

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

Universität des Saarlandes

Homburg / Saar

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

HEPATO-ARTERIELLE INFUSION VON BEVACIZUMAB, OXALIPLATIN UND IRINOTECAN

**Eine Untersuchung zur Wirkung der hepato-arteriellen Infusion im Vergleich zur
systemischen Applikation in einem Tumormodell der Rattenleber**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2015

vorgelegt von

Christian Ziemann

geb. am 22.10.1981 in Lübeck

Gewidmet
meinen Eltern, meiner Tante
und meiner Großmutter

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	01
1.1. Hepato-arterielle Infusion von Bevacizumab, Oxaliplatin und Irinotecan sowie die Kombination von Bevacizumab mit Oxaliplatin oder Irinotecan reduzieren das Tumorwachstum in einem kolo- rektalen Metastasenmodell der Rattenleber.....	01
2. Abstract	03
2.1. Hepatic arterial infusion of bevacizumab, oxaliplatin and irinotecan or bevacizumab in combination with oxaliplatin or irinotecan reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases.....	03
3. Einleitung	05
3.1. Klinischer Hintergrund	05
3.1.1. Kolorektales Karzinom.....	05
3.1.2. Lebermetastasen.....	06
3.1.3. Leberresektion.....	07
3.1.4. Nichtoperative Ablationsverfahren.....	09
3.2 Regionale Chemotherapie	10
3.2.1. Hepato-arterielle Infusion (HAI).....	10
3.3. Antikörper	11
3.3.1. Bevacizumab.....	11
3.3.1.1. Historie	11
3.3.1.2. Physiologie und Biochemie.....	12
3.3.1.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen	13
3.4. Zytostatika	14
3.4.1. Oxaliplatin.....	14
3.4.1.1. Historie	14
3.4.1.2. Physiologie und Biochemie.....	14
3.4.1.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen	15
3.4.2. Irinotecan.....	17
3.4.2.1. Historie	17
3.4.2.2. Physiologie und Biochemie.....	17

3.4.2.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen	18
4. Ziel der Studie	20
4.1. Fragestellung	20
5. Material und Methoden.....	21
5.1. Versuchstiere	21
5.2. Tumorzelllinie	21
5.3. Experimentelles Protokoll.....	22
5.4. Tumorimplantation.....	23
5.5. Bevacizumab	24
5.6. Oxaliplatin.....	24
5.7. Irinotecan	24
5.8. Modell.....	25
5.8.1. Anästhesie und chirurgische Präparation	25
5.8.2. Präparation der hepato-arteriellen Infusion.....	26
5.8.3. Präparation der systemischen Applikation.....	26
5.9. Hepato-arterielle Infusion	26
5.10. Systemische Applikation	27
5.11. Blutentnahme	27
5.12. Leberenzyme.....	28
5.12.1. γ -Glutamyltransferase (γ -GT).....	28
5.12.2. Glutamat-oxalat-transaminase (GOT, AST)	28
5.12.3. Glutamat-pyruvat-transaminase (GPT, ALT).....	28
5.12.4. Lactatdehydrogenase (LDH)	29
5.12.5. Glutamatdehydrogenase (GLDH)	29
5.13. 3-D-Sonographie.....	29
5.14. Untersuchungstechniken	30
5.14.1. Sonographische Berechnung des Tumorumfanges.....	30
5.14.2. Hämatologische Parameter und Enzymaktivität	31
5.14.3. Histomorphologie.....	31
5.14.4. Immunhistochemie	33
5.15. Organentnahme	35
5.16. Datenerfassung und Statistik.....	35
6. Ergebnisse	36
6.1. Tumorimplantation.....	36
6.2. Bevacizumab + Oxaliplatin	36

6.2.1. Tumorwachstum	36
6.2.2. Histologische Untersuchungen	38
6.2.2.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)	38
6.2.2.2. AS-D-Chloracetatesterase (CAE)	40
6.2.3. Immunhistochemische Untersuchungen	42
6.2.3.1. Apoptose, Caspase 3	42
6.2.3.2. Proliferation, PCNA	43
6.2.3.3. Vaskularisierung, PECAM-1	45
6.2.4. Gewicht der Versuchstiere	46
6.2.5. Laborchemische Parameter	47
6.2.5.1. Leberenzyme	47
6.2.5.2. Leukozyten	49
6.2.5.3. Hämoglobin	50
6.2.5.4. Thrombozyten	51
6.3. Bevacizumab + Irinotecan	52
6.3.1. Tumorwachstum	52
6.3.2. Histologische Untersuchungen	53
6.3.2.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)	53
6.3.2.2. AS- D Chloracetatesterase (CAE)	56
6.3.3. Immunhistochemische Untersuchungen	57
6.3.3.1. Apoptose, Caspase 3	57
6.3.3.2. Proliferation, PCNA	59
6.4.3.3. Vaskularisierung, PECAM-1	60
6.3.4. Gewicht der Versuchstiere	62
6.3.5. Laborchemische Parameter	63
6.3.5.1. Leberenzyme	63
6.3.5.2. Leukozyten	65
6.3.5.3. Hämoglobin	66
6.3.5.4. Thrombozyten	67
7. Diskussion	68
7.1. Diskussion von Material und Methoden	68
7.1.1. Chirurgische Präparation und Tumorimplantation	68
7.1.2. Hepato-arterielle Infusion (HAI)	69
7.1.3. Hochauflösende 3-D-Sonographie	70
7.2. Diskussion der Ergebnisse	70
7.2.1. Bevacizumab + Oxaliplatin	70
7.2.2. Bevacizumab + Irinotecan	74
7.3. Schlussfolgerung	75

8. Abkürzungsverzeichnis.....	77
9. Literaturverzeichnis.....	79
10. Danksagung.....	93
11. Lebenslauf.....	94
12. Publikationen.....	96

1. Zusammenfassung

1.1. Hepato-arterielle Infusion von Bevacizumab, Oxaliplatin und Irinotecan sowie die Kombination von Bevacizumab mit Oxaliplatin oder Irinotecan reduzieren das Tumorwachstum in einem kolorektalen Metastasenmodell der Rattenleber

Mit einer Inzidenz von nahezu 65.000 Patienten pro Jahr ist das kolorektale Karzinom die zweithäufigste Tumorentität in Deutschland. Viele der Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen, die eine bedeutende klinische Herausforderung darstellen. Die Optionen für eine Therapie sind in diesen Fällen limitiert. Neben der chirurgischen Resektion stehen lokal ablativ Verfahren und die systemische Chemotherapie zur Verfügung.

Inoperable kolorektale Lebermetastasen werden häufig mit einer systemischen Chemotherapie (SCT) behandelt. Klinische Studien zur Wirkung der systemischen Anwendung von Bevacizumab (BE), einem monoklonalen Antikörper gegen den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), zeigten eine leichte Erhöhung der Überlebensrate im Vergleich zu bekannten Chemotherapieschemata ohne Kombination mit Bevacizumab. In der vorliegenden Studie untersuchten wir in einem Rattenmodell von kolorektalen Lebermetastasen inwieweit die hepato-arterielle Infusion (HAI) von Bevacizumab (BE), Oxaliplatin (OX) und Irinotecan (IR) alleine oder die Kombination von BE mit IR bzw. BE mit OX im Vergleich zur systemischen Applikation effektiver ist, das Metastasenwachstum zu hemmen. Zehn Tage nach der Implantation von CC531 kolorektalen Tumorzellen in den linken Leberlappen von WAG/Rij Ratten, unterzogen wir die Tiere entweder einer HAI oder einer systemisch-intravenösen Applikation von BE (5 mg / kg Körpergewicht), OX (85 mg / m² Körperoberfläche), IR (90mg / m² Körperoberfläche) oder einer Kombination von BE + OX sowie BE + IR. Tiere der Kontrollgruppe (Sham) erhielten Kochsalzlösung. Das Tumolvolumen wurde an den Tagen 10 und 13 unter Verwendung dreidimensionaler hochauflösender Ultraschalluntersuchungen gemessen. Am Tag 13 wurde Tumor- und Lebergewebe entnommen und histologisch sowie immunhistochemisch untersucht.

Die systemische Anwendung von OX, BE und IR oder deren Kombination hat das Tumolvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinflusst. Im Gegensatz dazu konnte eine HAI von BE sowie die Kombination aus BE und OX oder BE und IR das Tumolvolumen signifikant reduzieren. Hierbei zeigte sich im Tumorgewebe eine Verminderung der Vaskularisierung und Zellproliferation sowie eine Erhöhung der Zell-Apoptose.

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die hepato-arterielle Infusion von BE, insbesondere in Kombination mit OX oder IR das Wachstum von hepatischen Metastasen gegenüber einer systemischen Applikation der Medikamente signifikant inhibiert.

2. Abstract

2.1. Hepatic arterial infusion of bevacizumab, oxaliplatin and irinotecan or bevacizumab in combination with oxaliplatin or irinotecan reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases

Colorectal cancer is the second most malignancy in Germany with an incidence of almost 65.000 patients per year. Many of the patients develop liver metastases, which still represent a significant clinical problem. The therapeutic options in those cases are limited. Possibilities to treat those patients are surgical resection, local ablative techniques and chemotherapy.

Unresectable colorectal liver metastases are commonly treated with systemic chemotherapy (SCT). Clinical studies on the effect of additional systemic application of bevacizumab (BE), a monoclonal antibody directed against vascular endothelial growth factor, to SCT showed a slight increase of patient survival. Herein, we studied in a rat model of colorectal liver metastasis whether a locoregional application of bevacizumab (BE), oxaliplatin (OX), irinotecan (IR) and the combination of BE with OX or IR via hepatic arterial infusion (HAI) is more effective to inhibit metastatic growth compared to systemic drug application. Ten days after implantation of CC531 colorectal cancer cells into the left liver lobe of WAG/Rij rats, animals underwent either HAI or systemic intravenous application of BE (5 mg/kg body weight), OX (85 mg/m² body surface), IR (90mg/m² body surface) or a combination of BE+OX and BE+IR. Sham-treated animals received saline and served as controls. Tumor volume was measured at days 10 and 13 using high resolution three dimensional ultrasound. At day 13 tumor tissue was analyzed histologically and immunohistochemically. Systemic application of OX, BE, IR or their combination did not affect tumor volume when compared to controls. In contrast, HAI of BE and, particularly, the combination of BE and OX or BE and IR significantly reduced tumor volume. This was associated with a decrease of vascularization and cell proliferation as well as an increase of cell apoptosis within the tumor tissue, as indicated by a decreased number of PECAM-1-positive cells and PCNA-positive cells and as well as an increased number of cleaved caspase-3-positive cells.

The present study demonstrates that hepatic-arterial infusion of BE, particularly in combination with OX or IR, enhances the inhibitory effect on hepatic metastatic growth compared to systemic application of the drugs.

3. Einleitung

3.1. Klinischer Hintergrund

3.1.1. Kolorektales Karzinom

Maligne Erkrankungen bilden nach den Herz-/Kreislaufkrankungen die zweitgrößte Gruppe der Todesursachen in den westlichen Industrieländern. In der Bundesrepublik Deutschland zeigt sich auf Grundlage von Erhebungen des Robert-Koch-Instituts, dass die Inzidenz bösartiger Erkrankungen im Jahre 2008 bei Männern ungefähr bei 200.000 sowie bei Frauen ungefähr bei 195.000 Neuerkrankungen lag. Dies entspricht sowohl bei Männern als auch bei Frauen eine gleichbleibenden Erkrankungsrate. Zwar zeigt sich ein Anstieg der Prävalenz im Vergleich zur Erhebung des Jahres 2002, dieser erklärt sich jedoch durch die demographische Entwicklung.

In Deutschland stellt das kolorektale Karzinom sowohl bei den Neuerkrankungen als auch bei der Mortalität bei Männern wie Frauen die zweithäufigste maligne Erkrankung dar. Jährlich erkranken etwa 35.000 Männer und 30.000 Frauen neu. Ungefähr 30.000 Patienten sterben jährlich an den Folgen der Erkrankung (Abb. 1). Damit ist das kolorektale Karzinom geschlechterunabhängig betrachtet die häufigste Krebstodesursache in Deutschland.

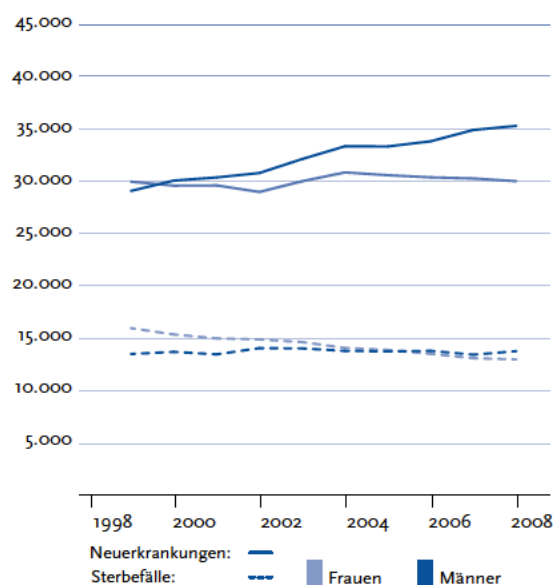


Abbildung 1: Neuerkrankungen und Sterbefälle des kolorektalen Karzinoms in Deutschland im Zeitraum von 1999-2008 [Robert-Koch-Institut, Krebsregisterdaten]

In den USA liegt die Inzidenz bei durchschnittlich 140.000 Neuerkrankungen und ca. 55.000 Todesfällen. Insgesamt ist es das vierthäufigste Karzinom in der westlichen Welt [Konopke and Saeger, 2003].

Das kolorektale Karzinom ist ein Adenokarzinom, welches erblich oder sporadisch auftritt. Bezüglich der Ätiologie der sporadischen Form spielen Ernährungsfaktoren, Umweltfaktoren und vorbestehende chronisch-entzündliche Erkrankungen des Darmes eine Rolle. Die häufigere sporadische Form entwickelt sich aus Epitheldysplasien, bei denen es sich in 90% der Fälle um Adenome handelt. Die Progression wird durch eine Akkumulation verschiedener genetischer Alterationen über 10 Jahre verursacht und entwickelt sich vom Normalgewebe über das Adenom bis zum Karzinom. Hierbei spielt die Aktivierung von Onkogenen wie K-Ras sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen wie APC, DCC und p53 eine Rolle. Bei Überschreiten einer kritischen Gesamtzahl an genetischen Veränderungen kann das kontrollierte Wachstum in ein unkontrolliertes malignes Wachstum übergehen. Bei der genetischen Form unterscheidet man verschiedene Erkrankungen, die mit einem erhöhten Risiko oder 100%-igen Risiko eines kolorektalen Karzinoms einhergehen. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das Hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC). [Möslein et al., 2008]

3.1.2. Lebermetastasen

Im Verlauf von malignen Erkrankungen des Kolons und Rektums werden in etwa 60% der Fälle Lebermetastasen beobachtet. Die Leber ist also der Hauptmanifestationsort für Organmetastasen ist. [Cohen and Kemeny, 2003]. Die Leberbeteiligung ist der Hauptgrund für die hohe Morbidität und Mortalität der Patienten.

Über die Pfortader entstehen bei dieser Tumorform durch hämatogene Streuung hepatische Metastasen. Konopke und Saeger berichten, dass die Hälfte der Patienten im Laufe dieser Erkrankung Lebermetastasen entwickeln [Konopke and Saeger, 2003]. Andere Autoren gehen gar davon aus, dass annähernd 60% aller Patienten mit kolorektalem Karzinom von einer Metastasierung in das Lebergewebe betroffen sind [Cohen and Kemeny, 2003]. Andere Studien wiederum sagen aus, dass eine Mehrheit der Patienten mit kolorektalem Karzinom bei Diagnose schon Metastasen aufweisen [SEER State Database]. So sind bereits bei Diagnosestellung bei etwa 14-25% der Patienten

hepatische Metastasen nachweisbar. Nach primärer Operation mit kurativer Intention treten bei 30-40% der Patienten metachrone Metastasen auf [Flieger et al., 2004]. In etwa 40% der Fälle ist die Leber der einzige Metastasierungsort. Ohne Therapie zeigt sich eine mediane Überlebenszeit bei Patienten mit Lebermetastasen von etwa 10 Monaten. [Konopke and Saeger, 2003].

3.1.3. Leberresektion

Die chirurgische Resektion bietet bei einer isolierten Lebermetastasierung eine gute Heilungschance. Untersuchungen zeigten 5-Jahresüberlebensraten von 25 – 47% und 10-Jahresüberlebensraten von bis zu 28% [Nordlinger et al., 1996; Jamison et al., 1997; Fong et al., 1999, Wei et al., 2006]. Unter Beachtung der funktionellen hepatischen Reserve sind Resektionen von 60 - 70% des Gesamtlebervolumens möglich [Lee and Hwang, 2005]. Die Letalität liegt bei diesen Eingriffen je nach Erfahrung des Operateurs unter 5% [Song et al., 2005]. Allerdings sind durch verschiedene Faktoren wie Größe, Anzahl und Lokalisation der Metastasen oder Begleiterkrankungen nur bei etwa 10 - 25% der Patienten Resektionen der Metastasen möglich [Rees und John, 2001; Schlag et al., 1999; Sharpe et al., 2005].

Durch diesen Sachverhalt stellen inoperable Lebermetastasen ein ernstzunehmendes klinisches Problem dar, bieten jedoch auch Ansätze für eine weitere Verbesserung der Therapie von Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom. Bei inoperablen Metastasen sind das Ausmaß des Herdes, der Allgemeinzustand, die Laborparameter und der Sitz des Primärtumors entscheidend für die Prognose. Momentan können unter Verwendung von Chemotherapie und lokalablativen Verfahren 1-Jahresüberlebensraten von 46% erreicht werden [Konopke and Saeger, 2003]. Aktuell stellt bei inoperablen kolorektalen Lebermetastasen neben lokal ablativen Techniken wie Kryotherapie oder Radiofrequenzablation die systemische Chemotherapie (SCT) den Goldstandard dar. Heute sind die häufigsten Algorithmen zur primären Chemotherapie (First-line) ein FOLFOX (Oxaliplatin/5-FU/Leucovorin)- oder FOLFIRI (Irinotecan/5-FU/Leucovorin)-Schema, welche zu einem medianen Gesamtüberleben von etwa 20 Monaten führen [André et al., 1999; de Gramont et al., 1997; 2000; Goldberg et al., 2004; Hebbbar et al., 2006; Tournigand et al., 2004; 2006]. Die Integration von modernen, antiangiogenen Substanzen, wie dem monoklonalen VEGF (vascular endothelial growth factor)-Antikörper Bevacizumab, konnte in Studien das mediane Gesamtüberleben als primäre

(Firstline) oder sekundäre (Secondline) Chemotherapie um 2-3 Monate verbessern [Hurwitz et al., 2004; Giantonio et al., 2007; Omura et al., 2008].

Adam und Mitarbeiter konnten bereits 2001 in einer retrospektiven Studie bei über 701 Patienten, die als irresektabel eingestuft wurden und daraufhin mit Oxaliplatin, 5-FU und Leucovorin behandelt wurden, ein signifikantes Ansprechen auf die Therapie mit Oxaliplatin, 5-FU und Leucovorin in etwa 14% der Patientengruppe nachweisen. Dadurch war nach der Chemotherapie eine sekundäre Resektion möglich [Adam et al., 2001]. Nach momentaner Studienlage ist es somit möglich, Patienten durch eine neoadjuvante Chemotherapie in eine prognostisch günstigere Situation zu überführen. Mit Hinblick auf die relativ guten Überlebenszeiten bei kolorektalen Lebermetastasen nach chirurgischer Resektion erscheint die Überführung primär irresektabler Lebermetastasen mit Hilfe neuer Therapieansätze in einen operablen Zustand als vielversprechender Ansatz.

Die HAI ermöglicht es, höhere lokale Dosen mit geringeren systemischen Nebenwirkungen als bei der SCT in der Leber zu erreichen. Allerdings ist auch die Applikation via HAI nicht ohne Toxizität. Der First-pass-Effekt der Leber, der vor Erreichen einer systemischen Zirkulation die Wirkstoffkonzentration stark reduziert, stellt daher einen relevanten Vorteil dar. Im Rahmen dieses Ansatzes konnten einzelne Studien an ausgewählten Patientenkollektiven ein gutes Ansprechen der Therapie als HAI oder als Kombination einer systemischen mit einer lokalen Chemotherapie nachweisen [Cohen and Kemeny, 2003; Kemeny et al., 2005; 2006]. Insbesondere konnten Patienten mit ausgedehnten unbehandelten kolorektalen Lebermetastasen und Patienten, die nicht auf die first-line Therapie angesprochen haben, in einen Zustand überführt werden, der die Resektion mit kurativer Zielsetzung möglich machte [Kemeny et al., 2009;]. Der Einsatz der Chemotherapie als systemische oder regionale Therapie mit der Zielsetzung des Downstaging des Tumors, um eine spätere Leberresektion mit kurativer Zielsetzung möglich zu machen, hat auch in einigen anderen Studien zu vielversprechenden Ergebnissen geführt [Adam et al, 2004; Bismuth et al., 1996; Pozzo et al., 2004]. Diese zeigen ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Rate von potentiell kurativen Resektionen nach Kombination der Chemotherapie mit Antikörpern, ohne dass sich die postoperative Mortalität erhöht [Adam et al., 2007].

Allerdings kam ein aktuelles Cochrane-Review sowie eine Metaanalyse zu dem Schluss, dass die momentan vorliegenden Daten den klinischen oder experimentellen Einsatz einer fluoropyrimidin-basierte HAI bei inoperablen kolorektalen Lebermetastasen nicht

unterstützen [Mocellin et al., 2007; 2011]. In den untersuchten fluoropyrimidin-basierte Studien zeigte sich zwar ein größeres Ansprechen des Tumors auf die HAI-Therapie, jedoch hatte dies keinen Überlebensvorteil zur Folge. Außerdem erreichten die ebenfalls untersuchten modernen SCT, welche 5-FU mit Oxaliplatin oder Irinotecan kombinierten, ähnliche Ansprechraten wie die fluoropyrimidin-basierte HAI-Therapie.

Von Interesse sind die Schlussfolgerungen der Autoren, dass die Zukunft der HAI in der Verwendung von neuartigen, antitumörogenen Substanzen oder Medikamentenkombinationen liegt. Eine HAI mit modernen Chemotherapeutika in Kombination mit einem VEGF-Antikörper wie Bevacizumab wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Daher sollte in dieser Arbeit an einem Modell kolorektaler Lebermetastasen in Ratten die Wirkung moderner Chemotherapeutika wie OX und IR sowie einer antiangiogenen Substanz wie BE im Vergleich zu einer systemischen Gabe auf das Tumorwachstum untersucht werden. Da die Resektion noch immer die einzige kurative Therapieoption ist, könnte dies weitere multimodale Therapieoptionen im Sinne eines Downstagingaufzeigen und eine spätere Leberresektion ermöglichen. [Saif et al., 2009].

3.1.4. Nichtoperative Ablationsverfahren

Es gibt zur Zeit verschiedene weitere Behandlungsstrategien bei irresektablen Lebermetastasen, wie zum Beispiel die lokale Tumordestruktion durch thermoablative Verfahren, wie der hypothermen Kryotherapie [Weaver et al., 1998; Zhou et al., 1988], der hyperthermen Radiofrequenzablation (RFA) oder der laserinduzierten Thermoablation (LITT) [Albrecht et al., 1996; Germer et al., 2005; Pereira et al., 2003].

Im Allgemeinen werden die nichtoperativen Ablationsverfahren, im Gegensatz zur Leberresektion, als rein palliative Therapiestrategien eingesetzt [Birth et al., 2005]. Allerdings haben Germer et al. Daten vorgelegt, die bei selektierten Patienten vergleichbare Ergebnisse mit denen der Resektion zeigten [Germer et al., 2005]. Jedoch gibt es momentan noch keine Langzeitergebnisse und die Möglichkeiten der nichtoperativen Verfahren sind je nach Art und Größe des Tumors beschränkt. Der wesentlich limitierende Faktor ist die Induktion klinisch relevanter Läsionsvolumina. Daher können ablative Verfahren noch nicht routinemäßig als kurative Therapie empfohlen werden. Auch scheint die Resektion im Falle von nicht-selektierten Patienten der Ablation noch überlegen, so dass der Stellenwert der ablativen Verfahren für die

Behandlung von Lebertumoren gegenwärtig noch nicht abschließend geklärt ist [Timmermann et al., 2009, Stang et al, 2009, Saif et al., 2009].

3.2. Regionäre Chemotherapie

3.2.1. Hepato-arterielle Perfusion

Als regionäre Therapieverfahren kommen die hepato-arterielle Infusion (HAI) und die isolierte hepatische Perfusion (IHP) in Frage. Bei der in der vorliegenden Studie gewählten HAI handelt es sich im Vergleich zur IHP um einen offenen Kreislauf. Sullivan und Mitarbeiter haben dieses Modell im Jahre 1963 beschrieben [Sullivan et al., 1963]. Durch die Tatsache, dass die Leber via portalem Blutfluss der häufigste Metastasierungsort eines kolorektalen Karzinoms und anderer gastrointestinaler Tumore ist, sowie dass die Möglichkeit einer Metastasierung per continuitatem besteht, erhofft man sich von einer regionären Therapie, also der hepato-arteriellen Infusion, durch die direkte und begrenzt lokale Anwendung ein Ausbreiten der Metastasen einzudämmen oder sogar zu verhindern.

Durch eine Arbeit von Breedis und Young aus dem Jahre 1954 weiß man, dass das Lebergewebe zu großen Teilen über die Vena porta versorgt wird. Im Gegensatz dazu erhalten metastatische Herde in der Leber ab einer Größe von >3mm ihr Blut vollständig durch die Arteria hepatica [Breedis und Young, 1954]. Dadurch kann über HAI im Tumorgewebe eine hohe Konzentration der applizierten Substanz erreicht werden, ohne dass das übrige Lebergewebe den hohen Dosen ausgesetzt wird. Ein zweiter Vorteil ist die Nutzung des first-pass-Effekts der Leber. Durch die in der Leber stattfindende Metabolisierung wird ein Großteil des applizierten Medikaments bereits während der ersten Passage abgebaut oder deaktiviert. Dadurch kann trotz hoher Dosen der Substanz ihre systemische Toxizität auf einem niedrigen Niveau gehalten werden.

Die Ideen zu diesen Therapieansätzen gehen auf Sullivan et al. zurück, der bereits Mitte der 60er Jahre des vergangenen Jahrhunderts Patienten mit Lebermetastasen gastrointestinaler Tumore mit einer hepatisch-arteriellen Infusion therapierte [Sullivan et al., 1963]. 62 % der Patienten zeigten ein Ansprechen auf die Therapie und hatten ein verbessertes Gesamtüberleben [Sullivan et al., 1964]. Anfänglich war die HAI mit einer relativ hohen Komplikationsrate behaftet. Durch die operative oder perkutane Implantation des Katheters in der Arteria hepatica und dem Anschluss an eine externe Infusionspumpe kam es zu einer hohen Anzahl von Komplikationen wie Infektion,

Blutung, Dislokation und Thrombosierung [Ensminger, 2002]. Aufgrund dieser Probleme wick man auf Portsysteme aus. Allerdings waren auch diese Systeme mit einer hohen Komplikationsrate behaftet [Wickremesekera et al., 2000; Doci et al., 1990]. Erst die Möglichkeit der implantierbaren Infusionspumpen reduzierte die Komplikationsrate deutlich. Dies belegen Daten aus einer Metaanalyse von Kemeny und Cohen, welche Studien aus dem Zeitraum von 1987 bis 2003 analysierten. Es zeigten sich signifikante Vorteile für verschiedene Therapieregime der HAI gegenüber einer i.v.-Chemotherapie mit verbesserten Ansprechen und erhöhter 2-Jahresüberlebensrate [Cohen und Kemeny, 2003; 2006]. Andere Metaanalysen sind zurückhaltender und stellten einen geringeren Vorteil der HAI gegenüber einer i.v.-Chemotherapie fest. [Harmantas et al., 1998]. Nichtsdestotrotz stellt die HAI unter Anwendung neuerer Chemotherapeutika wie Oxaliplatin und Irinotecan sowie der Kombination mit Antikörpern wie Bevacizumab einen lohnenswerten Ansatz zur weiteren Verbesserung der momentanen Therapie dar. Auch im Hinblick auf den Einsatz von wirkungsvolleren Medikamenten in der first-line Therapie ist über einen Einsatz als second-line Therapie sowie die Kombination einer systemischen mit der lokalen Therapie nachzudenken, um eine möglichst große Anzahl von Patienten einer späteren Resektion mit kurativer Zielsetzung zuführen zu können [Kemeny et al., 2009, Fujimoto et al., 2009; Wicherts et al., 2007].

3.3. Antikörper

3.3.1. Bevacizumab

3.3.1.1. Historie

Bevacizumab war in den USA der erste klinisch verfügbare Antikörper, der die Angiogenese hemmt. Der Antikörper wurde zum ersten Mal 1997 von Presta beschrieben [Presta et al., 1997]. Das Prinzip der Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurde zum ersten Mal 1975 von Milstein, Köhler und Jerne beschrieben, wofür sie 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten [Köhler et al., 1975]. Die Technik beruhte auf der Verschmelzung von Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten mit Zellen einer Myelomzelle, wodurch hybride Zellen entstanden, die unbegrenzt Antikörper einer bestimmten Spezifität produzierten. Bei der heutigen Herstellung monoklonaler Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen wird eine Maus mit einem speziellen Antigen infiziert. Aufgrund der Immunantwort kommt es zur Bildung von B-

Lymphozyten, die Antikörper bilden, welche mit dem Antigen reagieren und sich in der Milz anreichern. Aus der entnommenen Milz werden die B-Lymphozyten isoliert und mit Plasmazellen einer aus einem Myelom gewonnenen Zelllinie fusioniert. So entstehen sogenannte Hybridom-Zelllinien. Diese Hybridomzellen vereinen Eigenschaften ihrer Ursprungszellen mit denen der fusionierten Zellen. Die B-Lymphozyten haben die Eigenschaft einen bestimmten Antikörper zu produzieren und die Myelomzellen die Fähigkeit zum unbegrenzten Wachstum im Reagenzglas.

