaliplatin

In der Behandlung kolorektaler Metastasen zeigte Cetuximab in klinischen Studien sowohl als Einzelsubstanz als auch in Kombination mit Oxaliplatin- und Irinotecan-basierten Therapien Wirksamkeit [Arnold et al. 2008; Cunningham et al. 2004; Van Cutsem et al. 2009]. Dementsprechend wird heutzutage die systemische Infusion von Cetuximab regelmäßig in der Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen eingesetzt. Die Verwendung ist jedoch nur auf Tumore mit einem KRAS-Wildtyp beschränkt [Stintzing et al. 2009]. In der vorliegenden Studie zeigte die systemische Infusion von Cetuximab eine gering ausgeprägte antitumoröse Wirkung im Vergleich zur HAI. Dafür könnte eine Mutation im KRAS Gen der in der vorliegenden Studie verwendeten CC531-Zelllinie verantwortlich sein. Die Mutation befindet sich im Codon 12 (GGT zu GAT) und führt zu einem Austausch von Glycin durch Asparaginsäure [Etten et al. 2002]. Diese Ergebnisse stimmen mit klinischen Untersuchungen überein, die keinen Einfluss von Cetuximab auf die Remissionsrate und das progressionsfreie Überleben von Patienten mit einer KRAS-Mutation nachwiesen [Karapetis et al. 2008; Lievre et al. 2008]. Angesichts dieser Tatsache sind die Ergebnisse der vorliegenden Studie von besonderem Interesse. Denn die HAI von Cetuximab inhibierte nicht nur das Tumorwachstum, sondern reduzierte zudem auch das Tumolvolumen des CC531 KRAS-mutierten Tumors signifikant im Vergleich zur systemischen Applikation. Es konnte gezeigt werden, dass die HAI von Cetuximab das Tumorwachstum durch eine Steigerung der Apoptoserate und Reduktion der Angiogenese unabhängig vom KRAS-Status inhibiert. Zudem kann die stärkere Wirkung der HAI von Cetuximab durch eine höhere intratumorale Medikamentenkonzentration erklärt werden. In der Literatur lassen sich keine Daten zur Leberextraktionsrate von Cetuximab, die für die HAI-Wirkung entscheidend ist, finden. Medikamente mit hohen Leberextraktionsraten sind für die HAI besonders geeignet. Für eine sichere und erfolgreiche Anwendung der HAI mit Cetuximab in der Therapie von kolorektalen Lebermetastasen ist eine Bestimmung dieser Leberextraktionsrate in pharmakokinetischen Studien sinnvoll.

Die HAI von Oxaliplatin war in der vorliegenden Studie mit einer signifikanten Verminderung der Angiogenese im Vergleich zur systemischen Applikation assoziiert. Zusätzlich zeigte sich eine Verminderung des Tumolvolumens und eine tendenzielle Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zur systemischen Infusion. Studien an Kaninchen zeigten, dass eine HAI von Oxaliplatin mit einer 4,3fach höheren Medi-

kamentenkonzentration im Tumor im Vergleich zum Leberparenchym verbunden ist [Dzodic et al. 2004]. In humanen pharmakokinetischen Studien wurde ein Leberextraktionsquotient bei HAI von Oxaliplatin von 0,47 bestimmt. Dies bedeutet, dass nur rund 50% des aktiven Metabolits den systemischen Kreislauf erreicht [Guthoff et al. 2003]. Dieses vorteilhafte pharmakologische Profil erklärt den besseren antitumorösen Effekt der HAI von Oxaliplatin gegenüber der systemischen Applikation.

Vergleichbar mit der Arbeit von Gramont et al. zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit eine Oxaliplatin-induzierte Leukozytopenie [Gramont et al. 2000]. Zudem konnte ein signifikant stärkerer Abfall der Leukozytenzahl bei systemischer Verabreichung gezeigt werden, welcher sich durch einen höheren Oxaliplatin Spiegel im systemischen Kreislauf und somit höherer Toxizität im Vergleich zur HAI erklären lässt. Entsprechend fanden sich in der systemischen Oxaliplatingruppe eine signifikant geringere Leukozyteninfiltration im extravasalen Portalfeld.

Die systemische Infusion von Oxaliplatin zeigte eine weniger ausgeprägte Wirkung. Es ist weitgehend bekannt, dass Oxaliplatin als Monopräparat in vivo eine herabgesetzte antitumoröse Aktivität besitzt. Dies war auch das Ergebnis der vorliegenden Studie und stimmt somit mit anderen klinischen Untersuchungen überein, die nur einen geringen antitumorösen Effekt von Oxaliplatin nachwiesen [Culy et al. 2000; Raymond et al. 1997]. Aus diesem Grund wird Oxaliplatin in klinischen Studien mit anderen antitumorösen Substanzen, wie 5-Fluorouracil, Leukovorin, Bevacizumab und Cetuximab, kombiniert [Omura 2008].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein additiver Effekt einer HAI von Cetuximab bezüglich der antitumorösen Wirkung von Oxaliplatin gezeigt werden. Die HAI der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin führte verglichen mit einer venösen Gabe zu einer signifikanten Reduktion der Tumorgroße sowie zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate. Zudem wurde die Angiogenese durch die HAI der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin am stärksten inhibiert. Balin-Gauthier et al. testeten den Effekt von Cetuximab und Oxaliplatin in vitro und in vivo an vier kolorektalen Karzinom-Zelllinien. In zwei Zelllinien konnten sie einen synergistischen Effekt nachweisen [Balin-Gauthier et al. 2006]. Ein Jahr später zeigten Prewett et al. an einem subkutanen Xenograft-Modell in Mäusen, dass die Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin in Oxaliplatin-resistenten Zelllinien eine Wirkung besitzt [Prewett et al. 2007]. Der Mechanismus des synergistischen Effektes ist noch nicht geklärt. Platin-Derivate können zu einer erhöhten EGFR Phosphorylierung und Aktivierung führen und Cetuximab könnte diesen Effekt abschwächen [Benhar et al. 2002]. Zusätzlich werden auch DNA-Reparatursysteme, wie das Nukleotid Exzisions Reparatursystem (NER), welches eine Schlüsselrolle in der

7. DISKUSSION

Oxaliplatin-Wirkung spielt, diskutiert. Cetuximab reduziert *in vitro* die Expression von ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementation Group 1) und XPF (Xeroderma Pigmentosum Group F), welche wichtige Komponenten des NER sind und an der Exzision von Platin-DNA-Addukten beteiligt sind. Eine Interaktion zwischen dem NER-System und den EGFR-vermittelten Signalwegen führt zur Reduktion der DNA-Reparaturkapazität und könnte somit die Sensivität von einigen Zelllinien gegenüber Oxaliplatin erhöhen [Balin-Gauthier et al. 2006; Prewett et al. 2007]. Der additive Effekt von Cetuximab auf die Wirkung von Oxaliplatin lässt sich also auch auf die hepato-arterielle Applikation übertragen.

Der intravenöse Einsatz von Cetuximab und Oxaliplatin konnte in der vorliegenden Studie das Tumorwachstum nicht hemmen. Diese Tatsache lässt sich erneut durch die KRAS-Mutation der CC531-Zellen erklären. Entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Studie bestätigten klinische Studien den Synergismus bei intravenöser Gabe nur in KRAS-Wildtyp Tumoren. In der OPUS Studie wurden Patienten mit einem 5-FU/Oxaliplatin (FOLFOX4)-Regime mit oder ohne Cetuximab behandelt. Die Cetuximab-Kombination ergab signifikant höhere Ansprechraten bei Patienten mit KRAS-Wildtyp Tumoren [Bokemeyer et al. 2009]. Die Studie zeigte nochmals die fehlende Wirkung von Cetuximab in KRAS-mutierten Tumoren. Umso bemerkenswerter ist die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit die HAI der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin das Tumorwachstum des KRAS-mutierten CC531-Tumors inhibierte.

