

2 Grundlagen und Literaturübersicht

2.1 Kolorektales Karzinom und Lebermetastasen

2.1.1 Statistik

In Deutschland nahmen im Jahr 1999 die Sterbefälle an bösartigen Neubildungen mit 24 % und damit 210 837 Todesfällen den zweiten Platz nach den Todesursachen aufgrund von Kreislauferkrankungen (48 %, entsprechend 406 122 Todesfällen) ein (Statistisches Jahrbuch, 2001). Der Anteil der bösartigen Neubildungen der Verdauungsorgane lag bei 8,3 % (70 520 Todesfälle). Das kolorektale Karzinom ist bei Männern nach Lungenkrebs und bei Frauen nach Brustkrebs die zweithäufigste Todesursache durch Krebs (Statistisches Jahrbuch 1999). In der gesamten westlichen Welt ist das kolorektale Karzinom die dritthäufigste Todesursache an Krebs. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen. Die Erkrankung tritt gehäuft zwischen dem 60. und 75. Lebensjahr auf (Tumorzentrum München, 1997). In Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 53 000 Menschen an kolorektalen Karzinomen (Boese-Landgraf, 1998).

2.1.2 Äthiologie / Genetik

Die Prädisposition für einen Tumor kann erblich sein. Diese Prädisposition liegt für das kolorektale Karzinom um 10 % (Passarge, 2001) und ist kennzeichnend für jüngere Patienten. Dabei werden hauptsächlich unterschieden:

- Familiäre Polyposis-Syndrome (dominant vererbte familiäre adenomatöse Polyposis - FAP, für < 1 % der kolorektalen Karzinome verantwortlich)
- Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Tumorsyndrome (HNPCC, für ca. 5 - 7 % aller kolorektalen Karzinome verantwortlich).

Zur ersten Gruppe gehören auch die mit anderen Abnormitäten bzw. Erkrankungen vergesellschafteten Gardner-, Turcot-, Oldfield- oder Hereditary flat adenoma-Syndrome. Dem HNPCC zugeordnet werden kann das Lynch I- und II-Syndrom.

Die Mehrzahl der Krankheitsfälle entwickelt sich jedoch sporadisch mit 80 - 85 % (Boese-Landgraf, 1998). Dabei mutiert in mehreren Schritten die sogenannte Dysplasie-Karzinom-Sequenz in der DNA der Dickdarmschleimhautzelle.

Genetische Veränderungen wie die Aktivierung von Onkogenen, z.B. eine *K-ras* Mutation (Bos, 1987 / Forrester, 1987) oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie das APC- (Nishisho, 1991), p53- (Baker, 1989) oder DCC- Gen (Cho, 1994) werden als karzinogene Mechanismen in Betracht gezogen (Fearon u. Vogelstein, 1990).

Äthiologisch spielt der Konsum von Alkohol und Tabak eine wesentliche und beeinflussbare Rolle (Giovannucci, 1994).

Chronische entzündliche Darmerkrankungen, wie z.B. Colitis ulcerosis oder Morbus Crohn sind zu 5 % Ursache des kolorektalen Karzinoms (Boese-Landgraf, 1998) und können das Karzinomrisiko um bis zu 20 % erhöhen.

Die Bedeutung des oft zitierten Fasergehaltes der Nahrung, ihr hoher Fettgehalt und Fleischanteil ist umstritten (Willett, 2001 / Fuchs, 1999). Ballaststoffmangel soll die Passagezeit verlängern und somit eine höhere Konzentration potentieller Karzinogene im Darm erhalten. Mangelnde Kalziumzufuhr oder ein Vitaminmangel, besonders der Vitamine D, E, C sowie der Karotinoide (sie wirken als Radikalfänger), mangelnde körperliche Betätigung und hormonelle Faktoren können weiterhin die Entstehung kolorektaler Karzinome begünstigen (Heim, 2000).

2.1.3 Prävention

Zunächst sollten die schon erwähnten ernährungsbedingten Risikofaktoren vermieden werden. Als vorbeugende Untersuchung empfehlen sich ab dem 40. Lebensjahr ein jährlicher Test auf okkultes Blut im Stuhl (mittels Guajakfilterpapier) und eine digitale rektale Untersuchung. Der Haemokkulttest ist kostengünstig und senkt die Mortalität um 23 % (Meyer u. Lux, 2000 / Towler, 1998). Alle 5 Jahre sollte ab dem 50. Lebensjahr eine Sigmoidoskopie durchgeführt werden und ab dem 55. Lebensjahr alle 10 Jahre eine Koloskopie. Bei Patienten mit erhöhtem Risiko (wie: positive Familienanamnese oder chronische Darmerkrankung) oder rezidivprophylaktisch sind diese Vorsorgeuntersuchungen in engeren Zeitabständen durchzuführen (Schmiegel, 2000).

Anzumerken sei noch, dass eine klinische Symptomatik anfangs meist fehlt. Es können zunächst Obstipationen wechselnd mit Durchfall, leichte Blutbeimengungen im Stuhl und Gewichtsverluste auftreten. Spätsymptomatisch können Schmerzen, Anämie oder sogar ein Ileus auftreten.

2.1.4 Pathologie und Pathohistologie

Bis zu 95 % dieser Karzinome sind Adenokarzinome. Es können aber auch andere Formen, wie das schleimbildende mucinöse Adenokarzinom oder das Siegelringzellenkarzinom auftreten oder sehr selten ein Plattenepithelkarzinom, ein adenosquamöses oder ein undifferenziertes Karzinom entstehen (Einteilung nach WHO, 1976).

Das reife Adenokarzinom ahmt stets die Drüsen seines Muttergewebes nach. Die Adenokarzinomzellen bilden lumenhaltige Epithelschläuche. Diese Schläuche werden aus einem mehrreihigen Zylinderepithel gebildet und sind als regellos, atypisch und stark

größenvariabel zu bezeichnen. Unabhängig von seiner Lokalisation behält das reife Adenokarzinom seinen Charakter (Guski, 1980).

Nach UICC (1997) werden die kolorektalen Karzinome nach ihrem histologischen Differenzierungsgrad in vier Gruppen eingeteilt. G1 entspricht dabei dem hochdifferenzierten Tumor, G4 dem undifferenzierten Tumor. Diese Einteilung hat Konsequenzen für die Therapie, da nur hochdifferenzierte Tumoren für eine lokale Therapie geeignet sind.

Für die Beurteilung des Krankheitsbildes ist die TNM-Klassifikation (UICC 1997, vgl. Tab.1) am besten geeignet. Die TNM-Klassifikation umfasst Aussagen über die Beurteilung von Wachstum und Infiltrationsgrad des Primärtumors (T), den Befall der regionären Lymphknoten (N) und das Auftreten von Fernmetastasen (M):

T	Primärtumor	N	Reg. Lymphknoten	M	Fernmetastasen
TX	Primärtumor nicht beurteilbar	NX	Reg. Lymphknoten können nicht beurteilt werden	MX	Vorliegen von Fernmetastasen nicht beurteilbar
TO	Kein Anhalt auf Primärtumor	NO	Keine reg. Lymphknotenmetastasen (von 12 regionär entnommenen)	M0	Keine Fernmetastasen
Tis	Carcinoma in situ	N1	Metastasen in 1-3 perikolischen / perirektalen Lymphknoten	M1	Fernmetastasen
T1	Tumor infiltriert Submucosa	N2	Metastasen in 4 o. mehr perikolischen / perirektalen Lymphknoten		
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria				
T3	Tumor infiltriert durch die Muskularis propria in Subserosa o. in nicht peritonealisiertes perikolisches o. perirektales Gewebe				
T4	Tumor perforiert viscerales Peritoneum o. infiltriert andere Organe / Strukturen				

Tab.1: TNM Klassifikation (UICC, 1997)

Diese TNM-Klassifikation bedingt die Stadieneinteilung (UICC 1997, vgl. Tab. 2, nachfolgende Seite). Mit dem Auftreten von Fernmetastasen und damit des höchsten Stadiums IV nach TNM verringert sich das relative Überleben der Patienten über die Zeit signifikant (Tumorregister Uni München).

Stadium	Primärtumor	Reg. Lymphknoten	Fernmetastasen	Dukes-Klassifikation
Stadium 0	Tis	N0	M0	
Stadium I	T1	N0	M0	
	T2	N0	M0	
Stadium II	T3	N0	M0	Dukes A
	T4	N0	M0	
Stadium III	Jedes T	N1	M0	Dukes B
	Jedes T	N2	M0	
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1	Dukes C

Tab. 2: Stadienklassifikation (UICC, 1997) und Dukes-Einteilung

Gebräuchlich sind auch noch andere Klassifikationen, wie die Dukes-Einteilung (1932, vgl. Tab. 2). Daneben existieren noch ein nach digitaler Exploration präoperatives Staging nach Mason (1975) und eine R-Klassifikation R0-R2 (UICC, 1997), welche die Radikalität der Operation beschreibt.

2.1.5 Tumorausbreitung und Fernmetastasen

Kolorektale Tumore infiltrieren die Darmschichten, breiten sich örtlich ins umgebende Fettgewebe aus, sowie zumeist lymphogen entlang der Lymphabflusswege an den arteriellen Gefäßen, bzw. in regionäre Lymphknoten. Nach Einbruch in die Gefäße breitet sich das Karzinom hämatogen aus.

Bei etwa 25 % aller Patienten treten Fernmetastasen auf. Diese befinden sich zu 69 - 80 % in der Leber, entsprechend dem venösen Abfluss über das Pfortadersystem. In bis zu 30 % der Fälle bleibt die Leber der einzige Ort der Metastasierung (Fong, 1995). Die Leber ist auch nach potentiell kurativer Resektion gastrointestinaler Tumore der häufigste Ort der Fernmetastasierung (Hnatowitch, 1981). In der Häufigkeit folgen Lungen-, Skelett-, Nebennieren- und Gehirnmastasen.