Bevacizumab erhielt seine Zulassung für die Kombination mit Standardchemotherapeutika beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und metastasierten Kolonkarzinom 2004 von der US Food and Drug Administration. Im Jahre 2008 kam dann die Zulassung für das metastasierte Mammakarzinom und im Mai 2009 für das Glioblastoma multiforme dazu.

3.3.1.2. Physiologie und Biochemie

Bevacizumab ist ein rekombinanter, humanisierter monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der Immunglobuline (IgG1). Er wird künstlich mittels DNA-Technologie unter Zuhilfenahme von Chinesischen Hamster Ovarialzellen hergestellt. Der Antikörper enthält 7% murine und 93% humane Sequenzen und bindet mit hoher Affinität an humanen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), einen angiogenen Wachstumsfaktor, der eine besondere Rolle bei der unkontrollierten Blutgefäßproliferation spielt [Presta et al., 1997]. Bevacizumab verhindert durch eine sterische Blockade die Interaktion von VEGF mit seinen Rezeptoren Flt-1 (VEGF-Rezeptor-1) und KDR/Flk-1 (VEGF-Rezeptor-2), welche sich auf der Oberfläche der Endothelzellen befinden. Die Interaktion zwischen VEGF und seinem Rezeptor führt über eine Tyrosinkinase zur Endothelproliferation und der Bildung neuer Blutgefäße. Durch die gezielte Blockade von VEGF wird nicht nur die Angiogenese gehemmt, sondern neu entstandene noch unreife Blutgefäße rückgebildet. Durch diesen Mechanismus wird die Blutversorgung des Tumors reduziert [Shibuya et al., 2006; Rosen et al., 2002].

Bevacizumab wird analog eines nativen IgG-Moleküls metabolisiert. Die anfängliche Halbwertszeit von endogenem IgG beträgt 1,4 Tage, die terminale Halbwertszeit 20 Tage [Fachinformation Avastin].

3.3.1.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen

Wie in den oben aufgeführten und weiteren Studien beschrieben stellt Bevacizumab einen Benefit für den Patienten in der antitumorösen Therapie dar. Hurwitz et al. zeigten in einer Studie aus dem Jahre 2004 einen signifikanten Vorteil für Irinotecan, 5-FU, Leucovorin (IFL) plus Bevacizumab im Vergleich zu IFL plus einem Placebo. Das mediane Überleben konnte von 15,6 Monate auf 20,3 Monate gesteigert werden. Die 1-Jahresüberlebensrate stieg von 63,4% auf 74,3%. Das progressionsfreie Überleben (PFS) wurde von 6,2 auf 10,6 Monate gesteigert. Auch die overall response rate stieg von 34,8% auf 44,8% [Hurwitz H et al., 2004]. Giantonio und Mitarbeiter zeigten einen Überlebensvorteil beim Vergleich von FOLFOX plus Bevacizumab gegenüber FOLFOX ohne Bevacizumab sowie Bevacizumab alleine als second-line-Therapie bei metastasierten Kolonkarzinomen. FOLFOX plus Bevacizumab führte zu einem medianen Überleben von 12,9 Monaten im Vergleich zu 10,8 Monaten (FOLFOX) und 10,2 Monate (Bevacizumab) und einem PFS von 7,3 Monaten gegenüber 4,7 Monaten und 2,7 Monaten. Das 1-Jahresüberleben lag bei 56 % gegenüber 43 % und 44%. Die overall response betrug 22,7% gegenüber 8,6 % und 3,3 % [Giantonio et al., 2007]. In drei weiteren Studien wurde zwischen 2003 und 2005 von Kabbinavar et al. ebenso eine verbesserte Wirksamkeit der Therapiekombination von Bevacizumab plus 5-FU und Leucovorin gegenüber 5-FU plus Leucovorin gezeigt [Kabbinavar et al., 2003; 2005; 2005]. Im Jahre 2008 wies Saltz et al. einen Vorteil der Zugabe von Bevacizumab zur Therapie mit FOLFOX oder XELOX (Capecitabine plus Oxaliplatin) gegenüber einer reinen FOLFOX-oder XELOX-Therapie nach. Jedoch stellte sich der Effekt im Vergleich zu den vorgenannten Studien geringer dar [Saltz et al., 2008].

Während der Anwendung von Bevacizumab in Kombination mit anderen Zytostatika haben sich vermehrt unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen gegenüber der alleinigen Zytostatikagabe gezeigt. Als wichtigste Nebenwirkung ist die blutdrucksteigernde Wirkung zu nennen, die womöglich auf den ausbleibenden vasodilatatorischen Effekt des VEGF zurückzuführen ist [Ku et al., 1993; Ollson et al., 2006]. In mehr als 10% der Fälle trat ein Bluthochdruck auf. Weitere Nebenwirkungen sind gastrointestinale Perforationen, thromboembolische Ereignisse, Blutungen und Wundheilungsstörungen.

3.4. Zytostatika

3.4.1. Oxaliplatin

3.4.1.1. Historie

Die Stoffgruppe der platinkomplexhaltigen Zytostatika ist bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt. 1845 beschrieb Peyrone erstmalig den Stoff *cis*-PtCl₂(NH₃)₂, welcher daraufhin als Peyrone's salt bekannt wurde und heute unter dem Namen *cis*-Platin geläufig ist [Peyrone, 1845]. Bis in die 60-er Jahre des letzten Jahrhunderts gab es jedoch kaum weitere Erkenntnisse auf dem Gebiet dieser Stoffgruppe. Erst 1965 beschrieb Rosenberg den inhibierenden Effekt von *cis*-Platin auf die Zellteilung von *E.coli* und untersuchte daraufhin im Tiermodell die Wirkung verschiedener Platinkomplexe auf Sarkome [Rosenberg, 1965]. Nach Veröffentlichung der Ergebnisse und weiterer Arbeiten mit Hinblick auf die antitumoröse Wirkung von Platinkomplexen erfolgte 1978 in den USA die Zulassung von *cis*-Platin für die Behandlung verschiedener Krebserkrankungen [Connors et al., 1972; Kidani et al., 1978]. Somit war *cis*-Platin das erste zugelassene Zytostatikum der Gruppe der Platinderivate [FDA, 1978]. Später folgten Carboplatin und Oxaliplatin. Oxaliplatin erlangte im Jahre 2002 seine Zulassung in den Vereinigten Staaten für die second-line Therapie bei kolorektalen Karzinomen.

3.4.1.2. Physiologie und Biochemie

Oxaliplatin ist ein antineoplastisch wirksamer Arzneistoff mit der molekularen Formel C₈H₁₄N₂O₄Pt und dem chemischen Namen *cis*-[(1*R*,2*R*)-1,2-cyclohexanediamine-*N,N'*][oxalato(2-)-*O,O'*]platinum. Oxaliplatin ist ein organischer Platinkomplex, in dem das Platinatom einen Komplex mit 1,2-diaminocyclohexan (DACH) und einem Oxalatliganden als Abgangsgruppe bildet (Abb. 2) [Bruck et al, 1984].

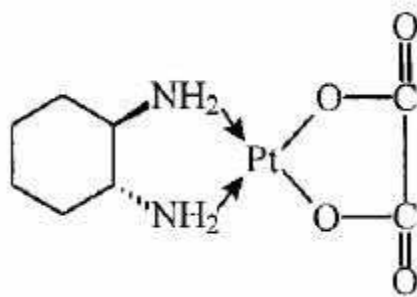


Abbildung 2: Strukturformel Oxaliplatin

Oxaliplatin wandelt sich nicht-enzymatisch in physiologischen Lösungen durch Abtrennung des labilen Oxalatliganden in seine aktiven Derivate um. Hierbei entstehen verschiedene zytostatisch aktive Stoffwechselprodukte, unter anderem ein 1,2-Diaminocyclohexyl-Ligand, welcher eine kovalente Bindung mit Makromolekülen eingehen kann. So interagieren die Addukte mit den Einzelsträngen der DNA und bilden Quervernetzungen in und zwischen den DNA-Strängen. Die Quervernetzungen entstehen besonders zwischen den N7-Positionen zweier benachbarter Guanin- oder Adenin-Guanin-Nukleinbasen sowie zwischen zwei durch ein Nukleotid getrennte Guaninbasen [Boudny et al., 1992; Faivre et al., 1998]. Diese Quervernetzungen inhibieren die DNA-Replikation und Transkription [Rixe et al., 1996; Pendyala et al., 1995; Mathe et al., 1986; Woynarowski et al., 1998; Hoffmann et al., 1989].

Der 1,2-Diaminocyclohexyl-Ligand (DACH-Ligand) beeinflusst außerdem die Fähigkeit der Zelle, DNA-Platin-Addukte zu tolerieren. Hierauf beruht der Unterschied in der Wirkung von Oxaliplatin und Cis-/Carboplatin. Die DACH-Platin-Addukte, die aus Oxaliplatin gebildet werden, hemmen die DNA-Synthese stärker, als die Cis-Diamino-Platin-Addukte, die aus Cis- und Carboplatin gebildet werden [Anderson et al., 1986; Pendyala et al., 1993]. Jedoch kommt es schneller als im Gegensatz zu Cis-platin zu einer Biotransformation und damit zu einem schnelleren Absinken der Oxaliplatinkonzentration im Blut, wodurch eine niedrigere Toxizität beobachtet wird [Kizu et al., 1993].

Oxaliplatin unterliegt einer nicht-enzymatischen Biotransformation, so dass Cytochrom P450 keine Rolle im Abbau des Stoffes spielt. Im Blut ist ein Großteil des Platinkomplexes an Plasmaproteine gebunden [Pendyala et al., 1993].

3.4.1.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen

Die gegenwärtige Studienlage zeigt, dass Oxaliplatin eine gute antitumoröse Wirkung besitzt. In Kombination mit 5-Fluoruracil (5-FU) steigert sich diese antiproliferative Wirkung nochmalig im Gegensatz zum alleinigen Einsatz von 5-FU oder Oxaliplatin. Ducreux et al. zeigten 2004 bei Patienten mit unbehandelten Pankreaskarzinomen, dass diese Kombination das mediane progressionsfreie Überleben von 1,5 Monaten nach Monotherapie mit 5-FU sowie 2 Monaten nach Monotherapie mit Oxaliplatin auf 4,2 Monate erhöht und die mediane Überlebenszeit von 2,4 Monaten sowie 3,4 Monaten auf 9 Monate verlängert [Ducreux et al., 2004]. In einer im selben Jahr erschienenen Arbeit

beschrieben Goldberg und Mitarbeiter den Benefit einer FOLFOX-Therapie für Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen gegenüber einer Therapie mit Irinotecan, Leucovorin und 5-FU sowie Irinotecan in Kombination mit Oxaliplatin. Das PFS verbesserte sich von 6,9 Monaten bzw. 6,5 Monaten auf 8,7 Monate. Das mediane Überleben lag bei 19,5 Monaten im Gegensatz zu 15,0 Monaten bzw. 17,4 Monaten. Die Ansprechrate lag bei der FOLFOX-Therapie bei 45% im Gegensatz zu 31% bzw. 35% [Goldberg et al., 2004]. Giacchetti et al. beschrieben im Jahre 2000 bei 200 Patienten mit metastasierten kolorektalen Karzinomen eine Überlegenheit der Kombination von 5-FU/LV mit Oxaliplatin gegenüber 5-FU/LV alleine. Die Ansprechrate lag bei 53% gegenüber 16%. Das progressionsfreie Überleben verbesserte sich von 6,1 Monate auf 8,7 Monate. Das mediane Überleben lag mit 19,4 Monaten im selben Bereich wie für 5-FU/LV mit 19,9 Monaten [Giacchetti et al., 2000]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen im selben Jahr de Gramont und Mitarbeiter, die in einer Studie, die 420 nicht vorbehandelte Patienten mit fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen umfasste, auch eine Kombination von 5-FU/LV mit oder ohne Oxaliplatin als first-line-Therapie untersuchten. Das mediane Überleben verbesserte sich in dieser Studie um 1,5 Monate von 14,7 auf 16,2 Monate. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Allerdings erhöhte sich das Ansprechen von 22,3% auf 50,7% sowie das progressionsfreie Überleben von 6,2 Monate auf 9,0 Monate. Jedoch sind in dieser Studie im Falle von Oxaliplatin schwerwiegende Nebenwirkungen als dosislimitierender Faktor aufgetreten. Neben dem Auftreten von Übelkeit, Durchfällen, Erbrechen, Blutbildveränderungen und Entzündungen der Schleimhäute wird die Dosis speziell durch die Gefahr der peripher-sensorischen Neuropathie limitiert. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Patienten peripher-sensorische Neuropathie Grad III in 18% der Fälle im Gegensatz zu 0% in der Gruppe mit 5-FU/LV alleine entwickeln. Neutropenien Grad III entwickelten 41,7% der Patienten nach Gabe von 5-FU/LV + Oxaliplatin im Gegensatz zu 5,3% ohne Oxaliplatin. Diarrhoen traten in 11,9% gegenüber 5,3% auf. Trotz dieser Nebenwirkungen zeigte die Kombination mit Oxaliplatin eine verbesserte Ansprechrate der Chemotherapie als Firstline-Therapie mit tolerablen unerwünschten Nebenwirkungen bei insgesamt guter Lebensqualität [de Gramont et al., 2000].

3.4.2. Irinotecan

3.4.2.1. Historie

Die Gruppe der Topoisomerase-Hemmer wurde zum ersten Mal im Jahre 1966 von Wall und Wani beschrieben. In einem systemischem Screening nach in der Natur vorkommenden Stoffen, die in der Krebsbekämpfung eingesetzt werden könnten, wurde Camptothecin entdeckt. Dabei handelte es sich um einen Stoff, der in der Rinde und dem Stamm des in China vorkommenden Baumes *Camptotheca acuminata* zu finden ist [Wall et al., 1966]. In ersten klinischen Studien, die die beachtliche antiproliferative Wirkung bestätigten, zeigte sich jedoch, dass Camptothecin durch ungünstige physikochemische und pharmakologische Eigenschaften für den klinischen Gebrauch ungeeignet war. Daraufhin wurden die beiden Camptothecinanaloga Topotecan und Irinotecan entwickelt. Nach ihrer Zulassung im Jahre 1996 sowie 1994 konnten beide in der onkologischen Therapie eingesetzt werden [FDA].

3.4.2.2. Physiologie und Biochemie

Irinotecan ist ein antineoplastisch wirksamer Arzneistoff aus der Gruppe der Topoisomerase-I-Hemmer, der zur Apoptose führt. Bei Irinotecan handelt es sich um ein semisynthetisches Derivat des Alkaloids Camptothecin, welches entweder aus der Pflanze *Camptotheca acuminata* gewonnen wird oder synthetisch hergestellt wird. Der chemische Name der Substanz ist (*S*)-4,11-Diethyl-3,4,12,14-tetrahydro-4-hydroxy- β -3,14-dioxo-1*H*-pyrano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-*b*]- β chinolin-9-yl-[1,4'-bipiperidin]-1'-carboxylat monohydrochlorid trihydrat und die Strukturformel ist in Abb. 3 dargestellt [Kunimoto et al., 1987; Sawada et al., 1991].

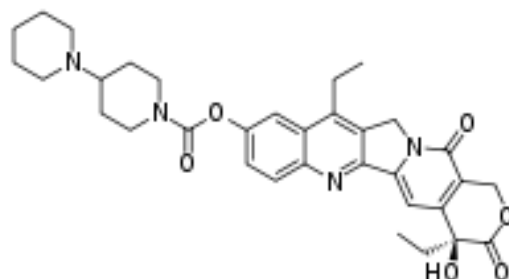


Abbildung 3: Strukturformel Irinotecan

Als Derivat des Camptothecins interagiert Irinotecan spezifisch mit der Topoisomerase I, deren physiologische Funktion darin besteht, Scherungsstress des DNA-Doppelstranges zu mindern, indem sie reversible Einzelstrangbrüche durchführt. Irinotecan und sein aktiver

Metabolit SN-38 bindet an dem Topoisomerase I-DNA-Komplex und verhindert so den Wiederverschluss dieser Einzelstrangbrüche [Hsiang et al., 1989]. Aktuelle Studien deuten daraufhin, dass die Zytotoxizität von Irinotecan auf einer Schädigung der Doppelstrang-DNA während der DNA-Synthese beruht. Während der DNA-Replikation interagieren die spezifischen Enzyme wie DNA-Polymerasen mit dem Komplex, der aus der DNA, der Topoisomerase I und Irinotecan oder SN-38 besteht, und führen dadurch zu einem Doppelstrangbruch und somit zu einem Abbruch der DNA-Replikation [Yoshida et al., 1993]. Säugetierzellen verfügen nicht über wirksame Reparaturmechanismen, um diese Doppelstrangbrüche zu reparieren. Dadurch ist Irinotecan bzw. SN-38 nur in der S-Phase des Zellzyklus wirksam. Ruhende Zellen, die sich nicht im Stadium der DNA-Replikation befinden, werden nicht geschädigt.

Irinotecan ist ein wasserlösliches Prodrug des lipophilen Metaboliten SN-38. Dieser entsteht vornehmlich in der Leber durch eine Carboxylesterase-vermittelte Spaltung der Carbamatbindung zwischen dem Camptothecin-Teil und der Dipiperidino-Seitenkette des Irinotecans in die aktive, lipophile Form SN-38. SN-38 ist in etwa ein 1000-fach stärkerer Hemmstoff der Topoisomerase-I als Irinotecan [Haaz, 1997; Slatter JG, 1997; 2000; Kawato, 1991; Yoshida, 1993; Lavelle, 1996].

Sowohl Irinotecan als auch SN-38 liegen in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zweier Zustandsformen vor: einer Lacton-Form und einer Hydroxy-Form. Ein saurer pH bewirkt den verstärkten Übergang der Hydroxy-Form in eine Lacton-Form, ein basischer pH bewirkt das umgekehrte. Nur die Lacton-Form von Irinotecan und SN-38 haben eine Wirksamkeit und verhindern die DNA-Replikation. Die Hydroxy-Form hat zeigt keine Hemmung der Topoisomerase-I und ist somit inaktiv. Welchen Anteil SN-38 an der antineoplastische Wirkung von Irinotecan hat, ist noch nicht zuverlässig geklärt [Chabot et al., 1995; 1997].

3.4.2.3. Klinische und experimentelle Untersuchungen

Wie aus den oben genannten und anderen Studien hervorgeht, belegen verschiedene Studien die Wirksamkeit von Irinotecan in der antitumorösen Therapie [Kostopoulos et al., 2009; Tsunoda et al., 2009]. Zum momentanen Zeitpunkt beschränkt sich das Haupteinsatzgebiet auf die first- und second-line Therapien des Kolonkarzinoms. In einer Arbeit aus dem Jahre 2000 beschrieb Douillard den Benefit für Patienten nach Kombination von Irinotecan mit 5-FU. Das mediane Überleben stieg von 14,1 Monaten auf 17,4 Monate. Das PFS verlängerte sich von 4,4 Monaten auf 6,7 Monate. Und das Ansprechen auf die Therapie verbesserte sich von 31% auf 49% [Douillard et al., 2000].

Köhne et al. bestätigten diese Wirksamkeit in einer Studie mit 430 Patienten. Die Kombination von Irinotecan mit 5-FU und Leucovorin bedeutete einen signifikanten Vorteil für den Patienten. Die mediane PFS betrug 8,5 Monate in der Gruppe mit Irinotecan im Vergleich zu 6,4 Monaten ohne Irinotecan. Das mediane Überleben steigerte sich von 16,9 auf 20,1 Monate und die Ansprechrate der Therapie von 34,4 % auf 62,2 % [Köhne et al., 2005].

Im Rahmen der Nebenwirkungen ist sicherlich neben dem Auftreten von Diarrhoen, Alopezie, Leber- und Nierentoxizität, Kolitiden und Ileus ein besonderes Augenmerk auf die Gefahr der Myelosuppression und den damit einhergehenden Folgen wie Anämie, Thrombopenie und insbesondere Neutropenie zu richten [Innocenti et al., 2009; Meyerhardt et al., 2004]. Bei Eintreten von neutropenischem Fieber sollte die Therapie schnellstmöglich unterbrochen und mit Antibiotika behandelt werden. Nach erneutem Überschreiten der Grenze von >1000 Neutrophile Granulozyten/mm³ sollte nach Wiederaufnahme der Therapie die Dosis angepasst werden, um eine erneute Neutropenie zu verhindern. Bei schweren Verläufen kann die Gabe von G-CSF erfolgen. Besonders Patienten, die homozygote Träger einer UGT1A1* 28- Mutation sind haben laut gegenwärtiger Studienlage ein erhöhtes Risiko, eine Neutropenie zu erleiden, da aus der verminderten Glukonidierung des SN-38 höhere Plasmaspiegel des aktiven Metaboliten resultieren [Hirose et al., 2012].

4. Ziel der Studie

4.1. Fragestellung

In der vorliegenden Studie wurden die Wirkmechanismen von verschiedenen Chemotherapeutika sowie eines monoklonalen Antikörpers im Rahmen einer hepato-arteriellen Infusion (HAI) bzw. einer systemischen Applikation in einem kolorektalen Lebermetastasenmodell in WAG/Rij-Ratten untersucht. Dabei waren folgende Fragestellungen von Interesse:

- Kann die Gabe von Bevacizumab, Oxaliplatin und Irinotecan sowie die Kombination der Zytostatika als systemische Applikation eine antitumoröse Wirkung erzielen?
- Führt die Gabe der oben genannten Substanzen als hepato-arterielle Infusion zu einer erhöhten antitumorösen Wirkung im Vergleich zur systemischen Therapie?
- Führt die Gabe der beschriebenen Substanzen als hepato-arterielle Infusion zu einer verstärkten Lebertoxizität im Vergleich zur systemischen Chemotherapie?
- Führt die Gabe der beschriebenen Substanzen als hepato-arterielle Infusion zu einer verminderten systemischen Toxizität?
- Können die Kombinationen eine antiangiogenen Therapie mit einer zytostatischen Therapie mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan eine erhöhte antitumoröse Wirkung erzielen?

5. Material und Methoden

5.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des bundesdeutschen Tierschutzgesetzes ausgeführt. Die 72 männlichen WAG-Ratten (Charles Rivers, Sulzfeld, BRD) wurden in verschiedene Versuchsgruppen aufgeteilt und befanden sich bis zu Beginn der Versuche unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22°C, Luftfeuchtigkeit: 55%, +/-10%) mit Hell-Dunkelrhythmus von 12 Stunden in der konventionellen Tierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. Monika Frings). Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns betrug das mittlere Körpergewicht der Tiere 291g. Während der Tierhaltung wurde den Tieren Standardlaborfutter (Fa. Altromin, Lage, BRD) und Wasser ad libitum, welchem Caprofen (Pfizer Inc., New York, USA) zur Schmerzbekämpfung postoperativ zugesetzt wurde, verabreicht.

5.2. Tumorzelllinie

Es wurde die CC531 Tumorzelllinie (CLS, Cell Lines Service and Tumor-Cellbank, Heidelberg, BRD) verwendet. Sie ist ein rattenspezifisches Kolonkarzinom. Vor Versuchsbeginn wurde die Zelllinie bei -180°C in flüssigem Stickstoff in 1,8ml Kryogefäßen (Nunc, Roskilde, DK) konserviert. Die Gefäße wurden zur Kultivierung in 37°C warmen Wasser aufgetaut, die Oberfläche der Gefäße wurde mit Isopropanol desinfiziert und danach in 50ml Zentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe, BRD) mit vorgelegtem, Raumtemperatur-equilibriertem, FCS-haltigem Kulturmedium (FCS, Fetal calf serum, Gold, PAA, Cölbe, BRD) überführt. Daraufhin wurden die Zellen nach zwei fünfminütigen Zentrifugationsschritten (Universal 30F, Hettisch, Tuttlingen, BRD) bei 1600 U/min in Petrischalen (Cellstar, 100/20mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD) ausgesät und bei 37°C unter einer 5%igen humiden CO₂-Atmosphäre in RPMI 1640 Medium (PAA) kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Zur weiteren Vermehrung wurden die Zellen nach Vorliegen einer Konfluenz von etwa 70-80% passagiert.

Vorbereitend für die Injektion wurden die Tumorzellen mit 0,02%igem Trypsin/EDTA-Lösung (0,5g/l, 0,2g/l, Virolex, PAA) versetzt und mit dem Enzym Accutase (PAA) aus

den Kulturgefäßen gelöst. Nach ca. 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Enzymwirkung mit FCS-haltigem Kulturmedium neutralisiert und der Zellansatz durch Zentrifugieren (5min, 1600 U/min) gewaschen und das Sediment mit PBS zweimal (Phosphat buffered solution, PAA) gereinigt. Die Zellen konnten anschließend nach erneutem Zentrifugieren im Verhältnis 1:2 ausgedünnt und zur nächsten 70-80%igen Konfluenz kultiviert werden. In der Regel wurden die Zellen in der folgenden zweiten Passage noch einmal 1:4 bis 1:5 ausgedünnt und dann am zweiten Tag nach der Passagierung für die Experimente eingesetzt. Mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Leica DMIL, Solms, BRD) wurde die Zellzählung bei einer 100x Gesamtvergrößerung (Objektiv Leica C Plan 10x/0.22, PHI, Okkular Leica 10x/18) in einer Neubauer-Zählkammer, welche auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ 50µl PBS eingestellt war, durchgeführt.

5.3. Experimentelles Protokoll

Die 72 Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip zu 12 experimentellen Gruppen zugeteilt (n = 6), darunter 6 Gruppen mit HAI und 6 Gruppen mit systemischer Chemotherapie. Zehn Tage nach Tumorimplantation wurden bei den Tieren entweder eine hepatoarterielle Infusion oder die systemische Therapie durchgeführt. Die Tiere erhielten entweder, Bevacizumab (BE), Oxaliplatin (OX), Irinotecan (IR) oder die Kombination von Bevacizumab mit einem der beiden Chemotherapeutika (BE-OX oder BE-IR). Sham-behandelte Tiere erhielten eine vergleichbare Menge von 0,9%-iger Kochsalzlösung (ecotainer®, Braun, Melsungen, Deutschland) und dienten als Kontrollen. Die Applikation per HAI sowie per systemischer Therapie wurde für einen Zeitraum von 1min vorgenommen. Jede Behandlung wurde durch Ultraschall-Bildgebung verfolgt. Drei Tage später wurde eine Relaparotomie zur erneuten Ultraschall-Bildgebung durchgeführt. Dann wurden die Tiere getötet und Gewebeproben für die histologischen und immunhistochemischen Analysen entnommen.

5.4. Tumorimplantation

Für die Tumorimplantation wurde den Versuchstieren zuerst die Bauchregion rasiert (Elektra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, BRD). Daraufhin wurde in Isoflurannarkose (Isofluran Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD) eine mediane Laparotomie durchgeführt und die Tumorzellen mittels einer feinen 27G Spritze (Omnicon F.Braun, Meisungen, BRD) unter Zuhilfenahme feuchter Wattestäbchen zur Leberfixation subkapsulär in die dorsale Leberseite des linken mobilisierten Leberlappens injiziert (Abb. 4 und Abb. 5). Die Zellzahl der Tumorzellen betrug pro Injektion 5×10^5 Zellen. Beim Entfernen der Kanüle aus der Leber wurde die Einstichstelle mit Hilfe eines Wattestäbchens (Fink & Walter GmbH, Merchweiler, Germany) unter leichtem Druck verschlossen, um eine Aussaat von Tumorzellen ins Peritoneum und ein Nachbluten zu verhindern. Danach wurde die Wunde zweizeitig mit einem Verschluss der Muskelatur und den Fascien sowie einer Hautnaht fortlaufend adaptiert [Kollmar et al., 2004]. Nach 10 Tagen wurden die Experimente durchgeführt.



