

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

Universität des Saarlandes

Homburg / Saar

Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

**Die hepato-arterielle Infusion der monoklonalen Antikörper  
Cetuximab und Bevacizumab in Kombination mit Oxaliplatin  
bzw. Irinotecan an einem Metastasenmodell der Rattenleber**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2013

vorgelegt von David Brandhorst

geboren am 27.05.1984 in Bielefeld

*Meinen Eltern gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Klinischer Hintergrund</b>	<b>8</b>
3.1.1	Kolorektales Karzinom	8
3.1.2	Lebermetastasen	8
3.1.3	Leberresektion	9
3.1.4	Systemische Therapie	10
3.1.5	Lokoregionäre Tumordestruktion	11
<b>3.2</b>	<b>Regionale Chemotherapie</b>	<b>11</b>
3.2.1	Grundlagen	11
3.2.2	Hepato-arterielle Infusion	12
<b>3.3</b>	<b>monoklonale Antikörper</b>	<b>13</b>
3.3.1	EGF-Rezeptor und Cetuximab	14
3.3.2	VEGF-Rezeptor und Bevacizumab	16
<b>4</b>	<b>Ziel der Studie</b>	<b>19</b>
<b>4.1</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>5.1</b>	<b>Versuchstiere</b>	<b>20</b>
<b>5.2</b>	<b>Tumorzellen</b>	<b>20</b>
5.2.1	Herstellung der Tumorzellsuspension	20
<b>5.3</b>	<b>Zeitlicher Ablauf der Versuche</b>	<b>21</b>
<b>5.4</b>	<b>Tumorimplantation</b>	<b>22</b>
<b>5.5</b>	<b>Versuchsdurchführung</b>	<b>23</b>
5.5.1	Vorbereitende chirurgische Präparation	23
5.5.2	Kleintiersonographie/Tumorvolumetrie	23
5.5.3	Hepato-arterielle Infusion	24
5.5.4	Systemisch-venöse Infusion	25
5.5.5	Versuchsabschluss und Probenentnahme	26
<b>5.6</b>	<b>Parameter</b>	<b>27</b>
5.6.1	Hämatologische Untersuchung	27

5.6.2	Histomorphologische Untersuchungen .....	27
5.6.3	Immunhistochemie.....	30
<b>5.7</b>	<b>Experimentelles Protokoll.....</b>	<b>32</b>
<b>5.8</b>	<b>Statistische Analyse .....</b>	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
<b>6.1</b>	<b>Systemische und hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin.....</b>	<b>34</b>
6.1.1	Allgemeinzustand.....	34
6.1.2	Körpergewicht.....	34
6.1.3	Tumorwachstum .....	35
6.1.4	Histologie.....	36
6.1.5	Laborchemische Parameter .....	44
<b>6.2</b>	<b>Systemische und hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan .....</b>	<b>48</b>
6.2.1	Allgemeinzustand.....	48
6.2.2	Körpergewicht.....	48
6.2.3	Tumolvolumen .....	49
6.2.4	Histologie.....	50
6.2.5	Immunhistochemie.....	55
6.2.6	Laborchemische Parameter .....	58
<b>7</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>61</b>
<b>7.1</b>	<b>Diskussion von Material und Methoden.....</b>	<b>61</b>
7.1.1	Tumormodell.....	61
7.1.2	Tumorimplantation .....	63
7.1.3	Hepato-arterielle Infusion (HAI).....	64
7.1.4	Kombination von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin.....	68
7.1.5	Kombination von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan.....	69
7.1.6	Untersuchungsmethoden.....	71
<b>7.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>72</b>
7.2.1	Hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin.....	72
7.2.2	Hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan .....	78
<b>7.3</b>	<b>Schlussfolgerung .....</b>	<b>82</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>86</b>

<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>103</b>
<b>11</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>104</b>

# 1 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist in Deutschland die Krebsentität mit der höchsten Inzidenz. Durch hämatogene Metastasierung entwickeln etwa 50% der Patienten im Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen. Nach wie vor ist in diesen Fällen die chirurgische Resektion die einzige Therapieoption mit kurativer Zielsetzung. Ist aufgrund von Komorbiditäten oder anatomischen Verhältnissen keine Resektion durchführbar, stellt die systemische Chemotherapie den Goldstandard in der weiteren Behandlung dar. Mit dem Einsatz von monoklonalen Antikörpern wie Bevacizumab und Cetuximab konnte die Gesamtüberlebenszeit der Patienten signifikant verlängert werden. Die Kombination aus monoklonalen Antikörpern mit einem lokoregionären Applikationsverfahren wie der hepato-arteriellen Infusion ermöglicht eine hochspezifische antitumoröse Therapie, bei der hohe Wirkstoffkonzentrationen innerhalb des metastatischen Gewebes erreicht werden. Die Effektivität einer derartigen Therapie wurde bisher jedoch nicht untersucht und war Ziel der vorliegenden Studie.

*Methoden:* 10 Tage nach Implantation von  $5 \times 10^6$  CC531 Tumorzellen eines kolorektalen Karzinoms in die Leber von 48 WAG/RIJ-Ratten, die in insgesamt 8 Gruppen (n=6) randomisiert waren, wurde eine hepato-arterielle oder systemische Infusion von Bevacizumab und Cetuximab alleine oder in Kombination mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan durchgeführt. Die Kontrollgruppen erhielten vergleichbare Volumina NaCl-Lösung infundiert. Die Bestimmung des Tumolvolumens erfolgte an Tag 10 und 13 durch einen dreidimensionalen Ultraschallscan. Nach Abschluss der Versuche wurde Tumorgewebe für histologische und immunhistochemische Analysen entnommen.

*Ergebnisse:* Die hepato-arterielle Infusion der monoklonalen Antikörper Bevacizumab und Cetuximab, vor allem in Kombination mit Oxaliplatin, führt im Vergleich zur systemischen Applikation zu einer signifikanten Reduktion des Metastasenwachstums. Dieser antitumoröse Effekt war vor allem auf eine signifikant vermehrte Apoptoseinduktion zurückzuführen.

## 2 Abstract

*Background:* Colorectal cancer is the malignant disease with the highest incidence in Germany. During the time course of the disease, up to 50% of the patients develop hepatic metastases. Surgical resection is the only curative therapy. If R0-resection is not possible, systemic chemotherapy (SCT) is the gold standard in the treatment of hepatic metastatic colorectal cancer disease. The addition of monoclonal antibodies such as bevacizumab and cetuximab to SCT is capable of prolonging the overall survival. There are ambitious efforts to establish hepatic-arterial infusion (HAI) as locoregional chemotherapy instead of SCT. Compared to SCT, HAI provides the opportunity to increase the concentration of chemotherapeutic drugs and antibodies in the metastatic tissue.

The efficacy of such a loco-regional therapy, however, has not been elucidated yet, and was the aim of the present study.

*Methods:* 10 days after hepatic implantation of  $5 \times 10^5$  CC531 colorectal cancer cells 48 WAG/RIJ rats, randomized in 8 groups (n=6), underwent either HAI or SCT of bevacizumab and cetuximab alone or in combination with oxaliplatin or irinotecan. Animals of the control groups received a comparable amount of saline solution. Tumor growth was measured on day 10 and 13 by high resolution three dimensional ultrasound. Animals were then sacrificed and tumor tissue was studied by histological and immunohistochemical techniques.

*Results:* Hepato-arterial infusion of bevacizumab and cetuximab, particularly in combination with oxaliplatin, significantly reduced tumor growth of colorectal hepatic metastases. Comparable effects could not be achieved by systemic application of these compounds. Inhibition of tumor growth seems to be caused by increased apoptosis of tumor cells.

## 3 Einleitung

### 3.1 Klinischer Hintergrund

#### 3.1.1 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom (KRK) gehört zu den häufigsten malignen Erkrankungen der westlichen Welt. Mit über 376.000 Neuerkrankungen im Jahr 2004 war es die zweithäufigste Krebserkrankung in der europäischen Union [Boyle et al., 2005]. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts wurden in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2004 circa 73.000 Erkrankungen neu diagnostiziert [Haberland et al., 2004]. Es ist damit in Deutschland die Krebserkrankung mit der höchsten Inzidenz. Zudem ist das kolorektale Karzinom mit jährlich ca. 18.000 Todesfällen die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache nach dem Bronchialkarzinom [Bundesamt, 2005].

Das kolorektale Karzinom ist ein Tumor des höheren Lebensalters mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 7. und 8. Lebensjahrzehnt. Es besteht keine Geschlechtspräferenz. Pathogenetisch unterscheidet man zwei verschiedene Formen des kolorektalen Karzinoms. Der weitaus größte Teil der Tumoren entwickelt sich sporadisch auf dem Boden vorbestehender Adenome (Adenom-Karzinom-Sequenz), wobei verschiedene ätiologische Faktoren, wie z.B. ethnische Herkunft und Ernährung, Einfluss auf die Pathogenese nehmen. Eine geringere Anzahl der Karzinome, circa 5-10%, entstehen im Zusammenhang mit einer erblichen Tumordisposition aufgrund eines monogenetischen Defektes [Al-Taie et al., 2002]. Hierzu gehört das familiäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom), die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und die seltene Gruppe der hamartomatösen Polyposis-Syndrome, wie z.B. das Peutz-Jeghers-Syndrom.

#### 3.1.2 Lebermetastasen

Die Leber ist aufgrund ihrer doppelten Blutversorgung (portalvenös und hepatoarteriell), dem damit verbundenem hohen Blutfluss und ihrer physiologischen Filterfunktion

vulnerabel für die Invasion von Tumorzellen und die Entwicklung von Metastasen. Aufgrund dessen ist sie das häufigste Zielorgan für Karzinometastasen [Nizze et al., 1995]. Auch das kolorektale Karzinom metastasiert durch hämatogene Streuung über die Pfortader bevorzugt in die Leber. Obwohl ein Großteil (ca. 85%) der kolorektalen Primärtumoren chirurgisch kurativ reseziert werden kann, entwickeln über 50% der Patienten im Krankheitsverlauf metachrone Lebermetastasen [Rosenberg et al., 2006]. In 14-25% der Fälle bestehen bereits synchrone Metastasen [Flieger et al., 2004].

Werden die Metastasen aufgrund von limitierenden Begleiterkrankungen nicht therapeutisch angegangen, liegt die mediane Überlebenszeit unter einem Jahr [Alberts et al., 2008] und die 5-Jahres-Überlebensrate bei nahezu 0%. Ursächlich für den Tod der Patienten ist in der Regel das Eintreten einer fulminanten Leberinsuffizienz aufgrund ausgeprägter Metastasenbildung [Konopke et al., 2003, Nordlinger et al., 1996].

#### 3.1.3 Leberresektion

Lange kam eine Fernmetastasierung in die Leber bei Patienten mit kolorektalem Karzinom einer infausten Prognose gleich [Gall, 1987]. Es zeigte sich jedoch, dass die Resektion von Lebermetastasen die Überlebenszeit signifikant verlängern kann und in einigen Fällen kurativ ist. So werden heute nach hepatischer Metastasektomie 5-Jahresüberlebensraten von 30-50% erreicht [Trarbach et al., 2007]. Aufgrund vorausschauender Patientenselektion, exakterer Bildgebung und modifizierter Operationstechniken liegt die perioperative Letalität in chirurgischen Zentren dabei unter 5% [Fong et al., 1999].

Die Ausschlusskriterien für die Leberresektion sind nicht eindeutig definiert und werden zum Teil kontrovers diskutiert. Weitestgehender Konsens besteht derzeit über folgende Kontraindikation: fehlende Möglichkeit einer R0-Resektion, absehbar zu geringes funktionelles Restlebergewebe nach Resektion, irresektable extrahepatische Metastasen und generelle Inoperabilität des Patienten. Diese Faktoren schränken das Patientenkollektiv stark ein, sodass letztlich nur in 15-25% der Fälle eine Leberresektion durchführbar ist [Ladurner et al., 2007].

Aufgrund dieser niedrigen Resektionsrate ist die Suche nach anderen Therapieansätzen bei Patienten mit irresektablen Lebermetastasen von größter klinischer Bedeutung.

### 3.1.4 Systemische Therapie

Über viele Jahre war die peripher-venöse Gabe des Pyrimidinantagonisten 5-Fluoruracil und Folinsäure die Standardtherapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. So wurden Tumoransprechraten von 20-30% und mediane Überlebenszeiten von 11-12 Monaten erreicht [Alberts and Wagman, 2008]. Mit der Zulassung von Oxaliplatin, einem Platin-Derivat, und dem Topoisomerase-Inhibitor Irinotecan in Kombination mit 5-FU und Folinsäure konnte die Prognose verbessert werden. Saltz et al. beschrieben, wie sich die Ansprechrate von ca. 30% unter Infusionstherapie mit 5-Fluorouracil und Leucovorin, auf über 50% unter der Kombinationstherapie mit Irinotecan (FOLFIRI) steigern ließ [Saltz et al., 2000]. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für Oxaliplatinkombinationen (FOLFOX) nachgewiesen. So konnte das mediane Überleben unter FOLFOX auf fast 20 Monate verlängert werden [Goldberg et al., 2004].

Ein weiterer Fortschritt in der systemischen Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms ergab sich aus dem Einsatz monoklonaler Antikörper wie Bevacizumab und Cetuximab. Angriffspunkte dieser sogenannten „targeted“-Substanzen sind Signalstoffe und ihre Rezeptoren die zentrale Bedeutung für das Tumorwachstum haben.

Cetuximab ist sowohl in der Erstlinientherapie als auch bei Irinotecan-refraktären Patienten als Therapieoption zugelassen. Die Wirksamkeit von Bevacizumab in der Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms wurde unter anderem von Hurwitz et al. nachgewiesen. Die Ergänzung von Bevacizumab zu einer konventionellen Chemotherapie verlängert das mediane Überleben der Patienten von 15,6 auf 20,3 Monate und die Ansprechraten von 34.8% auf 44.8% [Hurwitz et al., 2004].

Die beschriebenen Fortschritte im Rahmen der systemischen Chemotherapie ermöglichen es, einen Teil der Patienten deren Lebermetastasen primär als nicht resektabel eingestuft wurden, sekundär mit kurativer Zielsetzung zu operieren [Adam et al., 2004].

### 3.1.5 Lokoregionäre Tumordestruktion

Neben den Standardverfahren der offenen chirurgischen Metastasenresektion und der systemischen Chemotherapie gibt es zahlreiche Verfahren der lokalen Tumordestruktion, die als weitere wichtige Therapieoption nicht unerwähnt bleiben soll. Mit der lokalen Applikation von Hitze ist eine parenchymsparende in-situ Ablation von Lebermetastasen möglich. Man unterscheidet die Radiofrequenzablation (RFA) und die laserinduzierte Thermo-Therapie (LITT), bei denen die Applikatoren entweder perkutan oder intraoperativ in das tumoröse Gewebe eingebracht werden. RFA bzw. LITT können indiziert sein z.B. bei zentral gelegenen Rezidivmetastasen, in Kombination mit einer Resektion zur Ablation von tief liegenden Metastasen oder bei kleinvolumigen Metastasen mit eingeschränkter Operabilität des Patienten [Grundmann et al., 2008]. Die Evidenzlage zur Anwendung der in-situ-Ablation in Bezug auf Rezidivrate und Überlebenszeit ist jedoch unzureichend, sodass bei primär resektablen Metastasen die chirurgische Resektion vorzuziehen ist [Grundmann et al., 2008].

In Kombination mit regionären Infusionsmodellen, wie der hepato-arteriellen Infusion, ergeben sich interessante Therapieoptionen. So kombinierten beispielsweise Martin et al. die RFA mit der hepato-arteriellen FUDR Applikation bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen [Martin et al., 2006].

## 3.2 Regionale Chemotherapie

### 3.2.1 Grundlagen

Wesentlich für die therapeutische Effizienz einer Chemotherapie ist neben dem antitumorösen Potential des verwendeten Wirkstoffes auch die Konzentration, die innerhalb des Tumorgewebes erreicht wird. Eine lokoregionäre und somit organbezogene Chemotherapie erlaubt eine Konzentrationserhöhung verglichen mit der systemischen Applikation. Dieser Zusammenhang wurde von Collins ausführlich beschrieben. So ging die intrarterielle, intrathekale und intraperitoneale Wirkstoffapplikation mit einem höheren Konzentrationsniveau der Wirkstoffe innerhalb des Tumors einher, als dies nach systemischer Gabe einer vergleichbaren Dosis der Fall war [Collins, 1984].

Diese theoretischen Grundlagen spielen auch bei der hepato-arteriellen Infusion als einem Verfahren der lokoregionären Chemotherapie eine wesentliche Rolle. Breedis und Young zeigten bereits 1954, dass Lebermetastasen, unabhängig von ihrer Genese, fast vollständig von der A. hepatica perfundiert werden. Das übrige Leberparenchym wird hingegen überwiegend portalvenös versorgt [Breedis et al., 1954]. Durch Applikation von Chemotherapeutika über die A. hepatica können so deutlich höhere Wirkstoffkonzentrationen im Tumorgewebe erreicht werden als dies bei systemischer Infusion der Fall wäre. Abhängig von der verwendeten Substanz bleibt die Wirkung weitestgehend auf das tumoröse Gewebe beschränkt. Zusätzlich wird durch den first-pass-Effekt der Leber ein Großteil des Wirkstoffes unmittelbar metabolisiert, ohne in den Körperkreislauf zu gelangen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Dosisintensivierung von Chemotherapeutika bei gleichzeitig geringeren systemischen Nebenwirkungen [Collins, 1984].

#### 3.2.2 Hepato-arterielle Infusion

Bereits 1951 wurde die hepato-arterielle Infusion therapeutisch eingesetzt [Bierman et al., 1951]. Die praktische Durchführung war zunächst problembehaftet. So ging die transfemorale Katheterisierung der A. hepatica mit perkutaner Ausleitung häufig mit Thrombosierungen, Infektionen, Blutungen und Katheterdislokationen einher [Ensminger, 2002]. Mit der Einführung von subkutan implantierbaren Pumpen und Portsystemen konnte die Komplikationsrate gesenkt und das Verfahren im Rahmen der klinischen Anwendung deutlich praktikabler gestaltet werden.

Ein häufig verwendetes Chemotherapeutikum für die hepato-arterielle Infusion ist der 5-FU-Metabolit Fluorodeoxyuridin (FUDR), der aufgrund seines hohen first-pass Effektes von über 95% eine nahezu isoliert leberbezogene Behandlung ohne systemische Nebenwirkungen möglich macht [Collins, 1984, Mocellin et al., 2009, Power et al., 2009].

Zahlreiche randomisierte Studien verglichen die Effektivität der systemischen und der lokalen Behandlung mit FUDR bei Patienten mit primär nicht resektablen Lebermetastasen [Chang et al., 1987, Hohn et al., 1989, Kemeny et al., 1987]. Während unter systemischer Gabe die Response-Raten bei 10-20% lagen, zeigte sich nach hepato-arterieller Infusion des Wirkstoffes eine signifikante Steigerung der Ansprechraten auf 42-52%. Ein positiver Effekt

auf die mediane Überlebenszeit blieb jedoch aus. Auch die in diesem Zusammenhang veröffentlichte Metaanalyse von Mocellin et al., in der Daten von 1277 Patienten ausgewertet wurden, bestätigte das Ergebnis hoher Response-Raten bei gleichzeitig unveränderten Überlebenszeiten [Mocellin et al., 2007].

Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Sachverhalt ist das vermehrte Auftreten extrahepatischer Krankheitsmanifestationen bei alleiniger loko-regionärer Chemotherapie [Cohen et al., 2003]. So entwickeln 56% der mit hepato-arterieller Infusion behandelten Patienten im weiteren Krankheitsverlauf pulmonale Metastasen. Hingegen ist dies nur bei 37% der Patienten unter systemischer Therapie der Fall [Kemeny et al., 1987].

Behandlungsansätze, in denen die hepato-arterielle Infusion mit einer systemischen Chemotherapie kombiniert wird, liefern dagegen vielversprechende Ergebnisse [Gallagher et al., 2007, Kemeny et al., 2001, Kemeny et al., 2005]. So werden Ansprechraten von bis zu 88% und ein signifikanter Anstieg des medianen Überlebens auf über 36 Monate beschrieben. Diese Ergebnisse verdeutlichen, welches Potential die hepato-arterielle Infusion insbesondere in der Kombinationstherapie besitzt [Kemeny et al., 2005].

Der Einsatz moderner Chemotherapeutika im Rahmen der hepato-arteriellen Infusion ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die HAI unter Verwendung monoklonaler Antikörper im Vergleich zur systemischen Applikation hinsichtlich ihres antitumorösen Effektes zu untersuchen.

## 3.3 monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörpern in der Behandlung maligner Erkrankungen ermöglichen eine selektive gegen spezifische zelluläre Antigene gerichtete Therapie. Zellphysiologische Mechanismen wie Proliferation, Differenzierung und Wachstum sind für die Onkogenese relevante Vorgänge, die durch zielgerichtete Chemotherapeutika beeinflusst werden können. Angriffspunkte in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms sind unter anderem der „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) und der „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), die beide speziell im Rahmen der tumorinduzierten Angiogenese eine zentrale Rolle spielen.

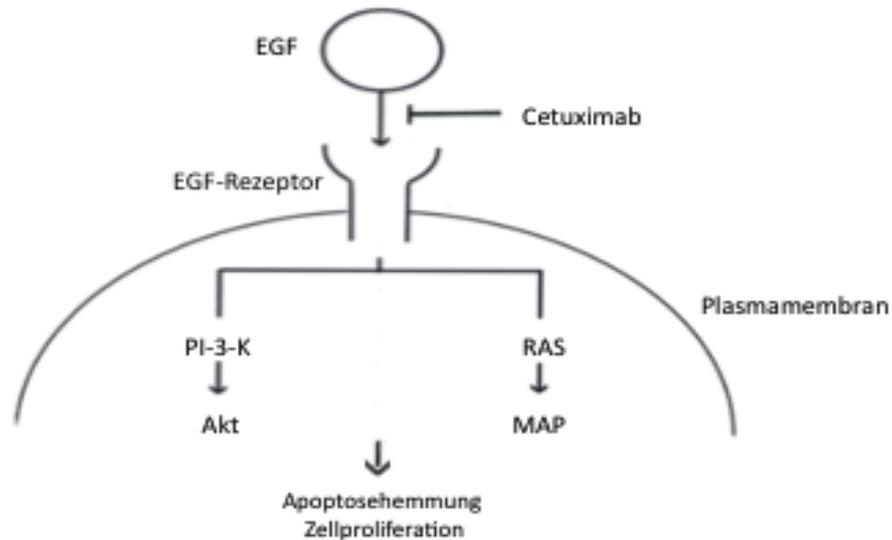
### 3.3.1 EGF-Rezeptor und Cetuximab

Der EGF-Rezeptor wird auf Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert und gehört zur Gruppe der Tyrosinkinaserzeptoren. Neben EGF (epidermal growth factor) binden auch andere Faktoren wie TGF-alpha (transforming growth factor alpha), Amphiregulin oder Betacellulin an den Rezeptor [Arteaga, 2002]. Nach Ligandenbindung kommt es durch Dimerisation und Autophosphorylierung zu einer Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase [Italiano, 2006]. Über eine intrazellulär vermittelte Signalkaskade resultieren stimulierende Effekte auf Angiogenese und Zellproliferation (siehe Abbildung 1). Zusätzlich wird die Apoptosewahrscheinlichkeit vermindert. Die Aktivierung von intrazellulären Matrixmetalloproteinasen und die Stimulation der Tumorzellmotilität fördern Invasivität und Metastasierungstendenz [Ellerbroek et al., 2001].

Mit Hilfe immunhistochemischer und molekularbiologischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in 72-82% aller kolorektalen Karzinome eine Überexpression von EGFR vorliegt bei gleichzeitig reduzierter Expression im normalen Gewebe [Saltz et al., 2004].

Der chimäre, monoklonale Antikörper Cetuximab (Erbix®<sup>®</sup>, Merck Serono GmbH, Darmstadt, BRD) bindet mit hoher Affinität an den EGF-Rezeptor [Goldstein et al., 1995] und verhindert so die Aktivierung durch natürliche Liganden. Daraus resultiert eine Inhibition der Zellproliferation, der Angiogenese sowie eine verminderte Metastasierungstendenz. Zusätzlich kommt es zu einer Stimulation der Apoptose [Mendelsohn et al., 2003]. Die Wirksamkeit in Bezug auf das metastasierende kolorektale Karzinom wurde an EGFR-exprimierenden Tumorzellkulturen [Wu et al., 1995] und in tierexperimentellen Studien nachgewiesen [Ciardiello et al., 1996].

Vor allem in der Behandlung von Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom, die weitestgehend refraktär gegen andere Chemotherapeutika waren, hat Cetuximab schnell einen hohen therapeutischen Stellenwert erlangt.



**Abbildung 1:** *Abbildung 1 zeigt die EGF-Signalkaskade und die Wirkungsweise von Cetuximab. Durch EGF-Bindung kommt es zur Aktivierung des Ras-MAP-Kinase-Signalwegs bzw. der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) und Akt-Kinase-Kaskade, die unter anderem eine verstärkte Zellproliferation und eine verminderte Apoptose zur Folge hat. Cetuximab verhindert die Rezeptorbindung und somit die Aktivierung der Signalkaskade*

Eine Prognoseverbesserung für Patienten mit metastasiertem KRK wurde in der BOND-1 Studie quantitativ erfasst. 329 Patienten, die kein Ansprechen auf eine Irinotecantherapie zeigten, erhielten entweder nur Cetuximab oder Cetuximab in Kombination mit Irinotecan. Während im Monotherapiearm eine Tumorkontrollrate von 32,4% erreicht wurde, stieg die Kontrollrate unter Kombinationstherapie auf 55,5% an. Auch der Zeitraum bis zur Krankheitsprogression konnte durch die Kombinationstherapie signifikant verlängert werden [Cunningham et al., 2004]. Diese und weitere Daten führten zur Zulassung von Cetuximab in der Behandlung des metastasierten Irinotecan-refraktären Kolonkarzinoms.

Aktuelle Studien untersuchen den Stellenwert von Cetuximab in der first-line-Therapie [Bokemeyer et al., 2009, Van Cutsem et al., 2009]. Vor allem in Kombination mit Oxaliplatin-basierten Therapieregimen ist Cetuximab ein vielversprechendes Chemotherapeutikum [Tabernero et al., 2007].

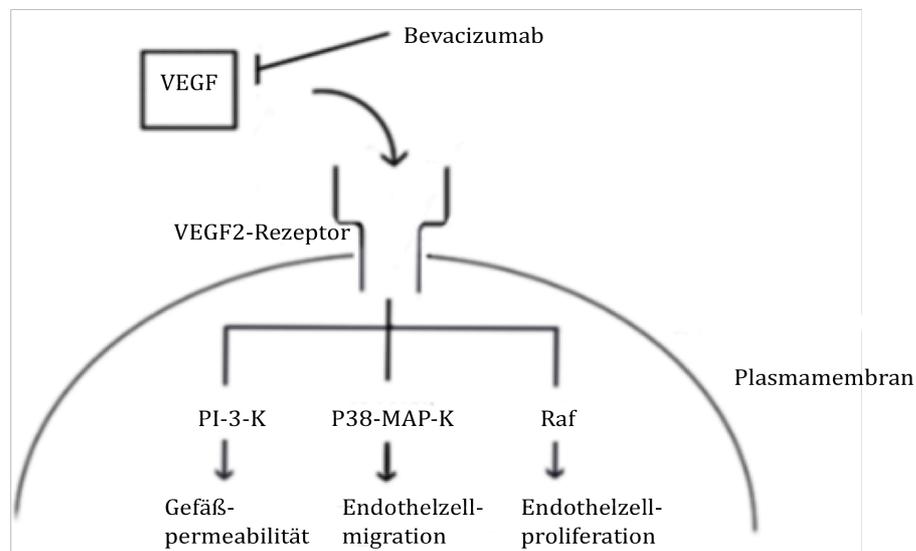
### 3.3.1.1 Cetuximab und der K-ras-Mutationsstatus

Bei 30-50% der humanen kolorektalen Karzinome besteht eine Mutation im K-ras Onkogen [Bos et al., 1987]. K-ras ist wichtiger Bestandteil der intrazellulären EGF-Signalkaskade. Da Cetuximab selektiv den EGF-Rezeptor blockiert und auf diese Weise die antitumoröse Wirkung vermittelt, hat eine Mutation von K-ras direkten Einfluss auf das Therapieansprechen. Dieser Zusammenhang konnte in einigen Studien nachgewiesen werden. So untersuchten Lievre et al. nach Therapieabschluss den Mutationsstatus von 30 Patienten, die mit Cetuximab behandelt wurden. Bei 13 Patienten, die nicht auf die Therapie ansprachen, bestand eine K-ras-Mutation. Bei den Patienten mit K-ras Wildtyp lag die Responderate bei 68,4% [Lievre et al., 2006]. Auch nachfolgende groß angelegte Wirksamkeitsstudien berücksichtigten den K-ras Mutationsstatus mit ähnlichen Ergebnissen. Mittlerweile hat sich der K-ras Mutationsstatus als etablierter prädiktiver Marker auch in der klinischen Praxis durchgesetzt, sodass eine Cetuximabtherapie nur bei Patienten mit Wildtypstatus erfolgt [Bokemeyer et al., 2009, Karapetis et al., 2008, Van Cutsem et al., 2009].

### 3.3.2 VEGF-Rezeptor und Bevacizumab

Der Wachstumsfaktor VEGF wird, wie auch EGF, im kolorektalen Karzinom vermehrt exprimiert [Takahashi et al., 1995] und hat somit für die primäre Tumorangiogenese und Vaskularisierung von Metastasen zentrale Bedeutung. Man unterscheidet insgesamt sieben verschiedene Subtypen (VEGF A-F und placental growth factor), welche Signalkaskaden über drei verschiedene Rezeptorsysteme mit Tyrosinkinaseaktivität (VEGF-R 1-3) einleiten [Ferrara et al., 2003].