2.1.6 Angiogenese und Tumervaskularisierung

Die Angiogenese ist eine essentielle Komponente sowohl für das Tumorwachstum (Gefäße versorgen die Tumorzellen mit Nährstoffen), als auch für die Metastasenbildung (Gefäße als Transportweg für Tumorzellembolie). Die Gefäßdichte im Tumor kann deshalb auch als prognostischer Faktor für den Krankheitsverlauf herangezogen werden. Die Zuverlässigkeit dieses Parameters hat sich beispielsweise bei der Prognose der Progression und Metastasenneigung des Prostatakarzinoms bestätigt. Auch die Gefäßdichte in

Lymphknotenmetastasen von Mammakarzinomen kann ebensolche Informationen für den Primärtumor vermitteln (Guidi, 2000).

Die Angiogenese und die Tumolvaskularisation stellen in der Onkologie einen weiteren Ansatzpunkt für Therapieverfahren dar.

Mikrometastasen im Gewebe haben dieselbe Anzahl sich teilender Zellen wie wachsende Tumore. Der Unterschied liegt in der höheren Rate absterbender Zellen. Mikrometastasen ruhen zunächst im Gewebe. Durch einen angiogenetischen „Switch“ wird die Metastase zum Wachstum angeregt und expandiert. Deshalb befassen sich u.a. derzeit verschiedene klinische Studien mit dem Einsatz antiangiogener Substanzen. Nach Zetter (1998) können die die Tumolvaskularisierung beeinflussenden Faktoren folgendermaßen eingeteilt werden: Zu den bekanntesten angiogenesefördernden Substanzen zählen der *Fibroblast growth factor (FGF)* und der *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*. Diese werden vom Tumor selbst oder von Immunzellen produziert. Antiangiogen wirken die körpereigenen Hemmer Thrombospondin, Interferon und Metalloproteinasehemmer, synthetische Verbindungen (Proteasehemmer und antiadhäsive Peptide), tumorale Hemmer (Angiostatin und Endostatin), sowie Pharmazeutika (die antibiotischen Substanzen AGN1470 / TNP470-, Thalidomid und der Kalziumkanalblocker CAI).

Ein besseres Verständnis der Feinmorphologie der Tumolvaskularisation, die meist als durchlässig und deformiert charakterisiert ist (Lasic, 1993), sollte ebenfalls helfen, diese als Angriffspunkt für antitumorale Agenzien zu definieren.

Die Tumorgefäße haben einen durchschnittlichen Querschnitt von 39 μm . Kleine Gefäße mit weniger als 25 μm Durchmesser überwiegen. Vom Lumen sprossen weitere Gefäße ab, die selbst lumenlos sind. Die Gefäßwand ist ausgekleidet mit irregulär gestalteten Endothelzellen, teilweise überlappend, teilweise inkomplett-lückenhaft. Die Endothelzellen bilden häufig lange Fortsätze, die in und durch das Gefäß ziehen. Die luminale Oberfläche ist von interzellulären Öffnungen unterbrochen. Diese sind durchschnittlich 1,7 μm groß (zwischen 0,3 - 4,7 μm) und nehmen etwa 0,1 % der Oberfläche ein. Weiterhin sind kleinere Diaphragma-bespannte Fenestrationsen und Hohlräume vorhanden (Hashizume, 2000). Anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Thurston, 1998) wurde allerdings das „Durchsickern“ von Stoffen durch diese defekten Tumorgefäße weniger nachgewiesen. Die tumorale Anreicherung der in diesem Versuch systemisch verabreichten Liposomenformulierungen war hier zu einem hohen Prozentsatz durch endozytotische Aufnahme über die Endothelzellen der Neovaskulatur bedingt.

In der Versorgung der Lebermalignitäten findet sich eine anatomische Besonderheit: Das gesunde Lebergewebe wird zu 70 - 80 % über die Vena portae perfundiert. Die restlichen 20 -

30 % erhält sie über die Arteria hepatica. Bei den Lebertumoren sind die Verhältnisse umgekehrt. Sie erhalten den Hauptanteil ihres Perfusionsvolumens (75 - 90 %) über die Arteria hepatica (Breedis, 1954). Ackermann (1974) findet allerdings im Tiermodell unterschiedliche Möglichkeiten der vaskulären Tumorversorgung, in Abhängigkeit von der Größe: sehr kleine Walker-Tumore (Karzinom), welche in Rattenlebern implantiert waren, mit 1 – 2 mm Durchmesser werden arteriell und portalvenös versorgt, mittelgroße Tumore mit 3 – 7 mm werden arteriell versorgt und sehr große Tumore wiederum variabel.

2.1.7 Therapie des Primärtumors / Kolorektales Karzinom

2.1.7.1 Chirurgie

Das kolorektale Karzinom wird aufgrund unterschiedlicher Therapieansätze im folgenden für das Kolonkarzinom und Rektumkarzinom getrennt beschrieben. Zu den Kolonkarzinomen werden die Malignitäten gezählt, deren aboraler Rand über 16 cm von der Anokutanlinie entfernt ist und zu den Rektumkarzinomen die Malignitäten, deren aboraler Rand bis 16 cm von der Anokutanlinie entfernt ist.

Bei den Kolonkarzinomen wird operativ zur Entfernung des Tumors eine *en-bloc*-Resektion des tumortragenden Anteils mit seinem Lymphabflussgebiet im gesundem Gewebe angestrebt. Das Ausmaß der Resektion wird von den zu unterbindenden Gefäßen bestimmt, die den Darmabschnitt versorgen. Es ergeben sich daraus verschiedene Standardresektionen: Hemikolektomie rechts, Kolontransversum-Resektion, Hemikolektomie links und Sigmaresektion. Bei prädisponierten Patienten oder bei operativen Grenzfällen kann eine prophylaktische (sub-) totale Koloektomie eine erneute Erkrankung verhindern, ihr Einsatz ist aber umstritten (Rodriguez-Bigas, 1996). Liegen resektable Lebermetastasen vor, so werden diese zum selben oder späteren Zeitpunkt entfernt (sog. „ein-“ oder „zweizeitiges“ Vorgehen). Standardverfahren für die *en-bloc*-Resektion von Rektumkarzinomen wären die kontinenzerhaltende tiefe anteriore und anteriore Rektumresektion, sowie die abdomo-perineale Rektumextirpation. Auch hierbei bleibt der Grundsatz der *en-bloc*-Resektion erhalten, der Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe sollte 1 - 2 cm betragen. Bei allen lokal fortgeschrittenen Rektumkarzinomen ist eine präoperative Radiotherapie indiziert. Adjuvant werden postoperativ in bestimmten Stadien Radio-Chemotherapien empfohlen (vgl. auch Kap. 1.7.2 und 1.7.3). Nur bei erhöhtem Operationsrisiko und günstigen Tumorstadien kommen eventuell lokale (endoskopische) Tumorexzisionen in Betracht.

Die chirurgische Vorgehensweise wird bei älteren Patienten oder unheilbarem kolorektalem Karzinom zur Erhaltung einer ausreichenden Lebensqualität angewandt, auch unter rein palliativer Zielstellung.

2.1.7.2 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie ist für das Kolonkarzinom eher bedeutungslos und als selten indiziert einzuschätzen, da eine Strahlenbelastung des empfindlichen Dünndarms hierbei unvermeidlich ist.

Im Gegensatz dazu wird das Rektumkarzinom in bestimmten Stadien adjuvant präoperativ zum Down-Staging (Mendenhall, 1992) oder adjuvant postoperativ bestrahlt. Sehr selten kann eine intraoperative Bestrahlung zum Einsatz kommen (Sadahiro, 2001).

Es wird über etwa 6 Wochen, in Einzeldosen von max. 2 Gy, eine Gesamtdosis von ungefähr 50 Gy verabreicht. Die Bestrahlung wird in einer Mehrfeldertechnik ausgeführt, ab 45 Gy werden die Dünndarmanteile mittels Blenden gesondert geschützt.

Als Nebenwirkungen können Durchfälle (1 / 5 der Patienten), seltener Übelkeit oder Obstruktionen auftreten.

2.1.7.3 Chemotherapie / Immuntherapie

Vorangestellt sei, dass es eine optimale adjuvante Therapie, besonders für fortgeschrittene Stadien nicht gibt. Empfehlungen zu systemisch durchgeführten Chemotherapien unterscheiden sich je nach Stadium des kolorektalen Karzinoms (nach Ruf, 2000): Das gängigste Chemotherapeutikum ist nach wie vor 5-Fluorouracil (5-FU).

Ein sehr *fortgeschrittenes lokales Tumorstadium ohne Fernmetastasierung* kann präoperativ, auch mit Radiotherapie, chemotherapeutisch behandelt werden und zu einem sog. Down-Staging führen. Ab dem Auftreten von Lymphknotenbefällen sinkt die 5-Jahresüberlebensrate erheblich und eine adjuvante Chemotherapie ist indiziert. Bei den Stadien II / III wird nach der OP adjuvant 5-FU mit Folinsäure über 6 Monate verabreicht (als Standard zu bezeichnen, beim Rektumkarzinom wird zusätzlich bestrahlt). Die nebenwirkungsreichere und langandauernde Kombination 5-FU und Levamisol über 12 Monate wird inzwischen seltener verwendet, sie verhält sich in den Ergebnissen äquivalent (Schwartzberg, 2001 / Haller, 1998). In klinischen Studien wurde gegen das 17-1A Epitop, welches die Tumorzellen exprimieren, ein Antikörper eingesetzt (Riethmüller, 1998). Ein entscheidender Vorteil gegenüber der alleinigen Chemotherapie gelang dabei jedoch noch nicht, auch nicht bei Kombination von Chemo- und Immuntherapie (Müller, 2001).

Im *metastasierenden Stadium* des kolorektalen Karzinoms prüfen Studien (EORTC-Studie) eine präoperative mehrmonatige Vorbehandlung mit 5-FU / Irinotekan oder 5-FU / Oxaliplatin an Patienten mit als resezierbar eingeschätzten Metastasen. Nach der OP werden adjuvant die gleichen Medikamente verabreicht.