Abbildung 4 – Tumorimplantation in den in der Transversalebene aufgerichteten linken Leberlappen unter leichter Fixierung mit einem feuchten Wattetüpfel

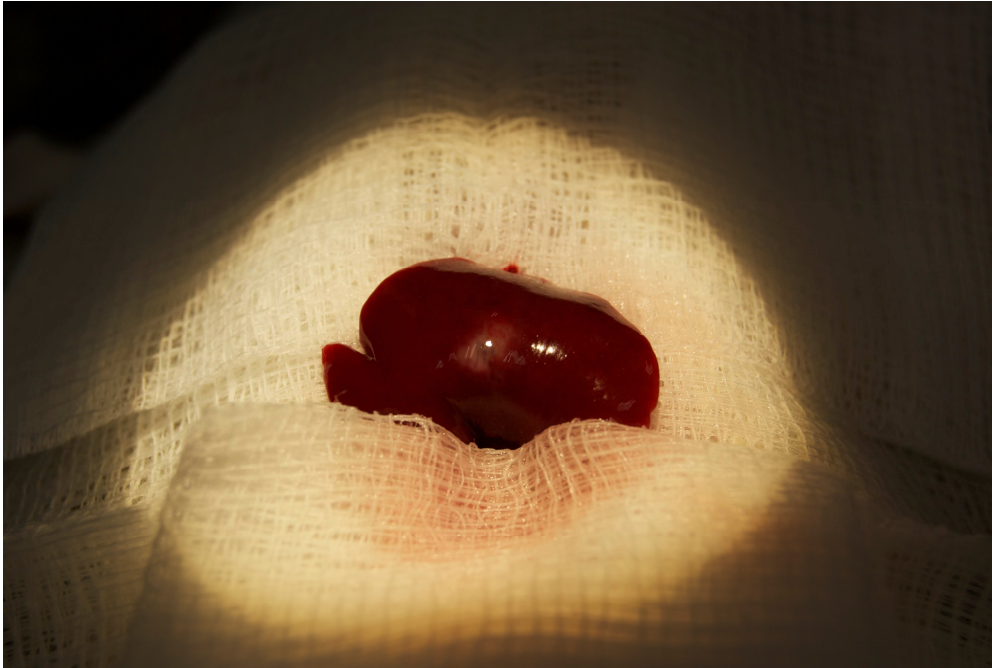


Abbildung 5 – Tumorsuspension an Tag 0 nach der Implantation

5.5. Bevacizumab

Das Medikament Bevacizumab (Avastin®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, BRD) ist ein monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der Immunglobuline, welcher durch die Bindung an den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) die Angiogenese unterbindet. Wir verwendeten den Antikörper in der Dosierung 5mg/kg KG.

5.6. Oxaliplatin

Oxaliplatin (Sanofi-Aventis, Frankfurt, BRD) ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der Platinderivate. Die Substanz selbst oder die entstehenden Stoffwechselprodukte interagieren mit der DNA und bilden Quervernetzungen zwischen den DNA-Strängen. Wir verwendeten das Zytostatikum in der Dosierung 85mg/m² Körperoberfläche.

5.7. Irinotecan

Irinotecan ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Topoisomerase-Hemmer, welches bei Kontakt mit der DNA in der S-Phase einen Doppelstrangbruch auslöst und somit einen Abbruch der DNA-Replikation bewirkt. Wir verwendeten das Zytostatikum in der Dosierung 90mg/m² Körperoberfläche.

5.8. Modelle

5.8.1. Anästhesie und chirurgische Präparation

In der beschriebenen Studie wurden 5 verschiedene Medikamentenapplikationen und eine NaCl-Applikation sowohl über systemische Infusion via Vena cava als auch über hepato-arterielle Infusion via Arteria gastroduodenalis untersucht. Bei diesen Kombinationen handelte es sich um:

- | | |
|--|-----|
| a) Bevacizumab (BE) | n=6 |
| b) Oxaliplatin (OX) | n=6 |
| c) Irinotecan (IR) | n=6 |
| d) Bevacizumab und Irinotecan (BE+IR) | n=6 |
| e) Bevacizumab und Oxaliplatin (BE+OX) | n=6 |
| f) Natriumchlorid (Sham) | n=6 |

Die Anästhesie wurde bei allen Versuchen des Experimentes wie folgt durchgeführt:

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran (Isofluran Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD) narkotisiert. Daraufhin wurden die Tiere gewogen und die Bauchregion rasiert (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, BRD). Danach wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf dem Versuchstisch mittels Pflasterstreifen fixiert. Der Operationstisch war eine Metallplatte mit integriertem Heizelement (Effenberger, Pfaffing/Attel, BRD), über das mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde es möglich war die Temperatur der Versuchstiere konstant zwischen 35° und 37°C zu halten. Zu Beginn der Operation wurde der Situs entlang der Naht der Tumorimplantation wiedereröffnet und falls nötig erweitert. Der Situs wurde zusätzlich mit Wundhaken aufgespannt, um den Operationssitus darzustellen. Anschließend wurden entstandene Verwachsungen beseitigt und die Haltebänder der Leber (Ligamentum falciforme hepatis, Ligamentum teres hepatis, Ligamenta triangulare dextra et sinistra) gelöst, um die Leber weiter zu mobilisieren. Eine Auslagerung des Intestinums erleichterte das weitere Vorgehen. Das Intestinum wurde auf der linken Körperseite der Tiere auf einer befeuchteten Mullkompressen gelagert und während der gesamten Versuchszeit mit einer weiteren befeuchteten Mullkompressen abgedeckt sowie kontinuierlich mit warmer Kochsalzlösung befeuchtet um ein Austrocknen zu verhindern.

5.8.2. Präparation der hepato-arteriellen Infusion

Nach Durchführung der unter Punkt 5.8.1. beschriebenen Schritte wurde in diesem Modell die Arteria gastroduodenalis freipräpariert und zweifach mit 6-0 Seide (Resorba Wundversorgung GmbH & Co KG, Nürnberg, BRD) angeschlungen. Die Arterie wurde anschließend mit einer feinen Präparationsschere inzidiert, um später einen heparinisierten Katheter (PE-50, ID 0,28, Portex, Hythe, UK) einführen zu können. Hierzu wurde der Blutfluss kurzzeitig mittels einer feinen Gefäßklemme unterbrochen. Der Katheter wurde bis zur Einmündung in die Arteria hepatica vorgeschoben.

5.8.3. Präparation für die systemische Applikation

In diesem Modell wurden ebenfalls die Schritte wie unter Punkt 5.8.1. beschrieben durchgeführt, bevor die Vena cava inferior für die Injektion freipräpariert wurde.

5.9. Hepato-arterielle Infusion

Über den in Punkt 5.8.2 eingebrachten Zugang erhielten die Versuchstiere kontinuierlich über 1min die vorbereiteten Medikamente (Abb. 6). Hierbei handelte es sich um Bevacizumab (5mg/kg KG), Oxaliplatin (85mg/m²), Irinotecan (90mg/m²), Bevacizumab (5mg/kg KG) und Irinotecan (90mg/m²) oder Bevacizumab (5mg/kg KG) und Oxaliplatin (85mg/m²). Den Tieren der Kontrollgruppe wurde NaCl appliziert. Nach Durchführung der Medikamentenapplikation konnte der Katheter, nachdem die Arteria gastroduodenalis ligiert wurde, entfernt werden. Abschließend wurde der Situs durch eine zweireihige fortlaufende Naht der Muskelfascien und der Haut verschlossen.

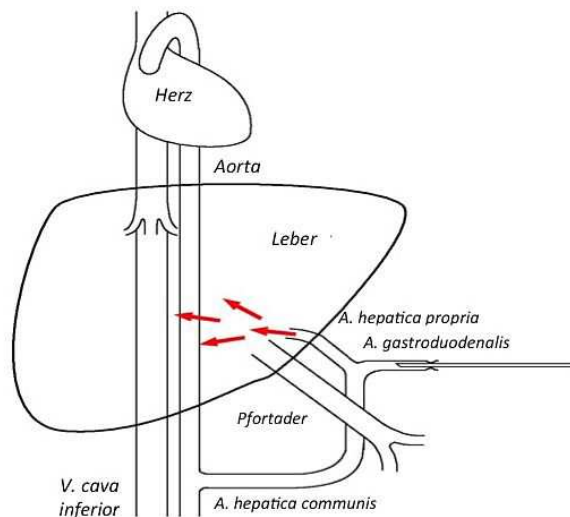


Abbildung 6 – Schematische Darstellung der hepato-arteriellen Infusion.

5.10. Systemische Applikation

Nach Durchführung der unter Punkt 5.8.3. beschriebenen Schritte wurde die Vena cava mit einer feinen 23-G-Nadel (Troge Medical GmbH, Hamburg, Germany) kanüliert. Über diesen Zugang wurden die vorbereiteten Medikamente in oben genannter Dosierung verabreicht. Nach dem Herausziehen der Kanüle wurde die Blutung mit Hilfe eines Wattestäbchens gestillt. Nachdem die Blutung gestillt war, wurde die Wunde mit einer zweireihigen kontinuierlichen Naht der Muskelfascien und der Haut adaptiert.

5.11. Blutentnahme

Vor Durchführung der Schritte 5.8., 5.9., 5.10. und 5.12. wurde den Tieren an Tag 10 und 13 mit einer feinen 23G-Nadel (Troge Medical GmbH, Hamburg, Germany) etwa 1ml Blut zur späteren Analyse abgenommen. Dieses Blut wurde in EDTA-Röhrchen im Kühlschrank gelagert. Das Blut wurde dann bei 4000 U/min und 4°C 3min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße pipettiert und umgehend bei -70°C tiefgefroren. Mit Hilfe eines Spektrometers wurden die Serumaktivitäten der Aspartat-Aminotransferase (ASAT, GOT) sowie der Alanin-Aminotransterase (ALAT, GPT) als Indikator für einen hepatozellulären Schaden bestimmt. Zusätzlich wurde die Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl und der Hämoglobingehalt zur Diagnostik einer möglichen Knochenmarksschädigung oder einer Leukozytendepletion gemessen.

5.12. Leberenzyme

5.12.1. γ -Glutamyltransferase (γ -GT)

γ -Glutamyltransferase ist ein membrangebundenes Enzym in vielen Körperzellen von Säugetieren, das zum Transport in die Zellen den Glutamylresten von Glutathion auf Aminosäuren oder Peptide überträgt. Dieser Abbau ist die einzige Möglichkeit Cystein effektiv in die Zellen zu schleusen. Als zweiten Reaktionsweg katalysiert γ -GT als Teilreaktion die Ausschleusung von Fremdstoffen aus der Zelle.

Hierdurch gilt γ -GT als sensitivster Indikator bei Störungen der Leberfunktion und des Gallengangsystems. Die im Blut gemessene γ -GT entspricht der γ -GT-Gesamtaktivität. Eine messbare Erhöhung entsteht hauptsächlich durch eine Zerstörung von Leberzellen, da γ -GT normalerweise membrangebunden vorliegt [Whitfield et al., 1972; Heisterkamp et al., 2008].

5.12.2. Glutamat-oxalat-transaminase (GOT, AST)

Glutamat-oxalat-transaminase (GOT) oder Aspartat-amino-transferase (AST) ist ein Enzym, welches die Aminogruppe von Aspartat auf α -Ketoglutarensäure überträgt. Hierdurch entstehen Oxalacetat und L-Glutamat. Diese Reaktion spielt in der Verwertung von Kohlenhydraten und dem Abbau von mehreren Aminosäuren eine wichtige Rolle. Das Enzym kommt vor allem in Skelett- sowie Herzmuskelzellen und in Leberzellen vor. Man unterscheidet die zytoplasmatische und mitochondriale Isoform. AST liegt zu 80% in den Mitochondrien vor.

Erhöhte AST-Werte sind ein Marker für Leber-, Skelettmuskel- oder Herzmuskelzellschädigung. Eine gleichzeitiger Anstieg der Glutamat-pyruvat-transaminase- und γ -GT-Werte deutet auf eine Schädigung von Leberzellen hin [Balazs et al., 1965; Bhargava et al., 1966].

5.12.3. Glutamat-pyruvat-transaminase (GPT, ALT)

GPT oder Alanin-amino-transferase (ALT) ist ein Enzym, welches zu 80% im Zytoplasma sowie zu 20% in den Mitochondrien von Leberzellen vorkommt und leberspezifisch ist. Es katalysiert die enzymatische Reaktion von L-Alanin + α -Ketoglutarensäure zu Pyruvat und L-Glutamat. Es spielt eine Rolle beim Transport von Alanin zur Leber im Rahmen des Glucose-

Alanin-Zyklus. Das in der Leber wieder enzymatisch umgewandelte Pyruvat steht in der Leber der Gluconeogenese und dem Harnstoffzyklus zu Verfügung.

Erhöhte GPT-Werte deuten auf eine Leberzellschädigung hin. Durch das hauptsächliche Vorkommen von GPT im Zytoplasma und GOT in den Mitochondrien kann im Fall einer Erhöhung der Leberwerte über den de-Ritis-Quotienten die Schwere des Leberzellschadens abgeschätzt werden [Franken et al., 1957; de Retis et al., 1956].

5.12.4. Lactatdehydrogenase (LDH)

Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert als Enzym in allen Körperzellen als Bestandteil der Milchsäuregärung die Bildung von L-Lactat und NAD⁺ aus Pyruvat und NADH. In Leberzellen kommt vorherrschend das Isoenzym LDH-5 vor. Als diagnostischer Parameter kann LDH die Lysierung und damit Schädigung von Zellen nachweisen. Es verbleibt durch seine große Stabilität im Extrazellulärraum. Erhöhte LDH-Spiegel treten besonders bei hämatologischen, muskuloskelettalen, kardialen und hepatobiliären Erkrankungen auf [Pagliaro et al., 1963].

5.12.5. Glutamatdehydrogenase (GLDH)

Glutamatdehydrogenase (GLDH) katalysiert allosterisch enzymatisch die Oxidoreduktase von L-Glutamat, Wasser und NAD⁺ zu Ammonium, α -Ketoglutar Säure und NADH. Dies spielt eine Rolle im Harnstoffzyklus. GLDH kommt ausschließlich in Mitochondrien vor. Das Enzym wird erst ins Blut abgegeben, wenn Leberzellen vollständig zerstört sind. Dadurch spielt GLDH eine besondere Rolle bei der Diagnostik von Leberzellschäden [Filippa et al., 1963; Hankiewicz et al., 1965].

5.13. 3-D-Sonographie

Zur Ultraschalluntersuchung wurde der 40MHz-Ultraschallkopf des hochauflösenden Ultraschallgerätes Vevo 770 benutzt (VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Kanada). Ultraschallanalysen der Tumoren wurden in situ vor Kanülierung der Arteria gastroduodenalis bzw. systemischer Applikation über die Vena cava inferior an Tag 10 und 13 durchgeführt (Abb. 7). Während der Untersuchung waren die Tiere unter oben beschriebener Anästhesie auf einer Heizplatte gelagert. Zur Untersuchung wurde der

tumortragende linkslaterale Leberlappen von seinen Ligamenten freipräpariert und atmungsunabhängig auf einer Kompresse ausgelagert. Der Schallkopf wurde über ein Kissen von Ultraschallgel aufgesetzt. Die Messung erfolgte in axialer Richtung.

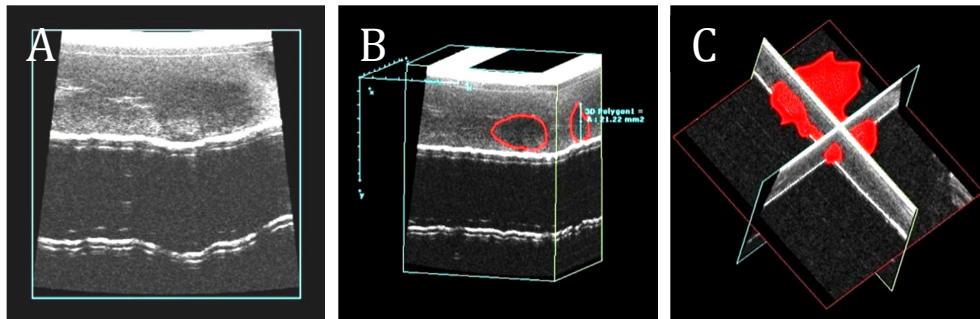


Abbildung 7 – Sonographische Darstellung der Tumoren und Rekonstruktion des Tumolvolumens
A: Axialer Tumorschnitt **B:** Markierter Tumor in axialer Schnittebene **C:** Rekonstruktion des Tumolvolumens in allen Schnittebenen

5.14. Untersuchungstechniken

5.14.1. Sonographische Berechnung des Tumolvolumens

Zur dreidimensionalen Darstellung wurden zwei parallele zweidimensionale Bildserien in 50µm Schnitten aufgezeichnet. Aus diesen Schnitten wurde dann eine 3-D-Rekonstruktion des Tumors mit Hilfe der im Ultraschallgerät integrierten Software erzeugt und das Tumolvolumen berechnet. In vorhergegangenen Studien konnte bereits die Validität der Ultraschallbilder und der damit errechneten Volumina validiert werden. Es zeigte sich in den Arbeiten von Laschke et al. eine Korrelation von ultraschallbasierter Volumenmessung zu histologischer Volumenmessung von $r=0,84$, was als gute Korrelation zwischen den beiden Methoden bezeichnet werden kann. Die Abweichung wird auf den Flüssigkeitsverlust während der Fixierung der histologischen Proben zurückzuführen, so dass durch die ultraschallgestützte Messungen im Gegensatz zu den histologischen Messungen das Volumen der vitalen Tumolvolumina erfasst wird. [Laschke et al., 2010]. Außerdem konnte im Rahmen von 3-D-Ultraschallmessung eine akzeptable Intra- und Interuntersuchervariation von 5,1% bzw. 11,4% nachgewiesen werden [Chang et al., 1997].

5.14.2. Hämatologische Parameter und Enzymaktivitäten

Es erfolgten Blutentnahmen aus der Vena cava inferior zu den folgenden Zeitpunkten:

1. Vor Tumorsonographie an Tag 10
2. Vor Tumorsonographie an Tag 13

Ein Teil des Blutes wurde zum jeweiligen Zeitpunkt mit einem EDTA-Röhrchen entnommen und umgehend zur Bestimmung eines Differentialblutbildes (Coulter AcT diff, Coulter Electronics Ltd., Buckinghamshire, UK) herangezogen.

Desweiteren wurden Proben für die spätere Leberenzymaktivitätsbestimmung aquiriert. Diese wurden zunächst in einem Kühlschrank zwischengelagert und am Ende des Experiments in einer Kühlzentrifuge (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen) für 3min bei 4°C und 3000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und zur weiteren Aufbewahrung weggefroren (bei etwa -75°C). Das gewonnene Material diente der spektrophotometrischen Bestimmung der Serumkonzentration der Leberenzyme GOT (Glutamat-oxalat-transaminase), GPT (Glutamat-pyruvat-transaminase) und LDH (Laktatdehydrogenase) als Ausdruck einer hepatozellulären Schädigung.

5.14.3. Histomorphologie

Das nach Versuchsende entnommene Gewebe von Leber und Tumor wurde in 4%igem phosphatgepuffertem Formalin für etwa drei Tage fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von dem aquirierten Gewebe wurden Schnitte (5µm) angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE), sowie mit AS-D Chloracetatesterase (CAE) für histologische Untersuchungen gefärbt. Die HE-gefärbten Präparate (Abb. 8) wurden semi-quantitativ ausgewertet. Hierbei wurden die Grobscholligkeit des Zytoplasmas, Zellkerndeformation und Vakuolisierung von Hepatozyten beurteilt. Die Gefäße wurden unter dem Gesichtspunkt der sinusoidalen Kongestion betrachtet. Hierfür kamen jeweils 25 High Power Fields (HPF) pro Leberschnitt zur Auswertung, in welchen die oben genannten Parameter, in Grade von 0 bis 3 eingestuft, quantifiziert wurden [Calabrese et al., 1997]:

- Grad 0 = nein (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 1 = leicht (< 30% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 2 = mäßig (40% - 70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)

- Grad 3 = schwer (>70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf).

Die Ergebnisse wurden hierbei in Prozent angegeben. Weitere Beobachtungseinheiten der Gefäße stellten Endothelablösung, Fibrinthrombosierung und Erythrozyten-endothelzelladhärenz dar, die ebenfalls in 25 High Power Fields bewertet wurden, und als Prozentwerte bezogen auf die Gesamtzahl der untersuchten Gefäße angegeben wurden.

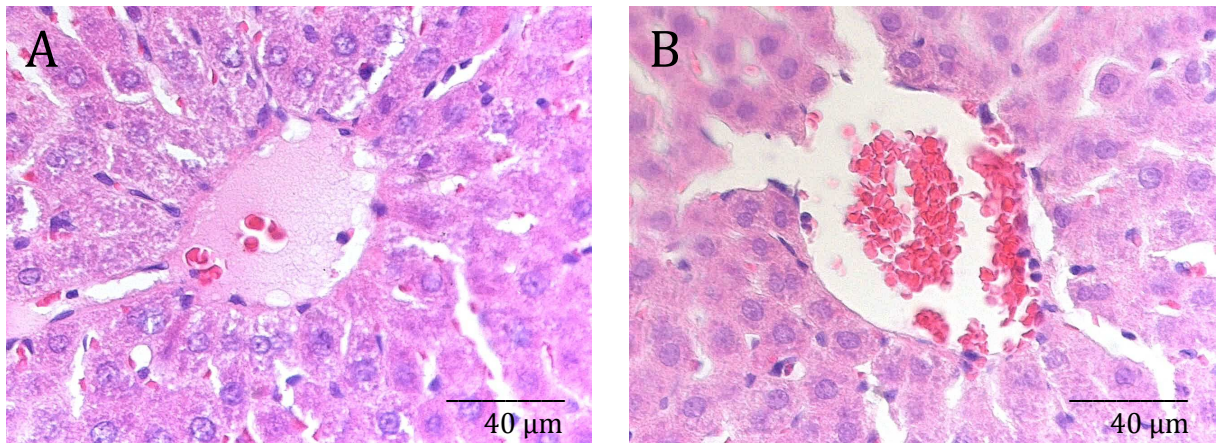


Abbildung 8 - HE-gefärbte Präparate zur Auswertung in 40-facher Vergrößerung (A- SYS BE+OX, B- SYS BE)

Mit den CAE-gefärbten Schnitten (Abb. 9) wurde die Leukozytenakkumulation in den Leberarealen untersucht. Es wurden CAE-positive Leukozyten in 48 HPF (12 HPF Sinusoide, 12 HPF Portalfeld intravasal, 12 HPF Portalfeld extravasal und 12 HPF Venolen) ausgezählt und in Absolutwerten festgehalten.

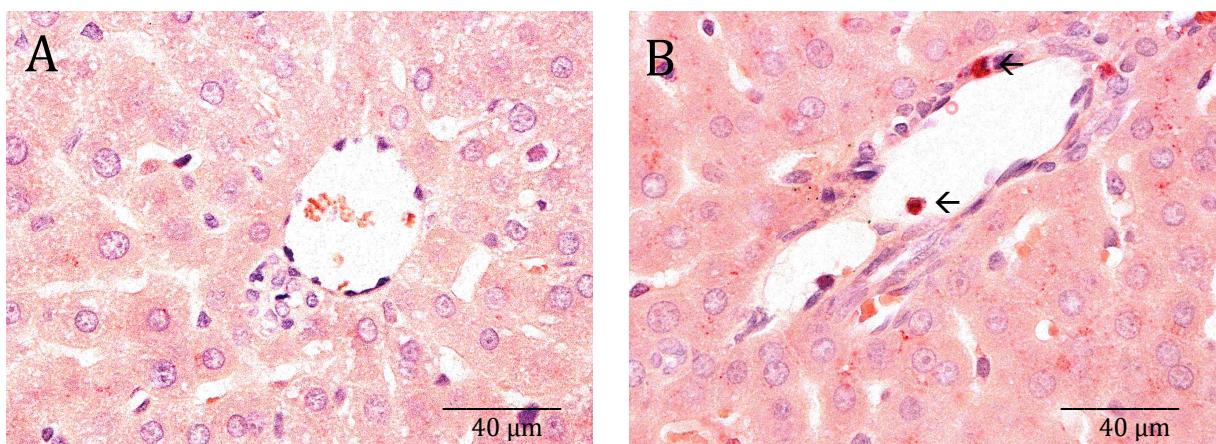


Abbildung 9 - CAE- gefärbte Präparate zur Untersuchung der Leukozytenakkumulation in der Leber als Indikator für eine hepatische Entzündungsreaktion in 40-facher Vergrößerung. (←CAE-positive Zellen; A- HAI Sham, B- HAI BE)

5.14.4. Immunhistochemie

Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen diente gespaltene Caspase-3 (Cystein-Aspartylproteasen) als Indikator für die Apoptose (Abb. 10). Fünf Abschnitte von in Paraffin eingebetteten tumortragenden Leberproben wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit einem polyklonalen-Caspase-3-nicht-spaltenden-Kaninchen-Antikörper (1:50, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland) inkubiert. Dieser Antikörper erkennt endogene Spiegel großer Fragmente (17/19 kDa) der aktivierten Caspase-3, aber nicht Caspase-3 in voller Länge. Für Streptavidin-Biotin-Komplex Peroxidasefärbung wurde ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Ig-Antikörper als sekundärer Antikörper (Link, LSAB-HRP, Dako-Cytomotion, Hamburg, Deutschland) verwendet. 3,3'-Diaminobenzidin wurde als Chromogen verwendet. Die Schnitte wurden mit Hemalaun gegengefärbt. Positiv gefärbte Zellen wurden in 25 HPF pro Probe gezählt und sind als Anzahl pro HPF angegeben.

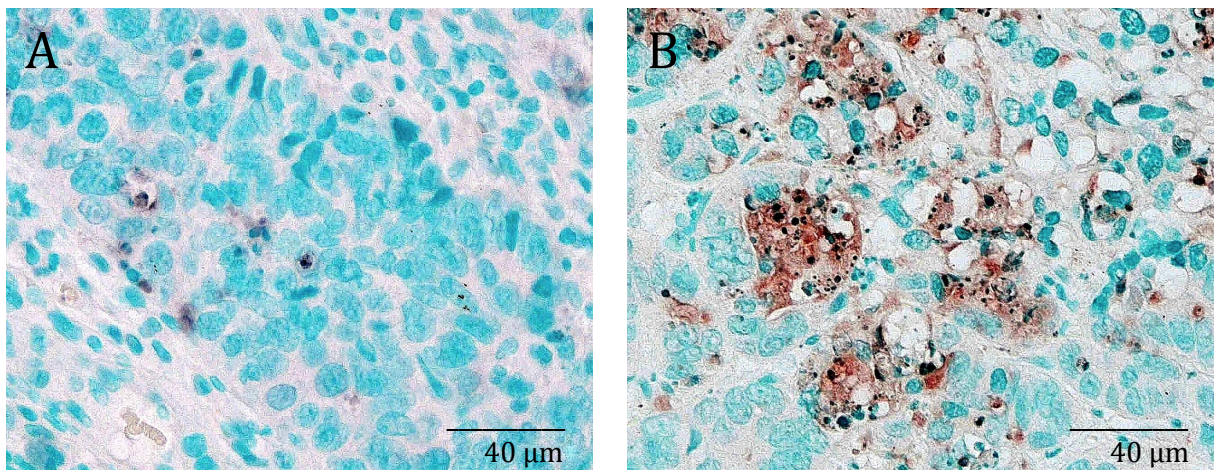


Abbildung 10 – Caspase-3-Färbung zur Auswertung der Apoptose im Tumor in 40-facher Vergrößerung (A- HAI Sham, B- HAI BE-OX)

Als Indikator der Zellproliferation diente PCNA (proliferating-cell-nuclear-antigen) (Abb. 11). Fünf Abschnitte von in Paraffin eingebetteten Proben wurden für 18 Stunden bei 4 ° C mit einem polyklonalen Kaninchen anti-PCNA-Antikörper (1:50, Santa Cruz Biotechnology) sowie mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Kaninchen-IgG (1:20; Dako Cytomation) für 30 min inkubiert. Fuchsin (PCNA) wurde als Chromogen und Hemalaun zur Gegenfärbung verwendet. Die gefärbten Schnitte wurden erneut mittels eines semiquantitativen Scoringindex (0: <1%, 1: 1-10%, 2: 10-30%, 3: 30-50%, 4:> 50% der PCNA-positive Zellen) erfasst.

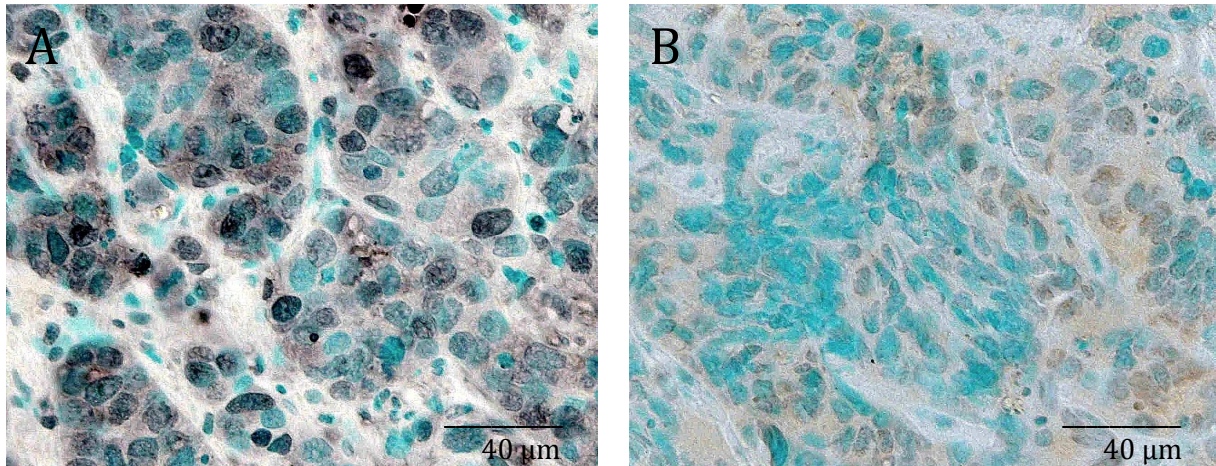


Abbildung 11 – PCNA-Färbung zur Bestimmung der Proliferationsrate in
40-facher Vergrößerung
(**A**- HAI Sham-Normalleber, **B**- HAI-BE- Tumorgewebe)

Als Indikator für die Vaskularisierung wurde das ausschließlich auf Endothelzellen vorkommende PECAM-1-Molekül (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; CD31) (Abb. 12) verwendet. Zum immunhistochemischen Nachweis der PECAM-1-Expression sind primäre Ratten-anti-Maus-Antikörper (1:25; Klon MEC13.3, BD Bioscience) sowie kreuzreagierende Peroxidase-konjugierte Kaninchen-Anti-Human-Antikörper (DAKO, Hamburg, Deutschland) verwendet worden. PECAM-1-positive Gefäße wurden in 25 HPF pro Abschnitt gezählt und als Anzahl pro HPF angegeben.