Bezüglich der Proliferation wies nur die HAI-Sham-Gruppe eine signifikant erniedrigte Proliferation im Vergleich zur systemischen Sham-Gruppe auf. Die HAI von Cetuximab zeigte eine tendenzielle Reduktion der Proliferation im Vergleich zur systemischen Applikation. Die restlichen Gruppen hatten vergleichbare Proliferationsindices, obwohl insbesondere die HAI der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin zu einer Volumenreduktion, einer hohen Apoptoserate und einer stark verminderten Angiogenese führte und somit das Tumorwachstum inhibierte. Zu diskutieren wäre eine mögliche überschießende Proliferation der noch vitalen Tumorzellen, bei einem Großteil von avitalen Zellen im Zellverband.

Insgesamt zeigte sich bei der HAI ein geringerer Abfall des Hämoglobins. Nach der Injektion der Chemotherapeutika in die V. cava inferior bildeten sich zum Teil retroperitoneale Hämatome aus, die mit Blutverlusten einhergehen konnten und auf diese Weise Veränderungen des Blutbildes hervorriefen. Die Präparation der A. gastroduodenalis war dagegen ohne Blutverluste möglich.

Die hepato-arterielle Infusion führte zu einem insgesamt höheren Anstieg von γ GT, GLDH, LDH und den Transaminasen. Dies lässt sich einerseits durch die

anatomische Nähe der A. gastroduodenalis zum Gallengang erklären, der während der Präparation geschont wurde, jedoch manipuliert werden musste. Andererseits versorgt die A. hepatica die Biliargefäße [Burkel 1970], sodass durch eine direkte Applikation eines Chemotherapeutikums die Gallenwege vermehrt geschädigt werden können. In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine signifikante Erhöhung von γ GT bei HAI-Sham behandelten Tieren im Vergleich zur systemischen Sham-Gruppe. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass nicht nur das applizierte Medikament zur Schädigung der Gallengänge beiträgt, sondern auch die Präparation und die bei der Infusion entstehenden Scherkräfte. Insgesamt zeigte die HAI von Cetuximab und Oxaliplatin sowie Oxaliplatin höhere Leberwertanstiege. Die HAI von Cetuximab und Oxaliplatin war zudem mit einem signifikanten Anstieg der GLDH im Vergleich zur systemischen Infusion verbunden. Die GLDH ist ein mitochondriales Enzym und ein Indikator für schwere Zellschäden. Demzufolge kann der HAI von Oxaliplatin und der Kombination von Oxaliplatin und Cetuximab eine Hepatotoxizität zugesprochen werden. Eine Erhöhung der Transaminasen als Zeichen einer beginnenden Leberschädigung ist nicht unüblich nach einer HAI und wurde auch in Studien an Patienten beobachtet [Power et al. 2008]. Eine kontinuierliche Reizung der Gallengänge kann zu einer Gallengangsstenose und infolgedessen zu einer sklerosierenden Cholangitis führen. Dexamethason reduziert die biliäre Toxizität und wird deshalb in klinischen Studien hinzugefügt [Scaife et al. 2003]. Klinische Studien mit HAI von Oxaliplatin wiesen bei Zugabe von Dexamethason keine signifikante Schädigung des Leberparenchyms und des Gallensystems nach [Fiorentini et al. 2004; Kern et al. 2001].

Die HAI von NaCl zeigte eine signifikant stärkere Grobscholligkeit und eine nicht signifikant stärkere Vakuolisierung als die systemische Infusion von NaCl. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beeinflussung dieser zwei Parameter durch die Applikationsart, d.h. die HAI erlangt ihren Effekt unter anderem auch durch die bei der Infusion entstehenden Scherkräfte, die wiederum die Fließgeschwindigkeit in der A. hepatica verändern und so einen Einfluss auf die Lebermorphologie nehmen können. Insgesamt zeigten sich in der Zellschädigung jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Applikationsarten. Bezüglich des Körpergewichtes konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsformen festgestellt werden, sodass von vergleichbarer Sicherheit und Verträglichkeit beider Methoden ausgegangen werden kann.

7.2.2 Hepato-arterielle Infusion und systemische Applikation von Cetuximab und Irinotecan

Die HAI der Kombination von Cetuximab und Irinotecan führte in der vorliegenden Untersuchung zu einer signifikanten Abnahme der Tumorgröße im Vergleich zur systemischen Infusion dieser Kombination. Die Kombination via HAI erreichte zudem ein geringeres Volumen als die HAI von Irinotecan alleine. Dabei zeigte die systemische Infusion von Cetuximab und Irinotecan fast eine Verdopplung des Volumens und somit eine signifikante Größenzunahme im Vergleich zur systemischen Kontrollgruppe. Zusätzlich war die HAI von Irinotecan sowie der Kombination von Irinotecan und Cetuximab mit einer erhöhten Apoptoserate im Vergleich zur systemischen Gabe dieser Medikamente verbunden, die jedoch nicht signifikant war. Die HAI der Kombination erreichte dabei gering höhere Apoptose-Werte.

Hier zeigt sich einerseits eine Verstärkung der antitumorösen Wirkung von Irinotecan durch Cetuximab und andererseits ein Vorzug der HAI gegenüber der systemischen Therapie.

Auch andere Studien konnten einen Vorteil einer Kombinationstherapie von Cetuximab und Irinotecan gegenüber Irinotecan zeigen [Cunningham et al. 2004; Kim et al. 2006; Prewett et al. 2002]. Es wurden einige Hypothesen für die synergistische Wirkung von Cetuximab und Irinotecan aufgestellt. Irinotecan steigert die Phosphorylierung des EGFR, was zu einer erhöhten Proliferation und Angiogenese der Tumorzelle führt [Koizumi et al. 2004]. Koizumi et al. konnten mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Gefinitib diese gesteigerte Phosphorylierung in humanen kolorektalen Zelllinien aufheben. Diese Eigenschaft lässt sich auch auf Cetuximab übertragen. Zudem ist es möglich, dass die Blockade des EGFR zelluläre Veränderungen hervorruft, die das DNA-Reparatursystem beeinträchtigen und dadurch die apoptotischen Effekte von Irinotecan verstärken [Kim et al. 2006]. Genotoxische Schäden verursachen einen S-Zellzyklusarrest oder Apoptose. Beide werden durch das EGFR-Signalnetzwerk reguliert. Deshalb wird die Unterbrechung der EGFR-vermittelten Überlebenssignale als einer der Hauptmechanismen in der synergistischen Wirkung von Cetuximab und zytotoxischen Agenzien, wie Irinotecan, angesehen [Mendelsohn 2000].

Prewett et al. zeigten in einer tierexperimentellen Studie an zwei verschiedenen Modellen des kolorektalen Karzinoms eine signifikante Steigerung der Apoptoserate, Reduktion der Zellproliferation sowie der Angiogenese für die Kombination von Cetuximab und Irinotecan im Vergleich zu Irinotecan [Prewett et al. 2002]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in beiden Behandlungsarten (HAI und SYS) ein tendenzieller additiver Effekt beobachtet werden, vor allem in der Steigerung der

Apoptose und der Hemmung der Angiogenese. Bezüglich der Proliferation stehen die Ergebnisse dieser Studie mit den Ergebnissen von Prewett et al. in Widerspruch. Es wurde keine Beeinflussung der Proliferation durch die verschiedenen Medikamente verzeichnet. Der Grund hierfür könnte sowohl in den unterschiedlichen Applikationsarten (i.v. oder HAI vs. i.p.), als auch in verschiedenen Infusionsmodellen (einmalige gleichzeitige Bolusgabe vs. 16 Zyklen Cetuximab und 7 Zyklen Irinotecan) sowie den unterschiedlichen Dosierungen der Medikamente liegen. Alle diese Punkte verändern die Pharmakodynamik und -kinetik und somit auch die antitumoröse Wirkung der applizierten Medikamente.