Eine Schlüsselrolle in der Angiogenese hat VEGF-A, der überwiegend an den VEGF-Rezeptor-2 (Synonym: KDR-Rezeptor) bindet (siehe Abbildung 2). Dieser Rezeptor befindet sich fast ausschließlich auf der Oberfläche von Endothelzellen und induziert nach Ligandenbindung die Migration und Proliferation der Endothelzellen. Zusätzlich steigert VEGF-A über diesen Mechanismus die Permeabilität von Gefäßen, verhindert den apoptotischen Abbau von Endothelzellen und hat einen modulierenden Effekt auf das zelluläre Immunsystem [Kramer et al., 2007]. Es resultiert ein beschleunigtes Tumorwachstum mit zusätzlich gesteigerter Metastasierung.



**Abbildung 2:** Das Schema zeigt die Wirkungsweise von Bevacizumab. Durch die Rezeptorbindung von VEGF kommt es zur Aktivierung verschiedener Proteinkinasen. Unter anderem führt die Phosphoinositol-3-Kinase-Aktivität zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, die Aktivierung der p38-MAP-Kinase und der Raf-Kinase geht mit einer gesteigerten Migration bzw. Proliferation von Tumorzellen einher. Bevacizumab bindet an den Wachstumsfaktor, wodurch eine Aktivierung der Signalkaskade verhindert wird.

Somit ist das VEGF/VEGFR-System eine ideale therapeutische Zielstruktur. Bevacizumab (Avastin®, Roche, München, BRD) ist ein humanisierter IgG-Antikörper (149 kDa), der spezifisch VEGF-A bindet und so eine Interaktion mit dem VEGF-Rezeptor verhindert. Daraus resultiert eine Hemmung des angiogenen Potentials einhergehend mit einem eingeschränkten Tumorwachstum. Präklinisch konnte dieser Effekt anhand von Tumorzelllinien und Xenograftmodellen nachgewiesen werden [Presta et al., 1997]. Auch das Metastasierungsverhalten wird durch den Einsatz von VEGF-Inhibitoren beeinflusst. So zeigten Warren et al. anhand von Xenograftmäusen mit kolorektalem Karzinom eine deutliche Reduktion der Häufigkeit von Lebermetastasen bei gleichzeitiger Abnahme der Primärtumormasse um bis zu 90% [Warren et al., 1995].

Zahlreiche klinische Studien bestätigten die Wirksamkeit von Bevacizumab in der Behandlung von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom. Hurwitz et al. verglichen die Kombination von Irinotecan/5-FU/Leukovorin entweder mit Bevacizumab oder einem Placebo. Im Therapiearm mit Bevacizumab lag das Gesamtüberleben im Mittel bei 20,3 Monaten im Vergleich zu 15,6 Monaten in der Placebogruppe. Das progressionsfreie Überleben stieg unter der Gabe des monoklonalen Antikörpers auf fast das Doppelte. Zudem zeigten die Patienten im Bevacizumab-Arm eine Ansprechrate von 45%, wohingegen in der Placebogruppe lediglich 35% auf die Behandlung ansprachen [Hurwitz et al., 2005].

Aufgrund der nachgewiesenen Wirksamkeit wurde Bevacizumab 2005 in Deutschland für die Erstlinienbehandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms in der Kombinationstherapie zugelassen. Mittlerweile ist Bevacizumab in Kombination mit allen fluoropyrimidinbasierten Chemotherapien einschließlich Oxaliplatin und Capecitabine zugelassen.

## 4 Ziel der Studie

### 4.1 Fragestellung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, die Effektivität einer hepato-arteriellen Infusion von antikörperbasierten Chemotherapieregimen im Vergleich zur systemischen Applikation zu untersuchen. Hierfür wurden die monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab allein oder in Kombination mit den Zytostatika Oxaliplatin bzw. Irinotecan verwendet. Die Untersuchungen wurden in einem Lebermetastasenmodell mit CC531-Zellen an WAG/RiJ-Ratten durchgeführt.

Dabei waren folgende Fragestellungen von besonderem Interesse:

- **Hat die hepato-arterielle Applikation von monoklonalen Antikörpern allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eine antitumoröse Wirkung auf Lebermetastasen kolorektalen Ursprungs?**
- **Welche qualitativen und quantitativen Unterschiede bestehen in der antitumorösen Wirkung von hepato-arterieller und systemischer Wirkstoffapplikation?**
- **Über welche Mechanismen wird die antitumoröse Wirkung von Cetuximab und Bevacizumab vermittelt?**
- **Bestehen synergistische Wirkmechanismen zwischen den einzelnen Substanzen?**
- **Ist die Therapie tumorspezifisch oder kommt es zu substanz- bzw. infusionsbedingten Schäden des normalen Leberparenchyms?**

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen WAG/Rij-Ratten (Charles River, Sulzfeld, BRD) gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Versuchstiere befanden sich über den gesamten Versuchszeitraum unter standardisierten Bedingungen (12-stündiger Hell-/Dunkelrhythmus, Lufttemperatur 22°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 10%, Standardlaborfutter Fa. Altromin, Lage, BRD, Wasser ad libitum über Trinkflasche) in der Tierhaltung des Instituts für Klinisch Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.

### 5.2 Tumorzellen

Bei der für die Versuche verwendeten Zelllinie vom Typ CC531 (CLS; Cell Lines Service and Tumor- Zellbank; Heidelberg, BRD) handelt es sich um Zellen eines chemisch induzierten, rattenspezifischen Adenokarzinoms des Colon sigmoideum. Durch Implantation von CC531-Tumorzellen in die Leber von WAG/Rij-Ratten werden Tumoren generiert, die ähnliche tumorbiologische Eigenschaften besitzen wie Metastasen humaner kolorektaler Karzinome.

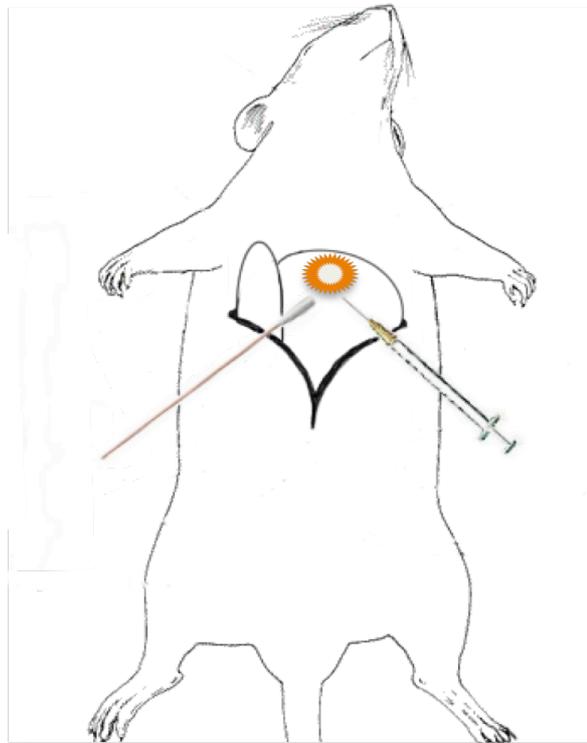
#### 5.2.1 Herstellung der Tumorzellsuspension

Die Zelllinien wurden bei -180°C in flüssigem Stickstoff in 1,8ml Kryogefäßen (Nuc, Roshilde, DK) konserviert. Für die Kultivierung wurden die Gefäße bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, die Oberfläche des Gefäßes mit 70% Isopropanol desinfiziert und anschließend in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe, BRD) mit vorgelegtem, raumtemperatur-equilibrierten, FCS-haltigem Kulturmedium (FCS; Foetal calf serum; Gold, PAA, Cölbe, BRD) überführt. Nach zwei fünfminütigen Zentrifugationsschritten (Universal 30 F; Hettich, Tuttlingen, BRD) bei 1600U/min wurden die Zellen in Petrischalen (Cellstar; 100/20mm, Greiner BioOne, Frickenhausen, BRD) ausgesät und bei 37°C unter einer 5% humiden CO<sub>2</sub>-



## 5.4 Tumorimplantation

Die Tumorimplantation an Tag 0 wurde in Äthernarkose durchgeführt (Äther für Narkose, Hoechst, Frankfurt/Main, BRD). Nachdem das initiale Körpergewicht des Versuchstieres ermittelt wurde, erfolgte die Rasur der Operationsregion (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, BRD). Anschließend wurde eine mediane Laparotomie von etwa 1,5 cm Länge bis kurz unterhalb des Sternums vorgenommen. Durch bilaterale Kompression des Oberbauchs war eine schonende Luxation des linken Leberlappens über das Hautniveau ohne Berührung desselben möglich. Feuchte Gazekompressen hielten den Leberlappen in Position und verhinderten eine Relaxation. Die Injektion der Tumorzellsuspension ( $5 \times 10^5$  Tumorzellen pro Injektion) erfolgte subkapsulär über eine 27G-Kanüle (Omnicon F, Braun, Melsungen, BRD) in den dorsalen Anteil des Leberlappens. Um eine peritoneale Aussaat von Tumorzellen über den Stichkanal zu verhindern und zugleich ein Nachbluten zu vermeiden, wurde die Injektionsstelle mit einem Wattestäbchen leicht komprimiert (siehe Abbildung 4). Nach anschließender Reposition des Leberlappens in die Abdominalhöhle wurden die Wundränder mit einer fortlaufenden, allschichtigen Hautnaht (PDS 4-0, Ethicon, Johnson & Johnson, Norderstedt, BRD) verschlossen.



**Abbildung 4:** Durchführung der Tumorimplantation. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte subkapsulär in den mobilisierten linken Leberlappen. Die Verwendung eines Wattestäbchens verhinderte das Austreten von Tumorzellen aus dem Stichkanal.

## 5.5 Versuchsdurchführung

### 5.5.1 Vorbereitende chirurgische Präparation

Die Wirkstoffapplikation wurde 10 Tage nach der Tumorimplantation vorgenommen. Analog zur Implantation erfolgte auch hier eine Äthernarkose (Äther für Narkose, Hoechst, Frankfurt/Main, BRD). Nach Ermittlung des Körpergewichtes und Rasur der Operationsregion (Electra, GH204; Aesculap, Tuttlingen, BRD) wurden die Tiere mit Hilfe von Pflasterstreifen an den Extremitäten in Rückenlage auf einem Operationstisch fixiert. Es erfolgte eine Relaparotomie mit Erweiterung der primären Inzision, sodass ein ausreichender Zugang zum Abdomen gewährleistet war. Wundhaken auf beiden Seiten des Tieres, welche über magnetische Füße auf dem Operationstisch (Effenberger, Pfaffingen, BRD) befestigt waren, ermöglichten das Offenhalten des Operationssitus. Unter Zuhilfenahme von Wattestäbchen wurden die Darmschlingen mobilisiert und extraabdominell auf Mullkompressen ausgelagert. Um einer Austrocknung vorzubeugen, wurden die Kompressen während der Operation mit Kochsalzlösung feucht gehalten. Anschließend erfolgte eine Blutentnahme aus der V. cava inferior, welche proximal ihrer Bifurkation mit einer Kanüle (Microlance 24G, 0,55×25mm, BD, New Jersey, USA) punktiert wurde. Die Lagerung des Blutes erfolgte in EDTA-Röhrchen bei 6°C im Kühlschrank. Nach Versuchsdurchführung wurden mittels Spektrometrie (Coulter Electronics Ltd, Ac\*T diff., Buckinghamshire, UK) definierte hämatologische Parameter (siehe Kapitel 5.5.1) für jedes Tier bestimmt. Um einem retroperitonealen Hämatom vorzubeugen, wurde die Einstichstelle bis zum Einsetzen der primären Blutgerinnung mittels Wattestäbchen (Fink und Walter, Merchweiler, BRD) komprimiert, ohne den Blutfluss zu kompromittieren.

### 5.5.2 Kleintiersonographie/Tumorvolumetrie

Die Tumorvolumetrie erfolgte mittels Kleintier-Sonographie (Vevo 770, VisualSonics INC., Toronto, Canada). Unter Verwendung eines 40 MHz Ultraschallkopfes (RMV703, VisualSonics INC., Toronto, Canada) erfolgte ein Tumorvolumenscan in Echtzeit. Das Tumolvolumen wurde an Tag 10 vor Applikation der Medikamente, sowie an Tag 13 zum Abschluss des jeweiligen Versuchs bestimmt.

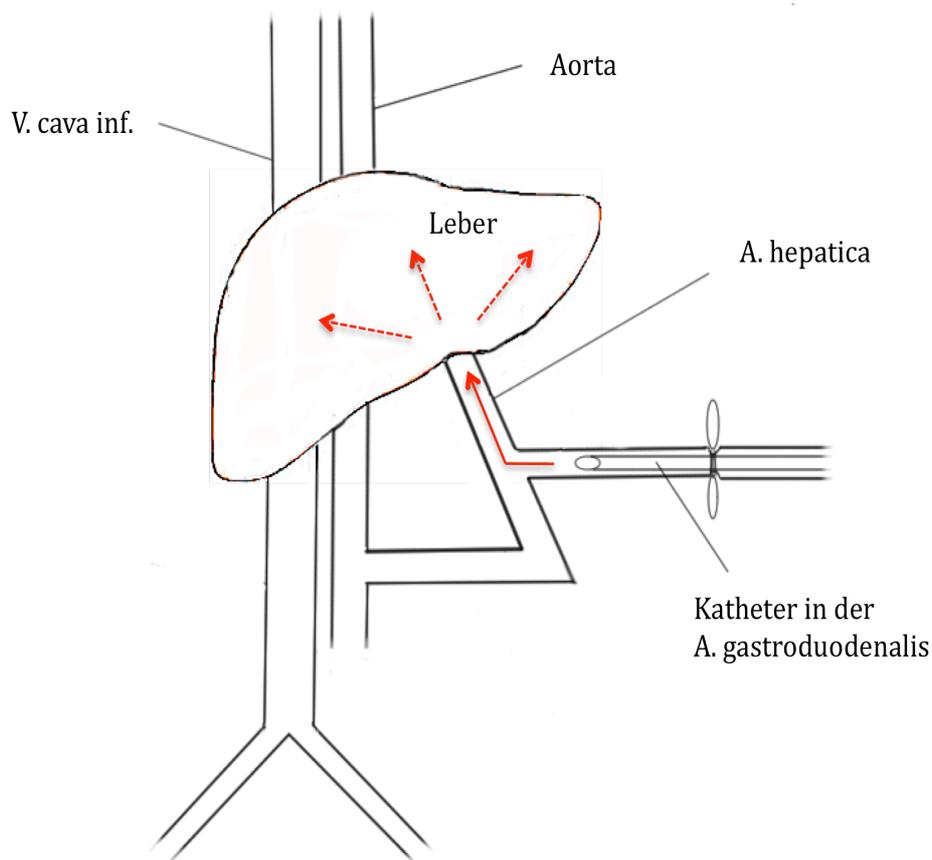
Nach der makroskopischen Beurteilung des Tumors erfolgte die Positionierung des linken Leberlappens für die anschließende sonographische Bestimmung des genauen Tumolvolumens. Um eine optimale Ausrichtung des Schallkopfes auf der ventralen Seite des linken Leberlappens zu ermöglichen, wurde dieser auf einigen Darmschlingen in Position gehalten und zusätzlich das Xiphoid mittels Klemmchen nach kranial luxiert. So kam der Ultraschallkopf senkrecht auf der Leberoberfläche zu liegen, was eine exakte Tumolvolumenbestimmung möglich machte. Um ein möglichst standardisiertes Vorgehen bei dem Ultraschallscan zu gewährleisten, wurde der Schallkopf durch ein motorisiertes Schienensystem geführt.

Die Validität und Reliabilität der hierfür zum Einsatz kommenden Technik konnte in zahlreichen präklinischen Studien mit vergleichbarem Design belegt werden. Hohe zeitliche (1000 Bilder/Sekunde) und räumliche Auflösung (35-40 Microns, Ultraschallcenterfrequenz 40 MHz) ermöglichten eine exakte Dokumentation der Tumolvolumenänderung von Tag 10, an dem die initiale Bestimmung erfolgte, bis zum Versuchabschluss an Tag 13. Die endgültige Vermessung des Tumors wurde mit Hilfe spezieller Software (VisualSonics B-Mode, Toronto, Canada) durchgeführt.

### 5.5.3 Hepato-arterielle Infusion

Das Prinzip der hepato-arteriellen Infusion ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Die mikrochirurgische Präparation der A. gastroduodenalis erfolgte unter dem Operationsmikroskop (Leica M-Stereomikroskop, Leica Microsystems, Heerbrugg, Schweiz). Um ausreichend Platz für die Kanülierung zu lassen, musste das Gefäß möglichst peripher, aber proximal seiner Bifurkation mit Seide 6-0 ligiert werden. Zusätzliches zweimaliges Anschlingen der Arterie mit Seide 6-0 ermöglichte zum einen die spätere Fixation des Katheters während der Infusion und zum anderen einen unkomplizierten Verschluss des Gefäßes nach erfolgter Infusion. Eine feine Bulldog-Klemme auf der A. gastroduodenalis, nahe der Mündung in die A. hepatica communis positioniert, verhinderte eine Blutung durch retrograden Blutfluss. Nach Inzision und Kanülierung mit einem schräg angeschnittenen heparinisierten Katheter (PE-50, ID 0.28mm, Portex Ltd., Hythe, UK) wurde dieser mit dem vorgelegten Seidenfaden fixiert und die Bulldog-Klemme entfernt. Die Substanzen konnten im nächsten Schritt intraarteriell infundiert werden. Die abschließende Spülung des Katheters

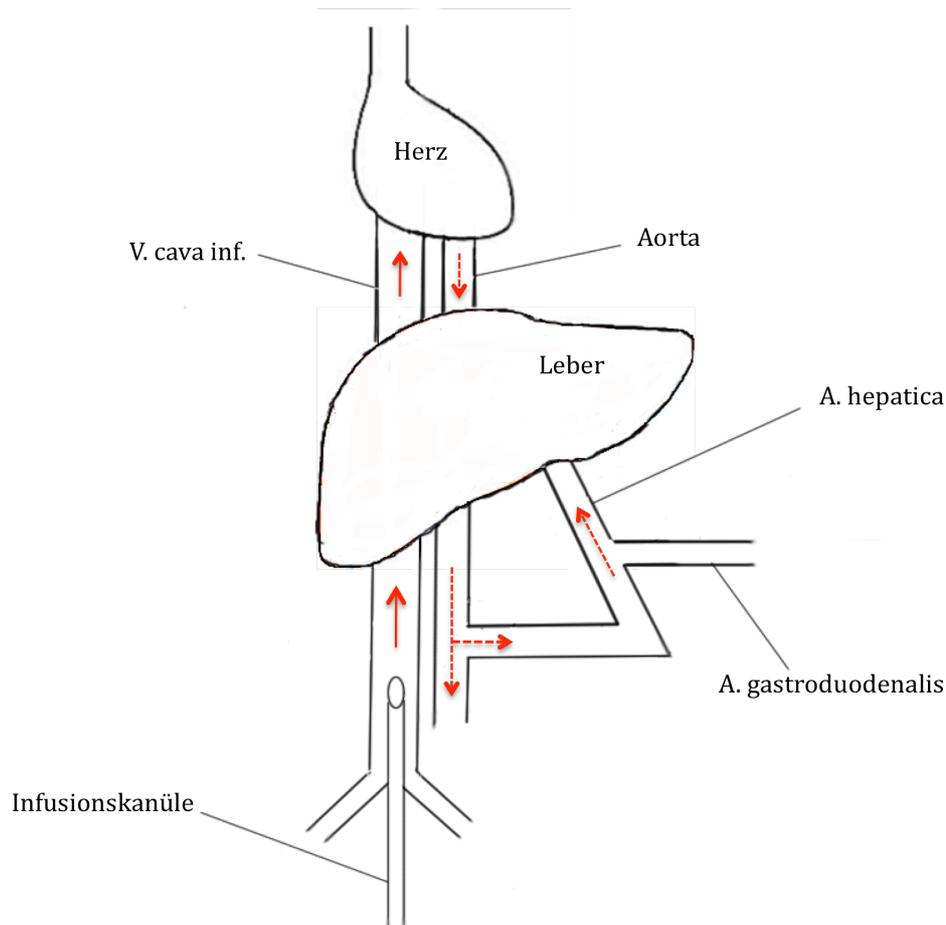
erfolgte mit 0,9% Kochsalzlösung (Ecotainer®, Braun, Melsungen, BRD). Ein am Katheter befindlicher Dreiwegehahn (Discofix® Secura FT, Braun, Melsungen, BRD) verhinderte das Eintreten von Luft in das Infusionssystem. Mit dem zweiten vorgelegten Seidenfaden wurde das Gefäß nach abgeschlossener Infusion ligiert und der Katheter entfernt. Es folgte die Rückverlagerung der Darmschlingen und die Adaptation der Wundränder durch eine fortlaufende allschichtige Naht (PDS 4-0, Ethicon®, Johnson & Johnson, Norderstedt, BRD).



**Abbildung 5:** Ablauf der hepato-arteriellen Infusion über die Arteria gastroduodenalis. Die Pfeile verdeutlichen den Applikationsweg der Medikamente.

### 5.5.4 Systemisch-venöse Infusion

Die systemische Chemotherapie erfolgte, wie in Abbildung 6 dargestellt, via Punktion der Vena cava inferior mit einer Butterflykanüle (0,65 × 20 mm 23G, Venofix®, Braun, Melsungen, BRD). Ein angeschlossener Dreiwegehahn (Discofix® Secura FT, Braun, Melsungen, BRD) ermöglichte den unkomplizierten Wechsel der wirkstofftragenden Einmalspritzen.



**Abbildung 6:** Ablauf der systemisch-venösen Wirkstoffapplikation über die Vena cava inferior. Die Pfeile verdeutlichen den Weg der infundierten Medikamente.

### 5.5.5 Versuchsabschluss und Probenentnahme

Zu Versuchsabschluss an Tag 13 erfolgte wiederum die Ermittlung des Körpergewichtes. Nach Rasur der Bauchregion und Einleitung einer Äthernarkose wurde die chirurgische Präparation, Blutentnahme und Tumolvolumenbestimmung analog zum Vorgehen an Versuchstag 10 durchgeführt. Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch Infusion eines Barbiturates (Pentobarbital) in die V. cava inferior. Für die spätere histologische Aufarbeitung wurde normales und tumortragendes Leberparenchym entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Dies erfolgte sowohl in nativer Form als auch in tissue-tek eingebettet (Tissue-Tek O.C.T Compound, Sakura, Torrance, Kalifornien, USA). Zur späteren Anfertigung von Paraffinschnitten wurde zusätzlich Leber- und Tumorgewebe entnommen und in Formalin gelagert.

## 5.6 Parameter

### 5.6.1 Hämatologische Untersuchung

Die Hämoglobin-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration des aus der Vena cava inferior entnommenen und in EDTA kühl gelagerten Vollblutes erfolgte im Anschluss an die Versuche mittels eines Coulter (Coulter Electronics Ltd, Ac\*T diff., Buckinghamshire, UK). Zudem wurde die Aktivität der  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Glutamat-Oxalacetat-Transferase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) als Indikator der hepatozellulären Schädigung spektrophotometrisch erfasst. Die Lactatdehydrogenaseaktivität (LDH) diente zur Bestimmung der allgemeinen Gewebeschädigung. Das restliche Blut wurde bei 4°C und 3000 U/min für 4 min zentrifugiert (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen), das Serum in Eppendorfröhrchen abpipettiert und bei -70°C tiefgefroren.

### 5.6.2 Histomorphologische Untersuchungen

Die Gewebeproben von Leber und Tumor wurden unmittelbar nach Entnahme in 4 % phosphatgepuffertem Formalin fixiert. Das Einbetten in Paraffin erfolgte 2-3 Tage später, um anschließend aus den Blöcken Gewebeschnitte anzufertigen. Die Untersuchungen wurden lichtmikroskopisch (Olympus BX60, Olympus Optical, Company Ltd., Japan) in festgelegten Vergrößerungen (20- und 40-fache Vergrößerung) durchgeführt. Eine am Mikroskop befindliche Kamera (Zeiss Axio Cam, Zeiss, Jena, BRD) ermöglichte die Echtzeit-Darstellung der histologischen Bilder auf einem Computermonitor mittels der AxioCam-Software.

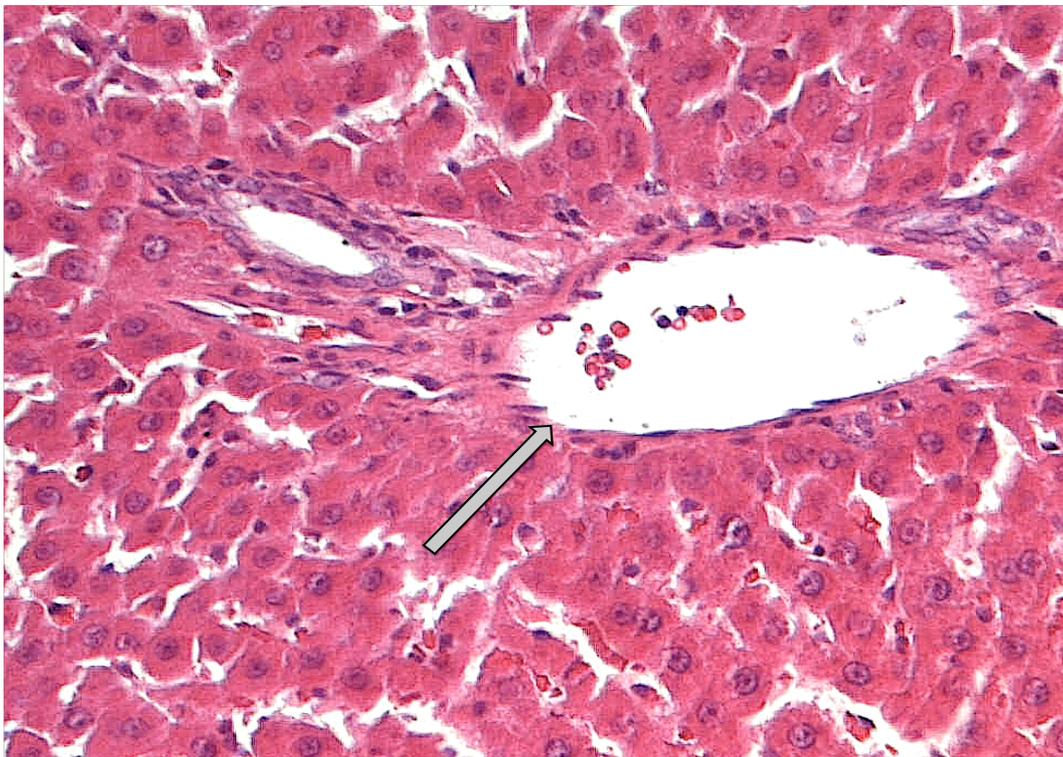
#### 5.6.2.1 Leberhistologie (HE)

Zur Analyse der Leberhistologie wurden aus den in Paraffin gebetteten Leberproben 5 $\mu$ m Schnitte angefertigt und diese mit Hematoxylin Eosin (HE) gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und nach Spülen mit destilliertem Wasser mit Hämatoxylin

gefärbt. Nach Differenzierung in Salzsäure-Alkohol und erneutem Spülen wurde mit Eosin gegengefärbt. Die HE-gefärbten Präparate dienen der semi-quantitativen Auswertung der Leberhistologie. Dazu wurden 25 nichtüberlappende High Power Fields (HPF) in 40facher Vergrößerung lichtmikroskopisch untersucht und die Parameter Grobscholligkeit des Zytoplasmas, Zellkerndeformation und Vakuolisierung für jedes Gesichtsfeld beurteilt (siehe Abbildung 7). Die Analyse der Daten erfolgte, semiquantitativ nach Calabrese, in vier verschiedenen Ausprägungsgraden [Calabrese et al., 1997].

- Grad 0 = nein (0% der Hepatozyten tragen das Merkmal)
- Grad 1 = leicht (< 30% der Hepatozyten tragen das Merkmal)
- Grad 2 = mäßig (40-70% der Hepatozyten tragen das Merkmal)
- Grad 3 = stark (>70% der Hepatozyten tragen das Merkmal)

Zusätzlich wurden pro Gewebeschnitt 25 Lebergefäße in 20facher Vergrößerung hinsichtlich Endothelablösungen, Fibrinablagerungen und Erythrozytenwandständigkeit analysiert. Die Auswertung erfolgte in Absolutwerten, was einen direkten Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen ermöglichte.

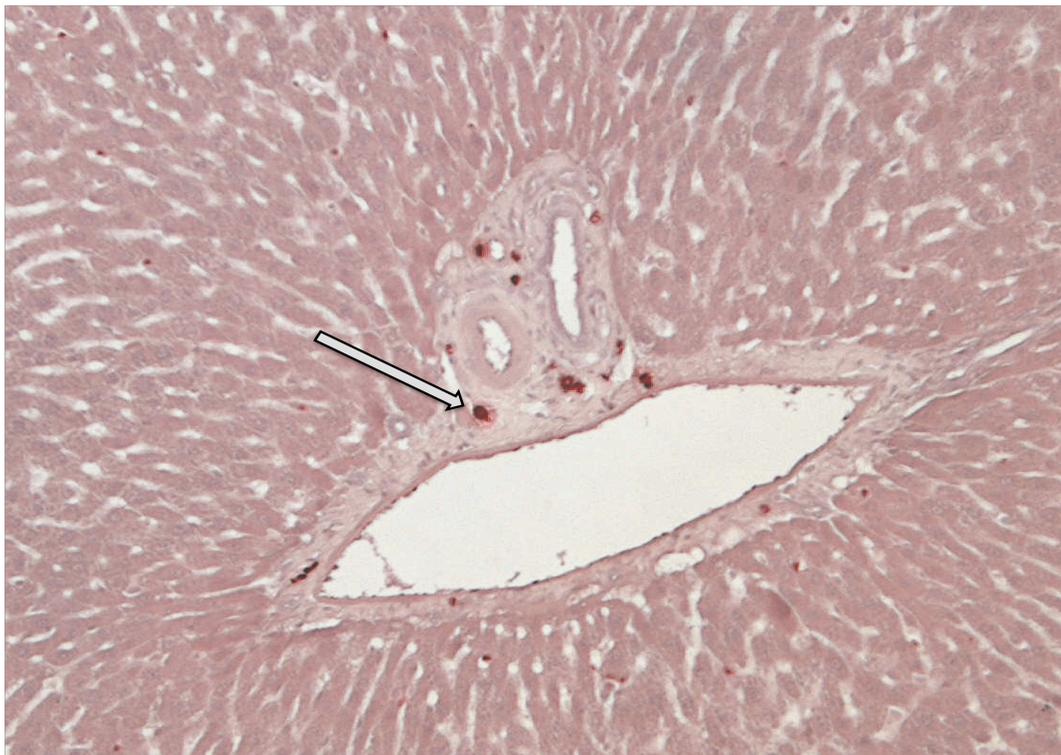


**Abbildung 7:** Die Abbildung zeigt einen HE-gefärbten Gewebeschnitt der gesunden Leber in 40facher Vergrößerung. An dem Versuchstier wurde eine hepato-arterielle Infusion mit Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin durchgeführt. Der Pfeil deutet auf eine morphologisch unauffällige terminal, portale Venule..