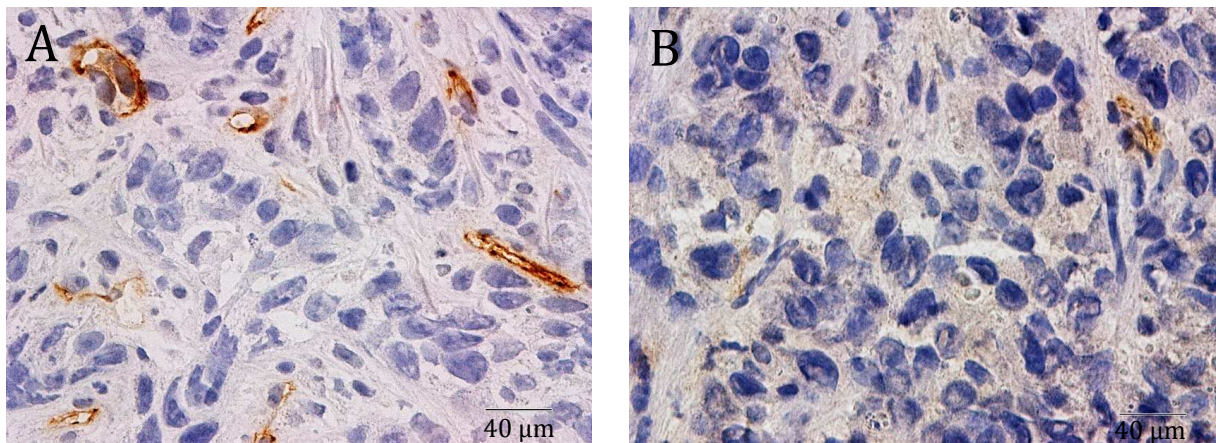


Abbildung 12 – PECAM-1-Färbung zur Auswertung der Angiogenese
(**A**- HAI Sham, **B**- HAI BE+OX)

Alle histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden verblindet durchgeführt.

5.15. Organentnahme

Am 13. Tag nach Versuchsbeginn wurden die Versuchstiere mit Isofluran narkotisiert und anschließend gewogen und bauchseits rasiert. Daraufhin wurden die Versuchstiere wieder auf einer Metallplatte mit Pflasterstreifen fixiert und der Situs wurde durch eine mediane Laparotomie eröffnet. Im Anschluss wurden die Tiere nach hochauflösender 3-D-Sonographie und Blutentnahme durch intraperitoneale Gabe von Narcoren (Merial GmbH, Halbergmoos, BRD) eingeschläfert, um dann die Organe zu entnehmen. Für die späteren Analysen wurde die Leber entnommen. Das Lebergewebe wurde vom Tumorgewebe getrennt. Alle Proben wurden dann jeweils in 3 Stücke geteilt, um diese in Formalin und Tissue-tek (Weckert Labortechnik, Kitzingen, BRD) aufzubewahren oder direkt in flüssigen Stickstoff einzufrieren und umgehend bei -70°C einzulagern.

5.16. Datenerfassung und Statistik

Alle ausgewerteten Parameter sind zunächst per Handschrift notiert worden und anschließend an einem Computer in Excel-Tabellen übertragen und zusammengefasst worden (Microsoft®Excel 2000, Microsoft Cooperation, USA).

Aus den so gewonnenen Datensätzen wurden die Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte (SEM, Standard error of the mean) erhoben. Nach Untersuchung von Varianzgleichheit und Normalverteilung der Werte, wurden die Unterschiede in den einzelnen Gruppen mittels ANOVA (one-way analysis of variance) durchgeführt. Darauf erfolgte ein geeigneter post-hoc Test, welcher die Korrektur des alpha-Fehlers gemäß Bonferroni beinhaltete, um Mehrfachtestungen zu kompensieren. Unterschiede wurden ab 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. Tumorimplantation

Die Implantation der Tumorzellen an Tag 0 erfolgte jeweils komplikationslos in Isoflurannarkose, welche von allen Tieren gut vertragen wurde. Zehn Tage nach Tumorimplantation zeigten alle Tiere bei der Relaparotomie zur hepato-arteriellen Infusion einen auf den linken Leberlappen beschränkten Tumor. Keines der Versuchstiere zeigte während der 10-tägigen Versuchsdauer Auffälligkeiten des Putz- oder Fressverhaltens. Im Rahmen der Laparotomie gab es bei keinem der Tiere den Anhalt für eine Peritonealkarzinose oder einer anderen extrahepatischen Tumormanifestation.

6.2. Bevacizumab + Oxaliplatin

6.2.1. Tumorwachstum

Die Ultraschallanalyse des Tumorwachstums zeigte bei den Tieren der Shamgruppe nach hepato-arterieller Infusion eine fast 50% Zunahme des Tumolvolumens von Tag 10 auf 13. Von Interesse war, dass die hepato-arterielle Infusion von Oxaliplatin (OX) das Tumorwachstum verglichen mit der Shamgruppe nicht reduzieren konnte. Jedoch konnte Bevacizumab (BE) als HAI das Tumorwachstum vollständig verhindern (Abb. 12). Darüber hinaus konnte die Kombination von Bevacizumab (BE) mit Oxaliplatin (OX) das Tumorwachstum nicht nur verhindern, sondern die Tumorgröße sogar um ~ 20% gegenüber dem Ausgangswert reduzieren (Abb. 12). Im Gegensatz dazu hatte die systemische Anwendung von Bevacizumab (BE), Oxaliplatin (OX) oder die Kombination von Bevacizumab und Oxaliplatin keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum im Vergleich zur systemischen Shamgruppe (Abb. 13).

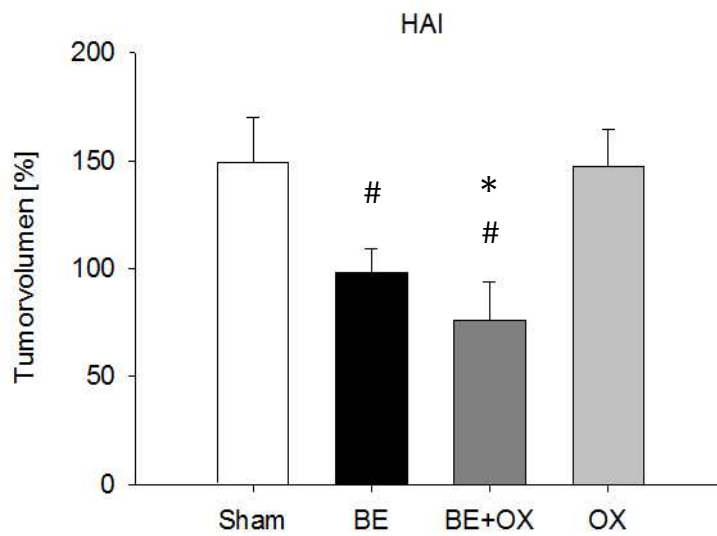


Abbildung 12 – Prozentuales Tumorstadium nach Medikamententherapie als HAI an Tag 13 im Vergleich zu Tag 10. *p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

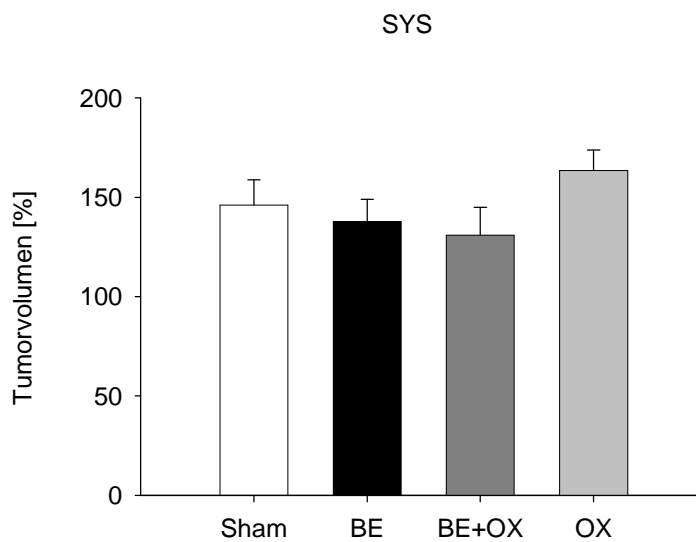


Abbildung 13 – Prozentuales Tumorstadium nach Medikamententherapie als systemische Applikation an Tag 13 im Vergleich zu Tag 10

6.2.2. Histologische Untersuchungen

6.2.2.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die histomorphologische Analyse ergab eine moderate Leberzellschädigung gemessen anhand der Grobscholligkeit und hepatozellulären Vakuolisierung, welche am stärksten nach der hepato-arteriellen Infusion von Bevacizumab ausgeprägt war (Abb. 14). Im Rahmen der systemischen Therapie zeigte sich bei Gabe von Oxaliplatin oder der Kombination von Oxaliplatin mit Bevacizumab ein leichter Leberzellschaden (Abb. 15). Die Endothelablösung sowie die vaskuläre Fibrinthrombosierung waren insgesamt sowohl bei systemischer als auch bei hepato-arterieller Infusionsbehandlung mit Bevacizumab, Oxaliplatin oder Bevacizumab und Oxaliplatin gering (Abb. 16 und 17). Die Auswertung der Erythrozytenwandständigkeit zeigte nach systemischer Therapie mit Bevacizumab und besonders in Kombination mit Oxaliplatin ein signifikanten Anstieg (Abb. 17).

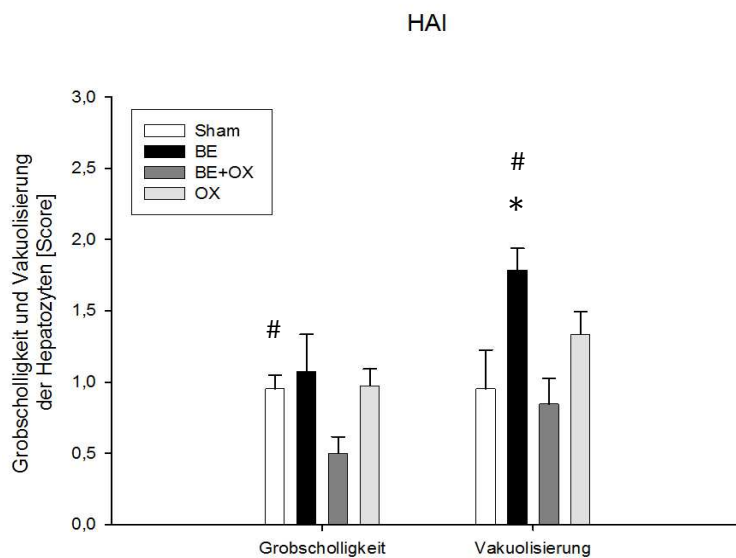


Abbildung 14 – Morphologische Analyse der Grobscholligkeit und Vakuolisierung der Hepatozyten an Tag 13 nach HAI-Medikamententherapie.

*p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

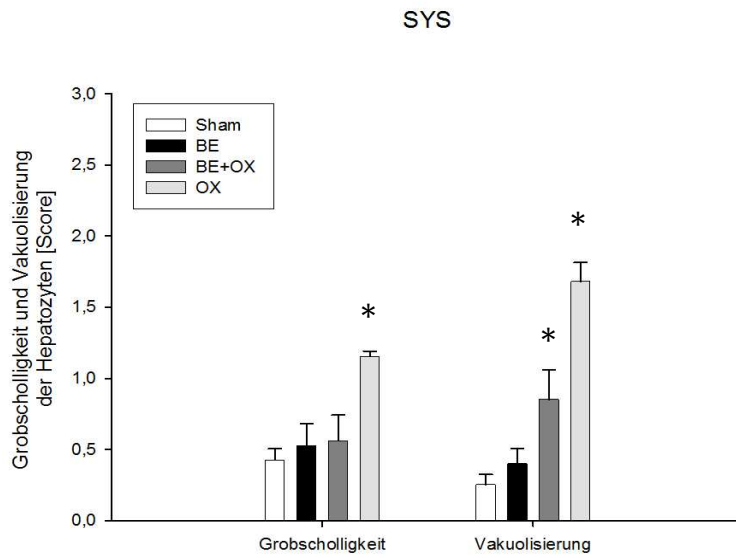


Abbildung 15 – Morphologische Analyse der Grobscholligkeit und Vakuolisierung der Hepatozyten an Tag 13 nach systemischer Medikamententherapie.
*p < 0,05 vs. Sham

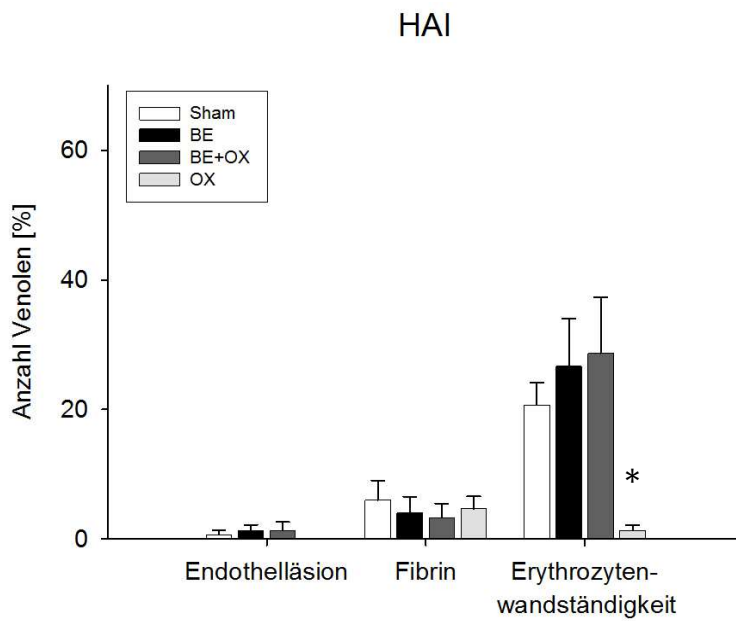


Abbildung 16 – Morphologische Analyse der Endothelläsionen, Fibrinthrombosierungen und Erythrozytenendothelzelladhäsionen an Tag 13 nach HAI-Medikamententherapie.
*p < 0,05 vs. Sham

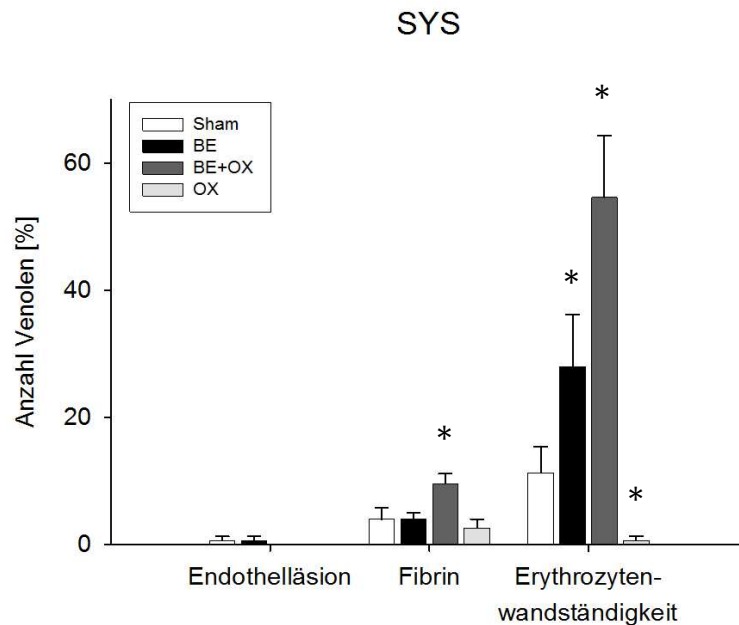


Abbildung 17 – Morphologische Analyse der Endothelläsionen, Fibrinthrombosierungen und Erythrozytenendothelzelladhäsionen an Tag 13 nach systemischer Medikamententherapie. *p < 0,05 vs. Sham

6.2.2.2. AS-D Chloracetatesterase (CAE)

In den CAE-Schnitten wurde quantitativ die Leukozytenadhärenz in Lebergefäßen und die Leukozyteninfiltration in der Leber untersucht. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Nur die Gruppe mit hepato-arterieller Infusion von Bevacizumab (HAI-BE) zeigte eine geringgradig erhöhte Leukozyteninfiltration in den Sinusoiden (Tab. 1 und 2).

HAI	SHAM	BE	BE+OX	OX
Sinusoide	1,18 (±0,58)	0,92 (±0,21) #	0,58 (±0,10)	0,90 (±0,13)
Portalfeld intravasal	0,14 (±0,04)	0,14 (±0,12)	0,03 (±0,03)	0,15 (±0,08)
Portalfeld extravasal	2,06 (±0,37)	2,93 (±0,36)	1,35 (±0,31)	2,17 (±0,54)
Venole intravasal	0,04 (±0,02)	0,22 (±0,90)	0,07 (±0,03)	0,12 (±0,03)
Venole extravasal	1,26 (±0,43)	1,05 (±0,25)	0,78 (±0,12)	0,80 (±0,17)

Tabelle 1 – Tabelle mit Analyse der Leukozyteninfiltration (CAE-Färbung) nach HAI-Medikamententherapie in den verschiedenen Lebergefäßen. #p < 0,05 vs. SYS

SYS	SHAM	BE	BE+OX	OX
Sinusoide	0,68 (±0,28)	0,41 (±0,05)	1,10 (±0,22)	0,87 (±0,11)
Portalfeld intravasal	0,13 (±0,08)	0,00 (±0,00)	0,07 (±0,05)	0,18 (±0,07)
Portalfeld extravasal	3,58 (±0,85)	2,12 (±0,39)	1,35 (±0,21)	1,28 (±0,18)
Venole intravasal	0,07 (±0,04)	0,10 (±0,04)	0,03 (±0,03)	0,03 (±0,02)
Venole extravasal	0,57 (±0,10)	0,38 (±0,11)	0,80 (±0,14)	0,83 (±0,15)

Tabelle 2 – Tabelle mit Analyse der Leukozyteninfiltration (CAE-Färbung) nach systemischer Medikamententherapie in den verschiedenen Lebergefäßen. #p < 0,05 vs. SYS

6.2.3. Immunhistochemische Untersuchungen

6.2.3.1. Apoptose, Caspase-3

Die immunhistochemischen Analysen der Apoptose im Tumor zeigten eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der Anzahl Caspase-3-positiver Zellen nach hepato-arterieller Infusion mit Oxaliplatin (HAI-OX) oder Bevacizumab (HAI-BE) im Vergleich zu den Shamkontrollen der hepato-arteriellen Infusion. Nur die hepato-arterielle Infusion von Bevacizumab und Oxaliplatin (HAI-BE+OX) war in der Lage eine signifikante Erhöhung der Anzahl der apoptotischen Zellen im Tumor zu erzielen (Abb. 18). Im Gegensatz dazu hatte die systemische Therapie keinen Einfluss auf die Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen im Vergleich zur systemischen Shamkontrolle, auch nicht bei Behandlung mit Bevacizumab und Oxaliplatin (SYS-BE-OX) (Abb. 19). Im Lebergewebe zeigten die Caspase-3-positiven Zellen weder nach hepato-arterieller Infusion noch nach systemischer Gabe der Substanzen einen signifikanten Unterschied (Abb. 18 und 19).

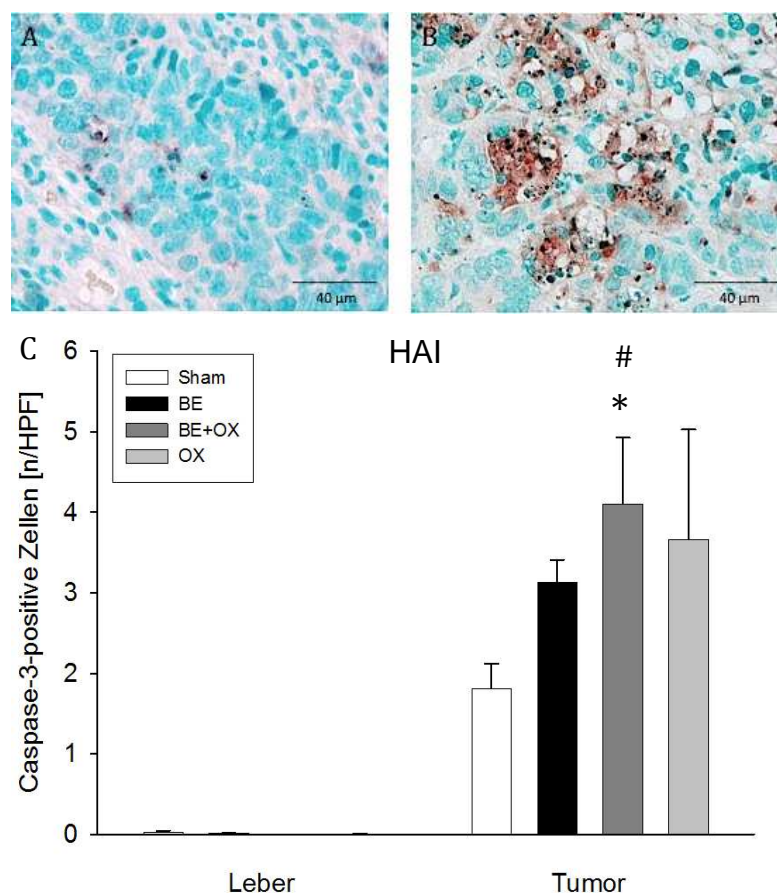


Abbildung 18 – Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen pro HPF der HAI-Gruppen jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen Caspase-3-Färbung an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS (A-HAI Sham, B- HAI BE+OX, C- Diagramm der Caspase-3-positiven Zellen im Leber- und Tumorgewebe)

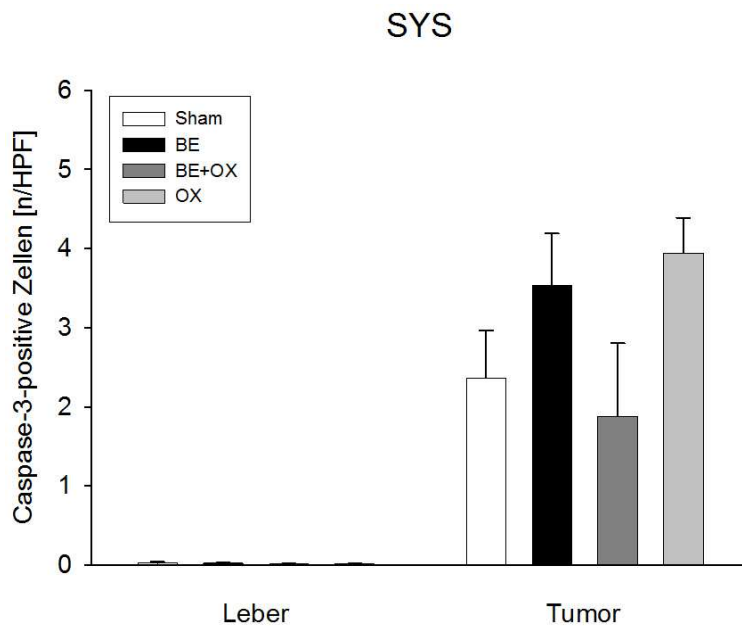


Abbildung 19 – Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen pro HPF der systemischen Gruppen jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen Caspase-3-Färbung an Tag 13.

6.2.3.2. Proliferation, PCNA

In der systemischen Shamgruppe zeigte die Analyse der Proliferation der Tumorzellen nahezu 50% PCNA-positive Zellen. In der hepato-arteriellen Shamgruppe war der Anteil der PCNA-positiven Zellen im Tumor leicht, aber signifikant im Vergleich zu den systemischen Shamkontrollen reduziert (Abb. 20). Die hepato-arterielle Infusion mit Oxaliplatin-Behandlung konnte die Tumorzellproliferation nicht weiter reduzieren. Im Gegensatz dazu senkte die hepato-arterielle Infusion sowohl mit Bevacizumab als auch mit Bevacizumab plus Oxaliplatin die Anzahl der PCNA-positiven Zellen im Vergleich zur Shamkontrolle (HAI-Sham) signifikant (Abb. 20). Die systemische Anwendung von Bevacizumab, Oxaliplatin oder die Kombination von Bevacizumab und Oxaliplatin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation im Vergleich zur systemischen Shamkontrolle (SYS-Sham). Im Lebergewebe zeigten die PCNA-positiven Zellen nach hepato-arterieller Infusion der Substanzen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 20). Bei systemischer Gabe zeigte nur Bevacizumab eine signifikante Reduktion der PCNA-positiven Zellen im Vergleich zur systemischen Shamgruppe (Abb. 21).

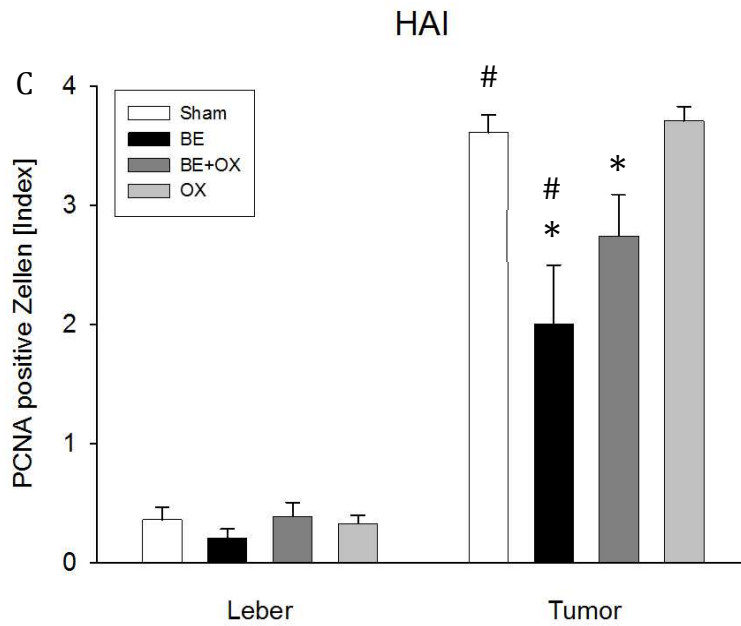
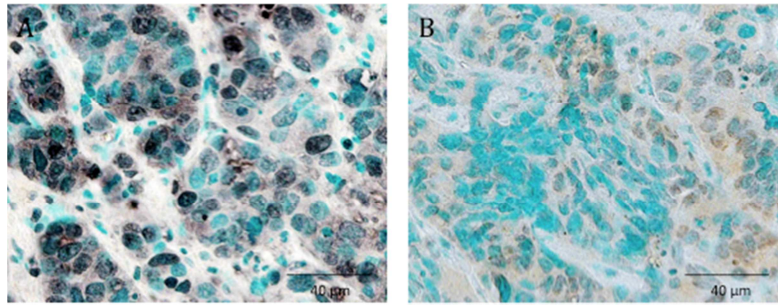


Abbildung 20 – Untersuchung der PCNA-positiven Zellen der HAI-Gruppen jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PCNA-Färbung an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS (A-HAI Sham, B- HAI BE, C- Diagramm der PCNA-positiven Zellen im Leber- und Tumorgewebe)

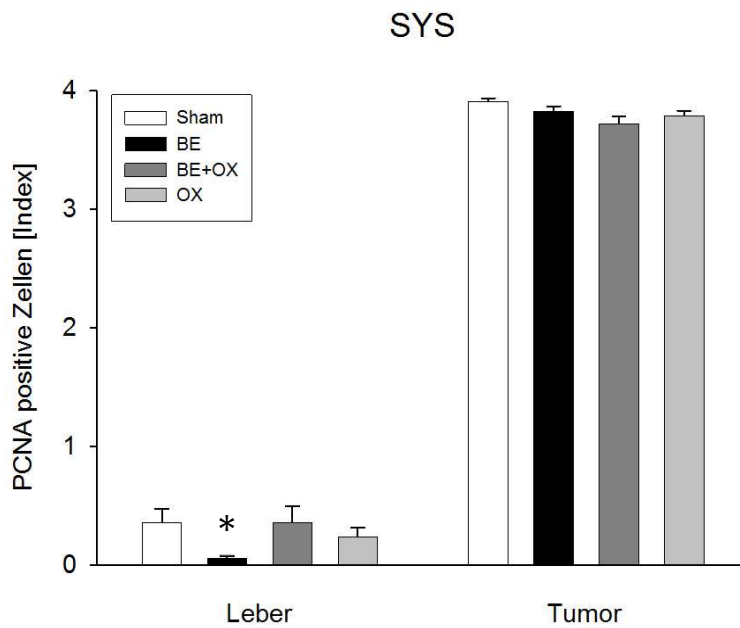


Abbildung 21 – Untersuchung der PCNA-positiven Zellen der Gruppen mit systemischer Therapie jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PCNA-Färbung an Tag 13

6.2.3.3. Vaskularisierung, PECAM-1

Die Analyse der Vaskularisierung zeigte eine ca. 50% Reduzierung der PECAM-1-positiven Zellen im Tumor nach hepato-arterieller Infusion von Oxaliplatin (HAI-OX), Bevacizumab (HAI-BE) und der Kombination von Oxaliplatin (HAI-BE-OX) im Vergleich zur hepato-arteriellen Shamkontrolle (Abb. 22). Die Versuchstiere der systemischen Therapiegruppen zeigten sowohl bei der Therapie mit Oxaliplatin (SYS-OX), Bevacizumab (SYS-BE) als auch bei der Kombination von Oxaliplatin mit Bevacizumab (SYS-BE-OX) eine 25-40%-ige Reduktion der Tumolvaskularisierung im Vergleich zu den shambehandelten Tiere (SYS-Sham) (Abb. 23).