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Studie eine stärkere Reduktion der Tumorgöße nach der HAI von Cetuximab und Irinotecan im Vergleich zur systemischen Applikation gezeigt werden. Die signifikante Reduktion der Tumorgöße resultierte aus der erhöhten Apoptoserate, jedoch ohne Signifikanz zur systemischen Gabe, und einer verringerten Angiogenese. Vergleichbare Studien zur HAI von Cetuximab und Irinotecan lassen sich in der aktuellen Literatur nicht finden. Van Riel et al. verglichen jedoch 2004 die HAI von Irinotecan mit einer systemischen Infusion desselben Medikamentes. Sie konnten keinen Vorteil einer HAI von Irinotecan gegenüber der systemischen Infusion zeigen [Riel et al. 2004]. De Jong et al. kamen im gleichen Jahr zu ähnlichen Ergebnissen [De Jong et al. 2004]. Zwei Jahre zuvor wiesen van Riel et al. eine erhöhte Metabolisierung von Irinotecan mit erhöhten systemischen Konzentrationen des Metaboliten SN-38 während einer HAI gegenüber der systemischen Infusion nach, sie war jedoch nicht mit einer erhöhten systemischen Toxizität verbunden [Riel et al. 2002]. Eine Erklärung dafür könnte der hohe Gehalt an Carboxylesterase (CE) in der Leber sein, die Irinotecan zu SN-38 metabolisiert. Die gleichartige Wirkung von Irinotecan via HAI gegenüber der systemischen Infusion wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls beobachtet. Die systemischen Nebenwirkungen (als Parameter galt das Körpergewicht), die Tumorgöße und die Hemmung der Angiogenese waren miteinander vergleichbar. Diskutiert werden aufgrund erhöhter Metabolisierung von Irinotecan zu SN-38 eine erhöhte systemische Verteilung und ein fehlender Einschluss des Medikamentes in die Lebermetastasen [Riel et al. 2004]. In der vorliegenden Untersuchung resultierte aus der Zugabe von Cetuximab zur HAI von Irinotecan eine signifikante Reduktion der Tumorgöße im Vergleich zur systemischen Infusion dieser Kombination. Dies bedeutet, dass die Kombination via HAI, im Gegensatz zur alleinigen Gabe von Irinotecan via HAI, einen Vorteil gegenüber der systemischen Applikation zeigte. Möglicherweise beeinflusst Cetuximab die Metabolisierung von Irinotecan, z.B. durch Blockade der CE, wenn beides hepato-arteriell verabreicht wird, sodass sich Irinotecan im Tumor anreichern kann.

7. DISKUSSION

Die Verdopplung des Tumolvolumens nach der systemischen Infusion von Cetuximab und Irinotecan kann erneut durch das Vorhandensein der KRAS-Mutation der CC531-Zellen und die fehlende Wirkung von Cetuximab i.v. bei KRAS-Mutationen diskutiert werden. Trotz KRAS-Mutation zeigte sich bei der Applikation der Kombination von Irinotecan und Cetuximab, wie schon bei der Kombination von Oxaliplatin und Cetuximab, ein antitumoröser Effekt.

Die HAI von Irinotecan führte in der Studie zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl zwischen dem 10. und 13. Tag im Vergleich zur HAI-Sham-Gruppe. Der Anstieg war jedoch mit dem der systemischen Infusion von Irinotecan vergleichbar. Dieser Aspekt spricht erneut für eine höhere systemische Irinotecan und SN-38 Konzentration während einer HAI, woraus ein der systemischen Infusion ähnlich starker Anstieg der Leukozyten resultiert. Die Gabe von Irinotecan führte sowohl in der HAI als auch in der systemischen Gruppe zum höchsten Leukozytenanstieg verglichen mit der Kombination von Irinotecan und Cetuximab sowie Cetuximab alleine. Diese Resultate stehen auf den ersten Blick in Widerspruch zu anderen Ergebnissen. Denn zur häufigsten und dosislimitierenden Nebenwirkung von Irinotecan gehört die durch eine Myelosuppression verursachte Neutropenie [Innocenti et al. 2009]. Da in der vorliegenden Studie aber weder eine Anämie noch eine Thrombozytopenie festgestellt wurde, kann nicht von einer Myelosuppression durch eine einmalige Bolusgabe von Irinotecan ausgegangen werden. Irinotecan ruft also in nicht myelotoxischen Dosen eine erhöhte Immunantwort im Sinne einer Leukozytose hervor.

Die Zellschädigung betreffend zeigte die HAI der Kombination von Irinotecan und Cetuximab eine signifikant geringere Grobscholligkeit und Vakuolisierung im Vergleich zur systemischen Infusion. Die systemische Infusion der Kombination wies zudem eine signifikant stärkere Grobscholligkeit und Vakuolisierung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Diese Ergebnisse sprechen für eine geringe hepatozelluläre Toxizität einer HAI von Cetuximab und Irinotecan gegenüber der systemischen Infusion. Dies kann durch die Schonung des peritumoralen Lebergewebes aufgrund der arteriellen Versorgung hepatischer Metastasen während einer HAI erklärt werden.

Die Leberenzyme zeigten einen tendenziellen Anstieg nach einer HAI. Die HAI von Irinotecan bewirkte eine signifikante Erhöhung der ALT im Vergleich zur systemischen Gabe von Irinotecan. Die Gründe für einen Anstieg der Leberwerte nach einer HAI wurden bereits im vorherigen Kapitel erörtert, weshalb auf eine wiederholte Darstellung verzichtet wird.

Die schwache Wirkung von Irinotecan in dieser Studie lässt sich durch die Applikationsart erklären. Irinotecan ist hauptsächlich ein S-Phasen spezifisches Medi-

kament und seine Wirkung hängt eher von der Expositionszeit und weniger von der maximal erreichten Konzentration ab. In der vorliegenden Studie wurden die Tiere mit einer einmaligen Bolusgabe von 90mg/m² Irinotecan behandelt. Präklinische Studien konnten eine erhöhte Aktivität von Irinotecan während einer prolongierten Infusion nachweisen und bestätigen somit die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit [Houghton et al. 1995; Kawato et al. 1991; Vassal et al. 1996]. Definitive Empfehlungen zur Verabreichung von Irinotecan können jedoch nicht gegeben werden, da Studien, die die Bolusgabe i.v. mit einer kontinuierlichen i.v. Infusion vergleichen, fehlen [Riel et al. 2004].

Das Übertragen der Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studie auf den Menschen sollte vorsichtig erfolgen. In Mäusen wurde eine höhere Cholinesterase-Aktivität gefunden, die zu einer erhöhten Metabolisierung von Irinotecan zu SN-38 führt und somit in einer erhöhten Bioverfügbarkeit von SN-38 resultiert [Jonsson et al. 2000]. Ähnliches könnte auch für WAG/Rij Ratten gelten. Geht man davon aus, dass in soliden Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom, Irinotecan die wirksamere Substanz ist [Jonsson et al. 2000], könnte Irinotecan sowie die Kombination von Irinotecan und Cetuximab in klinischen Studien an Patienten bessere Ergebnisse erzielen.

7.3 Schlussfolgerung

Die antitumoröse Wirkung von Cetuximab, Irinotecan und Oxaliplatin wurde bereits in vielen Studien bestätigt und alle drei Agenzien werden intravenös in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms eingesetzt. Die vorliegende Studie wurde als eine „Proof of Principle“ Studie konzipiert, bei der nach einer einmaligen kurzen Infusion der drei Medikamente untersucht wurde, ob die hepato-arterielle Infusion der systemischen Infusion dieser Medikamente überlegen ist und das Tumorstadium des CC531 Tumors stärker hemmen kann. Wie bei allen tierexperimentellen Studien ist die Übertragbarkeit auf den Menschen jedoch begrenzt.