### 5.6.2.2 AS-D Chloracetatesterase (CAE)

Für die CAE-Färbung wurde Pararosanilin (4%) und Natrium-Nitrit (4%) zu gleichen Anteilen gemischt und zu Na-Acetat-Veronalpuffer gegeben. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 6,3 und Filtration der Lösung wurde ein Naphtol/Dimethylformamidgemisch hinzugegeben und die entparaffinierten Gewebeschnitte für 30 Minuten in der Lösung inkubiert. Nach Wässern und Kernanfärbung mit Hämatoxilin erfolgte die Differenzierung in Salzsäure-Alkohol.

Mit Hilfe der CAE-gefärbten Präparate konnten Leukozyten, als Indikator einer lokalen Inflammation, dargestellt und quantifiziert werden (Abb.8). Insgesamt wurden pro Gewebeschnitt jeweils 10 Sinusoide, Portalfelder und Venolen in 40facher Vergrößerung analysiert und ausgewertet. Zusätzlich erfolgte bei Betrachtung der Portalfelder und Venolen eine Differenzierung in intra- und extravasal befindliche Leukozyten. Die Ergebnisse wurden in Absolutwerten dokumentiert.



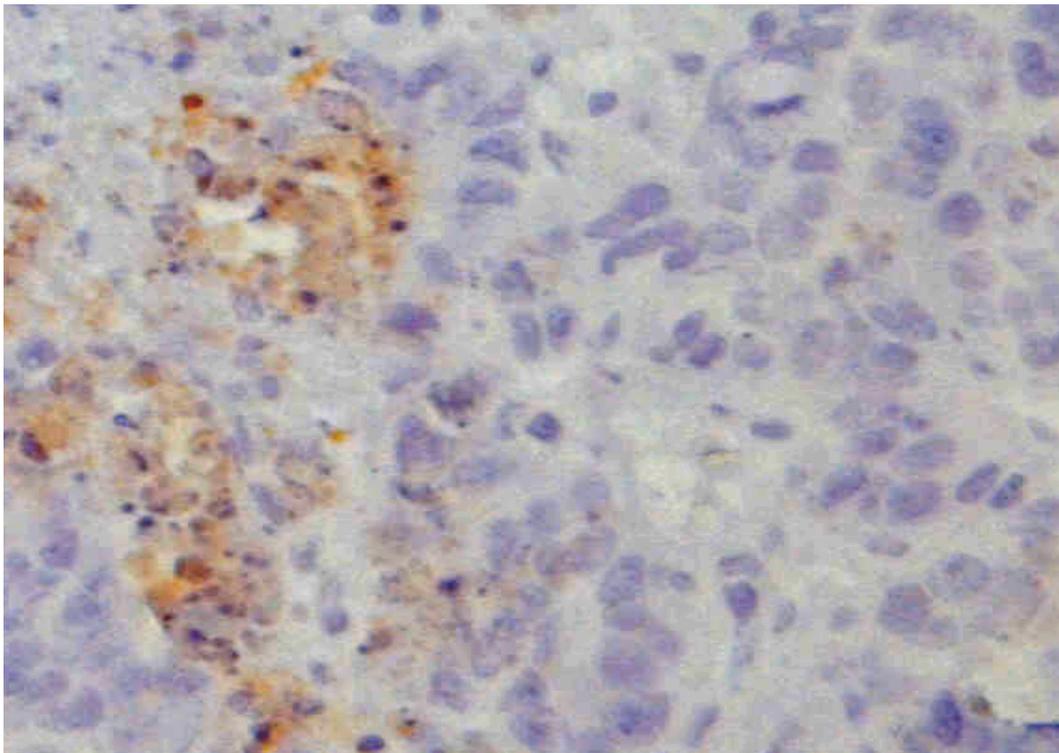
**Abbildung 8:** Es handelt sich um einen CAE-gefärbten Gewebeschnitt der Leber in 20facher Vergrößerung. Dem Tier wurden die Antikörper Cetuximab und Bevacizumab hepato-arteriell infundiert. Es zeigt sich eine normale Histomorphologie im Bereich eines Portalfeldes. Der Pfeil deutet auf einen rot angefärbten periportal infiltrierten Leukozyten.

### 5.6.3 Immunhistochemie

#### 5.6.3.1 Caspase-3

Caspase-3 dient als molekularer Marker für Apoptose. Sowohl in Leber- als auch in Tumorgewebe wurde die Aktivität von Caspase-3 untersucht. Hierzu erfolgte die Inkubation der 5µm Gewebeschnitte mit PBS (1ml) und polyklonalen Kaninchenantikörpern gegen Caspase-3 (rabbit anti cleaved caspase-3 antibody, 20µl, Verdünnung 1:50, Cell Signaling Technology, Frankfurt, BRD), daran anschließend die etwa einstündige Inkubation mit „anti-rabbit“-Immunglobulinen als Sekundärantikörper in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur. Als Chromogen wurde 3,3'-Diaminobenzidin verwendet. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hemalaun (Abb.9).

Ermittelt wurde die Anzahl Caspase-3-positiver Zellen in 25 nicht überlappenden HPF in 40facher Vergrößerung.

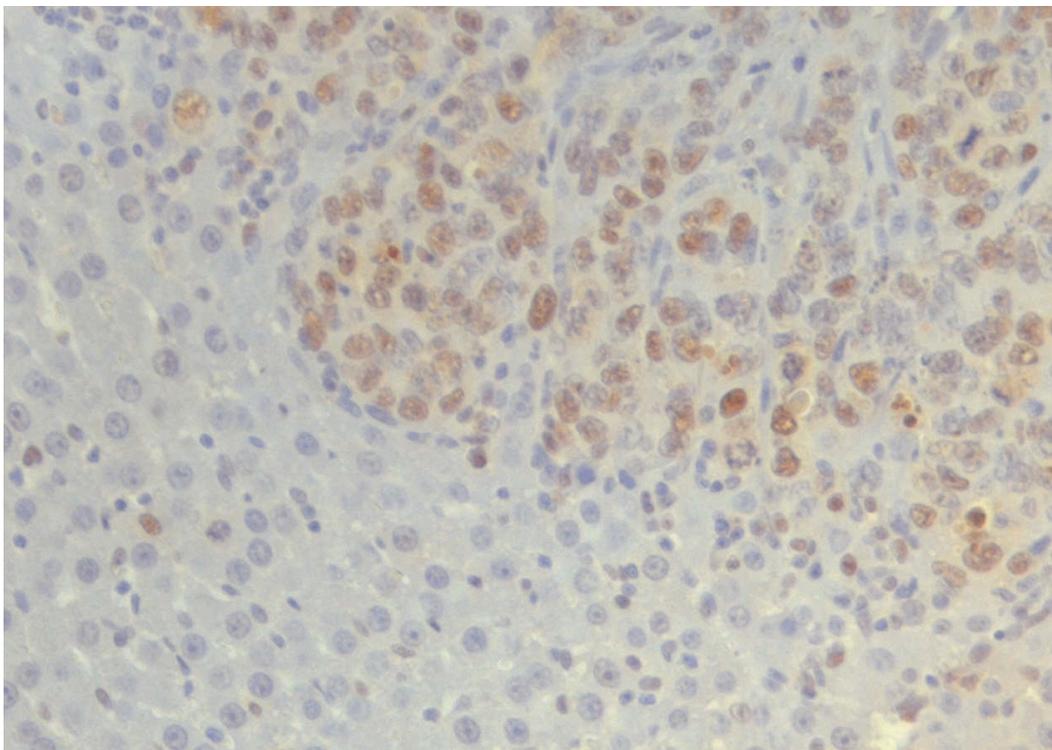


**Abbildung 9:** Die Abbildung zeigt den Übergang von tumorös verändertem Gewebe zu normalem Leberparenchym in 40facher Vergrößerung. Das Versuchstier erhielt eine hepato-arterielle Infusion mit Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin. In Apoptose befindliche Caspase-3-positive Zellen kommen braun zur Darstellung. Normales Leberparenchym ist blau.

### 5.6.3.2 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Mit dem immunhistochemischen Nachweis des Proliferating-Cell-Nuclear Antigen können Aussagen über das Proliferationsverhalten in einem Gewebe gemacht werden. Die 5µm Schnitte von Tumor und Lebergewebe wurden dazu über Nacht zusammen mit dem Primärantikörper (mouse anti PCNA, 20µl, Verdünnung 1:50, Cell Signaling Technology) inkubiert. Daran anschließend erfolgte die Inkubation mit einem anti-mouse-Immunglobulin (Link, LSAB-HRP, Dako-Cytomotion) in einer Feuchtkammer bei Zimmertemperatur. Die braun angefärbten PCNA-positiven Hepatozyten waren so deutlich abzugrenzen (Abb.10). Pro Gewebeschnitt wurden 25 HPF in 40facher Vergrößerung betrachtet und die Ausprägung der Proliferation in Stufen von 0-4 eingeordnet.

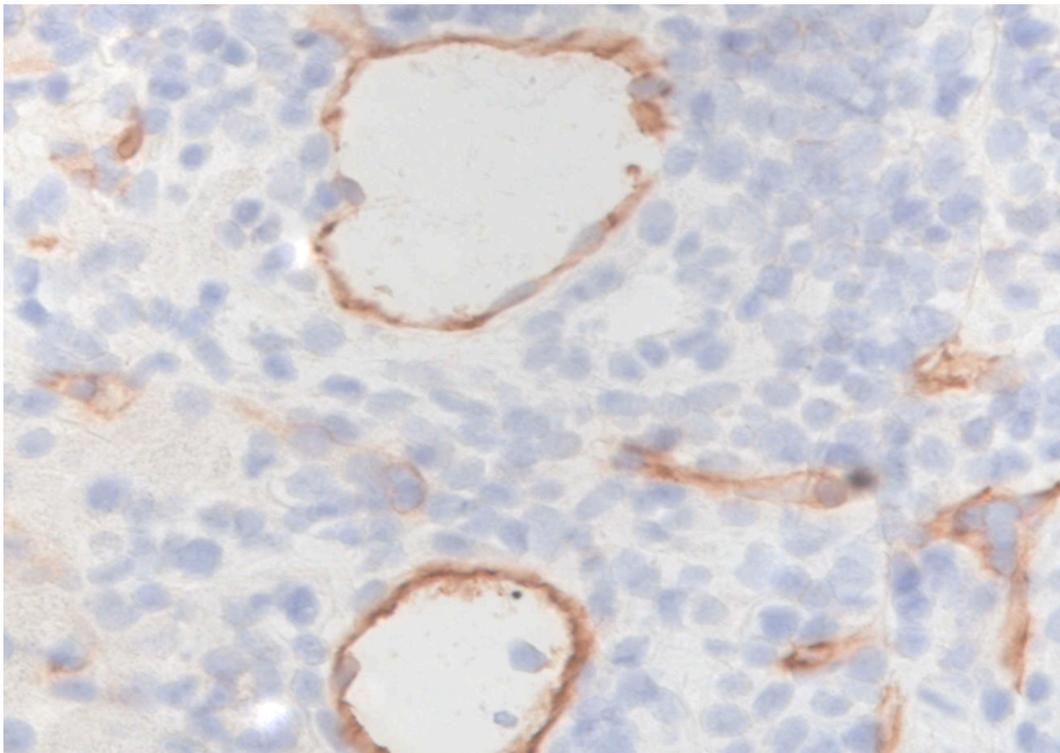
- Stufe 0 = 0-1% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf
- Stufe 1 = 1-10% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf
- Stufe 2 = 10-30% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf
- Stufe 3 = 30-50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf
- Stufe 4 = > 50% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf



**Abbildung 10:** Immunhistochemische Darstellung des Proliferationsmarkers PCNA in 20facher Vergrößerung. Die Abbildung zeigt den Übergang zwischen Leber- und Tumorgewebe bei einem Tier, das eine systemische Infusion von Cetuximab und Bevacizumab erhielt. PCNA-positive Zellen stellen sich braun dar. Das übrige Leberparenchym zeigt sich hellblau.

### 5.6.3.3 Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1; CD-31)

Die immunhistochemische Färbung von PECAM-1 ermöglicht die selektive Darstellung von Endothelzellen und kann somit als Marker für die Neoangiogenese quantitativ erfasst werden (Abb.11). Die immunhistochemischen Schnitte wurden primär mit einem mouse-anti-rat CD31 Antikörper inkubiert (Verdünnung 1:500). Sekundär wurde ein goat-anti-mouse Antikörper (Verdünnung 1:100) verwendet. PECAM-1-positive Blutgefäße wurden in 25 HPF ausgezählt und in Absolutwerten angegeben.



*Abbildung 11: Immunhistochemische Anfärbung des Endothelmarkers PECAM-1. Neugebildete PECAM-1-positive Gefäße kommen braun zur Darstellung. Die Aufnahme zeigt einen Ausschnitt (40fache Vergrößerung) aus dem Tumorgewebe eines Tieres, welches eine systemische Infusion mit Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan erhielt.*

## 5.7 Experimentelles Protokoll

Insgesamt wurden die Versuche an 48 Versuchstieren durchgeführt. Zwei Versuchsgruppen mit jeweils 6 Tieren dienten als Kontrollgruppen. Ihnen wurde physiologische Kochsalzlösung entweder systemisch oder hepato-arteriell verabreicht.

Die übrigen 36 Tiere wurden in insgesamt 6 Gruppen zu je 6 Tieren randomisiert. Die erste Gruppe erhielt eine Kombination aus Cetuximab (125mg/kg KG) und Bevacizumab

(5mg/kg KG) systemisch. Der zweiten Gruppe wurde die identische Kombination hepato-arteriell infundiert. Neben den monoklonalen Antikörpern Cetuximab (400mg/kg KG) und Bevacizumab (5mg/kg KG) wurde in der dritten Versuchsgruppe das Zytostatikum Irinotecan (90mg/kg KG) ergänzt und systemisch appliziert. Die vierte Versuchsgruppe erhielt die Kombination wiederum mittels hepato-arterieller Infusion. In der fünften und sechsten Versuchsgruppe wurde die Kombination von Cetuximab (400mg/kg KG) und Bevacizumab (5mg/kg KG) durch Oxaliplatin (85mg/kg KG) ergänzt. In Gruppe 5 erfolgte die systemische, in Gruppe 6 die hepato-arterielle Infusion.

## 5.8 Statistische Analyse

Die ermittelten Daten wurden zunächst in vorgefertigten Tabellen notiert und anschließend in Excel-Tabellen übertragen (Microsoft Excel 2000, Microsoft Cooperation, USA). Anhand von Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM, standard error of the mean) konnte eine vergleichende Analyse der Daten vorgenommen werden. Nach Feststellung von Varianzhomogenität und Normalverteilung der jeweiligen Datensätze wurde eine Varianzanalyse mittels ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt. Darauf folgte ein geeigneter post-hoc-Test, welcher die Korrektur des alpha-Fehlers gemäß Bonferroni beinhaltet, um Mehrfachvergleiche zu kompensieren. Der Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte mittels ANOVA (multiple groups comparison). Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  als signifikant betrachtet. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurden die Programme SigmaStat und SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Systemische und hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin

#### 6.1.1 Allgemeinzustand

Die Tumorimplantation erfolgte unter Äthernarkose durch subkapsuläre Injektion der CC531-Tumorzellen in den linken Leberlappen und konnte an allen Tieren komplikationslos durchgeführt werden. In der anschließenden 10-tägigen Tumorwachstumsphase zeigten die Tiere keine tumorbedingten systemischen Beeinträchtigungen. Die Wundheilung erfolgte per primam. Die anschließende Wirkstoffapplikation mittels systemischer bzw. hepato-arterieller Infusion konnte ohne technische Komplikationen durchgeführt werden.

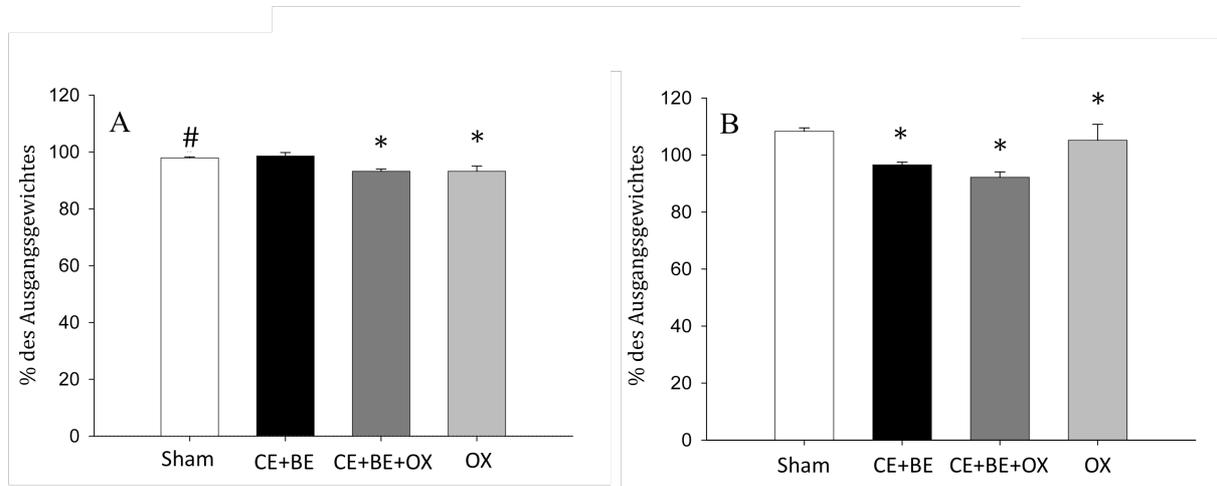
#### 6.1.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht wurde an Tag 0, 10 und 13 bestimmt. Wie in Abbildung 12 dargestellt, trat nach hepato-arterieller Infusion der beiden oxaliplatinhaltigen Therapiekombinationen gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme des Körpergewichtes auf, wohingegen die alleinige Gabe von Cetuximab und Bevacizumab keinen Unterschied zur Kontrollgruppe zeigte.

Im Rahmen der systemischen Applikation kam es verglichen mit der Kontrollgruppe in allen Therapiegruppen zu einer statistisch signifikanten Reduktion des Körpergewichtes (siehe Abbildung 12).

Bei Vergleich der beiden Applikationsformen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollgruppen. So reduzierte sich das Körpergewicht tendenziell nach hepato-arterieller Infusion, während es nach systemischer Gabe leicht zunahm. Hierfür ist am ehesten das intensivere operative Trauma bei der hepato-arteriellen Infusion verantwortlich (siehe Abbildung 12).

Insgesamt kann das Ausmaß der beschriebenen Gewichtsschwankungen als moderat eingestuft werden, sodass wesentliche wirkstoff- bzw. infusionsbedingte Beeinträchtigungen des Körpergewichts ausblieben.



**Abbildung 12 A, B:** Änderung des Körpergewichtes nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Die Angaben sind in Prozent wiedergegeben und beziehen sich auf das Ausgangsgewicht vor therapeutischer Intervention. Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS

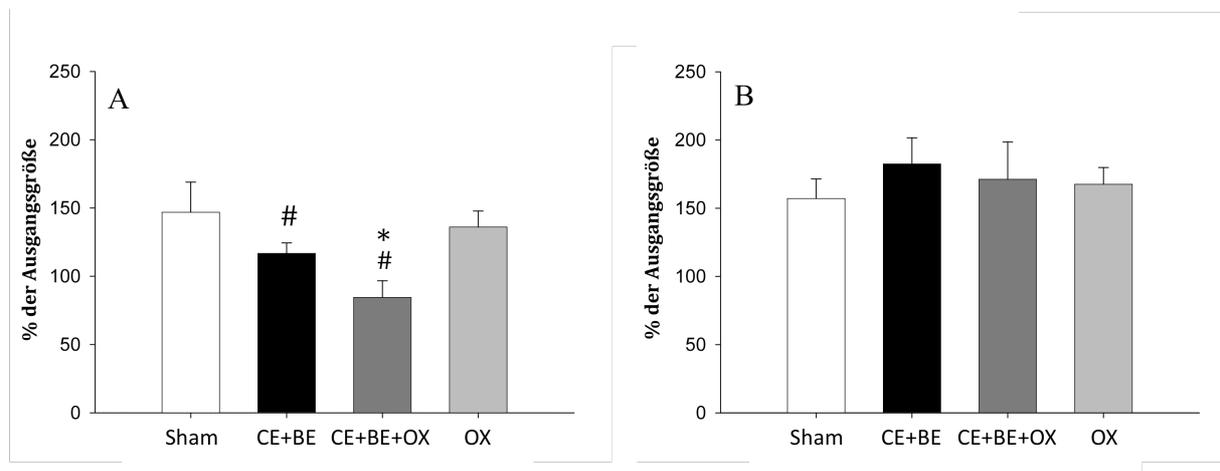
### 6.1.3 Tumorwachstum

Durch sonographische Bestimmung des Tumolvolumens unmittelbar vor und 3 Tage nach Applikation der Medikamente konnte die Entwicklung der Tumorgöße erfasst werden. Sie ist in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

Die hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin führte gegenüber der Kontrollgruppe zu einem signifikant reduzierten Metastasenwachstum. Die systemische Gabe dieser Wirkstoffkombination zeigte hingegen keinen Effekt und konnte eine Größenprogression nicht verhindern (siehe Abbildung 13).

Auch die hepato-arterielle Infusion der Antikörper ohne Oxaliplatin führte zu einem reduzierten Wachstum der Metastasen, jedoch nicht in signifikantem Ausmaß. Auch hier war die systemische Applikation der Wirkstoffe der lokalen Therapie unterlegen, sodass eine Inhibition des Tumorwachstums ausblieb (siehe Abbildung 13).

Interessanterweise zeigte sich bei alleiniger Gabe von Oxaliplatin kein therapeutischer Effekt auf das Tumorwachstum unabhängig davon, ob es hepato-arteriell oder systemisch appliziert wurde.



**Abbildung 13 A, B:** Prozentuale Änderung des Tumolvolumens von Tag 10 auf Tag 13 nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B) von NaCl (Sham), Cetuximab und Bevacizumab (CE+BE), Cetuximab und Bevacizumab in Kombination mit Oxaliplatin (CE+BE+OX) sowie Oxaliplatin alleine (OX). Es zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung nach hepato-arterieller Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin gegenüber der Sham-Kontrollgruppe, sowie gegenüber der systemischen Applikation. Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

## 6.1.4 Histologie

### 6.1.4.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)

#### 6.1.4.1.1 Zellmorphologie

In Abbildung 14 und 15 ist die quantitative Auswertung der hepatozellulären Schädigungsmerkmale Grobscholligkeit und Vakuolisierung graphisch dargestellt.

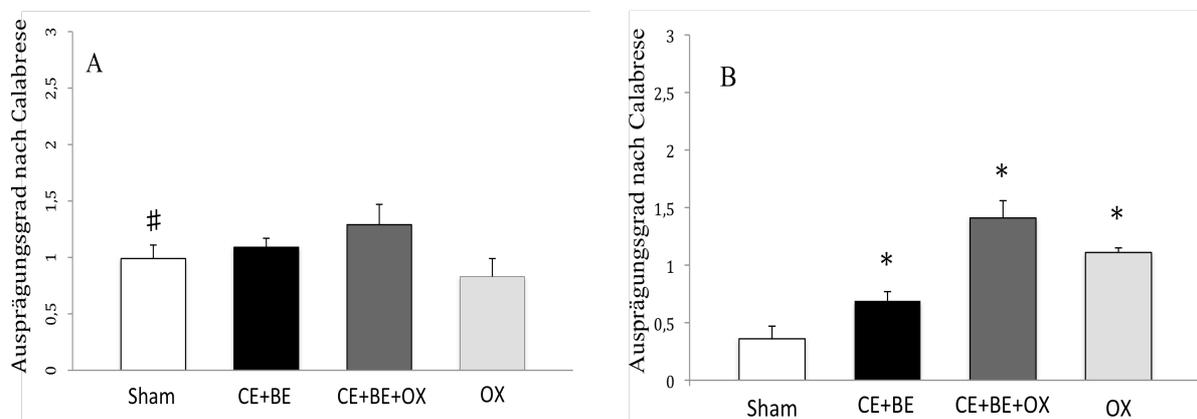
Die Analyse der hepatozellulären Grobscholligkeit ergab nach hepato-arterieller Infusion keine wesentlichen Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen (siehe Abbildung 14 A).

Der Grad der Vakuolisierung stieg hingegen nach hepato-arterieller Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe in allen Wirkstoffgruppen signifikant an (siehe Abbildung 15 A).

Die systemische Applikation der NaCl-Lösung hatte keinen wesentlichen Effekt auf die Morphologie der Leberzellen. Alle wirkstoffbasierten Gruppen wiesen nach systemischer Infusion einen signifikanten Anstieg sowohl der zytoplasmatischen Grobscholligkeit als auch der Vakuolisierung auf, was eine wirkstoffbedingte Schädigung nahelegt (siehe Abbildung 15 B).

Bei Vergleich der hepato-arteriellen mit der systemischen Infusion ergaben sich sowohl für die Kontrollgruppen als auch für die duale Antikörpertherapie signifikante Unterschiede. So nahm der Grad der Vakuolisierung und Grobscholligkeit nach lokaler Applikation im Vergleich zur systemischen Infusion in signifikantem Ausmaß zu.

Trotz dieser Unterschiede waren beide Merkmale in allen Therapiegruppen allenfalls mäßig ausgeprägt, sodass für erhebliche wirkstoff- oder infusionsbedingte parenchymatöse Schädigungen kein Anhalt besteht.



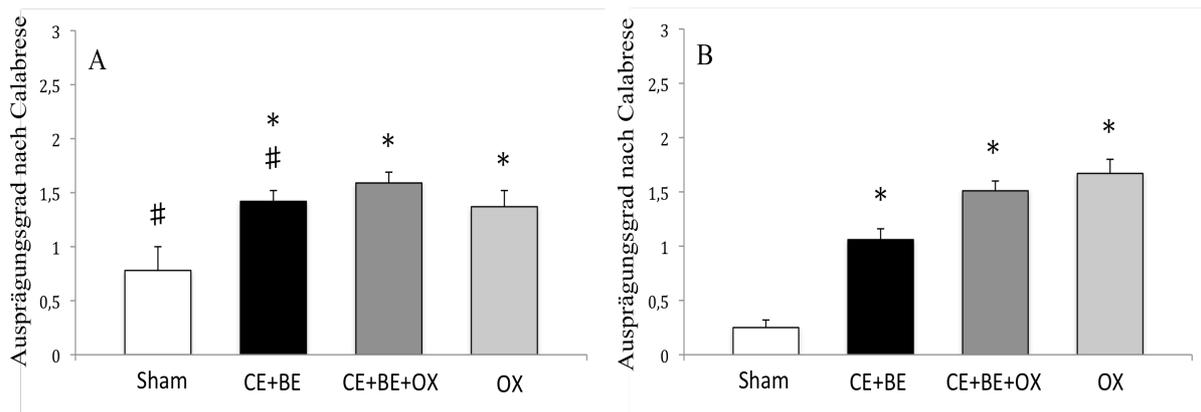
**Abbildung 14 A, B:** Abbildung 14 zeigt die Ausprägung der hepato-zellulären Grobscholligkeit nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Aus jedem histologischen Schnitt wurden 25 nichtüberlappende high power fields analysiert. Die semiquantitative Einordnung erfolgte nach Calabrese et al. in vier verschiedene Ausprägungsgrade: Grad 0 = nein (0% der Hepatozyten tragen das Merkmal)

Grad 1 = leicht (< 30% der Hepatozyten tragen das Merkmal)

Grad 2 = mäßig (30-70% der Hepatozyten tragen das Merkmal)

Grad 3 = stark (>70% der Hepatozyten tragen das Merkmal)

Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS



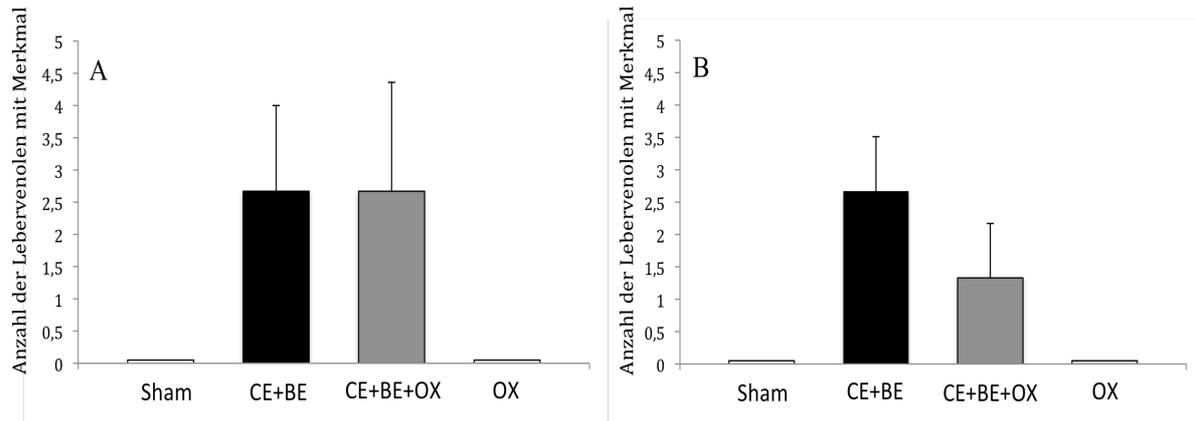
**Abbildung 15 A, B:** Abbildung 15 zeigt die Ausprägung der hepatozellulären Vakuolisierung nach hepatoarterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Auch hier erfolgte die semiquantitative Einordnung nach Calabrese et al., Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS

#### 6.1.4.1.2 Morphologie der Lebervenen

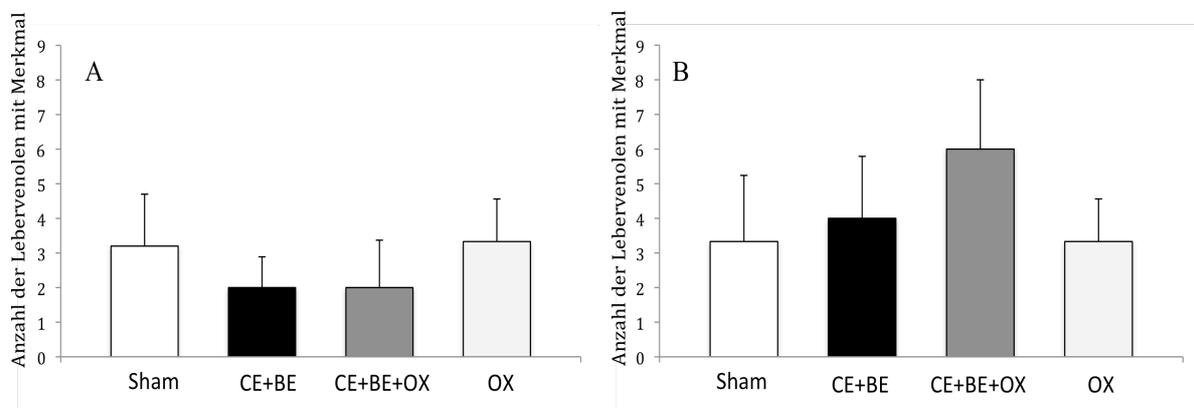
Endothelläsionen ließen sich unabhängig vom Infusionsweg insgesamt nur sehr vereinzelt nachweisen. Insgesamt wurden pro Gewebeschnitt 25 unterschiedliche Lebervenen in 20facher Vergrößerung dargestellt und die Endothelläsionen ausgezählt (siehe Abbildung 16).