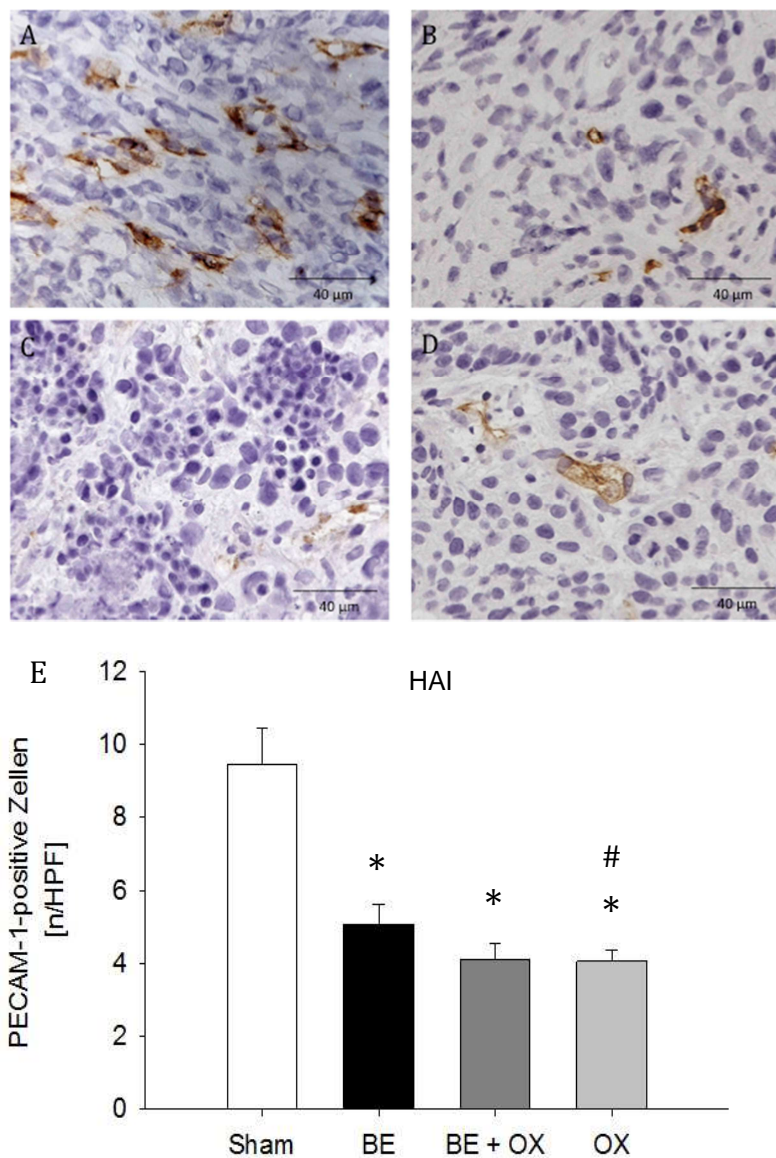


Abbildung 22 – Untersuchung der PECAM-1-positiven Zellen der HAI-Gruppen im Tumorgewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PECAM-1-Färbung an Tag 13. * $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,05$ vs. SYS (A-HAI Sham, B- HAI BE, C-HAI BE+OX, D- HAI OX, E- Diagramm der PECAM-1-positiven Zellen im Tumorgewebe)

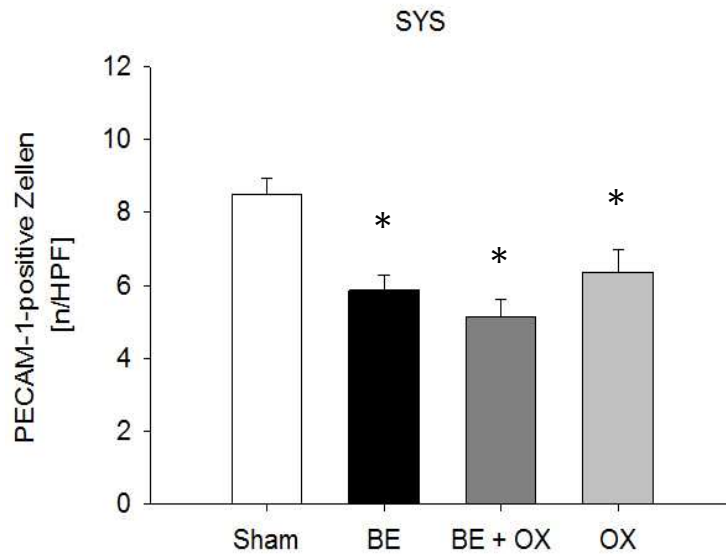


Abbildung 23 – Untersuchung der PECAM-1-positiven Zellen der systemischen Therapiegruppen im Tumorgewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PECAM-1-Färbung an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham

6.2.4. Gewicht der Versuchstiere

In den Gruppen der hepato-arteriellen Infusion zeigten nur die Tiere, die Bevacizumab und Oxaliplatin erhielten, eine signifikante Gewichtsreduktion im Vergleich zu den systemisch behandelten Versuchstieren (Abb. 24). Die Versuchstiere der Gruppen der systemischen Therapie zeigten keinen signifikanten Unterschied bei der Gewichtsentwicklung an Tag 13 in Relation zu Tag 0 (Abb. 25).

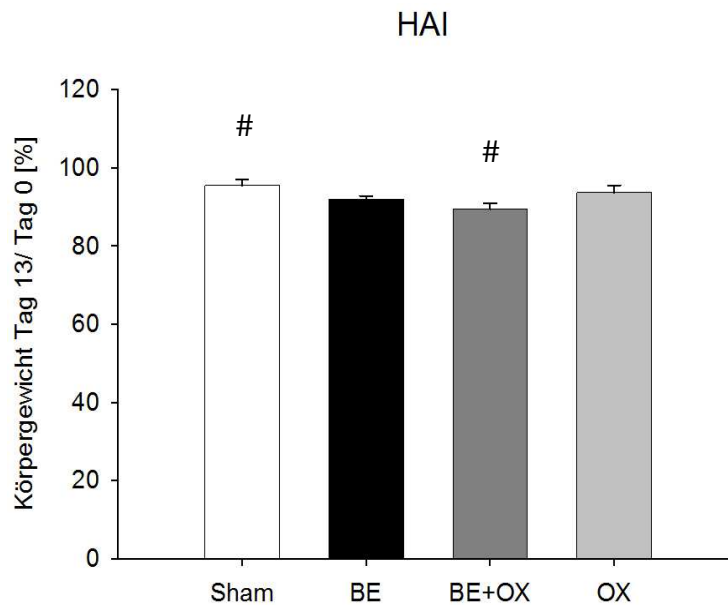


Abbildung 24 –Prozentuale Änderung des Körpergewichts der Versuchstiere der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 0. #p < 0,05 vs. SYS

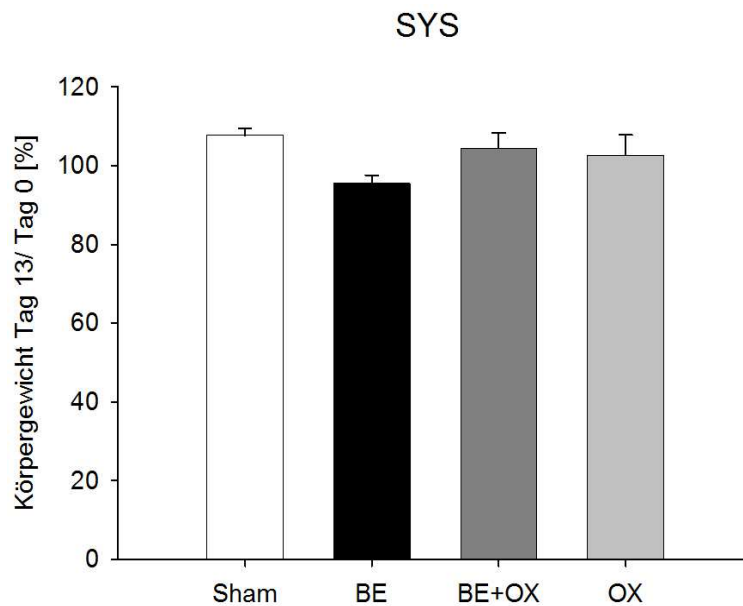


Abbildung 25 –Prozentuale Änderung des Körpergewichts der Versuchstiere der systemischen Therapiegruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 0

6.2.5. Laborchemische Parameter

6.2.5.1. Leberenzyme

Die Analyse der Leberenzyme (γ -GT, GOT, GPT, LDH, GLDH) als Indikatoren für eine hepatozelluläre Schädigung ergab an Tag 10 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren mit hepato-arterieller Infusion und systemischer Therapie.

Die Analyse an Tag 13 zeigte bei Tieren mit HAI-OX eine signifikante Erhöhung der GLDH im Vergleich zu den systemisch therapierten Tieren. Im Vergleich zu den Shamkontrollen zeigte sich eine signifikante Verringerung der GLDH. Die systemisch mit BE behandelten Tieren zeigten eine signifikante Reduktion der GPT im Vergleich zur Shamgruppe. Die Analyse von γ -GT, GOT und LDH zeigte weder nach hepato-arterieller Infusion noch bei systemischer Therapie signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen. Es war insgesamt bei der Untersuchung der Leberenzyme keine relevante hepatische Schädigung zu beobachten (Tab. 3 und 4).

HAI	SHAM	BE	BE+OX	OX
Y-GT	208,56 (±31,56)	493,74 (±160,69)	500,00 (±141,42)	245,78 (±110,58)
GOT	212,37 (±72,94)	137,37 (±22,38)	310,40 (±109,09)	243,57 (±34,20)
GPT	95,99 (±26,65)	119,57 (±39,02)	128,15 (±22,57)	153,04 (±18,39)
LDH	213,83 (±90,07)	141,38 (±38,53)	169,84 (±63,57)	87,85 (±26,51)
GLDH	223,59 (±65,53)	196,38 (±40,41)	191,29 (±44,21)	121,53 (±25,62) # *

Tabelle 3 – Analyse der Leberenzyme an Tag 13.
*p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

SYS	SHAM	BE	BE+OX	OX
Y-GT	140,42 (±41,35)	486,11 (±205,95)	272,22 (±117,82)	504,76 (±148,54)
GOT	178,50 (±62,29)	145,77 (±37,24)	288,63 (±57,26)	186,49 (±38,88)
GPT	123,05 (±12,52)	65,74 (±1,79) *	106,17 (±16,70)	146,59 (±26,00)
LDH	153,63 (±81,19)	347,79 (±100,59)	174,29 (±40,78)	55,99 (±14,55)
GLDH	123,76 (±27,70)	149,01 (±32,64)	276,02 (±71,15)	45,96 (±11,53)

Tabelle 4 – Analyse der Leberenzyme an Tag 13.
*p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

6.2.5.2. Leukozyten

Die Analyse der Anzahl der Leukozyten als ein Indikator für systemische Entzündung zeigte an Tag 10 in allen untersuchten Gruppen normale Werte. Alle Shamtiere wiesen an Tag 13 leicht erhöhte Werte von weißen Blutkörperchen auf (Abb. 26 und 27). Alle Tieren, die Oxaliplatin erhalten hatten, zeigten eine statistisch signifikant geringere Anzahl von Leukozyten als die Shamkontrollen, dabei war die Leukozytenreduktion bei Tieren die Oxaliplatin als hepato-arterielle Infusion erhalten hatten im Vergleich zur systemischen Applikation deutlich geringer (Abb. 26 und 27).

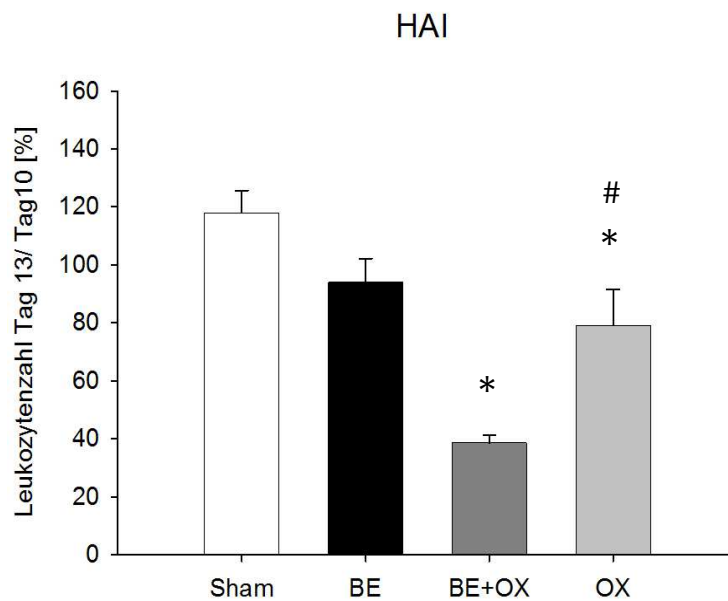


Abbildung 26 –Leukozytenanzahl der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10. *p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

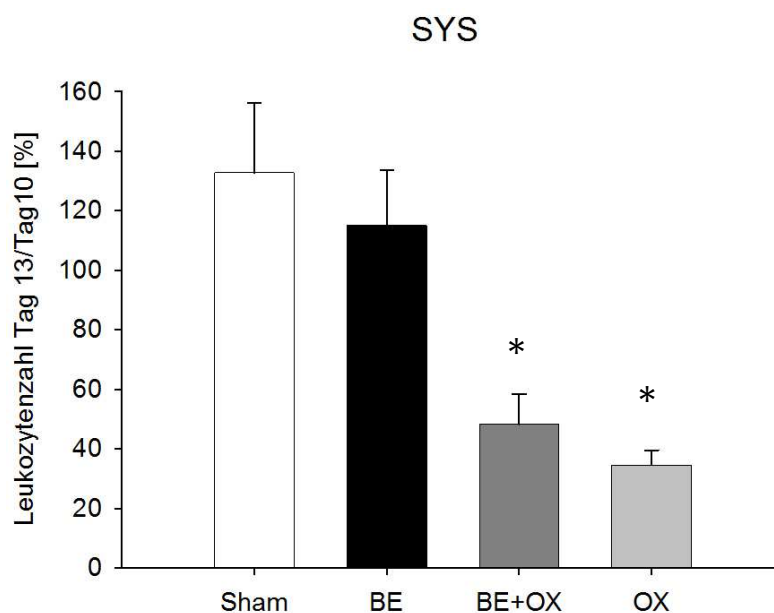


Abbildung 27 –Leukozytenanzahl der systemischen Therapiegruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10. *p < 0,05 vs. Sham

6.2.5.3. Hämoglobin

Die Auswertung des Hämoglobins bei der Analyse der Blutwerte zeigte in keiner der untersuchten Gruppen eine signifikante Veränderung (Abb. 28 und 29).

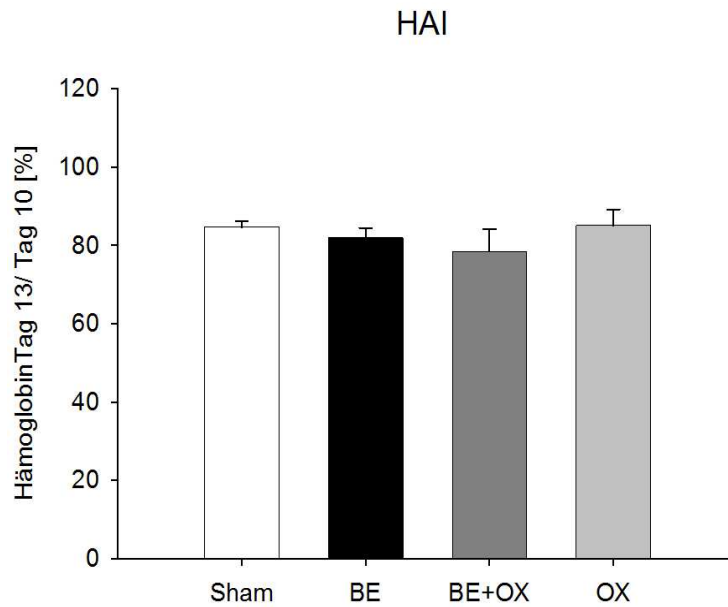


Abbildung 28 –Änderung der Hämoglobinwerte der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10

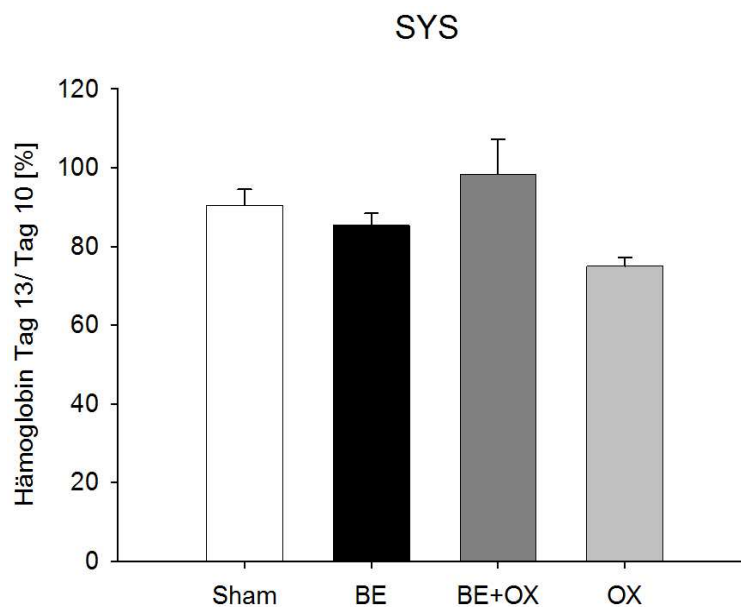


Abbildung 29 –Änderung der Hämoglobinwerte der systemischen Therapiegruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10

6.2.5.4. Thrombozyten

Bei der Analyse der Thrombozytenzahl im Blut zeigte sich außer in der Gruppe der hepatoarteriellen Infusion mit Oxaliplatin keine Veränderung der Thrombozytenanzahl von Tag 10 zu Tag 13 (Abb. 30 und 31). In der Gruppe mit hepatoarterieller Infusion mit Oxaliplatin kam es zu einem signifikanten Anstieg der Thrombozytenzahl.

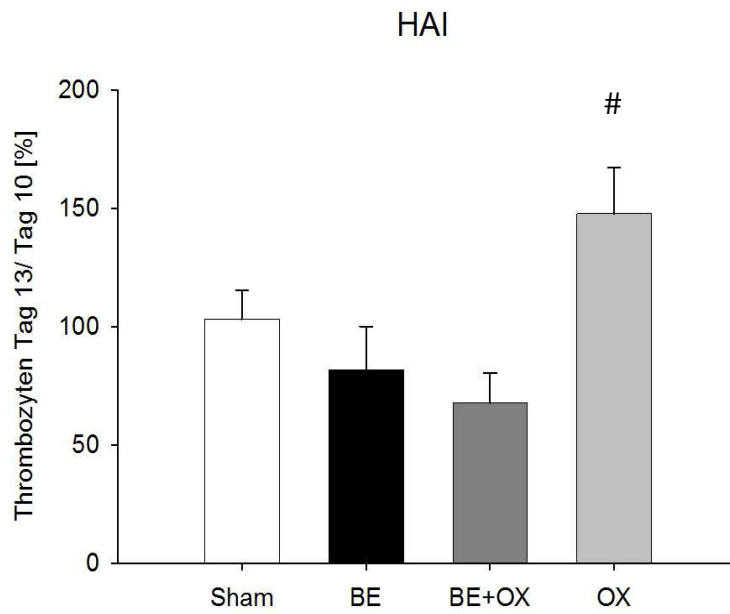


Abbildung 30 -Thrombozytenzahl der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10. #p < 0,05 vs. SYS

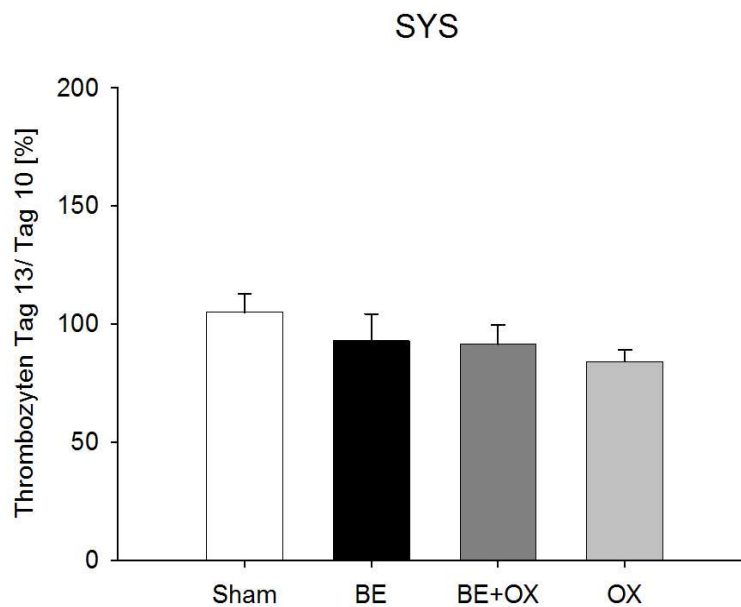


Abbildung 31 -Thrombozytenzahl der sytemische Therapiegruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10

6.3. Bevacizumab + Irinotecan

6.3.1. Tumorwachstum

Wie in den Versuchstiergruppen der hepato-arteriellen Infusion von Oxaliplatin konnte in den Gruppen von Irinotecan nur die Kombination mit Bevacizumab eine Tumorprogression verhindern, was allerdings aufgrund der Standardabweichung nicht signifikant war (Abb. 32). Vergleichbar der systemischen Therapie von Oxaliplatin oder kombiniert mit Bevacizumab ergab die systemische Therapie von Irinotecan (SYS-IR) bzw. die Kombination von Irinotecan (SYS-BE-IR) mit Bevacizumab keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum im Vergleich zur systemischen Shamgruppe (Abb. 33).

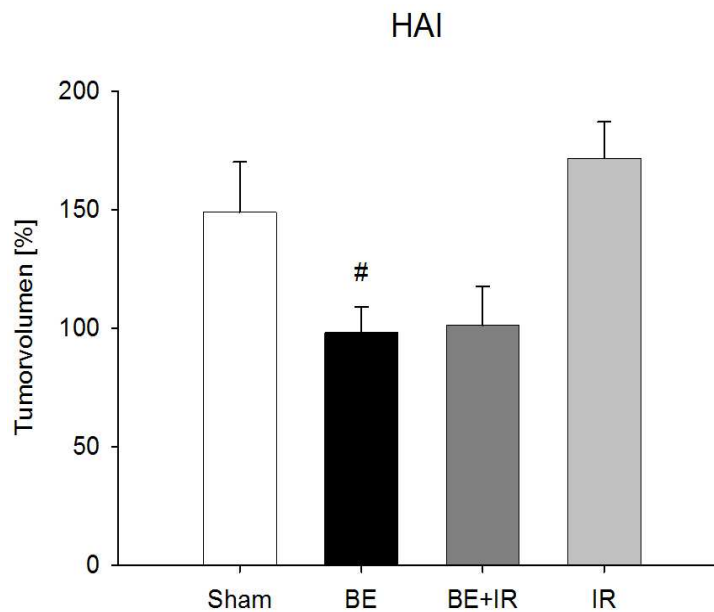


Abbildung 32 – Prozentuales Tumorvolumen an Tag 13 im Vergleich zu Tag 10 nach Medikamententherapie als HAI.
#p < 0,05 vs. SYS

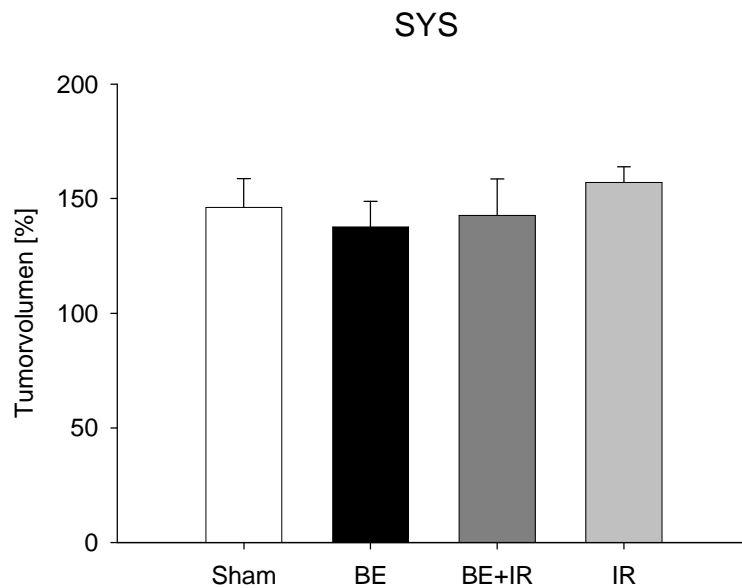


Abbildung 33 – Prozentuales Tumorzvolumen an Tag 13 im Vergleich zu Tag 10 nach Medikamententherapie als systemische Applikation.

6.3.2. Histologische Untersuchungen

6.3.2.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die Analyse der Histomorphologie ergab neben einer hepatozellulären Vakuolisierung bei hepatisch-arterieller Therapie von Bevacizumab auch eine geringere, aber signifikante hepatozelluläre Vakuolisierung bei hepato-arterieller Infusion von Irinotecan und bei der Kombination von Bevacizumab und Irinotecan (Abb. 40). Im Rahmen der systemischen Applikation zeigte nur Irinotecan eine ausgeprägte Vakuolisierung (Abb. 41).

Die Endothelablösung, die Erythrozytenwandständigkeit und vaskuläre Fibrinthrombosierung waren insgesamt ähnlich den Ergebnissen mit Oxaliplatin sowohl bei systemischer Gabe als auch bei hepatisch-arterieller Infusionsbehandlung von Bevacizumab, Irinotecan oder Bevacizumab und Irinotecan nicht signifikant (Abb. 42 und Abb. 43).

HAI

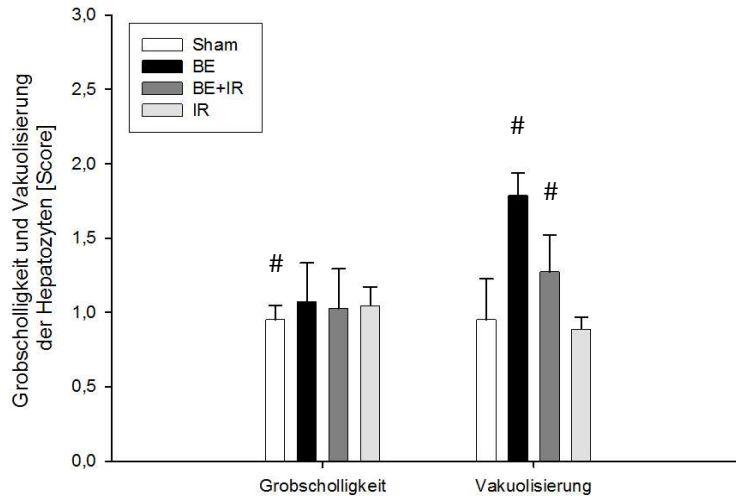


Abbildung 40 – Morphologische Analyse der Grobscholligkeit und Vakuolisierung der Hepatozyten nach Medikamententherapie als HAI an Tag 13. #p < 0,05 vs. SYS

SYS

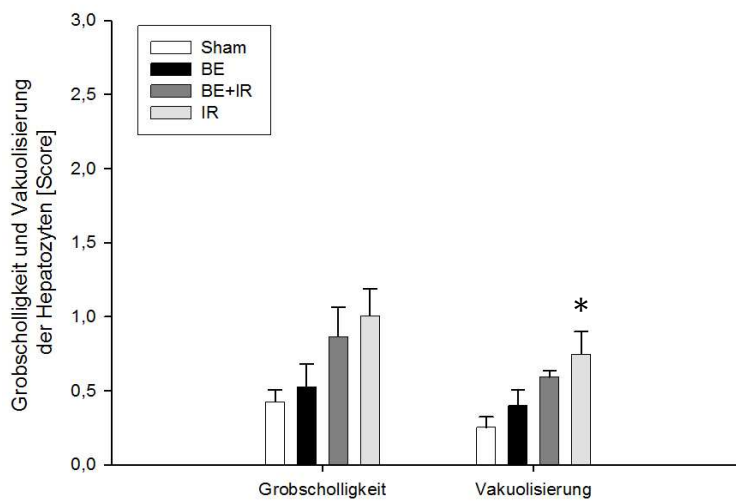


Abbildung 41 – Morphologische Analyse der Grobscholligkeit und Vakuolisierung der Hepatozyten nach Medikamententherapie als systemische Applikation an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham

HAI

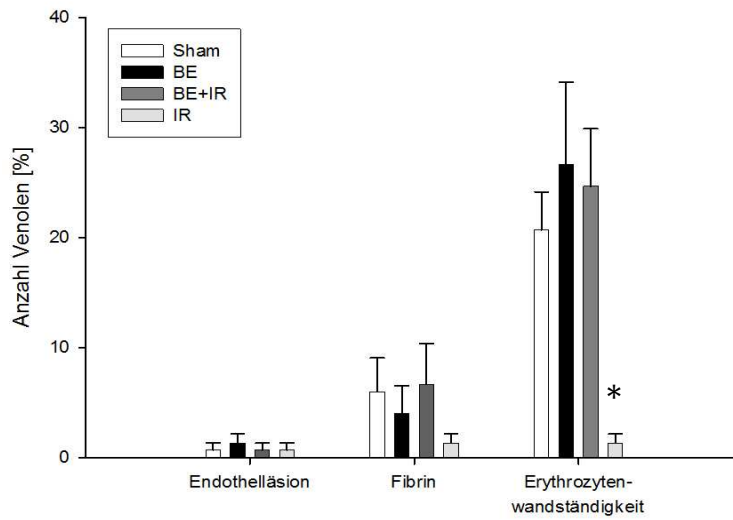


Abbildung 42 – Morphologische Analyse der Endothelläsionen, Fibrinthrombosierungen und Erythrozytenendothelzellularinfiltrationen nach Medikamententherapie als HAI an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham

SYS

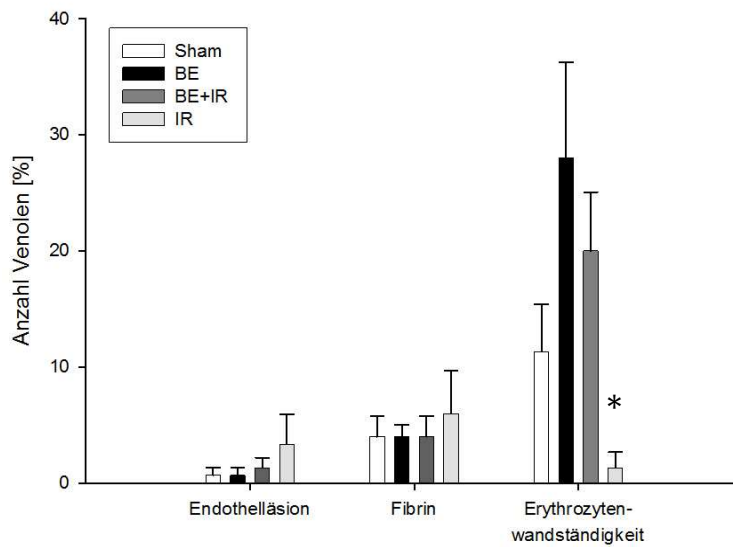


Abbildung 43 – Morphologische Analyse der Endothelläsionen, Fibrinthrombosierungen und Erythrozytenendothelzellularinfiltrationen nach Medikamententherapie als systemische Applikation an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham

6.3.2.2. AS-D Chloracetatesterase (CAE)

In den CAE-Schnitten wurde quantitativ die Leukozytenadhärenz in Lebergefäßen und die Leukozyteninfiltration in der Leber untersucht. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Nur die Gruppen mit Irinotecan (IR) zeigten sowohl bei hepato-arterieller Infusion als auch bei systemischer Applikation eine erhöhte Leukozyteninfiltration in den Sinusoiden und extravasal im Bereich der Venolen (Tab. 5 und 6).