Zusammenfassend haben sowohl die arterielle als auch die venöse Gabe von Cetuximab, Oxaliplatin und Irinotecan eine antitumoröse Wirkung gezeigt. Der Vergleich beider Applikationsformen zeigte jedoch einen klaren Vorteil der HAI von Cetuximab und der Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin. Die Wirkung dieser Kombination via HAI beruht vor allem auf der Steigerung der Apoptoserate sowie der Inhibition der Angiogenese. Daraus resultiert eine Reduktion der Tumorstadiumgröße. Die HAI von Irinotecan zeigte keinen, die HAI der Kombination von Cetuximab und Irinotecan einen geringen Vorzug. Wie erwartet kam es bei der hepato-arteriellen In-

7. DISKUSSION

fusion aufgrund der arteriellen Versorgung des peribiliären Plexus zur Erhöhung der Leberwerte, die in der Praxis beim Menschen jedoch beherrschbar ist. Sowohl die hepato-arterielle Infusion als auch die systemische Infusion mit Cetuximab, Oxaliplatin und Irinotecan sind sicher und mit nur geringen Nebenwirkungen auszuführen, wobei die systemische Infusion die einfachere Methode darstellt.

Die Zukunft der hepato-arteriellen Infusion liegt am ehesten in der Kombination mit einer systemischen Therapie. Da in der vorliegenden Untersuchung Cetuximab sowie die Kombination von Cetuximab und Oxaliplatin via HAI eindeutig das Tumorwachstum inhibieren konnten, sollten diese zwei Ansätze in der Therapie hepatischer Metastasen des kolorektalen Karzinoms erprobt werden. Eine Kombination von systemischer und arterieller Therapie würde sowohl hohe intratumorale Konzentrationen in hepatischen Metastasen ermöglichen, als auch extrahepatische Metastasen erfassen.

Abkürzungsverzeichnis

1,2-DACH	Diaminocyclohexan
5-FU	Fluorouracil
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
ml	Milliliter
A.	Arteria
Ca ²⁺	Calcium
CAE	AS-D Chloracetatesterase
CE	Carboxylesterase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CYP3A4	Cytochrome P450
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor)
ErbB	Erythroblastosis Homologue B
ERCC1	Excision Repair Cross-Complementation Group 1
FAP	Familiäre adematöse Polyposis

FCS	Foetal Calf Serum
FOLFIRI	Folinsäure/Fluouracil/Irinotecan
FOLFOX	Folinsäure/Fluouracil/Oxaliplatin
FUDR	Floxuridin
HAI	Hepato-arterielle Infusion
HAMA	Human Anti-Mouse Antibodies
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses kolorektales Karzinom
HPF	High Power Field
HWZ	Halbwertszeit
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFL	Irinotecan/Bolus 5-FU/LV
Ig	Immunglobulin
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene
LV	Leucovorin
MapK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MeK	MAP-Kinase-ERK-Kinase
MMR	DNA-Mismatch-Reparatur
mTor	Mammalian Target of Rapamycin
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid

NER	Nukleotid Exzisions Reparatursystem
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PI3-K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PLC _γ	Phospholipase C _γ
RAF	Rat Abundant Factor
Ras	Rat Sarcoma
SCCHN	Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean
SN-38	7-Ethyl-10-Hydroxy-Camptothecin
STAT	Signal Transducers and Activators of Transkription
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (Transforming Growth Factor)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V.	Vena
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor)
XPF	Xeroderma Pigmentosum Group F
XRCC	X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1

Literaturverzeichnis

- [1] Alberts S. R., Wagman L. D. (2008) Chemotherapy for colorectal cancer liver metastases. *Oncologist* 13:1063–1073.
- [2] Arnold D., Hohler T., Dittrich C., Lordick F., Seufferlein T., Riemann J., Woll E., Herrmann T., Zubel A., Schmoll H. J. (2008) Cetuximab in combination with weekly 5-fluorouracil/folinic acid and oxaliplatin (FUFOX) in untreated patients with advanced colorectal cancer: a phase Ib/II study of the AIO GI Group. *Ann. Oncol.* 19:1442–1449.
- [3] Balin-Gauthier D., Delord J. P., Rochaix P., Mallard V., Thomas F., Hennebelle I., Bugat R., Canal P., Allal C. (2006) In vivo and in vitro antitumor activity of oxaliplatin in combination with cetuximab in human colorectal tumor cell lines expressing different level of EGFR. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 57:709–718.
- [4] Bechstein W. O., Golling M. (2005) Standard surgical resection of colorectal liver metastases. *Chirurg* 76:543–551.
- [5] Becouarn Y., Rougier P. (1998) Clinical efficacy of oxaliplatin monotherapy: phase II trials in advanced colorectal cancer. *Semin. Oncol.* 25:23–31.
- [6] Benhar M., Engelberg D., Levitzki A. (2002) Cisplatin-induced activation of the EGF receptor. *Oncogene* 21:8723–8731.
- [7] Berg D. (2003) Oxaliplatin: a novel platinum analog with activity in colorectal cancer. *Oncol. Nurs. Forum* 30:957–966.
- [8] Bismuth H., Adam R., Lévi F., Farabos C., Waechter F., Castaing D., Majno P., Engerran L. (1996) Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Surg.* 224:509–520.
- [9] Boige V., Malka D., Elias D., Castaing M., De Baere T., Goere D., Dromain C., Pocard M., Ducreux M. (2008) Hepatic arterial infusion of oxaliplatin and intravenous LV5FU2 in unresectable liver metastases from colorectal cancer after systemic chemotherapy failure. *Ann. Surg. Oncol.* 15:219–226.

LITERATURVERZEICHNIS

- [10] Bokemeyer C., Bondarenko I., Makhson A., Hartmann J. T., Aparicio J., Braud F. de, Donea S., Ludwig H., Schuch G., Stroh C., Loos A. H., Zube A., Koralewski P. (2009) Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 27:663–671.
- [11] Botteri E., Iodice S., Bagnardi V., Raimondi S., Lowenfels A. B., Maisonneuve P. (2008) Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. *JAMA* 300:2765–2778.
- [12] Breedis C., Young G. (1954) The blood supply of neoplasms in the liver. *Am. J. Pathol.* 30:969–977.
- [13] Burchenal J. H., Kalaher K., O’Toole T., Chisholm J. (1977) Lack of cross-resistance between certain platinum coordination compounds in mouse leukemia. *Cancer Res.* 37:3455–3457.
- [14] Burkel W. E. (1970) The fine structure of the terminal branches of the hepatic arterial system of the rat. *Anat. Rec.* 167:329–349.
- [15] Calabrese F., Valente M., Pettenazzo E., Ferrareso M., Burra P., Cadrobbi R., Cardin R., Bacelle L., Parnigotto A., Rigotti P. (1997) The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J. Pathol.* 183:477–485.
- [16] Camp E. R., Summy J., Bauer T. W., Liu W., Gallick G. E., Ellis L. M. (2005) Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin. Cancer Res.* 11:397–405.
- [17] Cancer M.-A. G. I. (1996) Reappraisal of hepatic arterial infusion in the treatment of nonresectable liver metastases from colorectal cancer. Meta-Analysis Group in Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:252–258.
- [18] Caussanel J. P., Levi F., Brienza S., Misset J. L., Itzhaki M., Adam R., Milano G., Hecquet B., Mathe G. (1990) Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxaliplatin at circadian rhythm-modulated rate compared with constant rate. *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1046–1050.
- [19] Chan T. O., Rittenhouse S. E., Tsichlis P. N. (1999) AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68:965–1014.
- [20] Cohen A. D., Kemeny N. E. (2003) An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. *Oncologist* 8:553–566.