Das Auftreten von Fibrinthromben war in den Wirkstoffgruppen nicht signifikant vermehrt als in der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 17).

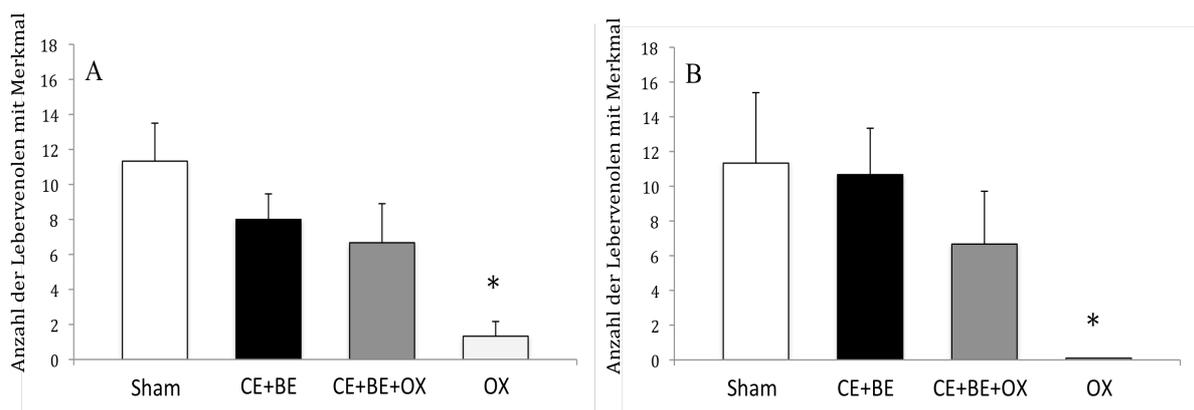
Auffällig war eine relativ hohe Inzidenz von endothelständigen Erythrozyten innerhalb der Kontrollgruppen und den antikörperhaltigen Therapieregimen, die unabhängig vom Infusionsweg auftrat. Die Oxaliplatinmonotherapie führte hingegen zu einer signifikant verringerten Anzahl wandständiger Erythrozyten (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 16 A, B:** Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl von Endothelläsionen innerhalb der Lebervenen nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Mittelwert  $\pm$  SEM



**Abbildung 17 A, B:** Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl der Fibrinthromben innerhalb der Lebervenen nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Mittelwert  $\pm$  SEM



**Abbildung 18 A, B:** Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl der Erythrozytenwandständigkeit innerhalb der Lebervenen nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Auffällig ist die niedrige Inzidenz unter Oxaliplatinmonotherapie. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham

## 6.1.4.2 AS-D Chloracetatesterase (CAE)

Die antikörperhaltigen Wirkstoffgruppen zeigten sowohl nach hepato-arterieller wie auch nach systemischer Applikation gegenüber der NaCl-Behandlung einen signifikanten Anstieg der Leukozytenzahl (siehe Tabelle 1). Eine bevorzugte Lokalisation ließ sich nicht ausmachen.

Infusionsbedingte Unterschiede ergaben sich für die Kombination von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin. So wurden sinusoidal- und extravasal-portalfeldassoziierte Leukozyten nach lokaler Applikation der drei Wirkstoffe signifikant häufiger beobachtet (siehe Tabelle 1).

Sham	HAI	SYS	Cetuximab+Bevacizumab	HAI	SYS
Sinusoide	1,18(±0,58)	0,80(±0,28)	Sinusoide	1,42(±0,21)	1,32(±0,20)*
Portalfeld intravasal	0,18(±0,02)	0,18(±0,08)	Portalfeld intravasal	0,15(±0,04)	0,15(±0,05)
Portalfeld extravasal	2,50(±0,55)	3,48(±0,87)	Portalfeld extravasal	2,92(±0,41)*	3,72(±0,38)*
Venole intravasal	0,04(±0,02)	0,08(±0,04)	Venole intravasal	0,10(±0,04)	0,067(±0,03)
Venole extravasal	1,22(±0,43)	0,77(±0,11)	Venole extravasal	1,53(±0,27)	1,05(±0,10)

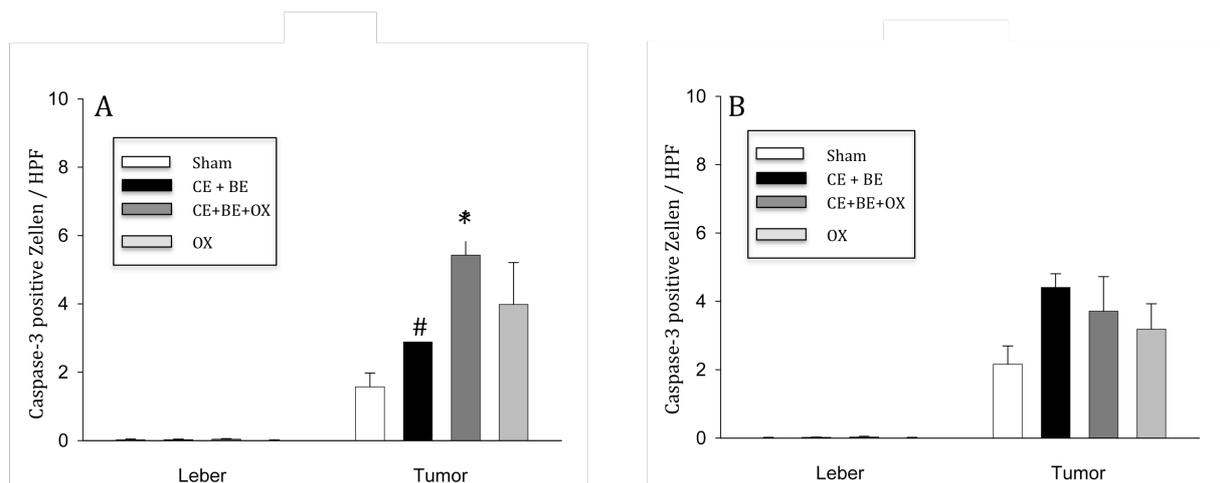
Cetuximab+ Bevacizumab+ Oxaliplatin	HAI	SYS	Oxaliplatin	HAI	SYS
Sinusoide	1,80(±0,36)*#	0,78(±0,21)	Sinusoide	0,83(±0,20)	0,87(±0,11)
Portalfeld intravasal	0,12(±0,06)	0,15(±0,08)	Portalfeld intravasal	0,15(±0,08)	0,13(±0,07)
Portalfeld extravasal	2,20(±0,53)	1,65(±0,30)	Portalfeld extravasal	1,98(±0,60)	1,40(±0,15)
Venole intravasal	0,22(±0,09)*	0,05(±0,02)	Venole intravasal	0,17(±0,06)#	0,02(±0,02)
Venole extravasal	1,57(±0,25)*	1,08(±0,31)*	Venole extravasal	0,75(±0,17)	0,85(±0,15)

**Tabelle 1:** Ausmaß der Leukozyteninfiltration in selektiven Parenchymabschnitten. Angegeben ist die durchschnittliche Leukozytenanzahl innerhalb eines high power fields (n/HPF) sowie der Standardfehler des Mittelwertes. \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS

### 6.1.4.3 Apoptose, Caspase-3

Im normalen Leberparenchym zeigten sich nach Behandlung nur sehr vereinzelt Caspase-3-positive Zellen (siehe Abbildung 19). Im Tumorgewebe hingegen wiesen alle Behandlungsgruppen eine Apoptose-induzierende Wirkung auf. Statistische Signifikanz erreichte die Kombinationstherapie aus Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin, die im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer erheblichen Induktion des programmierten Zelltodes führte (siehe Abbildung 19).

Auch nach systemischer Applikation war eine tendenziell Apoptose-induzierende Wirkung im Tumor in allen Wirkstoffgruppen nachweisbar, die allerdings kein signifikantes Ausmaß erreichte (siehe Abbildung 19).



**Abbildung 19 A, B:** Gemittelte Anzahl der apoptotischen Zellen pro „high power field“ (HPF). Unter 40facher Vergrößerung wurde die Ausprägung im normalen Leberparenchym und im metastatischen Gewebe nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B) ermittelt. Es zeigte sich im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe ein deutlich Apoptose-induzierendes Potential der hepato-arteriell verabreichten Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

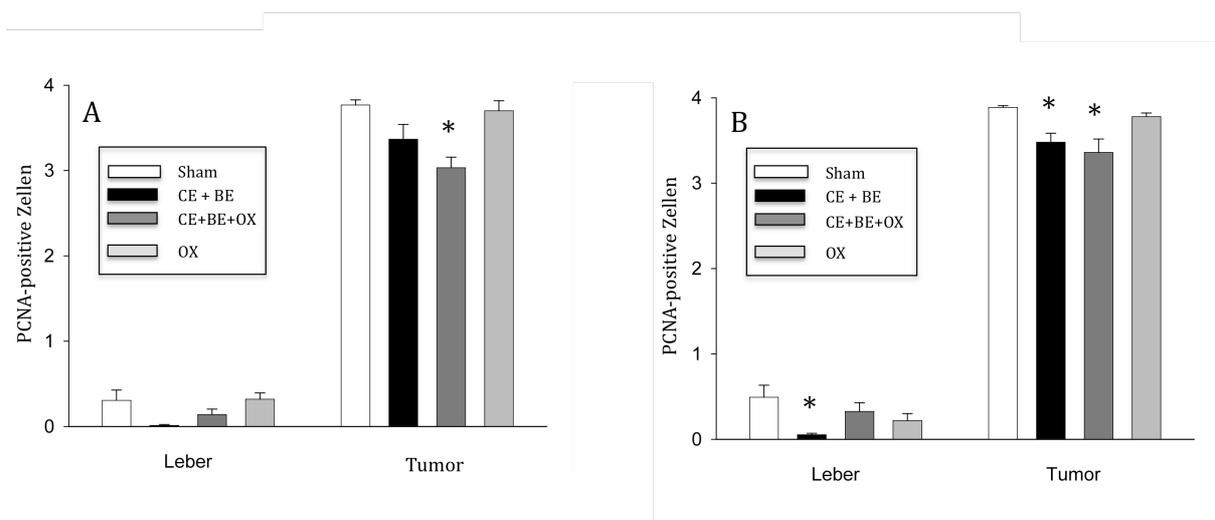
#### 6.1.4.4 Proliferation, PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

Wie in Abbildung 20 dargestellt, war die Proliferationsaktivität im Tumorgewebe weitaus höher als im normalen Leberparenchym.

Die hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin führte als einziges Wirkstoffregime zu einer signifikant reduzierten Tumorzellproliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 20 A).

Im Rahmen der systemischen Wirkstoffapplikation konnten die beiden antikörperhaltigen Therapieregime die Proliferationsraten der Tumorzellen signifikant reduzieren. Die Oxaliplatinmonotherapie blieb unabhängig vom Infusionsweg ohne wesentliche Auswirkungen auf die Tumorzellproliferation (Abbildung 20 B).

Signifikante Unterschiede zwischen beiden Infusionsmodellen waren nicht zu erkennen.

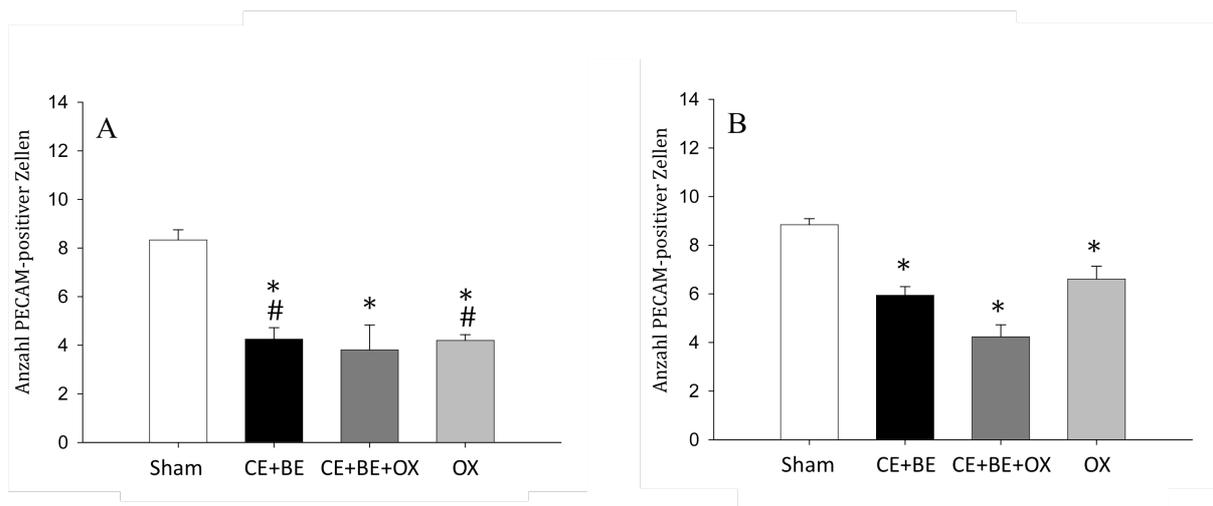


**Abbildung 20 A, B:** Semi-quantitative Analyse der PCNA-positiven Zellen in Leber- und Tumorgewebe nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Insgesamt kamen in jedem Gewebeschnitt 25 verschiedene „high power fields“ unter 40facher Vergrößerung zur Auswertung. Die Einordnung der Daten erfolgte mittels eines Scoresystems (PCNA-positive Zellen in Prozent: Grad 0 = <1%, Grad 1 = 1-10%, Grad 2 = 10-30%, Grad 3 = 30-50%, Grad 4 > 50%). Die intensivste Proliferationshemmung der Tumorzellen ergab sich nach hepato-arterieller Applikation von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham

## 6.1.4.5 Angiogenese, PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule)

Die immunhistochemische Anfärbung des endothelialen Markers CD-31 ermöglichte die Darstellung neugebildeter Tumorgefäße. Wie in Abbildung 21 A deutlich wird, wiesen alle Wirkstoffregime nach hepato-arterieller Infusion signifikant anti-angiogenes Potential auf. Am ausgeprägtesten war dieser Effekt nach Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin. Auch die systemische Applikation dieser Kombination ging mit der größten anti-angiogenen Wirksamkeit einher (siehe Abbildung 21 B).

Die vergleichende Analyse der Angiogenese in Abhängigkeit vom Infusionsmodell ergab ebenfalls signifikante Unterschiede. Während die duale Antikörpertherapie wie auch die Oxaliplatinmonotherapie nach hepato-arterieller Infusion zu einer signifikant stärkeren Angiogenesehemmung führten als nach systemischer Applikation, blieb dieser Effekt für die kombinierte Anwendung der drei Wirkstoffe aus (siehe Abbildung 21).



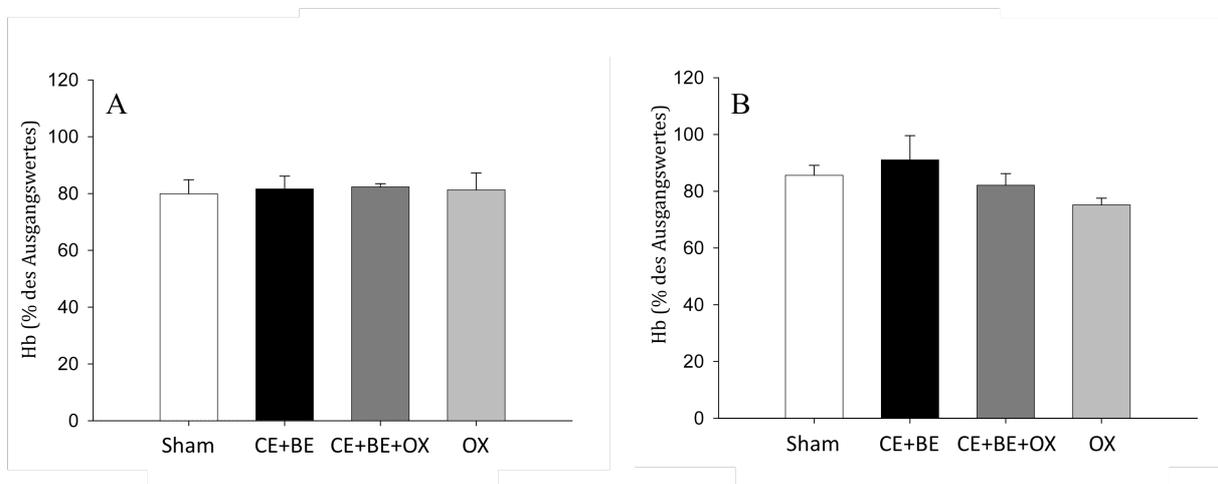
**Abbildung 21 A, B:** Tumorangiogenese nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Jeder Gewebeschnitt wurde in 40facher Vergrößerung analysiert und die Zahl der Tumorgefäße ermittelt. Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

## 6.1.5 Laborchemische Parameter

### 6.1.5.1 Blutbild

#### 6.1.5.1.1 Hämoglobinkonzentration

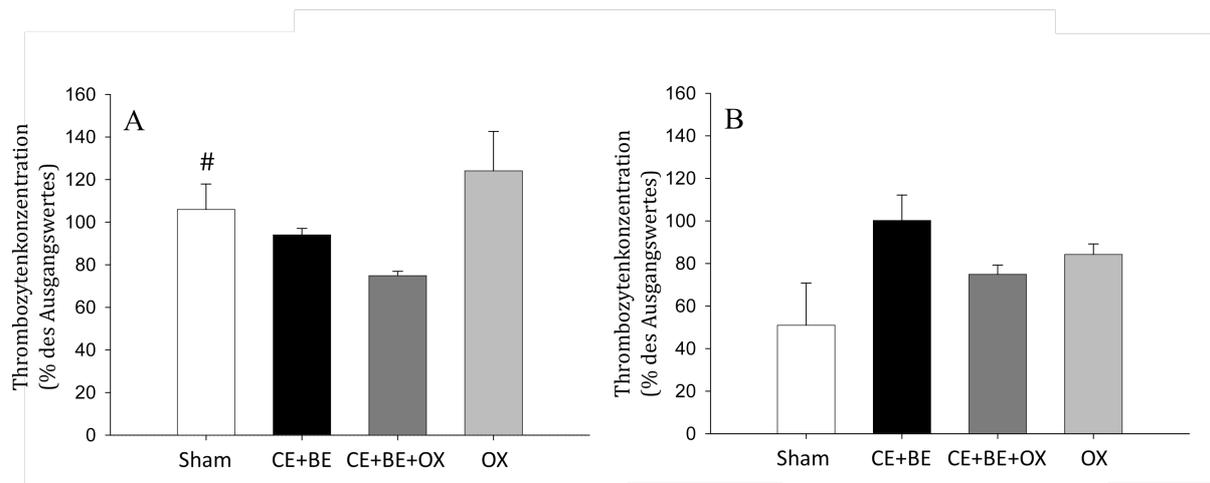
Es fand sich eine vergleichbare Abnahme des Hb-Wertes in allen Versuchsgruppen. Signifikante infusions- bzw. wirkstoffassoziierte Unterschiede waren nicht zu beobachten (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22 A, B:** Entwicklung der Hämoglobinkonzentration nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Der Ausgangswert (100%) wurde an Versuchstag 10 ermittelt. Es zeigt sich eine vergleichbare Abnahme der Hb-Konzentrationen in allen Versuchsgruppen ohne signifikante Unterschiede. Mittelwert  $\pm$  SEM

### 6.1.5.1.2 Thrombozytenkonzentration

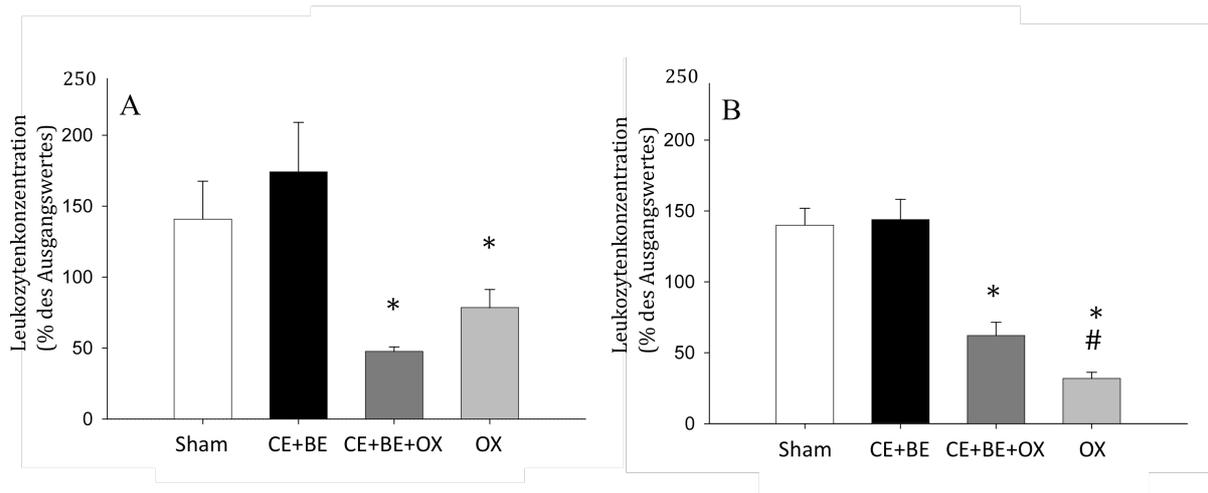
Wesentliche wirkstoff- bzw. infusionsbezogene Schwankungen der Thrombozytenkonzentration ergaben sich nicht. Lediglich eine im Vergleich zur hepato-arteriellen Infusion überproportionale Abnahme der Thrombozytenzahl nach systemischer Applikation der Kontrolllösung war statistisch signifikant (siehe Abbildung 23).



**Abbildung 23 A, B:** Entwicklung der Thrombozytenkonzentration nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Wirkstoffapplikation (SYS, B). Als Ausgangswert diente die an Tag 10 ermittelte Konzentration vor chirurgischer Intervention. Mittelwert  $\pm$  SEM, #  $p < 0,05$  vs. SYS

### 6.1.5.1.3 Leukozytenkonzentration

Nach Applikation der NaCl-basierten Kontrolllösung und der dualen Antikörpertherapie kam es zu einem Anstieg der peripheren Leukozytenkonzentration als Ausdruck einer systemisch inflammatorischen Reaktion. Dieser Anstieg trat unabhängig vom Infusionsmodell auf (siehe Abbildung 24). Regredient entwickelte sich hingegen die Leukozytenkonzentration nach Oxaliplatinmonotherapie und Infusion der Dreierkombination Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin. Dieser Effekt war ebenfalls unabhängig vom Infusionsweg nachweisbar.



**Abbildung 24 A, B:** Entwicklung der peripheren Leukozytenkonzentration nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Als Vergleichswert (100%) diente die Konzentration vor chirurgischer Intervention. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

### 6.1.5.2 Leberenzyme

In Tabelle 2 ist die prozentuale Änderung der mittleren Enzymkonzentrationen von Tag 10 zu Tag 13 wiedergegeben. 100% entspricht der an Tag 10 ermittelten Enzymkonzentration vor chirurgischer Intervention.

Unabhängig von der Art der Infusion fand sich in allen Therapiegruppen nach therapeutischer Intervention eine Abnahme der LDH-Konzentration. Am stärksten ausgeprägt war diese nach hepato-arterieller Infusion der Kontrolllösung (siehe Tabelle 1). Die Abnahme der LDH-Konzentration ist mit erhöhten Ausgangswerten zu erklären, die durch die Tumorimplantation zu Versuchsbeginn verursacht wurden. Die Normalisierung der LDH-Konzentration wurde durch die chirurgische Intervention nicht wesentlich beeinflusst.

Die Analyse der übrigen Leberenzymkonzentrationen ergab zum Teil deutliche Steigerungsraten, die als interventionsbedingt angesehen werden müssen. So stieg beispielsweise die  $\gamma$ -GT-Konzentration als sensitivster Parameter in allen Therapieregimen deutlich an. Auch wenn diese Steigerungsraten in den Wirkstoffgruppen tendenziell stärker ausgeprägt waren, konnten signifikante infusionsmodell- bzw. wirkstoffassoziierte Unterschiede nicht nachgewiesen werden. Lediglich die GLDH-Konzentration stieg nach hepato-arterieller gegenüber der systemischen Infusion in signifikantem Ausmaß (siehe Tabelle 1).

Sham	HAI	SYS	CE+BE	HAI	SYS
γGT	148,19 (±44,80)	193,75 (±68,21)	γGT	277,50 (±139,97)	233,33 (±61,46)
GLDH	166,00 (±55,33)	118,97 (±60,96)	GLDH	176,47 (±92,79)	74,80 (±9,36)
GOT	102,46 (±42,00)	120,45 (±39,88)	GOT	106,90 (±18,69)	93,51 (±14,06)
GPT	96,20 (±26,64)	140,31 (±22,11)	GPT	82,81 (±15,22)	68,74 (±4,46)
LDH	36,40 (±6,59) #	76,94 (±12,82)	LDH	95,98 (±14,86) *	96,10 (±16,30)

CE+BE+	HAI	SYS	OX	HAI	SYS
OX			OX		
γGT	346,67 (±113,33)	342,86 (±233,87)	γGT	277,68 (±136,68)	284,76 (±74,24)
GLDH	180,29 (±43,06) #	67,44 (±10,34)	GLDH	96,68 (±18,52)	45,69 (±11,55)
GOT	129,21 (±20,21)	165,65 (±30,32)	GOT	200,64 (±39,55)	284,06 (±115,96)
GPT	187,87 (±32,16)	112,66 (±18,15)	GPT	141,86 (±23,64)	109,46 (±29,01)
LDH	46,98 (±6,60)	56,61 (±7,39)	LDH	57,74 (±9,51)	60,79 (±14,06)

**Tabelle 2:** Prozentuale Änderung der Enzymkonzentrationen von Tag 10 auf Tag 13 nach hepato-arterieller (HAI) und systemischer Infusion (SYS) von NaCl (Sham), Cetuximab und Bevacizumab (CE+BE), Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin (CE+BE+OX) sowie Oxaliplatin alleine (OX). 100% entsprechen der Ausgangskonzentration an Tag 10. Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS

## 6.2 Systemische und hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan

### 6.2.1 Allgemeinzustand

Die Tumorimplantation erfolgte gemäß 5.3. in den linken Leberlappen und konnte an allen Tieren regelgerecht durchgeführt werden. Die anschließende 10-tägige Tumorstadiumsphase verlief unauffällig. Tumorbedingte Beeinträchtigungen waren nicht ersichtlich. Die Wundheilung erfolgte per primam. Die praktische Durchführung der hepato-arteriellen und systemischen Infusion war komplikationslos. Auch in der Nachbeobachtungsphase traten keine therapiebedingten Nebenwirkungen auf.

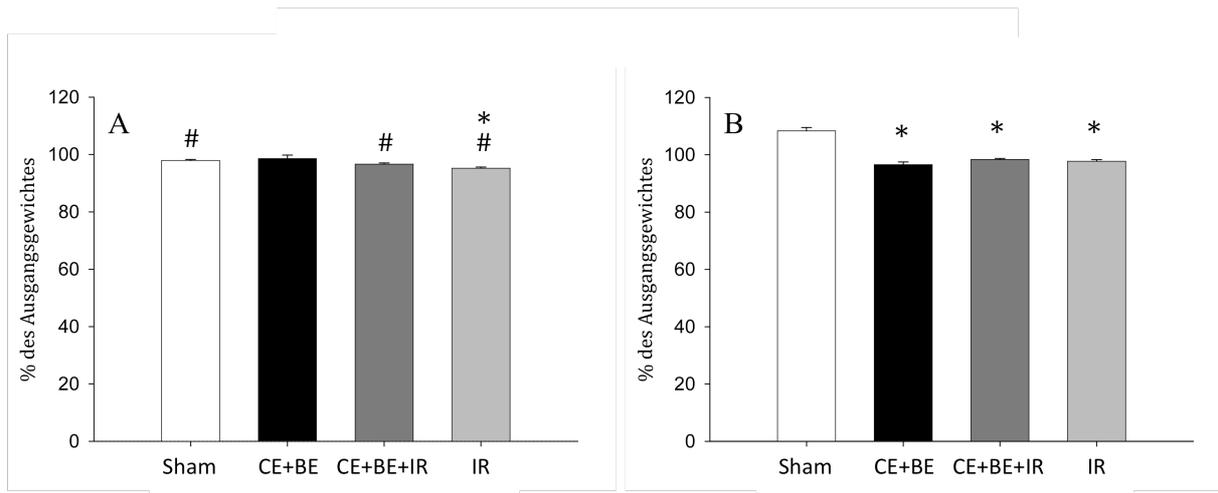
### 6.2.2 Körpergewicht

Die hepato-arterielle Infusion von Irinotecan ging im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einer signifikanten Abnahme des Körpergewichtes einher. Zudem war die Gewichtsreduktion signifikant stärker ausgeprägt als es nach systemischer Infusion der Fall war (siehe Abbildung 25).