HAI	SHAM	BE	BE+IR	IR
Sinusoiden	1,18 (±0,58)	0,92 (±0,21)	1,28 (±0,26)	1,02 (±0,18) #
Portalfeld intravasal	0,14 (±0,04)	0,14 (±0,12)	0,07 (±0,07)	0,07 (±0,03)
Portalfeld extravasal	2,06 (±0,37)	2,93 (±0,36)	4,27 (±1,40)	3,37 (±0,36)
Venole intravasal	0,04 (±0,02)	0,22 (±0,90)	0,10 (±0,04)	0,08 (±0,04)
Venole extravasal	1,26 (±0,43)	1,05 (±0,25)	1,10 (±0,24)	0,70 (±0,15) #

Tabelle 5 - Tabelle mit Analyse der Leukozyteninfiltration (CAE-Färbung) nach HAI-Medikamententherapie in den verschiedenen Lebergefäßen. *p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

SYS	SHAM	BE	BE+IR	IR
Sinusoide	0,68 (±0,28)	0,41 (±0,05)	1,07 (±0,15)	2,40 (±0,45) *
Portalfeld intravasal	0,13 (±0,08)	0,00 (±0,00)	0,00 (±0,00)	0,03 (±0,03)
Portalfeld extravasal	3,58 (±0,85)	2,12 (±0,39)	2,50 (±0,39)	4,10 (±0,12)
Venole intravasal	0,07 (±0,04)	0,10 (±0,04)	0,08 (±0,08)	0,10 (±0,06)
Venole extravasal	0,57 (±0,10)	0,38 (±0,11)	0,93 (±0,12)	1,50 (±0,32) *

Tabelle 6 - Tabelle mit Analyse der Leukozyteninfiltration (CAE-Färbung) nach systemischer Medikamententherapie in den verschiedenen Lebergefäßen. *p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

6.3.3. Immunhistochemische Untersuchungen

6.3.3.1. Apoptose, Caspase-3

Die Analyse der Caspase-3 positiven Zellen ergab bei Kombination von Irinotecan mit dem Antikörper Bevacizumab als hepato-arterielle Infusion eine signifikante Erhöhung der Anzahl der apoptotischen Zellen (Abb. 44). Ähnlich der lokoregionären Therapie mit Bevacizumab konnte auch Irinotecan eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der Apoptose im Vergleich zur Shamkontrolle erzielen. Im Gegensatz dazu konnte weder die systemische Therapie von Irinotecan als auch die Kombination von Irinotecan und Bevacizumab keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der gespaltenen Caspase-3-positiven Zellen im Vergleich zur systemischen Shamkontrolle erzielen (Abb. 45). Im Lebergewebe zeigten die Caspase-3 positiven Zellen weder nach hepato-arterieller Infusion als auch nach systemischer Gabe der Substanzen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 44 und Abb. 45).

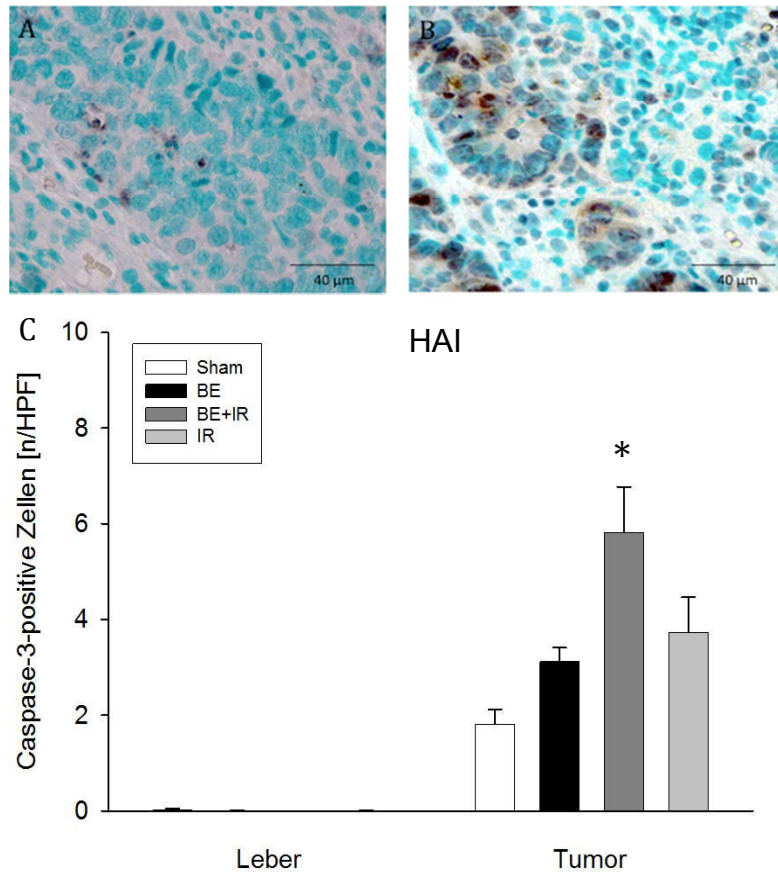


Abbildung 44 – Untersuchung der Caspase-3-positiven Zellen der HAI-Gruppen jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen Caspase-3-Färbung an Tag 13. * $p < 0,05$ vs. Sham (A-HAI Sham, B- HAI BE+IR, C- Diagramm der Caspase-3-positiven Zellen im Leber- und Tumorgewebe)

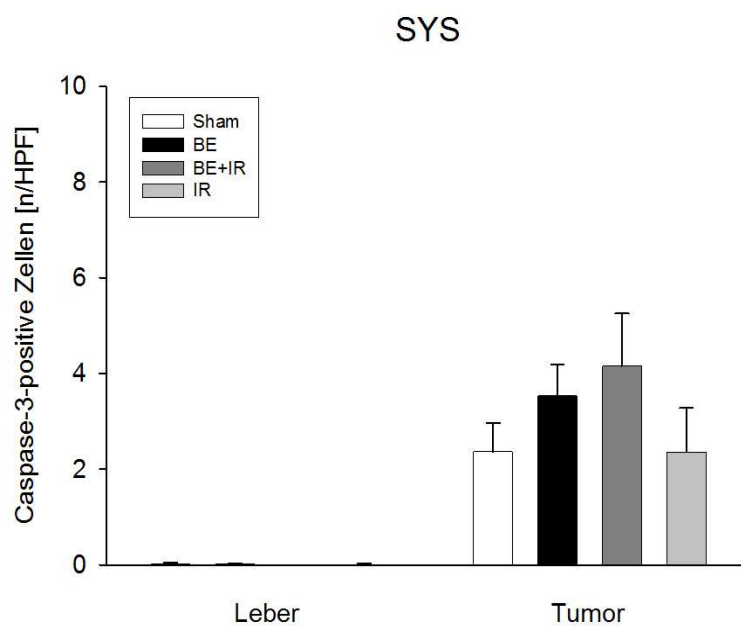


Abbildung 45 – Untersuchung der Caspase-3-positiven der Gruppen mit systemischer Therapie jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen Caspase-3-Färbung an Tag 13

6.3.3.2. Proliferation, PCNA

Irinotecan hatte wie Oxaliplatin und Bevacizumab als Monotherapie sowie in Kombination mit Bevacizumab als systemische Therapie keinen Einfluß auf die Anzahl der PCNA-positiven Zellen im Tumorgewebe (Abb. 46). In den Gruppen der hepatoarteriellen Infusion von Irinotecan als Monotherapie und von Kombination mit Bevacizumab zeigte sich die Anzahl der PCNA-positiven Zellen nicht reduziert im Vergleich zu den Shamkontrollen (Abb. 47). Im Lebergewebe zeigten die PCNA-positiven Zellen bei hepatoarterieller Infusion der Substanzen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 46). Bei systemischer Gabe zeigte nur Bevacizumab eine signifikante Reduktion der PCNA-positiven Zellen im Vergleich zur systemischen Shamgruppe (Abb. 47).

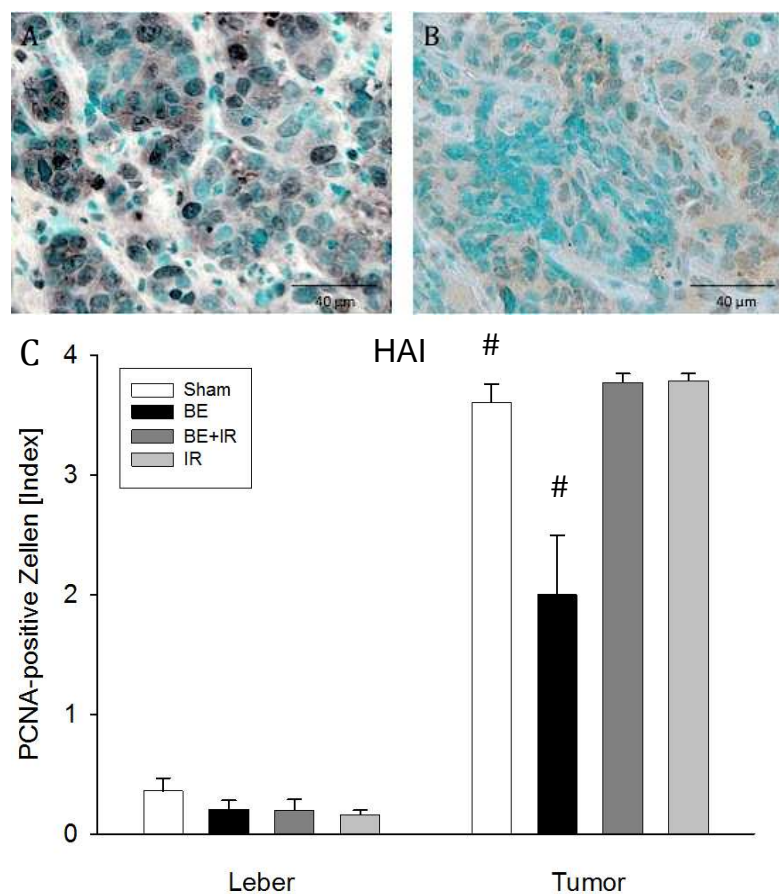


Abbildung 46 – Untersuchung der PCNA-positiven Zellen der HAI-Gruppen jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PCNA-Färbung an Tag 13. #p < 0,05 vs. SYS (A-HAI Sham, B- HAI BE, C- Diagramm der PCNA-positiven Zellen im Leber- und Tumorgewebe)

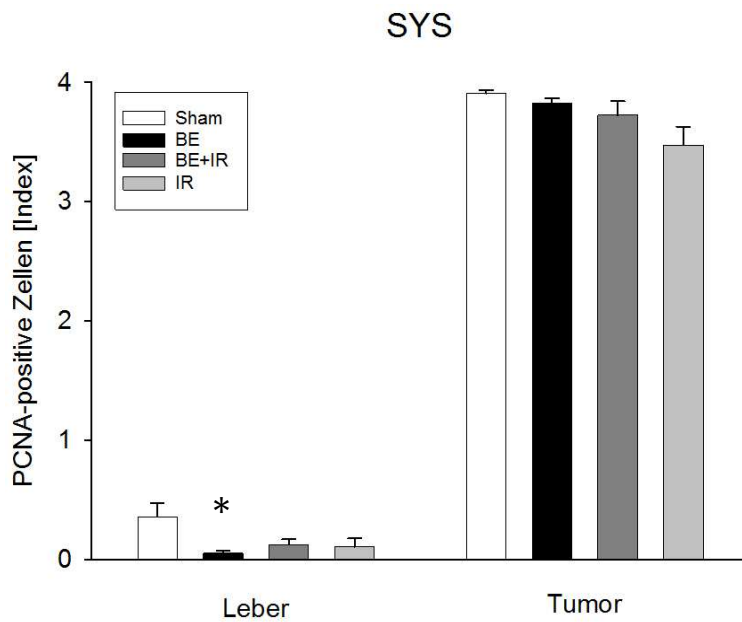


Abbildung 47 – Untersuchung der PCNA-positiven Zellen der Gruppen mit systemischer Therapie jeweils im Tumorgewebe sowie im gesunden Lebergewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PCNA-Färbung an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham

6.3.3.3. Vaskularisierung, PECAM-1

Die Analyse der Vaskularisierung zeigte im Falle der Therapie mit IR eine ca. 50% Reduzierung der PECAM-1-positiven Zellen im Tumor nach hepato-arterieller Infusion. Allerdings zeigte die Kombination von Irinotecan mit BE als hepato-arterielle Infusion keine signifikante Reduktion der PECAM-1-positiven Zellen im Vergleich zur Shamgruppe (Abb. 48). Die Versuchstiere der systemischen Therapiegruppen zeigten ähnlich der Ergebnisse der Versuchstiere mit lokoregionärer Therapie nur eine Reduktion der Vaskularisierung bei Therapie mit BE oder IR (Abb. 49).

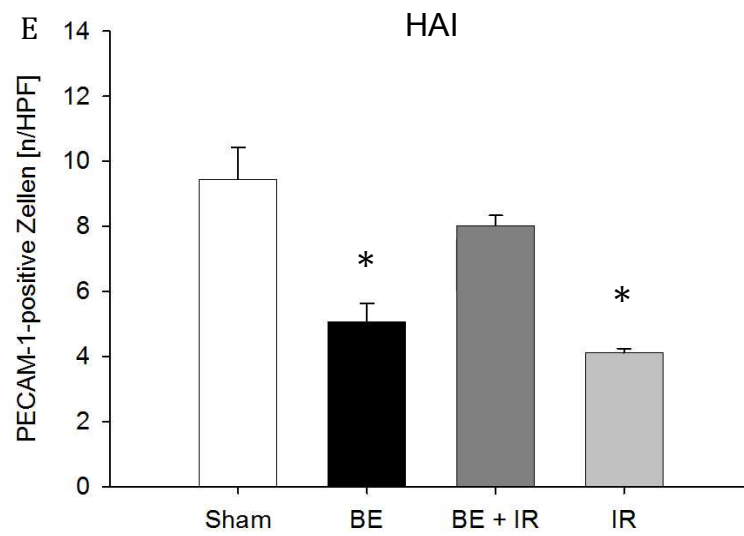
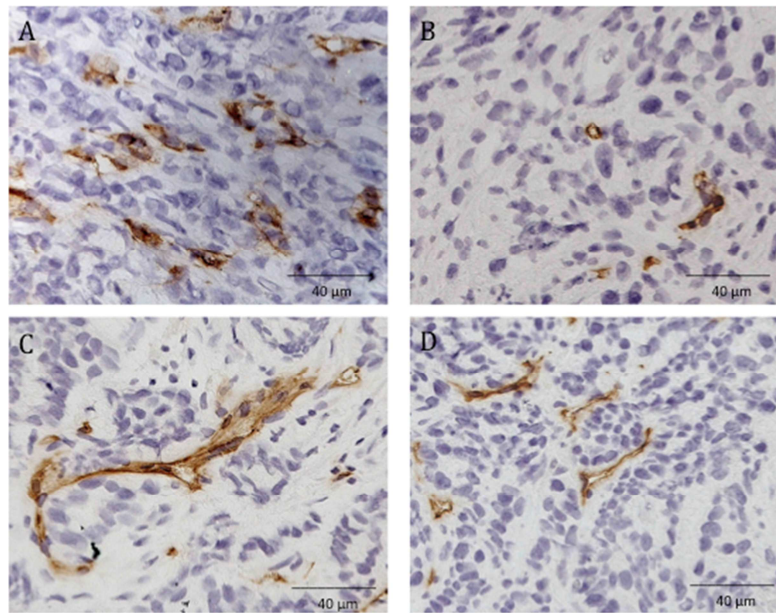


Abbildung 48 – Untersuchung der PECAM-1-positiven Zellen der HAI-Gruppen im Tumorgewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PECAM-1-Färbung an Tag 13. * $p < 0,05$ vs. Sham (**A**-HAI Sham, **B**- HAI BE, **C**-HAI BE+OX, **D**- HAI OX, **E**- Diagramm der PECAM-1-positiven Zellen im Tumorgewebe)

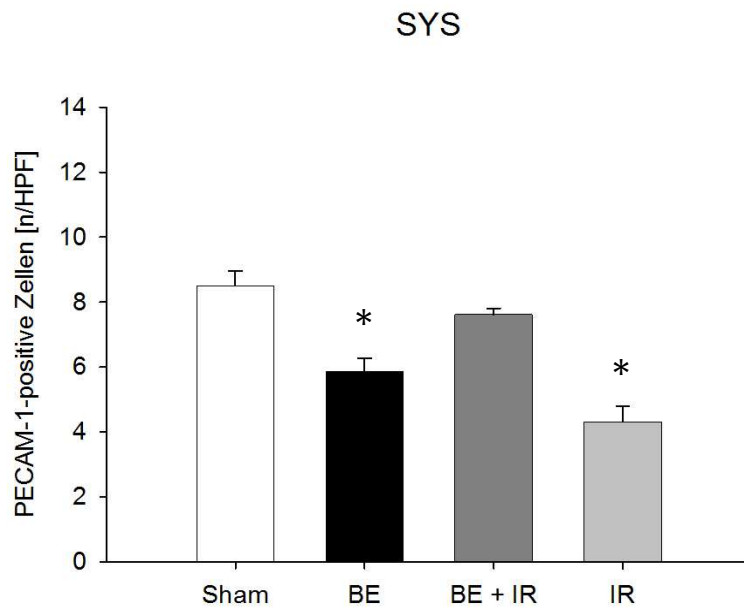


Abbildung 49 – Untersuchung der PECAM-1-positiven Zellen der systemischen Therapiegruppen im Tumorgewebe mit Hilfe einer immunhistochemischen PECAM-1-Färbung an Tag 13. *p < 0,05 vs. Sham

6.3.4. Gewicht der Versuchstiere

Die Versuchstiere der Gruppen der systemischen Therapie zeigten eine leicht signifikante Gewichtsabnahme an Tag 13 in Relation zu Tag 0 in den Gruppen mit Applikation von Bevacizumab sowie Irinotecan (Abb. 51). In den Gruppen der hepatisch-arteriellen Infusion zeigten nur die Tiere, die Bevacizumab erhielten, eine leicht signifikante Gewichtsreduktion (Abb. 50).

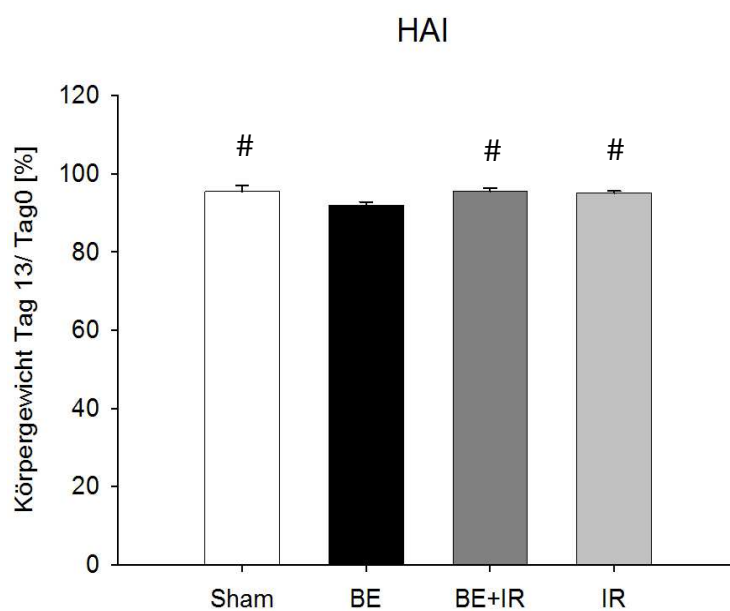


Abbildung 50 – Prozentuelle Änderung des Körpergewichts der Versuchstiere der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 0. #p < 0,05 vs. SYS

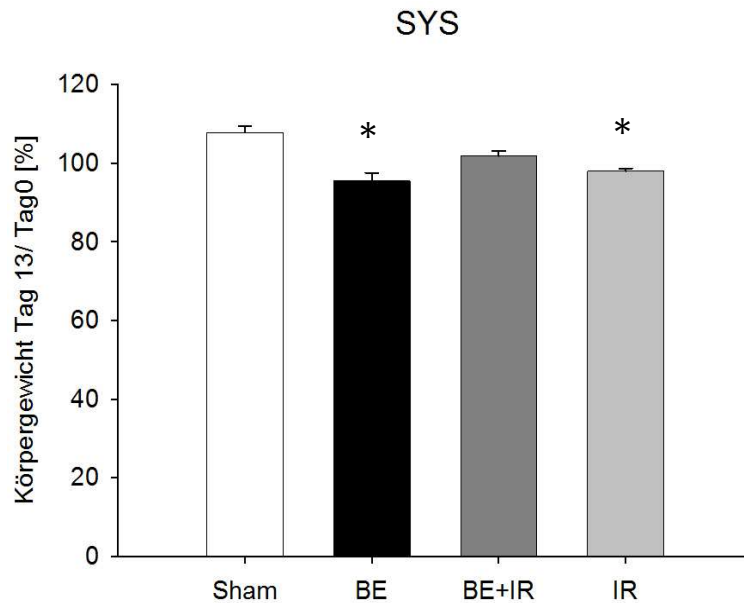


Abbildung 51 –Prozentuelle Änderung des Körpergewichts der Versuchstiere der systemischen Therapiegruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 0. *p < 0,05 vs. Sham

6.3.5 Laborchemische Parameter

6.3.5.1. Leberenzyme

Die Analyse der Leberenzyme (γ -GT, GOT, GPT, LDH, GLDH) als Indikatoren für eine hepatozelluläre Schädigung ergab an Tag 10 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren mit hepato-arterieller Infusion und systemischer Therapie.

Die Analyse an Tag 13 zeigte eine signifikante Verminderung der γ -GT bei Versuchstieren nach hepato-arterieller Therapie mit Irinotecan im Vergleich zu den mit Irinotecan systemisch therapierten Tieren. GOT, GLDH sowie LDH zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen. Nach systemischer Therapie zeigte sich die GPT im Vergleich zu den Shamkontrollen in allen Therapiegruppen signifikant reduziert. Es war insgesamt bei der Untersuchung der Leberenzyme ebenfalls keine relevante hepatische Schädigung zu beobachten (Tab. 7 und 8).

HAI	SHAM	BE	BE+IR	IR
Y-GT	208,56 (±31,56)	493,74 (±160,69)	275,67 (±133,73)	23,85 (±16,87) #
GOT	212,37 (±72,94)	137,37 (±22,38)	144,21 (±25,70)	99,66 (±21,27)
GPT	95,99 (±26,65)	119,57 (±39,02)	68,63 (±14,49)	81,35 (±12,37)
LDH	213,83 (±90,07)	141,38 (±38,53)	194,11 (±50,83)	88,95 (±23,42)
GLDH	223,59 (±65,53)	196,38 (±40,41)	286,01 (±87,75)	223,86 (±132,03)

Tabelle 7 – Analyse der Leberenzyme an Tag 13.
*p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

SYS	SHAM	BE	BE+IR	IR
Y-GT	140,42 (±41,35)	486,11 (±205,95)	453,89 (±145,96)	416,98 (±198,18)
GOT	178,50 (±62,29)	145,77 (±37,24)	142,41 (±28,77)	99,14 (±25,10)
GPT	123,05 (±12,52)	65,74 (±1,79) *	61,03 (±5,20) *	68,35 (±6,87) *
LDH	153,63 (±81,19)	347,79 (±100,59)	174,51 (±51,49)	117,56 (±47,43)
GLDH	123,76 (±27,70)	149,01 (±32,64)	120,57 (±29,04)	110,15 (±33,84)

Tabelle 8 – Analyse der Leberenzyme an Tag 13.
*p < 0,05 vs. Sham; #p < 0,05 vs. SYS

6.3.5.2. Leukozyten

Die Analyse der Leukozyten als ein Indikator für systemische Entzündung zeigte normale Werte an Tag 10 in allen untersuchten Gruppen. Alle Shamtiere wiesen an Tag 13 leichte erhöhte Werte von weißen Blutkörperchen auf (Abb. 52 und 53). Alle Tieren, die Irinotecan sowohl als systemische Therapie als auch als hepato-arterielle Infusion erhalten hatten, zeigten eine erhöhte Anzahl von Leukozyten als die Shamkontrollen (Abb. 52). Jedoch war die Leukozytenerhöhung bei Tieren die Irinotecan systemisch erhielten nicht signifikant (Abb. 53).

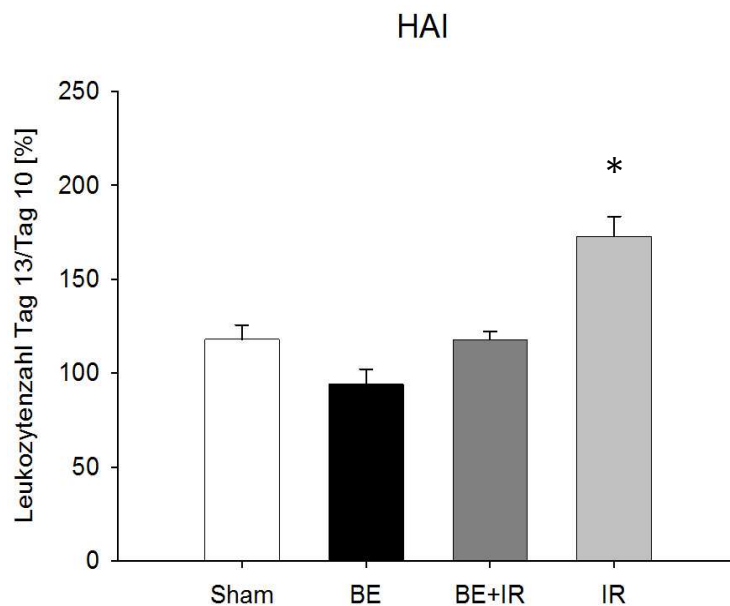


Abbildung 52 -Leukozytenanzahl der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10. *p < 0,05 vs. Sham

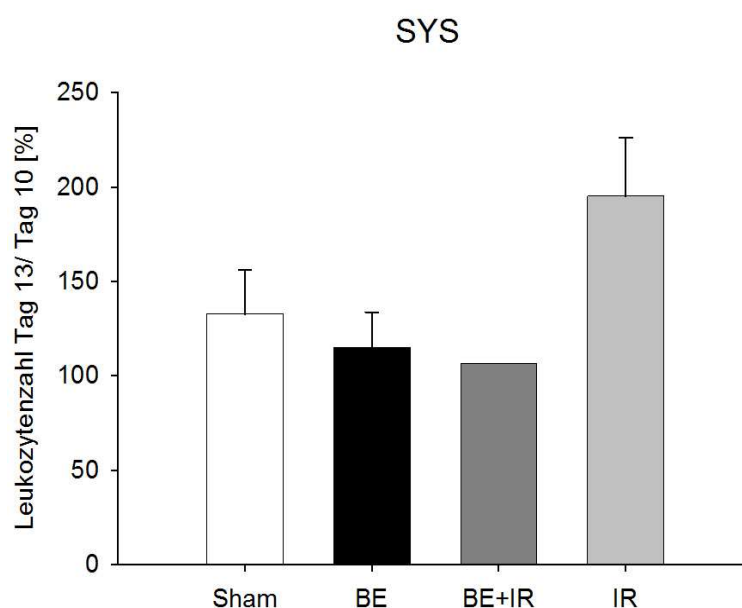


Abbildung 53 -Leukozytenanzahl der systemischen Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10

6.3.5.3. Hämoglobin

Die Auswertung des Hämoglobins bei der Analyse der Blutwerte zeigte bis auf eine signifikante Verringerung bei systemischer Monotherapie mit Irinotecan keine signifikanten Veränderungen in den Gruppen (Abb. 54 und 55).