- [21] Connors T. A., Jones M., Ross W. C., Braddock P. D., Khokhar A. R., Tobe M. L. (1972) New platinum complexes with anti-tumour activity. *Chem. Biol. Interact.* 5:415–424.
- [22] Culy C. R., Clemett D., Wiseman L. R. (2000) Oxaliplatin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in metastatic colorectal cancer and its potential in other malignancies. *Drugs* 60:895–924.
- [23] Cunningham D., Humblet Y., Siena S., Khayat D., Bleiberg H., Santoro A., Bets D., Mueser M., Harstrick A., Verslype C., Chau I., Van Cutsem E. (2004) Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351:337–345.
- [24] De Jong F. A., Mathijssen R. H., Verweij J. (2004) Limited potential of hepatic arterial infusion of irinotecan. *J. Chemother.* 16 Suppl. 5:48–50.
- [25] Di Francesco A. M., Ruggiero A., Riccardi R. (2002) Cellular and molecular aspects of drugs of the future: oxaliplatin. *Cell. Mol. Life Sci.* 59:1914–1927.
- [26] Diaz-Rubio E., Sastre J., Zaniboni A., Labianca R., Cortes-Funes H., Braud F. de, Boni C., Benavides M., Dallavalle G., Homerin M. (1998) Oxaliplatin as single agent in previously untreated colorectal carcinoma patients: a phase II multicentric study. *Ann. Oncol.* 9:105–108.
- [27] Doci R., Bignami P., Quagliuolo V. (1990) Continuous hepatic arterial infusion with 5-fluorodeoxyuridine for treatment of colorectal metastases. *Reg. Cancer Treat.* 3:13–18.
- [28] Douillard J. Y., Cunningham D., Roth A. D., Navarro M., James R. D., Karasek P., Jandik P., Iveson T., Carmichael J., Alakl M., Gruia G., Awad L., Rougier P. (2000) Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355:1041–1047.
- [29] Ducreux M., Ychou M., Laplanche A., Gamelin E., Lasser P., Hussein F., Quenet F., Viret F., Jacob J. H., Boige V., Elias D., Delperro J. R., Lubinski M. (2005) Hepatic arterial oxaliplatin infusion plus intravenous chemotherapy in colorectal cancer with inoperable hepatic metastases: a trial of the gastrointestinal group of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J. Clin. Oncol.* 23:4881–4887.

LITERATURVERZEICHNIS

- [30] Duijnhoven F. H. van, Tollenaar R. A., Terpstra O. T., Kuppen P. J. (2005) Locoregional therapies of liver metastases in a rat CC531 coloncarcinoma model results in increased resistance to tumour rechallenge. *Clin. Exp. Metastasis* 22:247–253.
- [31] Dzodic R., Gomez-Abuin G., Rougier P., Bonnay M., Ardouin P., Gouyette A., Rixe O., Ducreux M., Munck J. N. (2004) Pharmacokinetic advantage of intra-arterial hepatic oxaliplatin administration: comparative results with cisplatin using a rabbit VX2 tumor model. *Anticancer Drugs* 15:647–650.
- [32] Ensminger W. D. (2002) Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy: pharmacologic principles. *Semin. Oncol.* 29:119–125.
- [33] Ensminger W. D., Rosowsky A., Raso V., Levin D. C., Glode M., Come S., Steele G., Frei E. (1978) A clinical-pharmacological evaluation of hepatic arterial infusions of 5-fluoro-2'-deoxyuridine and 5-fluorouracil. *Cancer Res.* 38:3784–3792.
- [34] Etten B. van, Hagen T. L. ten, Vries M. R. de, Ambagtsheer G., Huet T., Eggermont A. M. (2002) Prerequisites for effective adenovirus mediated gene therapy of colorectal liver metastases in the rat using an intracellular neutralizing antibody fragment to p21-Ras. *Br. J. Cancer* 86:436–442.
- [35] Extra J. M., Espie M., Calvo F., Ferme C., Mignot L., Marty M. (1990) Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 25:299–303.
- [36] Finkelstein S. D., Sayegh R., Christensen S., Swalsky P. A. (1993) Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-ras-2 mutation type. *Cancer* 71:3827–3838.
- [37] Fiorentini G., Rossi S., Dentico P., Meucci F., Bonechi F., Bernardeschi P., Cantore M., Guadagni S., De Simone M. (2004) Oxaliplatin hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer: a phase I-II clinical study. *Anticancer Res.* 24:2093–2096.
- [38] Foster F. S., Zhang M. Y., Zhou Y. Q., Liu G., Mehi J., Cherin E., Harasiewicz K. A., Starkoski B. G., Zan L., Knapik D. A., Adamson S. L. (2002) A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound Med. Biol.* 28:1165–1172.

- [39] Gallagher D. J., Capanu M., Raggio G., Kemeny N. (2007) Hepatic arterial infusion plus systemic irinotecan in patients with unresectable hepatic metastases from colorectal cancer previously treated with systemic oxaliplatin: a retrospective analysis. *Ann. Oncol.* 18:1995–1999.
- [40] Garcia-Saenz J. A., Sastre J., Diaz-Rubio Garcia E. (2009) Biomarkers and anti-EGFR therapies for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 11:737–747.
- [41] Gerber D. E., Choy H. (2010) Cetuximab in combination therapy: from bench to clinic. *Cancer Metastasis Rev.* 29:171–180.
- [42] Giacchetti S., Perpoint B., Zidani R., Le Bail N., Faggiuolo R., Focan C., Chollet P., Llory J. F., Letourneau Y., Coudert B., Bertheaut-Cvitkovic F., Larregain-Fournier D., Le Rol A., Walter S., Adam R., Misset J. L., Levi F. (2000) Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 18:136–147.
- [43] Giovanella B. C., Stehlin J. S., Wall M. E., Wani M. C., Nicholas A. W., Liu L. F., Silber R., Potmesil M. (1989) DNA topoisomerase I-targeted chemotherapy of human colon cancer in xenografts. *Science* 246:1046–1048.
- [44] Goldberg R. M., Sargent D. J., Morton R. F., Fuchs C. S., Ramanathan R. K., Williamson S. K., Findlay B. P., Pitot H. C., Alberts S. R. (2004) A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 22:23–30.
- [45] Goldstein N. S., Armin M. (2001) Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer* 92:1331–1346.
- [46] Gonda T., Ishida H., Yoshinaga K., Sugihara K. (2000) Microvasculature of small liver metastases in rats. *J. Surg. Res.* 94:43–48.
- [47] Gourdiere I., Crabbe L., Andreau K., Pau B., Kroemer G. (2004) Oxaliplatin-induced mitochondrial apoptotic response of colon carcinoma cells does not require nuclear DNA. *Oncogene* 23:7449–7457.

LITERATURVERZEICHNIS

- [48] Graham K. C., Wirtzfeld L. A., MacKenzie L. T., Postenka C. O., Groom A. C., MacDonald I. C., Fenster A., Lacefield J. C., Chambers A. F. (2005) Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models. *Cancer Res.* 65:5231–5237.
- [49] Gramont A. de, Figuer A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., Boni C., Cortes-Funes H., Cervantes A., Freyer G., Papamichael D., Le Bail N., Louvet C., Hendlér D., Braud F. de, Wilson C., Morvan F., Bonetti A. (2000) Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 18:2938–2947.
- [50] Graus-Porta D., Beerli R. R., Daly J. M., Hynes N. E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 16:1647–1655.
- [51] Grundmann R. T. (2011) Current state of surgical treatment of liver metastases from colorectal cancer. *World J. Gastrointest. Surg.* 3:183–196.
- [52] Gupta E., Lestingi T. M., Mick R., Ramirez J., Vokes E. E., Ratain M. J. (1994) Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res.* 54:3723–3725.
- [53] Guthoff I., Lotspeich E., Fester C., Wallin I., Schatz M., Ehrsson H., Kornmann M. (2003) Hepatic artery infusion using oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil, folinic acid and mitomycin C: oxaliplatin pharmacokinetics and feasibility. *Anticancer Res.* 23:5203–5208.
- [54] Hagens M., Ensink N. G., Basse P. H., Hokland M., Nannmark U., Eggermont A. M., Velde C. J. van de, Fleuren G. J., Kuppen P. J. (2000) The microscopic anatomy of experimental rat CC531 colon tumour metastases: consequences for immunotherapy? *Clin. Exp. Metastasis* 18:189–196.
- [55] Harmantas A., Rotstein L. E., Langer B. (1996) Regional versus systemic chemotherapy in the treatment of colorectal carcinoma metastatic to the liver. Is there a survival difference? Meta-analysis of the published literature. *Cancer* 78:1639–1645.
- [56] Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. (2003) Apoptosis - the p53 network. *J. Cell. Sci.* 116:4077–4085.
- [57] Havenith M. G., Arends J. W., Simon R., Volovics A., Wiggers T., Bosman F. T. (1988) Type IV collagen immunoreactivity in colorectal cancer. Prognostic value of basement membrane deposition. *Cancer* 62:2207–2211.