Das *inoperable metastasierende Karzinom* wird unter palliativer Zielstellung zur Besserung der Symptomatik, zur Stabilisierung des Krankheitsverlaufes und der Überlebenszeitverlängerung mit 5-FU / Folinsäure Kombinationen behandelt, wobei bei „Nicht-“ oder „Nicht-mehr-Ansprechen“ zu dieser Chemotherapie Oxaliplatin oder Irinotekan addiert werden kann.

2.1.8 Therapie der Lebermetastasen

2.1.8.1 Chirurgie

Die Operation gilt als einzig etablierte, kurative Therapie von Lebermetastasen (Schlag, 1999 / Takeshi 2000), was u.a. als Ergebnis der bis jetzt eingeschränkt erfolgreichen Chemotherapien zu werten ist (Schlag, 1998).

Patienten mit unbehandelten Lebermetastasen haben eine sehr schlechte Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von nur 3 % (Wagner, 1984). Werden die Metastasen entsprechend früh erkannt und reseziert steigt diese Rate auf knapp 50 % (Tumorzentrum München / Takeshi, 2000), wobei Patienten mit unter drei, wenig gestreuten und kleinen Metastasen den eindeutigen Vorteil haben. Einen negativen Einfluss auf die Überlebenszeit nach der OP haben folgende Faktoren:

- ein tumorbefallener Resektionsrand
- das Vorhandensein von extrahepatischen Tumoren
- positive Lymphknoten bei der primären Kolonresektion
- Zeit von der Primäroperation bis zur Leberresektion von unter 12 Monaten
- mehr als eine vorhandene Metastase
- Tumoren über 5 cm Größe
- ein CEA-Titer (Carcinoembryonales Antigen) von über 200 ng / ml

Unter den Patienten mit fünf dieser Faktoren überlebte keiner die Zeit von 5 Jahren (Fong, 1999 / Baer, 2000). Weiterhin wird eine signifikant bessere Resektabilität mit Überlebenszeitverlängerung bei den von Spezialisten operierten Patienten gefunden (Wigmore, 1999 / Kessler, 1993).

Voraussetzung für die chirurgische Entfernung der Lebermetastasen ist die vollständige Resektion des Primärtumors. Anzahl, Lage der Metastasen und eine eventuelle ungenügende Leberparenchymreserve bestimmen weiterhin die potentielle Indikation zur Operation. Eine zumindest relative Kontraindikation stellen Lymphknotenmetastasen und extrahepatische Metastasen dar (Tumorzentrum München, 1997). Nach eingehenden Untersuchungen zum Allgemeinstatus des Patienten und speziellen Leberuntersuchungen (MRT, Laborwerte) kann dann gegebenenfalls operiert werden.

Die kurative Zielstellung ist hierbei überwiegend auf Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms beschränkt. Andere, wie Magen-, Bronchial- und Pankreaskarzinommetastasen, würden trotz Operation eine zu ungünstige Prognose aufweisen.

Je nach Größe, Anzahl und Lokalisation der Metastasen in der Leber wird eine monosegmentale Resektion (jedes Lebersegment ist hierbei möglich), eine links laterale Segmentresektion der Segmente II und III oder eine Hemihepatektomie - rechts, links, erweitert rechts oder erweitert links - durchgeführt (Baer, 2000). Der Begriff Segment kennzeichnet hierbei die anatomische Funktionseinheit des Lebergewebes, welche eine hepatische Vene und das Glisson'sche Trias (Gallengang, Arterie, Portalvene) besitzt. Eine Resektion der Metastasen im gesunden Gewebe stellt nach wie vor den Standard dar (Ott, 2001), und ein Sicherheitsabstand von 1 cm sollte eingehalten werden (Schlag, 1998).

Neuere ablativ Verfahren wie Kryo-, Laser- oder Radiohochfrequenzablation (perkutan oder offen) befinden sich in Testphasen und werden mit der Leberresektion kombiniert, um die Indikationsstellung für die Operation zu erweitern, d.h. mehr Patienten der Operation zu zuführen.

Oft ist eine chirurgische Intervention jedoch nicht möglich, sei es aufgrund des verstreuten Wachstums (die Metastasen wachsen selten solitär) oder aufgrund ungünstiger Lokalisation. Eine Erhaltung der Restfunktion dieses wichtigen Stoffwechselorgans muss gegeben sein. Mitunter ist eine solche Operation auch wegen des schlechten Allgemeinzustandes des Patienten kontraindiziert. Ein potentiell kurativer Eingriff ist schließlich nur bei 10 - 15 % der Patienten möglich (Schlag, 1999). Ein weiteres Problem nach einer kurativen Lebermetastasenresektion, die zwar wiederholt durchgeführt werden kann, ist, dass bis zu 50 % der Patienten ein Rezidiv in der Leber entwickeln (Tono, 2000).

Die hier aufgezeigten Einschränkungen für eine erfolgreiche chirurgische Therapie belegen die dringende Notwendigkeit alternative, weniger invasive Therapieverfahren zu entwickeln.

2.1.8.2 Strahlentherapie

Die Strahlentherapie sei hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Sie hat kaum Bedeutung, da die Leber selbst sehr strahlenempfindlich ist. Eine Bestrahlung könnte allenfalls zur Schmerzlinderung (Leberkapselschmerz) und zur Cholestasebehandlung perkutan durchgeführt werden (Eble MJ, 1993).

2.1.8.3 Chemotherapie der Lebermetastasen

2.1.8.3.1 Systemische und lokoregionäre Chemotherapie

Systemisch durchgeführte Chemotherapien entsprechen den Schemata der Behandlung des Primärtumors. Damit wird hauptsächlich 5-FU mit oder ohne Kombination von Folinsäure als intravenöser Bolus oder portrahierte Infusion eingesetzt (Borner, 2001). Die Nebenwirkungen wie Durchfälle, Übelkeit und hämatopoetische Störungen sind in ihrer Schwere dosisabhängig.

Die lokoregionäre Chemotherapie von Lebermetastasen wird adjuvant zur Resektion der Lebermetastasen, aber auch palliativ bei nicht resektablen Metastasen durchgeführt. Die Indikation ist sehr kritisch zu stellen. Extrahepatisch sollte kein weiterer Tumor vorliegen. Das Chemotherapeutikum kann lokoregionär intraperitoneal, intraportal oder intraarteriell appliziert werden. Die Ergebnisse der intraportalen und intraperitonealen Applikation unter Anwendung von zumeist 5-FU oder FUDR sind nicht eindeutig positiv bis enttäuschend (Hottenrott, 1996).

Aufgrund der besonderen oben schon erwähnten arteriellen Gefäßversorgung der Tumoren (vgl. Kapitel 1.6) werden zur lokoregionären Therapie Katheter bevorzugt intraarteriell in die Arteria gastroduodenalis eingeführt. Die Katheterspitze wird genau an der Verbindung von Gastroduodenalarterie und Leberarterie plaziert (Curley, 1990). Für die Behandlung und Vorgehensweise ist erforderlich, dass im Rahmen einer präoperativen Angiographie die klassische Anatomie der Gefäße bestätigt ist. Die Katheter werden mittels verschiedener Verfahren platziert: angiographisch und damit minimal invasiv, chirurgisch implantierte sog. Ports mit externen Pumpen kombiniert und chirurgisch implantierte Infusionspumpen (Vauthey, 1996). Wegen der Nebenwirkungen (Schleimhauttoxizitäten) muss die Arteria gastrica dextra unterbunden und die Gallenblase entfernt werden (Curley, 1990 / Kemeny, 1985). Die Ansprechraten des Tumors sind auf die lokoregionäre Therapie mit 18 - 28 % (Vauthey, 1996) signifikant höher, doch ohne deutliche Auswirkungen auf eine Überlebenszeitverlängerung (Ragnhammar, 2001). Die Studien zeigen hierzu widersprüchliche Ergebnisse. Die Lebensqualität der Patienten, welche eine lokoregionäre Form der Chemotherapie erhalten, ist erheblich besser im Vergleich zu den Patienten die konventionell palliativ behandelt werden (Allen-Mersh, 1994).

Eine sehr seltene Form der lokoregionären Anwendung therapeutischer Agenzien kann über das sehr aufwendige Verfahren der isolierten Leberperfusion erfolgen (Aigner, 1984 / Vahrmeijer, 1995). Die isolierte Leberperfusion ist am Patienten leider nicht wiederholbar.

Eine limitierte Aktivität des 5-FU innerhalb der verschiedenen Anwendungsformen wird auf eine Resistenz der Zellen aufgrund verschiedener Mechanismen zurückgeführt (Mader, 1998).

Ingesamt scheint in der Anwendung des 5-FU ein Plateau erreicht zu sein (Ragnhammar, 2001).

2.1.8.3.2 Lokoregionäre Embolisation und lokoregionäre Chemoembolisation

Die Embolisationstherapie der Lebermetastasen wird in erster Linie bei Patienten mit inoperablen Lebermetastasen angewandt und beruht wiederum auf der besonderen arteriellen Gefäßversorgung des Tumors. Mittels eines applizierten Embolisates (einer blutflußverlangsamenden Substanz) wird die arterielle Versorgung des Tumors permanent oder temporär verlegt. Dies geschieht wieder über den femoralen Katheter, der seinen Inhalt in die A. hepatica propria entlassen kann. Daraus resultieren eine erwünschte Ischämie, die den Tumor unmittelbar schädigen kann und eine vorübergehende Besserung des Krankheitsbildes. Die allgemeine portalvenöse Leberdurchblutung muss allerdings gewährleistet sein, um die Gefahr einer Leberzellnekrose zu minimieren. Dies erfordert ein Vorgehen unter angiographische Kontrolle.

Wird ein Chemotherapeutikum zusammen mit einem Embolisat appliziert, spricht man von Chemoembolisation. Neben den therapeutischen Vorzügen der Embolisation lassen sich die Konzentration und Verweildauer der mit dieser Technik applizierten Zytostatika erhöhen bzw. verlängern und systemische Nebenwirkungen können reduziert werden (vgl. auch folgende Kapitel).

2.1.8.3.3 Embolisate

Es wurden Embolisate mit verschiedenen Eigenschaften für verschiedene Indikationen und Einsatzgebiete entwickelt. Sie sind u. a. durch Partikelgröße, Röntgendichte, Okklusionsmechanismus und biologisches Verhalten charakterisiert.

Einige gebräuchliche Embolisate in der Lebermetastasenbehandlung seien im folgenden aufgeführt (nach Winkelbauer, 1997):

- **Ivalon[®]**: besteht aus Polyvinylalkohol mit der Partikelgröße 0,38 - 0,89 mm. Da es nicht abbaubar ist, dient es dem permanenten Gefäßverschluss.
- **Histoacryl[®]**: ist flüssiger Gewebekleber, der im Gefäß polymerisiert. Es ist jedoch schwierig in der Handhabung, nicht abbaubar und mitunter gewebetoxisch.
- **Ethibloc[®]**: besteht aus Maiseiweiß, Alkohol und Kontrastmittel. Es ist ebenso schwierig zu handhaben wie der Gewebekleber, eine Gefäßokklusion erfolgt nur partiell.
- **absoluter Alkohol**: bewirkt eine starke Schädigung des Gefäßendothels und damit eine Thrombosierung, welche nur als Ausnahme rekanalisiert werden kann. Er wird deshalb eher intratumoral angewandt.

Für eine reversible Flussverlangsamung sind diese vier Embolisate nicht geeignet, im Gegensatz zu den nun folgenden:

- **Gelfoam[®]**: besteht aus Gelatine und hat eine Partikelgröße von 0,01 - 0,1 mm. Es erreicht in der Verschlussenebene „nur“ die Arteriolen. Innerhalb von 2 - 30 Tagen wird die Gelatine enzymatisch abgebaut.
- **Lipiodol[®]**: ist jodiertes ethyliertes Mohnöl. Die Öltröpfchen sind röntgendicht und der Verschluss erfolgt auf Kapillarebene. Lipiodol kann aber auch in die Lungengefäße strömen.
- **Spherex[®], DSM 45 / 25**: Spherex[®] ist ein Amilomer aus Stärkemikrosphären. Die Stärke ist teilweise hydrolysiert, sowie quervernetzt und substituiert mit Glycerinether. Dieses Amilomer ist nicht immunogen. Der mittlere Teilchendurchmesser liegt bei 45 µm und die Halbwertszeit unter definierten *in-vitro*-Bedingungen beträgt 25 min. Der Verschluss erfolgt auf kapillärer Ebene. In wässriger Phase ist es gelartig und kann sich so dem Gefäßlumen anpassen. Die Auflösung der Microsphären erfolgt durch die körpereigene α -Amylase mit der angegebenen Halbwertszeit zu wasserlöslichen Abbauprodukten. Neben dem primären Effekt der Tumorschämie, kommt es durch arteriellen Rückstau zur Durchblutung zuvor hypovaskulärer Tumoreale, die damit der Therapie zugänglich sind. Meist wird das Embolisat in Verbindung mit einem Chemotherapeutikum lokoregionär verabreicht (Mitomycin C, 5-FU oder Adriamycin). Präklinische Untersuchungen an tumortragenden Kaninchen bestätigten in dieser Kombination eine signifikant erhöhte Anreicherung des Zytostatikums im Lebertumor im Vergleich zur systemischen Chemotherapie (Pohlen, 2000). Obwohl am Patienten das Auftreten von allgemeinen Nebenwirkungen, wie z.B. Übelkeit, kurz nach der lokoregionären Chemoembolisation gegenüber der lokoregionären Chemotherapie gehäuft auftraten, fallen jedoch weiße Blutzellen und Thrombozyten nicht so stark ab und die Effektivität bestätigt sich in wesentlich höheren Remissionsraten des Tumors (Produktmonographie / Taguchi, 1992).

2.2 Genterapie in der Onkologie

2.2.1 Definition

Nach dem ersten erfolgreichen genterapeutischen Behandlungsversuch einer Patientin mit einer seltenen Erbkrankheit, der Adenosin-Deaminase-Defizienz, im Jahr 1990 (Blaese, 1994) stieg die Anzahl der genterapeutischen Studien, besonders auch im Bereich der Onkologie (Culver, 1994). Dieses Feld nimmt den größten Platz ein (vgl. Abb. 1). Das Spektrum der Zielerkrankungen ist jedoch größer. Es reicht von Erbkrankheiten, erworbenen Immundefekten, Stoffwechselerkrankungen (Diabetes, Mukoviszidose) über Koronarstenosen

bis hin zu inflammatorischer Arthritis und Infektionskrankheiten wie z.B. HIV. Derzeit laufen insgesamt etwa 600 gentherapeutische klinische Studien weltweit, davon etwa 80 % in den USA.

Die Gentherapie in der Onkologie beinhaltet das Einbringen therapeutisch nutzbarer DNS in Tumorzellen zur Kurzzeitexpression mit dem Ziel der Vermittlung von Toxizität. Die DNS wird dabei in somatische (nicht an der Keimbahn beteiligte) Zellen eingebracht (Brach, 1996 / Willeke, 1998). Das zu übertragene Gen wird als dabei „Transgen“ bezeichnet. Es ist häufig in ein ringförmiges Plamid eingefügt, das noch weitere funktionelle Gene enthält und in Bakterien produziert wird.

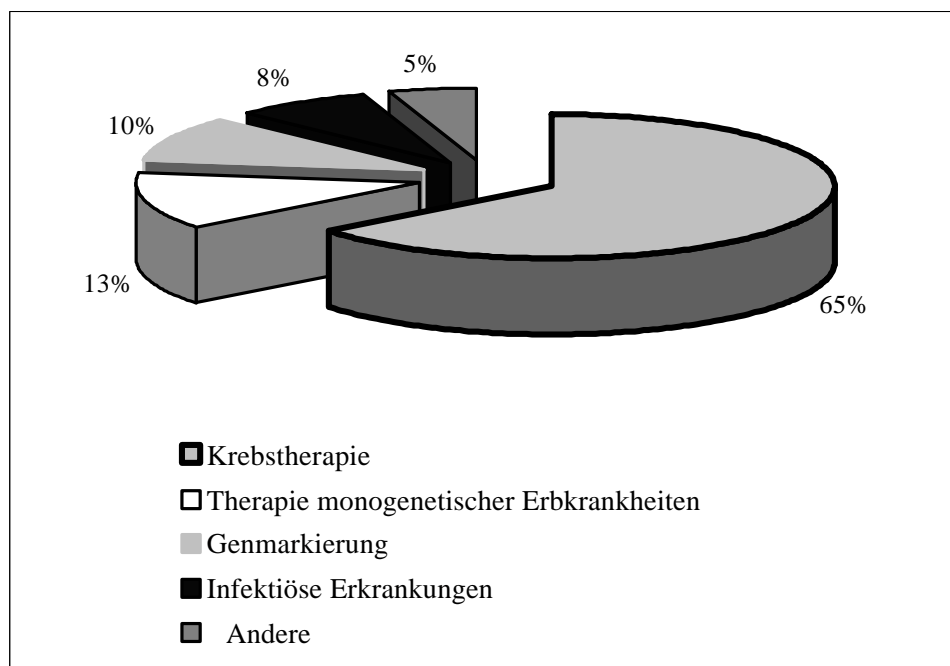


Abb. 1: Klinische Gentherapiestudien

2.2.2 Allgemeine Strategien

Die Übertragung des Transgens kann außerhalb des Patienten stattfinden (*ex-vivo*-Verfahren). Dazu werden diesem die Zielzellen entnommen, transfiziert und reinfundiert. Eine weitere Möglichkeit ist das *in-vivo*-Verfahren, bei dem das Transgen direkt im Patienten übertragen wird.

Verschiedene Strategien werden in der Onkologie angewendet (nach Baum, 1996):

1. **Der Suizidgentransfer:** Die mit einem Suizidgen transfizierten Tumorzellen sind aufgrund der Expression des Genproduktes in der Lage, nach Gabe eines untoxischen Prodrug einen zytotoxischen Metaboliten zu erzeugen und damit „Suizid“ zu begehen. Nicht-transfizierte Zellen können dabei durch den sog. Bystandereffekt zusätzlich abgetötet werden (vgl. Kap. 2.6). Eine Kombination mit Zytokingenen ist möglich.

2. **Der Onkogenantagonismus:** Dabei werden Onkogene inaktiviert oder Tumorsuppressorgene wieder eingeführt. Der Transfer und die Mechanismen sind ähnlich dem Suizidgentransfer.
3. **Die Tumorstabilisierung:** Die transduzierten Tumorzellen präsentieren bei dieser Strategie Antigene und stimulieren die Immunantwort. Transgene sind hier Zytokingene.
4. **Der Resistenzgentransfer:** Die transduzierten Zellen sind Zellen des Knochenmarks. Sie sind nach dem Gentransfer „resistent“ gegen Chemotherapeutika. Damit sind die Dosis und Verträglichkeit der Chemotherapie steigerbar.
5. **Die Genmarkierung:** Sie dient zur Detektion von Tumorzellen (wird weniger therapeutisch eingesetzt, eher zur Qualitätssicherung von Organ- oder gewebetransplantaten).
6. **Organoide:** Sie stellen implantierte „Miniorgane“ dar und sollen antitumorale Agenzien produzieren (wie z.B. Angiogeneseinhibitoren).
7. **Die adoptive Immunotherapie:** Hierbei werden transduzierte antileukämische lymphozytäre Effektorzellen eingesetzt, die bei Komplikationen abgetötet werden können.

2.2.3 Vektoren

Die Übertragung des Transgens erfolgt mittels eines geeigneten Transportsystems, eines Vektors. Idealerweise soll dieser Vektor das genetische Material zielgerichtet auf bestimmte (Tumor-) Zellen übertragen, so dass es dort in ausreichendem Maße abgelesen werden kann. Der Vektor soll darüber hinaus gefahrlos für den Empfänger sein. Man unterscheidet zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.

Der Begriff Vektor kann zweierlei Bedeutung tragen: der Begriff kann verwendet werden für die äußere Hülle, das sogenannte „Gentaxi“, aber auch für die genetischen Sequenzen, in die das Transgen eingebettet ist, beispielsweise eine Plasmid-DNA (vgl. Abb. 1, S.27). Das in dieser Arbeit verwendete liposomal (Vektor im weiteren Sinn) verkapselte Therapiegen (im Plasmid - Vektor im engeren Sinn) passiert die Zellmembran, gelangt ins Zytoplasma, dann in den Zellkern und liegt dort neben der zelleigenen DNA als Plasmid vor.

Wie schon Tierversuche zeigten, ist die Effizienz der Genübertragung jedoch leider limitiert. Dies betrifft besonders die *in-vivo*-Transfektionsverfahren und wird daher oft als "Achilles-Ferse" der Gentherapie bezeichnet. Es ist bisher noch nicht das ideale Gentaxi gefunden worden. Für die Bewertung präklinischer Versuche ist es realitätsnäher mit Modellen zu arbeiten, die genau diese Hürde mit überwinden müssen, d.h. eine Implantation schon transfizierter Tumorzellen (im *ex-vivo*-Transfektionsverfahren) käme für die vorliegende Arbeit nicht in Frage.

Virale Vektoren		Nicht Virale Vektoren
Replikations-inkompetent	Replikationskompetent und onkolytisch	-Liposomen, Kationische Lipide, Lipoplexe
		-DNA-Protein Komplexe
-Retroviren	-Adenoviren	-Freie DNA
-Adenoviren	-Herpesviren	-Physikalischer Transfer: Elektroporation, direkte Injektion (Mikroinjektion, Jetinjektion), Partikelbombardment
-Adenoassoziierte Viren	-Parvoviren	
-Herpesviren	-Aviäre Paramyxoviren	
-Sindbisviren	-Reoviren	-Gasgefüllte Mikropartikel
-Lentiviren	-Vesikuläres Stomatitis Virus	

Tab. 3: Vektoren und Methoden des Gentransfers

2.2.3.1 Virale Vektoren und Sicherheit

Für gentherapeutische Ansätze wurden bisher überwiegend virale, replikationsinkompetente Vektoren verwendet. Über den viralen Infektionsmechanismus werden die Transgene zwar hocheffizient in die Zelle geschleust, jedoch bestehen erhebliche Risiken bei der Verwendung dieser Art von Vektoren. Während zu Beginn der Arbeiten vorwiegend Retroviren eingesetzt wurden, nutzt man heute zunehmend Adenoviren.

Retroviren integrieren ihre genetische Information in das Genom der infizierten Zelle und sind somit in der Lage, Zellen stabil zu transfizieren, was in der Krebsgentherapie nicht unbedingt erwünscht oder nötig ist. Zur Integration des viralen Genoms müssen sich die Zellen in der Teilungsphase befinden. Letzteres kann für eine onkologische Therapie den Vorteil höherer Selektivität erbringen, da sich Tumorzellen schneller teilen als nichtentartete Zellen. Der Einsatz von Retroviren ist hinsichtlich der genetischen Sicherheit riskant, da virales Genom integriert wird und somit zu Mutagenesen führen kann. Limitierender Faktor bei der Herstellung von Retroviren ist ihre geringe Konzentration. Die Größenordnung des Titors beträgt etwa 10^8 Viruspartikel / ml. Damit werden auch weniger Zellen infiziert und transfiziert. Die Verpackungskapazität an Fremd-DNA (~7 kB Basenpaare) ist, verglichen mit anderen Vektoren, relativ gering. Lebermetastasenmodelle zeigten eine Transfektionseffizienz durch retrovirale Vektoren von 10 - 20 % (Caruso, 1996).

Adenoviren infizieren auch sich nicht-teilende Zellen effizient (Block, 1997), wodurch der für onkologische Therapieansätze potentielle Vorteil der Selektivität entfällt. Sie können in höheren Titern ($<10^{11}$ / ml) erstellt werden. Die Verpackungskapazität neuerer veränderter Adenoviren ist inzwischen mit bis zu 30 kB sehr hoch. Für das HSV-*tk* System und seine Anwendung an Lebermodellen wurden im Tierversuch hepatische Toxizitäten und

Dysfunktionen sowie erhöhte Mortalitäten, bedingt durch die hepatotrope Natur dieser Viren, festgestellt (van der Eb, 1998 / Brand, 1997 / Qian, 1997). Ein weiterer großer Nachteil ist auch die Expression ihrer eigenen Gene - durch die Produktion des viralen Proteins findet eine Immunisierung statt. Eine erneute Applikation, beispielsweise zur Steigerung der Transfektionseffizienz ist dadurch unmöglich.

Aus diesem Grunde wurden *adenoassoziierte Viren* (AAV) entwickelt. Sie haben kein eigenes Genom, das Proteine exprimieren könnte. AAV erreichen ebenso hohe Titer, bei geringerer Verpackungskapazität. Sie erreicht ~4 kB. Da jedoch zur Replikation der AAV Adenoviren nötig sind, ist die Gefahr einer Kontamination nicht auszuschließen.

Der Einsatz von *Lentiviren* beschränkt sich bisher noch auf präklinische Untersuchungen; Gentransfer über diese ist aber prinzipiell möglich (Zufferey, 1997). Lentiviren, auf Grundlage der HIV-Viren entwickelt, infizieren sich teilende und sich nicht-teilende Zellen. Sie integrieren ihr Genom (~7,5 kB) stabil in die Wirtszelle. Der produzierbare Titerbereich liegt bei 10^{11} / ml. Die Gefahr der Rekombination und Entstehung von replikationskompetenten Viren ist jedoch auch hier gegeben. Auch das Auftreten von Immunreaktionen ist denkbar.

Herpes-Simplex-Viren gehören ebenso wie AAV und Lentiviren zu den neueren Vektoren. Sie sind nicht auf den Zellteilungszyklus angewiesen, können viele Arten von Zellen infizieren und eine große Menge an Genom bergen.

Der Todesfall eines Patienten im Jahre 1999 der an einer Stoffwechselerkrankung, der Ornithin-Transcarbamylase-Defizienz litt (Hollon, 2000) und sich als Proband einer gentherapeutischen Studie unterzog, die adenovirale Vektorsysteme nutzte, zeigt die schon erwähnten Grenzen des viralen Gentransfers auf: Es existiert ein hohes Sicherheitsrisiko bezüglich Immunreaktion und genetischer Sicherheit. Der 18-jährige Patient starb wenige Tage nach der Vektorapplikation durch Lungen- bzw. multiples Organversagen, wahrscheinlich in Folge der Immunreaktion des Körpers auf die Viren.

Eine neuere Gruppe, die der *onkolytischen Viren*, soll in der Lage sein, besonders selektiv Tumorzellen zu infizieren. Sie sind, im Gegensatz zu den vorhergehend beschriebenen, replikationskompetente Viren und zerstören durch ihre Vermehrung die Tumorzellen, nicht jedoch gesundes Gewebe. Für diese Eigenschaften wurden sie modifiziert. Ein Sicherheitsrisiko birgt natürlich auch diese Art Vektoren. Zu den technisch am weitesten entwickelten onkolytischen Viren, die teilweise schon in klinischen Versuchen eingesetzt werden, zählen Adenoviren (Nemunaitis, 2001 / Kirn, 2001), Herpesviren mit dem Humanen Herpesvirus I (Markert, 2000 / Martuza, 2000) oder dem Epstein-Barr-Virus, Parvoviren (Moehler, 2001) oder Aviäre Paramyxoviren, wie das Newcastle-Disease-Virus

(Schirmmacher, 2001). Die apathogenen onkolytischen Reoviren (Coffey, 1998) nehmen eine Sonderstellung in dieser Gruppe ein, da sie nicht vor Beginn klinischer Versuche modifiziert werden müssen (Galani, 2001). Perspektivisch gesehen kann die Wirkung der onkolytischen Viren potenziert werden durch die Verwendung als Vektor für therapeutische Gene, wie zum Beispiel dem zelltodauslösenden Apoptin-Gen (Olijslagers, 2001) oder durch Kombination mit einer Chemotherapie (Norman, 2001).

2.2.3.2 Liposomen als nichtvirale Vektoren

Liposomen wurden schon vor über 30 Jahren beschrieben (Bangham, 1965) und werden heute in der Pharmakologie häufig als Arzneistoffträger verwendet. Sie umhüllen das Pharmakon vermitteln dessen Aufnahme in die Zelle und können so z.B. die Toxizität antitumoraler Medikamente senken.

Liposomen werden als geschlossene, vesikuläre Doppelschichtstrukturen definiert, in denen konzentrische Lipiddoppelschichten wässrige Kompartimente voneinander abgrenzen. Sie entstehen, wenn man geeignete amphiphile Verbindungen – wie z.B. Phospholipide- mit Wasser in Kontakt bringt (Arndt u. Fichtner, 1986).

Der Aufbau ähnelt den biologischen Zellmembranen. Nach Papahadjopoulos (1978) werden verschiedene Typen von Liposomen unterschieden. Sie unterscheiden sich in ihrer Präparationsmethodik und daraus resultierend in ihrer Zusammensetzung, ihrer Morphologie und ihren Eigenschaften (Größe, Einschlusskapazität, Verhalten *in-vivo* und *in-vitro*):

- **MLV** - Multilamellare Liposomen mit 0,4 - 3,5 µm Größe (Arndt u. Fichtner, 1986)
- **LUV** – Große, einschichtige Liposomen mit 0,06 - 1 µm Größe
- **SUV** – Kleine unilamellare Liposomen mit 0,015 - 0,6 µm Größe
- **REV** – *Reverse-phase-evaporation-vesicles* mit 0,07 - 0,25 µm Größe

Hinsichtlich der Verwendung der Liposomen als Arzneistoffträger soll ihr Verhalten *in-vitro* und *in-vivo* kurz erläutert werden: Die Aufnahme der Liposomen an der äußeren Zellmembran erfolgt durch Endocytose, Fusion oder Adsorption, letztere rezeptorvermittelt oder unspezifisch. Die Art der Applikation, die Größe, Ladung und Lipidzusammensetzung bestimmen die Verteilung und Verweildauer der Liposomen im Körper. Die hauptsächliche Eliminationsart liposomaler Vesikel aus dem Körper ist die Phagozytose nach Anlagerung von Plasmaproteinen (Opsonine). Sie verändern die Oberfläche von Partikeln, so dass diese phagozytiert werden können. Als Opsonine wirken z.B. Komponenten des Komplementsystems. Bei der parenteralen intravenösen Applikation von MLV's wurde schon in den 70er Jahren eine rasche Aufnahme der Liposomen in Leber und Milz nachgewiesen – Organe, in denen Zellen des retikuloendothelialen Systems Fremdkörper phagozytieren. In

der Leber sind dies die Kupferschen Sternzellen. Mitverantwortlich für diese Gewebeverteilung sind spezifische Opsonine für Leber und Milz (Moghimi, 1989). Wünschenswert ist jedoch eine längere Präsenz der arzneistofftragenden Liposomen und ein Targeting zu den Zielzellen, -geweben oder -organen. Aus diesem Grund entstanden verschiedene Weiterentwicklungen.

Durch die Herstellung von sogenannten „Stealth[®]“Liposomen wurde eine Verlängerung der Verweildauer im Blut erreicht. (Allen, 1991). Stealth[®]Liposomen enthalten Lipide, an die Polyethylenglycol (PEG) kovalent gebunden ist. Sie werden daher auch als “pegylierte” Liposomen bezeichnet. Auf diese Weise werden die Liposomen sterisch stabilisiert (Needham, 1992), die Opsonierung durch Plasmaproteine und ihre Phagozytose reduziert. Die auf diese Weise verlängerte Zirkulation im Blut führt zwangsläufig zur bevorzugten Ansammlung der Liposomen in Geweben mit veränderter Kapillarpermeabilität, wie in Entzündungsgebieten oder im Tumorgebiet (Wu, 1993). In pegylierte Liposomen verkapselte Zytostatika zeigen damit einen deutlich verbesserten therapeutischen Effekt bezüglich der Hemmung des Tumorwachstums (Papahadjopoulos, 1991).

Die Entwicklung von antikörpertragenden Immunliposomen (Torchillin, 1979) ermöglicht ein noch spezifischeres Erreichen der Zielzellen. Der Einsatz von Immunliposomen wird derzeit auch für das CC531-Lebermetastasenmodell untersucht (Kamps, 2000). Dabei werden pegylierte Liposomen verwendet (Kamps, 2000 / Koning, 2001).

Die Anwendung von Hyperthermie am Tumorgewebe kann die Passagierbarkeit und damit Anreicherung von größeren Liposomen im Tumor zusätzlich steigern (Kong, 2000).

Der größte Nachteil der Liposomen gegenüber viralen Vektoren im gentherapeutischen Einsatz ist ihre bisher geringere Transfektionseffizienz bei einmaliger Applikation.

2.2.4 Suizidgentherapie

Als Suizidgene werden Transgene zu Therapie Zwecken eingesetzt, die für jeweils verschiedene Enzyme kodieren. Erfolgreich in die Zielzelle integriert, vermitteln Suizidgene der Zelle die Fähigkeit, inaktive Formen von Medikamenten zu toxischen Metaboliten zu konvertieren und so die Nukleinsäuresynthese der Zelle zu inhibieren. Als Folge tritt der Zelltod ein. Tabelle 4 gibt einen Überblick über gängige Suizidgentherapie-Strategien.

Gen / Enzym	Prodrug	(Initialer) toxischer Metabolit
Herpes-Simplex-Virus- Thymidinkinase (HSV- <i>tk</i>)	Ganciclovir (GCV)	Ganciclovirmonophosphat
Cytosindesaminase (CD)	5-Fluorocytosin (5-FC)	5-Fluorouracil (5-FU)
Varicella-Zoster-Virus- Thymidinkinase (VCV- <i>tk</i>)	6-Methoxypurinarabinonukleosid (araM)	Adeninarabinonukleosidmonophosphat
Escherichia-Coli-Nitroreduktase (NTR)	5-(Aziridin-2-yl)-2,4- dinitrobenzamid (CB1954)	5-(Aziridin-1-yl)-4-hydroxyamino-2- nitrobenzamid
Cytochrom P540 B1 (CYPB1)	Cyclophosphamid (CPA)	4-Hydroxycyclophosphamid (4-HCPA)
Carboxypeptidase G2 (CPG2)	Benzoessäure-Lost-gluconurid (CMDA)	Lost-Benzoessäure
Penicillin Amidase	Palytoxin-4-Hydroxyphenyl- Acetamid	Palytoxin
Plasmin	Peptidyl-p-Phenylendiamin-Lost	Lost-Phenylendiamin

Tab.4: Gängige Suizidgentherapiestrategien (aus: Gene Therapy, O'Malley, 2000 / Connors, 1995)

2.2.4.1 Spezielle Suizidgentherapie: die HSV-*tk*-vermittelte Therapie

Innerhalb der Suizidgentherapien ist das meistverwendete System die HSV-*tk* / GCV Strategie. Das Transgen kodiert für das Enzym Thymidinkinase des HSV I. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Enzym im abgebildeten Plasmid verwendet (Abb. 2, S. 23). Dieses kann nukleosidähnliche Prodrugs in zytotoxische Metaboliten konvertieren (vgl. Kap 2.8 ff). Das System wird in verschiedenen präklinischen Studien erfolgreich überwiegend zur Behandlung von Hirntumoren verwendet, sowie primären und sekundären Lebertumoren, malignen Melanomen, Prostata- oder Ovarialtumoren, aber beispielsweise auch bei Brustkrebs-, Osteosarkom- oder Blasenkrebsmodellen.

Derzeit befassen sich erste klinische Versuche hauptsächlich mit der Suizidgentherapie von Glioblastomen (Klatzmann, 1998 / Shand, 1999 / Trask, 2000 / Rainov, 2000), malignen Melanomen (Singh, 2001 / Klatzmann, 1998 / Morris, 2000), Ovarial- und Prostatakarzinomen (Alvarez, 2000 / Hasenburg 1999 / 2001 / Herman, 1999 / Teh, 2001), malignem Mesotheliom (Stermann, 1998) und auch von Lebermetastasen des kolorektalen Karzinom (Sung, 2001).

Diese Studien an den verschiedensten Tumorerkrankungen unterscheiden sich in der Art des benutzten Vektors, des verwendeten Promotors (Startpunkte auf dem Transgen mit Erkennungs- und Bindungssequenzen für die RNA-Polymerase, in dieser Funktion auch natürlich für jede Transkriptionseinheit der DNA vorkommend), sowie bei den präklinischen

in-vivo Versuchen von der Art der Transfektion (*ex- / in-vivo*) und der Route über welche der Vektor appliziert wird. Durch die Kombination dieser Form der Suizidgentherapie mit Bestrahlung (Kim, 1997) konnte eine gesteigerte Effektivität hinsichtlich der Tumorrogression und eine Überlebenszeitverlängerung der Versuchstiere erreicht werden. In anderen Studien wurde diese Gentherapie mit einer Zytokingentherapie (Caruso, 1996 / Chen, 1995 / Kwong, 1997) kombiniert. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten jedoch nicht unbedingt den eindeutigen Vorteil einer solchen Kombination (Su, 2000). Zudem ist sie nicht geeignet zur Behandlung jeden Tumormodells, wie z.B. Untersuchungen am Blasenkrebsmodell (Freund, 2000) zeigten.

Häufig verwendete Promotoren sind Cytomegalie-Virus- (CMV-), Alphafetoprotein- (AFP-), Rous-Sarkom-Virus- (RSV-), Early-growth-response-gene 1- (Egr 1-), Prostata-Specific-Antigen- (PSA-) oder Carcinoembryonic- (CEA) -Promotoren. Allgemein wird die Anwendung des CMV-Promotors scheinbar favorisiert. Er bewirkt eine wesentlich stärkere zellabtötende Effizienz des Systems (Tong, 1999 / Freund 2000). Der CMV-Promotor scheint jedoch toxischere Effekte im Vergleich zu anderen Promotoren zu haben (Brand 1998 / Gerolami, 2000). Das trifft besonders in Kombination mit den Adenoviren bei der Lebertumorbehandlung zu. *In-vivo*-Versuche zeigen eine Expression des Transgens durch den CMV-Promotor mit dem Gipfel am 2. - 4. Tag, um dann nach spätestens 2 - 4 Wochen wieder den Ausgangswert zu erreichen (Löser, 1998 / Gill 2001). Es scheint dabei eine Abhängigkeit vom verwendeten Vektorsystem, der Transfektionsmethode und der verwendeten Spezies zu bestehen.

Das Vektor-Genkonstrukt wird über verschiedene Routen den Zielzellen zugeführt. Wie bei der Chemotherapie (vgl. Kap. 1.8.3.1 ff.) gibt es zur Transfektion der Lebermalignitäten die Möglichkeiten, systemisch in das Gefäßsystem oder in die Peritonealhöhle zu applizieren. Lokoregionär kann direkt intratumoral oder über die den Tumor versorgenden Gefäße appliziert werden. Für das Lebermetastasenmodell, bzw. das hepatozelluläre Karzinom-Modell werden lokoregionär die Portalvene oder die A. hepatica katheterisiert und mit dem Vektor-Gen-Konstrukt versetzt. Auch eine isolierte Leberperfusion zur Vektoradministration ist beschrieben (de Roos, 1997).

Wie zu ersehen ist, sind die Studien im Versuchsaufbau untereinander verglichen sehr unterschiedlich aufgebaut und deshalb schwer zu bewerten.

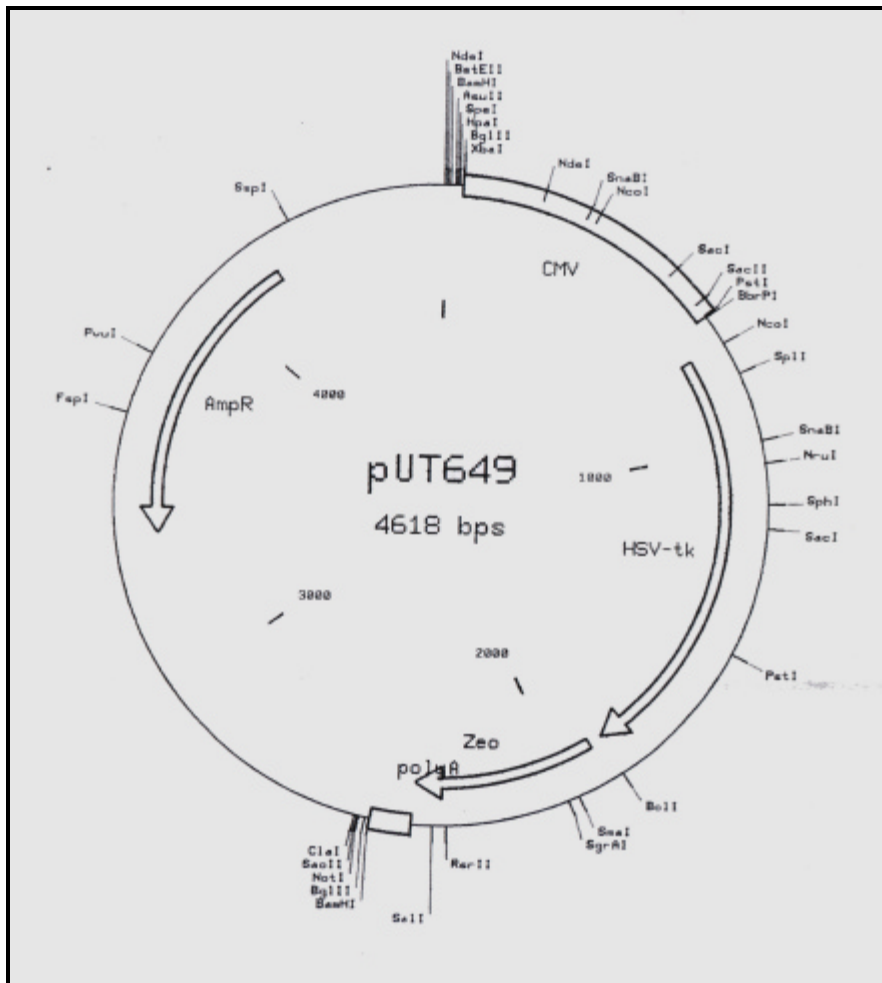


Abb. 2: Schematisierter Aufbau des verwendeten Plasmid pUT649 mit den Thymidinkinase kodierenden Sequenzen, Promotorregion, Antibiotikaresistenz (Produktinformation der Fa. Qiagen)

2.2.4.2 Der Bystander-Effekt

Als Bystandereffekt definiert man den durch den toxischen Metaboliten erzeugten zusätzlichen Therapieeffekt auf nicht transfizierte benachbarte Tumorzellen. Durch den toxischen Metaboliten wird nicht nur die transfizierte Tumorzelle abgetötet, sondern auch eine hohe Zahl umgebender Tumorzellen (vgl. Abb. 3).

Ein zentraler Mechanismus ist hierbei die Passage der zelltoxischen Substanz über Gap Junctions der Zellmembranen. Gap Junctions sind hexametrische Kanalstrukturen, die von der Proteinfamilie der Connexine gebildet werden und die Membranen zweier Zellen verbinden. Für die Passage des GCV, bzw. dessen toxische Metaboliten ist dies die meistakzeptierte Erklärung. Strukturen mit einem Molekulargewicht von ca. < 1000 Daltons können die Connexinkanäle passieren. Connexin-43-Gap junctions sind essentiell für Bystandereffekte (Mc Masters, 1998). Zellen mit einer Überexpression dieses Kanalproteins konnten den Bystandereffekt steigern (Estin, 1999).

Aber auch andere Mechanismen werden als Beitrag zum Bystandereffekt diskutiert: Der Transfer apoptotischer Vesikel zur benachbarten Tumorzelle (Moolten, 1993 / Freeman, 1993), eine lokale oder systemische Immunantwort, wie Versuche mit immunkompetenten und immuninkompetenten Tieren zeigten (Kuryama, 1999). Letzterer ist auch ursächlicher Mechanismus für eine Wachstumshemmung vorliegender „distaler“ Tumore und wird als „distant“ Bystandereffekt bezeichnet (Wilson, 1996 / Kianmanesh, 1997 / Agard, 2001).

Bystander Effekt und Tumorregression wurden *in-vitro* und *in-vivo* bei Vorhandensein von nur etwa 10 % transfizierten Tumorzellen dokumentiert (Freeman, 1993).

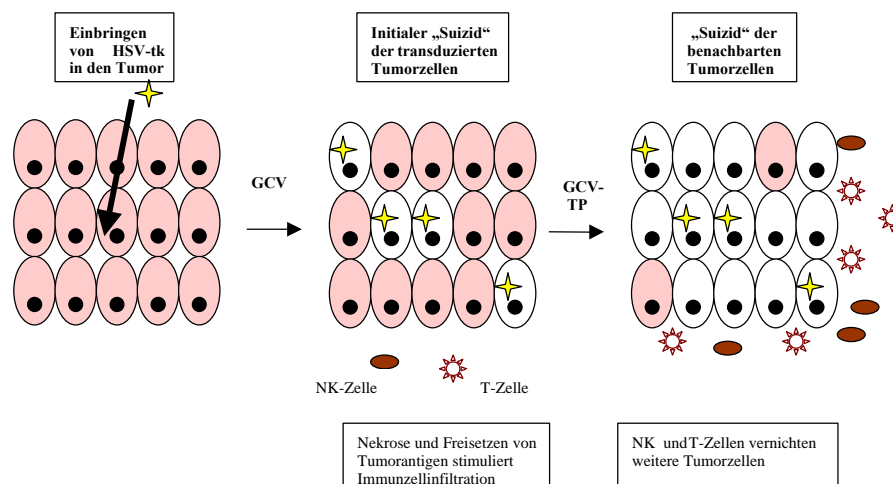


Abb. 3: Prinzip des Bystandereffektes

2.2.4.3 DCES

In der Arbeitsgruppe Drug Targeting am MDC-Berlin wurde eine optimale Kombination im vorangegangenen aufgezeigter bewährter Techniken und Therapeutika zusammen mit der HSV-*tk*-Suizidgentherapie zur Behandlung von Lebermetastasen entwickelt. Dieses therapeutische Mehrkomponentensystem trägt den Namen DCES (Reszka, 2002). Die Bedeutung der Kürzel seien im folgenden kurz erläutert:

- D-Drug:** Ist die therapeutische Komponente. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um das Thymidinkinase-Gen des Herpes-Simplex-Virus I (HSV-*tk*). Das Gen ist liposomal assoziiert und verkapselt.
- C-Carrier:** Sind die Transportvesikel für die therapeutische Komponente. In der vorliegenden Arbeit werden pegylierte multilamelläre (PEG-MLV-) Liposomen verwendet.
- E-Embolisation:** Verwendet wird Spherex[®], das einzig in Deutschland zugelassene Embolisat (vgl. vorangegangenes Kapitel).
- S-System:** Nur die geeignete Kombination der vorstehend genannten Komponenten ermöglicht nach lokoregionärer Applikation die maximale Anreicherung des therapeutischen Gens im Zielgebiet bei minimalen Nebenwirkungen. Das Konzept ist variabel in der therapeutischen Komponente (auch Zytostatikum möglich) und auf verschiedene Zielerkrankungen anwendbar. So wäre diese Therapie auch auf Lungentumore, Glioblastome oder andere Tumore anwendbar, sofern ein ausgeprägtes angiogenetisches Netzwerk vorliegt.

2.2.5 Therapiemonitoring

Für die Optimierung der Gentherapie wäre es hilfreich, die Aktivität des Therapiegens zu beobachten. Ein Behandlungserfolg könnte dadurch frühzeitig abgeschätzt werden. Bei dem HSV-*tk* / Prodrugsystem könnte beispielsweise bei abgelaufener oder ausbleibender Wirkung des Transgens eine Prodrugapplikation beendet werden. Das gilt auch, wenn die Transfektion an einem unerwünschtem Ort auftritt. Derzeit werden neue Verfahren entwickelt, um dies zu ermöglichen. Neben der *Single-photon emission-computed-tomography (SPECT)* erlaubt die *Positron-emissions-tomography (PET)* - gleichfalls ein szintigraphisches nicht-invasives Verfahren - durch höhere Auflösung diesen biologischen Prozess zu verfolgen (Hospers, 2000). Dafür muss dem Transgen, wenn es für ein Enzym kodiert wie in diesem Fall, ein radiomarkiertes Substrat zur Verfügung gestellt werden. Dynamik und Kinetik der HSV-*tk* kann dann im PET mittels radioaktiver Substrate wie zum Beispiel FIAU, Fluoroganciclovir oder FHPG (Tjuvajev, 1998 / Hospers, 2000 / Brust, 2000 / Jacobs, 2001) beobachtet werden.

Ein Ansatz für ein Monitoring über die Magnetresonanztomographie unter Verwendung bildgebender Magnetitpartikel wird derzeit von der Arbeitsgruppe Drug Targeting untersucht. Es handelt sich hierbei um Zellbestandteile, die aus dem Bakterium *Magnetospirillum gryphiswaldense* isoliert werden und in denen hochreines Magnetit angereichert ist.

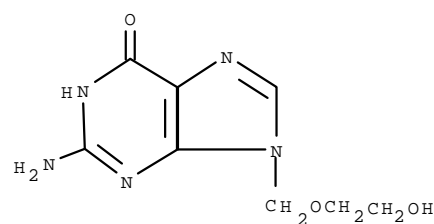
2.2.6 Substrate für die HSV-tk

Derzeit sind verschiedene antivirale Wirkstoffe, speziell Antiherpetika zur systemischen Verabreichung in der klinischen Anwendung: Aciclovir (ACV) oral und i.v., Ganciclovir (GCV) oral und i.v., Valaciclovir (VCV) oral, Fanciclovir oral, Penciciclovir, Cidofovir i.v. und weitere. Den aufgezählten Wirkstoffen ist gemeinsam ihre Abhängigkeit von der viralen Thymidinkinase, um ihre Wirksamkeit entfalten zu können.

Die verschiedenen Wirkstoffe zeigen eine unterschiedlich ausgeprägte Aktivität gegen Herpesviren. Zur Familie der Herpesviren zählen: das Cytomegalivirus (CMV), das Varizella-Zoster-Virus (VZV), das Herpes-Simplex-Virus (HSV) I und II, das Humane-Herpes-Virus (HHV) 6, 7, 8 und das Epstein-Barr-Virus (EBV). Auch die Nebenwirkungen sind unterschiedlich stark ausgeprägt.

2.2.6.1 Aciclovir (ACV)

Aciclovir ist zur systemischen Verabreichung im Handel als i.v. Lösung und oral als Kapsel, Tablette oder Suspension erhältlich. Die chemische Bezeichnung lautet 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)-guanin und die Strukturformel ist wie folgt:



Aciclovir kann in alle Zellen eintreten, wird jedoch durch das Vorhandensein der viralen Thymidinkinase in der herpesinfizierten Zelle zu Aciclovirmonophosphat phosphoryliert (Elion, 1993). Weitere Phosphorylierungen durch zelleigene Thymidinkinase überführen zum Aciclovirtriphosphat. Dieses hemmt kompetitiv die DNS-Polymerase und führt nach Einbau in die DNS zum Kettenabbruch bei der DNS-Synthese (Elongation) und damit zum Zelltod. Von Vorteil für die Behandlung von Herpes-Infektionen ist, dass die virale DNS-Polymerase eine deutlich höhere Affinität und Empfindlichkeit zum Triphosphat gegenüber den zellulären DNS-Polymerasen hat (Elion, 1977). Ein weiterer Vorteil ist, auch hinsichtlich der

Suizidtherapie, dass die Affinität zum Ausgangssubstrat gegenüber der zellulären Thymidinkinase bei der viralen Thymidinkinase wesentlich höher ist. Da Aciclovir auf diesen zwei Ebenen spezifisch und primär auf *virale* Enzyme aktiv ist, sind die Nebenwirkungen gering.

Die Bioverfügbarkeit des oralen Pharmakon liegt bei nur 20 %. Die Plasmahalbwertszeit beträgt ca. 3 h und die Proteinbindung bis 33 %. Das Hauptausscheidungsorgan ist die Niere. Die Konzentration im Liquor entspricht etwa 50 % der des Plasmakonzentrationswertes. Aciclovir wird aufgrund von Tierversuchen als nicht teratogen oder kanzerogen eingestuft.

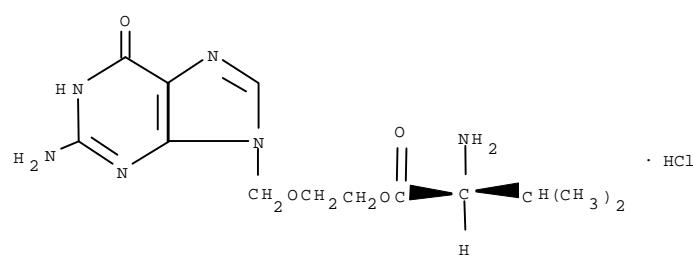
Nach Verabreichungen von Oral-Dosen von 800 mg wurden beim Menschen (im Steady-State) Plasmaspitzenwerte (C_{max}) von 1,61 $\mu\text{g} / \text{ml}$ gemessen. 1 h nach Verabreichung einer Infusion von 15 mg / kg wurden Plasmaspitzenwerte von 23,6 $\mu\text{g} / \text{ml}$ gemessen.

Der genterapeutische Einsatz ist wegen der schlechten Bioverfügbarkeit nur als Infusion möglich und wird von einigen Autoren dem Ganciclovir i.v. vorgezogen (Hasenburg, 1999), da Aciclovir in höheren Dosen besser verträglich ist.

In verschiedenen Studien, bei *in-vitro* und Tiermodellen zum Ovarialkarzinom, (Tong, XW 1998), zum Osteosarkom (Cheon, 1997) und Prostatakarzinommetastasen (Chung, 1997) wurde ACV als Prodrug bereits eingesetzt. An Patienten erfolgte der Einsatz von ACV in der HSV-*tk*-Therapie von Ovarialkarzinomen (Hasenburg, 1999).

2.2.6.2 Valaciclovir (VCV)

Valaciclovir ist ein L-Valylester des Aciclovirs:



Es wird oral angewendet und im Darm bis zu 65 % absorbiert (Burnett, 1994). Leberenzyme - primär verantwortlich ist die VCV-ase - hydrolisieren VCV rasch und fast vollständig zum eigentlichen Agens, dem Aciclovir (Burnette, 1995).

Die Synthese des toxischen Triphosphat und seine Auswirkungen im Körper erfolgen analog zum Aciclovir, wie oben beschrieben.

Durch die Veresterung ist die orale Bioverfügbarkeit bis 8-fach höher gegenüber oralem ACV (Burnette, 1994), sie beträgt bis 54 %. Die Plasmahalbwertszeit beträgt 3 h und die

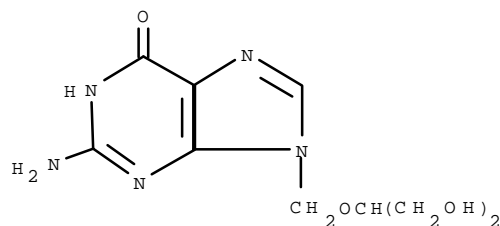
Eiweißbindung liegt bei 9 - 33 %. Die Niere ist das Hauptausscheidungsorgan. Die LD₅₀, an Ratten getestet, beträgt < 5000 mg / kg KG. Die Tiere verstarben eher an den Folgen einer obstruktiven Nephropathie, als an einer akuten Toxizität. Diese Nephropathie trat auch ab Dosen von 150 mg / kg KG über 97 Tage täglich appliziert auf, assoziiert mit dem Steigen der Harnstoff- und Kreatininwerte und einem Gewichtsabfall. Valaciclovir ist als nicht teratogen oder kanzerogen einzustufen.

Nach Applikation von 200 mg / kg KG an Ratten wurden Plasmaspitzenkonzentrationen von 50 µg / ml gemessen. Dagegen wurden am Menschen nach 3-maliger Applikation von 1000 mg Plasmaspitzenwerte von 5 µg / ml ermittelt (Fachinfo Valtrex[®], 2000 / Ormrod, 2000).

In suizidtherapeutischen Phase-I-Studien zu wiederkehrenden Ovarialkarzinomen wurde schon ein erster Einsatz des VCV beschrieben. Patientinnen wurde intraperitoneal mittels Adenoviren das HSV-*tk* appliziert. Nachfolgend erhielt eine Patientengruppe 14 Tage dreimal täglich durchgängig ACV i.v in der Dosierung 15 mg / kg. Eine andere Gruppe wurde nach 5 Tagen auf das orale VCV umgestellt unter der Dosierung 2g dreimal täglich für weitere 14 Tage. Die Serumwerte des Prodrugs waren in beiden Gruppen durchaus vergleichbar und lagen zwischen 2,09 - 2,78 µg / ml. (Hasenburg, 1999).

2.2.6.3 Ganciclovir (GCV)

Das hauptsächliche klinische Anwendungsgebiet des Ganciclovir besteht in der Behandlung der Cytomegalie-Virus bedingten Infektionen. Es ist ebenfalls ein synthetisches Nukleosidanalogen mit der chemischen Bezeichnung 9-(Dihydroxy-2-poxymethyl)-guanin und folgender Struktur:



Ebenso wie beim Aciclovir erfolgt durch die Thymidinkinase eine Phosphorylierung über das Mono- zum Diphosphat und weiter zum Ganciclovirtriphosphat, welches wiederum die Funktion der DNS-Polymerase und Elongation hemmt bzw. die DNS-Synthese abbricht. Die Phosphorylierungsreaktionen spielen sich bevorzugt in herpesinfizierten Zellen ab, da dort die Konzentration der Kinasen erhöht und der Metabolismus des Triphosphats deutlich verlangsamt ist.

Ganciclovir wird hauptsächlich als Tropfinfusion verwendet (100 % Bioverfügbarkeit). Bei oraler Applikation beträgt die Bioverfügbarkeit nur etwa 5 %. Die Plasmahalbwertszeit beträgt wiederum 3 h und die Eiweißbindung ist mit 1 - 2 % gering. Die Ausscheidung erfolgt bei der i.v. Applikation hauptsächlich über die Niere. Die LD₅₀, untersucht als i.v.-Applikation an Mäusen, liegt bei 900 mg / kg KG. Bei dieser Applikationsform traten in verschiedenen Dosen bei verschiedenen Tierarten toxikologische Effekte am Reproduktionssystem, eine erhöhte Embryoletalität sowie teratogene Effekte auf. Ganciclovir ist potentiell karzinogen.

Eine häufige Nebenwirkung unter der Behandlung ist das Auftreten einer Leukopenie, speziell einer Neutropenie. (Bei unter 500 Neutrophilen / μ l sollte keine Behandlung durchgeführt werden oder eine Dosisreduzierung stattfinden). Auch Anämie und Thrombozytopenie als Ausdruck einer Knochenmarkstoxizität sind beschrieben.

Die c_{\max} im Plasma nach einer Infusion (Mensch) wurde mit 8,3 μ g / ml bestimmt. Im Liquor können sich bis zu 67 % der maximalen Plasmakonzentration finden, was in suizidgentherapeutischen Studien an Hirntumoren genutzt wird. Nach täglich dreimaliger Applikation von 1000 mg Ganciclovir betragen die Plasmaspitzenwerte beim Menschen c_{\max} 1,02 μ g / ml.

Ganciclovir ist in der HSV-*tk* vermittelten Suizidgentherapie bisher das Mittel der Wahl. Es wird als das zytotoxischere Agens beschrieben (Kuryama, 1996). Wegen der beschriebenen myelosuppressiven Nebenwirkungen wird jedoch der Einsatz anderer, neuartiger Nukleosidanaloga überprüft (Hasegawa, 2000).