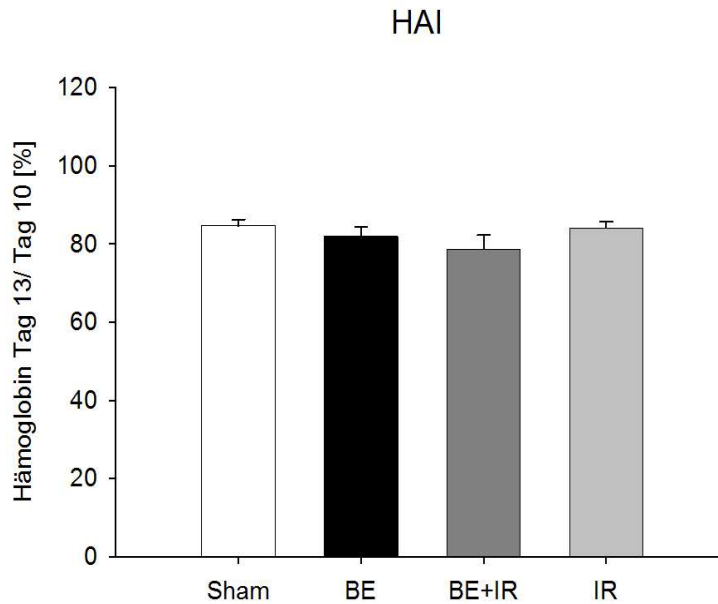


Abbildung 54 –Änderung der Hämoglobinwerte der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10

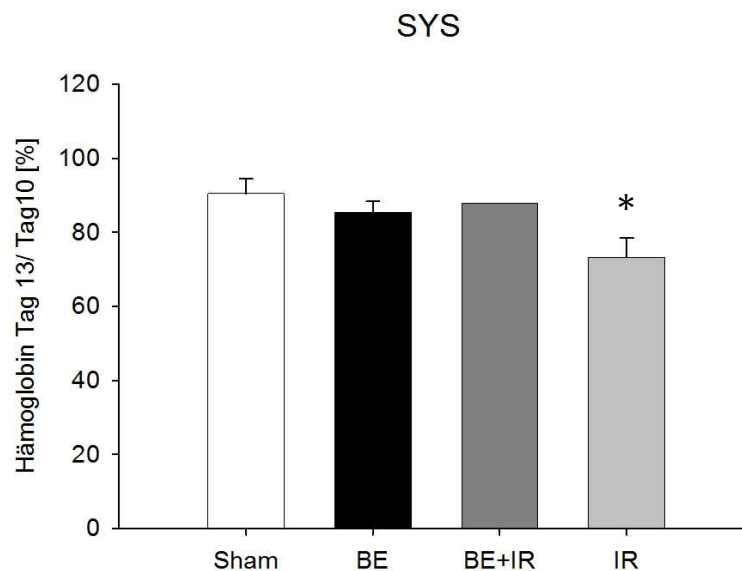


Abbildung 55 –Änderung der Hämoglobinwerte der systemischen Therapiegruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10. *p < 0,05 vs. Sham

6.3.5.4. Thrombozyten

Bei der Analyse der Thrombozytenzahl zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den verschiedenen Gruppen (Abb. 56 und 57).

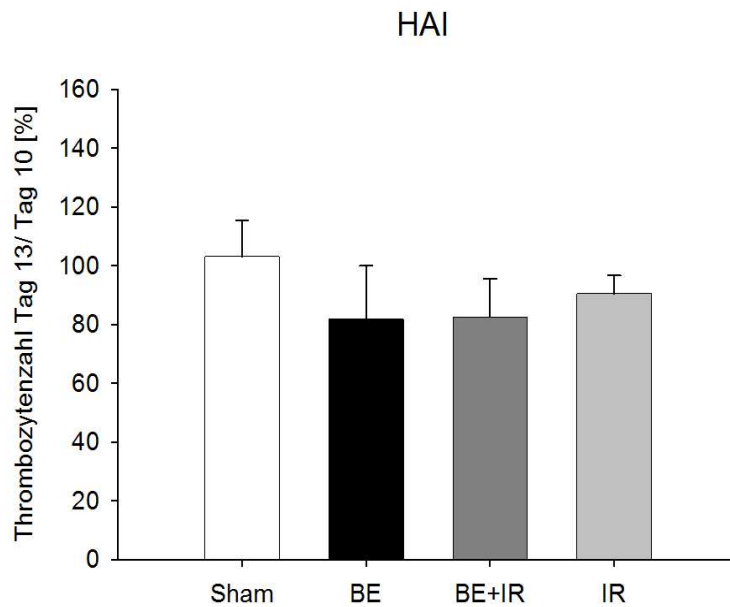


Abbildung 56 -Thrombozytenzahl der HAI-Gruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10

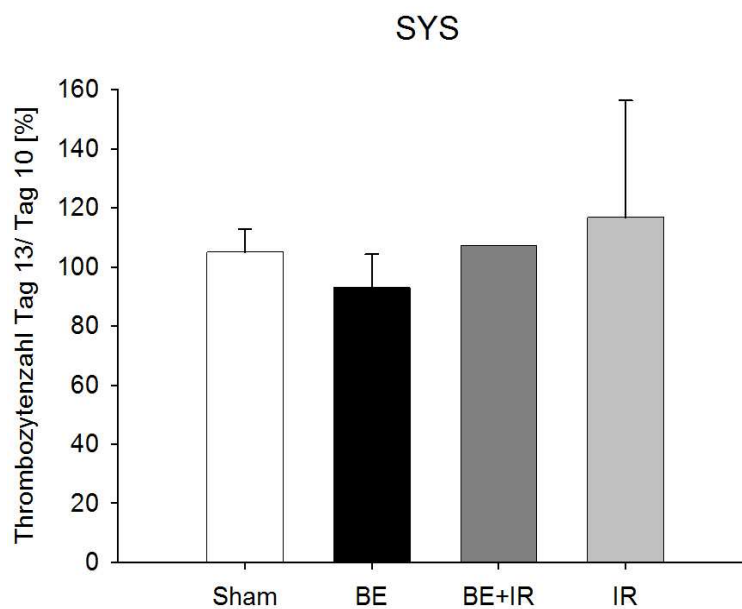


Abbildung 57 -Thrombozytenzahl der systemischen Therapiegruppen an Tag 13 in Relation zu Tag 10

7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit diene der vergleichenden Untersuchung der Auswirkung verschiedener Chemotherapeutika und Bevacizumab, welche als systemische Therapie oder aber als hepato-arterielle Infusion appliziert wurden. In diesem Zusammenhang wurde das Tumolvolumen ultraschallgestützt zu bestimmten Zeitpunkten ermittelt. Darüberhinaus wurden zur Untersuchung der Wirkung der einzelnen Substanzen Apoptose, Proliferation, Angiogenese und Leberenzymfreisetzung analysiert. Alle Versuche wurden an anästhesierten und spontanatmenden WAG-Rij-Ratten durchgeführt.

Die vorliegende Arbeit ist eine in-vivo-Studie, welche im Gegensatz zu in-vitro-Untersuchungen die Möglichkeit bietet, die Auswirkungen auf den gesamten Organismus und damit auf alle Organsysteme und deren komplexen physiologischen Interaktionen analysieren zu können [Menger and Lehr, 1993; McCuskey, 1986].

7. 1. Diskussion von Material und Methoden

7.1.1. Chirurgische Präparation und Tumorimplantation

Im beschriebenen Versuch wurden aufgrund der genetischen Eignung zur Implantation der CC531-Tumorzelllinie WAG-Rij-Ratten gewählt. Die Technik der Implantation ist ausführlich von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [Marinelli et al., 1991; Kollmar et al., 2004]. Im Gegensatz zu anderen Implantationsmöglichkeiten, wie der Injektion von Tumorzellen in die Vena cava [Scheringa et al., 1989], Vena porta [Griffini et al. 1996] oder Vena lienalis [Zhong et al., 2010] mit Einschweben der Zellen ins Lebergewebe oder einer Implantation von z.B. in der Flanke gewachsenen kleinen Tumorfragmenten unter die Leberkapsel [van Etten et al., 2003;2004; Ijzermans et al., 1992], wurden in der vorliegenden Arbeit die Tumorzellen direkt unter die Leberkapsel appliziert. Die Methoden der Injektion der Tumorzellen in die Vena cava, Vena porta bzw. Vena lienalis, welche den hämatogenen Metastasierungsweg am ehesten nachahmen, haben den Nachteil, dass es zu einer unkontrollierten Aussaat der Tumorzellen in die Leber kommt. Für das vorliegende Versuchsmodell benötigt man zur sonographischen Analyse ein standardisiertes, reproduzierbares Modell. Die Tumorfragmentimplantation

berücksichtigt bei gut reproduzierbarem Tumolvolumen kaum die pathophysiologischen Mechanismen der Angiogenese und Tumorentstehung, so dass das gewählte Modell der beste Kompromiss zwischen pathophysiologischen Bedingungen und reproduzierbaren lokalen Tumorumfängen ist. Somit bietet das gewählte Modell die größte Ähnlichkeit in Bezug auf die pathophysiologischen Bedingungen unter Wahrung eines lokal reproduzierbaren Tumorumfanges.

Die Wahl der Größe und des Gewichtes der WAG-Rij-Ratten richtet sich hauptsächlich an die Voraussetzungen für eine geeignete mikrochirurgische Präparation der Arteria gastroduodenalis. Um das operative Trauma zu reduzieren, wurden alle Präparationen unter Zuhilfenahme eines Mikroskops sowie mikrochirurgischer Instrumente durchgeführt.

7.1.2. Hepato-arterielle Infusion (HAI)

Eine hepato-arterielle Infusion ist eine vereinfachte Form der IHP mit weniger chirurgischen Nebenwirkungen, die mit einer geringeren Morbidität und Mortalität einhergehen. Allerdings besteht verglichen mit der IHP das Risiko für stärker ausgeprägte systemische Nebenwirkungen [Okuno et al., 1998]. Obwohl einige Autoren die Applikation von Chemotherapeutika über die Arteria hepatica als bestmöglichen Zugang anzweifeln, konnte gezeigt werden, dass bei intraarterieller Gabe im Gegensatz zu einer portalvenösen oder systemischen Gabe über eine Schwanzvene im Rahmen einer 5-FU-Applikation und F-NMR-Spektroskopie eine erhöhte Medikamentenkonzentration im Lebergewebe nachweisbar ist [Okuno et al., 1998]. Des Weiteren kam es im Falle der arteriellen Gabe zu einem deutlich langsameren Konzentrationsabfall, was am ehesten durch den Verbleib des Chemotherapeutikums in peribiliären Plexus erklärt wird. Ein weiterer Vorteil stellt die hauptsächlich arterielle Blutversorgung von Malignomen in der Leber dar. Burke beschrieb bereits 1969, dass Blut aus der Vena porta direkt in die Lebersinusoiden drainiert wird und nicht wie arterielles Blut hauptsächlich über die peribiliären Plexus in die Lebersinusoiden. [Burke et al., 1969]. Dies führt zu einer deutlich längeren Transitzeit. Diese am Rattenmodell erhobenen Daten konnten später auch beim Menschen bestätigt werden [Takasaki et al., 2001]. Entsprechend dieser Studien konnte Gonda et al. im Jahre 2000 zeigen, dass gerade Malignome überwiegend aus den peribiliären Plexus versorgt werden [Gonda et al.,

2000]. Außerdem können Endothelschäden der Lebergefäße bei Applikation von Chemotherapeutika als HAI im Gegensatz zur portalvenösen Infusion über die Pfortadern vermieden werden [Horikawa et al., 1994].

Eine aktuelle Cochrane-Analyse zeigte allerdings nach Kombination moderner Chemotherapeutika mit Antikörpern als systemische Applikation keinen Vorteil für die HAI. Allerdings waren im Rahmen der HAI bei diesen Studien veraltete Chemotherapieschemata verwendet worden, so dass in dieser Arbeit die Vorteile einer lokalen hepatischen Therapie mit einer modernen Chemotherapie in Kombination mit Antikörpern mit einer vergleichbaren systemischen Therapie nicht verglichen wurden [Mocellin et al.; 2009; 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund die Medikamente Oxaliplatin, Irinotecan und Bevacizumab gewählt, welche zum Therapiestandard der first- und secondline-Therapie bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen gehören [Cersosimo et al., 2013].

7.1.3. Hochauflösende 3-D-Sonographie

Die Methode der 3-D-Sonographie im Kleintiermodell ist ein noch relativ wenig in der Literatur beschriebenes Verfahren zur Bestimmung von Tumorumfängen im in-vivo-Modell. In vorausgegangenen Versuchen konnte anhand eines Vergleiches der 3-D-sonographisch ermittelten Tumorumfänge mit der Auswertung der histologischen Tumorschnitte und den damit berechneten Tumorumfängen die Validität der Bildgebung ermittelt werden. Außerdem zeigen andere in der Literatur beschriebenen Studien eine valide Messung des Tumorzustandes mit Hilfe der 3-D-Sonographie [Kuriyama et al., 1999; Echevarria-Uraga et al., 2010]. Mit dieser Technik gelingt es am offenen Abdomen in vivo das Leber- sowie Tumorgewebe zu visualisieren und damit an verschiedenen Zeitpunkten das Tumorumfänge zu berechnen.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Bevacizumab + Oxaliplatin

Oxaliplatin, ein Diaminocyclohexanplatin, bietet ein großes Spektrum von antitumoröser Aktivität und ist ein fester Bestandteil in der Zytostatika-Therapie des kolorektalen Karzinoms [Goldberg et al., 2004; André et al., 1999; de Gramont et al., 2000; 1997; Hebbbar et al., 2006; Tournigand et al., 2004; 2006; Ducreux et al., 2004]. Darüber hinaus hat es ein ausgezeichnetes Sicherheitsprofil, da die Nebenwirkungen insbesondere auf

Hämatotoxizität und kumulative neurosensorische Toxizität begrenzt sind [Cusack et al., 2006]. Entsprechend zeigte die systemische Verabreichung von OX nur marginale Nebenwirkungen, wie z.B. einen leichten Abfall der weißen Blutkörperchen und einen Anstieg der Transaminasen (AST). Die vorliegende Studie liefert allerdings nur geringe Informationen zur langfristigen Toxizität. So können die beobachteten marginalen Nebenwirkungen während des ersten 3-Tages-Zeitraums nach Oxaliplatinapplikation die mögliche Entwicklung von schweren Nebenwirkungen nach einer längeren Beobachtungszeit oder nach wiederholter Verabreichung der Substanz nicht ausschließen. In der Tat ist zu berücksichtigen, dass die Anwendung von OX als HAI deutliche systemische Nebenwirkungen hervorrufen kann, weil Alkylierungsmittel wie Platin-Derivate im Vergleich zu anderen Medikamenten wie Fluoropyrimidine einen deutlich geringeren First-pass-Effekt aufweisen. Daher sollten weitere Studien detailliert die Auswertung systemischer Konzentrationen und langfristiger Nebenwirkungen von OX nach Anwendung über HAI klären.

Bevacizumab ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper aus der Gruppe der Immunglobuline (IgG1). Der Antikörper bindet mit hoher Affinität an humanen *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) und verhindert so durch eine sterische Blockade die Interaktion des VEGF mit seinen Rezeptoren Flt-1(VEGF-Rezeptor-1) und KDR/Flk-1(VEGF-Rezeptor-2), welche sich auf der Oberfläche der Endothelzellen befinden. Die Interaktion von VEGF an seine Rezeptoren führt über eine Tyrosinkinase zur Endothelproliferation und der Bildung neuer Blutgefäße [Ranieri et al., 2006]. Bevacizumab wurde entwickelt, um den humanen VEGF zu neutralisieren, aber Bock et al. [Bock et al., 2007] haben gezeigt, dass BE auch an den murinen VEGF bindet. Dementsprechend zeigten Heiduschka et al. mit Hilfe der Immunhistochemie [Heiduschka et al., 2008] die Bindung des humanisierten Antikörpers mit murinem VEGF. Diese Autoren wiesen weiterhin nach, dass die Bindung spezifisch ist, weil eine deutlich schwächere Aktivität gefunden wurde, wenn mit rekombinantem murinen VEGF vorinkubiert wurde, da die VEGF-Bindungsstellen durch murines VEGF für die Bindung mit humanen VEGF blockiert werden.

Die wichtigste Erkenntnis der vorliegenden Studie ist, dass die Applikation von Bevacizumab (BE) über HAI das Tumorwachstum hemmt, jedoch die systemische Anwendung dies nicht vermag. Von Interesse ist, dass eine HAI als Kombination von Bevacizumab (BE) und Oxaliplatin (OX) nicht nur das Tumorwachstum hemmt, sondern

zusätzlich eine Tumorregression induziert. Die systemische Anwendung der beiden Medikamente induzierte weder eine Tumorwachstumshemmung noch eine Tumorregression.

Die antiangiogene Wirkung von BE wurde bereits in früheren Studien im Nagetier-Modell beobachtet [Youruek et al., 2008]. Es kam neben der Hemmung der Angiogenese auch zur Induktion der Apoptose [Bock et al., 2007; Youruek et al., 2008; Barros et al., 2007; Habet-Wilner et al., 2010; Hashemian et al., 2009; Hosseini et al., 2007; Manzano et al., 2007; Papathanassiou et al., 2008]. Weiterhin unterstützt Bevacizumab die Entzündungszellrekrutierung und Freisetzung von Zytokinen [Oh et al., 2009] sowie die Normalisierung der Gefäß-Permeabilität [Abcouwer et al., 2010]. Darüber hinaus verzögert BE die Wundheilung. [Kim et al., 2010]. Habet-Wilner et al. zeigte eine deutliche dosisabhängige Wirkung von BE auf corneale Neovaskularisation in Wistar-Ratten [Habet-Wilner et al., 2010]. Aufgrund seiner geringen Affinität zu murinen VEGF-A, scheint BE eine besonders effektive Wirkung in Modellen mit hoher lokaler Konzentrationen zu zeigen [Papathanassiou et al., 2008]. Diese Ansicht steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, dass die HAI durch die Gewährleistung hoher lokaler Konzentrationen von BE eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums bewirkt, während die systemische Verabreichung von BE eine geringere lokale hepatische Konzentration ohne eine derartige Wirkung erzielt.

Das VEGF / VEGF-R-System spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Angiogenese und ist somit in der Entwicklung und Etablierung von Lebermetastasen von Bedeutung [Ferrara et al., 2003; Mac Gabhann et al., 2008; Roy et al., 2006; Fernando et al., 2003]. Insbesondere haben Metastasen von kolorektalen Karzinomen eine erhöhte VEGF-Expression in den malignen Zellen [Warren et al., 1995]. Dementsprechend wird BE in der klinischen Praxis als zusätzliche zielgerichtete Therapie bei der Behandlung von metastasierenden kolorektalen Karzinomen verwendet. In einer Phase I Studie zeigten Gordon et al. [Gordon et al., 2001], dass BE keine signifikante Toxizität besitzt. In Phase II, III und IV Studien wurde der anti-Tumor-Effekt des Antikörpers in Kombination mit anderen Zytostatika [Kabbinnavar et al., 2003; Giantonio et al., 2007; Hurwitz et al., 2006; de Gramont et al., 2006; Saltz et al., 2007; Goldberg et al., 2006; Wedam et al., 2006; Sobrero et al., 2009] bestätigt.

In der vorliegenden Studie hatte eine Einzeldosis, welche der klinisch eingesetzten humanen Dosis äquivalent war (Bevacizumab von 5 mg/kg Körpergewicht), als systemische Gabe keinen Einfluss auf das Tumorwachstum. Allerdings wurde das

Tumorwachstum bei Applikation der gleichen Dosis über HAI signifikant reduziert. Wie in früheren Studien gezeigt wurde, wird das Tumorwachstum durch Hemmung der Tumolvaskularisation vermindert [Wagner et al., 2009]. In der vorliegenden Studie wird die Angiogenese nach HAI im Vergleich mit einer systemischen Gabe signifikant gehemmt. Dies wurde durch die verringerte Endotheldichte in Rahmen der PECAM-1-Färbung dargestellt. Von Interesse war, dass OX keinen Einfluss auf das Tumorwachstum hatte. Es zeigte sich zwar auch eine reduzierte PECAM-1-Färbung, was jedoch durch die toxische Schädigung von Endothelzellen der Tumorgefäße erklärt werden kann und nicht unbedingt mit einer Verschlechterung der Tumordurchblutung in Zusammenhang steht.

Allerdings induziert BE seine anti-Tumor-Wirkung nicht nur durch die Reduzierung der Gefäßdichte im Tumor. Bei entzündlichem Brustkrebs zeigte Wedam et al. eine signifikante Erhöhung der Tumor-Zell-Apoptose nach der Behandlung mit BE trotz einer unveränderten Mikro-Gefäßdichte [Wedam et al., 2006]. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, welche eine sehr hohe Rate von apoptotischen Zellen in Tumoren nach Kombinationstherapie von BE und OX via HAI nachweisen konnte.

Darüber hinaus kann eine Behandlung mit BE die Metastasierung unmittelbar beeinflussen [Fernando et al., 2004]. Dies wurde durch eine Studie über die Auswirkungen von BE bei hepatisch implantierten okulären Mikrometastasen der Leber von Melanomen unterstrichen. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Ki67 Expression in Tumorzellen [Yang et al., 2010]. Dies spiegelt die Ergebnisse der vorliegenden Studie wieder, welche auch eine Reduktion der Proliferation der Tumorzellen durch BE aufzeigten. In der vorliegenden Studie fand sich ebenfalls eine Reduktion des Tumorwachstums. Diese war, wie die immunhistochemische Auswertung zeigte, nicht ausschließlich durch antiangiogene Eigenschaften verursacht, sondern auch durch direkte antiproliferative und proapoptotische Wirkungen von BE auf die Tumorzellen.

Die Applikation der Kombination von BE und OX via HAI kann im Gegensatz zu einer systemischen Gabe eine signifikante antineoplastische Wirkung induzieren.

Die nutritive Blutversorgung von kolorektalen Lebermetastasen erfolgt im Gegensatz zum Leberparenchym, welches hauptsächlich durch portalvenöses Blut versorgt wird, überwiegend aus dem arteriellen System [Breedis et al., 1954]. Die dadurch längere Transitzeit von arteriell applizierten Medikamente im tumortragenden Teil der Leber

verursacht einen erhöhten Anti-Tumor-Effekt nach HAI und kann die in der vorliegenden Studie beschriebenen besseren antitumorösen Effekt einer Therapie via HAI im Vergleich zur systemischen Applikation erklären.

Die systemische Verabreichung von OX war nicht wirksam, um das Tumorwachstum zu hemmen. Dies steht im Einklang mit den klinischen Befunden, die zeigen, dass OX allein eine nur minimale anti-neoplastische Wirkung ausübt [Omura et al., 2008]. Dementsprechend kommt in klinischen Studien OX nicht als Monotherapie zur Anwendung, sondern wird lediglich als Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt [Omura et al., 2008].

7.2.2. Bevacizumab + Irinotecan

Irinotecan (IR) als Topoisomerasehemmer induziert in der S-Phase der Zelle über Doppelstrangbrüche einen Abbruch der DNA-Replikation [Hsiang et al., 1989; Yoshida et al., 1993]. Die Substanz zeigt eine vielfältige antitumoröse Aktivität und ist ein erprobter Bestandteil der Chemotherapie bei kolorektalen Karzinomen [de Gramont et al., 2000; Douillard et al., 2000]. Irinotecan zeigt darüber hinaus Nebenwirkungen, wie das cholinerge Syndrom, Myelosuppression, die Alopezie, die Leberschädigung, die Nierenschädigung und die Kolitis, die in der Regel jedoch akzeptabel sind [Chabot et al., 1997; Slatter et al., 1997; 2000]. In unserer Studie zeigten sich weder im Rahmen der systemischen Applikation noch im Rahmen der HAI schwerwiegende Nebenwirkungen nach Irinotecangabe. Es kam einzig bei hepato-arterieller Infusion zu einer signifikanten Zunahme der Leukozyten im Blutbild. Allerdings bedürfte es auch in diesem Fall zur validen Aussage möglicher Nebenwirkungen einen längeren Beobachtungszeitraum, um mögliche schwere Nebenwirkungen ausschließen zu können.

Neben allen im vorangegangenen Teil beschriebenen Effekten der Monotherapie von Bevacizumab im Rahmen der vorliegenden Studie zeigte die Kombination von Bevacizumab mit Irinotecan als Kombinationstherapie eine tendenzielle Hemmung des Tumorwachstums, welche sich allerdings nicht signifikant zeigte. Die Kombination der beiden Medikamente zeigte aber eine signifikante erhöhte Tumorerstörung, welche anhand der Caspase-3-Färbung gemessen wurde. In Studien zur kombinierten Wirkung von Bevacizumab mit Irinotecan konnte nach 24 bis 96 Stunden während der kurzfristigen Periode der vaskulären Normalisierung eine erhöhte Kollagendichte um die Tumorgefäße und somit eine bessere Aufnahme von Irinotecan in das Tumorgewebe nachgewiesen werden, so dass von einer effizienteren zytotoxischen Wirkung der

Substanz ausgegangen werden kann [Vangestel et al., 2011] Eine plausible Erklärung könnte sein, dass zwar weniger Gefäße durch die Therapie vorhanden sind, diese jedoch von besserer Qualität sind und dadurch die zugeführten zytotoxischen Substanzen besser aufgenommen werden [Wildiers et al., 2003]. Die chaotische Blutzufuhr des Tumors und die erhöhte Permeabilität der Gefäßwand von Tumorgefäßen können die Aufnahme von zytotoxischen Substanzen ins Tumorgewebe inhibieren [Jain et al., 1987, 2001, 2005]. Vangestel et al. zeigten eine 60-70% höhere Aufnahme der zytotoxischen Substanz im Tumorgewebe bei gleichzeitiger Gabe von Bevacizumab. Nach dieser vulnerablen Phase kam es wieder zu einer geringeren Aufnahme, welche durch die erschwerte Aufnahme über die verdickten Basalmembranen der Tumorzelle erklärt werden kann [Vangestel et al., 2011]. Tong et al. konnten nachweisen, dass es über die Normalisierung bzw. Reduzierung des onkotischen Druckgradienten durch die VEGF-Blockade und einer Normalisierung der Gefäßpermeabilität zu einer erhöhten Aufnahme von Zytostatika ins Tumorgewebe kommt und damit zu einer verbesserten Wirkung des Zytostatikums [Tong et al., 2004]. Es wurde außerdem festgestellt, dass Hypoxie ein Kennzeichen von soliden Tumoren ist. Dadurch zeigen solide Tumore eine erhöhte Produktion von angiogenen Faktoren wie VEGF. Hypoxie verringert die Aktivität der Prolyl-hydroxylasedomänproteine (PHD1-3), die als Sauerstoffsensoren wirken. Dies wiederum verhindert den Abbau von Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktoren (HIF) 1α und $HIF2\alpha$, die die Transkription von HIF-angetriebenen Hypoxie-Genen einschließlich VEGF ermöglicht [Goel et al., 2011]. Im Einklang dazu zeigte in der vorliegenden Studie die Kombination von BE und IR die höchste Rate an apoptotischen Zellen. Die systemische Anwendung der beiden Medikamente konnte analog zur Gabe von BE und OX weder eine Tumorstillung noch eine Tumorzellzerstörung zeigen.

7.3. Schlussfolgerung

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass eine HAI als Monotherapie von Bevacizumab als auch die Kombination von BE und OX eine effektive therapeutische Option ist, um das Tumorstillung zu hemmen. Die Kombination von BE mit IR zeigte eine nicht signifikante Reduktion des Tumorstillung bei deutlicher Tumorzellregression. Somit kann eine HAI von BE in Kombination mit OX-basierten Chemotherapien einen vielversprechenden Ansatz zur Behandlung von primär

inoperablen kolorektalen Lebermetastasen liefern. Die HAI von BE mit IR-basierten Chemotherapien zeigt ebenfalls einen Benefit, der in dieser Arbeit nicht signifikant ist und noch weitergehender Untersuchungen zum Nachweis eines signifikanten antineoplastischen Effekts bedarf.

8. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

A./Aa.	-	Arteria/Arteriae
bzw.	-	beziehungsweise
°C	-	Grad Celsius
cm	-	Zentimeter
Δ (delta)	-	Differenz
DNS	-	Desoxyribonucleinsäure
d.h.	-	das heißt
γ-GT	-	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	-	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	-	Glutamat-Oxalactat-Transaminase
GPT	-	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HE	-	Hämatoxylin-Eosin
i.v.	-	intravenös
KCl	-	Kalium-Chlorid
kg	-	Kilogramm
Lig./Ligg.	-	Ligamentum/Ligamenta
M./Mm.	-	Musculus/Musculi
max.	-	maximal
mg	-	Milligramm
MG	-	Molekulargewicht
μg	-	Mikrogramm
μl	-	Mikroliter
μmol	-	Mikromol
min	-	Minute
min.	-	minimal
ml	-	Milliliter

mm	-	Millimeter
MW	-	Mittelwert
n	-	Anzahl
NaCl	-	Natrium-Chlorid
pH	-	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
s.c.	-	subcutan
SD	-	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	-	standard error of the mean (Fehler der Standardabweichung)
U/l	-	Units per liter (Einheiten pro Liter)
U/min	-	Umdrehungen pro Minute
V.	-	Vena
VC	-	Variationskoeffizient
vergl.	-	vergleiche
vs.	-	versus (gegenüber)
z.B.	-	zum Beispiel
z.T.	-	zum Teil

9. Literaturverzeichnis

1. Abcouwer SF, Lin CM, Wolpert EB, Shanmugam S, Schaefer EW, Freeman WM, Barber AJ et al. Vascular permeability and apoptosis are separable processes in retinal ischemia-reperfusion injury: effects of ischemic preconditioning, bevacizumab and etanercept. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010 Epub ahead of print
2. Adam R. Rescue Surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy. A model to predict long term survival. *Ann Surg.* 2004; 240: 644-658
3. Adam R, Aloia T, Lévi F, Wicherts DA, de Haas RJ, Paule B, Bralet MP, Bouchahda M, Machover D, Ducreux M, Castagne V, Azoulay D, Castaing D. Hepatic resection after rescue cetuximab treatment for colorectal liver metastases previously refractory to conventional systemic therapy. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 4593-4602.
4. Adam R, Avisar E, Ariche A. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal [liver] metastases. *Ann Surg Oncol.* 2001; 8: 347-353
5. Adelsberger H, Quasthoff S, Grosskreutz J et al. Alteration of sodium channel inactivation kinetics of rat sural nerve by the chemotherapeutic agent oxaliplatin. *Biol Chem.* 1999; 380: 132
6. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Curr Oncol.* 2011; 18: 18-25
7. Albrecht D, Germer C, Isbert C, Buhr HJ. Laser-induced thermotherapy for palliative treatment of malignant liver tumors: results of a clinical study. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1996; 113: 136-138
8. Anderson WK. Synthesis, physical properties, and antitumor activity of tetraplatin and related tetrachloroplatinum(IV) stereoisomers of 1,2-diaminocyclohexane. *Cancer Treat Rep.* 1986; 70: 997-1002
9. Andre´ T, Bensmaine MA, Louvet C, Francois E, Lucas V, Desseigne F, Beerblock K et al. Multicenter phase II study of bimonthly high-dose leucovorin, fluorouracil infusion, and oxaliplatin for metastatic colorectal cancer resistant to the same leucovorin and fluorouracil regimen. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 3560–3568
10. Cusack JC Jr, Liu R, Xia L, Chao TH, Pien C, Niu W, Palombella VJ et al. NPI-0052 enhances tumoricidal response to conventional cancer therapy in a colon cancer

- model. *Clin Cancer Res.* 2006; 12: 6758–6764
11. Barros LF, Belfort R. The effects of the subconjunctival injection of bevacizumab (Avastin) on angiogenesis in the rat cornea. *An Acad Bras Cienc.* 2007; 79: 389–394
 12. Bismuth H. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Ann Surg.* 1996; 224: 509-522
 13. Birth M, Hildebrand P, Dahmen G, Ziegler A, Broring DC, Hillert C, Bruch HP. Present state of radio frequency ablation of liver tumors in Germany. *Chirurg.* 2005; 75: 417-423
 14. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G et al. Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 2545–2552
 15. Boudny V. Bioanalysis of DNA modified by 1,2-diaminocyclohexane platinum(II) complexes. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 267-272
 16. Breedis C, Young C. The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol.* 1954; 30: 969-985
 17. Bruck MA. The crystal structure and absolute configurations of anti-tumor complexes Pt(oxalato)(1R,2R-cyclohexanediamine) and Pt (malanato) (1R,2R-cyclohexanediamine). *Inorg Chem Acta.* 1984; 92: 279-284
 18. Burkel WE. The fine structure of the terminal branches of the hepatic arterial system of the rat. *Anat Rec.* 1970; 167: 329–349
 19. Calabrese F, Valente M, Pettenazzo E, Ferraresso M, Burra P, Cadrobbi R, Cardin R, Bacelle L, Parnigotto A, Rigotti P. The protective effects of L-arginine after liver ischaemia/reperfusion injury in a pig model. *J Pathol.* 1997; 183: 477-485
 20. Calvert H, Judson I, Vijgh, W JF. Platinum complexes in cancer medicine: Pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to toxicity and therapeutic activity. *Cancer Surv.* 1993; 17: 189-217
 21. Celeen W. Initial experience with the use of preoperative transarterial chemoembolization in the treatment of liver metastasis. *Acta Chir Belg.* 1996; 96: 37-40
 22. Cersosimo RJ. Management of advanced colorectal cancer, part1. *Am J Health Pharm.* 2013; 70: 395-406
 23. Chabot GG, Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan (CPT-11) and active metabolite SN-38 during phase I trials. *Ann Oncol.* 1995; 6:

141-151

24. Chabot GG. Clinical pharmacokinetics of irinotecan. *Clin Pharmacokinet.* 1997; 33: 245-259
25. Cohen AD, Kemeny NE. An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. *Oncologist.* 2003; 8: 553-566
26. Connors TA. New platinum complexes with anti-tumour activity. *Chem Biol Interact.* 1972; 5: 415-424
27. de Gramont A, Tournigand C, Louvet C, Andre´ T, Molitor JL, Raymond E, Moreau S et al. Oxaliplatin, folinic acid and 5-fluorouracil (folfox) in pretreated patients with metastatic advanced cancer. The GERCOD. *Rev Med Interne.* 1997; 18: 769–775
28. de Gramont A, Figer A, Seymour M, Homerin M, Hmissi A, Cassidy J, Boni C et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000; 18: 2938–2947
29. de Gramont A, Tournigand C, Andre T, Larsen AK, Louvet C. Targeted agents for adjuvant therapy of colon cancer. *Semin Oncol.* 2006; 33: 42–45
30. Doci R, Bignami P, Quagliuolo V. Continuous hepatic arterial infusion with 5-fluorodeoxyuridine for treatment of colorectal metastases. *Reg Cancer Treat.* 1990; 3: 13-18
31. Douillard JY. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000; 355: 1041-1047
32. Douillard JY, Sobrero A, Carnaghi C, Comella P, az-Rubio E, Santoro A, Van CE. Metastatic colorectal cancer: integrating irinotecan into combination and sequential chemotherapy. *Ann Oncol.* 2003; 2: 7-12
33. Ducreux M. Randomized phase II study evaluating oxaliplatin alone, oxaliplatin combined with infusional 5-FU, and infusional 5-FU alone in advanced pancreatic carcinoma patients. *Ann Oncol.* 2004; 15: 467-473
34. Echevarria Uruga JJ, García-Alonso Montoya I, Díaz Sanz I, Herrero de la Parte B, Miguélez Vidales JL, Zabalza Estévez I, Fernández-Ruanova B. Ultrasonographic characterization of an experimental model of liver metastases from colon carcinoma in rats. *Radiologia.* 2010; 52: 37-44
35. Ensminger WD. Intrahepatic arterial infusion of chemotherapy. *Semin Oncol.* 2002; 29: 119-125

36. Extra JM, Espie M, Calvo F et al. Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1990; 25: 299-303
37. Faivre S. Oxaliplatin effects of DNA integrity and apoptosis induction in human tumor cells (abstract). *Proc Am Assoc Cancer Res.* 1998; 39: 158
38. Fink D, Nebel S, Aebi S et al. The role of DANN mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res.* 1996; 56: 4881-4886
39. Fink D, Zheng H, Nebel et al. In vitro and in vivo resistance to cisplatin in cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer Res.* 1997; 57: 1841-1845
40. Fliieger D, Keller R, Fischbach W. Palliative treatment for colorectal cancer. *Internist.* 2004; 45: 786-794
41. Fong Y, Fortner J, Sun RL. Clinical Score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg.* 1999; 230: 309-318
42. Fernando NH, Hurwitz HI. Inhibition of vascular endothelial growth factor in the treatment of colorectal cancer. *Semin Oncol.* 2003; 30: 39-50
43. Fernando NH, Hurwitz HI. Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. *Oncologist.* 2004; 9: 11-18
44. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003; 9: 669-676
45. Gamelin E, Le Bouil A, Boisdron-Celle M et al. Cumulative pharmacokinetic study of oxaliplatin, administered every three weeks, combined with 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1997; 3: 891-899
46. Gamelin E, Allain P, Maillert P et al. Long-term pharmacokinetic behaviour of platinum after cisplatin administration. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1995; 37: 97-102
47. Germer CT, Buhr HJ, Isbert C. Nonoperative ablation for liver metastases. Possibilities and limitations as a curative treatment. *Chirurg.* 2005; 76: 552-563
48. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 1539-1544
49. Giacchetti S. Phase III multicenter randomized trial of Oxaliplatin added to chronomodulated Fluorouracil-Leucovorin as first-line treatment of metastatic

- colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000, 18; 136-147
50. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK. Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiol Rev.* 2011; 91: 1071-1121
 51. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 23–30
 52. Goldberg RM, Hurwitz HI, Fuchs CS. The role of targeted therapy in the treatment of colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2006; 4: 11–12
 53. Gonda T, Ishida H, Yoshinaga K, Sugihara K. Microvasculature of small liver metastases in rats. *J Surg Res.* 2000; 94: 43–48
 54. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW Jr, Holmgren E, Benjamin R, Stalter S et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 843–850
 55. Graham MA, Lockwood GF, Greenslade D, Brienza S, Bayssas M, Gamelin E. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 1205-1218
 56. Haaz, MC. The transformation of irinotecan (CPT-11) to its active metabolite SN-38 by human liver microsomes Differential hydrolysis for the lactone and carboxylate forms. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 1997; 356: 257-262
 57. Habet-Wilner Z, Barequet IS, Ivanir Y, Moisseiev J, Rosner M. The inhibitory effect of different concentrations of topical bevacizumab on corneal neovascularization. *Acta Ophthalmol.* 2010; 88: 862–867
 58. Hashemian MN, Moghimi S, Kiumehr S, Riazi M, Amoli FA. Prevention and treatment of corneal neovascularization: comparison of different doses of subconjunctival bevacizumab with corticosteroid in experimental rats. *Ophthalmic Res.* 2009; 42: 90–95
 59. Harmantas A, Rotstein L, Langer B. Regional versus systemic chemotherapy in the treatment of colorectal carcinoma metastatic to the liver: is there a survival difference? Meta-analysis of the published literature. *Cancer.* 1998; 78: 1639-1645

60. Hebbbar M, Tournigand C, Lledo G, Mabro M, Andre' T, Louvet C, Aparicio T et al. Phase II trial alternating FOLFOX-6 and FOLFIRI regimens in second-line therapy of patients with metastatic colorectal cancer (FIREFOX study). *Cancer Invest.* 2006; 24: 154–159
61. Heiduschka P, Julien S, Hofmeister S, Bartz-Schmidt KU, Schraermeyer U. Bevacizumab (avastin) does not harm retinal function after intravitreal injection as shown by electroretinography in adult mice. *Retina.* 2008; 28: 46–55
62. Hirose K, Kozu C, Yamashita K, Maruo E, Kitamura M, Hasegawa J, Omoda K, Murakami T, Maeda Y. Correlation between plasma concentration ratios of SN-38 glucuronide and SN-38 and neutropenia induction in patients with colorectal cancer and wild-type UGT1A1. *Oncol Lett.* 2012; 3: 694-698
63. Holzhauer P. „-nibs, -mibs und -mabs“ – und was sich dahinter verbirgt. *DZO.* 2010; 42: 100-104
64. Hosseini H, Nejabat M, Mehryar M, Yazdchi T, Sedaghat A, Noori F. Bevacizumab inhibits corneal neovascularization in an alkali burn induced model of corneal angiogenesis. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2007; 35: 745–748
65. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350: 2335–2342
66. Hoffmann JS. Conversion of monofunctional DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum (II) to bifunctional lesions: effects of the in vitro replication of single-stranded DNA by *Escherischia coli* DNA polymerase I and eukaryotic DNA polymerase alpha. *J Biol Chem.* 1989; 264: 15130-15135
67. Hsiang YH. DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res.* 1989; 49: 4385-4389
68. Innocenti F. Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 2604-2614
69. Isenberg J. Treatment of liver metastases from colorectal cancer. *Anticancer Res.* 1996; 16: 1291-1295
70. Iqbal S, Lenz HJ. Integration of novel agents in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004; 54: 32–39
71. Jain RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res.* 1987; 47: 3039–3051
72. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new

- paradigm for combination therapy. *Nat Med.* 2001; 7: 987–989
73. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005; 307: 58–62.
 74. Jamison RL, Donohue JH, Nagorney DM. Hepatic resection for metastatic colorectal cancer results in cure for some patients. *Arch Surg.* 1997; 132: 505
 75. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/ leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 60–65
 76. Kabbinavar FF. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3697-3705
 77. Kabbinavar FF. Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3706-3712
 78. Kawato, Y. Intracellular Roles of SN-38, a Metabolite of the Camptothecin Derivative CPT-11, in the Antitumor Effect of CPT-11. *Cancer Research.* 1991; 51: 4187-4191
 79. Kelly H, Goldberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4553-4560
 80. Kemeny NE, Niedzwiecki D, Hollis DR, Lenz HJ, Warren RS, Naughton MJ, Weeks JC, Sigurdson ER, Herndon JE 2nd, Zhang C, Mayer RJ. Hepatic arterial infusion versus systemic therapy for hepatic metastases from colorectal cancer: a randomized trial of efficacy, quality of life, and molecular markers (CALGB 9481). *J Clin Oncol.* 2006; 24: 1395-1403
 81. Kemeny NE. Conversion to respectability using hepatic artery infusion plus systemic chemotherapy for the treatment of unresectable liver metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 3465-3471
 82. Kidani Y. Antitumor activity of platinum (II) complexes of 1-amino-2-aminomethylcyclo-hexane isomers. *Gann.* 1978; 69: 863-864
 83. Kim EC, Lee WS, Kim MS. The inhibitory effects of bevacizumab eyedrops on NGF expression and corneal wound healing in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 4569–4573

84. Kizu R. Pharmacokinetics of (1R,2R-diaminocyclohexane)oxalatoplatinum(II) in comparison with cisplatin following a single intravenous injection in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1993; 31: 475-480
85. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256: 495-497.
86. Köhne CH. Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4856-4865
87. Kollmar O, Schilling MK, Menger M. Experimental liver metastasis: standards for local cell implantation to study isolated tumor growth in mice. *Clin Exp Metastasis.* 2004; 21: 453-460
88. Konopke R, Saeger HG. Lebermetastasen. *Diagnostik und Therapie. Chirurg.* 2003; 74: 866-884
89. Kostopoulos I. Topoisomerase I but not thymidylate synthase is associated with improved outcome in patients with resected colorectal cancer treated with irinotecan containing adjuvant chemotherapy. *BMC Cancer.* 2009; 9: 339
90. Ku DD. Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1993; 265: 586-592
91. Kunimoto T, Antitumor activity of 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino]carbonyloxy-camptothecin, a novel water-soluble derivative of camptothecin, against murine tumors. *Cancer Res.* 1987; 47: 5944-5947
92. Kuriyama S, Tsujimoto T, Nakatani Y, Tsujinoue H, Yoshiji H, Mitoro A, Yamazaki M, Okuda H, Toyokawa Y, Nagao S, Nishiwaki I, Fukui H. Sonographic estimation of liver tumor development induced by oral administration of thioacetamide in rat. *In Vivo.* 1999; 13: 129-134
93. Lavelle F. Preclinical evaluation of CPT-11 and its active metabolite SN-38. *Semin Oncol.* 1996; 23: 11-20
94. Lee KT. The effect of preoperative transarterial chemoembolization of resectable hepatocellular carcinoma on clinical and economic outcomes. *J Surg Oncol.* 2009; 99: 343-350
95. Lee SG, Hwang S. How I do it: assessment of hepatic functional reserve for indication of hepatic resection. *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2005; 12: 38-43

96. Lewandowski RJ. A comparative analysis of transarterial downstaging for hepatocellular carcinoma: Chemoembolization versus radioembolization. *American Journal of Transplantation*. 2009; 9: 1920-1928
97. Mac Gabhann F, Popel AS. Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation*. 2008; 15: 715–738
98. Mamenta EL, Poma EE, Kaufmann EK et al. Enhanced replicative bypass of platinum-DNA adducts in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cell-lines. *Cancer Res*. 1994; 54: 3500-3505
99. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC et al. Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol*. 2007; 91: 804–807
100. Marinelli A1, Dijkstra FR, van Dierendonck JH, Kuppen PJ, Cornelisse CJ, van de Velde CJ. Effectiveness of isolated liver perfusion with mitomycin C in the treatment of liver tumours of rat colorectal cancer.. *Br J Cancer*. 1991; 64: 74-78.
101. Massari C, Brienza S, Rotarski M et al. Pharmacokinetics of oxaliplatin in patients with normal versus impaired renal function. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000; 45: 157-164
102. Mathé G. A phase I trial of trans-1-diaminocyclohexane oxalato-platinum (I-OHP). *Biomed Pharmacother*. 1986; 40: 372-376
103. Meyerhardt JA. Relationship of baseline serum bilirubin to efficacy and toxicity of single-agent irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 1439-1446
104. Mocellin S, Pilati P, Lise M, Nitti D. Meta-analysis of hepatic arterial infusion for unresectable liver metastases from colorectal cancer: the end of an era? *J Clin Oncol*. 2007; 25: 5649–5654
105. Mocellin S, Pasquali S, Nitti D. Fluoropyrimidine-HAI (hepatic arterial infusion) versus systemic chemotherapy (SCT) for unresectable liver metastases from colorectal cancer (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2009; 3: Art. No.: CD007823
106. Möslein G. Hereditäres kolorektales Karzinom. *Der Chirurg*. 2008; 79: 1038-1046
107. Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant JC. 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*. 1996; 77: 1254-1262

108. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Curr Eye Res.* 2009; 34: 85-91
109. Okuno K, Hirai N, Lee YS, Tarabar D, Ueno H, Yasutomi M et al. Superiority of hepatic arterial infusion in preventing catabolism of 5-FU compared with portal vein infusion revealed by an in vivo ¹⁹F NMR study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1998; 42: 341-344
110. Olsson AK. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 359-371
111. Omura K. Advances in chemotherapy against advanced or metastatic colorectal cancer. *Digestion.* 2008; 77: 13-22
112. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA. Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145: 424-431
113. Pendyala L. In vitro cytotoxicity, protein binding, red blood cell partitioning, and biotransformation of oxaliplatin. *Cancer Res.* 1993; 53: 5970-5976
114. Pendyala L. Cytotoxicity, cellular accumulation and DNA binding of oxaliplatin isomers. *Cancer Letters.* 1995; 97: 177-184
115. Pereira PL, Trubenbach J, Schmidt D. Radiofrequency ablation: basic principles, techniques and challenges. *Rofo.* 2003; 175: 20-27
116. Peyrone M. *Ann Chemie Pharm.* 1845; 51: 129
117. Power DG, Kemeny NE. Chemotherapy for the conversion of unresectable colorectal cancer liver metastases to resection. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011; 79: 251-264
118. Pozzo C. Neoadjuvant treatment of unresectable liver disease with iriontecan and 5-Fluorouracil plus folinic acid in colorectal cancer patients. *Ann Oncol.* 2004; 15: 933-939
119. Presta LG. Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997; 57: 4593-4599
120. Ranieri G, Patruno R, Ruggieri E, Montemurro S, Valerio P, Ribatti D et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Curr Med Chem.* 2006; 13: 1845-1857

121. Rees M, John TG. Current status of surgery in colorectal metastases to the liver. *Hepatogastroenterology*. 2001; 48: 341-344
122. Rixe O. Oxaliplatin, Tetraplatin, Cisplatin and Carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of national cancer institute's anticancer drug screen panel. *Biochem. Pharm.* 1996, 52: 1855-1865
123. Rosen LS. Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*. 2002; 9: 36-44
124. Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965; 205: 698-699
125. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 2006; 580: 2879-2887
126. Saif MW. Secondary hepatic resection as therapeutic goal in advanced colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2009; 15: 3855-3864
127. Saltz LB, Lenz HJ, Kindler HL, Hochster HS, Wadler S, Hoff PM, Kemeny NE et al. Randomized phase II trial of cetuximab, bevacizumab, and irinotecan compared with cetuximab and bevacizumab alone in irinotecan-refractory colorectal cancer: the BOND-2 study. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 4557-4561
128. Saltz LB. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 2013-2019
129. Saris CP, van de Vaart PJM, Rietbroek RC, Blommaert FA. In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis*. 1996; 17: 2763-2769
130. Sawada S, Synthesis and antitumor activity of 20(S)-camptothecin derivatives: A-ring modified and 7,10-disubstituted camptothecins. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*. 1991; 39: 3183-3188
131. Schmidt W, Chaney SG. Role of carrier ligand in platinum resistance of human carcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1993; 53: 799-805
132. Sobrero A, Ackland S, Clarke S, Perez-Carrión R, Chiara S, Gapski J, Mainwaring P et al. Phase IV study of bevacizumab in combination with infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) in first-line metastatic colorectal cancer. *Oncology*. 2009; 77: 113-119

133. Stringer AM. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. *Int J Exp Pathol.* 2009; 90: 489-499
134. Scheele J, Tendorf-Hofmann A, Grube T, Hohenberger W, Stangl R, Schmidt K. Resection of colorectal liver metastases. What prognostic factors determine patient selection? *Chirurg.* 2001; 72: 547-560
135. Schlag PM, Benhidjeb T, Kilpert B. Principles of curative resection of liver metastases. *Chirurg.* 1999; 70: 123-132
136. Sharpe J, Hamady ZZ, Lodge JP. Hepatic resection for colorectal metastasis; time to challenge the accepted doctrine. *Minerva Chir.* 2005; 60: 375-389
137. Shibuya M. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2006; 39: 469-478
138. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006; 9: 225-230
139. Slatter JG. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of irinotecan (CPT-11) following I.V. infusion of [(14)C]CPT-11 in cancer patients. *Drug Metab Dispos.* 2000; 28: 423-433
140. Slatter JG et al. Bioactivation of the anticancer agent CPT-11 to SN-38 by human hepatic microsomal carboxylesterases and the in vitro assessment of potential drug interactions. *Drug Metab Dispos.* 1997; 25: 1157-1164
141. Song T-J, Adusumilli PS, Fong Y. Prognostic factors in the evaluation of colorectal liver metastases. *Chirurg.* 2005; 76: 535-542
142. Stang A. A systemic review on the clinical benefit and role of radiofrequency ablation as treatment of colorectal liver metastases. *European J Cancer.* 2009; 45: 1748-1756
143. Sullivan RD, Norcross JW, Watkins E. Chemotherapy of metastatic liver cancer by prolonged hepatic-artery infusion. *N Engl J Med.* 1964; 270: 321-327
144. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program (www.seer.cancer.gov) SEER*Stat Database: Incidence: SEER 9 Regs Public-Use (1973-2002). Bethesda, MD, National Cancer Institute, Division of Cancer Control and Population Sciences, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch, released April 2005
145. Timmermann RD. Local surgery, ablative and radiation treatment of metastases. *CA Cancer J Clin.* 2009; 59: 145-170

146. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK. Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res.* 2004; 64: 3731–3736.
147. Tournigand C, Andre´ T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery- Mignard D, Quinaux E et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2004; 22: 229–237
148. Tournigand C, Cervantes A, Figer A, Lledo G, Flesch M, Buyse M, Mineur L et al. OPTIMOX1: a randomized study of FOLFOX4 or FOLFOX7 with oxaliplatin in a stop-and-go fashion in advanced colorectal cancer—a GERCOR study. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 394–400
149. Tsonuda A. Phase I-Study of S-1 Combined with Irinotecan (CPT-11) in Patient with advanced colorectal cancer. *Oncology.* 2009, 77;192-196
150. Vangestel C, Van de Wiele C, Van Damme N, Staelens S, Pauwels P, Reutelingsperger CP, Peeters M. (99)mTc-(CO)(3) His-annexin A5 micro-SPECT demonstrates increased cell death by irinotecan during the vascular normalization window caused by bevacizumab. *J Nucl Med.* 2011; 52: 1786-1794
151. Vassilaki M, Desses N, Parassiris V et al. Two phase II studies with the combination of oxaliplatin (L-OHP) +5-fluorouracil (5-FU) +leucovorin (LV) as first-line chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer (MCC). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 2000; 19: A1111
152. Vogl TJ. Repeated transarterial chemoembolization in the treatment of liver metastatic of colorectal cancer: Prospective study. *Radiology.* 2009; 250: 281-289
153. Wagner AD, Arnold D, Grothey AA, Haerting J, Unverzagt S. Anti-angiogenic therapies for metastatic colorectal cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 8: CD005392
154. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AI, Sim GA. Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from camptotheca acuminata. *J Am Chem Soc.* 1966; 88: 3888–3890
155. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest.* 1995; 95: 1789–1797

156. Weaver ML, Ashton JG, Zemel R. Treatment of colorectal liver metastases by cryotherapy. *Semin Surg Oncol.* 1998; 14: 163-170
157. Wedam SB, Low JA, Yang SX, Chow CK, Choyke P, Danforth D, Hewitt SM et al. Antiangiogenic and antitumor effects of bevacizumab in patients with inflammatory and locally advanced breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 769–777
158. Wei AC. Survival after hepatic resection for colorectal metastases: A 10-year experience. *Ann Surg Oncol.* 2006; 13: 668-676
159. Weiss L, Grundmann E, Torhorst J. Haematogenous metastatic patterns in colonic carcinoma: an analysis of 1541 necropsies. *J Pathol.* 1986; 150: 195-203
160. Wicherts DA, de Haas RJ, Adam R. Bringing unresectable liver disease to resection with curative intent. *Eur J Surg Oncol.* 2007; 33: 42-51
161. Wickremesekera JK, Cannan RJ, Stubbs RS. Hepatic artery access ports: recognizing and avoiding the problems. *Aust N Z J Surg.* 2000; 70: 496-502
162. Wildiers H, Guetens G, De Boeck G, et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *Br J Cancer.* 2003; 88: 1979–1986
163. Wiseman LR, Adkins JC, Plosker GL, Goa KL. Oxaliplatin. A review of its use in the management of metastatic colorectal cancer. *Drugs Aging.* 1999; 14: 459-475
164. Woynorowski JM. Sequence- and region-specificity of Oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Molecular Pharm.* 1998; 54: 770-777
165. Yoeruek E, Ziemssen F, Henke-Fahle S, Tatar O, Tura A, Grisanti S, Bartz-Schmidt KU et al. Safety, penetration and efficacy of topically applied bevacizumab: evaluation of eyedrops in corneal neovascularization after chemical burn. *Acta Ophthalmol.* 2008; 86: 322–328
166. Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE. Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51: 2835–2842
167. Yoshida A. DNA damage and cell killing by camptothecin and its derivative in human leukemia HL-60 cells. *Jap J Cancer Res.* 1993; 84: 566-573
168. Zhou XD, Tang ZY, Yu YQ, Ma ZC. Clinical evaluation of cryosurgery in the treatment of primary liver cancer. Report of 60 cases. *Cancer.* 1988; 61: 1889-1892

DANKSAGUNG

Die Erstellung der folgenden Arbeit wäre ohne die folgenden Personen, denen ich gerne für die Unterstützung und Hilfe danken möchte, nicht möglich gewesen:

Als Erstes möchte ich Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, danken. Ohne seine umfangreiche Unterstützung und sein fachübergreifendes Verständnis der thematischen Zusammenhänge während der Projektplanung, der Durchführung sowie der Analyse und Auswertung wäre die Erstellung der Arbeit nicht möglich gewesen. Im Weiteren waren die Diskussionen im Rahmen der Arbeit prägend und haben mein wissenschaftliches Interesse nachhaltig beeinflusst und geprägt.

Besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. Jens Sperling, damals Assistenzarzt der Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, aktuell Assistenzarzt der Universitätsmedizin Göttingen, Abteilung für Allgemein- und Visceralchirurgie, für seine direkte Betreuung. Herr Dr. Sperling war zu jeder Zeit als kompetenter Ansprechpartner für die Durchführung der Arbeit erreichbar und hat so die Erstellung erst möglich gemacht. Unsere Zusammenarbeit hat mich bestärkt, den Beruf des Chirurgen zu ergreifen. Dafür muss ich ihm von ganzen Herzen danken.

Abschließend bedanke ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie. Ohne die Hilfe von Frau Janine Becker und Frau Sandra Schuler bei der Anfertigung der histologischen Präparate und immunohistochemischen Färbungen, Frau Claudia Scheuer und Frau Christina Marx bei der Anzucht von Tumorzellen sowie Elisabeth Gluding und Kati Jordan bei der Betreuung der Versuchstiere wäre es nicht möglich gewesen, die vorliegende Arbeit durchzuführen. Vielen Dank für die ausgezeichnete Arbeit und freundliche Art.