- [58] Herbst R. S. (2004) Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 59:21–26.
- [59] Hofmann C., Buttenschoen K., Straeter J., Henne-Bruns D., Kornmann M. (2005) Pre-clinical evaluation of the activity of irinotecan as a basis for regional chemotherapy. *Anticancer Res.* 25:795–804.
- [60] Houghton P. J., Cheshire P. J., Hallman J. D., Lutz L., Friedman H. S., Danks M. K., Houghton J. A. (1995) Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 36:393–403.
- [61] Hsiang Y. H., Hertzberg R., Hecht S., Liu L. F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* 260:14873–14878.
- [62] Innocenti F., Kroetz D. L., Schuetz E., Dolan M. E., Ramirez J., Relling M., Chen P., Das S., Rosner G. L., Ratain M. J. (2009) Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol.* 27:2604–2614.
- [63] Jerremalm E., Wallin I., Ehrsson H. (2009) New insights into the biotransformation and pharmacokinetics of oxaliplatin. *J. Pharm. Sci.* 98:3879–3885.
- [64] Jonsson E., Dhar S., Jonsson B., Nygren P., Graf W., Larsson R. (2000) Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines. *Eur. J. Cancer* 36:2120–2127.
- [65] Karapetis C. S., Khambata-Ford S., Jonker D. J., O’Callaghan C. J., Tu D., Tebbutt N. C., Simes R. J., Chalchal H., Shapiro J. D., Robitaille S., Price T. J., Shepherd L., Au H. J., Langer C., Moore M. J., Zalcborg J. R. (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 359:1757–1765.
- [66] Kari C., Chan T. O., Quadros M. Rocha de, Rodeck U. (2003) Targeting the epidermal growth factor receptor in cancer: apoptosis takes center stage. *Cancer Res.* 63:1–5.
- [67] Kawato Y., Aonuma M., Hirota Y., Kuga H., Sato K. (1991) Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* 51:4187–4191.
- [68] Kemeny N. (2006) Management of liver metastases from colorectal cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)* 20:1161–1176.

LITERATURVERZEICHNIS

- [69] Kern W., Beckert B., Lang N., Stemmler J., Beykirch M., Stein J., Goecke E., Wagershauser T., Braess J., Schalhorn A., Hiddemann W. (2001) Phase I and pharmacokinetic study of hepatic arterial infusion with oxaliplatin in combination with folinic acid and 5-fluorouracil in patients with hepatic metastases from colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 12:599–603.
- [70] Khanna C., Hunter K. (2005) Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 26:513–523.
- [71] Köhler G., Milstein C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497.
- [72] Kidani Y., Noji M., Tashiro T. (1980) Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers. *Gann.* 71:637–643.
- [73] Kim S., Prichard C. N., Younes M. N., Yazici Y. D., Jasser S. A., Bekele B. N., Myers J. N. (2006) Cetuximab and irinotecan interact synergistically to inhibit the growth of orthotopic anaplastic thyroid carcinoma xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 12:600–607.
- [74] Kohne C. H., Cutsem E. van, Wils J., Bokemeyer C., El-Serafi M., Lutz M. P., Lorenz M., Reichardt P., Ruckle-Lanz H., Frickhofen N., Fuchs R., Mergenthaler H. G., Langenbuch T., Vanhoefer U., Rougier P., Voigtmann R., Muller L., Genicot B., Anak O., Nordlinger B. (2005) Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J. Clin. Oncol.* 23:4856–4865.
- [75] Koizumi F., Kanzawa F., Ueda Y., Koh Y., Tsukiyama S., Taguchi F., Tamura T., Saijo N., Nishio K. (2004) Synergistic interaction between the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib („Iressa“) and the DNA topoisomerase I inhibitor CPT-11 (irinotecan) in human colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* 108:464–472.
- [76] Kollmar O., Schilling M. K., Menger M. D. (2004) Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin. Exp. Metastasis* 21:453–460.
- [77] Konopke R., Saeger H. D. (2003) [Liver metastases. Diagnosis and therapy]. *Chirurg* 74:866–884.
- [78] Koopman M., Punt C. J. (2009) Chemotherapy, which drugs and when. *Eur. J. Cancer* 45 Suppl 1:50–56.

- [79] Kulaylat M. N., Gibbs J. F. (2010) Regional treatment of colorectal liver metastasis. *J. Surg. Oncol.* 101:693–698.
- [80] Kunimoto T., Nitta K., Tanaka T., Uehara N., Baba H., Takeuchi M., Yokokura T., Sawada S., Miyasaka T., Mutai M. (1987) Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res.* 47:5944–5947.
- [81] Kuo T. H., Kubota T., Watanabe M., Furukawa T., Teramoto T., Ishibiki K., Kitajima M., Moossa A. R., Penman S., Hoffman R. M. (1995) Liver colonization competence governs colon cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:12085–12089.
- [82] Lee J. J., Chu E. (2007) First-line use of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 6 Suppl. 2:42–46.
- [83] Levi F., Perpoint B., Garufi C., Focan C., Chollet P., Depres-Brummer P., Zidani R., Brienza S., Itzhaki M., Iacobelli S. (1993) Oxaliplatin activity against metastatic colorectal cancer. A phase II study of 5-day continuous venous infusion at circadian rhythm modulated rate. *Eur. J. Cancer* 29A:1280–1284.
- [84] Lievre A., Bachet J. B., Boige V., Cayre A., Le Corre D., Buc E., Ychou M., Bouche O., Landi B., Louvet C., Andre T., Bibeau F., Diebold M. D., Rougier P., Ducreux M., Tomasic G., Emile J. F., Penault-Llorca F., Laurent-Puig P. (2008) KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 26:374–379.
- [85] Link K. H., Preiß J. (2006) Prinzipien der lokoregionären Chemotherapie. *Kompendium Internistische Onkologie.* Springer Berlin Heidelberg.
- [86] Liu L. F., Desai S. D., Li T. K., Mao Y., Sun M., Sim S. P. (2000) Mechanism of action of camptothecin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 922:1–10.
- [87] Ljubimov A. V., Bartek J., Couchman J. R., Kapuller L. L., Veselov V. V., Kovarik J., Perevoshchikov A. G., Krutovskikh V. A. (1992) Distribution of individual components of basement membrane in human colon polyps and adenocarcinomas as revealed by monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 50:562–566.

LITERATURVERZEICHNIS

- [88] Machover D., Diaz-Rubio E., Gramont A. de, Schilf A., Gastiaburu J. J., Brienza S., Itzhaki M., Metzger G., N'Daw D., Vignoud J., Abad A., Francois E., Gamelin E., Marty M., Sastre J., Seitz J. F., Ychou M. (1996) Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines. *Ann. Oncol.* 7:95–98.
- [89] Mandalà M., Mosconi S., Quadri A., Milesi L., Labianca R. (2007) Neoadjuvant chemotherapy for patients with liver metastases from colorectal cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* 7:887–897.
- [90] Marmor M. D., Skaria K. B., Yarden Y. (2004) Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58:903–913.
- [91] Mathe G., Kidani Y., Noji M., Maral R., Bourut C., Chenu E. (1985) Antitumor activity of l-OHP in mice. *Cancer Lett.* 27:135–143.
- [92] Mathijssen R. H., Alphen R. J. van, Verweij J., Loos W. J., Nooter K., Stoter G., Sparreboom A. (2001) Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin. Cancer Res.* 7:2182–2194.
- [93] Mendelsohn J. (2000) Blockade of receptors for growth factors: an anticancer therapy—the fourth annual Joseph H Burchenal American Association of Cancer Research Clinical Research Award Lecture. *Clin. Cancer Res.* 6:747–753.
- [94] Mendelsohn J., Baselga J. (2003) Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* 21:2787–2799.
- [95] Midgley R., Kerr D. (1999) Colorectal cancer. *Lancet* 353:391–399.
- [96] Mocellin S., Pasquali S., Nitti D. (2009) Fluoropyrimidine-HAI (hepatic arterial infusion) versus systemic chemotherapy (SCT) for unresectable liver metastases from colorectal cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD007823.
- [97] Moertel C. G., Schutt A. J., Reitemeier R. J., Hahn R. G. (1972) Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother. Rep.* 56:95–101.
- [98] Morris E. J., Geller H. M. (1996) Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase-I: evidence for cell cycle-independent toxicity. *J. Cell Biol.* 134:757–770.