Nach systemischer Infusion kam es in allen wirkstofftragenden Regimen zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Reduktion des Körpergewichtes (siehe Abbildung 25 B).

Auch die hepato-arterielle Infusion der irinotecanhaltigen Therapiegruppen war mit einer signifikanten Abnahme des Körpergewichtes assoziiert (siehe Abbildung 25 A).

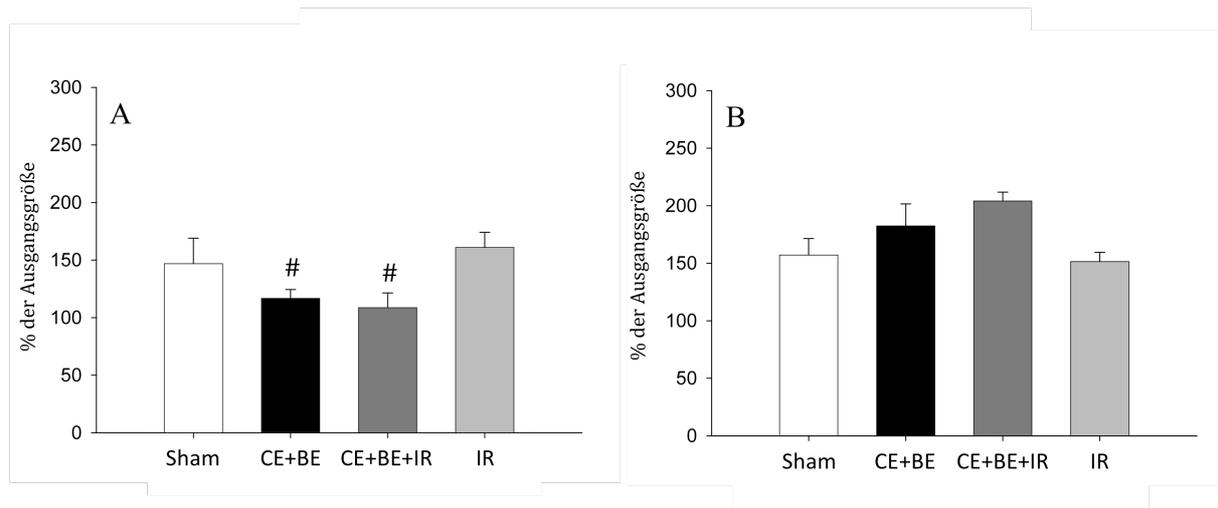
Insgesamt gesehen waren die therapiebedingten Schwankungen des Körpergewichtes allenfalls mäßig ausgeprägt.



**Abbildung 25 A, B:** Prozentuale Veränderung des Körpergewichtes der Versuchstiere nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Die Daten beziehen sich auf das Ausgangsgewicht vor Wirkstoffapplikation. Wesentliche wirkstoffassoziierte Unterschiede sind nicht zu erkennen. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

### 6.2.3 Tumorvolumen

Im Vergleich zur systemischen Applikation kam es nach hepato-arterieller Infusion in den antikörperhaltigen Therapiegruppen zu einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums (siehe Abbildung 26 A). In den Kontrollgruppen nahm das Tumorvolumen um etwa 50% zu. Die hepato-arterielle Irinotecanmonotherapie konnte das Tumorwachstum ebenfalls nicht inhibieren. Interessanterweise war das Tumorwachstum nach systemischer Applikation der monoklonalen Antikörper sowohl alleine als auch in Kombination mit Irinotecan noch deutlicher ausgeprägt (siehe Abbildung 26)



**Abbildung 26 A, B:** Prozentuale Änderung des Tumorzustands nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B) der Wirkstoffe. Das Ausgangsvolumen (100%) wurde an Versuchstag 10 vor therapeutischer Intervention ermittelt. Deutlich wird die nahezu komplette Inhibition des Tumorzustands nach hepato-arterieller Infusion der antikörperbasierten Therapieregime. Mittelwert  $\pm$  SEM, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

## 6.2.4 Histologie

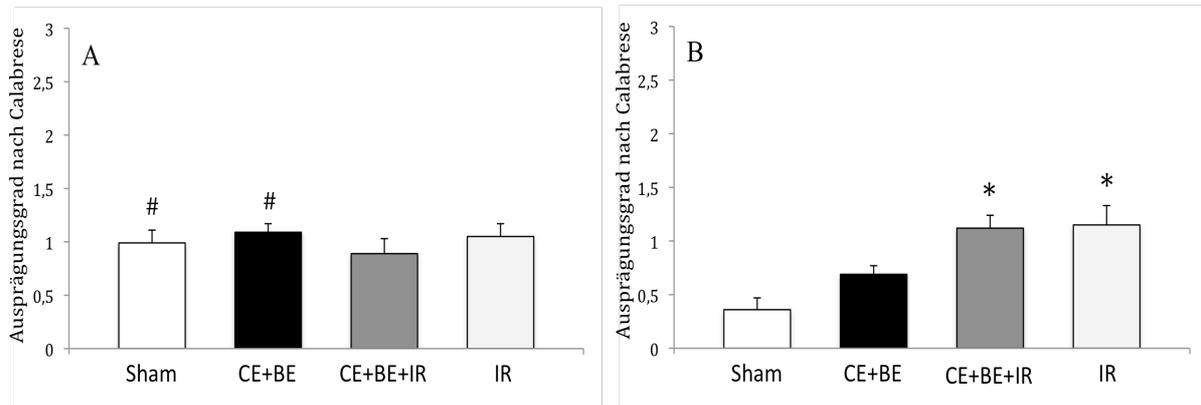
### 6.2.4.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)

#### 6.2.4.1.1 Zellmorphologie

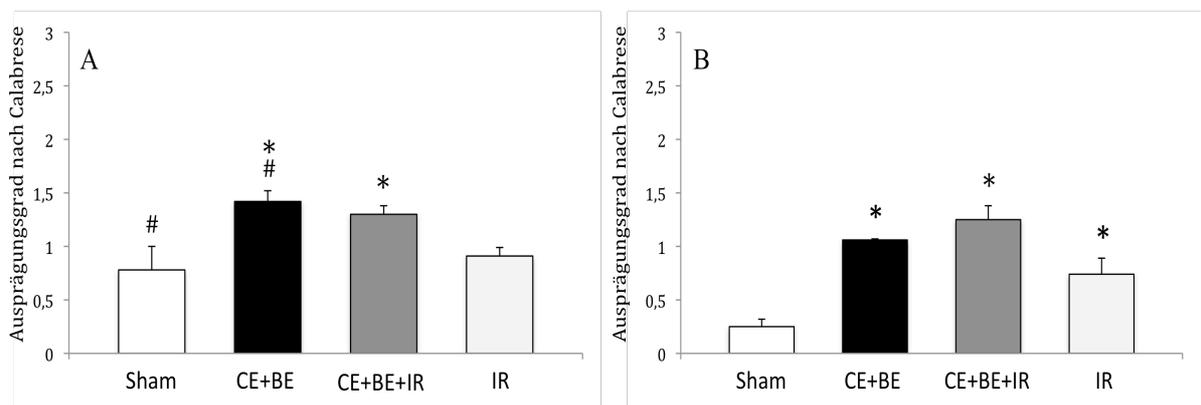
Die lichtmikroskopische Beurteilung der Grobscholligkeit des Zytoplasmas und Vakuolisierung der Hepatozyten erfolgte anhand der fünf Ausprägungsgrade nach Calabrese et al. (1997) und diente der Beurteilung einer wirkstoff- bzw. infusionsbedingten Schädigung der histomorphologischen Integrität des Leberparenchyms.

Insgesamt waren die beiden Parameter allenfalls mäßig ausgeprägt, was gegen eine deutliche Affektion des Parenchyms spricht. Dennoch ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. So kam es nach hepato-arterieller Infusion der NaCl-Kontrolllösung und dualer Antikörpertherapie im Vergleich zur systemischen Applikation zu einer verstärkten Ausprägung von Grobscholligkeit und Vakuolisierung (siehe Abbildung 27 und 28).

Betrachtet man nur den systemischen Therapiearm, waren beide Schädigungsparameter in den Wirkstoffgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe stärker ausgeprägt, was eine wirkstoffbedingte Affektion der Gewebeintegrität nahelegt (siehe Abbildung 27 B und 28 B).



**Abbildung 27 A, B:** Hepatozelluläre Grobscholligkeit nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Die Einteilung erfolgte nach Calabrese et al. (1997) in fünf Ausprägungsgraden. Die allenfalls mäßig ausgeprägte Grobscholligkeit spricht gegen eine substantielle parenchymatöse Schädigung. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.



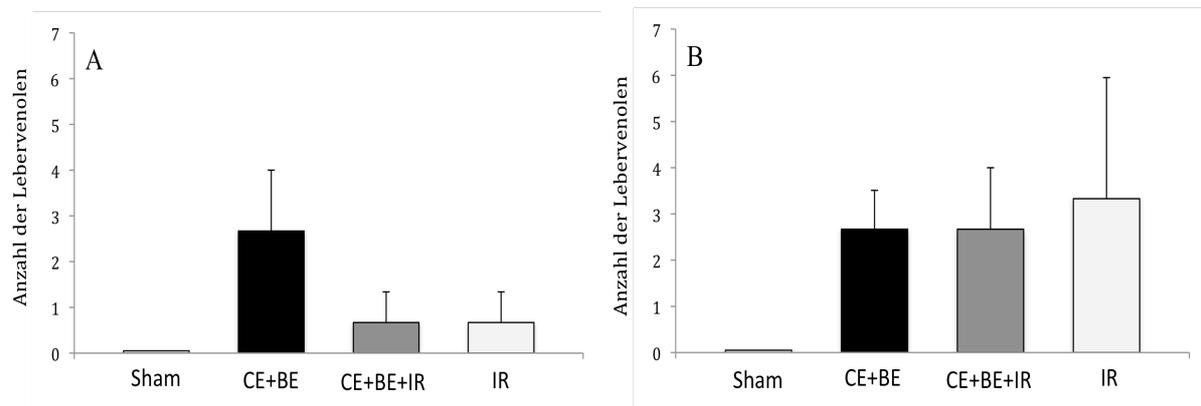
**Abbildung 28 A, B:** Histomorphologischer Schädigungsparameter Vakuolisierung nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer (SYS, B) Infusion. Die Einteilung erfolgte auch hier nach Calabrese et al. (1997). Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

### 6.2.4.1.2 Morphologie der Lebervenen

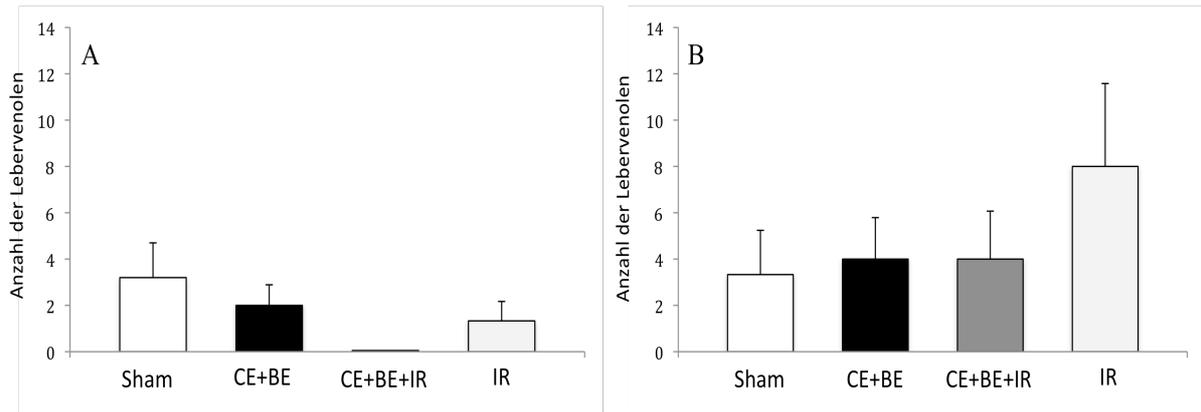
Endothelläsionen in Lebervenen wurden nach lokaler wie auch nach systemischer Wirkstoffinfusion nur sehr vereinzelt beobachtet. Hier bestanden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den zwei Infusionswegen (siehe Abbildung 29).

Vergleichbares ergab sich für die Ausbildung von intraluminalen Fibrinablagerungen. Deren Auftreten war zwar nach systemischer Infusion tendenziell vermehrt, statistische Signifikanz erreichten diese Unterschiede jedoch nicht (siehe Abbildung 30).

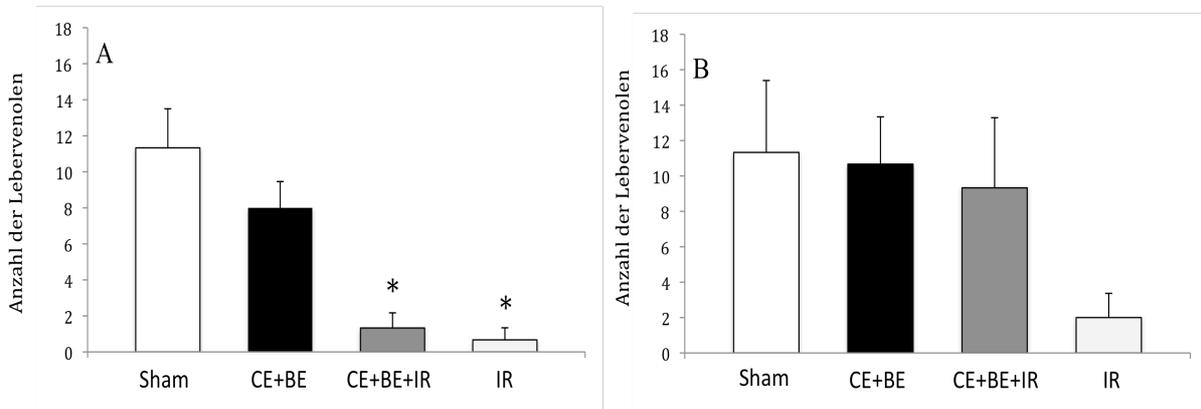
Eine endotheliale Erythrozytenwandständigkeit war insgesamt häufiger zu beobachten. Wesentliche infusionsmodellassozierte Unterschiede ließen sich nicht nachweisen. Deutlich war der Unterschied zwischen den lokal applizierten irinotecanhaltigen Therapiekombinationen und der Kontrollgruppe. So war die Inzidenz des Merkmals nach Gabe der wirkstoffbasierten Kombination signifikant verringert (siehe Abbildung 31).



**Abbildung 29 A, B:** Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl von Endothelläsionen nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Mittelwert  $\pm$  SEM,



**Abbildung 30 A, B:** Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl von Fibrinthromben nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Mittelwert  $\pm$  SEM



**Abbildung 31 A, B:** Die Abbildung zeigt die absolute Anzahl einer endothelialen Erythrozytenwandständigkeit nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham

## 6.2.4.2 AS-D Chloracetatesterase (CAE)

Die Leukozyteninfiltration zeigte wirkstoffassoziierte Unterschiede. So führte die Infusion der antikörperhaltigen Regime im Mittel zu einem Anstieg der hepatischen Leukozytenkonzentration. Vor allem die Inzidenz von sinusoidalen, extravasal-portalfeldassoziierten und extravasal-venulären Leukozyten war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (siehe Tabelle 3). Dieser Effekt zeigte sich unabhängig vom Infusionsmodell.

Sham	HAI	SYS	Cetuximab+Bevacizumab	HAI	SYS
Sinusoide	1,18(±0,58)	0,80(±0,28)	Sinusoide	1,42(±0,21)*	1,32(±0,20)*
Portalfeld intravasal	0,18(±0,02)	0,18(±0,08)	Portalfeld intravasal	0,15(±0,04)	0,015(±0,05)
Portalfeld extravasal	2,50(±0,55)	3,48(±0,87)	Portalfeld extravasal	2,92(±0,41)*	3,72(±0,38)*
Venole intravasal	0,04(±0,02)	0,08(±0,04)	Venole intravasal	0,10(±0,05)	0,07(±0,03)
Venole extravasal	1,22(±0,43)	0,77(±0,11)	Venole extravasal	1,53(±0,27)*	1,05(±0,01)*

Cetuximab+Bevacizumab+ Irinotecan	HAI	SYS	Irinotecan	HAI	SYS
Sinusoide	0,97(±0,14)#	1,87(±0,23)*	Sinusoide	1,05(±0,18)#	2,18(±0,29)
Portalfeld intravasal	0,12(±0,05)	0,13(±0,06)	Portalfeld intravasal	0,03(±0,02)	0,02(±0,02)
Portalfeld extravasal	2,62(±0,26)*	2,77(±0,40)*	Portalfeld extravasal	3,73(±0,41)	4,78(±0,71)
Venole intravasal	0,07(±0,03)	0,10(±0,05)	Venole intravasal	0,08(±0,04)	0,08(±0,04)
Venole extravasal	1,23(±0,14)	1,22(±0,15)*	Venole extravasal	0,72(±0,15)#	1,48(±0,21)

**Tabelle 3:** Ausmaß und Verteilung der Leukozyteninfiltration. Insgesamt wurden pro Gewebeschnitt 30 high power fields in 40facher Vergrößerung beurteilt. Angegeben ist die mittlere Leukozytenanzahl innerhalb eines high power fields (n/HPF) sowie der Standardfehler des Mittelwertes. \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

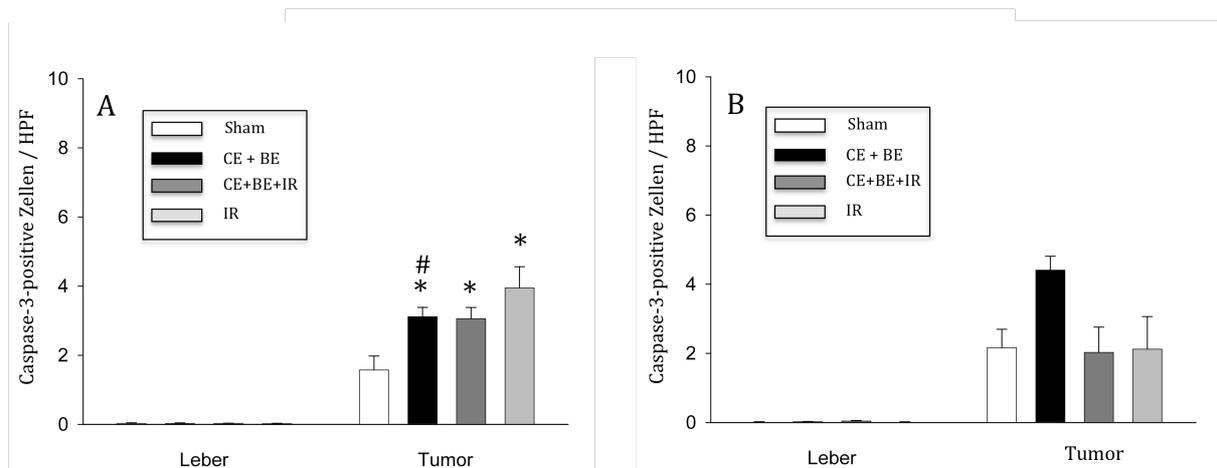
## 6.2.5 Immunhistochemie

### 6.2.5.1 Apoptoseindex, Caspase-3.

Innerhalb des normalen Leberparenchyms zeigten sich nur vereinzelt Caspase-3-positive Zellen (siehe Abbildung 32).

Verglichen mit der Kontrollgruppe konnte für alle hepato-arteriell verabreichten Wirkstoffgruppen ein deutlicher Anstieg der Apoptoserate im Tumorgewebe verzeichnet werden (siehe Abbildung 32 A).

Die systemische Infusion der Wirkstoffkombinationen zeigte verglichen mit der Kontrollgruppe kein signifikant Apoptose-induzierendes Potential. Jedoch konnte nach systemischer Infusion von Cetuximab und Bevacizumab eine tendenziell vermehrte Apoptose beobachtet werden, die im Vergleich zur hepato-arteriellen Infusion signifikantes Ausmaß erreichte.

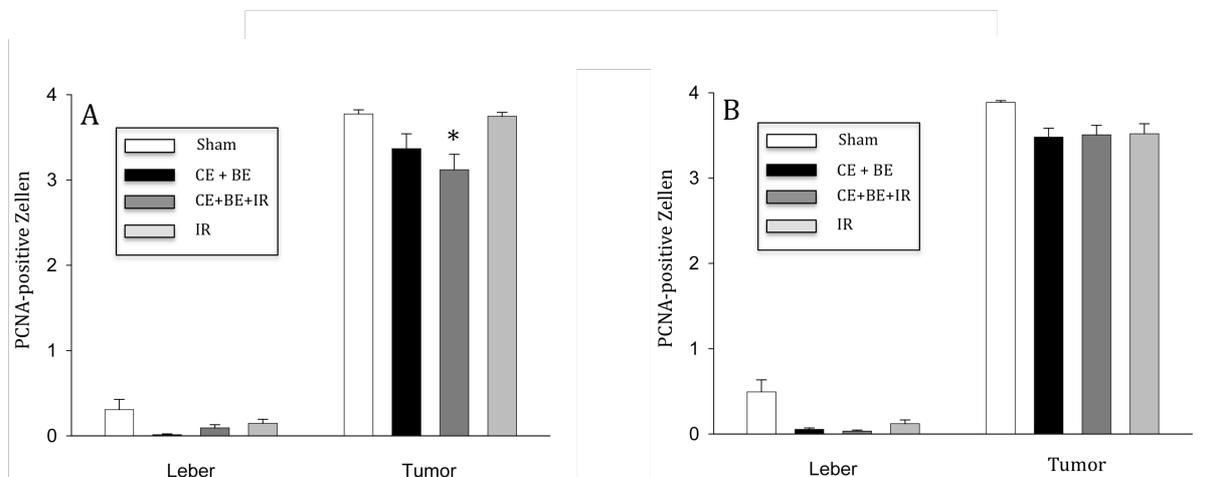


**Abbildung 32 A, B:** Quantitative Analyse der apoptotischen Zellen im normalen Leberparenchym und im metastatischen Gewebe nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B) mittels immunhistochemischer Markierung von Caspase-3. Alle lokal applizierten Wirkstoffgruppen weisen ein im Vergleich zur Kontrolllösung Apoptose-induzierendes Potential auf. Die systemische Gabe bleibt hingegen ohne signifikanten Einfluss. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

### 6.2.5.2 Proliferation, PCNA (proliferating cell nuclear antigen)

Im normalen Leberparenchym waren die Proliferationsraten deutlich geringer als im metastatischen Gewebe (siehe Abbildung 33).

Die hepato-arterielle Infusion der Kombinationstherapie aus Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan konnte als einziges therapeutisches Setting im Vergleich zur NaCl-Kontrollgruppe die Tumorzellproliferation signifikant reduzieren (siehe Abbildung 33 A). Im Vergleich zur systemischen Applikation ergab sich jedoch keine statistische Signifikanz.

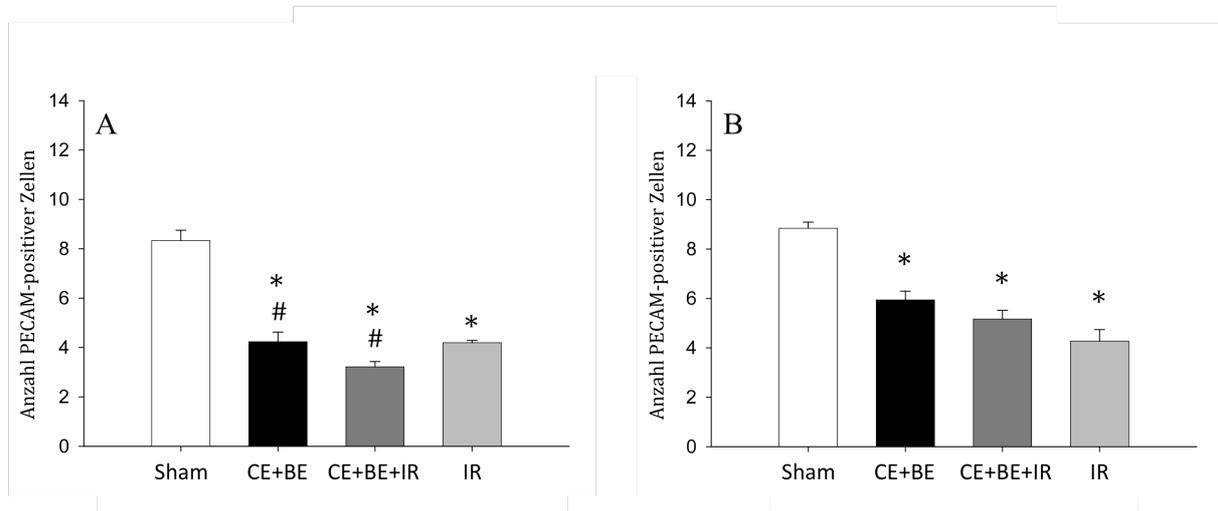


**Abbildung 33 A, B:** PCNA-positive Zellen in Leber und Tumor nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Die Einteilung erfolgte mithilfe eines Scores in Prozent PCNA-positive Zellen (0 = <1%, 1 = 1-10%, 2 = 10-30%, 3 = 30-50%, 4 > 50%). Deutlich wird das signifikant reduzierte Proliferationsausmaß nach hepato-arterieller Infusion der Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham

### 6.2.5.3 Angiogenese, PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule)

Die hepato-arterielle Infusion aller Wirkstoffgruppen ging mit einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanten Hemmung der Tumorgefäßneubildung einher. Die lokale Gabe von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan zeigte das im Vergleich größte anti-angiogene Potential. So konnte gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe die Angiogeneserate um fast 75% reduziert werden (Abbildung 34 A).

Auch die systemische Applikation der Wirkstoffgruppen wies ein signifikant anti-angiogenes Potential im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Dieses war jedoch im Vergleich zur hepato-arteriellen Infusion weniger stark ausgeprägt (siehe Abbildung 34 B).



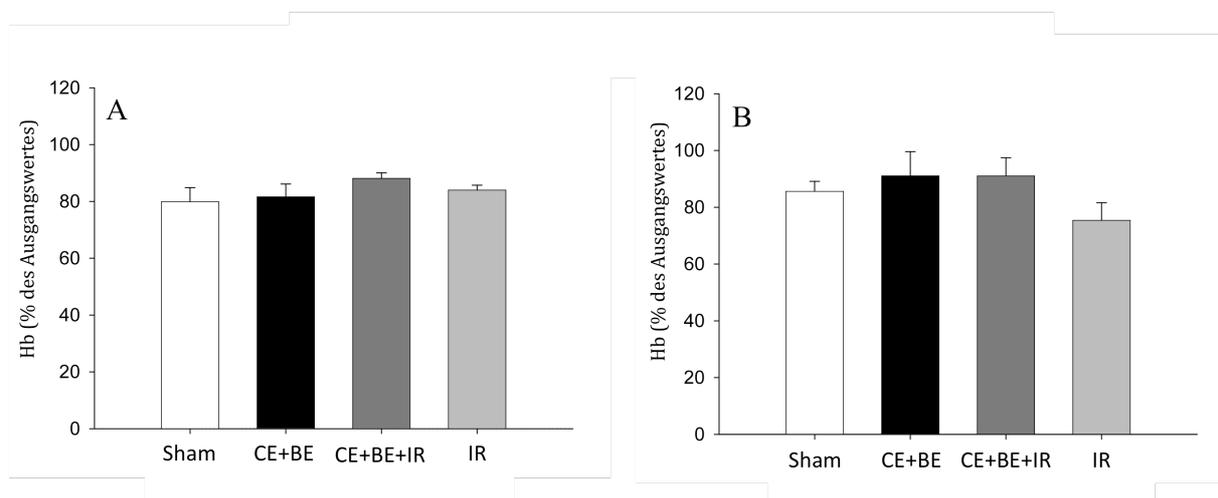
**Abbildung 34 A, B:** Anzahl CD-31-positiver Zellen nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Infusion (SYS, B). Die PECAM-positiven Zellen wurden gezählt und die gemittelten Absolutwerte aufgetragen. Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

## 6.2.6 Laborchemische Parameter

### 6.2.6.1 Blutbild

#### 6.2.6.1.1 Hämoglobinkonzentration

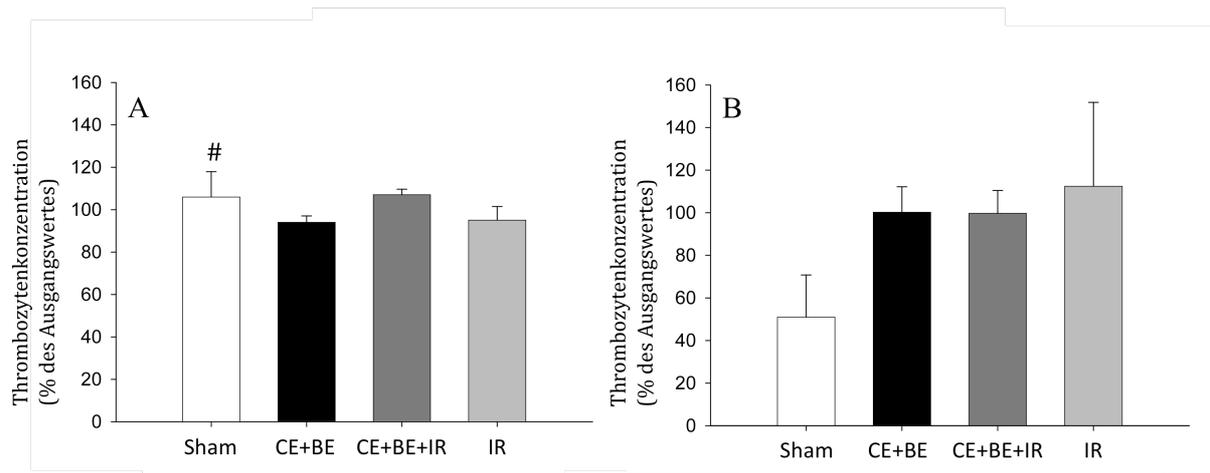
Durch die chirurgische Intervention kam es zu einem Abfall der Hämoglobinkonzentration (siehe Abbildung 35). Wesentliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden nicht, sodass kein Anhalt für infusionsbedingte Blutverluste oder eine wirkstoffbedingte Hämolyse besteht.



**Abbildung 35 A, B:** Prozentuale Entwicklung der Hämoglobinkonzentration nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer (SYS, B) Infusion. Als Bezugswert (100%) diente der an Tag 10 ermittelte Wert vor therapeutischer Intervention. Mittelwert  $\pm$  SEM

#### 6.2.6.1.2 Thrombozytenkonzentration

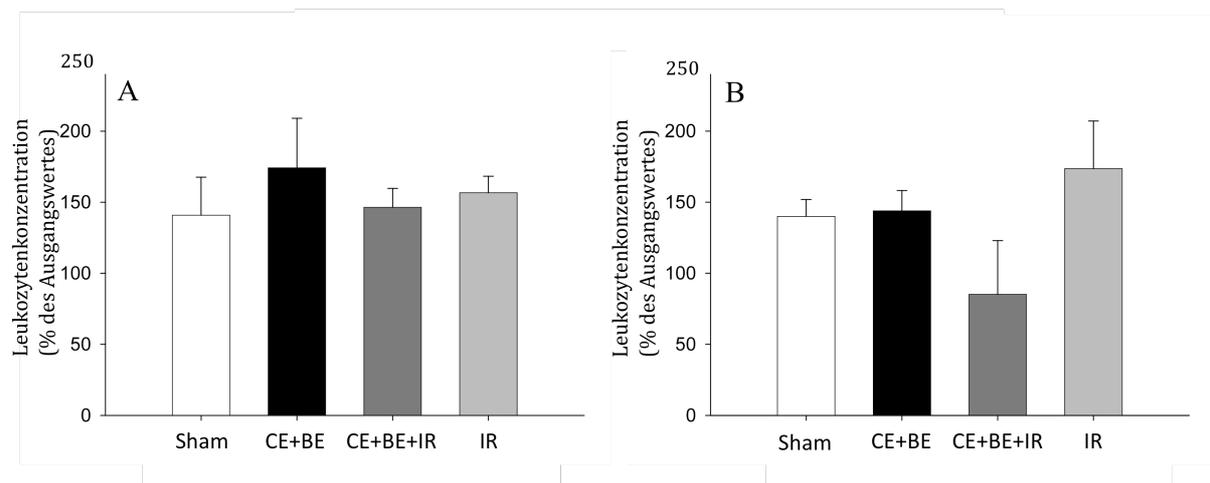
Vom Behandlungstag bis zum Versuchsabschluss unterlag die Thrombozytenkonzentration keinen wesentlichen Schwankungen. Lediglich die systemische Sham-Infusion führte zu einer signifikanten Abnahme der Thrombozytenzahl (siehe Abbildung 36).



**Abbildung 36 A, B:** Entwicklung der Thrombozytenkonzentration nach hepato-arterieller (HAI, A) bzw. systemischer Wirkstoffapplikation (SYS, B). Ausgangswert war die an Tag 10 ermittelte Konzentration vor chirurgischer Intervention. Mittelwert  $\pm$  SEM, #  $p < 0,05$  vs. SYS.

### 6.2.6.1.3 Leukozytenkonzentration

Die Veränderung der peripheren Leukozytenkonzentration wies keine signifikanten infusions- bzw. wirkstoffbedingten Schwankungen auf (Abbildung 37).



**Abbildung 37 A, B:** Prozentuale Entwicklung der venösen Leukozytenkonzentration nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B). Die Angaben beziehen sich auf die Konzentration vor chirurgischer Intervention (=100%). Statistisch signifikante Änderungen traten nicht auf. Mittelwert  $\pm$  SEM

## 6.2.6.2 Leberenzyme

Die Entwicklung der Leberenzymkonzentrationen wiesen keine wesentlichen infusionsmodell- bzw. wirkstoffassoziierten Unterschiede auf. Lediglich die GPT-Konzentration fiel nach systemischer Infusion der Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan im Vergleich zur Kontrollgruppe in signifikantem Ausmaß (siehe Tabelle 4).

Sham	HAI	SYS	CE+BE	HAI	SYS
γGT	148,19 (±44,80)	193,75 (±68,21)	γGT	277,50 (±139,97)	233,33 (±61,46)
GLDH	166,00 (±55,33)	118,97 (±60,96)	GLDH	176,47 (±92,79)	74,80 (±9,36)
GOT	102,46 (±42,00)	120,45 (±39,88)	GOT	106,90 (±18,69)	93,51 (±14,06)
GPT	96,20 (±26,64)	140,31 (±22,11)	GPT	82,81 (±15,22)	68,74 (±4,46)
LDH	36,40 (±6,59)	76,94 (±12,82)	LDH	95,98 (±14,86)	96,10 (±16,30)

CE+BE+	HAI	SYS	IR	HAI	SYS
IR			IR		
γGT	135,00 (±56,73)	366,67 (±176,38)	γGT	61,16 (±38,82)	230,38 (±81,76)
GLDH	109,57 (±17,34)	86,39 (±17,51)	GLDH	227,59 (±131,11)	138,84 (±43,47)
GOT	96,73 (±14,67)	105,40 (±20,54)	GOT	109,51 (±17,94)	115,34 (±31,58)
GPT	50,18 (±4,09)	61,84 (±5,42) *	GPT	87,75 (±8,24)	68,44 (±6,92)
LDH	100,42 (±19,98)	104,36 (±23,88)	LDH	102,65 (±19,79)	154,35 (±60,04)

**Tabelle 4:** Prozentuale Änderung der Enzymkonzentrationen von Tag 10 auf Tag 13 nach hepato-arterieller (HAI, A) und systemischer Infusion (SYS, B), Mittelwert ± SEM, \*  $p < 0,05$  vs. Sham

## 7 Diskussion

Die Anwendung der monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab im Rahmen eines lokoregionären Applikationsverfahrens wie der hepato-arteriellen Infusion macht mit den in der Einleitung dargelegten theoretischen Grundlagen eine hochspezifische, metastasenbezogene Tumorbehandlung möglich.

Um die zugrundeliegenden Fragestellungen nach Wirksamkeit und Verträglichkeit dieser Applikationsform aufzuklären, war ein Versuchsmodell nötig, welches eine problembezogene, den gesamten Organismus berücksichtigende Betrachtungsweise ermöglicht. Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurde ein in-vivo-Tiermodell gewählt. Tiermodelle erfassen interferierende lokale und systemische, positive wie auch negative Rückkopplungsmechanismen in der Regulation und Kontrolle komplexer physiologischer oder pathophysiologischer Prozesse [Menger et al., 1993] sowie neuronale Steuerungsmechanismen und metabolische Faktoren. Vergleichende Studien, in denen in-vivo und in-vitro Versuchsmodelle miteinander verglichen wurden zeigen, dass diese vielfältigen Wechselwirkungen und Interaktionen lediglich in einer organismusbasierten Versuchsanordnung adäquat berücksichtigt werden können [Petit et al., 1997]. Eventuell auftretende wirkstoff- oder interventionsbedingte Organreaktionen können auf diese Weise quantitativ erfasst und evaluiert werden.

### 7.1 Diskussion von Material und Methoden

#### 7.1.1 Tumormodell

Die in den Versuchen verwendete Kolonkarzinomzelllinie CC531 entstammt einem durch 1,2-Dimethylhydrazin induzierten Karzinoms des Colon sigmoideums und wächst in den syngen WAG-Ratten nach Implantation in die Leber zuverlässig zu soliden Tumoren aus. Mit einer Proliferationsrate von 40-60% ist es einem humanem kolorektalen Karzinom vergleichbar [Thomas et al., 1993, van Hillegersberg et al., 1992]. Weiterhin sprechen die gute Reproduzierbarkeit von Tumoren und ein hoher Standardisierungsgrad im Aufbereiten der Tumorzellsuspension für die Verwendung dieses Modells.

Die WAG-Ratte ist aufgrund der syngenesischen Eigenschaft mit CC531-Tumorzellen das Versuchstier der Wahl. Die Ratte bietet zudem ideale anatomische und konstitutionelle Voraussetzungen für die mikrochirurgische Präparation und Durchführung der hepatoarteriellen Infusion [van Duijnhoven et al., 2005]. Weitere Vorteile ergeben sich aus der hohen Stresstoleranz und einer niedrigen Komplikationsrate bei tiefer Narkose.

Die Praktikabilität und Wertigkeit des verwendeten Tumormodells wurde in zahlreichen Studien mit vergleichbarem Design nachgewiesen [Liu et al., 2007, Richter et al., 2005, Schafer et al., van Duijnhoven et al., 2005, van Hillegersberg et al., 1992]

#### 7.1.1.1 Tumormodell und K-ras-Mutationsstatus

Wie bereits in Kapitel 3.3.1.1 dargelegt, zeigen neuere Studien einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab und dem K-ras-Mutationsstatus. So ist das Vorliegen eines K-ras Wildtyps ein positiver prädiktiver Marker für eine erfolgreiche Therapie kolorektaler Lebermetastasen mit Cetuximab.

Die Untersuchung humaner kolorektaler Karzinome und Lebermetastasen ergab in etwa 50% der Fälle einen positiven K-ras-Mutationsstatus in Codon 12 oder 13 [Peeters et al. 2012, Schramm et al., 2000].

Die Mutationsfrequenz des K-ras Onkogens in experimentell erzeugten kolorektalen Karzinomen wurde von Jacoby et al. untersucht [Jacoby et al., 1991]. Durch mehrfache subkutane Injektion von 1,2-Dimethylhydrazin (DMH) erzeugten sie kolorektale Karzinome in Ratten. Ein Anteil von 66% der so generierten Tumoren, wies eine K-ras Mutation in Codon 12 oder 13 auf. Erdman et al. bestätigten diese Daten. Sie führten vergleichbare Versuche an Ratten ebenfalls mit DMH als Prokarzinogen durch [Erdman et al., 1997]. Auch hier lag die Mutationsrate von K-ras bei ca. 60%.

Die Mutationsfrequenz von K-ras im hier verwendeten Tumormodell wurde von Koesters et al. untersucht [Koesters et al., 2001]. Sie wiesen nach DMH-Injektion in 21 von insgesamt 33 WAG/Rij-Ratten Mutationen des K-ras-Onkogens nach, was einer Rate von 63% entspricht. Auch hier kam es zu einem Nucleotidaustausch von Guanin zu Arginin im Codon 12 oder 13.

### 7.1.2 Tumorimplantation

Die Reproduzierbarkeit gut abgrenzbarer, unilokulär wachsender Tumoren war für die exakte Tumolvolumenbestimmung mit möglichst hohem Grad der Standardisierung eine Grundvoraussetzung. Die subkapsuläre Injektion der Tumorzellsuspension in das Leberparenchym wird von zahlreichen Arbeitsgruppen durchgeführt [Richter et al., 2005, Rothbarth et al., 2003] und wurde von Kollmar et al. am Mausmodell ausführlich beschrieben [Kollmar et al., 2004].

Alternativ zu dem praktizierten Verfahren besteht die Möglichkeit einer direkten Implantation von Tumorfragmenten in die Leber [van Etten et al., 2003, Yang et al., 1992], der portalvenösen Injektion von Tumorzellen [Gutt et al., 2000] oder der Infusion von Tumorzellen in die Vena mesenterica superior [Heuff et al., 1993]. Jedoch sind diese Verfahren zum Teil mit erheblichen praktischen Nachteilen verbunden. So geht die Tumorfragmentimplantation häufig mit einer mangelnden Perfusion des Tumormaterials einher, was zu einer anschließenden Nekrose führen kann [Hamm et al., 1993]. Eine portalvenöse Injektion von Tumorzellen kommt zwar dem pathophysiologischen Prozess einer hämatogenen Metastasierung am nächsten, führt jedoch durch unkontrollierte Aussaat zu einer multiplen Metastasenentstehung [Chen et al., 1989]. Die Infusion von Tumorzellen in die Vena mesenterica superior ist aufgrund einer hohen perioperativen Mortalitätsrate von bis zu 27% ebenfalls wenig geeignet [Chen et al., 1989].

Das gewählte Implantationsverfahren ist technisch gut durchführbar und bietet die Möglichkeit einer standardisierten Tumorinduktion im Hinblick auf Volumen und Lokalisation. Zudem werden entscheidende pathophysiologische Grundmechanismen des Metastasenwachstums wie Angiogenese und Mikrozirkulation berücksichtigt [Kollmar et al., 2004].

Die Implantation erfolgte streng subkapsulär, um ein Übertreten der Tumorzellen in tiefer liegende Blut- oder Lymphgefäße zu vermeiden. Es wurde darauf geachtet, dass die Leberkapsel bis auf die Einstichstelle intakt blieb, um eine peritoneale Tumorzellaussaat zu verhindern.

### 7.1.3 Hepato-arterielle Infusion (HAI)

Die Leber bietet aufgrund ihrer dualen Blutversorgung durch A. hepatica und V. portae ideale anatomische Voraussetzungen zur Durchführung einer lokoregionären Chemotherapie. Die Frage, welcher Zufluss den effektiveren Applikationsweg darstellt, wurde lange kontrovers diskutiert.

Zunächst lag der Fokus auf einer portalen Chemoperfusion, da auf diese Weise der primäre, hämatogene Metastasierungsweg imitiert wird. Weiterhin ist belegt, dass kleine Tumorzellnester bis zu einem Durchmesser von etwa 0,5mm, überwiegend portal-venös versorgt werden. Größere Leberherde hingegen erhalten ihren Blutzufluss fast ausschließlich über den arteriellen Schenkel. Dieser Sachverhalt ist schon sehr früh von Breedis und Young beschrieben worden [Breedis and Young, 1954] und wird von neueren Studien gestützt. So zeigten Archer et al. in einem Metastasenmodell an Ratten eine starke Anreicherung von radioaktiv markierten Mikrosphären im metastatischen Gewebe nach Injektion in die A. hepatica. Die Applikation über die V. portae ging mit einer signifikant geringeren Partikelanreicherung im Tumorgewebe einher. Die Autoren schlossen aus diesen Beobachtungen auf eine differenzierte Angioarchitektur innerhalb des tumorösen Gewebes, die ihren Ursprung von der A. hepatica nimmt und bereits in einem relativ frühen Metastasenstadium vorhanden ist [Archer et al., 1989]. Sigurdson et al. konnten ähnliche anatomische Gegebenheiten an Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen nachweisen. Nach Injektion von radioaktiv markiertem FUDR und Albumin über Pfortader bzw. A. hepatica erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der Substanzen im metastatischen Gewebe. Auch hier ergaben sich signifikant höhere Tracerkonzentrationen nach hepato-arterieller Infusion [Sigurdson et al., 1987]. Okuno et al. analysierten mithilfe magnetresonanztomographischer Verfahren die Konzentrationsentwicklung von 5-FU in experimentell erzeugten Lebermetastasen nach hepato-arterieller, portalvenöser und systemischer Applikation. Das verwendete Tumormodell war mit dem der vorliegenden Arbeit vergleichbar. Die hepato-arterielle Infusion hatte den stärksten Konzentrationsanstieg innerhalb des metastatischen Gewebes zur Folge. Zudem blieben diese hohen Wirkstoffkonzentrationen über einen signifikant längeren Zeitraum bestehen, als dies nach Infusion über die anderen Applikationswege der Fall war. Nach Meinung der Autoren ist die spezifische hepatische Angioarchitektur auf Plexusebene eine Erklärung für diese Beobachtung. So konnte gezeigt werden, dass die terminalen Äste der A. hepatica überwiegend in den peribiliären Plexus drainieren, bevor sie letztlich sinusoidal münden [Okuno et al., 1998]. Burkel et al.

beschrieben diesen Umweg über den Plexus im Tiermodell an Ratten [Burkel, 1970]. Die Pfortaderäste drainieren hingegen ohne Verbindung zum peribiliären Plexus direkt in die Sinusoide. Takasaki et al. konnten vergleichbare Mechanismen beim Menschen nachweisen [Takasaki et al., 2001].

Auf der Basis dieser Erkenntnisse sind die von Gonda et al. publizierten Daten von Bedeutung. Sie zeigen, dass gerade die Metastasenperipherie als Ort der eigentlichen Wachstumsprogression überwiegend Blut aus dem peribiliären Plexus erhält [Gonda et al., 2000].

Der therapeutische Benefit der hepato-arteriellen Infusion basiert folglich auf zwei angioarchitektonischen Besonderheiten von kolorektalen Lebermetastasen. Zum einen resultieren aus dem Umweg des Therapeutikums über den peribiliären Plexus längere Kontaktzeiten zwischen Wirkstoff und Tumorgewebe. Zum anderen besteht durch Infusion über die A. hepatica ein fast selektiver Fluss von Wirkstoff in die Metastasenperipherie, die den Ort mit der höchsten Tumorzellproliferationsrate darstellt.

Erwähnt werden muss das Vorhandensein von arterioportalen Shuntverbindungen, die im Falle einer arteriellen Okklusion die Perfusion des metastatischen Gewebes, vor allem in der Peripherie, aufrechterhalten [Kan et al., 1993]. Inwieweit diese Shuntverbindungen bei der hepato-arteriellen Infusion zum Tragen kommen und deren Wirksamkeit beeinträchtigen, wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

### 7.1.3.1 Hepato-arterielle Infusion monoklonaler Antikörper

Die systemische Anwendung von monoklonalen Antikörpern in der Chemotherapie von kolorektalen Lebermetastasen ist klinisch etabliert. Über die Verwendung im Rahmen eines tierexperimentellen Modells, wie es in der vorliegenden Arbeit beschrieben wird, liegen nur vereinzelt Studienergebnisse vor. In einer Studie an Mäusen mit kolorektalen Lebermetastasen führten Sears et al. eine hepato-arterielle Infusion von murinen monoklonalen Antikörpern durch, die gegen metastasenspezifische Epitope gerichtet waren. Neben einer Reduktion der Metastasengröße wurde eine signifikant erhöhte monozytäre Infiltration beobachtet. Weiterhin ergab sich eine veränderte Echogenität des metastatischen Gewebes [Sears et al., 1982].

Ein weiterer experimenteller Ansatz, bei dem die hepato-arterielle Infusion monoklonaler Antikörper zur Anwendung kommt, ist die radiologisch basierte

Immundetektion, die eine isolierte Darstellung von Lebermetastasen ermöglicht. Hierfür kommen radioaktiv-markierte monoklonale IgG-Antikörper zum Einsatz, die ein Epitop des carcino-embryogenen-Antigens (CEA) binden. Aufgrund der hohen Bindungsspezifität kommt es zu fokalen Anreicherung von Antikörpern im metastatischen Gewebe, was eine selektive Darstellung der Leberherde möglich macht [Muhrer et al., 1986].

Ein therapeutisches Potential der hepato-arteriellen Anwendung von anti-CEA-Antikörper in der klinischen Behandlung kolorektaler Lebermetastasen ist ebenfalls nachgewiesen. Epenetos et al. infundierten radioaktiv markierte monoklonale Antikörper in Kombination mit embolisierenden Stärkepartikeln über die A. hepatica. Dieses Therapiesetting führte zu einer signifikanten Größenreduktion der Lebermetastasen [Epenetos et al., 1987].

Wesentlich umfassender ist die Studienlage zur hepato-arteriellen Applikation anderer immunkompetenter Effektorzellen. Zahlreiche Studien beschreiben vielversprechende experimentelle Ansätze mit lymphokin-aktivierten Killerzellen und T-Lymphozyten [Hagenaars et al., 1998, Kuppen et al., 1992, Kuppen et al., 2001].

Grundlage für die tumorizide Wirkungsweise der meisten immunogenen Zellen ist die direkte Invasion ins metastatische Gewebe, um unmittelbar mit der Tumorzelle interagieren zu können. Charakteristische zellmorphologische Eigenschaften der immunogenen Zellen erschweren den Prozess der Extravasation, die Überwindung der extrazellulären Matrix und die Penetration in die Tumorzelle. Außerdem besteht die Möglichkeit einer Deaktivierung der immunologisch aktiven Zellen im Interstitium durch Bindung anderer Proteine [Jain, 1990]. Diese strukturellen bzw. funktionellen Nachteile mindern das antitumorösen Potential dieser Wirkstoffgruppe.

Ein wesentlicher Wirkmechanismus der in der vorliegenden Studie verwendeten monoklonalen Antikörper besteht hingegen in der direkten Hemmung der Neoangiogenese. Für diesen unmittelbar auf Endothelebene ablaufenden Prozess ist eine Extravasation bzw. ein Transfer über die perivaskuläre extrazelluläre Matrix keine Grundvoraussetzung. So gelangen die monoklonalen Antikörper über die hepato-arterielle Infusion unmittelbar an ihren Wirkort, ohne das Kompartiment zu wechseln. Aus der barrierebedingten, zeitlich verzögerten Extravasation und den damit einhergehenden längeren Kontaktzeiten zwischen Antikörpern und Endothel kann sogar eine Wirkungsintensivierung resultieren.

### 7.1.3.2 Hepato-arterielle Infusion von Irinotecan und Oxaliplatin

Irinotecan ist in der systemischen Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen und steigert in der Kombinationstherapie mit 5-FU und Folinsäure die Ansprechrate sowie die mittlere und progressionsfreie Überlebenszeit. Das Potential der hepato-arteriellen Infusion von Irinotecan wurde in mehreren Studien untersucht. Eindeutige Vorteile gegenüber der systemischen Therapie konnten nicht nachgewiesen werden. So führte eine kontinuierlich über 5 Tage laufende Infusion von 20 mg/m<sup>2</sup>/Tag Irinotecan bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen zu keiner signifikanten Steigerung der Ansprechraten im Vergleich zu einer intravenösen Applikation [van Riel et al., 2004]. Hohe Ansprechraten und gesteigerte Gesamtüberlebenszeiten ergaben sich hingegen für die hepato-arterielle Infusion von Irinotecan in Kombination mit 5-FU [Idelevich et al., 2009, Shimonov et al., 2005].

Auch Oxaliplatin ist vor allem in Kombination mit FU und Leucovorin ein Standardchemotherapeutikum in der systemischen Behandlung kolorektaler Lebermetastasen. Verglichen mit der intravenösen Infusion führt die Applikation von Oxaliplatin via A. hepatica zu deutlichen Konzentrationsvorteilen innerhalb des metastatischen Gewebes, wie Dzodic et al. im Tierversuch zeigen konnten [Dzodic et al., 2004]. Zahlreiche Studien deuten auf ein hohes antitumoröses Potential für die hepato-arterielle Anwendung von Oxaliplatin hin. So ergaben sich vor allem in Kombination mit 5-FU und ergänzender systemischer Chemotherapie hohe Response- und Tumorkontrollraten [Del Freo et al., 2006, Guthoff et al., 2003]. Zudem konnte sowohl die progressionsfreie Zeit wie auch die Gesamtüberlebenszeit unter diesen Therapieansätzen signifikant verlängert werden [Ducreux et al., 2005].

Neben der beschriebenen Konzentrationserhöhung, die sich aus der hepato-arteriellen Anwendung ergibt, bietet der first-pass Effekt der Leber einen wesentlichen Vorteil gegenüber der systemischen Therapie. So führt der direkte hepatische Metabolismus von Oxaliplatin zu einer geringen systemischen Bioverfügbarkeit. Das Risiko einer oft dosislimitierenden oxaliplatininduzierten Neurotoxizität, wie sie nach systemischer Gabe häufig auftritt, kann auf diese Weise deutlich reduziert werden [Guthoff et al., 2003]. Jedoch sollte eine Oxaliplatinkonzentration von 150mg/m<sup>2</sup> nicht überschritten werden, da sowohl hepatotoxische Effekte mit Okklusion der A. hepatica als auch Leukopenien und akute Pankreatitiden bei weiterer Dosisescalation signifikant häufiger auftreten [Kern et al., 2001].

### 7.1.4 Kombination von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin

Die vielfältigen Arzneimittelinteraktionen zwischen Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin sind nicht vollends verstanden. Einige Studien wiesen jedoch synergistische Wirkmechanismen zwischen den einzelnen Komponenten nach, die auf einen therapeutischen Vorteil der kombinierten Therapie gegenüber den jeweiligen Monotherapien hindeuten.

So zeigten Balin et al. an verschiedenen Tumorzelllinien kolorektalen Ursprungs eine additiv gesteigerte antitumoröse Wirksamkeit von Oxaliplatin, wenn zusätzlich Cetuximab verabreicht wurde [Balin-Gauthier et al., 2008]. Der wesentliche Wirkmechanismus von Oxaliplatin besteht in der Generierung von DNA-Platin-Formationen innerhalb des Tumorzellkerns. Dies hat die anschließende Apoptose der Tumorzelle zur Folge. Interessanterweise kommt es jedoch gleichzeitig zu einer Hochregulation von Reparaturmechanismen wie DNA-Exzision und -Replacement, die ein vermehrtes Eintreten von Tumorzellen in den programmierten Zelltod verhindern und so die Wirksamkeit der Oxaliplatinmonotherapie abschwächen [Chaney et al., 2005, Reed, 1998]. Eine Anti-EGFR-Therapie mit Cetuximab kann diese oxaliplatininduzierte Verstärkung der Reparaturenzyme XPA/XPC (Xeroderma pigmentosum protein Group A bzw. C) und ERCC1 (Excision Repair Cross Complement Group 1) effektiv hemmen und wirkt so insbesondere den Nucleotidexzisionsprozessen entgegen. Die Apoptosewahrscheinlichkeit von Tumorzellen wird auf diese Weise wieder gesteigert. Vergleichbares gilt für die oxaliplatinbedingte Aktivitätszunahme des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signalweges (PI3K-Signalweg). Insbesondere die Induktion der Akt-Kinase leitet anti-apoptische Prozesse ein und verhindert so eine stärker ausgeprägte tumorizide Wirkung. Cetuximab hat auf diesen Signaltransduktionsweg einen inhibierenden Einfluss und macht eine Tumorzellapoptose wahrscheinlicher. Aufgrund der gesteigerten Expression von EGF und EGF-R im metastatischen Gewebe ist dieser apoptose-induzierende Synergismus überwiegend auf das tumoröse Gewebe beschränkt.

Weitere proliferationshemmende Eigenschaften, welche sowohl Oxaliplatin als auch Cetuximab betreffen, sind von Balin et al. beschrieben. Sie konnten zeigen, dass beide Substanzen die Proliferation auf Zellzyklusebene hemmen und zu einer gesteigerten Anzahl von Tumorzellen im G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Stadienarrest führen. Nukleäre Kondensations- und Fragmentationsprozesse von DNA sind die Folge, die letztlich die Apoptose bewirken [Balin-Gauthier et al., 2008].

Bevacizumab als zusätzliche antiangiogene Komponente ist eine sinnvolle Ergänzung zur Kombination aus Oxaliplatin und Cetuximab. So zeigten präklinische Studien eindeutig synergistische Wirkmechanismen zwischen den Einzelkomponenten, welche das antitumoröse Wirkpotential steigern. Fan et al. konnten beispielsweise in Versuchen an kolorektalen Tumorzelllinien eine verstärkte oxaliplatininduzierte VEGF-A und VEGF-R-1 Expression nachweisen [Fan et al., 2008]. Hier ist ebenfalls der über die PI3-Kinase/AKT-Kinase vermittelte Signaltransduktionsmechanismus grundlegend beteiligt, der EGF-abhängig aktiviert wird und somit selektiv von Cetuximab inhibiert werden kann. Eine überschießende Zunahme der VEGF-A und VEGF-1-Rezeptor-Expression wird auf diese Weise effektiv unterbunden. Über diesen Mechanismus könnte eine weitere Steigerung der antiangiogenen Wirksamkeit von Bevacizumab erreicht werden, was sich in einer effektiveren Inhibition der Neoangiogenese widerspiegeln würde.

Letztlich wird durch die ergänzende Applikation der monoklonalen Antikörper eine Abschwächung der oxaliplatin-bedingten Stressreaktionen erreicht, die einer Apoptose entgegenwirken. Dies hat eine gesteigerte Apoptosewahrscheinlichkeit bei gleichzeitig verminderter Proliferations- und Neoangiogeneserate zur Folge.

Die Verträglichkeit der Therapiekombination Capecitabine, Oxaliplatin, Bevacizumab plus Cetuximab wurde von Tol et al. in einer großangelegten klinischen Studie überprüft. Die Vermutungen, dass analog zur Wirksamkeit auch das Ausmaß der Nebenwirkungen additiv zunimmt, konnten jedoch nicht bestätigt werden [Tol et al., 2008].

Diese Ergebnisse legen auch für die hier verwendete Therapiekombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin ein akzeptables Toxizitätsprofil nahe.

### 7.1.5 Kombination von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan

Theoretische Grundlagen und präklinische Daten sprechen für ein effektives Zusammenwirken der Therapiekomponenten Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan.

Wildiers et al. beobachteten in einem in-vivo-Metastasenmodell synergistische Mechanismen zwischen einer anti-VEGF Therapie und dem Topoisomerase-Hemmer Irinotecan. Entgegen der Erwartung führte eine Reduktion der Tumorgefäßdichte durch Bevacizumab zu einer gesteigerten Distribution und einem gesteigerten Uptake von simultan verabreichtem Irinotecan im metastatischen Gewebe [Wildiers et al., 2003]. Die Erklärung für diesen zunächst kontroversen Zusammenhang liefert die Hypothese von Jain et al., nach der

die antiangiogene Therapie überwiegend Gefäße von minderer Qualität erfasst. Eine transiente „Normalisierung“ der Tumor-Vaskularisation mit erhöhter funktioneller Perfusion ist die Folge, wodurch die Aufnahme von zusätzlich verabreichten Chemotherapeutika ins metastatische Gewebe gesteigert wird [Jain, 2005].

Ein zusätzlicher Effekt, der sich im Rahmen einer anti-VEGF-Therapie ergibt, ist die signifikante Minderung des interstitiellen Drucks innerhalb solider Tumoren. So wiesen Lee et al. in einem kolorektalen Tumormodell an Mäusen durch Applikation eines anti-VEGF-Antikörpers eine interstitielle Druckminderungen von über 74% nach. Die passive Diffusion, auf der die Verteilung von Irinotecan im Tumorgewebe im wesentlichen beruht, wird so begünstigt [Lee et al., 2000].

Vergleichbare synergistische Effekte sind auch für die Kombination von Cetuximab und Irinotecan bekannt. In einem kolorektalen Tumormodell an Mäusen infundierten Ciardiello et al. den anti-EGFR-Antikörper C-225 und den Topoisomerase-Hemmstoff Topotecan. Beide Substanzen unterscheiden sich von ihrem Wirkungsprinzip her nicht von Cetuximab und Irinotecan. Die simultane Infusion führte zu einer gesteigerten Hemmung der Proliferationsrate im Vergleich zur jeweiligen Monotherapie. Nach Autorenmeinung ist der vermehrte Zellzyklusarrest, der von beiden Wirkstoffen induziert wird, für das starke antiproliferative Potential der Kombinationstherapie verantwortlich [Ciardiello et al., 1999].

Von klinischer Bedeutung ist die Anwendung der Kombination von Irinotecan und Cetuximab bei der Behandlung von irinotecanrefraktären Patienten, die durch Ergänzung von Cetuximab erhöhte Ansprechraten von bis zu 23% aufweisen [Cunningham et al., 2004]. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Überwindung der Refraktärität durch zusätzliche Gabe von Cetuximab ist bisher jedoch nicht eindeutig geklärt.

Der Nachweis der systemischen Wirksamkeit der Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan gelang im Rahmen der BOND-2-Studie. Insgesamt erhielten 43 Patienten das Dreiertherapieregime. Eine Kontrollgruppe, bestehend aus 40 Patienten, erhielt die monoklonalen Antikörper ohne Irinotecan. Eine gesteigerte Toxizität bzw. eingeschränkte Verträglichkeit der Kombination wurde nicht beobachtet. In dem Dreiertherapiearm ergab sich ein progressionsfreies Intervall von 7,3 Monaten verglichen mit 4,9 Monaten bei dualer Antikörperinfusion. Zudem ließen sich Ansprechraten und Gesamtüberleben durch zusätzliche Irinotecangabe signifikant steigern. So sprachen 37% der Patienten auf die Dreifachtherapie an, während es bei alleiniger Applikation der monoklonalen Antikörper lediglich 20% waren. Die mittlere Gesamtüberlebenszeit stieg durch ergänzende Gabe von Irinotecan von 11,4 auf 14,5 Monate.

Die theoretischen Überlegungen und die bereits in der klinischen Praxis gewonnenen Erkenntnisse über das antitumoröse Wirkpotenzial machen die Kombinationstherapie von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan zu einem attraktiven Therapieansatz. Die experimentelle Anwendung der Wirkstoffkombination im Rahmen des hepato-arteriellen Infusionsmodells lässt einen weiteren Anstieg der therapeutischen Wirksamkeit bei gleichzeitig herabgesetzter systemischer Toxizität erwarten.

### 7.1.6 Untersuchungsmethoden

Zahlreiche bildgebende Verfahren wie Kernspin-, Computer- und Positronenemissionstomographie sowie Fluoreszenz- und Biolumineszenzmethoden ermöglichen eine Visualisierung und Größenbestimmung von Leberherden in in-vivo Tumormodellen. Grundlegende Anforderungen, die im Rahmen eines Tierexperiments an die Bildgebung gestellt werden, bestehen in einer ausreichend hohen Auflösung, einer akzeptablen Zeiteffizienz mit schneller Bildgenerierung und einer angemessenen Kosteneffektivität. Diese Kriterien wurden für das Kleintiermodell von Weissleder et al. ausführlich evaluiert. So liefert die Volumenmessung mittels magnetresonanztomographischer Schnittbildverfahren qualitativ hochwertige Bilder, allerdings sind die Methoden sehr zeit- und kostenintensiv. Auch die Computertomographie generiert Bilder mit hoher räumlicher Auflösung. Sie bietet jedoch keinen ausreichenden Weichteilkontrast, was den Einsatz von Radiokontrastmitteln indizieren würde. Dies wiederum wäre mit Gewebe-Kontrastmittel-Interaktionen, zusätzlicher Strahlenbelastung und zusätzlichen Kosten assoziiert.

Die PET-Untersuchung liefert im Vergleich zur CT- und MRT-Diagnostik qualitativ schlechtere Bilder. Zudem ist die Produktion und Aufbewahrung der benötigten Radionukleotide mit erheblichen Kosten verbunden [Weissleder, 2002].

Das in dieser Studie eingesetzte hochauflösende Ultraschallverfahren ist speziell für die Verwendung im Kleintierversuch konzipiert und deckt die im Rahmen der longitudinalen Tumolvolumenbestimmung geforderten Ansprüche an die Bildgebung in nahezu idealer Weise ab. Graham et al. beschrieben die Wertigkeit dieses Verfahrens in mehreren präklinischen Studien. Im Mausmodell wurden experimentell erzeugte Lebermetastasen verschiedener Entität (u.a. auch kolorektalen Ursprungs) mit vergleichbarer 3D-

Ultraschalltechnik detektiert und die Volumenänderung über die Zeit ermittelt. Die Vermessung der Leberherde erfolgte im Vergleich zur vorliegenden Studie jedoch transkutan. Alle Tumorentitäten fielen durch einen deutlich inkohärenten Kontrast auf und waren vom umgebenden normalen Leberparenchym klar abgrenzbar. Die Verwendung von hochfrequenten Schallköpfen ermöglichte die Detektion von minimalen Leberfilae mit großer Sensitivität [Graham et al., 2005]. Eine quantitative Einschätzung der Validität des Verfahrens erbrachten Wu et al., indem sie experimentell erzeugte Prostatakarzinome in Mäusen einer in-vivo-sonographischen und autoptischen Tumolvolumenmessung unterzogen. Der Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Methoden lag bei 0,997 [Wu et al., 2005].

## 7.2 Diskussion der Ergebnisse

### 7.2.1 Hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin

Nach hepato-arterieller Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin war sonographisch eine Regredienz der Metastasenausdehnung nachweisbar, nach systemischer Applikation jedoch nicht. Um die zugrundeliegenden antitumorösen Wirkmechanismen genauer differenzieren zu können, erfolgte die selektive Auswertung des histomorphologischen und immunhistochemischen Materials.

Unter anderem konnte die Apoptoserate durch lokale Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin im Vergleich zur Kontrollgruppe um den Faktor 3 gesteigert werden. Das signifikant vermehrte Eintreten von Tumorzellen in den programmierten Zelltod fand sich lediglich bei kombinierter Anwendung der drei Wirkstoffe. Ein therapeutischer Vorteil der Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin im Vergleich zur alleinigen Oxaliplatingabe, wie er in Kapitel 7.1.4. hypothetisch angenommen wurde, wird durch diese Daten gestützt. Die von Balin et al. formulierte These, dass zwischen den antiangiogen wirksamen Antikörpern und Oxaliplatin ein apoptosefördernder Synergismus besteht, liefert eine plausible Erklärung für diese Datenkonstellation. Über Blockade des EGF-Rezeptors mittels Cetuximab können entscheidende, oxaliplatininduzierte DNA-Reperaturmechanismen, wie z.B. die Nukleotidexzision, effektiv unterbunden werden. Dies resultiert in einem vermehrten Eintreten von Tumorzellen in den programmierten Zelltod [Balin-Gauthier et al., 2008].

Ein weiterer oxaliplatinbedingter Effekt besteht in der Induktion der Akt-Kinase, was die Apoptoseneigung der Zelle mindert [Kim et al., 2005]. Durch ergänzende Anwendung von Cetuximab wird dieser Prozess effektiv unterbunden. Hierdurch wird Apoptosewahrscheinlichkeit weiter gesteigert.

Zudem begünstigt sowohl Cetuximab als auch Oxaliplatin den Tumorzellarrest. Dies fördert zusätzlich die Apoptoseneigung.

Bevacizumab als weitere Therapiekomponente besitzt neben dem primär anti-angiogenen Potential auch eine apoptosefördernde Wirkung. VEGF kann über Aktivierung der Phosphokinase C bzw. Phosphatidylinositol 3'-kinase und einer Hochregulation der anti-apoptotisch wirksamen Proteine Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), XIAP (X-linked-inhibitor of apoptosis protein) und Survivin einer Apoptose entgegenwirken. Bevacizumab neutralisiert VEGF und hat somit einen indirekt apoptosefördernden Effekt [Prabhudesai et al., 2007].

Tendenziell war das proapoptische Potential der Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin nach hepato-arterieller Infusion gesteigert, jedoch ergab sich gegenüber der systemischen Applikation keine statistische Signifikanz. Ein klarer Nachweis für die Konzentrationsabhängigkeit der beschriebenen Vorgänge kann somit nicht erbracht werden.

Insbesondere die anti-EGFR-Therapie mittels Cetuximab setzt eine direkte Interaktion des Wirkstoffes mit der Tumorzelle voraus. Nur auf diese Weise ist eine adäquate Hemmung der eingeleiteten DNA-Reparaturmechanismen zu vermitteln. Bestimmte zellmorphologische Barrieren und ein hoher interstitieller Druck, wie sie von Jain et al. beschrieben wurden, spielen auch bei der hepato-arteriellen Infusion eine wichtige Rolle und verhindern eine adäquate Wirkstoffdistribution mit angemessenem Tumoruption [Jain, 1990]. Ein deutlicher Vorteil der lokalen Infusion gegenüber der systemischen Applikation bleibt so aus.

Zudem können sich auf die Wirksamkeit negativ auswirkende Interaktionen zwischen den einzelnen Therapiekomponenten nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

Wie bereits unter Kapitel 6.1.5.3. dargelegt, ging die hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin mit der stärksten antiproliferativen Wirkung einher. Das gehemmte Tumorzellwachstum, das nach Applikation der Einzelkomponenten nicht oder nur mäßig in Erscheinung trat, spricht für ein effektives Zusammenwirken von

Oxaliplatin und den monoklonalen Antikörpern. Insbesondere die kombinierte Anwendung einer anti-EGFR-Therapie mittels Cetuximab und Oxaliplatin besitzt eine vielfach beschriebene antiproliferative Wirkung. Beide Substanzen verfügen über ein ausgeprägt zytostatisches Potential, was sich in einem additiv verstärkten Tumorzellarrest in der G0 und G1-Phase manifestiert [Balin-Gauthier et al., 2008].

Die vergleichende Proliferationsanalyse unter Berücksichtigung des Infusionsmodells wies tendenzielle Vorteile für die lokale Applikation auf, statistische Signifikanz gegenüber der systemischen Infusion wurde jedoch nicht erreicht. Auch hier verhindern möglicherweise die von Jain et al. beschriebenen physiologischen Barrieren auf zellulärer Ebene eine effektivere proliferationshemmende Wirkung [Jain, 1990].

In allen Wirkstoffgruppen kam es nach Behandlung zu einer signifikanten Hemmung der Gefäßneubildung, die unabhängig vom Infusionsmodell auftrat. Auffällig ist die Tatsache, dass die intraarterielle Oxaliplatinmonotherapie ein ähnlich ausgeprägtes anti-angiogenes Potential besitzt wie die bevacizumabhaltigen Gruppen. Ein signifikanter Vorteil der Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin gegenüber der Applikation der einzelnen Wirkstoffe ließ sich nicht beobachten. So kann die Vermutung einer additiven anti-angiogenen Wirkungsintensivierung, wie sie von Fan et al. dargelegt wird, nicht bestätigt werden. Fan und Kollegen beschreiben eine durch Oxaliplatin verursachte Expressionssteigerung von VEGF-A und VEGF-Rezeptor-1, die wiederum EGF-vermittelt aktiviert wird [Fan et al., 2008]. Durch den Einsatz der monoklonalen Antikörper kann dieser Expressionssteigerung auf beiden Ebenen begegnet werden, was die proangiogene Wirkkaskade unterbinden würde. Eine effektive Suppression der Gefäßneubildung wäre das Resultat. Das Ausbleiben dieser additiven Wirkungsverstärkung ist möglicherweise auf die Infusionspraxis zurückzuführen. Der von Fan et al. beschriebene Mechanismus basiert auf einer stufenweise ablaufenden Wirkkaskade, bei der die primär hervorgerufenen oxaliplatinbedingten Effekte sekundär durch Cetuximab und Bevacizumab aufgehoben werden. Die in der vorliegenden Studie praktizierte simultane Wirkstoffapplikation lässt einen solchen graduell ablaufenden Mechanismus nur bedingt zu. Eine zeitliche Trennung der einzelnen Wirkstoffapplikationen mit primärer Oxaliplatininfusion und darauf folgender Antikörpergabe hätte das antiangiogene Potential vermutlich weiter steigern können.

Die Angiogenesehemmung durch Oxaliplatin war nach hepato-arterieller Infusion signifikant stärker ausgeprägt als nach systemischer Applikation. Die daraus ableitbare stark

konzentrationsabhängige Wirkung wurde von anderen Arbeitsgruppen bereits beschrieben [Dzodic et al., 2004].

In zahlreichen experimentellen Ansätzen wurde deshalb versucht, die Bioverfügbarkeit von Platinderivaten innerhalb der tumorversorgenden Gefäße zu optimieren, um so eine isoliert Endothelzell-bezogene Zytotoxizität zu gewährleisten [Abu-Lila et al., 2009]. Die Verwendung eines lokoregionären Therapieverfahrens wie der hepato-arteriellen Infusion ist ebenfalls eine Möglichkeit die Konzentration von Oxaliplatin innerhalb der Tumorgefäße zu steigern und so die Oxaliplatinwirkung zu intensivieren. Der sich ergebende Konzentrationsvorteil nach hepato-arteriellen Infusion ist vielfach nachgewiesen [Cagol et al., 2006, Stewart et al., 1983]. Erwartungsgemäß trat die stärkste Hemmung der Gefäßneubildungsrate nach kombinatorischer Anwendung von Cetuximab, Bevacizumab und Oxaliplatin auf. Signifikante Vorteile gegenüber den anderen Therapieregimen ergaben sich jedoch weder nach lokaler noch nach systemischer Infusion, sodass ein additiv anti-angiogener Effekt von Bevacizumab und Oxaliplatin fraglich bleibt.

Das deutlich ausgeprägte antiangiogene Potential der Bevacizumab-haltigen Therapiegruppen lässt sich durch den Wirkmechanismus auf zellulärer Ebene erklären. Während für Apoptoseinduktion bzw. Proliferationsinhibition eine unmittelbare Interaktion des Antikörpers mit der Tumorzelle nötig ist, entfaltet Bevacizumab seine Wirkung am Endothel der Tumorgefäße. Eine Extravasation des Wirkstoffs in die perivaskuläre Matrix ist somit keine Voraussetzung für die Wirkungsentfaltung. Die intravasal ablaufende VEGF-Hemmung bewirkt so unmittelbar eine verminderte Neubildungsrate von Tumorgefäßen.

Zudem induziert Bevacizumab den Abbau von qualitativ minderwertigen Gefäßen innerhalb des metastatischen Gewebes. Eine transienten „Normalisierung“ der Tumolvaskularisation mit verbesserter Distribution und gesteigertem Uptake der weiteren Wirkstoffe ist die Folge [Jain, 2005]. Intravasal zirkulierende Endothelzellen als Grundbausteine der Neoangiogenese werden somit effektiver über anti-VEGF-Therapie erfasst, was die Neuformierung von Gefäßen direkt unterbindet. Da das antiangiogene Potential der Antikörper nach hepato-arterieller Infusion signifikant stärker ausgeprägt ist als nach systemischer Infusion, scheint auch dieser Mechanismus konzentrationsabhängig zu sein. Wie bereits dargelegt, ist für Cetuximab und insbesondere Oxaliplatin eine signifikant antiangiogenes Potential nachgewiesen, was die Wirksamkeit der Kombinationstherapie weiter steigert.

Die Auswertung der weiteren laborchemischen und histologischen Daten erfolgte, um etwaige Nebeneffekte in anderen Organsystemen zu erfassen und eine retrospektive Einschätzung der Verträglichkeit und Toxizität beider Infusionsmodelle zu ermöglichen.

Nach Versuchsdurchführung kam es in den verschiedenen Gruppen lediglich zu moderaten Schwankungen des Körpergewichtes. Wesentliche wirkstoff- bzw. infusionsbedingte Beeinträchtigungen, die sich auf das Fressverhalten und Allgemeinbefinden der Tiere auswirken, konnten aufgrund dieser Beobachtung weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die lichtmikroskopische Betrachtung des HE-gefärbten Leberparenchyms ermöglichte die Beurteilung der hepato-zellulären Grobscholligkeit und Vakuolisierung, die als Zellschädigungsparameter interpretiert werden können. Die vermehrte Vakuolisierung, die sich in allen Therapiegruppen ergab, kann als wirkstoffassoziiert angesehen werden, da sie sowohl nach lokaler wie auch nach systemischer Gabe in vergleichbarem Ausmaß in Erscheinung trat. Sowohl monoklonale Antikörper wie auch Oxaliplatin nehmen Einfluss auf die Integrität des Leberparenchyms und können Läsionen hervorrufen [Delis et al., 2009, Rubbia-Brandt et al., 2004]. Insbesondere die oxaliplatinhaltigen Therapiekombinationen gehen mit einer vermehrten Vakuolisierung einher, was Ausdruck einer vielfach beschriebenen Hepatotoxizität der Platinderivate ist [Koc et al., 2005, Rubbia-Brandt et al., 2004]. Aber auch Cetuximab und Bevacizumab können Affektionen des gesunden Lebergewebes hervorrufen. Trotz des beschriebenen signifikanten Anstiegs ist das Ausmaß der hepatischen Zellschädigung allenfalls als mäßig einzustufen, sodass ein akzeptables Toxizitätsprofil aller Wirkstoffregime vermutet werden kann. Infusionsassoziierte Unterschiede zeigten sich lediglich im Rahmen der vergleichenden Analyse der Kontrollgruppen. So ergab sich eine tendenziell vermehrte hepatozelluläre Grobscholligkeit und Vakuolisierung nach lokaler Applikation der dualen Antikörpertherapie. Diese vermehrte Schädigung der Leberzellen kann möglicherweise die Folge erhöhter intravasaler Drücke sein, die während der hepato-arteriellen Infusion auftreten. Zudem tragen eventuell osmotisch bedingte Volumenverschiebungen zu einer verstärkten Vakuolisierung innerhalb der Hepatozyten bei, die durch die veränderten Druckverhältnisse noch intensiviert sein können.

Weder nach systemischer noch nach hepato-arterieller Infusion traten wesentliche Alterationen der Lebervenolen auf. Die Ausprägung von Endothelläsionen, Fibrinthromben und einer Erythrozytenwandständigkeit zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Insgesamt spricht die mäßige Ausprägung der Schädigungsparameter unabhängig von Wirkstoffen und Infusionsmodell gegen eine wesentliche zelluläre bzw. venuläre Alteration des Lebergewebes, sodass insgesamt von einem akzeptablen Toxizitätsprofil des Therapiesettings ausgegangen werden kann.

Eine moderate Abnahme der Hämoglobin- und Thrombozytenkonzentration war in allen Versuchsgruppen zu beobachten. Diese vom Infusionsmodell unabhängige Entwicklung ist als Folge des sich perioperativ ergebenden Blutverlustes anzusehen.

Eine gesteigerte periphervenöse Leukozytenkonzentration als Ausdruck einer leichten interventionsbedingten Entzündungsreaktion ließ sich nach lokaler wie auch nach systemischer Infusion von Cetuximab und Bevacizumab und den Kontrollgruppen nachweisen.

Die in den oxaliplatinhaltigen Therapieregimen beobachtete sich regredient entwickelnde periphervenöse Leukozytenkonzentration ist vermutlich auf die vielfach beschriebene leukozytendepletierende Wirkung von Platin-Analoga zurückzuführen [Extra et al., 1998]. Es zeigt sich, dass dieser Effekt nach hepato-arterieller Infusion geringer ausfällt. Diese Beobachtung resultiert vermutlich aus einer herabgesetzten systemischen Bioverfügbarkeit von Oxaliplatin, die durch den first-pass-Effekt zu Stande kommt.

Die Auswertung der leberspezifischen Enzymkonzentrationen im periphervenösen Blut diente ebenfalls als Indikator einer eventuellen infusions- bzw. wirkstoffbedingten hepatozellulären Schädigung. Einer regredienten Entwicklung der GLDH-Konzentration nach systemischer Infusion stand eine tendenzielle Steigerung der Enzymkonzentration nach lokaler Wirkstoffgabe gegenüber, was eine durch die Infusion bedingte hepatozelluläre Schädigung nahelegt. Diese Steigerung in den oxaliplatinhaltigen Gruppen war statistisch signifikant. So kann ein hepatotoxischer Effekt bei hohen lokalen Oxaliplatinkonzentrationen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dieser Zusammenhang wurde bereits in anderen Studien nachgewiesen [Del Freo et al., 2006, Neyns et al., 2006]. Möglicherweise tragen auch hier unphysiologische Perfusionsdrücke im Rahmen der hepato-arteriellen Infusion dazu bei, dass die durch Oxaliplatin verursachte Alteration des Lebergewebes weiter zunimmt.

Die  $\gamma$ -GT-Konzentration als sehr sensitiver Parameter stieg nach therapeutischer Intervention deutlich an. Diese Elevation ließ sich in nahezu allen Therapieregimen nachweisen, sodass kein Anhalt für klare infusionsmodell- bzw. wirkstoffassoziierte Schädigungen besteht.

Die LDH-Konzentration als Parameter für die allgemeine Gewebeschädigung nahm in allen Gruppen unabhängig vom Applikationsweg unterschiedlich stark ab. Vermutlich sind hohe Ausgangswerte, die durch die Tumorimplantation verursacht wurden, für die insgesamt regrediente Entwicklung verantwortlich. Die erneute chirurgische Intervention am Versuchstag 10 beeinflusste die tendenzielle Abnahme der LDH-Konzentration also nicht.

### 7.2.2 Hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan

Wie bereits in Kapitel 6.2.3. beschrieben, konnte durch die hepato-arterielle Infusion der beiden antikörperhaltigen Therapieregime eine fast vollständige Stase des Metastasenwachstums erzielt werden. Trotz der deutlichen Tendenz erreichten beide Therapieansätze keine Wachstumshemmung in statistisch signifikantem Ausmaß. Bezogen auf das Infusionsmodell ergaben sich hingegen signifikante Vorteile für die hepato-arterielle Anwendung. Während die systemische Applikation der antikörperhaltigen Therapieregime mit einem uneingeschränkt progredienten Wachstum der Metastasen auf etwa das Doppelte des Ausgangsvolumens verbunden war, blieb die Metastasengröße nach lokaler Applikation nahezu unverändert.

Es zeigte sich zudem, dass die alleinige Applikation von Irinotecan weder nach hepato-arterieller noch nach systemischer Infusion das Metastasenwachstum wesentlich beeinflussen konnte. Diese Datenkonstellation legt synergistische Wirkungsweisen zwischen den monoklonalen Antikörpern wie auch zwischen Antikörpern und Irinotecan nahe, die lediglich im Rahmen der lokalen Anwendung zum tragen kommen.

Ein wesentliches Korrelat, das der antitumorösen Wirksamkeit der Therapiekombination Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan zugrunde liegt, besteht in der gesteigerten Apoptoseinzidenz, die nach hepato-arterieller Infusion im Vergleich zur Kontrollgruppe eintritt. Ein signifikanter Vorteil gegenüber der dualen Antikörpertherapie bzw. Irinotecanmonotherapie konnte jedoch nicht festgestellt werden. So wird die in Kapitel 7.1.5. dargelegte Hypothese, dass sich anti-angiogenes Potential von Bevacizumab und pro-apoptotisches Potential von Irinotecan gegenseitig ergänzen und sich dies in einer additiv

gesteigerten Apoptoserate manifestiert [Wildiers et al., 2003], durch die vorliegende Ergebniskonstellation nicht gestützt.

Ein Grund für das Ausbleiben des erwarteten synergistischen Effektes liegt möglicherweise in der zeitlich nicht getrennten Wirkstoffapplikation, die in dieser Studie praktiziert wurde. Durch simultane Applikation der Wirkstoffe ist eine stufenweise ablaufende Wirkkaskade mit primärer Bevacizumab-induzierter „Normalisierung“ der Tumorperfusion und anschließender verbesserter Distribution der weiteren Therapiekomponenten, wie sie von Jain et al. postuliert wurde, nur bedingt möglich [Jain, 2005]. Es wäre zu überprüfen, ob eine getrennte Infusion mit primärer Applikation von Bevacizumab und darauf folgender Irinotecaninfusion den antiapoptotischen Effekt deutlicher hervorheben kann.

Die antitumoröse Wirkung der Kombination aus Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan beruht zudem auf einer deutlichen Hemmung der Tumorzellproliferation. So konnte anhand der quantitativen Auswertung des immunhistochemischen Markers PCNA gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Hemmung der Tumorzellproliferation nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Ciardiello et al., die ein synergistisches Zusammenwirken von anti-EGFR-Therapie und Topoisomerase-1-Inhibitoren nachweisen konnten. So führte die simultane Applikation des anti-EGFR-Antikörper CC-225 in Kombination mit Topotecan auch hier zu einer supraadditiven Hemmung der kolorektalen Tumorzellproliferation. Beiden Substanzen ist ein ausgeprägtes zytostatisches Potential gemein, das sich nach gemeinsamer Applikation aufaddiert. Den Autoren zufolge resultiert ein verstärkter Arrest der Tumorzellen, insbesondere in der G1-Zyklusphase [Ciardiello et al., 1999]. Zudem ist von Prewett et al. im Versuch mit einem kolorektalen Xenograftmodell eine starke Konzentrationsabhängigkeit dieses Effekts nachgewiesen worden, was den tendenziellen Vorteil nach hepato-arterieller Anwendung erklären würde [Prewett et al., 2002].

Die lokale Irinotecanmonotherapie ergab gegenüber einer systemischen Anwendung tendenzielle Vorteile. So zeigte sich nach hepato-arterieller Irinotecanapplikation eine stärker ausgeprägte Proliferationshemmung als dies nach systemischer Applikation der Fall war. Diese Beobachtung ist mit Studienergebnissen vereinbar, die eine Überlegenheit der hepato-

arteriellen Gabe von Irinotecan gegenüber einer intravenösen postulierem [Fiorentini et al., 2001, Hofmann et al., 2005].

Zentraler Mechanismus für die anti-tumoröse Wirksamkeit, insbesondere der antikörperhaltigen Therapiegruppen, ist die Inhibition der Tumorangio-genese. Alle Wirkstoffgruppen wiesen unabhängig vom Infusionsmodell eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere antiangiogene Wirkung auf. Die hepato-arterielle Infusion von Cetuximab, Bevacizumab und Irinotecan konnte die Gefäßneubildung nahezu um den Faktor 4 vermindern und war sowohl der alleinigen Antikörperinfusion als auch der Monotherapie mit Irinotecan überlegen. Die hepato-arterielle Applikation dieser Kombination wies zudem eine signifikant stärkere Wirksamkeit gegenüber der systemischen Infusion auf. Dieses gesteigerte antiangiogene Potential der Kombinationstherapie beruht vermutlich auf dem bereits beschriebenen synergistischen Zusammenwirken von Bevacizumab und Irinotecan. Dieser Effekt kommt durch den Konzentrationsvorteil, der sich aus der hepato-arteriellen Infusion ergibt, noch deutlicher zur Ausprägung.

Wie bereits in Kapitel 7.1.5 erläutert, bewirkt eine anti-VEGF-Therapie mittels Bevacizumab eine gesteigerte funktionelle Vaskularisation des Tumorgewebes. Dieser von Wildiers et al. dargelegte Mechanismus in Verbindung mit einer ebenfalls durch Bevacizumab induzierten Abnahme der Gefäßpermeabilität kann letztlich zu einer verbesserten Wirkstoffdistribution mit gesteigerter Verfügbarkeit von Irinotecan sowohl im metastatischen Gewebe als auch im intravasalen Kompartiment führen [Wildiers et al., 2003]. Das von vielen Autoren beschriebene antiangiogene Potential von Irinotecan kommt auf diese Weise deutlicher zum Tragen [Ji et al., 2007, O'Leary et al., 1999].

Zudem führt Cetuximab als ergänzende Therapiekomponente zu einer reduzierten Freisetzung von VEGF und anderer proangiogenen Faktoren, was eine zusätzliche Inhibition der tumorinduzierten Neoangiogenese bewirkt [Bruns et al., 2000, Inoue et al., 2000, Perrotte et al., 1999]. Die beschriebenen Effekte werden durch lokale Applikation und der damit einhergehenden gesteigerten Wirkstoffkonzentrationen weiter intensiviert. So ist die lokale Gabe der antikörperhaltigen Therapieregime gegenüber der systemischen Applikation mit einer signifikant gesteigerten Angiogenesehemmung verbunden.

Die Beurteilung von Grobscholligkeit und Vakuolisierung an HE-gefärbten Gewebeschnitten diente auch hier der Erfassung einer etwaigen hepatozellulären Schädigung. Die Auswertung der einzelnen Versuchsgruppen ermöglicht differenzierte Aussagen über

wirkstoff- bzw. infusionsbedingte Effekte. Der Ausprägungsgrad von Vakuolisierung und Grobscholligkeit war nach hepato-arterieller Infusion in allen Wirkstoffgruppen vergleichbar, was einen wesentlichen substanzassoziierten Leberzellschaden unwahrscheinlich macht. Auch die Wahl des Infusionsmodells hatte bezogen auf die wirkstoffbasierten Therapiegruppen keinen erheblichen Einfluss auf die Ausprägung der morphologischen Schädigungsparameter Vakuolisierung und Grobscholligkeit. Lediglich die lokale Infusion der NaCl-haltigen Kontrollösung war im Vergleich zur systemischen Applikation mit einem signifikanten Anstieg beider Merkmale assoziiert. Diese Beobachtung, die bereits in den Oxaliplatin-Kontrollgruppen in Erscheinung trat, kann auf einen mechanisch bedingten Infusionsschaden zurückgeführt werden, der die Anwesenheit von NaCl voraussetzt. Die im Rahmen der lokalen Applikation auftretenden unphysiologisch hohen Perfusionsdrücke innerhalb der Lebergefäße führen möglicherweise zu Flüssigkeits- und Elektrolytverschiebungen ins Interstitium, was mit einer Veränderung der hepatozellulären Integrität einher gehen kann [Gellert et al., 1985, Jahn, 1972]. Zusätzlich zu diesen direkt infusionsassoziierten Effekten sind auch osmotische Vorgänge an der Hepatozytenmembran denkbar, die eine vermehrte Flüssigkeitsaufnahme in die Zelle bewirken [Graf et al., 1996].

Eine signifikante Schädigung der Venolen mit vermehrten Endothelläsionen, Fibrinthromben oder abnorm gesteigerter Erythrozytenwandständigkeit konnte in den Wirkstoffgruppen weder nach hepato-arterieller noch nach systemischer Infusion beobachtet werden.

Der Verlauf von Hämoglobin- und Thrombozytenkonzentration nach Versuchsdurchführung war in allen Wirkstoffgruppen unauffällig. Auch hier sind die moderaten Abnahmen des Hämoglobinwertes auf den perioperativen Blutverlust zurückzuführen. Ansteigende Leukozytenkonzentrationen, die in nahezu allen Therapiegruppen beobachtet werden konnten, sind Ausdruck einer systemischen Inflammationsreaktion, bedingt durch die chirurgische Intervention.

Die Konzentrationsentwicklung der leberspezifischen Enzyme ergab keine signifikanten Schwankungen. In allen Versuchsgruppen kam es zu einer Steigerung der  $\gamma$ -GT-Konzentration. Auch die GLDH-Konzentration stieg in nahezu allen Versuchsgruppen an, was eine hepatozelluläre Affektion des Parenchyms nahe legt. Ein Nachweis für eine wirkstoff- bzw. infusionsmodellassozierte Toxizität, ließ sich jedoch nicht zeigen.

## 7.3 Schlussfolgerung

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Studie, dass die Applikation der monoklonalen Antikörper Cetuximab und Bevacizumab allein oder in Kombination mit Irinotecan und Oxaliplatin im Rahmen einer hepato-arteriellen Infusion hinsichtlich der Inhibition des Wachstums von CC-531 kolorektalen Lebermetastasen einer systemischen Applikation therapeutisch überlegen ist. Gerade in Kombination mit Oxaliplatin ergaben sich signifikante Vorteile gegenüber der systemischen Applikation. Ob der hier im Tierversuch nachgewiesene Effekt sich direkt auf den menschlichen Organismus übertragen lässt, muss durch klinische Studien evaluiert werden. Hierbei sollte ein besonderes Augenmerk auf die Verträglichkeit des Therapiesettings gelegt werden. Die hier gemachten Aussagen lassen zwar ein akzeptables Toxizitätsprofil und eine adäquate Verträglichkeit vermuten, zeigen aber dennoch wirkstoff- und infusionsassoziierte Unterschiede.

Unter Berücksichtigung der in Kapitel 3.3.1.1 gemachten Aussagen sollte im Rahmen klinischer Untersuchungen prätherapeutisch eine K-ras-Mutationsanalyse erfolgen, da eine Cetuximab-basierte Therapie lediglich bei Wildtypträgern einen zusätzlichen therapeutischen Nutzen verspricht.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

3-D	Dreidimensional
A./Aa	Arteria/Arteriae
ALAT	Alaninaminotransferase
ANOVA	analysis of variance
ASAT	Aspartataminotransferase
BE	Bevacizumab
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Zirka
CAE	AS-D Chloracetatesterase
CAM	cell adhesion molecule
CD	cluster of differentiation
CE	Cetuximab
CEA	Carcino embryonales Antigen
Cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
DMH	1,2-Dimethylhydrazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
EGFR	epidermal growth factor Rezeptor
ET	Endothelin
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FCS	fetal calf serum
5-FU	5-Fluoruracil
FUDR	Fluorodeoxyuridin
g	Gramm
γ-GT	γ-Glutamyl-Transferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LDH	Laktatdehydrogenase
HAI	hepato-arterielle Infusion

Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HNPCC	Hereditäres nocht-polypöses kolorektales Karzinom
HPF	high power field
ID	Innendurchmesser
i.d.R	in der Regel
Ig	Immunglobulin
IR	Irinotecan
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KRK	Kolorektales Karzinom
LITT	laserinduzierte Thermotherapie
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAP	mitogen activated protein
max.	maximal
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mHz	Megahertz
min	Minute
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OX	Oxaliplatin
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PI-3-K	Phosphoinositol-3-Kinase
PBS	phosphate buffered solution

PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDS	Polydioxanon
PE	Polyethylen
PET	Positronenemissionstomographie
R0	Resektion ohne Resttumor
Raf	rat fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RFA	Radiofrequenzablation
SD	standard deviation
SEM	standard error of the mean
SYS	systemisch
TF	tissue factor
TGF	transforming growth factor
U/min	Umdrehungen pro Minute
u.a.	und andere
VEGF	vascular endothelial growth factor
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 9 Literatur

1. Abu-Lila A, Suzuki T, Doi Y, Ishida T, Kiwada H (2009) Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. *J Control Release* 134: 18-25.
2. Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, Giacchetti S, Paule B, Kunstlinger F, Ghemard O, Levi F, Bismuth H (2004) Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 240: 644-657
3. Al-Taie O, Mörk H, Seufert J, Treis H, Jakob F, Scheurlen M (2002) Hereditäres Non-Polyposis kolorektales Karzinom (HNPCC). *Coloproctology* 24: 1-13.
4. Alberts SR, Wagman LD (2008) Chemotherapy for colorectal cancer liver metastases. *Oncologist* 13: 1063-1073.
5. Archer SG, Gray BN (1989) Vascularization of small liver metastases. *Br J Surg* 76: 545-548.
6. Arteaga CL (2002) Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 29: 3-9.
7. Balin-Gauthier D, Delord JP, Pillaire MJ, Rochaix P, Hoffman JS, Bugat R, Cazaux C, Canal P, Allal BC (2008) Cetuximab potentiates oxaliplatin cytotoxic effect through a defect in NER and DNA replication initiation. *Br J Cancer* 98: 120-128.
8. Bierman HR, Miller ER, Byron RL, Dod KS, Kelly KH, Black DH (1951) Intra-arterial catheterization of viscera in man. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med* 66: 555-568.
9. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, Donea S, Ludwig H, Schuch G, Stroh C, Loos AH, Zobel 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.
10. Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327: 293-297.
  11. Boyle P, Ferlay J (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16: 481-488.
  12. Breedis C, Young G (1954) The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol* 30: 969-977.
  13. Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ, Evans DB, Abbruzzese JL, Hicklin DJ, Radinsky R (2000) Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 6: 1936-1948.
  14. Bundesamt S (2005) Todesursachen, Sterbefälle insgesamt 2005 nach den 10 häufigsten Todesursachen der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10).
  15. Burkel WE (1970) The fine structure of the terminal branches of the hepatic arterial system of the rat. *Anat Rec* 167: 329-349.
  16. Cagol PP, Pasqual E, Bacchetti S (2006) Potential advantages of loco-regional intra-arterial chemotherapy. *In Vivo* 20: 777-779.
  17. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferraresso 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.

18. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y (2005) Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol* 53: 3-11.
19. Chang AE, Schneider PD, Sugarbaker PH, Simpson C, Culnane M, Steinberg SM (1987) A prospective randomized trial of regional versus systemic continuous 5-fluorodeoxyuridine chemotherapy in the treatment of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 206: 685-693.
20. Chen MC, Tsang YM, Stark DD, Weissleder R, Saini S, Brandhorst J, White DL, Engelstad BL, Ferrucci JT (1989) Hepatic metastases: rat models for imaging research. *Magn Reson Imaging* 7: 1-8.
21. Ciardiello F, Bianco R, Damiano V, De Lorenzo S, Pepe S, De Placido S, Fan Z, Mendelsohn J, Bianco AR, Tortora G (1999) Antitumor activity of sequential treatment with topotecan and anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225. *Clin Cancer Res* 5: 909-916.
22. Ciardiello F, Damiano V, Bianco R, Bianco C, Fontanini G, De Laurentiis M, De Placido S, Mendelsohn J, Bianco AR, Tortora G (1996) Antitumor activity of combined blockade of epidermal growth factor receptor and protein kinase A. *J Natl Cancer Inst* 88: 1770-1776.
23. Cohen AD, Kemeny NE (2003) An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. *Oncologist* 8: 553-566.
24. Collins JM (1984) Pharmacologic rationale for regional drug delivery. *J Clin Oncol* 2: 498-504.
25. 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.

26. Del Freo A, Fiorentini G, Sanguinetti F, Muttini MP, Pennucci C, Mambrini A, Pacetti P, Della Seta R, Lombardi M, Torri T, Cantore M (2006) Hepatic arterial chemotherapy with oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil in pre-treated patients with liver metastases from colorectal cancer. *In Vivo* 20: 743-746.
27. Delis S, Triantopoulou C, Bakoyiannis A, Tassopoulos N, Athanasiou K, Dervenis C (2009) Sclerosing cholangitis in the era of target chemotherapy: a possible anti-VEGF effect. *Dig Liver Dis* 41: 72-77.
28. Ducreux M, Ychou M, Laplanche A, Gamelin E, Lasser P, Husseini F, Quenet F, Viret F, Jacob JH, Boige V, Elias D, Delpero JR, Luboinski 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.
29. Dzodic R, Gomez-Abuin G, Rougier P, Bonnay M, Ardouin P, Gouyette A, Rixe O, Ducreux M, Munck JN (2004) Pharmacokinetic advantage of intra-arterial hepatic oxaliplatin administration: comparative results with cisplatin using a rabbit VX2 tumor model. *Anticancer Drugs* 15: 647-650.
30. Ellerbroek SM, Halbleib JM, Benavidez M, Warmka JK, Wattenberg EV, Stack MS, Hudson LG (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase activity in epidermal growth factor-stimulated matrix metalloproteinase-9 production and cell surface association. *Cancer Res* 61: 1855-1861.
31. Ensminger WD (2002) Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy: pharmacologic principles. *Semin Oncol* 29: 119-125.
32. Epenetos AA, Courtenay-Luck N, Dhokia B, Snook D, Hooker G, Lavender JP, Hemmingway A, Carr D, Paraharalambous M, Bosslet K (1987) Antibody-guided irradiation of hepatic metastases using intrahepatically administered radiolabelled anti-CEA antibodies with simultaneous and reversible hepatic blood flow stasis using biodegradable starch microspheres. *Nucl Med Commun* 8: 1047-1058.

33. Erdman SH, Wu HD, Hixson LJ, Ahnen DJ, Gerner EW (1997) Assessment of mutations in Ki-ras and p53 in colon cancers from azoxymethane- and dimethylhydrazine-treated rats. *Mol Carcinog* 19: 137-144.
34. Extra JM, Marty M, Brienza S, Misset JL (1998) Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol* 25: 13-22.
35. Fan F, Gray MJ, Dallas NA, Yang AD, Van Buren G, 2nd, Camp ER, Ellis LM (2008) Effect of chemotherapeutic stress on induction of vascular endothelial growth factor family members and receptors in human colorectal cancer cells. *Mol Cancer Ther* 7: 3064-3070.
36. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676.
37. Fiorentini G, Lucchi SR, Giovanis P, Cantore M, Guadagni S, Papianni G (2001) Irinotecan hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer: results of a phase I clinical study. *Tumori* 87: 388-390.
38. Flieger D, Keller R, Fischbach W (2004) Kolorektales Karzinom. *Der Internist* 45: 786-794.
39. Fong Y, Salo J (1999) Surgical therapy of hepatic colorectal metastasis. *Semin Oncol* 26: 514-523.
40. Gall FP (1987) [Resection of liver metastases]. *Onkologie* 10: 247-249
41. Gallagher DJ, 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.

42. Gellert K, David H, Otto G, Uerlings I, Wolff H (1985) Alteration of the ultrastructure of the pig liver after a continuous perfusion of six hours in vitro. *Exp Pathol* 28: 245-250.
43. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts SR (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.
44. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1: 1311-1318.
45. Gonda T, Ishida H, Yoshinaga K, Sugihara K (2000) Microvasculature of small liver metastases in rats. *J Surg Res* 94: 43-48.
46. Graf J, Haussinger D (1996) Ion transport in hepatocytes: mechanisms and correlations to cell volume, hormone actions and metabolism. *J Hepatol* 24 Suppl 1: 53-77.
47. Graham KC, Wirtzfeld LA, MacKenzie LT, Postenka CO, Groom AC, MacDonald IC, Fenster A, Lacefield JC, Chambers AF (2005) Three-dimensional high-frequency ultrasound imaging for longitudinal evaluation of liver metastases in preclinical models. *Cancer Res* 65: 5231-5237.
48. Grundmann RT, Hermanek P, Merkel S, Germer CT, Hauss J, Henne-Bruns D, Herfarth K, Hopt UT, Junginger T, Klar E, Klempnauer J, Knapp WH, Kraus M, Lang H, Link KH, Lohe F, Oldhafer KJ, Raab HR, Rau HG, Reinacher-Schick A, Ricke J, Roder J, Schafer AO, Schlitt HJ, Schon MR, Stippel D, Tannapfel A, Tatsch K, Vogl TJ (2008) [Diagnosis and treatment of colorectal liver metastases - workflow]. *Zentralbl Chir* 133: 267-284.
49. 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.
50. Gutt CN, Kim ZG, Gessmann T, Lorenz M, Paolucci V (2000) Hepatic tumor spread of colorectal cancer in a laparoscopic animal model. *Surg Endosc* 14: 448-451.
  51. Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth BM German cancer statistics 2004. *BMC Cancer* 10: 52.
  52. Hagens M, Ensink NG, Koelemij R, Basse PH, Eggermont AM, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ (1998) Regional administration of natural killer cells in a rat hepatic metastasis model results in better tumor infiltration and anti-tumor response than systemic administration. *Int J Cancer* 75: 233-238.
  53. Hamm B, Taupitz M (1993) [A liver tumor model in the rat suitable for experimental MRT]. *Rofo* 158: 332-336.
  54. Heuff G, van der Ende MB, Boutkan H, Prevoo W, Bayon LG, Fleuren GJ, Beelen RH, Meijer S, Dijkstra CD (1993) Macrophage populations in different stages of induced hepatic metastases in rats: an immunohistochemical analysis. *Scand J Immunol* 38: 10-16.
  55. 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.
  56. Hohn DC, Stagg RJ, Friedman MA, Hannigan JF, Jr., Rayner A, Ignoffo RJ, Acord P, Lewis BJ (1989) A randomized trial of continuous intravenous versus hepatic intraarterial floxuridine in patients with colorectal cancer metastatic to the liver: the Northern California Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 7: 1646-1654.
  57. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F

- (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342.
58. Hurwitz H, Kabbinavar F (2005) Bevacizumab combined with standard fluoropyrimidine-based chemotherapy regimens to treat colorectal cancer. *Oncology* 69 Suppl 3: 17-24.
59. Idelevich E, Greif F, Mavor E, Miller R, Kashtan H, Susmalian S, Ariche A, Brenner B, Baruch NB, Dinerman M, Shani A (2009) Phase II study of UFT with leucovorin plus hepatic arterial infusion with irinotecan, 5-fluorouracil and leucovorin for non-resectable liver metastases of colorectal cancer. *Chemotherapy* 55: 76-82.
60. Inoue K, Slaton JW, Perrotte P, Davis DW, Bruns CJ, Hicklin DJ, McConkey DJ, Sweeney P, Radinsky R, Dinney CP (2000) Paclitaxel enhances the effects of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ImClone C225 in mice with metastatic human bladder transitional cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 4874-4884.
61. Italiano A (2006) Targeting the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: advances and controversies. *Oncology* 70: 161-167.
62. Jacoby RF, Llor X, Teng BB, Davidson NO, Brasitus TA (1991) Mutations in the K-ras oncogene induced by 1,2-dimethylhydrazine in preneoplastic and neoplastic rat colonic mucosa. *J Clin Invest* 87: 624-630.
63. Jahn W (1972) [Uptake of water and substances of high molecular weight by the isolated perfused liver during phalloidin poisoning and during increased posthepatic pressure]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 275: 405-418.
64. Jain RK (1990) Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res* 50: 814s-819s.
65. Jain RK (2005) Antiangiogenic therapy for cancer: current and emerging concepts. *Oncology (Williston Park)* 19: 7-16.

66. Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307: 58-62.
67. Jain RK (1990) Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev* 9: 253-266.
68. Ji Y, Hayashi K, Amoh Y, Tsuji K, Yamauchi K, Yamamoto N, Tsuchiya H, Tomita K, Bouvet M, Hoffman RM (2007) The camptothecin derivative CPT-11 inhibits angiogenesis in a dual-color imageable orthotopic metastatic nude mouse model of human colon cancer. *Anticancer Res* 27: 713-718.
69. Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A, McCuskey PA, Wright KC, Wallace S, McCuskey RS (1993) In vivo microscopy of hepatic tumors in animal models: a dynamic investigation of blood supply to hepatic metastases. *Radiology* 187: 621-626.
70. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR (2008) K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 359: 1757-1765.
71. Kemeny N, Daly J, Reichman B, Geller N, Botet J, Oderman P (1987) Intrahepatic or systemic infusion of fluorodeoxyuridine in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. A randomized trial. *Ann Intern Med* 107: 459-465.
72. Kemeny N, Gonen M, Sullivan D, Schwartz L, Benedetti F, Saltz L, Stockman J, Fong Y, Jarnagin W, Bertino J, Tong W, Paty P (2001) Phase I study of hepatic arterial infusion of floxuridine and dexamethasone with systemic irinotecan for unresectable hepatic metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 19: 2687-2695.
73. Kemeny N, Jarnagin W, Paty P, Gonen M, Schwartz L, Morse M, Leonard G, D'Angelica M, DeMatteo R, Blumgart L, Fong Y (2005) Phase I trial of systemic oxaliplatin combination chemotherapy with hepatic arterial infusion in patients with unresectable liver metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23: 4888-4896.

74. Kern W, Beckert B, Lang N, Stemmler J, Beykirch M, Stein J, Goecke E, Wiggershauser 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.
75. Kim D, Cheng GZ, Lindsley CW, Yang H, Cheng JQ (2005) Targeting the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway for the treatment of cancer. *Curr Opin Investig Drugs* 6: 1250-1258.
76. Koc A, Duru M, Ciralik H, Akcan R, Sogut S (2005) Protective agent, erdosteine, against cisplatin-induced hepatic oxidant injury in rats. *Mol Cell Biochem* 278: 79-84.
77. Koesters R, Hans MA, Benner A, Probst R, Boehm J, Gahlen J, Doeberitz MK (2001) Predominant mutation of codon 41 of the beta-catenin proto-oncogene in rat colon tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine using a complete carcinogenic protocol. *Carcinogenesis* 22: 1885-1890.
78. Kollmar O, Schilling MK, Menger MD (2004) Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis* 21: 453-460.
79. Konopke R, Saeger HD (2003) Lebermetastasen. *Der Chirurg* 74: 866-886.
80. Kramer I, Lipp HP (2007) Bevacizumab, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *J Clin Pharm Ther* 32: 1-14.
81. Kuppen PJ, Marinelli A, Camps JA, Pauwels EK, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Eggermont AM (1992) Biodistribution of lymphokine-activated killer (LAK) cells in Wag rats after hepatic-artery or jugular-vein infusion. *Int J Cancer* 52: 266-270.
82. Kuppen PJ, van der Eb MM, Jonges LE, Hagenaars M, Hokland ME, Nannmark U, Goldfarb RH, Basse PH, Fleuren GJ, Hoeben RC, van de Velde CJ (2001) Tumor

- structure and extracellular matrix as a possible barrier for therapeutic approaches using immune cells or adenoviruses in colorectal cancer. *Histochem Cell Biol* 115: 67-72.
83. Ladurner R, Konigsrainer A (2007) [Liver surgery: what is feasible?]. *Zentralbl Chir* 132: 274-280.
84. Lee CG, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD, Boucher Y (2000) Anti-Vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Res* 60: 5565-5570.
85. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, Cote JF, Tomasic G, Penna C, Ducreux M, Rougier P, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P (2006) KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res* 66: 3992-3995.
86. Liu L, Sun H, Valji WY, Pang KS (2007) Transporters, enzymes, and enalapril removal in a rat (CC531-induced) liver metastatic model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293: G1078-1088.
87. Martin RC, 2nd, Scoggins CR, McMasters KM (2006) A phase II study of radiofrequency ablation of unresectable metastatic colorectal cancer with hepatic arterial infusion pump chemotherapy. *J Surg Oncol* 93: 387-393.
88. 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.
89. Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* 14: 519-522.
90. 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.

91. Mocellin S, Pilati P, Lise M, Nitti D (2007) Meta-analysis of hepatic arterial infusion for unresectable liver metastases from colorectal cancer: the end of an era? *J Clin Oncol* 25: 5649-5654.
92. Muhrer K, Bosslet K, Aigner K, Holzheimer R, Grebe S (1986) Intraarterial infusion of monoclonal antibodies (Anti-CEA) in patients with liver metastases of colorectal carcinomas. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 111: S98-S98.
93. Neyns B, Van Nieuwenhove Y, Aerts M, Fontaine C, Vermeij J, Schallier D, Decoster L, De Mey J, Vandembroucke F, Hoorens A, Delvaux G, De Greve J (2006) Hepatic arterial infusion of oxaliplatin and L-folinic acid-modulated 5-fluorouracil for colorectal cancer liver metastases. *Anticancer Res* 26: 611-619.
94. Nizze H, Hebecker R, Stropahl G, Putzke HP, Barten M, Kackenmeister A (1995) [primary and secondary malignant liver tumors at autopsy, biopsy and cytology: frequency and problems of differential diagnosis]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 79: 137-143.
95. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC, Balladur P, Boudjema K, Bachellier P, Jaeck D (1996) Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. *Association Francaise de Chirurgie. Cancer* 77: 1254-1262.
96. O'Leary JJ, Shapiro RL, Ren CJ, Chuang N, Cohen HW, Potmesil M (1999) Antiangiogenic effects of camptothecin analogues 9-amino-20(S)-camptothecin, topotecan, and CPT-11 studied in the mouse cornea model. *Clin Cancer Res* 5: 181-187.
97. Okuno K, Hirai N, Lee YS, 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 <sup>19</sup>F NMR study. *Cancer Chemother Pharmacol* 42: 341-344.
98. Peeters M, Douillard JY, Van Cutsem E, Siena S, Zhang K, Williams R, Wiezorek J (2013) Mutant KRAS Codon 12 and 13 Alleles in Patients With Metastatic Colorectal

- Cancer: Assessment As Prognostic and Predictive Biomarkers of Response to Panitumumab. *J Clin Oncol* 31: 759-765
99. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP (1999) Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 5: 257-265.
100. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS (1997) Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151: 1523-1530.
101. Power DG, Kemeny NE (2009) The role of floxuridine in metastatic liver disease. *Mol Cancer Ther* 8: 1015-1025
102. Prabhudesai SG, Rekhraj S, Roberts G, Darzi AW, Ziprin P (2007) Apoptosis and chemo-resistance in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 96: 77-88.
103. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N (1997) Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57: 4593-4599.
104. Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, Ellis LM, Waksal HW, Hicklin DJ (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.
105. Reed E (1998) Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 24: 331-344.

106. Richter S, Pistorius G, Seidel R, Feifel G, Schilling MK, Vollmar B, Menger MD (2005) Arteriolo-venular shunting critically determines shutdown of microcirculation upon cryotherapy in tumor-bearing rat liver. *Ann Surg Oncol* 12: 303-312.
107. Rosenberg R, Stangl M, Siewert J. Chirurgische Therapie von Lebermetastasen. *Praxis der Viszeralchirurgie*; 2006. p. 575-586.
108. Rothbarth J, Woutersen RA, Sparidans RW, van de Velde CJ, Mulder GJ (2003) Melphalan antitumor efficacy and hepatotoxicity: the effect of variable infusion duration in the hepatic artery. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 1098-1103.
109. Rubbia-Brandt L, Audard V, Sartoretti P, Roth AD, Brezault C, Le Charpentier M, Dousset B, Morel P, Soubrane O, Chaussade S, Mentha G, Terris B (2004) Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 15: 460-466.
110. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ, Maroun JA, Ackland SP, Locker PK, Pirota N, Elfring GL, Miller LL (2000) Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 343: 905-914.
111. Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ, Sr., Needle MN, Kopit J, Mayer RJ (2004) Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 22: 1201-1208.
112. Schafer T, Sperling J, Kollmar O, Richter S, Schilling MK, Menger MD, Lindemann W Early effect of hepatic artery TNF-alpha infusion on systemic hemodynamics and inflammation: a dose-response study in pigs. *Int J Colorectal Dis* 25: 523-532.
113. Schramm K, Krause K, Bittroff-Leben A, Goldin-Lang P, Thiel E, Kreuser ED (2000) Activated K-ras is involved in regulation of integrin expression in human colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 87: 155-164.

114. Sears HF, Atkinson B, Mattis J, Ernst C, Herlyn D, Steplewski Z, Hayry P, Koprowski H (1982) Phase-I clinical trial of monoclonal antibody in treatment of gastrointestinal tumours. *Lancet* 1: 762-765.
115. Shimonov M, Hayat H, Chaitchik S, Brener J, Schachter P, Czerniak A (2005) Combined systemic chronotherapy and hepatic artery infusion for the treatment of metastatic colorectal cancer confined to the liver. *Chemotherapy* 51: 111-115.
116. Sigurdson ER, Ridge JA, Kemeny N, Daly JM (1987) Tumor and liver drug uptake following hepatic artery and portal vein infusion. *J Clin Oncol* 5: 1836-1840.
117. Stewart DJ, Benjamin RS, Zimmerman S, Caprioli RM, Wallace S, Chuang V, Calvo D, 3rd, Samuels M, Bonura J, Loo TL (1983) Clinical pharmacology of intraarterial cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 43: 917-920.
118. Tabernero J, Van Cutsem E, Diaz-Rubio E, Cervantes A, Humblet Y, Andre T, Van Laethem JL, Soulie P, Casado E, Verslype C, Valera JS, Tortora G, Ciardiello F, Kisker O, de Gramont A (2007) Phase II trial of cetuximab in combination with fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 25: 5225-5232.
119. Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55: 3964-3968.
120. Takasaki S, Hano H (2001) Three-dimensional observations of the human hepatic artery (Arterial system in the liver). *J Hepatol* 34: 455-466.
121. Thomas C, Nijenhuis AM, Timens W, Kuppen PJ, Daemen T, Scherphof GL (1993) Liver metastasis model of colon cancer in the rat: immunohistochemical characterization. *Invasion Metastasis* 13: 102-112.

122. Tol J, Koopman M, Rodenburg CJ, Cats A, Creemers GJ, Schrama JG, Erdkamp FL, Vos AH, Mol L, Antonini NF, Punt CJ (2008) A randomised phase III study on capecitabine, oxaliplatin and bevacizumab with or without cetuximab in first-line advanced colorectal cancer, the CAIRO2 study of the Dutch Colorectal Cancer Group (DCCG). An interim analysis of toxicity. *Ann Oncol* 19: 734-738.
123. Trarbach T, Lang H, Köhne CH, Schmitz S (2007) Lebermetastasen beim kolorektalem Karzinom. *Best Practice Onkologie* 2: 26-37.
124. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, 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.
125. van Duijnhoven FH, Tollenaar RA, Terpstra OT, Kuppen PJ (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.
126. van Etten B, de Vries MR, van IMG, Lans TE, Guetens G, Ambagtsheer G, van Tiel ST, de Boeck G, de Bruijn EA, Eggermont AM, ten Hagen TL (2003) Degree of tumour vascularity correlates with drug accumulation and tumour response upon TNF-alpha-based isolated hepatic perfusion. *Br J Cancer* 88: 314-319.
127. van Hillegersberg R, Marijnissen JP, Kort WJ, Zondervan PE, Terpstra OT, Star WM (1992) Interstitial photodynamic therapy in a rat liver metastasis model. *Br J Cancer* 66: 1005-1014.
128. van Riel JM, van Groeningen CJ, de Greve J, Gruia G, Pinedo HM, Giaccone G (2004) Continuous infusion of hepatic arterial irinotecan in pretreated patients with colorectal cancer metastatic to the liver. *Ann Oncol* 15: 59-63.

129. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N (1995) Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* 95: 1789-1797.
130. Weissleder R (2002) Scaling down imaging: molecular mapping of cancer in mice. *Nat Rev Cancer* 2: 11-18.
131. Wildiers H, Guetens G, De Boeck G, Verbeken E, Landuyt B, Landuyt W, de Bruijn EA, van Oosterom AT (2003) Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *Br J Cancer* 88: 1979-1986.
132. Wu G, Wang L, Yu L, Wang H, Xuan JW (2005) The use of three-dimensional ultrasound micro-imaging to monitor prostate tumor development in a transgenic prostate cancer mouse model. *Tohoku J Exp Med* 207: 181-189.
133. Wu X, Fan Z, Masui H, Rosen N, Mendelsohn J (1995) Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J Clin Invest* 95: 1897-1905.
134. Yang R, Rescorla FJ, Reilly CR, Faught PR, Sanghvi NT, Lumeng L, Franklin TD, Jr., Grosfeld JL (1992) A reproducible rat liver cancer model for experimental therapy: introducing a technique of intrahepatic tumor implantation. *J Surg Res* 52: 193-198.

## **10 Danksagung**

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung der Arbeit bedanken.

Ganz besonders danke ich meinem Betreuer, Dr. med. Jens Sperling, der mir sowohl bei der praktischen Durchführung als auch bei der theoretischen Ausarbeitung der Daten stets mit großem Engagement zur Seite stand. Ohne sein Zutun wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Weiterhin gilt mein Dank dem gesamten Team des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes für die Einarbeitung in die Grundlagen der laborchemischen Methoden. Insbesondere danke ich Frau Janine Becker für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen und immunhistochemischen Präparate.

## 11 Publikationen

1. Sperling J, Brandhorst D, Schafer T, Ziemann C, Benz-Weisser A, Scheuer C, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD 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 30: 447-455.