- [99] Muggia F. M., Creaven P. J., Hansen H. H., Cohen M. H., Selawry O. S. (1972) Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother. Rep.* 56:515–521.
- [100] Ng M., Cunningham D. (2004) Cetuximab (Erbix)–an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Int. J. Clin. Pract.* 58:970–976.
- [101] Nicholson R. I., Gee J. M., Harper M. E. (2001) EGFR and cancer prognosis. *Eur. J. Cancer* 37 Suppl. 4:9–15.
- [102] Okuno K., Hirai N., Lee Y. S., Tarabar D., Ueno H., Yasutomi M. (1998) Superiority of hepatic arterial infusion in preventing catabolism of 5-FU compared with portal vein infusion revealed by an in vivo ¹⁹F NMR study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42:341–344.
- [103] Oliveira C., Westra J. L., Arango D., Ollikainen M., Domingo E., Ferreira A., Velho S., Niessen R., Lagerstedt K., Alhopuro P., Laiho P., Veiga I., Teixeira M. R., Ligtenberg M., Kleibeuker J. H., Sijmons R. H., Plukker J. T., Imai K., Lage P., Hamelin R., Albuquerque C., Schwartz S., Lindblom A., Peltomaki P., Yamamoto H., Aaltonen L. A., Seruca R., Hofstra R. M. (2004) Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum. Mol. Genet.* 13:2303–2311.
- [104] Omura K. (2008) Advances in chemotherapy against advanced or metastatic colorectal cancer. *Digestion* 77 Suppl. 1:13–22.
- [105] Pasetto L. M., Merenda R., Pilati P., Sinigaglia G., Monfardini S. (2006) Hepatic metastases of colorectal cancer: locoregional intra-arterial treatment. *Anticancer Res.* 26:4785–4792.
- [106] Peng X. H., Karna P., Cao Z., Jiang B. H., Zhou M., Yang L. (2006) Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J. Biol. Chem.* 281:25903–25914.
- [107] Poggi G., Montagna B., Melchiorre F., Quaretti P., Delmonte A., Riccardi A., Tagliaferri B., Sottotetti F., Di Cesare P., Stella M. G., Villani L., Zorzetto M., Greco G., Cornalba G., Bernardo G. (2011) Hepatic intra-arterial cetuximab in combination with 5-fluorouracil and cisplatin as salvage treatment for sorafenib-refractory hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 31:3927–3933.

LITERATURVERZEICHNIS

- [108] Power D. G., Healey-Bird B. R., Kemeny N. E. (2008) Regional chemotherapy for liver-limited metastatic colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 7:247–259.
- [109] Power D. G., Kemeny N. E. (2011) Chemotherapy for the conversion of unresectable colorectal cancer liver metastases to resection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 79:251–264.
- [110] Prewett M. C., Hooper A. T., Bassi R., Ellis L. M., Waksal H. W., Hicklin D. J. (2002) Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin. Cancer Res.* 8:994–1003.
- [111] Prewett M., Deevi D. S., Bassi R., Fan F., Ellis L. M., Hicklin D. J., Tonra J. R. (2007) Tumors established with cell lines selected for oxaliplatin resistance respond to oxaliplatin if combined with cetuximab. *Clin. Cancer Res.* 13:7432–7440.
- [112] Ramos F. J., Macarulla T., Capdevila J., Elez E., Tabernero J. (2008) Understanding the predictive role of K-ras for epidermal growth factor receptor-targeted therapies in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 7 Suppl. 2:52–57.
- [113] Raymond E., Buquet-Fagot C., Djelloul S., Mester J., Cvitkovic E., Allain P., Louvet C., Gespach C. (1997) Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidylate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancers. *Anticancer Drugs* 8:876–885.
- [114] Raymond E., Chaney S. G., Taamma A., Cvitkovic E. (1998) Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann. Oncol.* 9:1053–1071.
- [115] Raymond E., Faivre S., Chaney S., Woynarowski J., Cvitkovic E. (2002) Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin. *Mol. Cancer Ther.* 1:227–235.
- [116] Riel J. M. van, Groenigen C. J. van, Greve J. de, Gruia G., Pinedo H. M., Giaccone G. (2004) Continuous infusion of hepatic arterial irinotecan in pretreated patients with colorectal cancer metastatic to the liver. *Ann. Oncol.* 15:59–63.
- [117] Riel J. M. van, Groenigen C. J. van, Kedde M. A., Gall H., Leisink J. M., Gruia G., Pinedo H. M., Vijgh W. J. van der, Giaccone G. (2002) Continuous administration of irinotecan by hepatic arterial infusion: a phase I and pharmacokinetic study. *Clin. Cancer Res.* 8:405–412.

- [118] Rixe O., Ortuzar W., Alvarez M., Parker R., Reed E., Paull K., Fojo T. (1996) Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem. Pharmacol.* 52:1855–1865.
- [119] Robert Koch-Institut (2010) Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beitrag zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin.
- [120] Rodemann H. P., Dittmann K., Toulany M. (2007) Radiation-induced EGFR-signaling and control of DNA-damage repair. *Int. J. Radiat. Biol.* 83:781–791.
- [121] Ross J. S., Gray K., Gray G. S., Worland P. J., Rolfe M. (2003) Anticancer antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 119:472–485.
- [122] Rothenberg M. L., Eckardt J. R., Kuhn J. G., Burris H. A., Nelson J., Hilsenbeck S. G., Rodriguez G. I., Thurman A. M., Smith L. S., Eckhardt S. G., Weiss G. R., Elfring G. L., Rinaldi D. A., Schaaf L. J., Von Hoff D. D. (1996) Phase II trial of irinotecan in patients with progressive or rapidly recurrent colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 14:1128–1135.
- [123] Saenger J., Leible M., Seelig M. H., Berger M. R. (2004) Chemoembolization of rat liver metastasis with irinotecan and quantification of tumor cell reduction. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130:203–210.
- [124] Scaife C. L., Curley S. A., Izzo F., Marra P., Delrio P., Daniele B., Cremona F., Gershenwald J. E., Chase J. L., Lozano R. D., Patt Y. Z., Fornage B. D., Vauthey J. N., Woodall M. L., Gonzalez K. B., Ellis L. M. (2003) Feasibility of adjuvant hepatic arterial infusion of chemotherapy after radiofrequency ablation with or without resection in patients with hepatic metastases from colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 10:348–354.
- [125] Shao R. G., Cao C. X., Zhang H., Kohn K. W., Wold M. S., Pommier Y. (1999) Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA: DNA-PK complexes. *EMBO J.* 18:1397–1406.
- [126] Sigurdson E. R., Ridge J. A., Kemeny N., Daly J. M. (1987) Tumor and liver drug uptake following hepatic artery and portal vein infusion. *J. Clin. Oncol.* 5:1836–1840.

LITERATURVERZEICHNIS

- [127] Soulie P., Bensmaine A., Garrino C., Chollet P., Brain E., Fereres M., Jamin C., Musset M., Misset J. L., Cvitkovic E. (1997) Oxaliplatin/cisplatin (L-OHP/CDDP) combination in heavily pretreated ovarian cancer. *Eur. J. Cancer* 33:1400–1406.
- [128] Sperling J., Schafer T., Ziemann C., Benz-Weißer A., Kollmar O., Schilling M. K., Menger M. D. (2012) Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin. Exp. Metastasis* 29:91–99.
- [129] Starling N., Cunningham D. (2004) Monoclonal antibodies against vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor in advanced colorectal cancers: present and future directions. *Curr. Opin. Oncol.* 16:385–390.
- [130] Steinbauer M., Guba M., Cernaianu G., Kohl G., Cetto M., Kunz-Schughart L. A., Geissler E. K., Falk W., Jauch K. W. (2003) GFP-transfected tumor cells are useful in examining early metastasis in vivo, but immune reaction precludes long-term tumor development studies in immunocompetent mice. *Clin. Exp. Metastasis* 20:135–141.
- [131] Stintzing S., Heinemann V., Moosmann N., Hiddemann W., Jung A., Kirchner T. (2009) The treatment of colorectal carcinoma with monoclonal antibodies: the importance of KRAS mutation analysis and EGFR status. *Dtsch. Arztebl. Int.* 106:202–206.
- [132] Ströhle A., Maike W., Hahn A. (2007) [Nutrition and colorectal cancer]. *Med. Monatsschr. Pharm.* 30:25–32.
- [133] Sullivan R. D., Norcross J. W., Watkins E. (1964) Chemotherapy of metastatic liver cancer by prolonged hepatic-artery Infusion. *N. Engl. J. Med.* 270:321–327.
- [134] Tournigand C., Andre T., Achille E., Lledo G., Flesh M., Mery-Mignard D., Quinaux E., Couteau C., Buyse M., Ganem G., Landi B., Colin P., Louvet C., Gramont A. de (2004) FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J. Clin. Oncol.* 22:229–237.
- [135] Van Cutsem E., Kohne C. H., Hitre E., Zaluski J., Chang Chien C. R., Makhson A., D’Haens G., Pinter T., Lim R., Bodoky G., Roh J. K., Folprecht G., Ruff P., Stroh C., Tejpar S., Schlichting M., Nippgen J., Rougier P. (2009) Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 360:1408–1417.

- [136] Vassal G., Terrier-Lacombe M. J., Bissery M. C., Venuat A. M., Gyergyay F., Benard J., Morizet J., Boland I., Ardouin P., Paillet B., Bressac-de, Gouyette A. (1996) Therapeutic activity of CPT-11, a DNA-topoisomerase I inhibitor, against peripheral primitive neuroectodermal tumour and neuroblastoma xenografts. *Br. J. Cancer* 74:537–545.
- [137] Vibert E., Canedo L., Adam R. (2005) Strategies to treat primary unresectable colorectal liver metastases. *Semin. Oncol.* 32:33–39.
- [138] Wall M. E., Wani M. C., Cook C. E., Palmer K. H., McPhail A. I., Sim G. A. (1966) Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 88:3888–3890.
- [139] Wanebo H. J., Berz D. (2010) The neoadjuvant therapy of colorectal hepatic metastases and the role of biologic sensitizing and resistance factors. *J. Surg. Oncol.* 102:891–897.
- [140] Weissleder R. (2002) Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer* 2:11–18.
- [141] Wickremesekera J. K., Cannan R. J., Stubbs R. S. (2000) Hepatic artery access ports: recognizing and avoiding the problems. *Aust. N. Z. J. Surg.* 70:496–502.
- [142] Wild J. J., Reid J. M. (1952) Application of echo-ranging techniques to the determination of structure of biological tissues. *Science* 115:226–230.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, ohne die diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre:

Ein besonderer Dank gebührt Prof. Dr. med. M. D. Menger für die Überlassung des Themas meiner Arbeit. Mit seinem fundiertem Fachwissen und konstruktiver Kritik gab er mir viele Anregungen für meine wissenschaftliche Arbeit.

Der größte Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Jens Sperling, der mich mit sehr viel Geduld in die wissenschaftliche Arbeit eingeführt hat. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv und professionell begleitet. Sein Durchhaltevermögen aber auch seine Genauigkeit waren mir stets ein Vorbild. Er trug einen entscheidenden Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Mein weiterer Dank gilt Frau Dr. rer. med. Claudia Scheuer und Christina Marx für die Anzuchtung der Tumorzellen. Während der Durchführung der Versuche konnte ich immer auf ihre Hilfe zählen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Janine Becker für die Anfertigung der Histologie und die freundliche Unterstützung bei der Auswertung derselben.

Des weiteren danke ich dem Team der Tierpflege, insbesondere Elisabeth Gluding. Durch ihre Zuverlässigkeit und Hilfsbereitschaft haben sie zu einem reibungslosen Ablauf der Versuche beigetragen.

Publikationen

Originalpublikationen

1. J. Sperling, T. Schäfer, C. Ziemann, A. Benz-Weißer, O. Kollmar, M. K. Schilling, and M. D. Menger

Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin. Exp. Metastasis*, 2012 Feb;29(2):91-99.

2. J. Sperling, T. Schäfer, A. Benz-Weißer, C. Ziemann, C. Scheuer O. Kollmar, M. K. Schilling, and M. D. Menger

Hepatic arterial infusion but not systemic application of cetuximab in combination with oxaliplatin significantly reduces growth of CC531 colorectal rat liver metastases. *Int. J. Colorectal Dis.*, 2012 Dec 15. [Epub ahead of print]

3. J. Sperling, D. Brandhorst, T. Schäfer, C. Ziemann, A. Benz-Weißer, C. Scheuer, O. Kollmar, M. K. Schilling, and M. D. Menger

Liver-directed chemotherapy of cetuximab and bevacizumab in combination with oxaliplatin is more effective to inhibit tumor growth of CC531 colorectal rat liver metastases than systemic chemotherapy. *Clin. Exp. Metastasis*, 2012 Nov 27. [Epub ahead of print]

Kongressbeiträge

1. 126. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

J. Sperling, T. Schäfer, A. Benz, C. Ziemann, M. Schilling, M. D. Menger

Hepato-arterielle Infusion von Bevacizumab, insbesondere in Kombination mit Oxaliplatin, reduziert das Wachstum von CC531 kolorektalen Lebermetastasen.

Chirurgisches Forum 2009, Springer Verlag Heidelberg, Band 38, S. 73-74

2. 128. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie

J. Sperling, D. Brandhorst, A. Benz, C. Ziemann, O. Kollmar, M. Schilling,
M. D. Menger

Hepatic-arterial infusion of the monoclonal antibodies cetuximab and bevacizumab results in a significant reduction of tumor growth of colorectal liver metastases

Poster

1. 13. Chirurgische Forschungstage, 10.-12. September 2009, München

J. Sperling, T. Schäfer, A. Benz, C. Ziemann, M. K. Schilling, M. D. Menger

Hepatic-arterial infusion of bevacizumab, particularly in combination with oxaliplatin, reduces growth of CC531 colorectal liver metastases.

Langenbecks Arch Surg (2009), 394: 923-24

2. 14. Chirurgische Forschungstage, 23.-25.09.2010, Rostock

J. Sperling, T. Schäfer, A. Benz, C. Ziemann, M.K. Schilling, M. D. Menger

Hepatic-arterial infusion, but not systemic application of cetuximab and oxaliplatin reduces growth of CC531 colorectal liver metastases.

Langenbecks Arch Surg (2010), 395: 770-71

3. 18. Wissenschaftliche Jahrestagung der Saarländischen Chirurgenvereinigung, 20.01.2010, Völklingen

J. Sperling, T. Schäfer, A. Benz, C. Ziemann, M.K. Schilling, M. D. Menger

Hepato-arterielle Infusion von Bevacizumab, insbesondere in Kombination mit Oxaliplatin, reduziert das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen