

Aus dem
Institut für Radiologie
Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte
vorgelegt über das
Institut für Veterinär-Anatomie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Evaluierung neuer Verfahren zur lokalen Tumorthherapie am VX2-Modell des Kaninchens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
MELANIE BIEDERMANN
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3632

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Matthias Taupitz
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rabbits, therapy, tumours, catheters, injection, cytotoxic compounds

Tag der Promotion: 08.08.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-370-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Für Stefan

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATUR	4
2.1 Lebertumore	4
2.1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	4
2.1.1.1 Epidemiologie	4
2.1.1.2 Ätiologie.....	5
2.1.1.3 Risikofaktoren für das HCC.....	6
2.1.1.3.1 Hepatitis-B-Virus (HBV)	6
2.1.1.3.2 Hepatitis-C-Virus (HCV)	7
2.1.1.3.3 Alkoholtoxische Leberzirrhose.....	7
2.1.1.3.4 Nicht alkoholische Fettleberhepatitis (NASH)	8
2.1.1.3.5 Aflatoxine.....	9
2.1.1.3.6 Diabetes mellitus	9
2.1.1.3.7 Hämochromatose (genetisch bedingte Eisenspeichererkrankung)	10
2.1.2 Kolorektales Karzinom	10
2.1.3 Lebermetastasen	11
2.2 Bildgebende Diagnostik der Lebertumore	11
2.2.1 Kurze Einführung in die Computertomographie	11
2.2.2 Verwendung von Kontrastmittel im CT: Ultravist 370®.....	12
2.2.3 Größe und Stadieneinteilung der Tumore	13
2.3 Behandlungsmöglichkeiten von Lebertumoren oder -metastasen	14
2.3.1 Systemische Chemotherapien.....	15
2.3.1.1 Chimäre Antikörper gekoppelt mit Radionukliden	15
2.3.1.2 Virotherapie	15
2.3.1.3 Drug Targeting.....	15
2.3.2 Lokale Chemotherapien	16
2.3.2.1 Perkutane Ethanolinjektion (PEI) oder Essigsäure (PAI).....	16
2.3.2.2 Transarterielle Chemoembolisation (TACE).....	17
2.3.3 Lokale Thermotherapien	17
2.3.3.1 Kryotherapie	18
2.3.3.2 Radiofrequenzablation (RFA)	18
2.3.3.3 Laserinduzierte interstitielle Thermotherapie (LiTT)	18
2.3.3.4 Hochfrequenzinduzierte Thermotherapie (HiTT)	19
2.3.3.5 Mikrowellenkoagulation (MWK).....	19
2.3.3.6 Magnetfeld-induzierte Thermotherapie mit magnetischen Flüssigkeiten.....	19

2.3.3.7 Brachytherapie.....	19
2.4 Wirkstoffzubereitungen und Applikationsformen	20
2.4.1 Zugangswege	20
2.4.2 Applikationssysteme und pharmazeutische Zubereitungen für die lokale Tumorthherapie	21
2.4.3 Ballonkatheter.....	21
2.5 Testsubstanzen.....	22
2.5.1 Zytostatikum Paclitaxel (Taxol®)	23
2.5.2 Zytostatikum Mitoxantron	25
2.5.3 Zytostatikum Doxorubicin	26
2.5.4 Zytostatikum Fantolon	27
2.5.5 Zytostatikum Bortezomib (Velcade®)	28
2.5.6 Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU)	29
2.5.7 Antineoplastischer Wirkstoff Arsentrioxid.....	30
2.6 Das Kaninchen als Versuchstier in der Onkologie	32
2.6.1 Anatomie der Kaninchenleber	32
2.6.2 VX2-Tumormodell	32
3 MATERIAL UND METHODEN.....	34
3.1 In vitro Untersuchungen	34
3.1.1 Tumorzellen, Kultivierung, Inkubation.....	34
3.1.2 Populationszählung und Portionierung	34
3.1.3 Getestete antineoplastisch wirkende Substanzen	35
3.1.4 Versuchsaufbau.....	36
3.1.5 Bestimmung der intramitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Medien.....	37
3.1.6 Auswahl der Zubereitungen für die Wirkstoffe.....	38
3.1.7 Beschichtung der Ballone und Bestimmung der Dosis	38
3.1.7.1 Beschreibung des Beschichtungsablaufs	38
3.1.7.2 Herstellung der Beschichtungslösungen	38
3.1.7.3 Auswahl der für die in vivo Versuche geeigneten Testsubstanzen	39
3.1.7.3.1 Herstellung der Beschichtungslösung Paclitaxel.....	39
3.1.7.3.2 Herstellung der Beschichtungslösung Fantolon	39
3.1.7.3.3 Herstellung des Doxorubicin-Gels	39
3.1.7.3.4 Herstellung des Arsentrioxid-Gels	39
3.1.8 Bestimmung der applizierten Dosis	40
3.2 In vivo Untersuchungen.....	40
3.2.1 Versuchstiere und deren Haltung	40
3.2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsplan	41
3.2.3 Operationsvorbereitung.....	41
3.2.4 Operative Durchführung	42

3.2.4.1 Tumoriimplantation	42
3.2.4.2 CT-Untersuchungen.....	44
3.2.4.3 Kontrolle des Tumorwachstums	44
3.2.4.4 Durchführung der Therapie	45
3.2.4.4.1 Therapie mit Paclitaxel, Fantolon und Kontrolle mit Ballonkatheter	45
3.2.4.4.2 Doxorubicin, Arsentrioxid und Kontrolle mit Injektion	46
3.2.5 Tierschutz und Verträglichkeit	46
3.2.6 Euthanasie.....	47
3.2.7 Tumorentnahme.....	47
3.2.7.1 Aufarbeitung der Tumore zur Reimplantation	47
3.2.7.2 Aufarbeitung der Tumore zur Auswertung	48
3.2.7.2.1 TTC-Färbung	48
3.2.7.2.2 Histologie.....	49
3.2.7.2.3 Quantifizierung der Tumorgroße und -vitalität.....	49
3.2.8 Statistische Methoden/Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	50
4 ERGEBNISSE.....	52
4.1 Ergebnisse der in vitro Versuche.....	52
4.1.1 Paclitaxel.....	53
4.1.2 Arsentrioxid.....	56
4.1.3 5-Fluorouracil.....	58
4.1.4 Fantolon.....	61
4.1.5 Bortezomib	63
4.1.6 Doxorubicin.....	65
4.1.7 Mitoxantron.....	68
4.1.8 Kontrolle/DMSO.....	71
4.1.9 Überblick über die Ergebnisse der Zellkulturversuche.....	72
4.1.10 Begründung Auswahl verwendeter Wirkstoffe unter Berücksichtigung der Zellversuche.....	73
4.2 Ergebnisse der in vivo Versuche	74
4.2.1 Beispiele der computertomographischen Untersuchungen	75
4.2.2 Beispiele makroskopische Untersuchung der Tumore ohne/mit TTC-(Vital-)Färbung	76
4.2.2.1 Tumore nach der Präparation aus der Leber	76
4.2.2.2 Tumore nach der Vitalitätsfärbung mit TTC	77
4.2.3 Besonderheiten bei der Therapie mit Doxorubicin.....	79
4.2.4 Beispiele histologischer Untersuchungsergebnisse	79
4.2.5 Beobachtungen bei den Versuchstieren	84
4.2.5.1 Tierschutz und Verträglichkeit	85
4.2.6 Ergebnisse der Wirkstoff-Analysen.....	85
4.2.7 Ergebnisse der Auswertungen der Tumolvolumina.....	87
4.2.8 Vergleich Dosis VX2-Tumor mit systemischer Humandosis	90

4.2.9 Zusammenhang zwischen Tiergewichten und Art der Therapie	90
5 DISKUSSION	93
5.1 Tier- und Tumormodell sowie Wachstums- und Metastasierungsverhalten.....	93
5.2 Zellkultur/Zelllinie	96
5.3 Auswahl der Wirkstoffe.....	97
5.4 Therapie mit Ballonkathetern: Eignung und Anwendbarkeit	97
5.4.1 Anwendbarkeit in der Klinik	100
5.5 Vergleich Dosis VX2-Tumor mit systemischer Humandosis	101
5.6 Bildgebung CT	101
5.7 Histologie, Auswertung Nekrosen.....	102
5.8 Ausblick und Schlussfolgerung	103
6 ZUSAMMENFASSUNG	104
7 SUMMARY	107
8 ANHANG.....	110
8.1 In vitro Zellversuche: Einzelwerte der Extinktionsmessungen.....	110
9 ABKÜRZUNGEN.....	118
10 MEDIKAMENTEN- UND CHEMIKALIENLISTE	120
11 LITERATURVERZEICHNIS	121
12 DANKSAGUNG.....	129
13 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	131

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Strukturformel Iopromid	13
Abb. 2: Ballonkatheter: A: unbeschichtet, deflatiert; B: beschichtet, deflatiert; C: unbeschichtet, expandiert; D: beschichtet, expandiert	21
Abb. 3: Strukturformel Paclitaxel	23
Abb. 4: Strukturformel Mitoxantron	25
Abb. 5: Strukturformel Doxorubicin	26
Abb. 6: Strukturformel Fantolon	27
Abb. 7: Strukturformel Bortezomib.....	28
Abb. 8: Strukturformel 5-Fluorouracil	29
Abb. 9: Strukturformel Arsentrioxid.....	31
Abb. 10: Schema der Belegung der Mikrotiterplatten	36
Abb. 11: Mediane Laparotomie beim Kaninchen in Rückenlage	43
Abb. 12: Zur Implantation vorbereitete Tumorstücke.....	43
Abb. 13: Zur Tumorumplantation verwendeter Trokar	44
Abb. 14: Kontrolltumor, Färbung mit TTC	48
Abb. 15: Tumor nach Behandlung mit Fantolon,	49
Abb. 16: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Paclitaxel auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt	53
Abb. 17: Einfluss der Expositionszeit von Paclitaxel auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt	53
Abb. 18: Exemplarische Darstellung der Formazanbildung am Beispiel von Paclitaxel	55
Abb. 19: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Arsentrioxid auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt	56
Abb. 20: Einfluss der Expositionszeit von Arsentrioxid auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt.....	56
Abb. 21: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von 5-Fluorouracil auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); Messwerte aller Zeitpunkte berücksichtigt	58
Abb. 22: Einfluss der Expositionszeit von 5-Fluorouracil auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); Messwerte aller Konzentrationen berücksichtigt	59
Abb. 23: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Fantolon auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt	61
Abb. 24: Einfluss der Expositionszeit von Fantolon auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt	61

Abb. 25: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Bortezomib auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt	63
Abb. 26: Einfluss der Expositionszeit von Bortezomib auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt	63
Abb. 27: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Doxorubicin auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt	65
Abb. 28: Einfluss der Expositionszeit von Doxorubicin auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt	66
Abb. 29: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Mitoxantron auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt	68
Abb. 30: Einfluss der Expositionszeit von Mitoxantron auf die Zellhemmung; (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt	68
Abb. 31: CT-Untersuchung vor Therapie	75
Abb. 32: CT-Untersuchung nach Therapie	75
Abb. 33: Präparierte VX2-Tumore aus der Kontrollgruppe	76
Abb. 34: Vitalitätsfärbung VX2-Tumore aus der Arsentrioxidgruppe	77
Abb. 35: Tumor Arsentrioxidtherapie nach TTC-Test	77
Abb. 36: Kontrolltumor nach TTC-Färbung	78
Abb. 37: Leberlappen mit VX2-Tumoren nach Therapie mit Doxorubicin	79
Abb. 38: Vitale Leber, Kaninchen, Kontrolle (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)	80
Abb. 39: Vitale Leber, Kaninchen, Kontrolle (40fache Vergrößerung, HE-Färbung)	80
Abb. 40: Tumorrand, VX2-Tumor aus der Leber vom Kaninchen, Behandlung mit Doxorubicin (Übersicht, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung)	81
Abb. 41: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO ₃ , niedrige Dosis (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)	81
Abb. 42: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO ₃ , niedrige Dosis (40fache Vergrößerung, HE-Färbung)	82
Abb. 43: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO ₃ , niedrige Dosis (100fache Vergrößerung, HE-Färbung)	82
Abb. 44: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO ₃ , niedrige Dosis, Injektionskanal (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)	83
Abb. 45: VX2-Tumor, Kaninchen, Injektionskanal mit Bestandteilen von Doxorubicin (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)	84

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Unterschiedliche Inkubationszeiten und Konzentrationen der zu testenden Substanzen in den in vitro Versuchen an VX2-Zellen.....	35
Tab. 2: Einteilung der Tiergruppen nach Wirkstoffen und Behandlungsformen	41
Tab. 3: Zellhemmung Paclitaxel.....	54
Tab. 4: Zellhemmung Arsentrioxid	57
Tab. 5: Zellhemmung 5-Fluorouracil.....	59
Tab. 6: Zellhemmung Fantolon	62
Tab. 7: Zellhemmung Bortezomib.....	64
Tab. 8: Zellhemmung Doxorubicin	66
Tab. 9: Zellhemmung Mitoxantron	69
Tab. 10: Mittelwerte der Zellhemmung aus den in vitro Versuchen	70
Tab. 11: Zellhemmung DMSO	71
Tab. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse in vitro Versuche	72
Tab. 13: Auswertungen an den VX2-Tumoren	74
Tab. 14: Berechnung der in die Tumore eingebrachten Wirkstoffmengen.....	86
Tab. 15: Tumorgößen vor und nach Behandlung mit den ausgewählten Substanzen, Vitalität des Gewebes nach TTC-Färbung.....	89
Tab. 16: Vergleich Dosis Kaninchen/Dosis Mensch.....	90
Tab. 17: Aufstellung der Anfangs- und Endgewichte der Tiere aus dem Versuch	92

1 EINLEITUNG

In Deutschland stehen Tumorerkrankungen nach Herz-Kreislaferkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall an zweiter Stelle der Todesursachen. Jeder vierte Mensch starb im Jahr 2010 an den Folgen von Krebs (Statistisches Bundesamt, 2011). Viele Tumorentitäten führen im Verlauf ihrer Progression zu einer Metastasierung in für die Neoplasien meist charakteristischen, vom Primärtumor entfernten Zielorgane. Je nach Art des Primärtumors und des Metastasierungsweges finden sich häufig Metastasen in der Leber. Lebermetastasen sind z. B. typisch für das Kolon-, Magen-, Pankreas-, Bronchial- und Mammakarzinom. Das kolorektale Karzinom ist die am häufigsten auftretende maligne Erkrankung mit Todesfolge in Deutschland (Statistisches Bundesamt, 2003). Ungefähr 15 bis 20% der Patienten mit kolorektalem Karzinom haben zum Zeitpunkt der primären Diagnose bereits synchrone Lebermetastasen. Metachrone Lebermetastasen treten in 20 bis 50% der Fälle auf. Nach Resektion des Primärtumors entwickeln weitere 40% der Patienten im Verlauf der Erkrankung Lebermetastasen, wobei wiederum bei einem Drittel der Patienten die Leber das einzig betroffene Organ der Metastasierung ist (Weber et al., 2000).

Die chirurgische Resektion der vom Tumor betroffenen Leberareale stellt aufgrund der Langzeitüberlebensrate immer noch den Goldstandard dar (Fong et al., 1999). Allerdings kommen für diese Behandlung nur weniger als 20% der Patienten in Frage. Die Möglichkeit zur Durchführung einer Resektion hängt unter anderem von der Größe und Anzahl der Metastasen sowie deren Verteilung über die Leberlappen, ihre Lagebeziehungen zu Pfortader, Leberarterien und Gallenwegen ab. In 60 bis 70% der Fälle tritt bei den chirurgisch behandelten Patienten ein intra-hepatisches Rezidiv auf, das nur noch sehr selten erneut mit chirurgischen Verfahren behandelt werden kann. Die 5-Jahres-Überlebensrate nach der Resektion von multiplen kolorektalen Lebermetastasen liegt zwischen 23 und 58% (Bangard, 2011).

Bei primär nicht resektablen Lebermetastasen kann durch eine Chemotherapie versucht werden, die Metastasen zu verkleinern und Mikrometastasen zu zerstören. Diese neoadjuvante Therapie wird auch eingesetzt, um anschließend eine Operation zu ermöglichen.

Da die chirurgische Entfernung des Tumors in vielen Fällen nicht möglich und eine systemische Chemo- und/oder Strahlentherapie nicht erfolgversprechend sind, wird an neuartigen, weniger invasiven und bevorzugt lokal wirkenden Tumortherapieverfahren mit möglichst geringer Nebenwirkungsrate gearbeitet. Zu diesen alternativen oder zusätzlichen Therapieverfahren zählen lokale Behandlungen, wie z. B. die interstitielle Thermotherapie mit Radiofrequenz- oder Laserstrahlen, die Kryotherapie, die perkutane Ethanol-Injektion und die

transarterielle Chemotherapie. Jede dieser Therapieformen ist mit einem Risiko von 10 bis 30% für das Auftreten neuer lokaler Metastasen behaftet (Fujiki et al., 2011).

In dieser Arbeit wurden neue Techniken und Wirkstoffe zur lokalen Pharmakotherapie solider Malignome am Kaninchenmodell untersucht und hinsichtlich einer möglichen Anwendung am Menschen bewertet. Als wirksam anerkannte Verfahren könnten entweder als alleinige Behandlung oder zur Verminderung der Rezidivrate in Verbindung mit physikalischen Methoden, z. B. der Thermotherapie eingesetzt werden.

Für eine erste Abschätzung der Wirksamkeit und Verträglichkeit der Behandlung wurden Kaninchen VX2-Tumore in die Leber implantiert. Diese Tumore wurden im Wachstum mit dem bildgebenden Verfahren der Computertomographie detektiert, lokal therapiert und im Verlauf dokumentiert. Der Computertomograph (CT) ist das beste und im Allgemeinen auch am häufigsten vertretene Gerät zur Messung von Leberläsionen (Shanbhogue et al., Shanbhogue et al., 2010). Die Therapie wurde durch Einführen eines mit Arzneimittel beschichteten Ballonkatheters unmittelbar am eröffneten Abdomen in den Tumor oder als Injektion direkt in das Tumorgewebe durchgeführt. Durch eine lokale Verabreichung wurden im Tumor wesentlich höhere Arzneimittelkonzentrationen angenommen als bei systemischer, beispielsweise intravenöser Gabe, ohne dass in entfernten Organen toxische Spiegel erreicht werden. Bei Eignung der Therapie mittels Ballonkatheter müsste an einem minimal-invasiven perkutanen Punktionsverfahren durch die Bauchdecke weitergearbeitet werden.

Die Verabreichung der Substanzen in trockener, fester Form auf den Ballonkathetern wurde gewählt, weil:

- a) dieser Applikationsweg sich bei der Behandlung und Prophylaxe der Restenose nach Dilatation verengter Arterien gut bewährt hat,
- b) Arzneistoffe länger im Tumor verbleiben, wenn sie als Lösung eingebracht werden und nicht sofort mit der Flüssigkeit abfließen,
- c) der Ballon den Wirkstoff nach Expansion über eine größere Fläche im Gewebe verteilt und
- d) die trockenen Substanzen im Tumor wie ein Depot wirken und den Konzentrationspiegel dort über einen gewissen Zeitraum aufrechterhalten

Für diese in vivo Versuche wurden vier Wirkstoffe (Paclitaxel, Fantolon, Doxorubicin und Arsentrioxid) ausgewählt und gegen eine Kontrolle getestet. Die Auswahl erfolgte unter anderem aufgrund der Ergebnisse von Untersuchungen an Zellkulturen. In den in vitro Ver-

suchen wurden noch zusätzlich die Wirkstoffe Mitoxantron, 5-Fluorouracil und Bortezomib überprüft.

Hypothese:

Die im Verlauf dieser Studie im Tiermodell eingesetzte lokale Therapie mit festen Wirkstoffen ist eine gute Ergänzung, wenn nicht sogar Alternative zu thermisch oder chemisch (Ethanol) ablativen Verfahren zur Behandlung von Tumoren und Metastasen in der Leber. In fester Form kann der Wirkstoff länger im Gewebe verbleiben, als die normalerweise eingesetzten flüssigen Wirkstofflösungen. Durch die längere Kontaktzeit von Wirkstoff zum behandelten Gewebe, wird die Wirksamkeit erhöht. Ganz generell umgeht die lokale Applikation die Nebenwirkungen systemischer Chemotherapien.

Ziel:

Die Zielsetzung in diesem Projekt ist die Untersuchung eines lokalen Therapieverfahrens zur Bekämpfung von Lebertumoren/-metastasen, welches entweder als neoadjuvante, adjuvante oder ausschließliche Behandlung angewendet werden kann.

Es soll geprüft werden, inwieweit die Substanzen im geplanten Versuch in ihrer verwendeten nicht-flüssigen Form einen Einfluss auf das Tumorwachstum ausüben. Überwacht werden soll dies mittels regelmäßiger computertomographischer Betrachtungen sowie verschiedener Untersuchungen am ex vivo Tumor.

2 LITERATUR

2.1 Lebertumore

Die häufigsten einer lokalen Therapie zugänglichen Tumore finden sich in der Leber. Es sind Hepatozelluläre Karzinome und Metastasen verschiedener Primärtumore mit Ursprung in Magen, Darm oder Pankreas.

2.1.1 Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

2.1.1.1 Epidemiologie

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist der häufigste Primärtumor der Leber. Mit steigender Inzidenz steht es weltweit an Platz fünf der häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen (Abou-Alfa and Venook, 2008, Ruzzenente et al., 2011) und an dritter Stelle der tumorbedingten Todesfälle (WHO, Ruzzenente et al., 2011). Die jährlich erwartete Inzidenz liegt weltweit bei 500.000 bis 1.000.000 mit bis zu 600.000 Todesfällen (Sherman, 2005, Parkin et al., 2005, Fujiki et al., 2011). Interessanterweise gibt es große Unterschiede zwischen den einzelnen Ländern. So treten die meisten Erkrankungen in Asien und im westlichen Afrika auf (Montalto et al., 2002). Die geringste Inzidenz ist in den USA, Kanada und den skandinavischen Ländern zu verzeichnen. Deutschland liegt zusammen mit Frankreich und England mit 5 bis 10 Fällen/100.000 im Mittelfeld (Bosch et al., 2004). Wenn auch langsam, so steigt die Inzidenz in den westlichen Industrieländern an. Innerhalb der letzten beiden Jahrzehnte ist die jährliche Inzidenz in den USA um 80% angestiegen. Insgesamt sind Männer häufiger betroffen als Frauen, wobei Afroamerikaner eine höhere Inzidenz aufwiesen als kaukasische Amerikaner. Dies scheint seine Ursache einerseits im zeitgleichen Auftreten von Hepatitis C in dieser Zeit zu haben wie andererseits der Anstieg an Immigranten aus Hepatitis B Virus-endemischen Ländern. Dieser Trend ist auch in anderen westlichen Industrieländern zu verzeichnen (El-Serag und Mason, 1999, Di Bisceglie, 2002). Die geographische Variabilität der Inzidenz des HCCs wird mit dem natürlichen Vorkommen und dessen Veränderungen des Hepatitis B und C Virus in Verbindung gebracht (Liu und Kao, 2007).

Die Inzidenz des HCCs steigt weiterhin mit dem Alter an, wobei es die höchste Prävalenz bei über 65-jährigen aufzeigt (El-Serag und Mason, 1999, Parikh und Hyman, 2007). Obwohl das HCC in Nordamerika und im westlichen Europa selten bei unter 50-jährigen auftritt, konnte innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte durchaus eine Zunahme der Inzidenz bei

jüngeren Personen beobachtet werden. Hierbei scheint das HCC in über 90% der Fälle mit Hintergrund der Leberzirrhose aufzutreten (Montalto et al., 2002, Okuda, 2000). Dieser Hauptrisikofaktor der Leberzirrhose ist weltweit auf chronische Hepatitis-B und -C-Virus-erkrankungen zurückzuführen. Außerdem spielen Lebensweise, Gesundheitsvorsorge und genetische Veranlagungen eine Rolle wie sich am Beispiel der hispanischen Bevölkerung in den Vereinigten Staaten erkennen lässt (Carrion et al., 2011).

2.1.1.2 Ätiologie

Eine Vielzahl von genetischen Veränderungen führen zur Entwicklung eines HCC. Diese genetischen Veränderungen können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Die erste Gruppe beinhaltet alle Veränderungen im Zusammenhang mit den Risikofaktoren des HCCs. Diese sind z. B. Integration von Hepatitis-B-Virus-DNA (Paterlini-Brechot et al., 2003), R249S-Tumorsuppressorgen-*p53*-Mutation in Aflatoxin-B1-exponierten Patienten (Smela et al., 2001), *KRAS*-Mutationen aufgrund von Vinylchlorid-Exposition (Weihrauch et al., 2001) und Hepatocyte-Nuclear-Factor-1 α -(*HNF1 α*)-Mutationen in Verbindung mit hepatozellulären Adenomen und dem Tumorsuppressorgen adenomatosis-polyposis-coli-(*APC*)-Mutationen, die prädisponierend für Hepatoblastome sind (Bluteau et al., 2002).

Die zweite Gruppe von genetischen Veränderungen sind ätiologisch unspezifischer Herkunft wie Chromosomenveränderungen in folgenden für die Proliferation relevanten Genen: Veränderungen des Tumorsuppressorgens *p53* (Hollstein et al., 1991, Feitelson et al., 1993), Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs durch *CTNNB1*/ β -Catenin und *AXIN* (axis-inhibiting-protein)-Mutation. Inaktivierung des Retinoblastom- und *IGF2R* (insulin-like-growth-factor-2-receptor)-Signalwegs durch die Inaktivierung von *RB1* (Retinoblastom 1), *P16* und *IGF2R* (Laurent-Puig et al., 2001).

Umfangreiche Studien lassen in Abhängigkeit von Vorliegen oder Abwesenheit chromosomaler Instabilität auf zwei unterschiedliche Signalwege bezüglich der Genese des HCCs schließen. Das Hepatitis-B-Virus (HBV) sowie schlecht differenzierte Tumore werden in Zusammenhang gebracht mit chromosomal instabilen Tumoren, verbunden mit häufigen *p53*-Mutationen. Im Gegensatz dazu stehen dagegen nicht HBV-induzierte und gut differenzierte Tumore im Zusammenhang mit chromosomal stabilen Tumoren, die häufig β -Catenin-aktiviert sind (Laurent-Puig et al., 2001).

2.1.1.3 Risikofaktoren für das HCC

Auch wenn einem Viertel aller in den USA diagnostizierten Fälle eines HCCs keinerlei prädisponierende Faktoren zu Grunde liegen, so sind doch die bekannten Hauptrisikofaktoren viraler (chronische Hepatitis B und C) (Alacacioglu et al., 2008, Petry et al., 1997), toxischer (Alkohol und Aflatoxine), metabolischer (Diabetes mellitus und nicht alkoholische Leberverfettung) und immunologischer (primär biliäre Zirrhose und autoimmune Hepatitis) Ursache (Parikh und Hyman, 2007). Grundsätzlich ist unabhängig von der Ätiologie jede Leberzirrhose als Präkanzerose anzusehen (Persson et al., 2012).

Damit wird deutlich, dass sich das HCC sekundär aus folgenden Krankheiten entwickeln kann:

2.1.1.3.1 Hepatitis-B-Virus (HBV)

Die Übertragung des Hepatitis-B-Virus erfolgt parenteral und coital, d. h. durch Blut oder andere Körperflüssigkeiten eines infizierten, Hepatitis-B-surface-antigen-positiven Patienten. Dies ist der wichtigste Parameter für den Nachweis einer Hepatitis-B-Infektion. In Endemiegebieten ist der wichtigste Übertragungsweg die vertikale Infektion von einer HBsAg-positiven Mutter während der Geburt. Diese perinatale Infektion hat zu 90% eine chronische Infektion des Kindes zur Folge.

Die Hepatitis-B-Infektion ist eine Infektionskrankheit der Leber mit dem Hepatitis-B-Virus, die häufig akut (90%), gelegentlich aber auch chronisch verlaufen kann. Aus einer chronischen Hepatitis-B-Infektion kann eine Leberzirrhose mit nachfolgendem Leberkarzinom entstehen.

Wie auch bei anderen bösartigen Tumoren, ist die Entstehung des HCCs ein mehrstufiger Prozess, der verschiedene genetische Veränderungen beinhaltet und letztlich durch direkte und indirekte Stoffwechselwege zur malignen Transformation der Leberzelle, des Hepatozyten führt. Anhaltende Hepatozytenschädigung und Regeneration bis hin zur Zirrhose führen zu einem erhöhten Zellumsatz und demzufolge zu einer Erhöhung von kritischen Mutationen im Wirtsorganismus. Dies kann sowohl zu chromosomalen Aberrationen führen wie auch zur Aktivierung zellulärer Onkogene oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. In HBV-induzierten HCC-Fällen finden sich chromosomale Abweichungen häufiger als bei Patienten, die ein HCC aufgrund anderer Risikofaktoren entwickeln (Marchio et al., 2000, Laurent-Puig et al., 2001). Weiterhin müssen bei diesem onkogenen Virus Mechanismen bedacht werden, die eine Rolle bei der Integration der Virus-DNA in das Wirtszellgenom

spielen. So finden sich die integrierten Fragmente häufig in Genen der Zellsignal- oder Wachstumskontrolle (But et al., 2008).

Gegen Hepatitis B kann eine prophylaktische Impfung durchgeführt werden. Daher wird generell davon ausgegangen, dass die Folgen der chronischen HBV-Infektion aufgrund der seit den 80er Jahren zunehmenden Immunisierung abnehmen werden (Margolis, 1998, Kane, 1995). Die Impfung wird bei Hochrisikopopulationen wie Beschäftigten im Gesundheitswesen, immunsuppressiven Patienten, Patienten mit chronischer Lebererkrankung, Patienten mit regelmäßiger Bluttransfusion oder Hämodialyse und Neonaten von HBV-positiven Müttern empfohlen.

2.1.1.3.2 Hepatitis-C-Virus (HCV)

Die Übertragung des Hepatitis-C-Virus erfolgt parenteral über das Blut. Im Gegensatz zur Hepatitis-B-Infektion wird das HCV nur äußerst selten coital übertragen und das Risiko der vertikalen Übertragung während der Geburt liegt bei einer normalen Entbindung unter 5%.

Die Hepatitis-C-Infektion ist eine durch das Hepatitis-C-Virus verursachte Infektionskrankheit und bis zu 80% der HCV-Patienten gelingt es nicht, das Virus zu eliminieren, sie müssen dadurch mit einer chronischen HCV-Infektion leben (Suruki et al., 2006, Gruner et al., 2000). Das HCV ist der wichtigste Risikofaktor für das HCC in Westeuropa und in den Nordamerikanischen Ländern. Das Risiko an HCC infolge einer HCV-Infektion zu erkranken ist 17 Mal höher als bei HCV-negativen Patienten (Donato et al., 2002). Epidemiologischen Studien zufolge weisen HCC-Patienten bis zu 70% HCV-Antikörper im Serum auf (Nishioka et al., 1991, Bruix et al., 1989, Colombo et al., 1989). Das HCV ist nicht in der Lage sein Genom in das der Wirtszelle zu integrieren. Das HCC wird mittels indirekter Mechanismen induziert. Chronische Hepatitis mit fortwährender Entzündung und Hepatozytendegeneration mit folgender Entwicklung einer Leberzirrhose führt zu chromosomaler Schädigung und möglicherweise zur Initiierung der hepatischen Kanzerogenese (Ahn und Flamm, 2004). So findet sich z. B. das HCV-induzierte HCC fast ausschließlich in Zirrhosepatienten. Gegen Hepatitis C ist keine Impfprophylaxe möglich.

2.1.1.3.3 Alkoholtoxische Leberzirrhose

Durch Alkoholabusus kommt es zur Entwicklung einer Fettleber, aus der sich wiederum über die alkoholische Fettleberhepatitis eine alkoholische Leberzirrhose entwickeln kann. Die

Zirrhose birgt ein hohes onkogenes Potential, in Süddeutschland wird dieses mit 58% angegeben (Kirchner et al., 2010, Donato et al., 2002). Von besonderer Bedeutung ist dies speziell in Ländern wie Deutschland, weil dort HCV-Infektionen nicht die Hauptursache für die Entstehung des HCC sind (Kubicka et al., 2000). Die Ursache der Zirrhose ist die Nekrose von Leberzellen, verursacht durch Alkohol, aber auch durch Viren oder Gifte. Dabei werden Botenstoffe, wie z. B. Zytokine freigesetzt, die einerseits Makrophagen (v.-Kupffer-Zellen) und für die Fibrose verantwortliche Ito-Zellen aus der Leber freisetzen. Monozyten und Granulozyten werden aus dem Blut aktiviert (Heinzeller und Büsing, 2001, Hirner und Weise, 2004). Hierdurch kommt es zu Parenchym-Nekrosen, Herausbildung von Regeneratknotten (Pseudolobuli) und Bindegewebsstraßen infolge des destruktiven Umbaus der Organstruktur. Im Frühstadium der Erkrankung nimmt die Leber an Größe zu (Hepatomegalie), bekommt eine unregelmäßig-höckerige Struktur und verkleinert sich mit zunehmendem Krankheitsverlauf. Daraus resultiert eine Verschlechterung des Blutflusses durch die Leber, welcher einen Blutstau vor der Leber und in der Milz nach sich zieht. Durch die Ausbildung von venösen Umgehungskreisläufen entstehen Varizen bevorzugt im Magen und der Speiseröhre, als auch in der Bauchhaut. Platzen diese Varizen auf, so kann es zu lebensbedrohlichen inneren Blutungen führen. Diese Blutungen werden zusätzlich durch eine herabgesetzte Blutgerinnung verstärkt, da die Hepatomegalie zu einem gesteigerten Abbau der an der Blutgerinnung beteiligten Thrombozyten führt. Durch den strukturellen Umbau des Lebergewebes kommt es zu Funktionsstörungen des Organs. Die Proteinproduktion der Leber nimmt ab und sie muss aus diesem Grund auf körpereigene Proteine zurückgreifen. Dies führt durch den Verlust von Muskelmasse zu einer Muskeldystrophie. Dazu kommt Aszites durch Wassereinlagerungen in Bauch und Beinen (Messmann, 2012).

2.1.1.3.4 Nicht alkoholische Fettleberhepatitis (NASH)

NASH kann sich als Komplikation aus einer Steatosis hepatis entwickeln und erzeugt das gleiche Erscheinungsbild wie die alkoholtoxische Hepatitis, ohne dass ein erhöhter Alkoholkonsum besteht.

Die Ursachen für eine NASH sind vielfältig, unter anderem handelt es sich dabei um erworbene Stoffwechselstörungen (z. B. Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Hyperlipoproteinämie, Hunger), angeborene Stoffwechselstörungen (z. B. Tyosinämie, Morbus Wilson), Zustand nach chirurgischen Eingriffen (z. B. Adipositaschirurgie, Kurzdarmsyndrom), Medikamenten/Giften (z. B. Steroide, Tamoxifen, synthetische Östrogene, Farben, Lacke) und andere, wie z. B. jejunale Divertikulose mit bakteriellem Überwachstum (Nakade et al., 2012, Tuyama und Chang, 2012). Nach einer Verfettung der Leberzellen kommt es über komplexe Mechanismen zu einer chronischen Entzündung im Lebergewebe. Die Folge

ist zunächst das Absterben von Leberzellen. Langfristig führt diese zur Entstehung von Bindegewebe, woraus sich im fortgeschrittenen Stadium eine Leberzirrhose bilden kann (Trauner, 2006). Diese Zirrhose birgt ein hohes Potential für die Entstehung von Leberkarzinomen.

2.1.1.3.5 Aflatoxine

Schimmelpilzgifte werden vom Menschen durch die Nahrung aufgenommen. Aflatoxine kommen oftmals in Getreide und Nüssen vor. Wenn diese Bestandteil von Tierfutter sind, kann der Mensch sie jedoch auch über den Konsum von Kuhmilch oder Rindfleisch aufnehmen, da Aflatoxine im Tierkörper nicht unschädlich gemacht werden. Man unterscheidet über 20 natürlich vorkommende Aflatoxine, wovon das Aflatoxin B₁ (AFB₁) als das für den Menschen am gefährlichsten gilt. Bereits Mengen um 10 µg/kg Körpergewicht haben akut lebertoxische Wirkung, wirken jedoch auch bei geringeren Mengen, vor allem bei wiederholter Aufnahme, karzinogen. Allerdings bilden sich Aflatoxine bevorzugt in Gebieten mit feuchtwarmem Klima, so dass Afrika, Süd-Amerika und Süd-Ost-Asien hauptsächlich betroffen sind. Es wird vermutet, dass hohe AFB₁-Aufnahmen bei HBV-infizierten Patienten zu einem erhöhten Risikofaktor bei der Entwicklung eines HCCs führen (Groopman et al., 1996, Liu et al., 2005). So konnte beobachtet werden, dass Gegenden mit einer hohen Prävalenz von HCC und hoher AFB₁-Aufnahme mit den endemischen HBV-Gebieten korrelieren und Patienten mit hoher HBV- und AFB₁-Exposition das höchste Risiko aufweisen am HCC zu erkranken (Montalto et al., 2002, Groopman et al., 1996). Es wird vermutet, dass AFB₁ aufgrund einer spezifischen Mutation auf Codon 249 des Tumorsuppressorgens *p53* zum HCC führen kann (Bressac et al., 1991). Diese Mutation wurde auch bei Patienten mit vorangegangenem HBV-Kontakt gefunden (Montalto et al., 2002, Yu et al., 2005). In Europa spielt AFB₁ jedoch eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung des Leberkarzinoms.

2.1.1.3.6 Diabetes mellitus

Es ist nachgewiesen, dass Diabetes mellitus ein unabhängiger Risikofaktor für das HCC ist (Wideroff et al., 1997). Eine amerikanische Studie zeigte auf, dass ein 2 bis 3 Mal höheres Risiko besteht an einem HCC zu erkranken, wenn Diabetes mellitus vorliegt. (Davila et al., 2005). Es stellte sich jedoch auch heraus, dass das Vorhandensein weiterer Risikofaktoren neben dem Diabetes mellitus die Wahrscheinlichkeit einer HCC-Erkrankung zusätzlich erhöht. So besteht ein 4 Mal höheres Risiko von Diabetespatienten an HCC zu erkranken,

wenn eine Hepatitis, Zirrhose und Alkoholismus vorliegen (Adami et al., 1996). Auch Übergewicht und Diabetes mellitus bei HCV-Patienten oder Patienten mit alkoholbedingter Leberzirrhose führen zu einem erhöhten Risiko einer HCC-Erkrankung (N'Kontchou et al., 2006). In einer taiwanesischen Studie stellte sich sogar ein 100-fach höheres Risiko für das HCC bei HBV- oder HCV-Patienten mit Übergewicht und Diabetes mellitus heraus (Chen et al., 2008).

2.1.1.3.7 Hämochromatose (genetisch bedingte Eisenspeichererkrankung)

Aufgrund eines autosomal-rezessiv vererbten Gendefektes reichert sich nach einer erhöhten Eisenaufnahme aus dem Darm vermehrt Eisen in der Leber an. Daraus kann eine Hepatitis und Leberzirrhose entstehen, wodurch die Gefahr für ein daraus resultierendes HCC gegeben ist (Edison et al., 2008).

2.1.2 Kolorektales Karzinom

Das kolorektale Karzinom ist bei den Krebsarten die zweithäufigste Todesursache in Deutschland bei Männern und Frauen. Mit einer Inzidenz von 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr gehört es zu den häufigsten Tumorerkrankungen. Etwa 29.000 der Erkrankten sterben daran. Es ist nur durch die totale chirurgische Resektion heilbar (Halle und Schoenberg, 2009).

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen mit 85% durch somatische Mutationen, 10% sind hereditären Ursprungs und 5% entstehen durch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Weitz et al., 2004).

Häufig wird die Krankheit erst im metastasierten Stadium oder durch fortgeschrittene klinische Symptome wie dem Ileus erkannt. Ursache dafür ist unter anderem ein initial langsames Tumorwachstum, welches zu einer langen Latenzzeit bis zur Entwicklung klinischer Symptome führt. Aus dem kolorektalen Karzinom entsteht in vielen Fällen ein HCC (Jin et al., 2012).

Ein tumorbegünstigender Faktor ist die Ernährung: Eine ballaststoffarme und fettreiche, fleischlastige Ernährung begünstigen die Entstehung von Kolonkarzinomen. Positiv wirken sich dagegen der Verzehr von Fisch, Getreide und Gemüse aus. Weitere Negativ-Faktoren sind Bewegungsmangel, Übergewicht und Nikotin (Odegaard et al., 2011).

2.1.3 Lebermetastasen

Lebermetastasen entstehen hauptsächlich durch eine hämatogene Metastasierung aus dem kolorektalen Karzinom (Jin et al., 2012).

Durch eine Entdifferenzierung der Tumorzelle wird die Metastasierung des Primärtumors möglich. Ein geringer Anteil von Zellen löst sich aus dem Tumorzellverband und gelangt über den Pfortaderkreislauf zuerst in die Leber. Dadurch bilden sich Fernmetastasen im Lebergewebe. Von der Leber aus können sich die Tumorzellen über die Lebervenen in die Vena cava inferior und dann bis zur Lunge ausbreiten. Beim Kolonkarzinom kann der Tumor auch auf lymphogenem Wege metastasieren (regionäre Metastasen). Die Lymphknotenmetastasen treten hierbei entlang des Verlaufs der Arterien auf.

Lebermetastasen führen zu einer Verschlechterung der Prognose und reduzieren die Heilungschancen erheblich (Vogl et al., 2002).

2.2 Bildgebende Diagnostik der Lebertumore

2.2.1 Kurze Einführung in die Computertomographie

Sir Godfrey Newbold Hounsfield, der Erfinder des Computertomographen und englische Ingenieur, gewann 1979 gemeinsam mit dem amerikanischen Physiker Allan M. Cormack den „Nobelpreis für Physiologie oder Medizin“ und wurde für seine Erfindung sogar 1981 von der englischen Königin zum Ritter geschlagen (Nicoletti et al., 2007). Hounsfield setzte die theoretischen Grundlagen zur Computertomographie von Cormack praktisch um und entwickelte den ersten Computertomographen (Hall, 1997). 1971 erstellte Hounsfield damit die ersten klinischen CT-Bilder, die bei der Untersuchung des Schädels einer Frau eine Zyste im Gehirn erkennen ließen. Bereits 1977 brachte die Firma Siemens den ersten Ganzkörper-CT unter dem Namen „Somatom 1“ heraus, also einem Vorläufer des für dieses Projekt verwendeten Gerätes (Wieczorek, 2004).

Die Computertomographie stellt eine Kombination aus Computertechnik und Röntgen dar. Dabei entstehen Querschnittbilder des Körpers. Die Röntgenröhre (Gantry) rotiert kontinuierlich um den auf dem Aufnahmetisch liegenden Patienten und sendet dabei fächerförmig Röntgenstrahlen aus, die durch den Körper hindurch gehen, je nach Röntgendichte des Körpers abgeschwächt und vom gegenüberliegenden Detektor aufgefangen werden. Diese Strahlen werden in elektrische Signale umgewandelt. Damit wird ermittelt, wie stark die

Röntgenstrahlen beim Durchtritt durch das Gewebe an Intensität verlieren (Alkadhi et al., 2011).

Da die durchleuchteten Gewebe verschiedene Dichten aufweisen, wird die Strahlung unterschiedlich absorbiert. Dieser Dichte-Wert wird in Hounsfield-Einheiten (HE) berechnet. Der Dichte-Wert von Wasser wird = null gesetzt, der Dichtewert von Luft = - 1000, von Fett = - 100 und Knochen = 500 bis 1500 HE. Je höher die Werte sind, desto heller/weißer stellen sie sich in der Aufnahme dar (Nicoletti et al., 2007).

Spiral-Computertomographen haben den Vorteil, dass der Patient kontinuierlich und in kurzer Zeit untersucht werden kann, indem sich der Tisch mit dem Patienten in Längsrichtung gegenüber der Röntgenröhre und den Detektoren bewegt. Eine weitere Verkürzung der Meßzeit bieten die Mehrzeilen-Spiral-Computertomographen, da nicht nur eine sondern mehrere Detektorreihen nebeneinander liegen, welche gleichzeitig mehrere Schichten messen (Alkadhi et al., 2011).

2.2.2 Verwendung von Kontrastmittel im CT: Ultravist 370[®]

Ultravist (1,3-Benzenedicarboxamide, N, N'-bis ((2, 3-dihydroxypropyl)-2, 4, 6-triiodo-5-[(methoxyacetyl)amino]-N-methyl-lopromide) ist ein nichtionisches, wasserlösliches, farbloses jodiertes Röntgenkontrastmittel, welches für die intravenöse Applikation vorgesehen ist. Das darin enthaltene kontrastgebende Jod ist kovalent an ein Derivat der trijodierten Isophthalsäure gebunden und absorbiert die darauf treffenden Röntgenstrahlen. Es verstärkt die Kontraste bei der Computertomographie durch eine, besonders kurz nach der Injektion beobachtbare ungleichmäßige Verteilung. Das Kontrastmittel fließt zunächst über die Arterien in die gut durchblutete gesunde Leber ein und erreicht erst später das Tumorgewebe bzw. nekrotische Gewebe. Ein Perfusionsdefekt hebt sich dunkel vor dem hellen Lebergewebe ab (s. Abb. 31 und Abb. 32, CT-Aufnahmen). Vitales Tumorgewebe ist allerdings nicht eindeutig von abgestorbenem krankem Tumorgewebe zu unterscheiden. Zu späteren Zeitpunkten gelangt das Kontrastmittel in das kranke bzw. nekrotische Gewebe während die Kontrastmittelkonzentration im gesunden Lebergewebe gleichzeitig abnimmt, so dass der Kontrast verschwindet.

In einem Milliliter Ultravist 370[®] (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) befinden sich laut Herstellerangabe 770 mg Iopromid entsprechend 370 mg Jod.

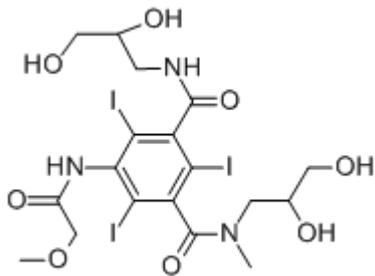


Abb. 1: Strukturformel Iopromid

2.2.3 Größe und Stadieneinteilung der Tumore

Die Einteilung der Tumore in festgelegte Stadien, auch „Staging“ genannt, ist sehr hilfreich für die Planung in der Tumor-Therapie und die Prognose. Durch das Staging wird der Krankheitsverlauf kontrollier- und vergleichbar.

Die Veränderung der Tumorgöße ist ein relativ einfach zu beurteilendes Kriterium für das Ansprechen auf die Therapie. Allerdings kann der Tumor trotz konstanter Größe auf die Therapie angesprochen haben, indem das Wachstum gehemmt wird oder das Tumorgewebe abstirbt. Hinweise darauf kann die histologische Bewertung geben.

Einteilung des hepatozellulären Karzinoms nach der TNM-Klassifikation (Tannapfel und C., 2003):

T-Primärtumor:

- TX Primärtumor nicht beurteilbar
- T0 keine Anzeichen für Primärtumor
- T1 solitärer Tumor, ohne Gefäßinvasion
- T2 solitärer Tumor mit Gefäßinvasion oder multiplen Tumoren, keiner mehr als 5 cm in größter Ausdehnung
- T3 multiple Tumoren mit mehr als 5 cm in größter Ausdehnung oder Tumoren mit Befall eines größeren Asts der Vena portae oder der Venae hepaticae
- T4 Tumor(en) mit direkter Invasion von Nachbarorganen ausgenommen Gallenblase oder Tumor(en) mit Perforation des visceralen Peritoneums

N-regionäre Lymphknoten:

- NX regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 regionäre Lymphknotenmetastasen

M-Fernmetastasen:

- MX das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
M0 keine Fernmetastasen
M1 Fernmetastasen

Nach Begutachtung des Patienten und Entscheidung der Einteilung dieser drei Komponenten kann eine Eingruppierung in ein klinisches Krankheitsstadium vorgenommen werden:

Stadiengruppierung:

Stadium I	T1, N0, M0
Stadium II	T2, N0, M0
Stadium IIIA	T3, N0, M0
Stadium IIIB	T4, N0, M0
Stadium IIIC	jedes T, N1, M0
Stadium IV	jedes T, jedes N, M1

2.3 Behandlungsmöglichkeiten von Lebertumoren oder -metastasen

Der Goldstandard in der Therapie maligner Lebertumore, auch des HCC, ist die Leberteileresektion (Makuuchi et al., 2008, Brouquet et al., 2011). Diese Methode ist jedoch nur bei 15 bis 30% der Betroffenen durchführbar. Häufig spricht ein zu weit fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung dagegen. Eine Resektion ist bei generalisierter Metastasierung und bei Zirrhosen der Leber ausgeschlossen. Bei einigen Patienten wird vor der Leberteileresektion die Portalvene des zu entfernenden Leberlappens verschlossen und dadurch dem verbleibenden Leberanteil ein verstärkter Blutfluss zugeführt, wodurch die Leber zum Wachstum angeregt wird (Hypertrophie). Die 5-Jahres-Überlebensrate nach einer Leberteileresektion wird mit bis zu 71% benannt (Brouquet et al., 2011). Im Falle eines Rezidivs kann in einigen Fällen eine Re-Resektion oder eine adjuvante Therapie durchgeführt werden.

Bei der Lebertransplantation wird aus Mangel an Spenderorganen häufig die Lebendspende praktiziert. Diese hat den Vorteil, dass die Operation geplant werden kann, der Empfänger nicht lange auf ein Organ warten muss und deshalb in einem gesundheitlich stabileren Zustand transplantiert werden kann. Die Leber des Spenders kann sich innerhalb einiger Monate wieder auf die ursprüngliche Größe regenerieren (Lang, 2001).

Eine Transplantation eines gesunden Organs empfiehlt sich, wenn die gesamte Leber so stark durch den Tumor und Zirrhosen geschädigt ist, dass eine Teilresektion nicht durchführbar ist.

2.3.1 Systemische Chemotherapien

Bei der intravenösen Verabreichung von Chemotherapeutika wird der gesamte Organismus mit dem Medikament versorgt. Im Gegensatz zur lokalen Chemotherapie gelangen die Wirkstoffe nicht nur in die vom Tumor befallenen Regionen, sondern belasten auch gesunde Organe. Allerdings bietet die systemische Chemotherapie den Vorteil, dass bei systemischen Tumorerkrankungen (z. B. Leukämien, malignen Lymphomen) oder einer weiten Ausbreitung von Metastasen alle betroffenen Areale erreicht werden können. In der Regel wird diese Therapieform in mehreren Intervallen durchgeführt, wobei sich Behandlungsphasen und Behandlungspausen, in denen sich der Patient erholen kann, miteinander abwechseln. Häufig werden auch mit einer systemischen Chemotherapie nach einer Leberteilresektion gute Ergebnisse erreicht (Brouquet et al., 2011).

2.3.1.1 Chimäre Antikörper gekoppelt mit Radionukliden

Durch die Verbindung monoklonaler Antikörper mit toxischen Stoffen, wie z. B. Radionukliden sollen die zellzerstörenden Substanzen bevorzugt zu den malignen Zielzellen im Körper transportiert werden (Brockmann, 2006).

2.3.1.2 Virotherapie

Bestimmte Viren, meist genetisch manipulierte Adenoviren, replizieren sich vorwiegend in Tumorzellen, so dass gesunde Zellen nicht befallen werden. Adenoviren werden als onkolytische Viren verwendet, weil sie normalerweise beim Menschen höchstens eine Erkältung auslösen. Weitere Vorteile der Adenoviren sind die enorme Reproduktionsrate bei geringer Mutation. Das bedeutet, dass aus einem Adenoviruserreger Tausende Kopien erstellt werden (Cao et al., 2011). Eine sogenannte Tumoringpfung mit einem für den Menschen ungefährlichen Erreger wie dem Newcastle-Disease-Virus erreicht, dass die Erreger die Tumorzellen detektieren und selektieren und diese dann zerstören (Ravindra et al., 2009).

2.3.1.3 Drug Targeting

Beim „Drug Targeting“ wird ein Arzneistoff unter kontrollierten Bedingungen gezielt an seinen Wirkort im Körper transportiert. Eine Steigerung dessen ist die „Controlled Release“, bei

welcher der Arzneistoff erst nach Erreichen seines Wirkortes freigesetzt wird. Ein Beispiel dafür ist das Doxorubicin, welches liposomal verkapselt in der systemischen Therapie von Ovarial- oder Mammakarzinomen eingesetzt wird (Jiang et al., 2011, Fiegl et al., 2011).

2.3.2 Lokale Chemotherapien

Bei der lokalen Chemotherapie wird das Medikament direkt in den Tumor eingebracht, entweder durch Katheter über den Tumor versorgende Blutgefäße oder durch direkte Injektion in das Tumorgewebe. Durch die gezielte Positionierung geht weniger Wirkstoff durch den Blutkreislauf verloren als bei der systemischen Chemotherapie. Obwohl eine geringere Menge des Medikamentes erforderlich ist, wird trotzdem eine höhere Konzentration im Tumor erzielt als bei der systemischen Chemotherapie. Daher ist diese Form schonender für den Organismus. Diese Therapieform ist geeignet für einzelne, solide Tumore oder Metastasen. Probleme sind die ungleichmäßige Verteilung im Tumor, das rasche Abfließen flüssiger Zubereitungen durch bei der Punktion verletzte Blutgefäße, Lymphbahnen oder andere Strukturen. Dem wurde versucht durch Verabreichung von Depotformulierungen, z. B. wirkstoffhaltigen Implantaten oder Partikeln, zu begegnen (Eyol et al., 2008, Gonzalez et al., 2008, Keese et al., 2009). Als Alternative wurden in dieser Arbeit Wirkstoffe in Form von Trockensubstanzen oder nur langsam löslichen Mikrokristallen verabreicht, wodurch das rasche Abschwemmen verhindert werden kann.

2.3.2.1 Perkutane Ethanolinjektion (PEI) oder Essigsäure (PAI)

Die perkutane Ethanolinjektion (PEI) führt eine Nekrose des Tumorgewebes herbei, indem das zelluläre Zytoplasma degeneriert und die zellulären Proteine komplett denaturiert werden. Unter z. B. sonographischer Kontrolle wird intratumoral absoluter Ethanol mit einer Feinnadel injiziert. Der Vorgang muss mehrmals wiederholt werden, da sich Ethanol im Tumor inhomogen verteilt und Tumorareale unbehandelt bleiben. Bei einer Single-Shot-PEI können dagegen bis zu 150 ml 96%igen Ethanols in das Tumorgebiet injiziert werden (Spangenberg, 2006). Speziell bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms kann keine ausreichende Verteilung im Tumor erzielt werden, da der Tumor nicht von einer Kapsel umgeben ist und der Alkohol meist rasch aus dem strukturell festeren Tumorgewebe abfließt (Giovannini und Seitz, 1994).

Rezidive sind häufig und liegen nach 1 Jahr bei 26 bis 32% und nach 3 Jahren bei 51 bis 86% (Stättner, 2010). Bei größeren Läsionen liegt das Rezidivrisiko weitaus höher

(Spangenberg, 2006). Die Injektion kann auch mit Essigsäure (PAI) erfolgen. Dabei wurden bessere Ergebnisse erzielt, als mit Ethanol (Shah et al., 2004). Die 3-Jahres-Rezidivrate liegt bei der PAI mit 56% niedriger als bei der PEI mit 64% (Tsai et al., 2008).

2.3.2.2 Transarterielle Chemoembolisation (TACE)

Bei diesem Verfahren wird die arterielle Infusion eines Chemotherapeutikums mit einer Embolisation der Blutversorgung des Tumors kombiniert. Durch die Embolisation wird ein frühzeitiges Ausschwemmen des Wirkstoffes aus dem Tumor verhindert, wodurch der therapeutische Effekt verstärkt wird. Hinzu kommt, dass das gesunde Lebergewebe überwiegend venös über die Pfortader und der Tumor vorwiegend arteriell versorgt werden. Dadurch wird bei der TACE das Lebergewebe weitestgehend geschont. Die Embolisation kann durch vielfältige Verschlussmaterialien herbeigeführt werden, wie z. B. Lipiodol (Lipiodol Ultra Fluid[®]), kollagenen Substanzen oder Gelatineschaum (Gelfoam[®]).

Die Erfolgsrate der Verkleinerung des Tumors (Downstaging) liegt hier bei 31 bis 61% (Fujiki et al., 2011, De Luna et al., 2009). Wird alternativ zur TACE nur das tumorversorgende Gefäß embolisiert, spricht man von einer Transarteriellen Embolisation (TAE), wird dagegen nur das Lipiodol-Zytostatikum-Gemisch injiziert, so handelt es sich um eine Transarterielle Chemoperfusion (TAC) (Spangenberg, 2006).

2.3.3 Lokale Thermotherapien

Tumorgewebe kann lokal durch Einfrieren oder Erhitzen abgetötet werden, ohne dass das umgebende Gewebe in größerer Entfernung geschädigt wird. Voraussetzung für den Einsatz ist jedoch, wie bei allen lokal ablativen Verfahren, eine Metastasenanzahl von weniger als fünf, eine Metastasengröße von unter 5 cm und das Fehlen von extrahepatischen Metastasen. Wesentlich ist auch die Lage des Tumors in der Leber. Die Nähe zu großen Gefäßen erschwert die Behandlung durch Wärmeableitung oder -zufuhr, die Nähe zu empfindlichen Strukturen wie der Gallenblase erlaubt kein ausreichend aggressives Vorgehen. Eine weitere Beschränkung stellt die Rezidivrate dar, weil häufig vitale Tumorreste zurückbleiben. Der Grund hierfür ist ein Nichteinhalten des Sicherheitsabstandes vom Tumor zum gesunden Lebergewebe von mindestens 1 cm (Bangard, 2011).

2.3.3.1 Kryotherapie

Die Kryotherapie wird selten allein, sondern meist in Verbindung mit einer Leberteilresektion durchgeführt. Dabei wird das Tumorgewebe sowie ein etwa 1 cm breiter Saum gesunden Lebergewebes durch Schockgefrierung zerstört, indem flüssiger Stickstoff mit einer Temperatur von bis zu -196 °C mittels einer Sonde in das Zentrum des Tumors verbracht wird (Chen et al., 2010, Bhardwaj et al., 2010).

2.3.3.2 Radiofrequenzablation (RFA)

Die Applikation von hochfrequentem elektrischem Strom durch eine Nadelelektrode ist das gebräuchlichste Verfahren zur Thermoablation. Meist unter Kontrolle mittels Computertomographie werden im Zielgebiet hohe Temperaturen bis zu 100 °C erreicht. Mit dieser Sonde kann gleichzeitig zur Kontrolle die Temperatur und die Leitfähigkeit des Gewebes (Impedanz) gemessen werden. Bei einer erfolgreichen Ablation werden das maligne Tumorgewebe sowie ein daran angrenzender schmaler Rand gesunden Gewebes zerstört. Bei den Tumoren bis maximal 3 cm Durchmesser kann damit eine Tumornekrose in 80 bis 90% der Interventionen erreicht werden. Bei größeren oder multifokalen Läsionen ist die TACE besser geeignet (Lencioni et al., 2003, Toso et al., 2010, Fujiki et al., 2011). Ein allgemeines Risiko aller lokal ablativer Therapien stellen die Stichkanalmetastasen dar, welche bei der RFA bei 0,5% liegen (Livraghi et al., 2003).

2.3.3.3 Laserinduzierte interstitielle Thermoablation (LiTT)

Die LiTT stellt ebenfalls eine minimalinvasive Thermoablation dar, die durch Hitze zur Proteindenaturierung und Koagulation im Tumor führt. Bei der LiTT wird dem Patienten ein Katheter von außen durch die Bauchwand in die Leber bis zur Metastase geschoben und darüber ein Lichtleiter mit Diffusor platziert, der das Licht eines Nd:YAG-Lasers (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) mit einer Wellenlänge von 1064 nm transportiert. Das Licht wird im Gewebe in Wärme umgewandelt (Vogl et al., 2006, Maataoui et al., 2005).

2.3.3.4 Hochfrequenzinduzierte Thermotherapie (HiTT)

Hochfrequenter Wechselstrom mit einer Nennfrequenz von 375 kHz und maximal 60 Watt wird über eine Nadelelektrode in den Tumor geleitet, wobei intratumorale Temperaturen von bis zu 90 °C erreicht werden. Durch die Zuführung von Kochsalzlösung wird ein stromleitfähiger Flüssigkeitsfilm erzeugt, der für eine kontrolliert großflächige Ausbreitung der Hitze sorgt (Knight et al., 2003).

2.3.3.5 Mikrowellenkoagulation (MWK)

Es wird eine Sonde in den Tumor eingeführt und durch diese mit Mikrowellen mit einer Frequenz von 2450 MHz behandelt. Durch eine lokale Hyperthermie entsteht eine Gewebekrose im Tumor von 1,5 bis 3 cm (Spangenberg, 2006, Geißler, 1998).

2.3.3.6 Magnetfeld-induzierte Thermotherapie mit magnetischen Flüssigkeiten

Eine magnetische Flüssigkeit (eisenoxidhaltige Nanopartikel) wird direkt in den Tumor appliziert und dann in einem externen magnetischen Wechselfeld erwärmt. Je nach Intensität der Behandlung sollen die Tumorzellen vernichtet bzw. empfindlicher werden für nachfolgende Therapien (Jordan et al., 2007).

2.3.3.7 Brachytherapie

Strahlenquellen werden mittels Katheter oder mittels radioaktiver Kapseln („Seeds“) für kurze Zeit in den zu behandelnden Bereich eingeführt. Dadurch entsteht ein enger Kontakt zwischen der Strahlenquelle und dem Tumor, der dabei eine hohe Strahlendosis erhält, das umliegende Gewebe jedoch nur eine geringe Dosis (Ricke et al., 2005).

2.4 Wirkstoffzubereitungen und Applikationsformen

2.4.1 Zugangswege

Intravenös:

Die intravenöse Verabreichung ist die gebräuchlichste parenterale Verabreichungsform (Thiel and Roewer, 2009). Vor- und zugleich Nachteil der Methode sind, dass alle Organe und Gewebe erreicht werden bis auf wenige geschützte Bereiche wie das Zentralnervensystem. Die toxischen Wirkungen der Zytostatika bleiben nicht auf den Tumor beschränkt.

Intraarteriell:

Bei der intraarteriellen Applikationsform besteht ein hoher First-Pass-Effekt. Das bedeutet, dass die regionale Exposition des Gewebes während der Infusion am größten ist. Verlässt die applizierte Lösung das Organ und tritt in den Körperkreislauf über, verhält sie sich verteilungstechnisch ebenso wie nach intravenöser Applikation. Da die Tumore in der Leber arteriell und die Leber selbst überwiegend venös versorgt werden, stellt die intraarterielle Applikation den direkteren Weg dar (Thiel und Roewer, 2009).

Interstitiell:

Bei den interstitiellen Therapieverfahren werden lokal pathologische Gewebe eliminiert. Dabei kann zwischen thermischen und nicht-thermischen Verfahren unterschieden werden.

Ein Beispiel für diesen Behandlungszugang ist die Laserinduzierte Interstitielle Thermotherapie (LITT). Im Gegensatz zum offenen chirurgischen Eingriff ist hierbei lediglich ein minimalinvasiver Zugang erforderlich (Vogl et al., 2006).

Nach Lokalisation und Punktion des Tumors wird über einen Katheter eine spezielle Glasfaser mit nur einem Millimeter Durchmesser in das Zentrum des Tumors eingeführt. Hierüber wird das Laserlicht in den Tumor geleitet und das Gewebe erhitzt.

Im Anschluss nach einer offenen chirurgischen Resektion muss der Patient auf der Intensivstation versorgt werden und hieran noch mit einem drei- bis vierwöchigen Krankenhausaufenthalt rechnen. Bei vielen Eingriffen mit dem Laser können diese ambulant durchgeführt werden (Radiologie Universität Frankfurt a. M., 2012).

2.4.2 Applikationssysteme und pharmazeutische Zubereitungen für die lokale Tumorthherapie

Lösungen:

Bei der Verabreichung von in Lösung gebrachten Wirkstoffen besteht das Problem des schnellen Abfließens vom gewünschten Wirkungsort. Ursächlich sind ein hohes Applikationsvolumen, für das insbesondere in unelastischem Tumorgewebe kein Platz ist, der Injektionsdruck und die Ausbildung von Kanälen, durch die die applizierte Lösung ohne deutlichen Gegendruck entweicht. Daraus resultiert dann auch eine zu niedrige Konzentration des Wirkstoffes in großen Teilen des Tumorgewebes (Vaupel, 1994).

Gele, verschiedene Depotformulierungen, langsam lösliche Wirkstoffpartikel:

In der Literatur sind zahlreiche Zubereitungen von zytostatisch wirksamen Substanzen in Depotformulierungen beschrieben, z. B. den sogenannten „drug eluting beads“. Dabei handelt es sich um aus Polyvinylalkohol bestehende Mikrosphären, die mit Wirkstoffen beladen werden (Eyol et al., 2008, Gonzalez et al., 2008, Keese et al., 2009).

2.4.3 Ballonkatheter

Ballonkatheter für die Angioplastie sind Katheter, welche am distalen Ende mit einem inflatableren Kunststoffballon ausgestattet sind. Dieser liegt vor Gebrauch eng gefaltet der Katheterspitze an und wird nach intraarterieller Einführung am Zielort, meist einer durch Arteriosklerose herbeigeführten Stenose, mit hohem Druck expandiert.

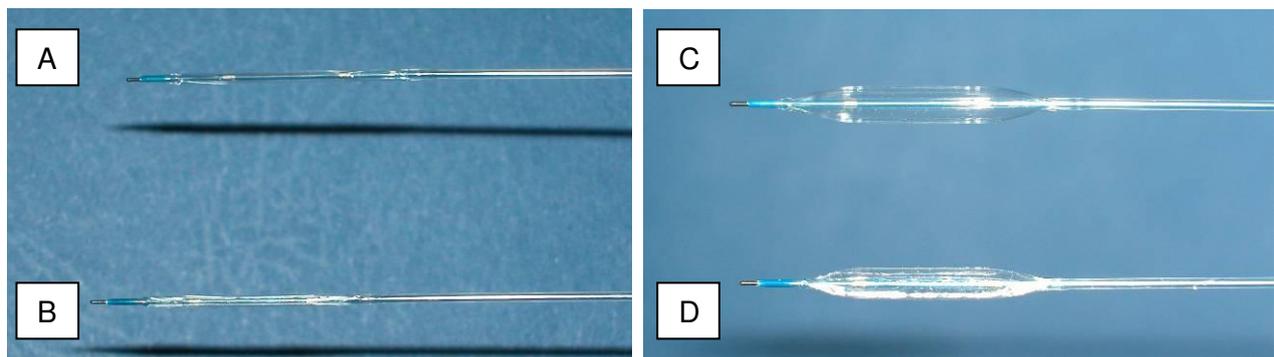


Abb. 2: Ballonkatheter: A: unbeschichtet, deflatiert; B: beschichtet, deflatiert; C: unbeschichtet, expandiert; D: beschichtet, expandiert

Üblicherweise werden die Ballonkatheter entweder als solche oder mit vormontiertem Stent in den Koronararterien zur Behebung einer Stenose verwendet. Nach Platzierung im stenotischen Bereich und Expansion des Ballons wird der Ballonkatheter wieder deflatiert und aus

dem Gefäß herausgezogen. War ein Stent über den gefalteten Ballon geschoben, bleibt dieser als Gefäßstütze zurück und verhindert so, z. B. eine sofortige erneute Gefäßverengung durch elastische Rückformung (Pant et al., 2012).

Der herkömmliche Ballonkatheter wurde weiterentwickelt, indem er mit Medikamenten beschichtet wurde („Drug Eluting Balloon“/DEB), die die Zellproliferation an der aufgedehnten Gefäßwand hemmen, um so einer Restenose vorzubeugen. In der Regel wird hierbei der Wirkstoff Paclitaxel verwendet. Restenosen sind erneute Verengungen des Gefäßes durch Überwucherungen und Vernarbungen der Gefäßwände (Cremers et al., 2009, Cremers et al., 2010, Kelsch et al., 2011).

Durch großflächige Verteilung der Substanzen und durch Erhöhung der regionalen Wirkstoffkonzentration im Tumor soll eine Steigerung der lokalen Effektivität erreicht werden. Durch die Expansion des Ballons vergrößert sich dessen Oberfläche und damit kann eine größere Fläche im Tumor mit den Wirkstoffen versorgt werden, ohne dass gleichzeitig Flüssigkeit eingebracht wird (Speck, 2008).

2.5 Testsubstanzen

Zytostatika sind natürliche oder synthetisch hergestellte Substanzen, die in unterschiedlicher Weise auf den Teilungszyklus einer Zelle wirken. Die Teilung der Zelle wird unterbunden und somit der Tumor, der sich durch eine rege Zellteilung auszeichnet, in seinem Wachstum gehemmt. Zytostatika wirken nicht selektiv auf Tumorzellen, sondern auch auf alle anderen Zellen des Organismus und bewirken dadurch die bekannten Nebenwirkungen, wie z. B. in häufigen Fällen Übelkeit, Erbrechen, Blutbildveränderungen, Haarausfall, Schleimhautdegeneration und –entzündungen sowie in weniger häufigen Fällen Nierenfunktionsstörungen, Allergien, Herzschäden und Nervenstörungen.

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Testsubstanzen kurz vorgestellt:

2.5.1 Zytostatikum Paclitaxel (Taxol®)

(Indena, Mailand, Italien)

Summenformel: $C_{47}H_{52}NO_{14}$

Molekulargewicht: 853,9 g/mol

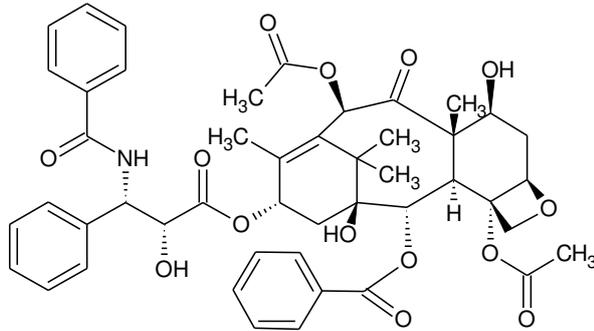


Abb. 3: Strukturformel Paclitaxel

Paclitaxel gehört zur Gruppe der Taxane. Im Jahr 1967 wurde der Wirkstoff das erste Mal isoliert und als Taxol benannt. Bis 1994 wurde der Wirkstoff Paclitaxel aus der Borke der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*), die nur in zwei US-Bundesstaaten vorkommt, hergestellt. Pro Patientin benötigte man zur Behandlung des Ovarialkarzinoms vier Bäume. Da der Einsatz des Wirkstoffs auf weitere Tumorarten ausgeweitet wurde, bestand „Ausrottungsgefahr“ für die pazifische Eibe. Aus diesem Grund wurde die halbsynthetische Herstellung aus Nadeln und Zweigen von europäischen Eibenarten (*Taxus baccata*) eingeführt. Dabei entsteht das 10-Deacetylbaccatin (10-DAB), welches durch Anlagerung einer weiteren Seitenkette zu Taxol wird. 10-DAB ist zu kompliziert aufgebaut, um vollsynthetisch hergestellt zu werden. Aber mit Hilfe von Eibe-Enzymen kann es aus Inhaltsstoffen der Nadeln und nicht nur aus der Rinde hergestellt werden. Der ebenfalls aus 10-DAB herstellbare Wirkstoff Docetaxel (Taxotere®) ist ähnlich wirksam wie Taxol und seit 1996 in Deutschland zugelassen (Bartsch, 2004).

Einsatzmöglichkeiten:

Anwendung findet Paclitaxel bei Mamma- und Ovarialkarzinomen und dem AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkom. Die empfohlene Dosis liegt bei 175 mg/m^2 Körperoberfläche (KOF)/Infusion.

Da Paclitaxel eine sehr lipophile Substanz ist, kann diese auch schnell in Gefäßwände diffundieren. Das ist bei der Verwendung auf Ballonkathetern zur Gefäßdilatation, um einer erneuten Restenose durch Zellproliferation vorzubeugen, von Vorteil.

Wirkmechanismus:

Die Wirkung Paclitaxels beruht auf der Störung der Zellteilung (Mitose). Es stabilisiert die Mikrotubuli und inhibiert deren Abbau, die dadurch funktionsunfähig werden und eine Zellteilung verhindern.

Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinfilamente, die einen wichtigen Bestandteil des Cytoskeletts der Zelle darstellen. Sie geben den Zellen ihre Form und Stabilität. Sie dienen als Transportwege innerhalb der Zelle, aber auch in die Zelle hinein oder hinaus. Die wichtigste Funktion ist jedoch die Beteiligung an der Strukturgebung während der Zellteilung.

Die strukturelle Reorganisation der intrazellulären Mikrotubuli wird gestört, indem die Depolymerisation verhindert und die Aggregation freier Tubulileinheiten gefördert wird. Es kommt zur Akkumulation sehr stabiler, aber funktionsgestörter Tubuli. Dadurch wird die Ausbildung des Spindelapparates verhindert und die Mitose blockiert. Die Zellen bleiben in der G2/M-Phase (Vorbereitung und Beginn der Mitose) stehen. Die Wirkung betrifft alle Zellen, aber Tumorzellen sind wegen ihrer schnelleren Teilung stärker betroffen (Bartsch, 2004).

Nebenwirkungen:

Bei der Verabreichung von Paclitaxel kann es zu Knochenmarksdepression, Thrombozytopenie, Neutropenie, Anämie, Neuropathien, Myalgien, Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall kommen. Akute Unverträglichkeitsreaktionen wie Allergien werden vorwiegend durch den im Taxol[®] enthaltenen Lösungsvermittler Cremophor EL hervorgerufen. Dem kann durch eine Prämedikation mit Dexamethason sowie einem Antihistaminikum entgegengewirkt werden (Aktories, 2009).

2.5.2 Zytostatikum Mitoxantron

(Auspure Bio-Technology Co Ltd, China)

Summenformel: $C_{22}H_{28}N_4O_6 \cdot 2 HCl$

Molekulargewicht: 517,41 g/mo

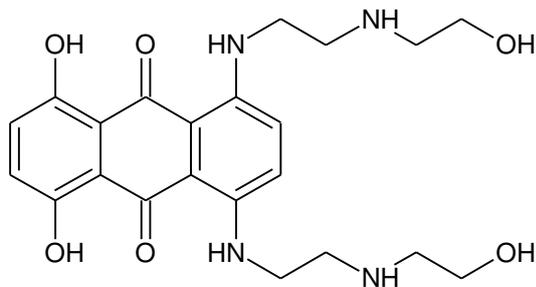


Abb. 4: Strukturformel Mitoxantron

Wirkmechanismus:

Bei Mitoxantron handelt es sich um ein zytotoxisches Antibiotikum der Anthracenedion-Gruppe, welches über Wasserstoffbrücken die DNA interkaliert. Es hemmt das Enzym Topoisomerase II, das für die Entspiralisierung und Reparatur von beschädigter DNA zuständig ist. Eine wesentliche Eigenschaft des Mitoxantrons ist die Unabhängigkeit vom Zellzyklus. Das bedeutet, dass Mitoxantron auf sich teilende und ruhende Zellen wirkt (Aktories, 2009, Dingermann et al., 2002).

Mitoxantron besitzt immunmodulatorische Wirkungen. Es unterdrückt die B-Zell-Immunität und vermindert die Anzahl der T-Zellen, beide Zelltypen sind Bestandteile des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem kann das angeborene Immunsystem nicht ersetzen, vielmehr ergänzen sie sich gegenseitig, denn erst durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr wird die komplexe Immunreaktion des Körpers ermöglicht.

Bei niedriger Dosis tritt meist die Apoptose der Zellen auf, wogegen mit steigender Dosierung Nekrosen erzielt werden. Die Apoptose ist eine besondere Form des Zelltods der, genetisch programmiert, von der Zelle selbst ausgelöst abläuft und geschädigte und störende Zellen beseitigt. Dieser Vorgang ist physiologisch und findet lebenslang in den meisten Zellen des Organismus statt. Bei der Nekrose wird die Zelle durch die Einwirkung äußerer Einflüsse zerstört, wodurch das Zytoplasma anschwillt, die Zellmembran platzt und das Zellinnere heraustritt. Durch Anlockung von Fresszellen kommt es in nekrotischen Gewebsbezirken zu einer Entzündung.

Einsatzmöglichkeiten:

Häufig wird Mitoxantron bei der Bekämpfung von multiplen Mammakarzinomen, fortgeschrittenen Prostatakarzinomen, der akuten myeloischen Leukämie und dem Non-Hodgkin-Lymphom eingesetzt. Es wird außerdem als Immunsuppressivum bei der Behandlung der Multiplen Sklerose verwendet. Die Dosierung von Mitoxantron wird mit 5 bis 12 mg/m² KOF/Injektion empfohlen.Nebenwirkungen:

Neben den üblichen Nebenwirkungen der Zytostatika kann Mitoxantron auch Mukositis oder Herzmuskelschädigungen auslösen.

2.5.3 Zytostatikum Doxorubicin

(Davos Chemical Corporation, New Jersey, USA)

Summenformel: C₂₇H₂₉NO₁₁

Molekulargewicht: 543,54 g/mol

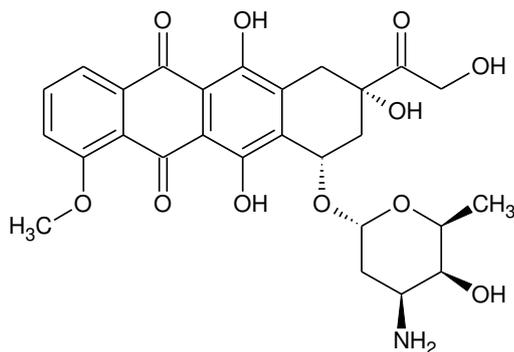


Abb. 5: Strukturformel Doxorubicin

Wirkmechanismus:

Das Doxorubicin gehört zur Gruppe der Interkalantien und dort zur Stoffgruppe der Anthrazykline. Interkalantien sind eine spezielle Zytostatikagruppe, welche nichtkovalente Bindungen mit der DNA eingeht und Anthrazykline sind Antibiotika, die als Zytostatika in der Chemotherapie eingesetzt werden (Dingermann et al., 2002).

Doxorubicin führt durch eine Blockierung der DNA- und RNA-Synthese zum Zelltod. Es schiebt sich zwischen benachbarte Nucleotide in der DNA, blockiert dadurch die Transkription und hemmt dann die Topoisomerase II, das Schlüsselenzym der DNA-Synthese. Die Wirkung ist in der S-Phase (Verdopplung der DNA während der Mitose) und G2-Phase (Replikationskontrolle) am stärksten ausgeprägt, darum sind die schnell proliferierenden Tumorzellen stärker als gesunde Zellen von der toxischen Wirkung betroffen (Aktories, 2009).

Einsatzmöglichkeiten:

Verwendung findet Doxorubicin bei der Therapie von Mammakarzinomen, Bronchialkarzinomen, Weichteil- und Knochensarkomen, gynäkologischen und Blasen-Karzinomen, Hodentumoren, Schilddrüsenkarzinomen malignen Lymphomen (Hodgkin- und andere Typen) sowie akuter Lymphoblasten- und Myeloblastenleukämie.

Als Dosierung werden 75 mg/m² KOF/Injektion angegeben.

Nebenwirkungen:

Die wichtigsten Nebenwirkungen sind Knochenmarksdepression, Kardiotoxizität und das Hand-Fuß-Syndrom (PPE)/periphere Neuropathie, wobei Erytheme, Desquamation, Parästhesien und Dysästhesien der Endextremitäten auftreten können.

2.5.4 Zytostatikum Fantolon

Bei dieser Substanz handelt es sich um ein noch nicht zugelassenes Prüfmuster der Bayer-Schering Pharma AG, Berlin.

Summenformel: C₃₀ H₄₁ N O₆ S

Molekulargewicht: 543,7 g/mol

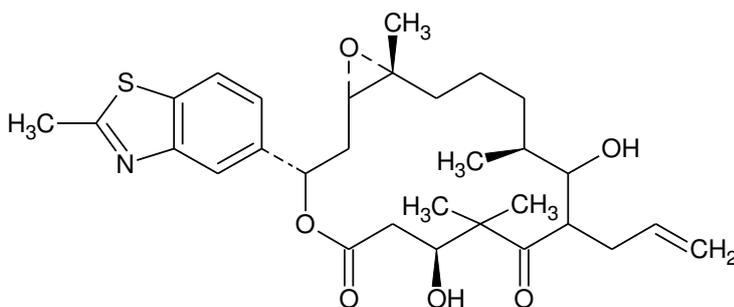


Abb. 6: Strukturformel Fantolon

Wirkmechanismus:

Fantolon ist ein besonders wirksames Epothilon. Epothilon wurde 1987 in Braunschweig am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung entdeckt. Epothilon wurde aus *Sorangium cellulosum* isoliert. Dieser Stamm gehört zu den Myxobakterien. Diese weltweit verbreiteten Bodenbakterien kommen teilweise unter extremen Umweltbedingungen vor.

Das Epothilon kam zu seinem Namen durch die Untereinheiten aus denen es besteht: Epoxid, Thiazol und Keton.

Es stabilisiert den Aufbau der Mikrotubuli, reichert sich in den Zellkernen an und macht dadurch eine weitere Zellteilung unmöglich. Die Effluxpumpen, die normalerweise Medikamente aus den Zellen transportieren, erkennen das Epothilon nicht. Die Proliferation der Zellen wird zwischen der G2 und der Mitose während der Zellteilung blockiert. Epothilon bindet an das Zellgerüst und verhindert, dass sich dieses in der G2/M-Phase auflöst – einem Teilabschnitt im Zellteilungsprozess. Es kommt zur Akkumulation sehr stabiler, aber funktionsgestörter Tubuli. Als Folge stockt die Teilung, und die Zelle zerstört sich selbst.

Einsatzmöglichkeiten:

Der Wirkstoff besitzt eine bessere Wasserlöslichkeit als die Taxane (z. B. Paclitaxel). Das ist zum einen von Vorteil, weil bei diesem Projekt eventuelle Nebenwirkungen durch Lösungsmittel vermieden werden und zum anderen die Gefahr ausgeschlossen wird, dass das Lösungsmittel und nicht der Wirkstoff eine Wirkung erzielt.

Bei Tumorzellarten die sich bereits gegen Taxol als resistent erwiesen haben, kann Epothilon erfolgreich eingesetzt werden, da die Bindung von Epothilon stärker ist und Taxol von den β -Tubulin-Rezeptoren verdrängt. Zurzeit werden Epothilone (z. B. Ixabepilon) zur Behandlung von metastasierenden Mammakarzinomen eingesetzt.

Nebenwirkungen:

Es treten häufig periphere Neuropathien auf, welche sich jedoch nach der Dosisreduktion schneller als bei den Taxanen verbessern.

2.5.5 Zytostatikum Bortezomib (Velcade®)

(Takeda Pharma, Aachen, Deutschland)

Summenformel: $C_{19}H_{25}BN_4O_4$

Molekulargewicht: 384,2 g/mol

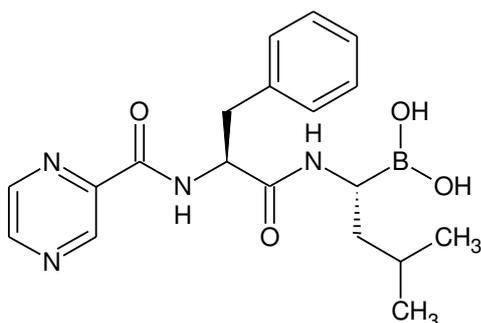


Abb. 7: Strukturformel Bortezomib

Wirkmechanismus:

Bortezomib ist ein Proteasomeninhibitor. Proteasome wirken beim zellulären Proteinabbau mit. Die Zelle markiert die zum Abbau freigegebenen Proteine. Dabei werden speziell die mit dem Polypeptid Ubiquitin markierten Proteine von den 26S-Proteasomen erkannt und abgebaut. Proteine regulieren den Zellzyklus und somit das Zellwachstum. Durch eine Blockierung der Proteasomen werden also Signalkaskaden unterbrochen und die Stoffwechselwege der Tumorzellen gehemmt. Besonders Tumorzellen reagieren auf diese Hemmung indem sie an einem Proteinüberschuss im Zellinneren „ersticken“. Dadurch kommt es zur Apoptose, das bedeutet zum selbstinduzierten Zelltod zuvor resistenter Tumorzellen (Aktories, 2009). Das Tumorzellwachstum wird eingeschränkt und die Fähigkeit zur Metastasierung reduziert. Außerdem wird auch die Angiogenese gehemmt, d. h. eine Bildung von neuen Blutgefäßen wird unterbunden, wodurch auch der Tumor nicht mehr ausreichend versorgt wird. Gesunde Zellen sind zwar auch betroffen, können sich aber im Gegensatz zu den Tumorzellen regenerieren.

Einsatzmöglichkeiten:

Zurzeit wird das Präparat zur Behandlung des multiplen Myeloms (Non-Hodkin-Lymphom) eingesetzt. Die zu verabreichende Dosis beim Patienten liegt bei 1,3 mg/m² KOF/Injektion.

Nebenwirkungen:

Die Behandlung begrenzende wichtigste Nebenwirkung ist die periphere Neuropathie. Dabei handelt es sich um eine Nervenstörung mit Schmerzen und Taubheitsgefühlen, vor allem an Füßen und Händen. Weitere Nebenwirkungen sind Erschöpfungszustände, Ohnmachtsanfälle, verminderte Blutplättchenkonzentration und gastrointestinale Störungen.

2.5.6 Zytostatikum 5-Fluorouracil (5-FU)

(Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland)

Summenformel: C₄H₃FN₂O₂

Molekulargewicht: 130,08 g/mol

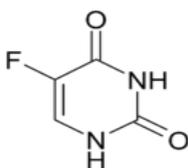


Abb. 8: Strukturformel 5-Fluorouracil

Wirkmechanismus:

Beim 5-Fluorouracil handelt es sich um ein Pyrimidinanalogon, das als Antimetabolit wirkt. Es ist die fluoriierte Form von Uracil. In Zellen transformiert es zu verschiedenen aktiven und toxischen Metaboliten. Anstelle von Cytosin und Thymin wird es dann als falsche Base in die DNA und RNA eingebaut und bewirkt somit eine Hemmung des Zellzyklus und nachfolgendem Zelltod durch Apoptose. Es besitzt nur eine kurze Plasmahalbwertszeit. Durch die schnelle Metabolisierung sind hohe Dosen notwendig. 5-FU wird bei einem pH über 11 instabil und hydrolysiert zu Harnstoff, Fluorid und einem Aldehyd (Schneemann and Wurm, 1995).

Einsatzmöglichkeiten:

Am häufigsten findet 5-FU Verwendung bei der Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms und bei Mammatumoren. Die Kombination mit dem Vitamin Folsäure moduliert die Wirkung und gehört mittlerweile zum medizinischen Standard. Allerdings konnte in Studien keine längere Überlebensdauer der behandelten Patienten nachgewiesen werden. Je nach Lokalisation und Stadium des Tumors werden als Dosis 300-1000 mg/m² KOF /Injektion empfohlen.

5-FU wird auch als Mittel gegen die topische Behandlung von Warzen eingesetzt (Verruma[®]).

Nebenwirkungen:

Die systemischen Nebenwirkungen wie die Schädigung der Schleimhaut des gesamten Verdauungstraktes oder Dermatitis sind teilweise erheblich und schwere bis tödliche Nebenwirkungen bei Patienten, die das sogenannte „Exon-14-Skipping-Mutations-DPD-Gen“ besitzen, können auftreten. Dabei weist die Dihydro-Pyrimidindehydrogenase (DPD) eine verminderte Enzymaktivität auf, wodurch der metabolische Abbau von 5-FU herabgesetzt wird.

2.5.7 Antineoplastischer Wirkstoff Arsentrioxid

(Sigma-Aldrich Chemie, Deutschland)

Summenformel: As₂O₃

Molekulargewicht: 197,84 g/mol

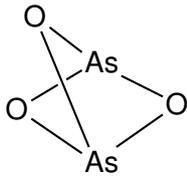


Abb. 9: Strukturformel Arsentrioxid

Dreiwertige anorganische Arsenverbindungen wie Arsentrioxid oder Arsensulfid werden seit über 2400 Jahren in der Medizin verwendet. Durch die Entdeckung der Röntgenstrahlung und die Entwicklung potenter Zytostatika für die Therapie akuter myeloischer Leukämien (AML) wurde Arsentrioxid immer mehr verdrängt. Stattdessen fanden organische dreiwertige Arsenverbindungen bis Ende des 20. Jahrhunderts bei der Therapie der refraktären oder rezidierten akuten Promyelozytenleukämie (APL) Verwendung.

Beim Arsen handelt es sich um den einzigen hier vorgestellten Wirkstoff, der nicht zu den Zytostatika gezählt wird. Das Arsen ist ein Halbmetall, welches als Oxid oder Salz in geringen Konzentrationen überall im Boden vorkommt und in größeren Mengen als Nebenprodukt bei der Gewinnung von Kupfer, Blei, Kobalt und Gold anfällt.

Wirkmechanismus:

Das Arsentrioxid verändert bestimmte Strukturen an der Myelomzelloberfläche. Das Immunsystem detektiert diese veränderten Myelomzellen und attackiert sie.

Zum Wirkmechanismus existieren zwei Hypothesen: Einerseits soll die Substanz Proteine zerstören, welche die Ausreifung der Leukozyten behindern. Andererseits wird vermutet, dass Arsentrioxid den programmierten Zelltod (Apoptose) ankurbelt, indem es die Freisetzung von dafür notwendigen Caspase-Enzymen fördert (Aktories, 2009).

Bei in vitro Untersuchungen wurden morphologische Veränderungen und eine Fragmentierung der DNA festgestellt.

Seine Wirksamkeit bei der Therapie solider Tumore wird auch auf die antiangiogenetische Wirkung zurückgeführt. Durch eine zu geringe Gefäßversorgung kommt es im Tumor zu Sauerstoff- und Nährstoffmangel.

Einsatzmöglichkeiten:

Im Jahr 2000 wurde ein Arsentrioxid-haltiges Präparat unter dem Namen Trisenox[®] in den USA zur Behandlung der promyelozytären Leukämie (APL) zugelassen. Seit 2002 besteht für Trisenox[®] auch in Europa eine Zulassung zur Behandlung der APL. Die tägliche Dosis beträgt 0,15 mg/kg KG.

Nebenwirkungen:

Als Nebenwirkungen können durch das Arsen trioxid Fieber, Dyspnoe, Leukozytose, Herzrhythmusstörungen und ein gestörter Elektrolythaushalt auftreten.

2.6 Das Kaninchen als Versuchstier in der Onkologie

2.6.1 Anatomie der Kaninchenleber

Die Kaninchenleber befindet sich zum größten Teil innerhalb der rippengestützten Bauchhöhle und liegt dem Zwerchfell (Diaphragma) mit seiner konvex geformten Seite direkt an. Die konkav geformte Seite der Leber liegt den inneren Organen an. Nur die ventralen Leberränder gehen über den letzten Rippenbogen hinaus.

Die einzelnen Leberlappen gliedern sich beim Kaninchen wie folgt:

Der rechte und der linke seitliche Leberlappen (Lobus dexter lateralis und Lobus sinister lateralis) sowie der rechte und der linke mittlere Leberlappen (Lobus dexter medialis und Lobus sinister medialis) bilden den Großteil der Leber. Der Lobus quadratus befindet sich zwischen den beiden mittleren Leberlappen nahe der Gallenblase (Vesica fellea). Der Lobus caudatus liegt der visceralen Seite des Lobus dexter lateralis an und besitzt ein kleines Anhängsel, den Processus papillaris lobi caudati. Die rechte Niere liegt am Lobus dexter lateralis sowie zu einem großen Teil am Processus caudatus, welcher die Impressio renalis aufweist. Das Ligamentum falciforme verläuft zwerchfellseitig zwischen den rechten und linken mittleren Leberlappen (Popescu et al., 1992, Salomon et al., 2005).

2.6.2 VX2-Tumormodell

Das VX2-Tumormodell ist ein etabliertes Modell. Das VX2-Karzinom hat seinen Ursprung in einem virusinduzierten Hautpapillom von wildlebenden Kaninchen, welches später zu einem sehr malignen, schnell wachsenden anaplastischen Plattenepithelkarzinom mutierte (Kidd und Rous, 1940). Danach hat sich der Tumor auch nach zahlreichen Transplantationen morphologisch, biologisch und immunologisch nicht mehr verändert. Vor dem 1. Weltkrieg lautete die Bezeichnung dafür V2: „V“ für virusinduziert und die „2“ für das zweite Karzinom, welches etabliert wurde. Später wurde es wegen der negativen Bedeutung („Vergeltungswaffe 2“) in VX2 umbenannt (Rous et al., 1952).

Seit über 50 Jahren werden VX2-Tumore in einer Vielzahl von experimentellen Studien genutzt. Sie finden Verwendung bei Untersuchungen zur Karzinogenese und um neue Behandlungsmöglichkeiten in der Tumorthherapie zu erforschen.

Bezeichnend für das VX2-Karzinom sind der geringe Differenzierungsgrad ohne Keratinisierung, die Infiltration umliegender Strukturen, die Ausbildung von Ulzerationen und nekrotischen Bereichen ab einer gewissen Tumorgröße und ein initial lymphogenes Metastasierungspotential (Rous et al., 1952). Kaninchen wurden für die Untersuchungen wegen ihrer gegenüber Mäusen und Ratten für die Behandlung mit Ballonkathetern günstigeren Körpergröße gewählt, der VX2-Tumor wegen seines aggressiven Wachstums und der guten Verfügbarkeit. Die Erfahrung zeigt auch, dass viele Tumorarten, die bei Mäusen und Ratten gut anwachsen, bei Kaninchen jedoch keine zufriedenstellende Anwachsrate zeigen (Speck, 2007).

Die in der vorliegenden Arbeit zur Tumorimplantation verwendeten Tumorstücken stammen aus entnommenem unbehandeltem Tumormaterial (Chen et al., 2004).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 In vitro Untersuchungen

3.1.1 Tumorzellen, Kultivierung, Inkubation

An einer VX2-Karzinomzelllinie (I.A.Z. Zellkultur, München) wurde der Effekt von verschiedenen antineoplastisch wirkenden Substanzen in vitro untersucht. Die Zellen wurden aus einem Plattenepithelkarzinom von Kaninchen gewonnen.

Für die Anzucht wurde die Zelllinie als Monolayer-Kultur in einer Lösung aus 80% RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin und Phenolrot (GIBCO invitrogen, Germany, Darmstadt), mit 20% fetalem Kälberserum (Foetal Bovine Serum, GIBCO invitrogen, Germany, Darmstadt) unter Zugabe von 5% L-Glutamin (GlutaMAX™, GIBCO invitrogen, Germany, Darmstadt) und 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (GIBCO invitrogen, Germany, Darmstadt), in einer Atmosphäre aus 5% Kohlendioxid in 95% Luft bei 37 °C inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte zwei Mal wöchentlich.

Zur Ablösung der adhärent wachsenden Zellen aus den Zellkulturflaschen (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) mit einer Bodenfläche von 150 cm² erfolgte eine Trypsinierung für 5 Minuten mit 5 ml Trypsin-EDTA (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA, GIBCO invitrogen, Germany, Darmstadt). Nach anschließender Neutralisation des Trypsins durch Zugabe von 5 ml Vollmedium (RPMI 1640 mit fetalem Kälberserum, GIBCO invitrogen, Germany, Darmstadt) wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 U/min zentrifugiert (Laborfuge 400 R, Heraeus Instruments, Kendro Laboratory Products, Deutschland) und die Zellpellets in 10 ml Vollmedium resuspendiert. Das fetale Kälberserum enthält Proteaseinhibitoren, die die Trypsinierung sofort stoppen.

3.1.2 Populationszählung und Portionierung

Die Zellzählung wurde in einer Neubauer-Zählkammer (0,1 µl) mit einer Trypan-Blau-Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellsuspension sowie das 0,4%ige Trypan-Blau (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Deutschland) in einem Verhältnis von 1:10 gemischt. Dadurch war die Zählung der avitalen, blau angefärbten Zellen unter dem Mikroskop möglich. Die Zahl der avitalen Zellen wurde von der Gesamtzahl der Zellen abgezogen, um die Zahl der vitalen Zellen zu ermitteln.

Die Zählung der Zellen erfolgte ausschließlich zum Zwecke der Portionierung für die Inkubation. Der Einfluss der Zytostatika auf die Zellen wurde durch Messung der intramitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität bestimmt.

3.1.3 Getestete antineoplastisch wirkende Substanzen

Tab. 1: Unterschiedliche Inkubationszeiten und Konzentrationen der zu testenden Substanzen in den in vitro Versuchen an VX2-Zellen

Substanz	Konzentrationen der Wirkstofflösungen	Inkubationszeit
Paclitaxel	2/4/16/32 µmol/l	24 h, 48 h, 72 h
Fantolon	2/4/16/32 µmol/l	24 h, 48 h, 72 h
Mitoxantron	2/4/16/32 µmol/l	24 h, 48 h, 72 h
Bortezomib	0,1/0,2/0,3/0,4 µmol/l	24 h, 48 h, 72 h
5-Fluoruracil	2/4/16/32 µmol/l	24 h, 48 h, 72 h
Arsentrioxid	2/4/16/32 µmol/l	24 h, 48 h, 72 h
Doxorubicin	10/15/20/25 µmol/l	24 h, 48 h, 72 h

Die Konzentrationen der einzelnen Substanzen wurden anhand von in der Literatur publizierten Daten gewählt (Saad-Hossne et al., 2006) und nach Vorversuchen an die eigenen Ergebnisse angepasst. Da es sich um vorrangig wasserunlösliche Substanzen handelt, wurde DMSO (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur besseren Löslichkeit bei der Herstellung der Lösungen sowie des Wachstumsmediums für die Kontrolle zugesetzt. Es ergab sich 1,25 Volumen% DMSO als Endkonzentration in den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatte (96-Well-Platte).

Annähernd gleiche Zahlen von VX2-Karzinomzellen wurden unterschiedlichen Medien für unterschiedliche Zeiten ausgesetzt. Das Inkubationsmedium ohne Zusatz von Zytostatika diente als Kontrolle. In allen Wirkstofflösungen jeder Konzentration, auch in der Lösung ohne Wirkstoffanteil, befand sich jeweils der gleiche Anteil an DMSO, d. h. 2,5 Volumen% an den zugesetzten Lösungen, die zu 1,25 Volumen% in den Zellkulturen führten. Dies war notwendig, um sämtliche Wirkstoffe in Lösung zu bringen. Als Kontrolle wurden daher Zellen mit reinem Medium bzw. Medium mit 2,5%igem DMSO-Anteil versetzt. So konnte überprüft werden, inwieweit das DMSO einen Einfluss auf die Enzymaktivität hat.

3.1.4 Versuchsaufbau

Einfluss unterschiedlicher Inkubationszeiten und Konzentrationen von den zu testenden Substanzen auf das Ausmaß der Zellproliferation:

Es wurde der Einfluss von vier verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen auf VX2-Tumorzellen mit drei verschiedenen Einwirkungszeiten untersucht. Hierfür wurden die zu testenden Substanzen mit RPMI (Wachstumsmedium) gemischt, um die verschiedenen Konzentrationen (s. Tab. 1) herzustellen. Jeweils drei Mikrotiterplatten wurden pro zwei Wirkstoffen angesetzt, eine für jede der unterschiedlichen Einwirkungszeiten von 24, 48 und 72 Stunden auf die VX2-Zelllinie. Je sechs der einzelnen mit Zellen besäten Wells einer Platte wurden mit je 100 µl Wirkstofflösung einer Konzentrationsstufe versehen. Die nächsten sechs Wells erhielten jeweils eine höhere Konzentrationsstufe.

		Wirkstoff A					Wirkstoff B						
		Konzentration 0	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 0	Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Leerwert: Nur Medium	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Leerwert: Nur Medium + Substanz	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zellen und Substanz	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zellen und Substanz	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zellen und Substanz	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zellen und Substanz	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zellen und Substanz	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Zellen und Substanz	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 10: Schema der Belegung der Mikrotiterplatten

Entsprechend der gewünschten Zellzahl erfolgte die Verdünnung der Zellsuspension mit Wachstumsmedium. Mit einer Pipette (Multipette, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden je 100 µl mit 1000 Zellen der Zellsuspension auf eine Well-Platte überführt (96er Cellstar Micro-Plate TC, steril, Greiner, Solingen, Deutschland).

In den Spalten 1 und 12 befanden sich ausschließlich Zellen mit Medium ohne Zusatz von Substanzen (=Zytostatika).

Nach Inkubation von 24 Stunden bei 37 °C, in welcher die Anheftung der Zellen an ihrem Untergrund erfolgte, wurden 100 µl der jeweiligen Wirkstofflösung in den vorher definierten Konzentrationen bzw. wirkstofffreie Kulturlösung dazugegeben.

Zur Bestimmung der Auswirkung der Inkubationszeit auf das Ausmaß der Hemmung der Zellvermehrung durch die Wirkstoffe, wurde die VX2-Zelllinie in den 3 Wellplatten für 24, 48 und 72 Stunden Wirkstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen bei 37 °C ausgesetzt. Die Versuchsansätze wurden einem Zytotoxizitätstest (XTT-Test, s. Kap. 3.1.5) unterzogen.

3.1.5 Bestimmung der intramitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität nach Inkubation mit verschiedenen Medien

Als Maß für die Zellaktivität der verschieden behandelten VX2-Tumorzellen wurde deren intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität durch Testung mit XTT-Reagenz untersucht (Cell Proliferation Kit II (XTT), Roche Diagnostics GmbH, Deutschland). Die Stoffwechsellistung von intakten Mitochondrien vitaler Zellen lässt sich durch die Reduktion von XTT 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz dokumentieren, welche mit einem Farbumschlag von gelb (492 nm) nach orange (690 nm) einhergeht. Zum optimalen Ablauf der Reaktion wurde 0,1 ml PMS (Phenazine methosulfate) als Elektronenakzeptor (electron-coupling-reagent) zu je 5 ml XTT zugefügt, 50 µl dieser Lösung wurden dann jeweils in ein Well der einzelnen Versuchsansätze gegeben. Die Herstellung und Zugabe des XTT-Reagenz wurde nach Anleitung durchgeführt. Bei allen Versuchsansätzen wurde eine Einwirkzeit des XTT-Reagenz für 4 Stunden gewählt. Zuvor wurden dazu Einwirkzeiten zwischen 2 und 4 Stunden ausprobiert, es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Unmittelbar nach Ablauf der Einwirkungszeit erfolgte eine Auswertung im Spectralphotometer (BioTek, Power Wave XS2, Bad Friedrichshall, Deutschland). Dabei wurden die zu untersuchenden Substanzen Licht in einem definierten Wellenlängenbereich (Testwellenlänge 492/Referenz-Wellenlänge 630) ausgesetzt, bei der die jeweilige Probe ihr Absorptionsmaximum erreicht, um die Lichtintensität nach Passage des Lichtes durch die Probe zu messen.

Die prozentuale Änderung der Absorption für Licht im Spektralbereich durch den durch die Reduktion von XTT-bedingten Farbumschlag, ließ eine Quantifizierung der Zellvitalität zu. Maß für eine Zellaktivität von 100% war die Absorptionsänderung, welche durch eine Kon-

trolle verursacht wurde, die keinem Wirkstoff ausgesetzt war. Prozentuale Änderungen der Extinktion waren Maßstab für die prozentuale Veränderung der Zellaktivität unter Wirkungseinwirkung.

3.1.6 Auswahl der Zubereitungen für die Wirkstoffe

Die Wirkstoffe sollten möglichst ohne Lösungsmittel bzw. mit wenig Flüssigkeit über große Bereiche des Tumors verteilt werden. Dies wurde mit trockenen Wirkstoffen auf der Oberfläche des im Tumorgewebe expandierten Ballons versucht. Für Wirkstoffe, mit denen keine gleichmäßige gut haftende Beschichtung von Ballonen gelang, wurden andere Zubereitungen gesucht.

3.1.7 Beschichtung der Ballone und Bestimmung der Dosis

3.1.7.1 Beschreibung des Beschichtungsablaufs

Alle Ballone am distalen Ende von den Ballonkathetern (Globamed, CTO „One“, 3.5—10 mm, Krefeld, Deutschland) wurden mehrmals mit der jeweiligen Lösung mittels einer halbautomatischen Hamilton-Spritze (Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst, Deutschland) beschichtet. Erst nach vollständiger Trocknung wurden die Ballone mit Schutz-Hüllen versehen und die gesamten Katheter in spiralförmig aufgerollte Kunststoff-Röhren zur sicheren Aufbewahrung und zum Transport geschoben. Die Schutzhüllen verhinderten zum einen das Abreiben der Ballonbeschichtung, zum anderen unterstützten diese aber auch durch den Druck, der dabei auf den beschichteten Ballon ausgeübt wird, die Haftung.

Die Beschichtungen wurden in Handarbeit durchgeführt und die Katheter danach durch die Vanguard AG, Berlin, EO-sterilisiert.

3.1.7.2 Herstellung der Beschichtungslösungen

Die Beschichtungslösungen wurden jeweils direkt vor dem Beginn des Beschichtungs Vorganges der Ballonkatheter hergestellt. Dafür wurde zuerst eine Lösungsmittelbasis angesetzt und darin der Wirkstoff in Lösung gebracht.

3.1.7.3 Auswahl der für die in vivo Versuche geeigneten Testsubstanzen

Folgende Stoffe wurden anhand der in vitro Versuche für die in vivo Versuche am VX2-Tumormodell ausgewählt:

- Paclitaxel
- Fantolon
- Doxorubicin
- Arsentrioxid

3.1.7.3.1 Herstellung der Beschichtungslösung Paclitaxel

Es wurden 4,6 ml Aceton (J.T. Baker, Deventer, Holland) und 0,4 ml Ethanol (Th.Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland) gemischt, davon 1 ml abgenommen und darin 60 mg Paclitaxel gelöst.

3.1.7.3.2 Herstellung der Beschichtungslösung Fantolon

Es wurden 4,6 ml Methanol (Sigma, St. Louis, USA) und zur Verbesserung der Haftung 0,4 ml Ultravist-370[®] (Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland) gemischt, davon 0,25 ml abgenommen und darin 10 mg Fantolon gelöst.

3.1.7.3.3 Herstellung des Doxorubicin-Gels

In 5 ml einer wässrigen 0,128 M Doxorubicin-Lösung wurden 73,05 mg NaCl bei 40 °C im Wasserbad gelöst und an der Luft abgekühlt. Es bildete sich ein rotes Gel.

3.1.7.3.4 Herstellung des Arsentrioxid-Gels

100 mg fein gemörsertes Arsentrioxid wurde mit 1 ml NaCl aufgeschüttelt und zur besseren Löslichkeit über Nacht in einen Wärmeschrank bei einer Temperatur von 100 °C gelagert. Unmittelbar vor der Verwendung am nächsten Tag wurde dem Gemisch ca. 1 ml Spongostan-Powder[®] (Ethicon, Johnson & Johnson Medical Ltd, Berkshire, UK) zugegeben,

damit eine visköse Konsistenz entstand, um einem vorzeitigen Abfließen aus dem Behandlungsgebiet entgegenwirken.

3.1.8 Bestimmung der applizierten Dosis

Bei Verwendung der halbfesten Zubereitungen (Gele) für die Therapie konnten die applizierten Wirkstoffmengen aus der Konzentration des Wirkstoffs in der Zubereitung und dem applizierten Volumen berechnet werden. Zur Messung des Gehaltes der Wirkstoffe auf den Ballonkathetern wurde die Firma AnaKat (Berlin, Deutschland) beauftragt, die dafür standardmäßig die HPLC-Methode (high performance liquid chromatography = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) anwendet. Zuerst wurden unbenutzte beschichtete Ballonkatheter mittels dieser Methode hinsichtlich ihres Wirkstoffgehaltes gemessen. Die zur Therapie genutzten wirkstoffbeschichteten Ballone wurden nach deren Verwendung ebenfalls auf deren verbliebenen Wirkstoffgehalt analysiert. So konnte mit Hilfe der zuvor gemessenen unbenutzten Ballone aus derselben Beschichtungsserie als Referenzwerte in etwa berechnet werden, wieviel der jeweils eingesetzten Substanz in den Tumor eingebracht werden konnte.

3.2 In vivo Untersuchungen

3.2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Diese Studie wurde im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 20 männliche Kaninchen der Rasse Chinchilla-Bastard, einer Kreuzung aus Groß-Chinchilla-Kaninchen und Weißen-Neuseeland-Kaninchen. Diese Kreuzung ergibt sehr robuste und ausgeglichene Tiere mit ausgezeichneten Ohrvenen. Die Rasse zeichnet sich durch eine geringere Stressanfälligkeit gegenüber den üblicherweise als Laborkaninchen eingesetzten Weißen Neuseeländern aus (Erhard et al., 2003, Charles-River-GmbH, 1996).

Das durchschnittliche Anfangsgewicht betrug zwischen 2,5 und 3,5 kg. Die Tiere wurden durch die Charles River WIGA Deutschland GmbH, Sulzfeld, bezogen. Vor der ersten Intervention wurde den Tieren eine mindestens einwöchige Eingewöhnungsphase gewährt.

Die Unterbringung erfolgte in Standardlaborkäfigen aus Edelstahl mit einer Ebene als Rückzugsmöglichkeit. Die Tiere hatten während des gesamten Versuchs freien Zugang zu Alleinfutter (ssniff® K-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), Äpfeln, Karotten, getrocknetem Brot und Wasser ad libitum aus einer Trinkflasche.

Die Tiere wurden während des gesamten Versuchszeitraumes unter klimatisierten Bedingungen (Umgebungstemperatur 16 bis 18 °C, Luftfeuchtigkeit 45 bis 55%) und Beleuchtung im zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere standen während der gesamten Versuchsdauer unter tierärztlicher Kontrolle.

3.2.2 Gruppeneinteilung und Versuchsplan

Es wurden 20 Kaninchen in 5 Gruppen à 4 Tiere eingeteilt (s. Tab. 2). Pro Wirkstoff (Paclitaxel, Fantolon, Doxorubicin, Arsentrioxid) und als Kontrollgruppe wurden 4 Tiere untersucht.

Tab. 2: Einteilung der Tiergruppen nach Wirkstoffen und Behandlungsformen

Gruppe	Anzahl der Tiere	Wirkstoff	Behandlung
I	4	Paclitaxel	Ballonkatheter
II	4	Fantolon	Ballonkatheter
III	4	Doxorubicin	Gel-Injektion
IV	4	Arsentrioxid	Gel-Injektion
V	4	Kontrolle	Ballonkatheter/Injektion

3.2.3 Operationsvorbereitung

Die Narkose wurde mit Ketamin (Ketavet®, Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Xylazin (Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) im Verhältnis 2:1 in einer Mischspritze aufgezogen und mit 1 ml/kg KG s.c. appliziert. Um den Stress für die Tiere zu minimieren, wurde die Injektion bereits im Käfig verabreicht und erst nach dem Einsetzen der Sedation wurden diese in einer Transportbox zum Operationsraum gebracht. Nach Wirkungseintritt der Narkose wurde eine Venenverweilkanüle (Vasocan®, 22 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die V. auricularis rostralis gelegt und kurz mit Natriumchlorid (Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) gespült. Über diesen Zugang konnte die Narkose durch eine auto-

matische Infusionspumpe (Braun Infusomat Space P, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufrechterhalten werden.

Im Übergang vom Thorax zum Abdomen wurde das Fell zuerst mit einer Schermaschine geschoren, dann mit einem Handrasierer rasiert und die Haut mit Softasept® N (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Braunoderm® (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert.

3.2.4 Operative Durchführung

3.2.4.1 Tumorimplantation

Nach einer medianen Laparotomie (s. Abb. 11) caudal des Processus xiphoideus wurde zwecks schonender und ausreichender Fixation mit einer Mullkomresse (BeeSana Mullkomresse, Beese Medical, Barsbüttel, Deutschland) einer der beiden medialen Leberlappen hervorgeklappt. Aus bereits vorhandenen tiefgefrorenen Tumorproben von Kontrolltieren wurden drei Tumorstücken (Ø 2 mm, s. Abb. 12) langsam im Wasserbad aufgetaut und in einem Trokar (s. Abb. 13) aufgezogen. Dieser wurde dann ca. 0,5 cm tief und ca. 2 cm weit in das Leberparenchym vorgeschoben, um die Tumorstückchen zu injizieren (s. Abb. 14). Mit einem Wattestäbchen (Rauscher, Oederau, Deutschland) wurde kurz hinter der Einstichstelle auf den Leberlappen gedrückt, um ein ungewolltes Austreten der Tumorstücke sowie eine eventuelle Blutung beim Herausziehen des Trokars zu verhindern. Anschließend wurde die Leber mit NaCl befeuchtet und wieder in die Bauchhöhle reponiert. Als Antibiotikum wurden 0,1 ml Tardomyocel® comp. III/kg KG i.p. (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal verabreicht. Das Peritoneum und die Muskulatur wurden mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Faden (Ethicon Vicryl Plus, 3-0, Johnson & Johnson Intl., New Jersey, USA) vernäht. Die Haut wurde mit U-Heften mit resorbierbarem Faden (Ethicon Vicryl rapide, 2-0, Johnson & Johnson Intl., New Jersey, USA) verschlossen. Zwischen die beiden Nähte wurden zwei Leukasekegel (Leukase N Kegel®, Dermapharm AG, Grünwald, Deutschland) platziert. Die Hautnaht wurde zum Schluss mit Klammern (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verstärkt und mit Braunovidon-Salbe® (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) versorgt.

Zur Schmerztherapie wurde 0,2 ml Novaminsulfon®/kg KG s.c. (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) appliziert. Das Schmerzmittel wurde ebenfalls an den folgenden Tagen sowie zu späteren Zeitpunkten bei Bedarf s.c. verabreicht.



Abb. 11: Mediane Laparotomie beim Kaninchen in Rückenlage

Auf der Abbildung liegend (s. Abb. 11) befindet sich der Kopf des Tieres in Richtung des rechten Bildrandes. Nach der Eröffnung des oberen Abdomens stellen sich die inneren Organe wie folgt dar:

1 = Magen, 2 = linker medialer Leberlappen, 3 = Schwertfortsatz (Proc. xiphoideus)

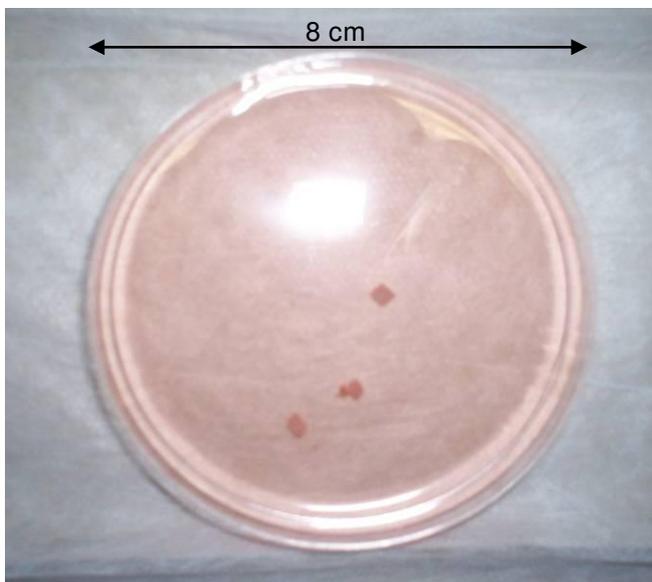


Abb. 12: Zur Implantation vorbereitete Tumorstücken

Nach dem Auftauen der Tumorstücken (s. Abb. 12) durch Erwärmung der Cryo-Röhrchen im Warmwasserbad wurde die für die Implantation vorgesehene Anzahl an Tumorstücken in eine mit RPMI-Medium (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gefüllte Petrischale gelegt. Von dort aus konnten diese kurz vor der Intervention mit dem Trokar (s. Abb. 13) aufgezogen werden.

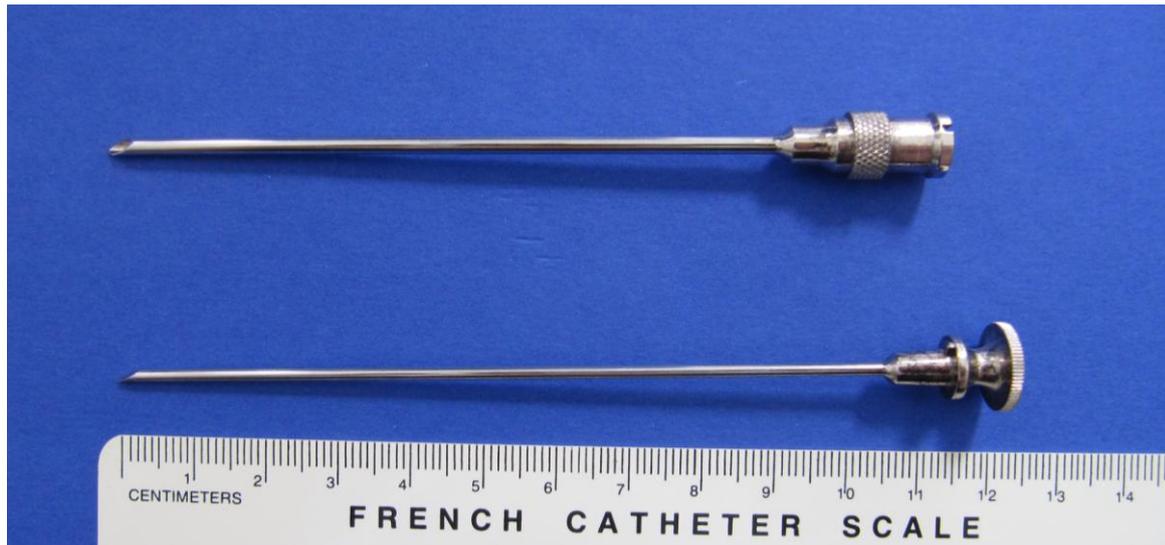


Abb. 13: Zur Tumorimplantation verwendeter Trokar

Die Tumorstücken wurden äußerst behutsam mit dem Trokar aufgezogen, um Luftein-schlüsse zwischen den einzelnen Stückchen zu vermeiden, die ansonsten bei der anschlie-Benden Injektion in das Lebergewebe mit eingebracht worden wären.

3.2.4.2 CT-Untersuchungen

Die CT-Kontrollen wurden mit einem Mehrschicht-Spiral-CT „Somatom Sensation 64“ von Siemens, welches sich im Imaging Science Institut – Charité Siemens (Robert-Koch-Platz, Berlin) befindet, durchgeführt.

Das Gerät nimmt 64 Schichten des Körpers pro Gantryumdrehung auf. Für eine Umdrehung werden lediglich 0,37 Sekunden benötigt. Bei den Bildern wird eine Auflösung von 0,4 Milli-metern erreicht.

Da die lokale Therapie ursprünglich sofort vor Ort während der Bildgebung durchgeführt werden sollte, fiel die Wahl auf den Computertomographen. Mit hoher Geschwindigkeit und guter örtlicher Auflösung können reproduzierbare Bilder hergestellt werden, mit denen auch schon kleinste Tumoren nachgewiesen werden können (Hauenstein und Heller, 2003).

3.2.4.3 Kontrolle des Tumorwachstums

Die Kontrolle der Tumorentwicklung wurde mittels CT mit Kontrastmittel durchgeführt, da die Lebertumore im Frühstadium weder tastbar noch nativ, d. h. ohne Kontrastmittel, sichtbar sind. Eine Woche nach der Tumorzellimplantation wurde das erste Mal computertomo-

graphisch kontrolliert. Die Kaninchen wurden in Rückenlage mit dem Kopf voran für die Aufnahmen positioniert. Dafür erhielten die Tiere eine Narkose wie bei der Tumorimplantation und über den Venenverweilkatheter in der Ohrtrandvene konnte zusätzlich ein Röntgenkontrastmittel (Ultravist 370[®], Bayer Schering Pharma, Berlin, Deutschland) in einer Dosis von ca. 2 ml/kg KG appliziert werden. Unmittelbar nach der Kontrastmittelgabe (jeweils per Bolusinjektion i.v.) wurde die computertomographische Aufnahme gestartet. War darauf kein Tumor sichtbar, folgten weitere Kontrollen in wöchentlichen Abständen. Ab einer Tumorgröße von 1 cm wurde die Therapie durchgeführt. Zeigte sich jedoch innerhalb von vier Wochen nach Implantation kein zufriedenstellendes Anwachsen des Tumors, wurde das Tier aus dem Versuch genommen und euthanasiert.

3.2.4.4 Durchführung der Therapie

Waren solitäre Tumore im CT-Bild sichtbar, wurden diese Tiere therapiert. Im Falle einer Zerstreuung des Tumors innerhalb der Leber in mehrere Tumore, wurde der größere, kompaktere Tumor für die Therapie bestimmt.

3.2.4.4.1 Therapie mit Paclitaxel, Fantolon und Kontrolle mit Ballonkatheter

Zur lokalen Tumorthherapie wurden unter anderem mit verschiedenen Wirkstoffen beschichtete Ballone verwendet.

Nach einer erneuten medianen Laparotomie, wie schon bei der Tumorimplantation beschrieben, wurde eine Venenpunktkanüle (Braunüle MT[®], 14 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in die Leber bis zur Tumormitte geführt. Dann wurde der Ballonkatheter durch diese bis zum distalen Tumorrand vorgeschoben, die Kanüle wurde um eine Ballonlänge zurückgezogen, so dass der Ballon eine möglichst zentrale Position im Tumor einnahm. Dort wurde der Ballon bei einem Druck von 10 bar expandiert und verblieb in dieser Stellung für eine Minute. Durch sanftes Hin- und Herdrehen des Ballons während dieser Zeit erhoffte man sich eine bessere Abgabe des Wirkstoffes von der Ballonoberfläche auf das Tumorgewebe. Der Ballon wurde deflatiert und vorsichtig wieder entfernt. Danach wurde die Punktkanüle zurückgezogen. Für zwei der Kontrolltiere wurde das gleiche Verfahren mit einem unbeschichteten Ballon durchgeführt. Mit der Behandlung von Kontrolltieren sollte vermieden werden, dass eine mögliche Beeinflussung des Tumorstwachstums durch die mechanische Einwirkung nicht erkannt und als Reaktion auf die Wirkstoffe interpretiert wird.

Als trockene Substanz eingesetzte Wirkstoffe besitzen den Vorteil, dass zur Verabreichung keine Flüssigkeit erforderlich ist, mit der der Arzneistoff aus dem Gewebe gespült werden kann. Der nicht gelöste und in einigen Fällen schwer lösliche Arzneistoff wird über einen längeren Zeitraum am Wirkungsort verbleiben, da er in fester Form nicht so leicht mit dem Blutstrom weggespült werden kann.

3.2.4.4.2 Doxorubicin, Arsentrioxid und Kontrolle mit Injektion

Bei der Durchführung der Therapie bzw. Kontrolle mittels Injektion wurde eine 1-ml-Spritze (Omnifix F Solo, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit einer Kanüle (Braun Sterican®, 23 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet. Die gesamte Injektionsmenge wurde dabei in mehreren Portionen über den gesamten Tumor bis zum angrenzenden Lebersaum verteilt. Dadurch konnte zum einen die Gesamtdosis im Tumor deponiert werden, ohne dass das Injektionsmedium durch den Stichkanal zurückströmte und gleichzeitig wurde durch die Aufteilung der Injektionsmenge der lokale Druck im Tumor reduziert, um ein rasches Abfließen der Zubereitung in das gesunde Gewebe zu verhindern. Für zwei der Kontrolltiere wurde die gleiche Menge einer physiologischen NaCl-Lösung in gleicher Weise appliziert.

3.2.5 Tierschutz und Verträglichkeit

Die folgenden Kriterien zur vorzeitigen Tötung vor dem planmäßigen Versuchsende waren vorgesehen:

- Extremes Tumorwachstum
- Gewichtsverlust von mehr als 20% vom protokollierten Eingangsgewicht
- Apathie
- Deutlich verminderte Futter- oder Wasseraufnahme
- Atemstörungen
- Fieber
- Abnorme Körperhaltung

3.2.6 Euthanasie

Die Euthanasie erfolgte in tiefer Narkose mit 3 ml T 61[®] (Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) i.v. unmittelbar vor der geplanten Tumorentnahme. Der Euthanasiezeitpunkt wurde durch die Ergebnisse der CT-Untersuchung bestimmt. Bei einem starken Tumorwachstum wurde das Tier aus dem Versuch genommen. Im Falle einer Verschlechterung des Gesundheitszustandes wäre die Euthanasie in gleicher Weise erfolgt.

3.2.7 Tumorentnahme

Nach Durchführung einer medianen Laparotomie wurden die Tumore visuell und manuell aufgesucht und der betroffene Leberlappen entnommen. Mit einer chirurgischen Pinzette und Skalpell wurde der Tumor dann vorsichtig unter Erhalt der Tumorkapsel aus dem Lebergewebe herauspräpariert.

3.2.7.1 Aufarbeitung der Tumore zur Reimplantation

Die frisch aus dem Lebergewebe entfernten unbehandelten Tumore wurden in einer mit RPMI-1640-Medium (Sigma Aldrich, St. Luis, USA) gefüllten Petrischale gewaschen und mit Schere und Pinzette von Leberresten und der Tumorkapsel befreit. Das derbelastische hellbeige bis zartrosafarbene Tumorrangewebe wurde in ca. 2 x 2 mm² große Stücke geschnitten und in mit eiskaltem Gefriermedium (Medium mit Earls Salzen, Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland) gefüllte Kunststoffröhrchen (Freezing Vials, Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland) überführt. Das weiche gräuliche nekrotische Gewebe aus dem Tumorrinneren wurde verworfen. Die daraus gewonnenen brauchbaren Tumorstücken wurden unverzüglich bei - 80° C eingefroren. Das so gewonnene Tumormaterial diente dann für die Tumorimplantationen der nachfolgenden Kaninchen dieser Studie. Die ersten Kaninchen aus dieser Studie wurden mit Tumorgewebe aus vorangegangenen Versuchen mit VX2-Tumoren implantiert.

3.2.7.2 Aufarbeitung der Tumore zur Auswertung

3.2.7.2.1 TTC-Färbung

Die TTC-Färbung dient der visuellen Abgrenzung von vitalem zu nekrotischem Gewebe. Die frisch entnommenen Tumore wurden nach sauberer Präparation in gleichmäßige, ca. 3 mm breite Scheiben geschnitten. Für die Herstellung der Färbelösung wurden 2 g 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 100 ml Phosphatpuffer (Waldeck GmbH & Co KG, Münster, Deutschland) gelöst. Die frischen Tumorscheiben wurden in dieser Lösung bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Das farblose TTC wird während dieser Zeit durch Dehydrogenasen zu farbigem Formazan reduziert. Dadurch erhält vitales Gewebe eine kräftig rote Färbung, das nekrotische Gewebe nimmt keine Farbe an und bleibt weißlich (s. Abb. 14 und Abb. 15). Durch Unterscheidung des vitalen von nekrotischem Gewebe konnten unabhängig von einer eventuellen Volumenveränderung der Läsion Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der verwendeten Wirkstoffe gezogen werden.

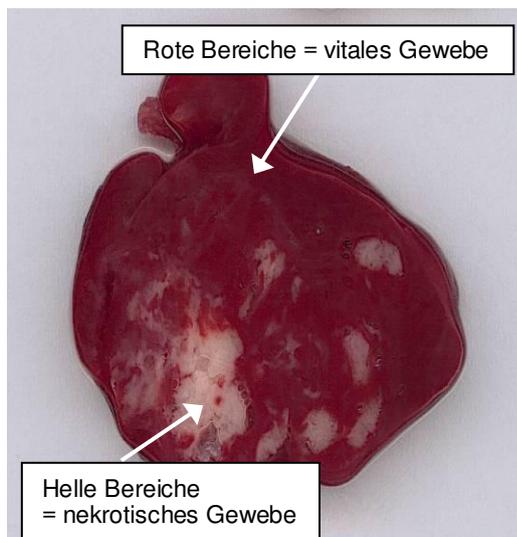


Abb. 14: Kontrolltumor, Färbung mit TTC

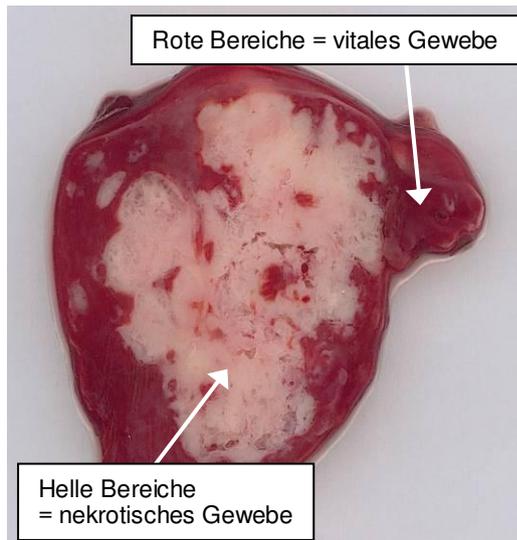


Abb. 15: Tumor nach Behandlung mit Fantolon, Färbung mit TTC

3.2.7.2.2 Histologie

Die zur histologischen Untersuchung entnommenen Tumorproben wurden für 24 h in 4%iger Formalinlösung (J. T. Baker, Deventer, Holland) fixiert und danach in der Histokinette (Leica TP 1020, Leica Microsystems, Nußloch GmbH, Nußloch, Deutschland) in Alkoholreihe und Rotohistol entwässert. Nach Einbettung in Paraffin (Einbettstation, Leica, Wetzlar, Deutschland) wurden von den Präparaten Schnitte (ca. 5 μ m) hergestellt (Mikrotom, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland), mit Hämatoxylin und Eosin (HE) angefärbt und unter einem Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) betrachtet.

3.2.7.2.3 Quantifizierung der Tumorgröße und -vitalität

Computertomographie:

Die Tumorgröße ist in der Computertomographie nach Injektion des Kontrastmittels aufgrund der Unterschiede in der Perfusion zu erkennen. Das vitale Tumorgewebe ist hauptsächlich arteriell versorgt und stellt sich daher gegenüber dem Leberparenchym (überwiegend venös versorgt) früher dar, der nekrotische Anteil des Tumors wird nicht perfundiert und ist aus diesem Grund ebenfalls vom gesunden Leberparenchym zu unterscheiden. Die Tumorgröße ergibt sich aus der Ausdehnung in den einzelnen Schichten (Beispiele Abb. 31, 32) und der Zahl der Schichten, in denen der Tumor zu erkennen ist. Die Schichtdicke der einzelnen CT-Aufnahmen beträgt 1 mm. Die Längen-Messungen in den CT-Aufnahmen erfolgt mit dem Programm CT OsiriX der Fa. Siemens AG.

Nekropsie:

Die Tumore unterscheiden sich in Farbe und Konsistenz von gesundem Lebergewebe.

Vitalität:

Einzelne Schnitte durch die Tumore wurden in TTC-Lösung inkubiert. Nach 30 Minuten erscheinen die vitalen Tumoranteile rot, nekrotische Anteile bleiben farblich unverändert. Es wurde der prozentuale Anteil der Nekrosen am Gesamttumor visuell abgeschätzt.

Histologie:

Einige Tumore wurden histologisch aufgearbeitet. Es konnten nicht von allen Tumoren histologische Präparate angefertigt werden, da für die TTC-Färbung sehr viel Gewebe benötigt wird und speziell bei kleineren Tumoren nicht mehr ausreichend verwertbares Gewebematerial für die Histologie zu Verfügung stand. Allerdings wurde darauf geachtet, dass von mindestens einem Tier pro Gruppe histologische Bilder zur besseren Veranschaulichung erstellt wurden.

3.2.8 Statistische Methoden/Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Untersuchungen dienten als erste Orientierung für die Anwendung einer neuen Methode der lokalen Tumorthherapie. Die Statistik ist folglich ausschließlich deskriptiv/exploratorisch.

Die im Spectralphotometer ermittelten Meßwerte der Zellversuche wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, USA) übertragen.

Die Auftragung der Werte in den Diagrammen wurde ebenfalls mit Excel durchgeführt. Die Untersuchung der Korrelation zwischen Expositionszeit bzw. Wirkstoffkonzentration und Zellvitalität erfolgte mittels SPSS (SPSS Inc. Chicago, USA), wobei der Pearsonsche Korrelationskoeffizient ermittelt wurde. Bei der Untersuchung der Korrelationen wurde der Startwert (zum Zeitpunkt $t=0$) und der Wert ohne Wirkstoffzugabe weggelassen, da nicht untersucht werden sollte, ob sich die Wirkstoffe überhaupt auf die Zellvitalität auswirken, sondern ob es eine Korrelation der Wirkung mit der Expositionsdauer oder der Wirkstoffkonzentration gibt.

Die Aussagen der Diagramme können folgendermaßen bewertet werden:

Einordnung des Korrelationskoeffizienten „r“:

Bis 0,2:	Sehr geringe Korrelation
Bis 0,5:	Geringe Korrelation
Bis 0,7:	Mittlere Korrelation
Bis 0,9:	Hohe Korrelation
Über 0,9:	Sehr hohe Korrelation

Einordnung der Irrtumswahrscheinlichkeit „p“:

$p > 0,05$:	Nicht signifikant
$p \leq 0,05$:	Signifikant
$p \leq 0,01$:	Sehr signifikant
$p \leq 0,001$:	Höchst signifikant

Die Größe der Tumore wurde mittels des medizinischen Computerprogramms „OsiriX Medical Imaging Software“ volumetrisch ausgemessen und ausgewertet. Von jeder Aufnahme (1 mm Schichtdicke), auf welcher der Tumor erkennbar war, wurde die Fläche berechnet und durch Multiplikation mit der Anzahl der gesamten Aufnahmen das Tumorumfang bestimmt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der in vitro Versuche

Folgende Substanzen wurden im Zellkulturversuch an VX2-Zellen getestet:

Paclitaxel, Arsenitrioxid, 5-Fluorouracil, Fantolon, Bortezomib, Doxorubicin und Mitoxantron, sowie DMSO zur Kontrolle und Prüfung der Zytotoxizität als Lösungsmittel auf die der Substanzen.

Die Beurteilung der Hemmung der Zellproliferation erfolgte durch Messung der intramitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität der Proben am Ende der Inkubationszeit. Die Enzymaktivität der Zellen, die nicht mit einer Wirkstofflösung behandelt wurden, wurde gleich 100% gesetzt. Die Enzymaktivität der übrigen Proben wurde in Prozent dieses Wertes angegeben.

4.1.1 Paclitaxel

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Wirkstoffkonzentration von Paclitaxel und der Zellhemmung ergab eine geringe Korrelation.

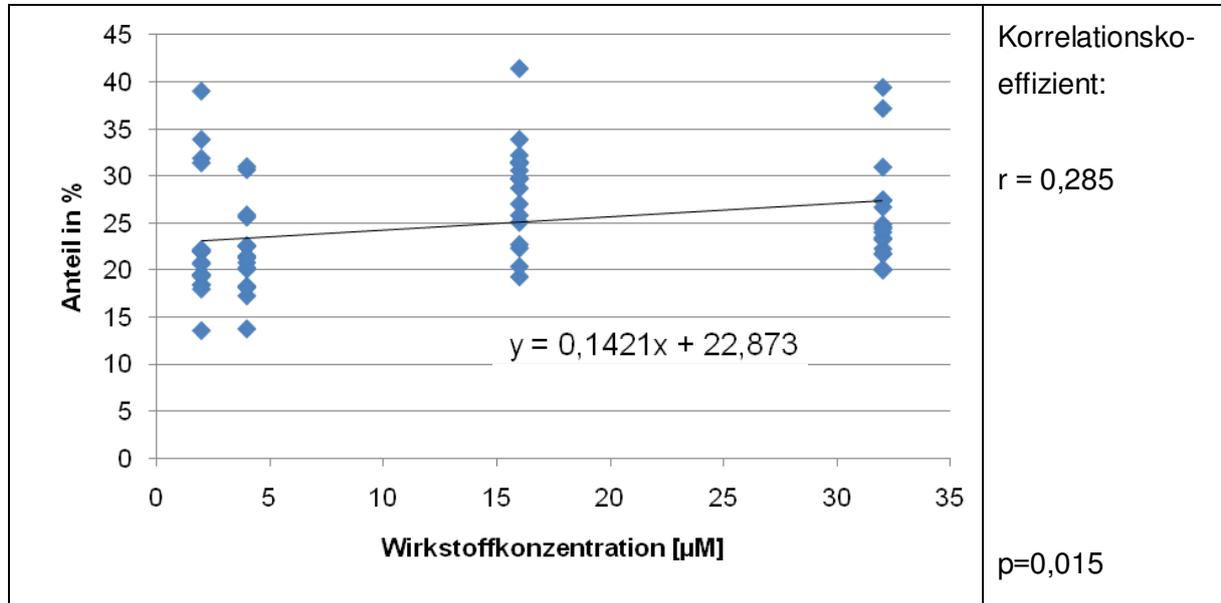


Abb. 16: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Paclitaxel auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt

Es besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen der Expositionszeit und der Zellhemmung.

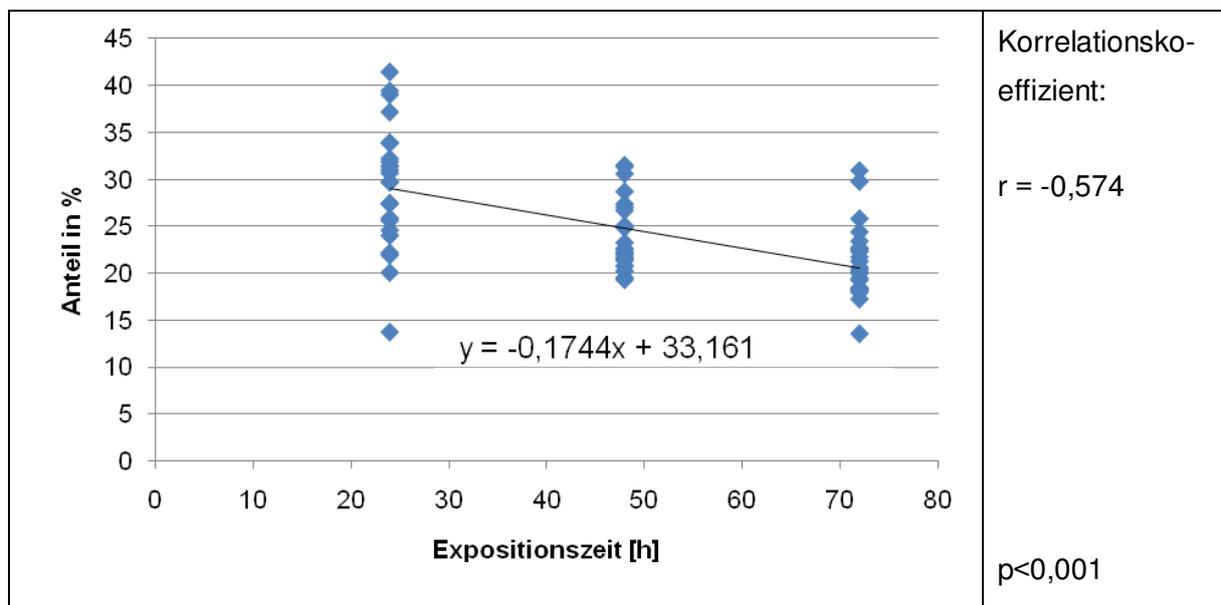


Abb. 17: Einfluss der Expositionszeit von Paclitaxel auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt

Die Mittelwerte für die Zellhemmung durch Paclitaxel schwankten bei 24-stündiger Einwirkung, bei den Mittelwerten für 48 und 72 Stunden stiegen diese jedoch proportional mit der Konzentration an.

Tab. 3: Zellhemmung Paclitaxel

<u>Paclitaxel</u> <u>24 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 $\mu\text{mol/l}$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 $\mu\text{mol/l}$	31,91	31,43	39,07	21,95	22,19	33,92	30,08	6,18
4 $\mu\text{mol/l}$	25,64	30,71	13,75	20,10	25,88	31,03	24,52	6,05
16 $\mu\text{mol/l}$	33,92	31,43	29,74	29,74	32,23	41,48	33,09	4,02
32 $\mu\text{mol/l}$	27,49	37,22	24,04	39,47	24,60	27,41	30,04	6,05

<u>Paclitaxel</u> <u>48 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 $\mu\text{mol/l}$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 $\mu\text{mol/l}$	22,00	22,14	19,55	19,34	19,48	20,81	20,55	1,18
4 $\mu\text{mol/l}$	22,63	21,37	20,25	22,56	20,81	21,51	21,52	0,86
16 $\mu\text{mol/l}$	31,53	30,62	27,05	25,09	31,39	28,73	29,07	2,38
32 $\mu\text{mol/l}$	21,72	22,28	27,40	23,27	26,70	24,88	24,38	2,14

<u>Paclitaxel</u> <u>72 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 $\mu\text{mol/l}$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 $\mu\text{mol/l}$	13,57	18,44	18,44	19,48	17,99	20,65	18,10	2,20
4 $\mu\text{mol/l}$	17,27	18,31	18,18	18,18	22,53	21,30	19,30	1,92
16 $\mu\text{mol/l}$	19,29	25,84	22,34	20,39	22,73	29,81	23,40	3,53
32 $\mu\text{mol/l}$	20,00	23,44	20,13	21,75	24,42	30,97	23,45	3,73

Bei Paclitaxel wurde bereits nach 24 Stunden mit der geringsten Konzentration eine gute Wirkung erreicht. Die Enzymaktivität als Maß der Viabilität wurde zu 70% gehemmt.

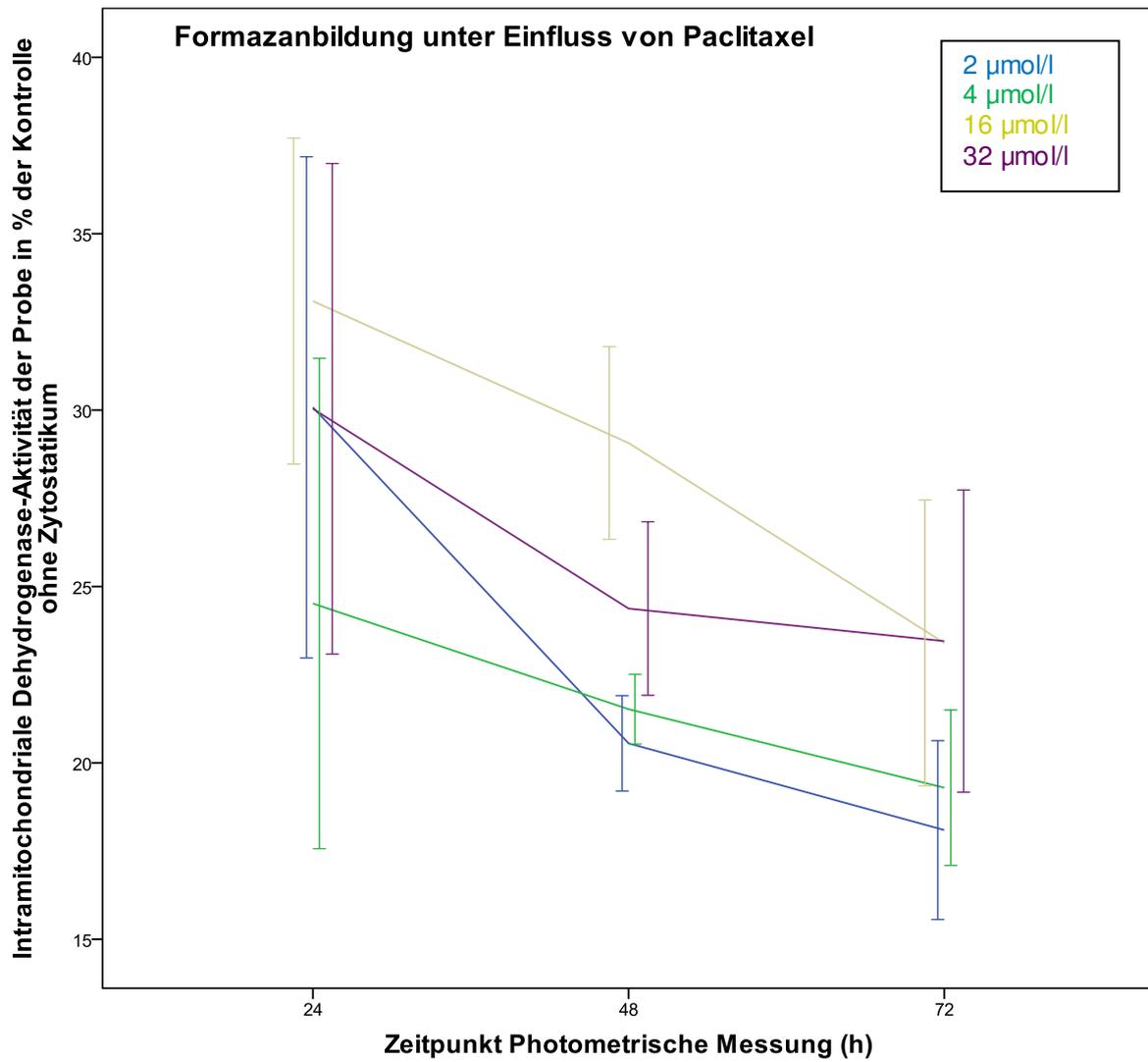


Abb. 18: Exemplarische Darstellung der Formazanbildung am Beispiel von Paclitaxel

Die Behandlung der Zellen mit der dritthöchsten Konzentration Paclitaxel hat die besten Ergebnisse bei diesem Wirkstoff erzielt. Bei einer höheren Konzentration ist ein leichter Abfall der intramitochondrialen Dehydrogenase-Aktivität zu erkennen.

4.1.2 Arsentrioxid

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Wirkstoffkonzentration von Arsentrioxid und der Zellhemmung ergab eine sehr geringe Korrelation.

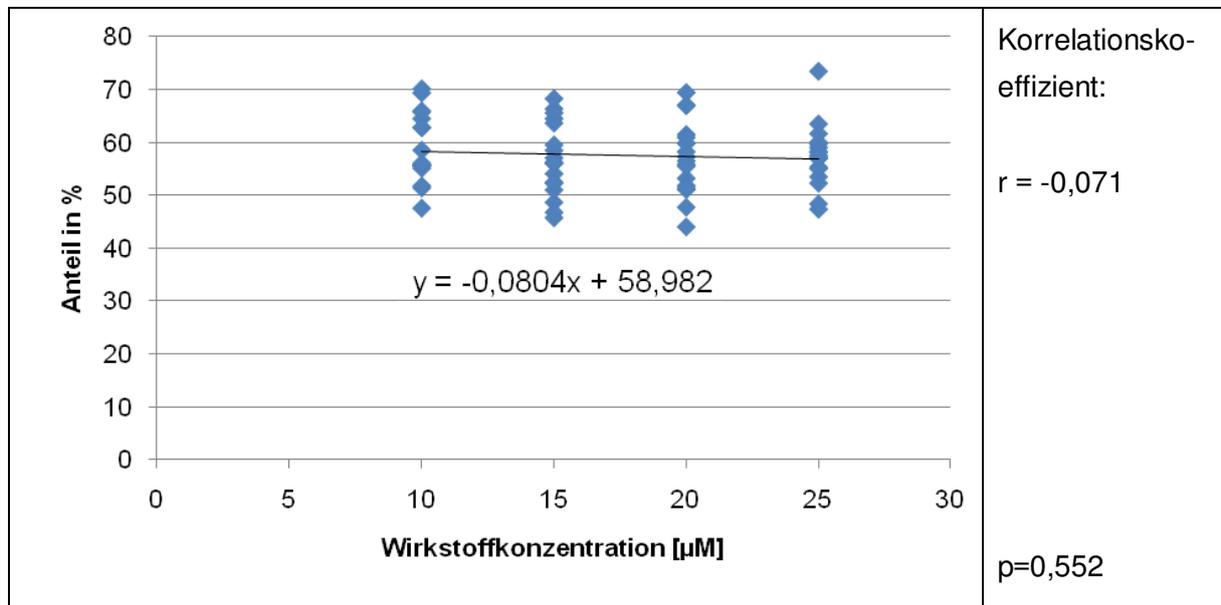


Abb. 19: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Arsentrioxid auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt

Es besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen der Expositionszeit und der Zellhemmung.

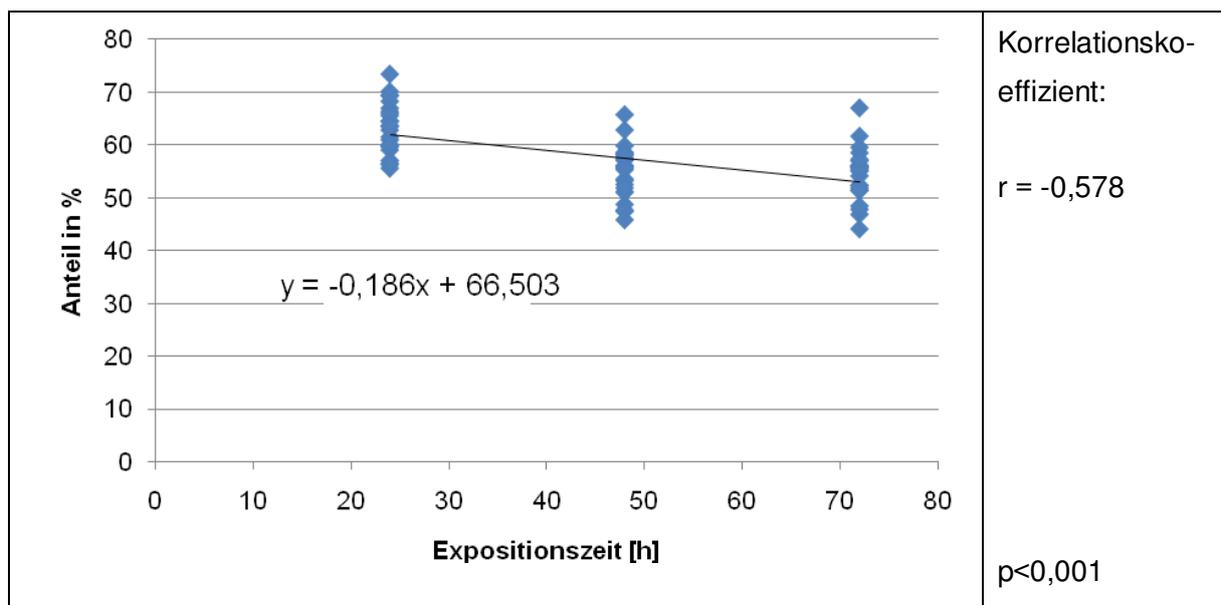


Abb. 20: Einfluss der Expositionszeit von Arsentrioxid auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt

Die Mittelwerte der Zellhemmung von Arsentrioxid sind innerhalb der einzelnen Tage relativ homogen und weisen dort kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationen auf.

Tab. 4: Zellhemmung Arsentrioxid

Arsentrioxid								
24 h	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6		
	Anteil in	Mittel-	Stand.-					
	%	%	%	%	%	%	wert	Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
10 µmol/l	70,11	55,55	62,79	65,95	64,48	69,34	64,70	4,83
15 µmol/l	63,64	66,33	64,48	56,24	65,56	68,26	64,09	3,80
20 µmol/l	66,95	56,47	61,48	60,94	59,86	69,41	62,52	4,37
25 µmol/l	59,01	57,01	73,42	59,63	60,02	63,48	62,10	5,41

Arsentrioxid								
48 h	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6		
	Anteil in	Mittel-	Stand.-					
	%	%	%	%	%	%	wert	Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
10 µmol/l	47,59	65,74	55,76	62,83	55,69	58,53	57,69	5,80
15 µmol/l	56,05	48,69	51,02	57,07	45,77	52,48	51,85	3,94
20 µmol/l	59,84	53,21	57,29	58,24	51,09	51,82	55,25	3,35
25 µmol/l	57,51	47,38	53,50	55,32	58,31	58,09	55,02	3,81

Arsentrioxid								
72 h	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6		
	Anteil in	Mittel-	Stand.-					
	%	%	%	%	%	%	wert	Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
10 µmol/l	55,12	51,41	51,79	55,75	55,63	56,07	54,30	1,93
15 µmol/l	46,80	54,09	52,30	58,50	56,07	59,53	54,55	4,24
20 µmol/l	55,82	47,76	44,05	67,01	51,34	55,50	53,58	7,29
25 µmol/l	52,30	48,40	61,64	55,05	56,97	57,23	55,27	4,15

Beim Arsentrioxid waren laut den Vorversuchen höhere Konzentrationen notwendig als zunächst angenommen. Daher wurde mit einer Konzentration von 10 µmol/l begonnen. Dann wurde in aufsteigender Folge die Konzentration weiter in gleichmäßigen Abständen erhöht. Die Auswirkungen der unterschiedlichen Konzentrationen waren sehr gleichförmig. Die

niedrigste Konzentrationsstufe erreichte also schon gute Ergebnisse mit einer Zellhemmung von etwa 35%. Vom ersten auf den zweiten Tag gab es eine leichte Wirkungsverbesserung auf etwa 45%. Zeitlich darüber hinaus gab es jedoch keinen Wirkungsanstieg.

4.1.3 5-Fluorouracil

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Wirkstoffkonzentration von 5-Fluorouracil und der Zellhemmung ergab eine sehr geringe Korrelation.

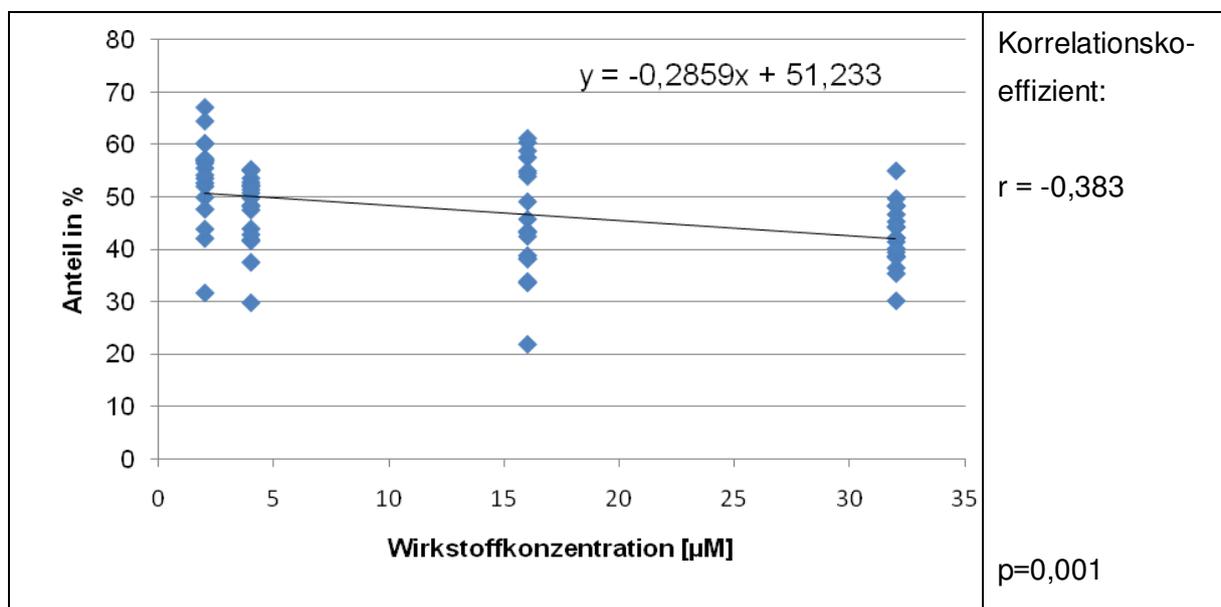


Abb. 21: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von 5-Fluorouracil auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); Messwerte aller Zeitpunkte berücksichtigt

Es besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen der Expositionszeit und der Zellhemmung.

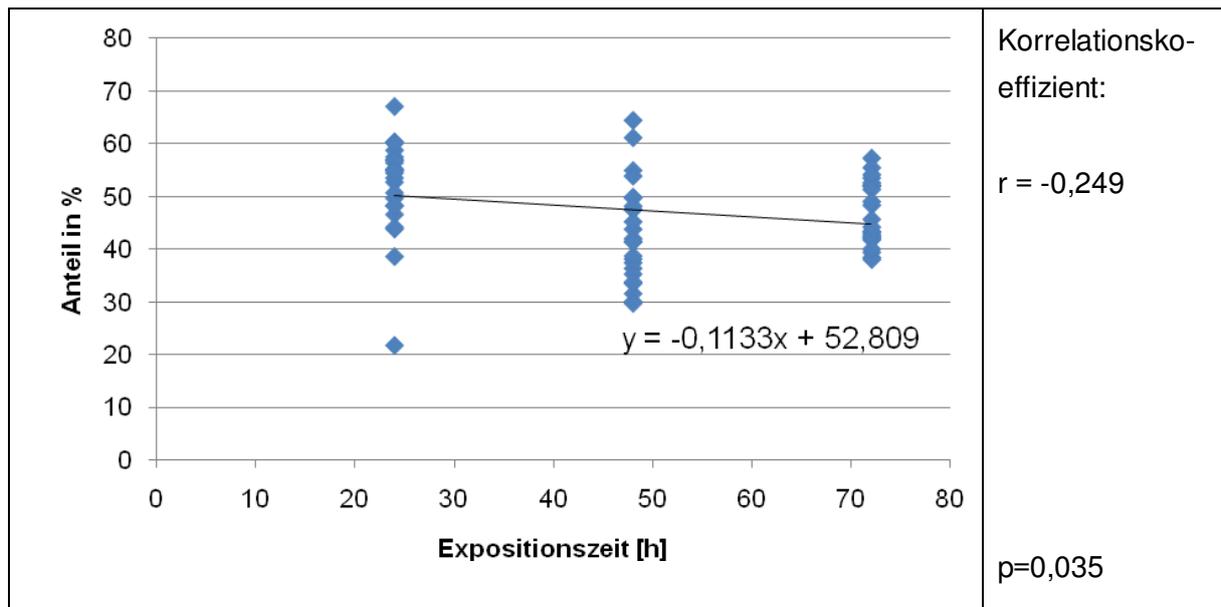


Abb. 22: Einfluss der Expositionszeit von 5-Fluorouracil auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); Messwerte aller Konzentrationen berücksichtigt

Die berechneten Mittelwerte der Zellhemmung durch 5-Fluorouracil schwankten innerhalb der verschiedenen Inkubationszeiten der Zellen. Bei 48 Stunden wurden jeweils etwas niedrigere Werte erreicht, als bei 24 Stunden oder 72 Stunden.

Tab. 5: Zellhemmung 5-Fluorouracil

<u>5-Fluorouracil</u>								
<u>24 h</u>	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6	Mittelwert	Stand.-Abw.
	Anteil in %							
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	67,07	57,00	56,44	60,23	56,84	60,14	59,62	3,67
4 µmol/l	43,88	52,74	55,23	53,54	50,72	54,99	51,85	3,87
16 µmol/l	57,49	58,78	54,51	60,39	21,82	54,91	51,32	13,35
32 µmol/l	38,65	46,62	44,20	49,68	48,23	48,31	45,95	3,69

5- Fluorouracil								
48 h	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6		
	Anteil in	Mittel-	Stand.-					
	%	%	%	%	%	%	wert	Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	49,89	31,62	42,04	47,61	43,83	64,45	46,57	9,86
4 µmol/l	49,75	37,47	29,76	47,47	41,54	48,18	42,36	7,05
16 µmol/l	38,19	38,76	33,55	53,89	61,17	33,83	43,23	10,51
32 µmol/l	54,96	30,12	36,40	35,33	41,40	45,25	40,58	8,00

5- Fluorouracil								
72 h	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6		
	Anteil in	Mittel-	Stand.-					
	%	%	%	%	%	%	wert	Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	57,29	53,52	55,48	51,99	52,62	54,15	54,18	1,78
4 µmol/l	48,36	41,80	51,99	42,78	52,20	51,36	48,08	4,29
16 µmol/l	43,41	45,71	43,20	42,43	38,10	49,06	43,65	3,32
32 µmol/l	42,15	38,45	42,15	39,43	40,06	44,24	41,08	1,96

5-Fluorouracil führt bereits in der niedrigsten Konzentration (2 µmol/l) und kürzesten Exposition zu einer deutlichen Verminderung der als Zeichen der Zellvermehrung gemessenen Enzymaktivität. Die Wirkung wird durch höhere Konzentrationen und längere Expositionszeiten noch etwas verstärkt, überschreitet jedoch 60% Hemmung im Vergleich zur Kontrolle ohne zytostatischen Zusatz nicht.

4.1.4 Fantolon

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Wirkstoffkonzentration von Fantolon und der Zellhemmung ergab eine sehr geringe Korrelation.

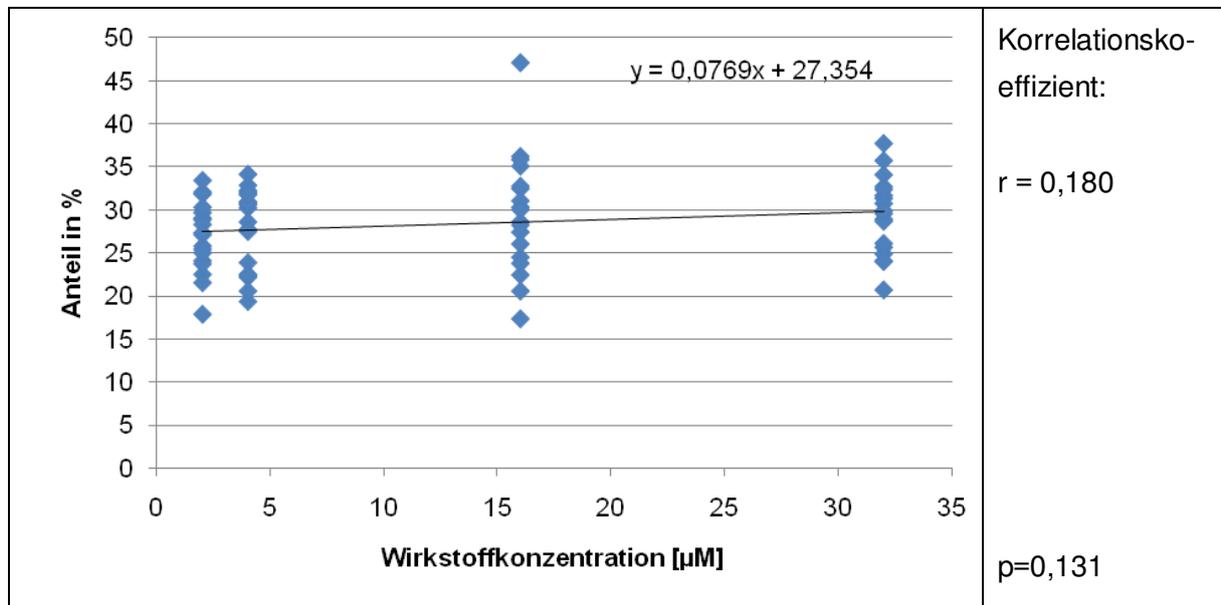


Abb. 23: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Fantolon auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt

Es besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen der Expositionszeit und der Zellhemmung.

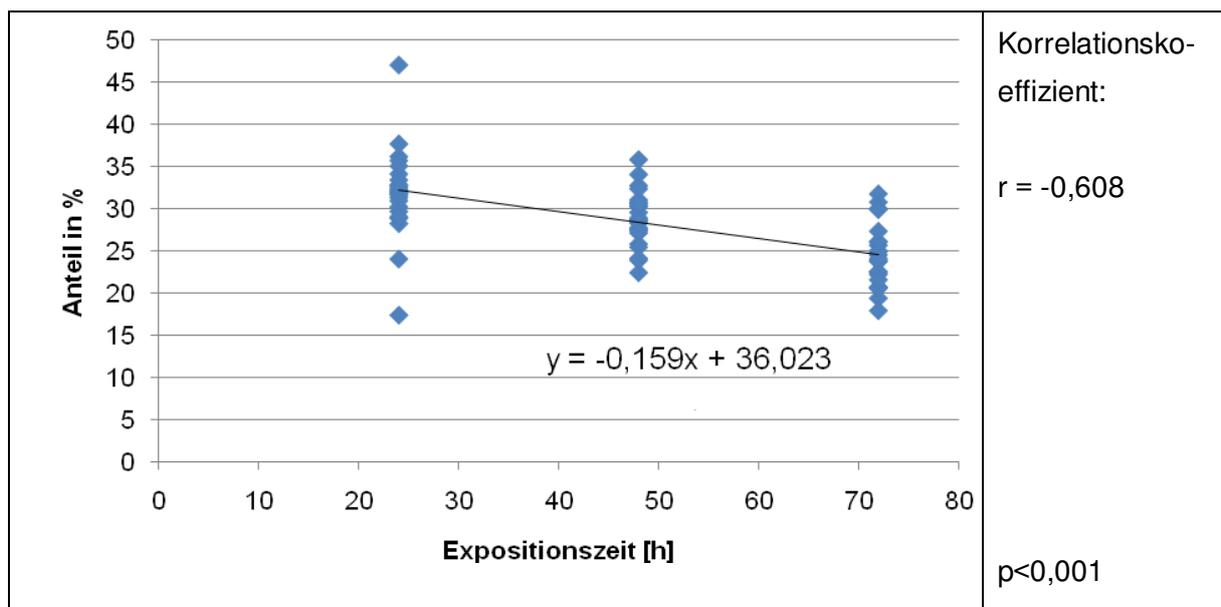


Abb. 24: Einfluss der Expositionszeit von Fantolon auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt

Innerhalb der Mittelwerte für die einzelnen Inkubationszeiten ist ein leicht abnehmender Trend der Zellhemmung mit ansteigender Konzentration erkennbar.

Tab. 6: Zellhemmung Fantolon

Fantolon 24 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	31,85	29,70	32,09	28,90	33,44	29,06	30,84	1,71
4 µmol/l	32,01	34,16	32,88	30,25	30,97	32,25	32,09	1,26
16 µmol/l	36,23	47,13	28,26	17,36	35,11	32,48	32,76	8,96
32 µmol/l	37,74	31,37	24,04	35,75	31,69	32,72	32,22	4,30

Fantolon 48 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	30,33	27,14	25,81	25,44	24,11	28,33	26,86	2,04
4 µmol/l	28,62	22,41	27,74	23,89	27,51	30,62	26,80	2,80
16 µmol/l	30,33	32,77	31,07	28,62	27,44	35,87	31,02	2,76
32 µmol/l	30,77	29,59	34,10	28,92	28,70	32,40	30,75	1,95

Fantolon 72 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	22,52	23,75	25,03	17,89	21,56	27,35	23,02	2,94
4 µmol/l	19,37	20,59	22,20	22,52	30,82	31,79	24,55	4,90
16 µmol/l	24,52	22,46	20,59	23,81	26,06	30,05	24,58	2,98
32 µmol/l	24,90	20,72	25,68	24,07	26,13	29,92	25,24	2,73

Schon bei einer Konzentration von 2 µmol/l und 24 h Expositionszeit wurde eine extreme Hemmung erzielt. Diese war deutlich stärker ausgeprägt als bei Fluorouracil und Arsen-trioxid. Mit steigender Expositionszeit erhöhte sich auch die Zellhemmung gleichmäßig.

4.1.5 Bortezomib

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Wirkstoffkonzentration von Bortezomib und der Zellhemmung ergab eine sehr gering ausgeprägte Korrelation.

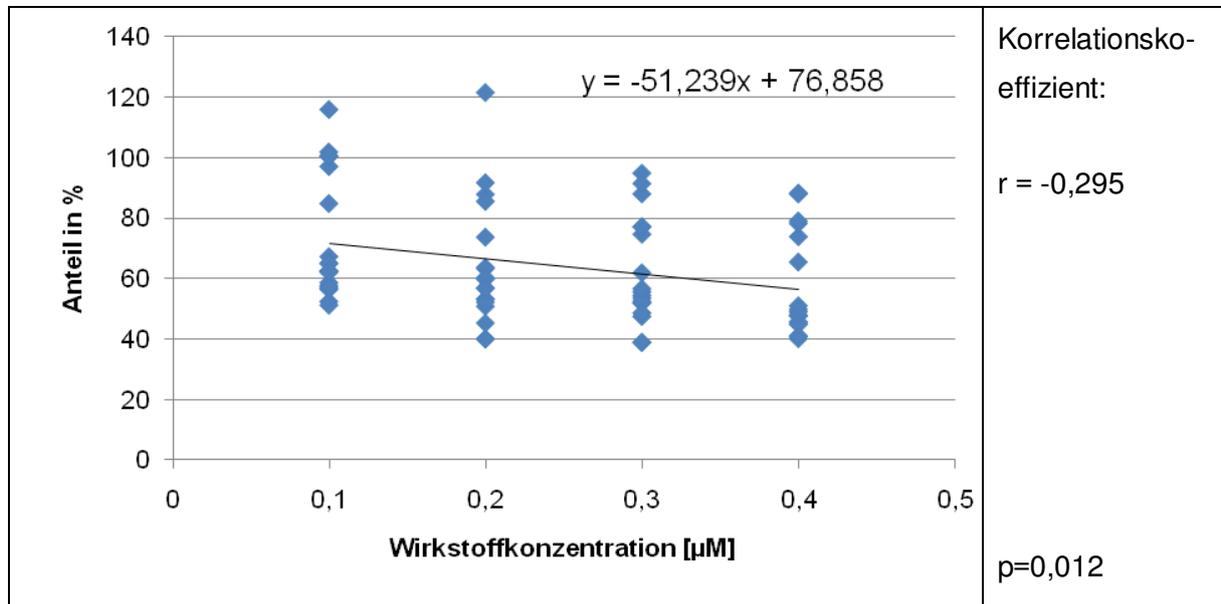


Abb. 25: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Bortezomib auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt

Es besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen der Expositionszeit und der Zellhemmung.

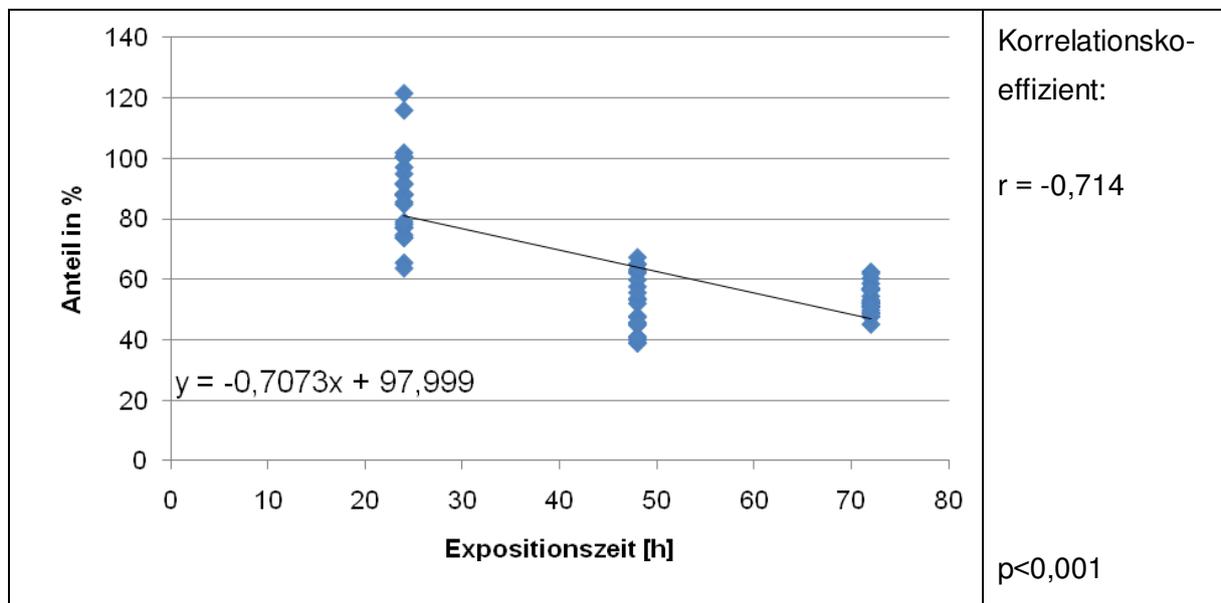


Abb. 26: Einfluss der Expositionszeit von Bortezomib auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt

Bei einer Inkubationsdauer von 24 Stunden und einer Konzentrationsstufe von 0,1 µmol/l ergibt sich ein Mittelwert für die VX2-Zellen von knapp über 100%. In mehreren Wells war

der Zellanteil auf über 100% angestiegen, in einem Well sogar auf 115%. Ursache dafür kann eine zu geringe Konzentration von Bortezomib bei zu geringer Einwirkzeit auf die Zellen sein.

Tab. 7: Zellhemmung Bortezomib

Bortezomib 24 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
0,1 µmol/l	96,98	100,27	101,78	84,77	115,78	100,55	100,02	9,07
0,2 µmol/l	73,66	87,79	121,40	91,63	63,65	85,46	87,27	17,94
0,3 µmol/l	74,62	77,09	77,09	87,93	94,79	91,36	83,81	7,85
0,4 µmol/l	73,80	65,43	78,19	87,93	88,20	79,01	78,76	7,91

Bortezomib 48 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
0,1 µmol/l	62,47	67,22	65,06	57,58	62,04	64,92	63,22	3,06
0,2 µmol/l	53,27	40,12	45,29	39,97	59,81	63,260	50,29	9,15
0,3 µmol/l	38,89	38,96	53,63	51,98	47,45	55,57	47,75	6,70
0,4 µmol/l	47,81	40,12	41,05	44,86	40,91	45,72	43,41	2,87

Bortezomib 72 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
0,1 µmol/l	52,41	51,20	58,62	56,42	57,02	62,43	56,35	3,76
0,2 µmol/l	56,75	53,14	50,80	60,29	52,14	56,82	54,99	3,26
0,3 µmol/l	51,87	54,41	52,54	48,60	56,62	61,90	54,32	4,18
0,4 µmol/l	47,66	47,79	45,12	49,80	49,00	51,00	48,40	1,86

In den Vorversuchen haben von Bortezomib bereits im Verhältnis zu den anderen getesteten Substanzen sehr geringe Konzentrationen ausgereicht, um einen Effekt auf die Zellen zu erzielen. Nach 48 Stunden gab es eine bessere Wirkung als nach 24 Stunden. Allerdings

konnte mit einer längeren Einwirkungsdauer als 48 Stunden keine weitere Verbesserung festgestellt werden. An allen drei Tagen konnte mit aufsteigender Konzentration des Wirkstoffs jeweils eine leichte Verbesserung der Wirkung beobachtet werden, die jedoch bei der gewählten sehr niedrigen Konzentration nicht an die Wirkung anderer bei höherer Konzentration getesteter Substanzen heranreichte.

4.1.6 Doxorubicin

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Wirkstoffkonzentration von Doxorubicin und der Zellhemmung ergab eine sehr geringe Korrelation.

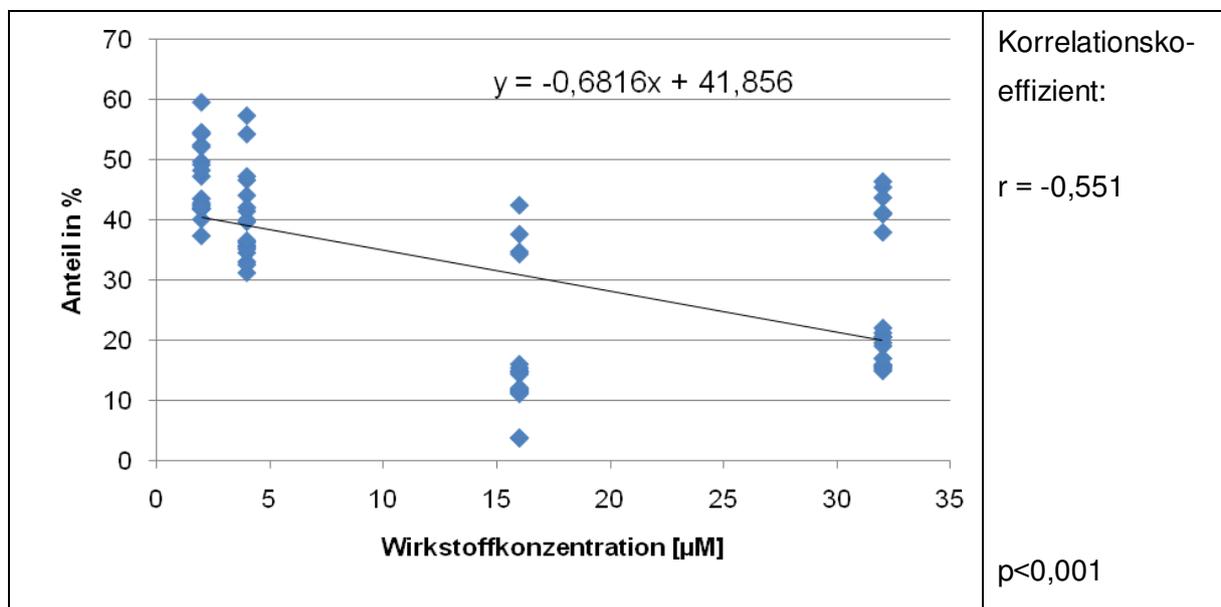


Abb. 27: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Doxorubicin auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt

Es besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen der Expositionszeit und der Zellhemmung.

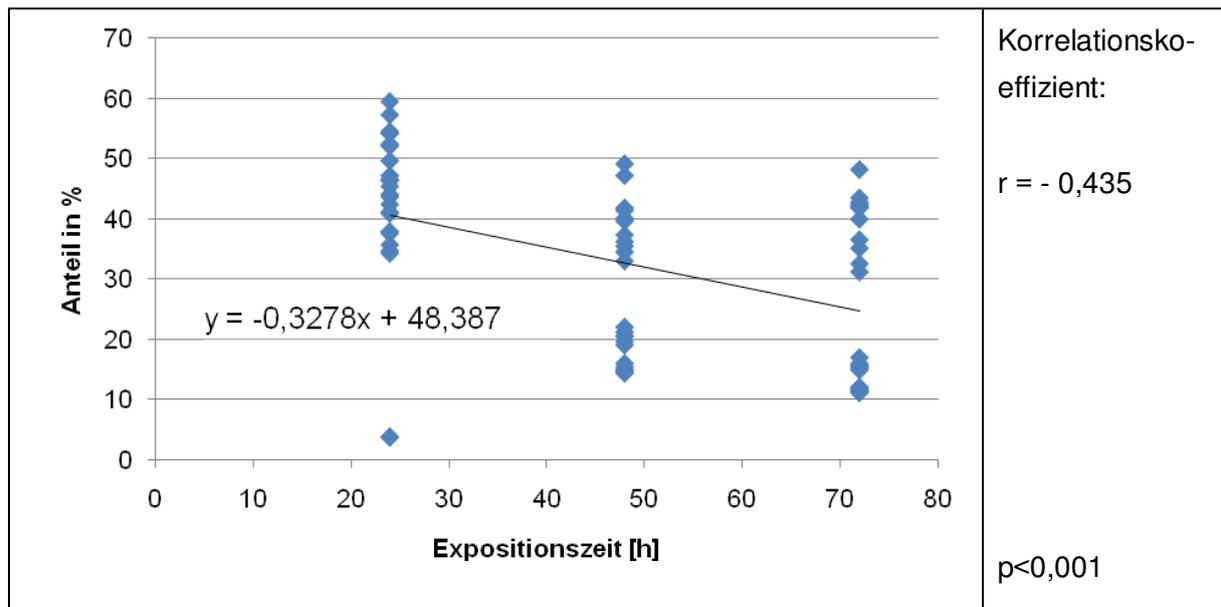


Abb. 28: Einfluss der Expositionszeit von Doxorubicin auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt

Bei der Inkubationszeit von 24 Stunden und einer Konzentration der aufgetragenen Wirkstofflösung von 16 $\mu\text{mol/l}$ lagen im 3. und 5. Well, im Gegensatz zu den anderen Wells aus der Reihe, jeweils nur knapp ein Zehntel dessen Zellaktivität vor.

Tab. 8: Zellhemmung Doxorubicin

<u>Doxorubicin</u>								
<u>24 h</u>	Well 1	Well 2	Well 3	Well 4	Well 5	Well 6		Stand.-
	Anteil in		Abw.					
	%	%	%	%	%	%	Mittelwert	
0 $\mu\text{mol/l}$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 $\mu\text{mol/l}$	52,40	54,22	52,09	54,53	49,65	59,50	53,73	3,04
4 $\mu\text{mol/l}$	54,22	46,57	47,20	44,05	35,70	57,29	47,51	6,99
16 $\mu\text{mol/l}$	37,59	42,40	3,70	34,67	3,79	34,28	26,07	16,01
32 $\mu\text{mol/l}$	45,39	43,66	40,90	37,90	41,13	46,34	42,55	2,89

Doxorubicin 48 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittelwert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	41,78	40,07	47,21	41,78	37,32	49,14	42,88	4,07
4 µmol/l	35,46	33,01	39,63	34,50	36,21	41,41	36,70	2,92
16 µmol/l	14,94	14,65	15,39	14,35	14,72	15,99	15,01	0,54
32 µmol/l	20,52	21,19	19,55	19,03	20,52	22,01	20,47	0,98

Doxorubicin 72 h	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittelwert	Stand.- Abw.
0 µmol/l	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 µmol/l	43,49	42,78	41,82	42,46	48,20	42,14	43,48	2,17
4 µmol/l	39,95	31,19	32,54	35,12	36,53	42,01	36,22	3,82
16 µmol/l	11,66	11,34	11,79	11,34	11,08	12,05	11,54	0,32
32 µmol/l	14,88	15,72	15,44	15,21	15,91	16,95	15,69	0,66

Die berechneten Mittelwerte weisen teilweise eine starke Streuung auf. Durch eine höhere Konzentration konnten nur bedingt bessere Ergebnisse erzielt werden. Auffällig ist jedoch, dass an allen drei gemessenen Tagen die Wirkung bei der Konzentration mit 16 µmol/l am besten abschnitt und sich damit als optimalste Konzentration des Wirkstoffs Doxorubicin erwies.

4.1.7 Mitoxanthron

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Wirkstoffkonzentration von Mitoxanthron und der Zellhemmung ergab eine sehr geringe Korrelation.

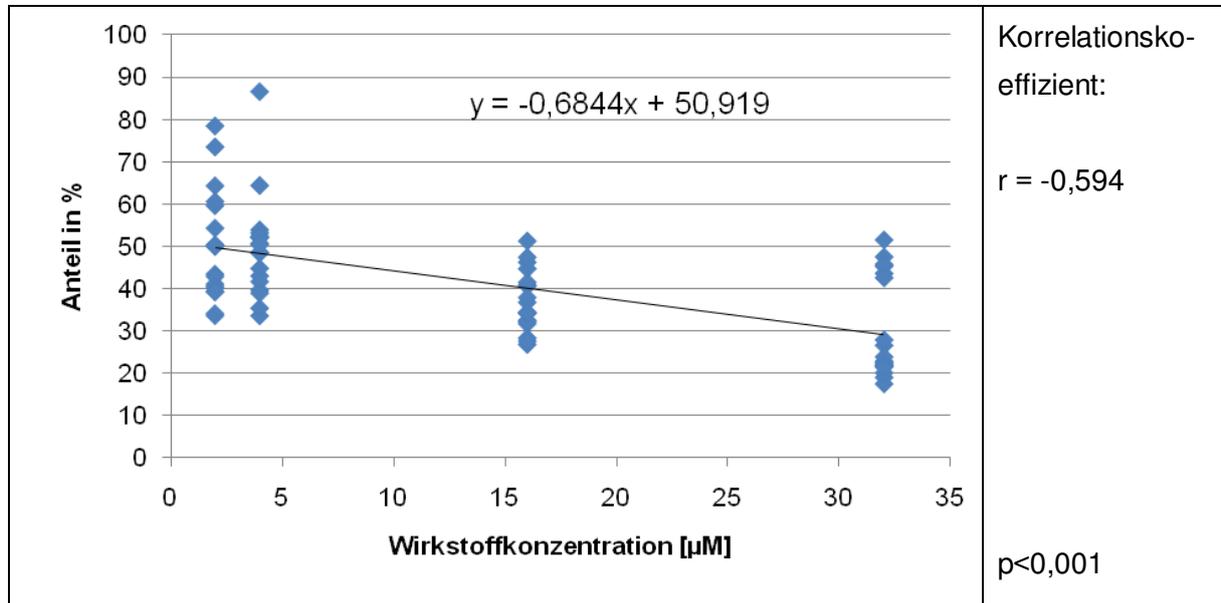


Abb. 29: Einfluss der Wirkstoffkonzentration von Mitoxanthron auf die Zellhemmung (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Zeitpunkte berücksichtigt

Es besteht eine sehr geringe Korrelation zwischen der Expositionszeit und der Zellhemmung.

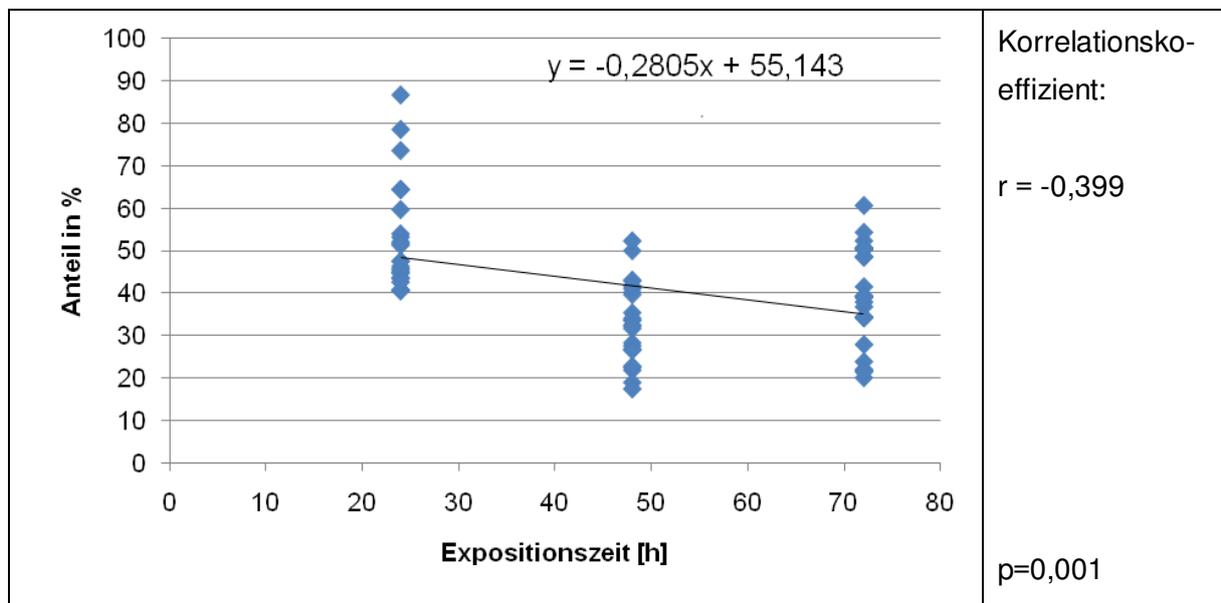


Abb. 30: Einfluss der Expositionszeit von Mitoxanthron auf die Zellhemmung; (Ordinate = intramitochondriale Dehydrogenase-Aktivität der Probe in % der Kontrolle ohne Zytostatikum); alle Konzentrationen berücksichtigt

Die Mittelwerte für die Zellaktivität sinken im Vergleich von 24 Stunden zu 48 Stunden sehr gut ab. Nach 72 Stunden gibt es jedoch keine weitere Abnahme, eher einen leichten Anstieg.

Tab. 9: Zellhemmung Mitoxanthron

<u>Mitoxanthron</u> <u>24 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 $\mu\text{mol/l}$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 $\mu\text{mol/l}$	40,56	43,47	59,69	73,61	78,57	64,39	60,05	14,15
4 $\mu\text{mol/l}$	52,09	53,97	44,83	86,68	64,47	53,20	59,21	13,56
16 $\mu\text{mol/l}$	44,75	51,32	40,73	46,29	40,82	47,48	45,23	3,72
32 $\mu\text{mol/l}$	47,57	45,35	43,64	45,77	42,61	51,58	46,09	2,92

<u>Mitoxanthron</u> <u>48 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 $\mu\text{mol/l}$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 $\mu\text{mol/l}$	41,11	42,92	40,17	33,67	34,10	50,00	40,33	5,54
4 $\mu\text{mol/l}$	33,60	35,40	39,67	43,06	41,69	52,31	40,96	6,06
16 $\mu\text{mol/l}$	26,81	31,72	28,32	27,60	32,51	32,23	29,87	2,34
32 $\mu\text{mol/l}$	22,54	21,89	22,83	19,00	17,49	26,59	21,72	2,91

<u>Mitoxanthron</u> <u>72 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
0 $\mu\text{mol/l}$	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
2 $\mu\text{mol/l}$	50,31	39,33	54,35	50,40	39,33	60,67	49,07	7,70
4 $\mu\text{mol/l}$	52,33	50,75	48,46	48,64	38,98	50,48	48,27	4,36
16 $\mu\text{mol/l}$	41,53	36,79	34,24	37,93	34,24	34,42	36,53	2,64
32 $\mu\text{mol/l}$	21,69	20,11	23,88	22,04	21,51	27,92	22,86	2,52

Bei der Behandlung der Zellen mit Mitoxanthron konnte eine Steigerung der Wirksamkeit zwar nicht nach der Zeitdauer, jedoch mit aufsteigender Konzentration beobachtet werden. Möglicherweise hätten mit einer höheren Konzentration über 32 $\mu\text{mol/l}$ noch bessere Ergebnisse erreicht werden können.

Nachfolgend wurden zur besseren Übersicht alle Mittelwerte der Zellhemmung aus den vorgestellten Zellkulturversuchen in Tabelle 10 zusammengefasst:

Tab. 10: Mittelwerte der Zellhemmung aus den in vitro Versuchen

Paclitaxel	Inkubationszeit in h		
	24	48	72
Konzentration			
2 μmol	30,1	20,6	18,1
4 μmol	24,5	21,5	19,3
16 μmol	33,1	29,1	23,4
32 μmol	30,0	24,4	23,5

Fantolon	Inkubationszeit in h		
	24	48	72
Konzentration			
2 μmol	30,8	26,9	23,0
4 μmol	32,1	26,8	24,6
16 μmol	32,8	31,0	24,6
32 μmol	32,2	30,8	25,2

Mitoxantron	Inkubationszeit in h		
	24	48	72
Konzentration			
2 μmol	60,1	40,3	49,1
4 μmol	59,2	41,0	48,3
16 μmol	45,2	29,9	36,5
32 μmol	46,1	21,7	22,9

5-Fluoruracil	Inkubationszeit in h		
	24	48	72
Konzentration			
2 μmol	59,6	46,6	54,2
4 μmol	51,9	42,4	48,1
16 μmol	51,3	43,2	43,7
32 μmol	46,0	40,6	41,1

Doxorubicin	Inkubationszeit in h		
	24	48	72
Konzentration			
2 μmol	53,7	42,9	43,5
4 μmol	47,5	36,7	36,2
16 μmol	26,1	15,0	11,5
32 μmol	42,6	20,5	15,7

Bortezomib	Inkubationszeit in h		
	24	48	72
Konzentration			
0,1 μmol	100,0	63,2	56,4
0,2 μmol	87,3	50,3	55,0
0,3 μmol	83,8	47,8	54,3
0,4 μmol	78,8	43,4	48,4

Arsentrioxid	Inkubationszeit in h		
	24	48	72
Konzentration			
10 μmol	64,7	57,7	54,3
15 μmol	64,1	51,9	54,6
20 μmol	62,5	55,3	53,6
25 μmol	62,1	55,0	55,3

4.1.8 Kontrolle/DMSO

Da alle verwendeten Substanzen für die Behandlung der VX2-Zellen mit DMSO in Lösung gebracht wurden, sollte eine Kontrolle Aufschluss über das Maß der Zelltoxizität des DMSO-Anteils (1,25%/Well) geben. Hierdurch sollte überprüft werden, inwiefern tatsächlich die eingesetzten Substanzen auf die VX2-Zellen einwirkten.

Tab. 11: Zellhemmung DMSO

<u>2,5% DMSO</u> <u>24 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
Medium	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
DMSO	115,08	81,22	101,28	121,48	94,72	124,04	106,30	15,33

<u>2,5% DMSO</u> <u>48 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
Medium	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
DMSO	94,71	100,24	114,30	105,53	98,32	81,61	99,12	10,00

<u>2,5% DMSO</u> <u>72 h</u>	Well 1 Anteil in %	Well 2 Anteil in %	Well 3 Anteil in %	Well 4 Anteil in %	Well 5 Anteil in %	Well 6 Anteil in %	Mittel- wert	Stand.- Abw.
Medium	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	
DMSO	89,28	64,15	78,82	83,57	76,71	86,20	79,79	8,17

Mit ansteigender Zeitdauer wurde eine zunehmende Verminderung der Enzymaktivität gemessen. Die Hemmung erreichte am 3. Tag 20%. Innerhalb der ersten beiden Tage war der Einfluss von DMSO auf die Zellen nur äußerst gering und kann daher zumindest für diesen Zeitraum auch für die anderen getesteten Substanzen vernachlässigt werden (s. Tab. 11).

4.1.9 Überblick über die Ergebnisse der Zellkulturversuche

Bei den Konzentrationen der Wirkstofflösungen konnten die einzelnen Abstufungen nicht für alle Substanzen einheitlich verwendet werden, da diese in mehreren Vorversuchen nach und nach angepasst wurden. Für Bortezomib wurden die Dosierungen im Verlauf der Vorversuche immer niedriger, bis Unterschiede unter den einzelnen Konzentrationsstufen erkennbar waren. Für das Doxorubicin galt Ähnliches, nur dass hier die Dosierungen schrittweise erhöht werden mussten, bis sich Auswirkungen auf die VX2-Zellen zeigten.

Zur besseren Veranschaulichung gibt die nachstehende Tabelle 12 noch einmal die Tendenzen der zuvor dargestellten Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen wieder:

Tab. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse in vitro Versuche

	Mittelwert Wirkstoff	Signifikanz	Mittelwert Wirkstoff	Signifikanz	Mittelwert Wirkstoff	Signifikanz	Maximale Verminderung der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle auf %	Konzentrationsabhängige Änderung der Enzymaktivität	Änderung der Enzymaktivität bei längerer Expositionszeit
Inkubationszeit	24 h		48 h		72 h				
Paclitaxel	33,09	< 0,001	29,07	< 0,001	23,45	< 0,001	18±2	erhöht	vermindert
Fantolon	32,76	< 0,001	31,02	< 0,001	25,24	< 0,001	23±3	nein	vermindert
Mitoxantron	60,05	< 0,001	40,33	< 0,001	49,07	< 0,001	22±3	vermindert	vermindert
Bortezomib	100,02	0,44	63,22	< 0,001	56,35	< 0,001	43±3	vermindert	vermindert
5-Fluorouracil	59,62	< 0,001	46,57	< 0,001	54,18	< 0,001	41±8	vermindert	vermindert
Arsentrioxid	64,70	< 0,001	57,69	< 0,001	55,27	< 0,001	52±4	nein	vermindert
Doxorubicin	53,73	< 0,001	42,88	< 0,001	43,48	< 0,001	12±3	vermindert	vermindert
Kontrolle	106,30		99,12		79,79				

Zusammengefasst kann die Aussage getroffen werden, dass sämtliche Zytostatika in den verwendeten Konzentrationen zu einer Verminderung der Enzymaktivität in den Zellkulturen führten, was auf eine verminderte Zellvermehrung hinweist. In den meisten Fällen ergab eine höhere Zytostatika-Konzentration eine stärkeren Hemmung der Enzymaktivität und in allen Fällen nahm der Effekt mit der Inkubationsdauer zu. Das als Lösungsvermittler eingesetzte DMSO hatte bei 3-tägiger Exposition einen gleichgerichteten, jedoch schwächeren Effekt.

Für die jeweils höchsten Mittelwerte der Zellhemmung einer Substanz wurden mittels eines TTests (Typ 2) die Signifikanzen bestimmt. Die Berechnung erfolgte jeweils gegen die zeitlich entsprechende DMSO-Kontrolle.

Für fast alle Substanzen ergaben sich zu allen Inkubationszeiten Werte $< 0,001$. Dies entspricht einer höchst signifikanten Wirksamkeit. Nur Bortezomib zeigte bei dem Mittelwert bei 24 h einen Wert von 0,44 und gilt daher bei dieser Inkubationsdauer als nicht signifikant wirksam (s. Tab. 12).

Der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest wurde zur Überprüfung der Normalverteilung eingesetzt. Sämtliche Werte waren nicht signifikant und daher normalverteilt. Aus diesem Grund wurde die Pearson-Korrelation zur Ermittlung des Korrelationskoeffizienten verwendet.

4.1.10 Begründung Auswahl verwendeter Wirkstoffe unter Berücksichtigung der Zellversuche

Nach der Auswertung der Zellversuche sowie der Vorversuche, bei denen versucht wurde, die Wirkstoffe in einer akzeptablen Form auf die Ballonkatheter aufzutragen und aufgrund von Erfahrungswerten wurde eine Auswahl an Wirkstoffen getroffen, die im Tiermodell näher untersucht werden sollten.

Für die Aufbringung der Wirkstoffe auf die Ballonkatheter war die Voraussetzung, dass die Stoffe in den einsetzbaren Lösungsmitteln in der notwendigen Konzentration gelöst werden konnten.

Der Einsatz von Paclitaxel stand schon vor Versuchsbeginn fest, weil von der Arbeitsgruppe bereits im kardio-vaskulären Bereich sehr gute Erfolge damit erzielt wurden. Bortezomib ist bei systemischer Gabe in sehr niedriger Dosis wirksam (Palumbo et al., 2008), erwies sich aber in laufenden Versuchen der Arbeitsgruppe zur Hemmung der Neointimaprolieration nach Angioplastie als unwirksam.

Fantolon sollte wegen seiner besseren Wasserlöslichkeit und stärkeren Rezeptoraffinität vergleichend zu Paclitaxel überprüft werden.

Für das Arsentrioxid war nicht nur der Zellversuch ausschlaggebend, sondern auch bisher veröffentlichte aussichtsreiche Forschungsergebnisse (Walker et al., 2010, Kim et al., 2009, Dilda und Hogg, 2007). Allerdings wurde unter anderem aufgrund der Löslichkeitsproblematik eine andere Applikationsform als der Ballonkatheter verwendet. Die Entscheidung fiel auf das Gel.

Das Doxorubicin verursachte selbst in der viskösen Form Schwierigkeiten beim Auftragen auf die Ballonkatheter. Daher wurde beschlossen, das Doxorubicin in der gelartigen Formulierung direkt in den Tumor zu injizieren.

Mitoxantron (ungenügende Haftung am Ballon), Bortezomib (Beschaffbarkeit und Handhabung schwierig) und 5-Fluoruracil (hohe Dosis erforderlich) erfüllten die Anforderungen am wenigsten und wurden deshalb in vivo nicht überprüft.

In den nachfolgenden in vivo Versuchen konnte verglichen werden inwieweit die Ergebnisse aus dem Zellversuch tatsächlich auf den tierexperimentellen Teil übertragbar sind.

4.2 Ergebnisse der in vivo Versuche

Je Wirkstoff wurden 4 Tiere untersucht, 4 weitere Tiere erhielten die gleiche Behandlung ohne Verabreichung eines Arzneistoffs (s. Tab. 13). Nur von einigen großen Tumoren wurden Proben für die Histologie entnommen, da die Tumorteile vorrangig für die Beurteilung der Vitalität des Gewebes (TTC-Färbung) verwendet wurden.

Tab. 13: Auswertungen an den VX2-Tumoren

Versuchsgruppe	Anzahl der behandelten Tiere	Computer-tomographie: Vermessung Tumore mit Programm OsiriX (Tierzahl)	TTC-Test (Tierzahl)	Makroskopische Begutachtung und Schätzung des Nekroseanteils (Tierzahl)	Histologische Aufarbeitung Tumore (Tierzahl)
Paclitaxel	4	4	4	4	2
Fantolon	4	4	4	4	2
Doxorubicin	4	4	4	4	2
Arsentrioxid	4	4	4	4	4
Kontrolle Ballonkatheter	2	2	2	2	1
Kontrolle Injektion	2	2	2	2	0
Insgesamt:	20	20	20	20	11

In den Abschnitten 4.2.1 - 4.2.5 werden die Befunde anhand von Beispielen qualitativ beschrieben, in den Abschnitten 4.2.6 und 4.2.7 sind die Ergebnisse der quantitativen Auswertung für alle Untersuchungen dargestellt.

4.2.1 Beispiele der computertomographischen Untersuchungen

Ein Woche nach der Implantation der VX2-Tumore wurden die Kaninchen erstmalig computertomographisch gescannt. Hierbei wurde zunächst ein allgemeines Anwachsen des eingeführten Tumormaterials in der Leber geprüft und, sofern dieses vorhanden, eine Vermessung des Tumors bzw. Perfusionsdefektes vorgenommen.

In der nativen CT (ohne Kontrastmittelinjektion) unterscheidet sich das intrahepatische Tumorgewebe häufig nicht von dem gesunden Lebergewebe. Der VX2 Tumor stellt sich für kurze Zeit nach Kontrastmittelinjektion als kontrastmittelarmer, dunkler Perfusionsdefekt dar. Nekrotisches Tumorgewebe und nekrotisches Lebergewebe zeigen sich ebenso.

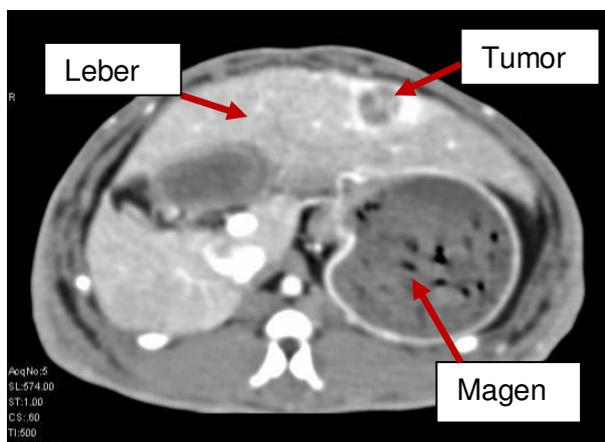


Abb. 31: CT-Untersuchung vor Therapie

Auf dieser Aufnahme (s. Abb. 31) kann man nach Injektion des Kontrastmittels Ultravist-370® den Perfusionsdefekt deutlich erkennen. Die Implantation des Tumors liegt hier zwei Wochen zurück und es ist ein idealer Zeitpunkt für die Durchführung der Therapie.

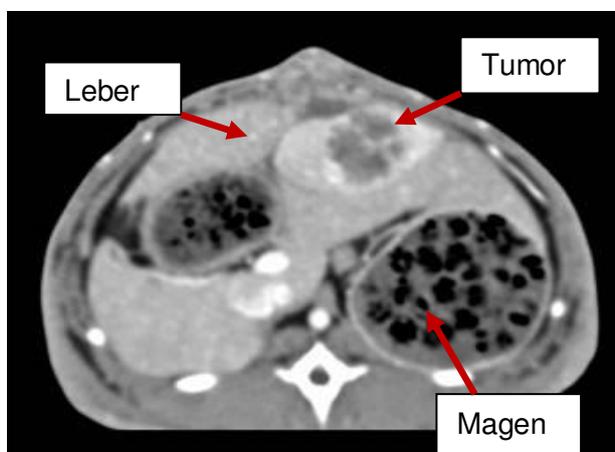


Abb. 32: CT-Untersuchung nach Therapie

Die CT-Aufnahme (s. Abb. 32) zeigt dasselbe Kaninchen wie auf dem oberen Bild, eine Woche nach der Therapie mit einem Paclitaxel beschichteten Ballonkatheter. Der dort sichtbare Perfusionsdefekt hat zwar erheblich an Größe zugenommen, bleibt jedoch hinter den durchschnittlichen Ergebnissen der Kontrolltiere weit zurück. Daraus lässt sich ableiten, dass zwar keine Rückbildung oder Stase des Tumors erfolgte, aber scheinbar eine Verlangsamung des Wachstums erreicht werden konnte.

4.2.2 Beispiele makroskopische Untersuchung der Tumore ohne/mit TTC-(Vital-)Färbung

Nach der Entnahme der Leber wurden die Tumore aus dem Lebergewebe sorgfältig herauspräpariert und standen zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

4.2.2.1 Tumore nach der Präparation aus der Leber



Abb. 33: Präparierte VX2-Tumore aus der Kontrollgruppe

Die Tumore auf Abb. 33 stammen aus der Kontrollgruppe direkt nach der Präparation aus dem Lebergewebe. Morphologisch stellen sich die Tumore als mehrkugelige rosa-beige Gebilde dar. Vor dem Anschnitt erscheint die Konsistenz derb-elastisch und prall.

4.2.2.2 Tumore nach der Vitalitätsfärbung mit TTC

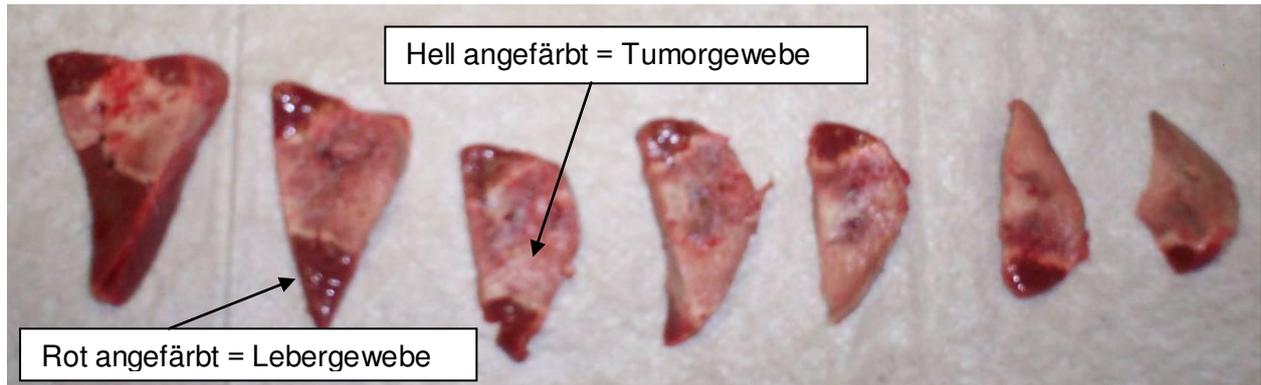


Abb. 34: Vitalitätsfärbung VX2-Tumore aus der Arsentrioxidgruppe

Nach der Behandlung mit Arsentrioxid (hohe Dosis) wies die entnommene Leber bereits makroskopisch einen deutlichen Unterschied zu den anderen entnommenen Gewebeproben auf. Die Strukturveränderung des den Tumor umgebenden Gewebes hatte sich im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen enorm ausgedehnt.

Ein partagierter Tumor mit Anteilen von Lebergewebe (s. Abb. 34) aus der Arsentrioxidgruppe wurde mit Einsatz des TTC-Tests im Hinblick auf die Vitalität überprüft.

Es sind deutlich die nekrotischen (hellen) Anteile vom vitalen Gewebe (dunkelrot) differenzierbar. Allerdings ist es möglich, dass es sich in den Randzonen der Nekrose nicht nur um Tumor, sondern eventuell um von Arsentrioxid destruiertes Lebergewebe handelt.

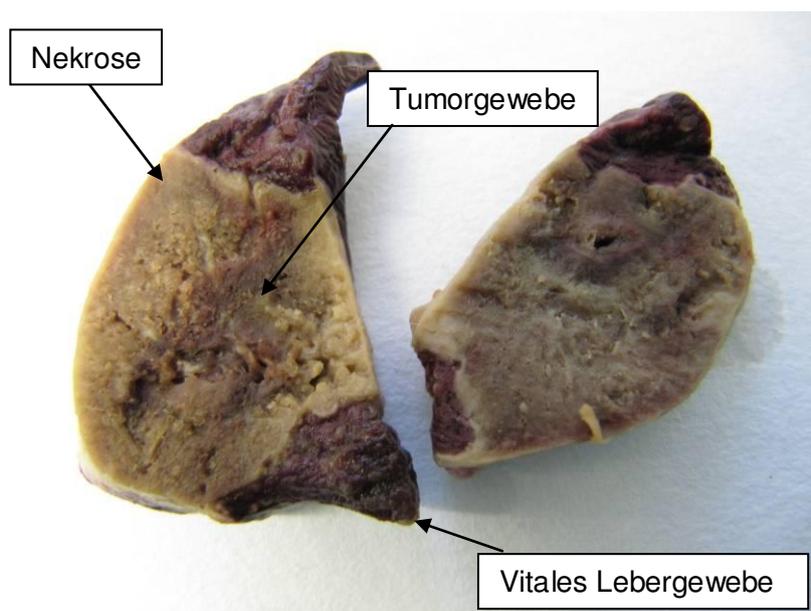


Abb. 35: Tumor Arsentrioxidtherapie nach TTC-Test

Diese Tumorproben (s. Abb. 35) waren zwischen der Färbung und den Fotoaufnahmen tiefgefroren und zeigen daher im Vergleich zu den anderen, am Entnahmetag aufgenommenen Tumoren, eine bräunliche Verfärbung. Diese ändert aber nichts am Ergebnis des TTC-Tests. Diese Tumore wurden hier großzügig einschließlich des visuell intakten Lebergewebes herauspräpariert, da bei den arsenitoxidtherapierten Tumoren diese nicht mehr eindeutig von vitalem/avitaalem Lebergewebe zu differenzieren waren. Der rotbraune Bereich stellt vitales Lebergewebe dar. Daran grenzt ein gleichmäßig ockerfarbener Rand, der ein durch Arsenitoxid verursachter Nekrosesaum der Leber zu sein scheint. Zentral davon ist der unstrukturierte Bereich des ursprünglichen Tumors abzugrenzen. Das Areal des Tumorbereiches scheint nicht größer zu sein, als bei der CT-Aufnahme vor der Therapie. Die letzte CT-Aufnahme konnte nicht mit der ersten CT-Untersuchung abgeglichen werden, da in dieser Aufnahme der gesamte nekrotische Bereich, einschließlich des nekrotischen Leber-saumes als einheitliche Läsion dargestellt wird.

Es ist anzunehmen, dass ein Teil des Arsenitoxidgels aus dem zu behandelnden Tumor hinaus- und in das umliegende gesunde Lebergewebe hineingeflossen ist. Dadurch ist das Lebergewebe abgestorben und hat quasi eine Barriere gegen die Ausbreitung des Tumors geschaffen. Ähnlich wird es auch bei lokal ablativen Therapien gehandhabt, dass ein Sicherheitssaum um das Tumoreal mit behandelt wird (Delis et al., 2006, Jungraithmayr et al., 2005).



Abb. 36: Kontrolltumor nach TTC-Färbung

Auf der obigen Abbildung (Abb. 36) kann man bei den Anschnitten eines Kontrolltumors nach TTC-Färbung erkennen, dass die vitalen (dunkelroten) Tumoreale überwiegen. Dazwischen liegen verstreut avitale (beige) Bereiche.

4.2.3 Besonderheiten bei der Therapie mit Doxorubicin

Das für die Therapie eingesetzte Doxorubicin-Gel besitzt eine stark hellrot leuchtende Farbe. Dies ist von Natur aus so und wurde nicht durch chemische Behandlungen bei der Herstellung oder Farbzusätze hervorgerufen.

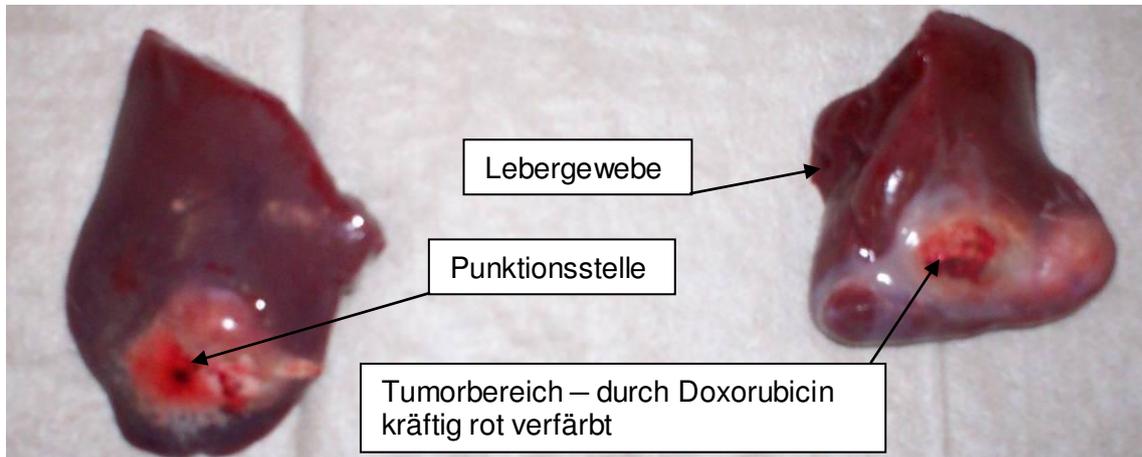


Abb. 37: Leberlappen mit VX2-Tumoren nach Therapie mit Doxorubicin

Obwohl bei der Leberentnahme die Therapie mit dem Doxorubicin-Gel bereits zwei Wochen zurück lag, sind immer noch die doxorubicinroten Bereiche an der Tumoroberfläche erkennbar (s. Abb. 37).

4.2.4 Beispiele histologischer Untersuchungsergebnisse

Histologische Präparate wurden nur von ausgewählten Tumoren angefertigt, da das Tumormaterial oft nicht für alle Untersuchungsmethoden ausreichte. Daher werden hier nur an einigen Beispielen die Unterschiede von vitalem Lebergewebe zu avitalem Lebergewebe/Tumor dargestellt.



Abb. 38: Vitale Leber, Kaninchen, Kontrolle (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Der Ausschnitt (s. Abb. 38) zeigt vitales Lebergewebe mit Zentralvene und den typischen radiär angeordneten Hepatozyten und Lebersinusoiden.

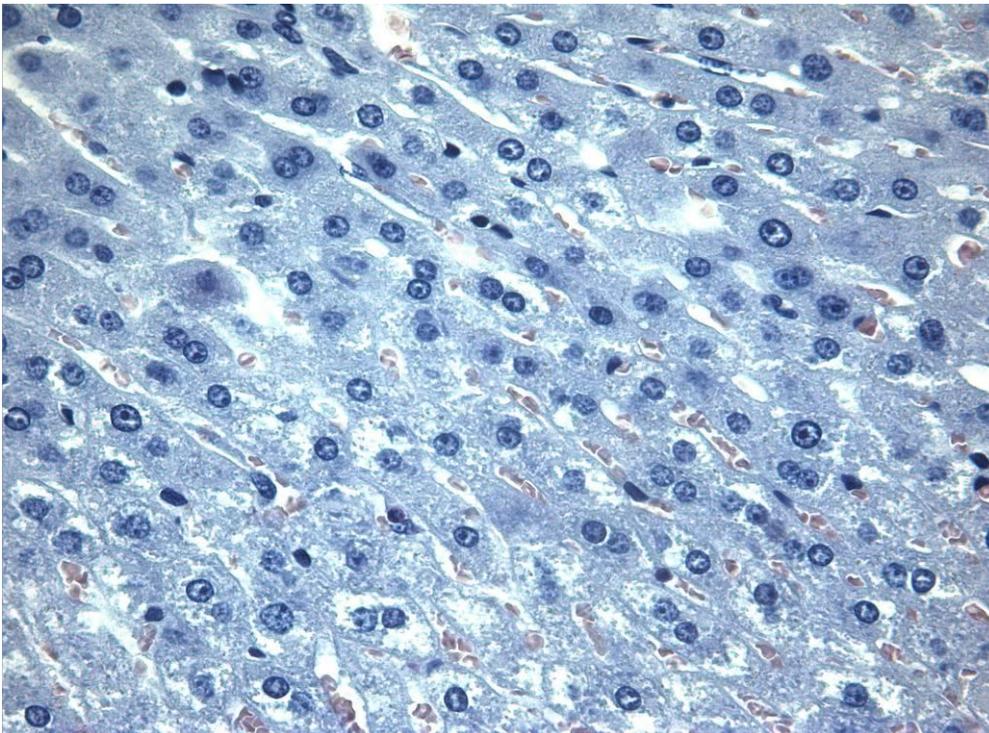


Abb. 39: Vitale Leber, Kaninchen, Kontrolle (40fache Vergrößerung, HE-Färbung)

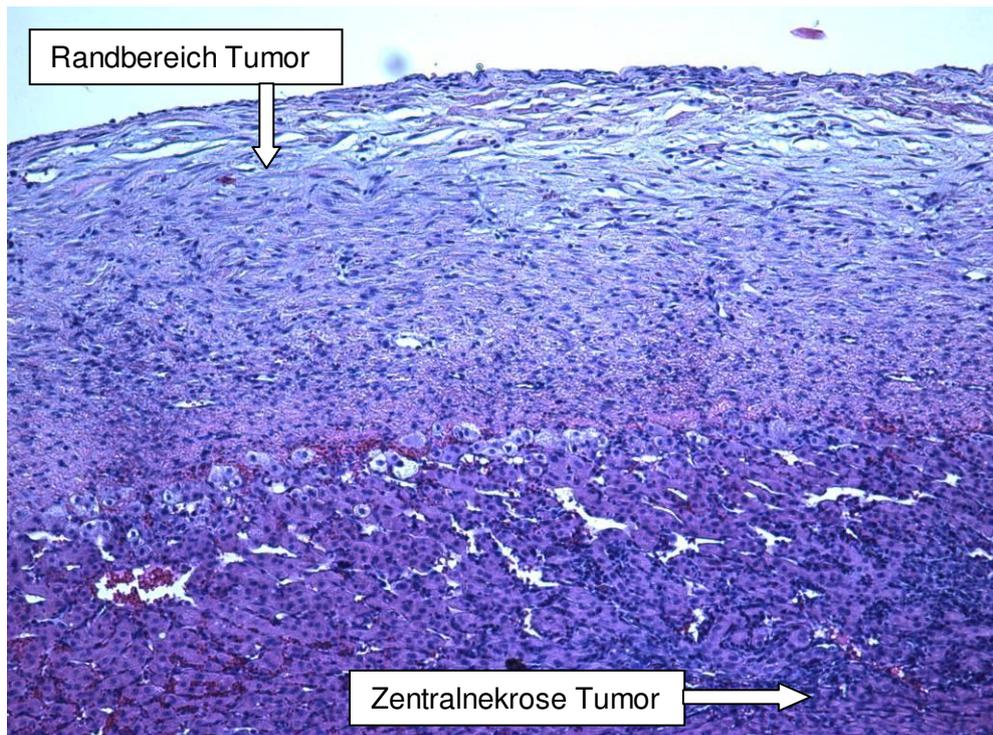


Abb. 40: Tumorrand, VX2-Tumor aus der Leber vom Kaninchen, Behandlung mit Doxorubicin (Übersicht, HE-Färbung, 10fache Vergrößerung)

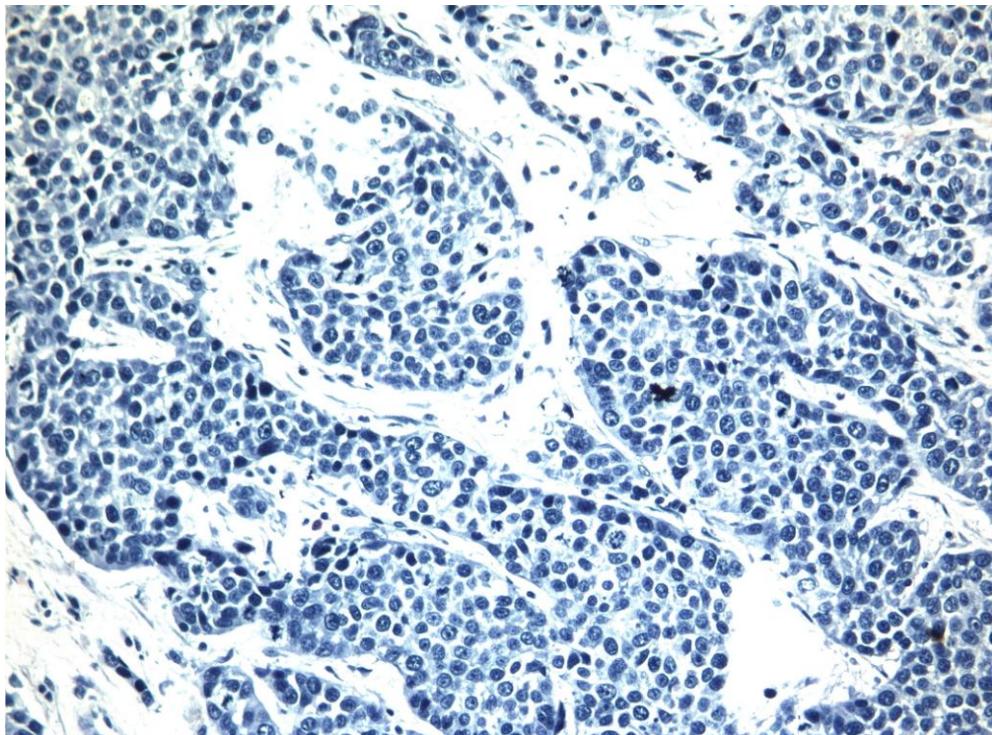


Abb. 41: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO_3 , niedrige Dosis (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Das Tumorgewebe (s. Abb. 41) erscheint im Vergleich zum vitalen Lebergewebe weniger geordnet und unstrukturierter.

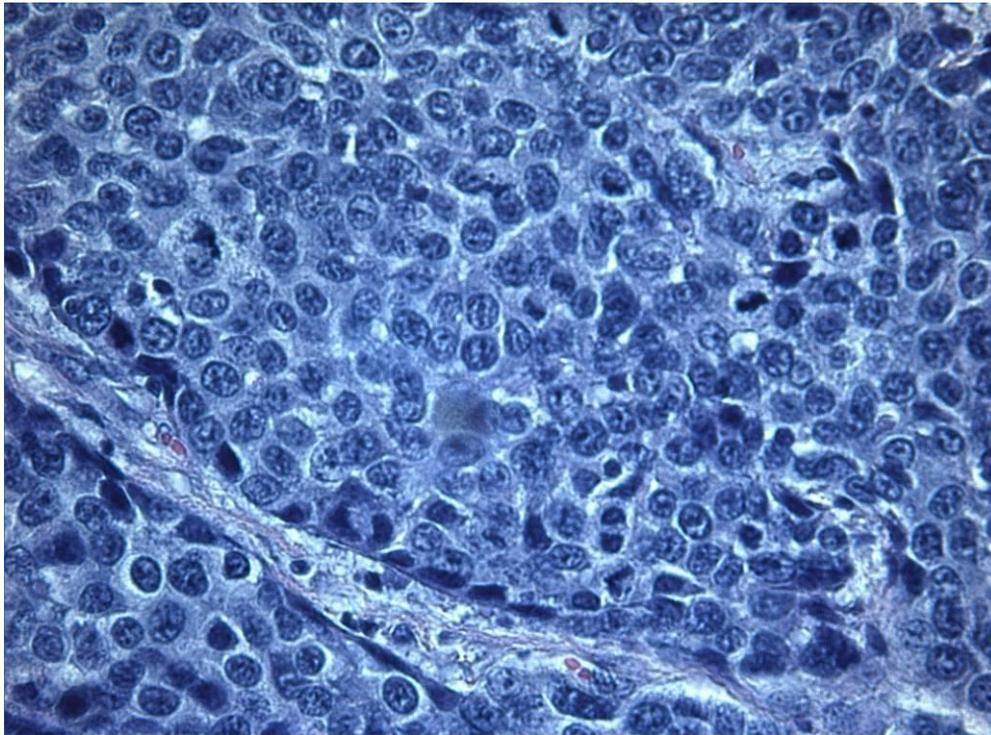


Abb. 42: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO_3 , niedrige Dosis (40fache Vergrößerung, HE-Färbung)

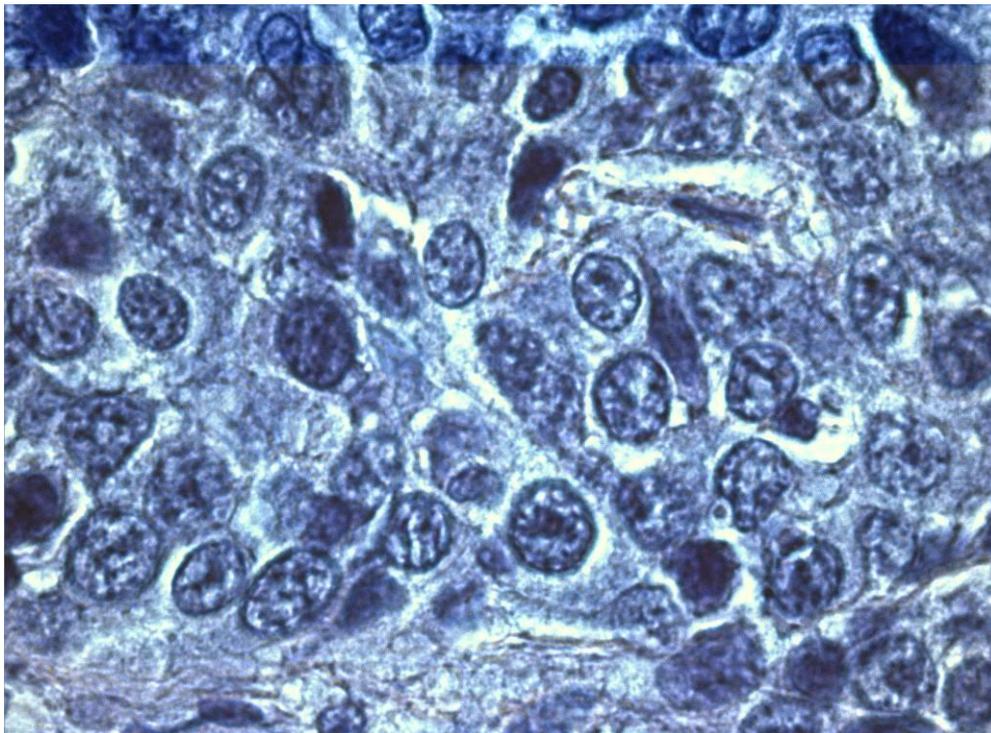


Abb. 43: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO_3 , niedrige Dosis (100fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Histologisch stellen sich die Tumorbilder (s. Abb. 41-43) polymorph, hyperchromatisch mit zahlreichen Mitosefiguren sowie deutlich zum Kern verschobenem Kern/Plasma-Verhältnis dar. Eine hohe Anzahl an Mitosefiguren spricht für eine ausgeprägte Teilungsrate der

Tumorzellen. Es ist kein strukturiertes Wachstum des Tumors erkennbar. Das Tumorgewebe hat die Tendenz zu einer zentralen Nekrotisierung, nur im Randbereich zeigt sich im ansonsten hypovaskularisierten Gewebe, vitaler Tumor.

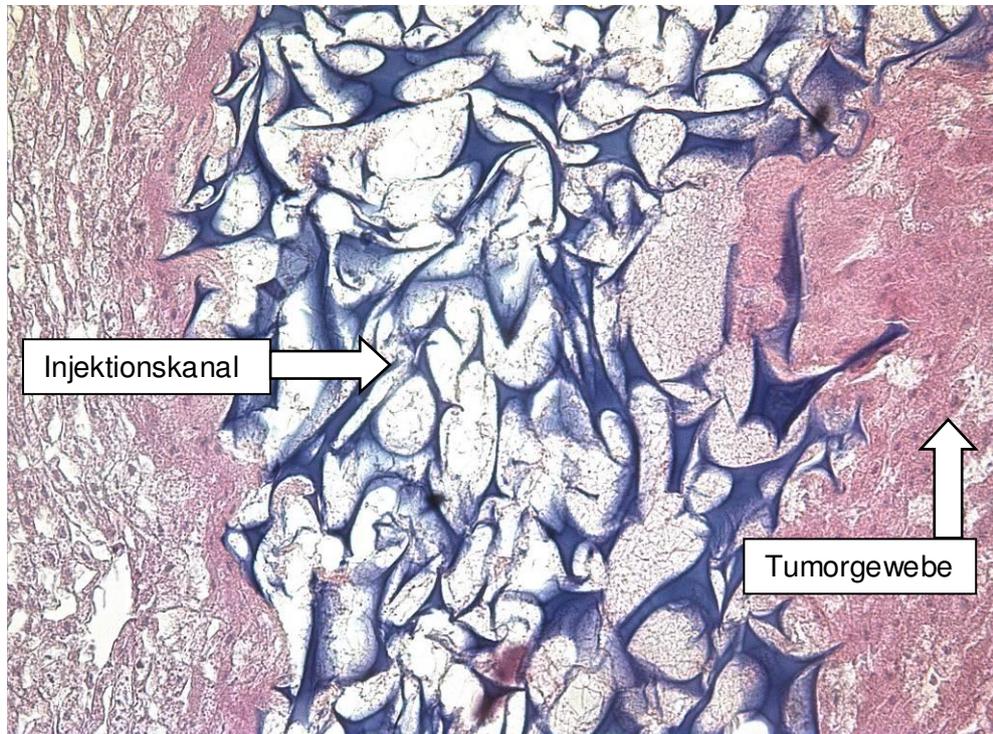


Abb. 44: VX2-Tumor, Kaninchen, 1 Woche nach Behandlung mit AsO_3 , niedrige Dosis, Injektionskanal (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Der blau angefärbte Bereich (s. Abb 44) lässt auch bei einer stark vergrößerten Ansicht keine einzelnen Zellen oder Zellbestandteile erkennen, vielmehr handelt es sich um eine feine gleichmäßige Struktur. Bei der HE-Färbung erhalten saure Molekülgruppen eine blaue Farbe, z. B. basophile Granulozyten, welche im Knochenmark gebildet werden.

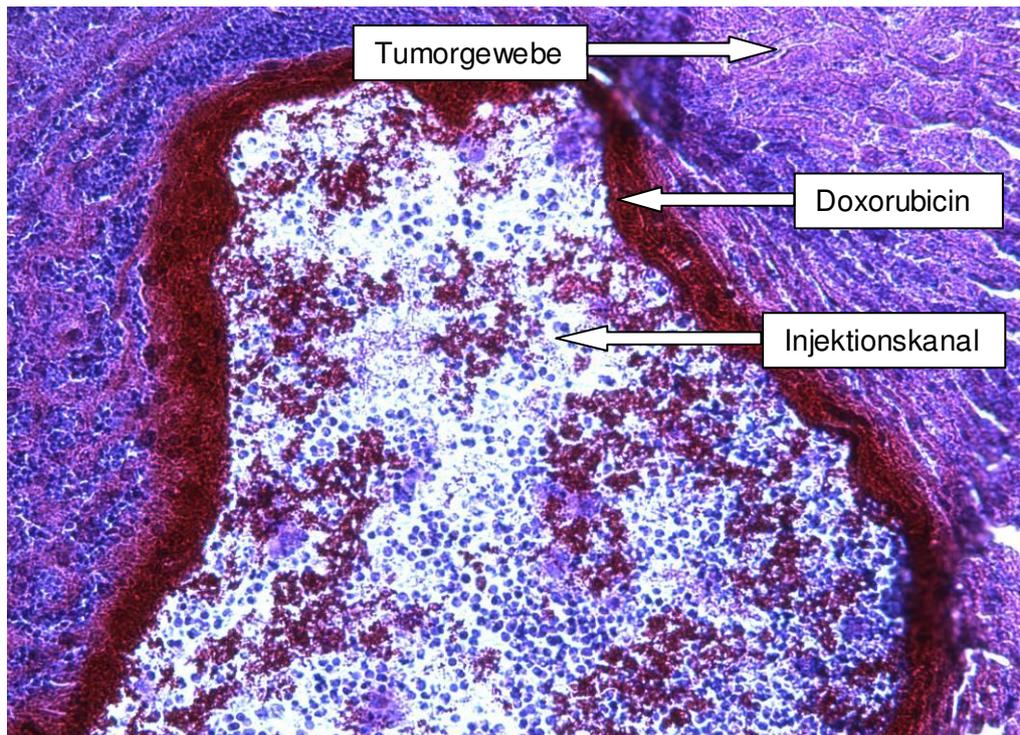


Abb. 45: VX2-Tumor, Kaninchen, Injektionskanal mit Bestandteilen von Doxorubicin (20fache Vergrößerung, HE-Färbung)

Insbesondere bei den Versuchen mit Doxorubicin konnte man wegen der Eigenfärbung des Doxorubicin in den histologischen Aufnahmen feststellen, wie gut sich der Wirkstoff im behandelten Gebiet verteilt hat und wie lange er dort verbleibt.

Man kann erkennen, dass sich die gesamte Wandregion des Injektionskanales im Tumor kräftig rot angefärbt hat (s. Abb 45). Einzelne rot gefärbte Fragmente sind auch noch im Kanallumen sichtbar, jedoch ist nicht deutlich identifizierbar, ob sich die Färbung tatsächlich innerhalb der Zellen oder im Randbereich befindet. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass sich der Wirkstoff Doxorubicin langfristig im behandelten Gewebe abgelagert hat.

4.2.5 Beobachtungen bei den Versuchstieren

Die Implantation von VX2-Tumorzellen bei 20 Kaninchen führte bei allen Tieren zu einem Tumorwachstum in der Leber. Das Tumorwachstum erfolgte unterschiedlich schnell. Bei etwa der Hälfte der Tiere wurden die Tumore nach ca. einer Woche behandelt, bei Tieren mit anfänglich sehr langsamem Tumorwachstum erst nach ca. zwei Wochen. Die Tiere wurden den fünf unterschiedlichen Behandlungsgruppen zugeteilt. Fantolon und Paclitaxel wurden als trockene Wirkstoffe auf Ballonkathetern appliziert. Die Herstellung und Applikation dieser Art der Zubereitung erwies sich für Doxorubicin (vorzeitige Ablösung vom Ballonkatheter)

und Arsentrioxid (nicht ausreichende Dosis auf den Ballonkatheter auftragbar) als nicht praktikabel. Die letztgenannten Wirkstoffe wurden daher als Gel mittels Spritzen intra- bzw. peritumoral verabreicht.

Es ergaben sich solitäre Tumore, Metastasen wurden in anderen Organen der Tiere nicht festgestellt.

4.2.5.1 Tierschutz und Verträglichkeit

Während der Studie wurde kein Merkmal der Abbruchkriterien zur vorzeitigen Tötung erfüllt. Nach den Untersuchungen im CT wurde jeweils überdacht, ob es einen weiteren Kenntnisgewinn ergeben würde, wenn das Tier eine Woche später noch ein weiteres Mal untersucht werden würde oder ob der Versuch für das jeweilige Tier an dieser Stelle beendet werden sollte.

4.2.6 Ergebnisse der Wirkstoff-Analysen

Die injizierbaren Formulierungen für das Doxorubicin und das Arsentrioxid konnten bereits vor der Applikation rechnerisch bestimmt werden. Bei der Therapie mit den beschichteten Ballonkathetern konnte die tatsächlich in den Tumor applizierte Dosis erst nach der Analyse der auf dem Ballon verbliebenen Beschichtungsreste festgestellt werden.

Die mittels HPLC ermittelten bzw. errechneten Werte für die für die Therapien eingesetzten Wirkstoffdosen wurden wie folgt zusammengefasst:

Tab. 14: Berechnung der in die Tumore eingebrachten Wirkstoffmengen

Tier	Wirkstoff	Applika- tions- form	Berechnete Wirkstoffmenge auf Ballon/ im Gel vor der Anwendung	Durch Analyse ermittelte Menge auf Ballon nach Verwendung	In den Tumor eingebrachte Wirkstoffmenge (Differenz)
1	Fantolon	Ballon	1,20 mg	0,077 mg (= 6,41%)	1,123 mg (= 93,59%)
2	Fantolon	Ballon	1,20 mg	0,083 mg (= 6,09%)	1,117 mg (= 93,91%)
3	Fantolon	Ballon	1,20 mg	0,042 mg (= 3,50%)	1,158 mg (= 96,5%)
4	Fantolon	Ballon	1,20 mg	0,076 mg (= 6,33%)	1,124 mg (= 93,67%)
5	Doxorubicin	gelförmig	5,94 mg	-	5,94 mg
6	Doxorubicin	gelförmig	3,71 mg	-	3,71 mg
7	Doxorubicin	gelförmig	14,85 mg	-	14,85 mg
8	Doxorubicin	gelförmig	20,78 mg	-	20,78 mg
9	Paclitaxel	Ballon	1,80 mg	0,231 mg (= 12,83%)	1,569 mg (= 87,17%)
10	Paclitaxel	Ballon	1,80 mg	0,026 mg (= 1,44%)	1,774 mg (= 98,56%)
11	Paclitaxel	Ballon	1,80 mg	0,059 mg (= 3,27%)	1,741 mg (= 96,73%)
12	Paclitaxel	Ballon	1,80 mg	0,024 mg (= 1,33%)	1,776 mg (= 98,67%)
13	Arsentrioxid	gelförmig	11,50 mg	-	11,50 mg
14	Arsentrioxid	gelförmig	11,50 mg	-	11,50 mg
15	Arsentrioxid	gelförmig	20,00 mg	-	20,00 mg
16	Arsentrioxid	gelförmig	22,00 mg	-	22,00 mg
17	Kontrolle	Ballon	-	-	-
18	Kontrolle	Ballon	-	-	-
19	Kontrolle	Lösung	-	-	-
20	Kontrolle	Lösung	-	-	-

Bei der Applikationsform „Gel“ wurde davon ausgegangen, dass die von der Spritze abgegebene Menge vollständig in den Tumor eingebracht wurde. Die Kanüle der Spritze wurde direkt in den Tumor gesetzt, so dass es zu keinem Verlust auf dem Behandlungsweg gekommen sein dürfte. Das Abgabevolumen wurde mittels Auslauf ermittelt, um ein Totvolumen der Spritze auszuschließen. Bei der Verwendung der Ballone kann es jedoch schon bei der Herstellung und dem Transport bis zur tatsächlichen Verwendung zu geringen Verlusten der Wirkstoffbeschichtung kommen. Hinzu kommen noch eventuelle Substanzverluste bei der Einführung des Ballonkatheters durch die Führungskanüle in den zu behandelnden Tumor und Reste auf dem Ballon, die nicht abgegeben werden. Um wenigstens Letztere exakt zu

erfassen, wurden die gebrauchten Katheter auf den verbliebenen Wirkstoffgehalt analysiert und diese Werte von den zuvor berechneten Wirkstoffmengen, die durch die Beschichtung aufgebracht wurden, subtrahiert. Dabei ergeben sich für die mit Fantolon behandelte Gruppe auf den verwendeten Ballonen berechnete Wirkstoffreste in Höhe von $5,58 \pm 1,39\%$ und für die mit Paclitaxel behandelte Gruppe in Höhe von $4,72 \pm 5,48\%$ (s. Tab. 14).

Bei den mit Doxorubicin und Arsentrioxid behandelten Tieren ergaben sich innerhalb der Gruppe unterschiedlich hohe Wirkstoffmengen dadurch, dass beim ersten Tier mit einer niedrigeren Dosis gestartet wurde, um eventuelle Nebenwirkungen zu erkennen. Bei den folgenden Tieren wurde dann die Wirkstoffmenge höher angesetzt, da die ursprüngliche Dosis gut vertragen wurde und die Wirkung nicht überzeugend war.

4.2.7 Ergebnisse der Auswertungen der Tumorvolumina

Nach der Therapie wurden die Tiere wöchentlich im CT vermessen und die Größe des Perfusionsdefekts bei der ersten Nachkontrolle mit dem Perfusionsdefekt des ursprünglichen Tumors verglichen, welcher am Tag der Therapie ermittelt wurde. In der darauf folgenden Woche wurde dann der jeweilige aktuelle Wert mit dem Wert aus der Vorwoche ins Verhältnis gesetzt. So konnte der Größenverlauf nach erfolgter Therapie beobachtet werden (s. Tab. 15). Es gab zwei Fälle, in denen sich die Perfusionsdefekte verkleinerten. Die Messungen erfolgten bei allen Tieren eine Woche nach Behandlung, wurden jedoch bei einigen Tieren mit vergleichsweise geringer Größenzunahme des Perfusionsdefekts nach 14 Tagen wiederholt. Da nur nach einer Woche Daten für alle Tiere vorliegen, wurden diese bevorzugt zur Beurteilung genutzt.

Die Läsionen, die an Größe abnahmen, fanden sich bei je einem Tier aus den Gruppen „Fantolon“ und „Kontrolle“. Ansonsten nahmen die Perfusionsdefekte an Größe zu. Als Maß für die Größenzunahme kann entweder die Veränderung in cm^3 oder in Prozent des Vorwertes (bei Therapie) herangezogen werden. Beide Größen divergieren nur bei den Kontrolltieren stark. Bei diesen steht eine starke Zunahme des Volumens ($64 \pm 68 \text{ cm}^3$) einer mäßigen prozentualen Größenzunahme (903 ± 925) gegenüber. Dies liegt vor allem an einem Tier der Kontrollgruppe, das bereits bei der „Therapie“ (mit wirkstofffreiem Ballon) ein sehr großes minderperfundiertes Areal in der Leber aufwies.

Die geringste Größenzunahme sowohl absolut in cm^3 (12 ± 14) als auch prozentual (271 ± 186) fand sich nach Applikation von Paclitaxel, die größte Zunahme ($31 \pm 31 \text{ cm}^3 \sim 3580 \pm 4871\%$) in der Gruppe der mit Arsentrioxid behandelten Tiere. Auffällig ist das große prozentuale Wachstum des Perfusionsdefekts bei Verabreichung von Arsentrioxid in der höheren Dosis.

Nach der TTC-Färbung wurde visuell das Verhältnis von vitalem zu nekrotischem Gewebe bestimmt. Das ist eine wichtige ergänzende Information zur Größe des Tumors. Die TTC-Färbung lässt bei den nicht mit Zytostatika behandelten Kontrolltumoren ebenso wie bei fast allen mit den Arzneimitteln behandelten Tumoren 50 bis 90% vitales neben 10 bis 50% nekrotischem Gewebe erkennen. Die einzige Ausnahme bilden die beiden mit der höheren Arsen trioxid-Dosis behandelten Tumore. In den betreffenden Proben wurde nach einer Woche <10% vitales Gewebe gefunden.

Tab. 15: Tumorgößen vor und nach Behandlung mit den ausgewählten Substanzen, Vitalität des Gewebes nach TTC-Färbung

Versuchsgruppe	In den Tumor eingebrachte Dosis mg	Tage zwischen Implantation und Therapie	Perfusionsdefekt vor Therapie (cm ³)	Perfusionsdefekt 1 Woche nach Therapie (cm ³)	Perfusionsdefekt Änderung zur Vorwoche (cm ³)	Perfusionsdefekt Änderung zur Vorwoche in %	Perfusionsdefekt 2 Wochen nach Therapie (cm ³)	Perfusionsdefekt Änderung zur Vorwoche (cm ³)	Perfusionsdefekt Änderung zur Vorwoche in %	Verhältnis vitales/nekrotisches Gewebe (visuell) nach TTC-Färbung)
Fantolon	1,1	9,00	1,44	46,02	44,57	3.086,77	-	-	-	ca. 75:25
Fantolon	1,1	8,00	0,44	7,00	6,56	1.491,59	53,05	46,05	657,53	ca. 80:20
Fantolon	1,2	7,00	1,68	1,08	0,61	35,99	0,87	0,21	19,11	ca. 60:40
Fantolon	1,1	7,00	1,68	3,57	1,90	113,25	55,08	51,51	1.442,11	ca. 90:10
Mittelwert	1,13	7,75	1,31	14,42	13,11	1.163,91	36,34	32,45	693,51	-
Stand.-Abw.	0,05	0,96	0,59	21,21	21,19	1.454,69	30,73	28,41	731,27	-
Doxorubicin-Gel	5,9	8,00	0,61	11,78	11,17	1.818,89	28,41	16,63	141,12	ca. 60:40
Doxorubicin-Gel	3,7	8,00	1,81	20,90	19,09	1.055,86	164,29	143,39	686,15	ca. 60:40
Doxorubicin-Gel	14,9	8,00	2,61	14,12	11,51	441,37	20,30	6,18	43,75	ca. 60:40
Doxorubicin-Gel	20,8	8,00	1,17	26,65	25,48	2.173,63	37,90	11,25	42,23	ca. 60:40
Mittelwert	11,33	8,00	1,55	18,36	16,81	1.372,44	62,72	44,36	228,31	-
Stand.-Abw.	7,96	-	0,86	6,74	6,84	776,39	68,09	66,16	308,71	-
Paclitaxel	1,6	15,00	5,31	16,87	11,57	217,96	-	-	-	ca. 75:25
Paclitaxel	1,8	15,00	7,56	39,66	32,10	424,71	-	-	-	ca. 50:50
Paclitaxel	1,7	16,00	0,64	3,28	2,64	410,42	-	-	-	ca. 60:40
Paclitaxel	1,8	13,00	0,80	1,05	0,25	31,25	-	-	-	ca. 90:10
Mittelwert	1,73	14,75	3,58	15,22	11,64	271,09	-	-	-	-
Stand.-Abw.	0,10	1,26	3,42	17,73	14,49	185,61	-	-	-	-
Arsentrioxid-Gel	11,5	16,00	2,46	14,83	12,37	503,01	-	-	-	ca. 80:20
Arsentrioxid-Gel	11,5	14,00	7,98	28,93	20,95	262,73	-	-	-	ca. 90:10
Arsentrioxid-Gel	20,0	7,00	0,51	15,18	14,67	2.888,39	-	-	-	ca. 0:100
Arsentrioxid-Gel	22,0	7,00	0,72	77,31	76,59	10.667,27	-	-	-	ca. 5:95
Mittelwert	16,25	11,00	2,92	34,06	31,15	3.580,35	-	-	-	-
Stand.-Abw.	5,55	4,69	3,48	29,57	30,51	4.871,00	-	-	-	-
Kontrolle	-	14,00	6,62	89,98	83,37	1.260,27	-	-	-	ca. 70:30
Kontrolle	-	16,00	5,84	5,49	0,35	6,01	-	-	-	ca. 50:50
Kontrolle	-	7,00	1,12	23,80	22,69	2.032,89	-	-	-	ca. 60:40
Kontrolle	-	14,00	46,94	198,96	152,02	323,88	-	-	-	ca. 70:30
Mittelwert	-	12,75	15,13	79,56	64,43	902,76	-	-	-	-
Stand.-Abw.	-	3,95	21,35	87,48	68,24	924,84	-	-	-	-

4.2.8 Vergleich Dosis VX2-Tumor mit systemischer Humandosis

Das Körpergewicht eines Kaninchens beträgt im Verhältnis zum durchschnittlichen Körpergewicht eines Menschen (75 kg) lediglich etwa 5%. In einem Tumor, der bei den Versuchstieren jedoch wiederum nur einen Bruchteil des eigenen Körpergewichtes ausmacht (< 100 g), wird im Verhältnis zur systemischen Dosis beim Menschen eine vielfach höhere Dosis in den Tumoren erreicht (s. Tab. 16).

Tab. 16: Vergleich Dosis Kaninchen/Dosis Mensch

Wirkstoff	Applizierte Dosis pro Tier/Tumor	Empfohlene Human-Dosis pro kg/KM	Entspricht einer systemischen Dosis pro Mensch (75 kg KM)	Proz. Anteil im Versuch pro Tier/Tumor an vergleichbarer systemischer Human-Dosis
Paclitaxel	1,8 mg	4 mg	300 mg	0,6%
Arsentrioxid	11,5 - 22,0 mg	0,15 mg	11,25 mg	102,2 - 195,5%
Doxorubicin	3,71 - 20,78 mg	1,3 mg	97,5 mg	3,8 - 21,3%
Fantolon	1,2 mg	0,35 mg	26,25 mg	4,6%

4.2.9 Zusammenhang zwischen Tiergewichten und Art der Therapie

Das Körpergewicht der Tiere wurde jeweils vor der ersten Intervention sowie vor allen folgenden Eingriffen festgestellt (s. Tab. 17). Zum einen war dies notwendig für die Berechnung der für die Anästhesie verwendeten Dosis und zum anderen ist der Gewichtsverlauf ein wichtiges Indiz für das gesundheitliche Wohlbefinden der Kaninchen.

Die Tiere wurden mit einem Anlieferungsgewicht von ca. 3 kg Körpergewicht bestellt. Nach der Eingewöhnungsphase in der Tierhaltung wurden zu Versuchsbeginn etwas höhere Anfangsgewichte, über 3 kg Körpergewicht, festgestellt.

Die Tiere waren im längsten Fall insgesamt vier Wochen im Versuch (gerechnet ab dem Zeitpunkt der Tumorimplantation). In der Doxorubicin- und der Kontrollgruppe haben alle Tiere während dieses Zeitraumes zugenommen oder zumindest das Anfangsgewicht bis zum Tage der Euthanasie gehalten. In der Gruppe Fantolon gab es zwei Tiere und in den Gruppen Paclitaxel und Arsentrioxid jeweils ein Tier, welches an Gewicht verloren hatte. In

diesen Fällen betrug die Gewichtsabnahme ca. 0,20 kg des Körpergewichtes. Mit Ausnahme der mit Fantolon behandelten Tiere (Gewichtsabnahme 0,03 kg) nahmen die Tiere aller Gruppen im Mittel zwischen 0,05 und 0,18 kg zu. Nach der Tabelle zeigt sich zwar für die Kontrollgruppe die höchste Gewichtszunahme (0,18 kg) aus allen Gruppen, jedoch ist der Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen minimal.

Tab. 17: Aufstellung der Anfangs- und Endgewichte der Tiere aus dem Versuch

Tier	Körpergewicht vor Implantation in kg	Körpergewicht Tag d. Euthanasie in kg	Körpergewicht Differenz in kg	Zeitspanne in Tagen	Wirkstoff für Therapie
1	3,2	3,0	-0,2	9	Fantolon
2	3,2	3,0	-0,2	8	Fantolon
3	3,2	3,3	0,1	7	Fantolon
4	3,3	3,5	0,2	7	Fantolon
Mittelw.	3,23	3,20	-0,03	7,75	
St.-Abw.	0,05	0,24	0,21	0,96	
5	3,1	3,3	0,2	15	Paclitaxel
6	4,0	3,8	-0,2	15	Paclitaxel
7	3,3	3,8	0,5	16	Paclitaxel
8	3,5	3,5	0,0	13	Paclitaxel
Mittelw.	3,48	3,60	0,13	14,75	
St.-Abw.	0,39	0,24	0,30	1,26	
9	3,2	3,4	0,2	8	Doxorubicin
10	3,1	3,3	0,2	8	Doxorubicin
11	3,2	3,2	0,0	8	Doxorubicin
12	3,4	3,5	0,1	8	Doxorubicin
Mittelw.	3,23	3,35	0,13	8,00	
St.-Abw.	0,13	0,13	0,10	0,00	
13	3,2	3,3	0,1	16	Arsentrioxid
14	3,2	3,4	0,2	14	Arsentrioxid
15	3,5	3,6	0,1	7	Arsentrioxid
16	3,0	2,8	-0,2	7	Arsentrioxid
Mittelw.	3,23	3,28	0,05	11,00	
St.-Abw.	0,21	0,34	0,17	4,69	
17	2,8	3,1	0,3	14	Kontrolle
18	3,2	3,4	0,2	16	Kontrolle
19	3,2	3,2	0,0	7	Kontrolle
20	3,1	3,3	0,2	14	Kontrolle
Mittelw.	3,08	3,25	0,18	12,75	
St.-Abw.	0,19	0,13	0,13	3,95	

5 DISKUSSION

Die Forschung in der Onkologie zielt darauf ab, für den Patienten immer schonendere, den Organismus möglichst minimal belastende Therapieformen zu finden, die jedoch einen maximalen Behandlungserfolg versprechen. Lokale Therapien oder Kombinationen aus einer systemischen mit einer lokalen Tumorbehandlung werden daher immer häufiger angewendet und alleinigen oralen oder intravenösen Chemotherapien vorgezogen (Chen et al., 2010, Eyol et al., 2008, Farres et al., 1998, Fiegl et al., 2011, Geißler, 1998, Fujiki et al., 2011, Lencioni et al., 2003, Shah et al., 2004).

Die Zielsetzung in diesem Projekt war die Untersuchung eines lokalen Therapieverfahrens zur Bekämpfung von Lebertumoren/-metastasen, welches entweder als neoadjuvante, adjuvante oder ausschließliche Behandlung angewendet werden kann.

Bei der Ausarbeitung des Therapieschemas für den Einsatz von lokalen Maßnahmen zur Tumorbekämpfung muss man sich überlegen, welches Ziel man erreichen möchte. Ist eine Aussicht auf Heilung des Patienten durch eine kurative Behandlung möglich oder kann lediglich durch eine palliative Behandlung Linderung verschafft und eine bessere Lebensqualität erreicht werden? Im nächsten Schritt ist zu überlegen, ob mit einer neoadjuvanten lokalen Therapie ein „Downstaging“ des Tumors realisiert werden kann, um eine nachfolgende operative Entfernung überhaupt erst zu ermöglichen und von dem betroffenen Organ nicht unnötig viel entfernen zu müssen. Falls nicht, kann eine adjuvante lokale Therapie nach einer erfolgreich durchgeführten Tumorresektion als ergänzende, unterstützende Maßnahme durchgeführt werden.

5.1 Tier- und Tumormodell sowie Wachstums- und Metastasierungsverhalten

Als Tiermodell wurde das Kaninchen gewählt, da es aufgrund seiner Größe eine bessere Vergleichbarkeit mit den physischen Gegebenheiten beim humanen Patienten erlaubt, als bei Experimenten an physisch kleineren Versuchstieren. Außerdem können beim Kaninchen die meisten medizinischen Materialien und technischen Geräte aus der Klinik eingesetzt werden. Für die Untersuchungen an Mäusen oder Ratten muss oftmals erst geeignetes Zubehör angeschafft werden. Aus diesen Gründen wurde das Kaninchen auch u.a. von Kreuter et al. (2008) bei in vivo Versuchen zur Tumortherapie eingesetzt.

Der VX2-Tumor ist ein hochgradig malignes Karzinom; dadurch wurde der Behandlungserfolg möglicherweise erschwert. Nach Betrachtung meiner Ergebnisse könnte ich mir vorstellen, dass durch den Einsatz von humanen, weniger aggressiven Tumorzellen die Ergebnisse anders bzw. zu Gunsten der Wirksamkeit der Behandlungen ausgefallen wären. Andererseits ist meine Vermutung, dass bei einem Nachweis einer erfolgreichen Bekämpfung eines äußerst aggressiven Tumors auch eine Wirkung auf weniger maligne Tumore angenommen werden kann.

Bei der Verwendung des Kaninchens als Tiermodell bietet sich der Einsatz des VX2-Tumors an, da dieser besonders gut beim Kaninchen auf der Leber anwächst. In vielen anderen Arbeitsgruppen wurde dies ebenfalls beobachtet und bestätigte somit die Wahl für dieses Versuchsmodell (Chen et al., 2004, Kim et al., 2009, Shah et al., 2004, Kreuter et al., 2008).

Bei dem gewählten Tiermodell wurde die Implantation von Tumorstücken zur Züchtung und Vermehrung der Tumore angewendet (Gimbrone et al., 1974). Eine Alternative wäre die Injektion einer selbst hergestellten Tumorzellsuspension gewesen (Kidd und Rous, 1940). Die Tumorzellen können ausgezählt werden und die Anzahl der implantierten Zellen ist dann bei allen Tieren ähnlich hoch. Die Tumore sind besser vergleichbar. Die Problematik bei dieser Form der Tumorzüchtung stellt die Streuung von Tumorzellen durch Abschwemmen dar. Beim Zurückziehen der Injektionsnadel kann es zu einer Verteilung von einzelnen, an der Kanüle haftenden Tumorzellen innerhalb des gebildeten Stichkanals kommen. Von dort aus wäre auch eine weitere Verbreitung der Tumorzellen möglich, was die Bildung von Fernmetastasen zur Folge hätte. Aus diesen Gründen wurde dieses Verfahren nicht durchgeführt. Die stattdessen verwendeten Tumorstückchen blieben dagegen gut an den positionierten Stellen haften und bildeten visuell keine sichtbaren Metastasen. Die gleichen Beobachtungen haben auch die Studien über diese beiden Inokulationsmethoden von VX2-Tumorzellen in die Kaninchenleber von Chen et al. (2004) gezeigt.

Eine weitere Überlegung war, ob sich durch die Therapie der Läsionen, d.h. durch die technische Manipulation ohne den Einfluss von Wirkstoffen, Änderungen im Wachstum ergeben. Es bestünde die Möglichkeit, dass durch den Eingriff das Größenwachstum angeregt und eine Zellproliferation ausgelöst wird. In einer Studie über Melanome beim Menschen wurde festgestellt, dass die Überlebensrate bei inzisiv biopsierten Patienten niedriger war, als bei anderen Prozeduren (Austin et al., 1996). Um die Werte der Kontrollgruppe nicht zu beeinflussen, wurden die Kontrolltiere in diesem Versuch ebenfalls mit unbeschichteten Ballonkathetern und NaCl-Injektionen „therapiert“. Dabei zeigte sich jedoch entgegen den Erwartungen bei einem mit einem unbeschichteten Ballonkatheter behandelten Kontrolltier eine geringe (-6%) Verkleinerung des Perfusionsdefektes. Es stellt sich die Frage, ob es sich hierbei

um eine zufällige Beobachtung handelt oder etwa durch die alleinige Manipulation des wirkstofffreien Ballonkatheters Einfluss auf das Tumorwachstum genommen wurde.

Die in dieser Studie eingesetzten VX2-Tumorzellen haben ihren Ursprung in einem Plattenepithelkarzinom. Diese Karzinome zeigen nach einer Manipulation durch Nadeln (Biopsie) selten Fernmetastasen (Kage et al., 1987, Ohtake et al., 1990).

Es wurde publiziert, dass die Gefahr der Metastasierung mit der Tumorgroße zunimmt (Rodriguez-Cuevas et al., 1995, Daniell, 1988). Diese Beobachtung konnte in den hier durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden.

Transplantierte Tumore unterscheiden sich allerdings von natürlich gewachsenen Tumoren. Die vielen zeitgleich implantierten Zellen müssen vom Organismus versorgt werden, wodurch eine äußerst hohe Neovaskularisation ausgelöst wird. Die Blutgefäße der Tumortransplantate weisen zudem eine höhere Dichtigkeit und eine bessere Zirkulation auf (Jang et al., 2003).

Der Beginn der Therapie kann entweder nach der Zeitdauer ab der Tumorimplantation oder nach der Tumorgroße gewählt werden. Bei diesem Versuch war der Therapiezeitpunkt von der Größe des Tumors abhängig. Wären alle Tiere nach einem festen zeitlichen Schema therapiert worden, hätte es noch bedeutendere Unterschiede der Tumorumfänge am Tag der Therapie gegeben. So wurde in regelmäßigen wöchentlichen computertomographischen Untersuchungen das Tumorwachstum dokumentiert. Allerdings gab es auch hierbei Fälle, bei denen dieses entweder fast stagnierte oder gegenteilig explosionsartig zunahm. Dadurch kam es dann zu divergierenden Tumorausmaßen zum Therapiezeitpunkt. Unter Umständen hätte man durch zeitlich enger gesteckte CT-Untersuchungen die Inhomogenität zwischen den behandelten Tumoren herabsetzen können, jedoch hätte es zum einen eine zusätzliche Narkosebelastung der Kaninchen bedeutet und zum anderen stand das CT nicht an allen Tagen für die Untersuchungen zur Verfügung.

Einer der wichtigsten Faktoren für die Einschätzung des Allgemeinbefindens der Kaninchen während des Versuchszeitraumes ist die Gewichtskontrolle. Kaninchen zeigen erst zu einem sehr fortgeschrittenen Zeitpunkt in ihrem Verhalten, dass es ihnen physisch nicht gut geht. Dies ist ein natürlicher Instinkt, um bei Krankheit nicht vom Rudel ausgeschlossen zu werden. Aus diesem Grund wurde neben der täglichen visuellen Adspektion und ggf. Palpation des Abdomens und der OP-Naht, das Gewicht der Tiere in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die protokollierten Gewichte wiesen unerhebliche Schwankungen auf.

Eine genaue Auswertung dieser doch recht geringen Gewichtsveränderungen wurde dadurch erschwert, dass die Endgewichte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Behandlung erhoben wurden, da die Beobachtungsdauer je nach Tumorwachstumsverlauf verschieden lang war. Das Kaninchen ist ein Tier mit einem sehr ausgeprägten Stoffwechsel, so dass Futteraufnahme und Ausscheidung sehr schnell zu Gewichtsschwankungen führen können. Daher bewegen sich die hier dokumentierten leichten Schwankungen der Tiergewichte in einem physiologischen Rahmen.

5.2 Zellkultur/Zelllinie

Die *in vitro* Versuche mit den Zellkulturen haben zu Beginn der Studie dazu beigetragen, die erfolgversprechendsten Substanzen zur Verwendung im *in vivo* Versuch herauszufiltern. Nicht alle *in vitro* gut wirksamen Substanzen konnten jedoch den erhofften Erwartungen *in vivo* stand halten. Hierfür gibt es mehrere Erklärungen: Im Tiermodell kann das Verhältnis der Wirkstoffe zu Tumorzellen nicht in der gleichen Genauigkeit, wie im Zellversuch erreicht werden. In beiden Versuchen kann die Dosis bzw. Konzentration in der Wirkstofflösung sehr genau berechnet werden. Die Zellzahl kann jedoch nur im *in vitro* Versuch relativ genau bestimmt werden. Im Tierversuch geht das leider nicht. Wie bereits zuvor erläutert, kann auch nicht durch die Tumorgröße allein auf die Vitalität der Zellen geschlossen werden.

In der Literatur erhält man Hinweise, dass die Diskrepanz von Ergebnissen aus *in vivo* und *in vitro* Versuchen intensiv diskutiert wird. *In vitro* können die Zellen von Zeit zu Zeit anders als *in vivo* reagieren, da diese *in vitro* biophysikalischen Einflüssen aus der Umgebung ausgesetzt sein können (Houbracken et al., 2012, Krukemeyer und Spiegel, 2005). Mitoxantron zeigte in dieser Studie beispielsweise in den Vorversuchen *in vitro* keine zufriedenstellenden Ergebnisse und wurde unter anderem auch aus diesem Grund nicht weiter *in vivo* bearbeitet. In anderen Studien hingegen wurden mit diesem Wirkstoff am Patienten bei der lokalen Tumorthherapie eine gute anti-tumorale Wirkung bestätigt (Farres et al., 1998, Ramirez et al., 1996). Einige Studien können jedoch Erfolge *in vivo* und *in vitro* vorweisen (Xie et al., 2012, He et al., 2012).

Es kommt vor, dass Substanzen schon bei Verwendung verschiedener Zelllinien unterschiedlich gut wirken. Daher fallen die Ergebnisse von Studien, die an humanen und tierischen Zellen durchgeführt wurden, bisweilen nicht einheitlich aus (Dosier et al., 2012, Lehmann et al., 2012). So kann die Situation entstehen, dass Substanzen nur an bestimmten Zelllinien wirken oder aber im Falle einer Wirkung eine abweichende Dosierung benötigen (Sarzaeem et al., 2012).

Ferner kann es auch zu geschlechtsspezifischen Abweichungen kommen (Parlar und Angerhöfer, 1995). Dazu konnten im Tierversuch dieser Studie jedoch keine Beobachtungen getätigt werden, da es sich ausschließlich um männliche Kaninchen handelte.

5.3 Auswahl der Wirkstoffe

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden ausschließlich bekannte, zugelassene Zytostatika ausgewählt bzw. ein Wirkstoff der Bayer-Schering Pharma AG, der sich in klinischer Prüfung befand (Fantolon). Paclitaxel erzielte etwas bessere Ergebnisse als das strukturähnliche Fantolon, obwohl erwartet wurde, dass das Fantolon besser wirken würde, da hier die Rezeptoraffinität höher ist als beim Paclitaxel (Buey et al., 2004, Larkin und Kaye, 2006, Sabbatini und Spriggs, 2009).

Bei den Versuchen wurden nur Single-Substanzen eingesetzt. Eine weitere Möglichkeit wäre gewesen, sich ergänzende Wirkstoffkombinationen zu verwenden (Xu et al., 2012, Macpherson et al., 2012). Untersuchungen in diese Richtung gab es beispielsweise zu der Kombination von Arsentrioxid mit Fantolon (Rangwala et al., 2012). Jedoch hätte man auch bei der Verwendung von Wirkstoffkombinationen zuvor die Substanzen einzeln in ihrer Wirkung testen müssen, um auszuschließen, dass nur einer der kombinierten Wirkstoffe eine potenzielle Wirkung auslöst. In einem weiteren Schritt hätte man die am ergebnisreichsten Substanzen miteinander kombinieren und damit in ihrer Wirkung beispielsweise bei gleichem Wirkmechanismus steigern oder bei unterschiedlichen Wirkmechanismen ergänzen können.

Weitere Auswahlkriterien waren möglichst unterschiedliche Wirkmechanismen, um mehrere Ansatzpunkte der Wirkstoffe bei den Untersuchungen abzudecken, eine hohe Wirkstärke und die Eignung zur intratumoralen Verabreichung. Für die intratumorale Applikation sollten leicht zugängliche, nicht dünnflüssige Formulierungen zur Verfügung stehen. Wenig visköse Zusammensetzungen wurden vermieden, da diese voraussichtlich rasch aus dem Tumorgewebe abfließen und damit eher systemisch als strikt lokal wirken würden.

5.4 Therapie mit Ballonkathetern: Eignung und Anwendbarkeit

Ein unvermeidbares, wenn auch geringes Risiko bei lokalen Tumortherapien, birgt die Verschleppung von Tumorzellen während der Intervention. So könnten beim Zurückziehen des Ballonkatheters aus dem Tumor maligne Zellen in gesundes Gewebe verteilt werden (Goldstein et al., 1993). Allerdings konnte dies in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Eine Verschleppung der Tumorzellen hat also offensichtlich nicht stattgefunden, kann aber

auch nicht uneingeschränkt ausgeschlossen werden, weil es möglich wäre, dass Metastasen zu klein waren, um sie makroskopisch oder unter CT-Kontrolle zu erkennen.

Die lokale Therapie mit trockenen Substanzen, wie die Beschaffenheit des Überzuges auf den Ballonkathetern, hat den Vorteil, dass die therapeutischen Wirkstoffe über einen längeren Zeitraum am platzierten Ort bleiben als flüssige Chemotherapeutika. Demnach verlängert sich die Kontaktzeit mit dem zu behandelnden Gewebe, wodurch die Wirkung der Substanzen verstärkt werden kann (Speck et al., 2011). Darüber hinaus kann die Dosis zugunsten einer geringeren systemischen Belastung des Patienten reduziert werden. Die Übertragung des Wirkstoffs vom Ballon ins umgebende Gewebe wird durch den mit 10 bar hohen Inflationsdruck verstärkt. Da die Wirkstoffe jeweils möglichst zentral im Tumor positioniert wurden, konnten diese durch den erhöhten Druck im Tumorrinneren auf natürlichem Wege bis in die Tumorperipherie gepresst werden (Vaupel, 1994).

Eine passive Verbreitung im Tumor kann über den extrazellulären Raum erfolgen. Tumore verfügen über keine ausgebildeten gerichteten Lymphbahnen. Im Zentrum des Tumors findet sich ein erhöhter interstitieller Druck. Die Flüssigkeit bewegt sich entsprechend dem Druckgradienten von innen nach außen (Vaupel, 1994). Es wird erwartet, dass sich der in die Mitte des Tumors eingebrachte Arzneistoff langsam löst in die Peripherie gespült wird und auf diesem Wege die nicht direkt behandelten Tumorareale erreicht. Der beschriebene Druckgradient erschwert den Stofftransport von der Peripherie in das Tumorrinnere – ein Problem, das durch die interstitielle Applikation umgangen wird (Seeber und Schütte, 2003).

Ramirez et al. (1996) haben in ihren Untersuchungen einen ausgeprägten Anti-Tumor-Effekt bei der intratumoralen Injektion von Mitoxantron erzielt. Zum Vergleich hatten sie Versuche mit der intravenösen Verabreichung des Zytostatikums durchgeführt und hierbei keinen Anti-Tumor-Effekt erreichen können. Einige Jahre später konnten Farrés et al. (1998) diese guten Ergebnisse mit dem intratumoralen Einsatz von Mitoxantron bei Leberläsionen am Patienten wiederholen. Ein sehr wichtiger Faktor bei der lokalen Behandlung von Tumoren ist nicht nur die Art des verwendeten Wirkstoffes, der Dosierung und der Applikationsart, sondern auch des Applikationsortes. Eine Behandlung des Tumors per Injektion kann an verschiedenen Stellen erfolgen: Zentral in den Tumor, in den Tumorrand oder in die arteriellen beziehungsweise venösen Blutgefäße der Leber.

Nicht bei allen untersuchten Substanzen war es möglich, diese in liquider Form auf die Ballonkatheter aufzutragen, um nach einer Trocknungszeit einen trockenen, gleichmäßigen Überzug auf den Ballonen zu erreichen.

Beim Doxorubicin wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln experimentiert, jedoch konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis bei der Beschichtung erzielt werden. Die beschichtete

Ballonoberfläche stellte sich stets inhomogen dar und der Wirkstoff wies keine ausreichende Haftung auf, so dass die Beschichtung zu schnell wieder abblätterte. Es wäre zu risikoreich gewesen, dass während der Intervention auf dem Weg zum Tumor bereits der größte Teil des Wirkstoffs verloren ginge.

Ebenso problematisch verhielt es sich mit den Erprobungen bei Arsentrioxid. Die Dosis, die für eine Applikation/Tier benötigt wird, konnte volumenmäßig nicht auf den Ballon aufgetragen werden. Es hätten größere oder mehrere Ballonkatheter zur Behandlung des Tumors eingesetzt werden müssen, was jedoch eine verstärkte Manipulation an der Leber bedeutet hätte. Insofern mussten alternative Applikationsformen gefunden werden, um an der Verwendung dieser beiden Substanzen festhalten zu können.

Die Applikation als Lösung mit einer Spritze war naheliegend, aber barg abermals die Problematik des vorzeitigen Abfließens. Die Wirkstofflösung musste also beträchtlich visköser formuliert werden. Bei Doxorubicin konnte dies mit Hilfe eines natürlichen physikalischen Vorganges, einer pH-abhängigen Gelierung, erreicht werden. Die gelartige Konsistenz bei Arsentrioxid wurde durch Zugabe gereinigter Schweinegelatine ermöglicht.

Bei der Injektion von Wirkstoffen gibt es wichtige Besonderheiten zu beachten: Die Partikelgröße von Substanzen in der verwendeten Applikationslösung, die Diffusionsfähigkeit von Partikeln durch das Gewebe, die verschiedenen Bindungsarten der jeweiligen Wirkstoffe an Rezeptoren, die höhere Viskosität des Blutes im Tumor als bei gesundem Gewebe, der interstitielle Flüssigkeitsdruck im tumorösen Gewebe und die Gewebestruktur an sich. Tumorgewebe reagiert anders als intaktes Gewebe und ist daher in seinem Verhalten oftmals schwer einschätzbar (Jang et al., 2003).

In anderen Studien haben sich Arbeitsgruppen ebenfalls mit unterschiedlichen Formen der Wirkstoffimplantation in Tumore beschäftigt. Es gab Untersuchungen mit Nanopartikeln, polymeren Beschichtungen, Gelen, Mikroplättchen und wirkstoffbeladenen Stäbchen (Wolinsky et al., 2012, Weinberg et al., 2007). Weinberg et. al. haben in ihren Versuchen in das Zentrum von VX2-Lebertumoren mit Doxorubicin besetzte Polymer-Stäbchen eingeführt. Bei den Auswertungen wiesen die behandelten Tumore eine geringere Größe als die unbehandelten Tumore auf. Zur Behandlung von Glioblastomen werden GLIADEL® Wafer, das sind Carmustin-beladene Mikroplättchen (\varnothing 14 mm), erfolgreich eingesetzt (Westphal et al., 2003). Ebenso bereits erhältlich ist das OncoGel®, welches nach Injektion in den Tumor über einen Zeitraum von mehr als 50 Tagen kontrolliert Paclitaxel freigegeben soll (Wolinsky et al., 2012).

Es ist zu bedenken, dass die in dieser Arbeit verwendeten Therapeutika im Falle einer Zulassung und Verwendung am menschlichen Patienten, für den Chirurgen einfach zu handha-

ben sind bzw. man davon ausgehen kann, dass in einer Klinik auch zügig gearbeitet werden muss und die Medizinprodukte schnell einsetzbar sein müssen. Daher sollte die Beschichtung auf den Ballonkathetern zumindest so fest haften, dass diese sich nicht bereits beim Handling vor der eigentlichen Intervention ablöst.

Meine Arbeiten haben gezeigt, dass es eine diffizile Angelegenheit ist, eine Beschichtung zu erhalten, die so gut haftet, dass sie sich erst am Bestimmungsort ablöst. In manchen Fällen erhält man auch eine Beschichtung, die wiederum zu gut haftet und sich dann selbst im Tumor nicht vom Ballon abtrennt. Oftmals waren zahlreiche weitere Arbeiten nötig, um einen optimal beschichteten Ballonkatheter zu erhalten.

Für die Gele gilt das Gleiche wie für die beschichteten Ballonkatheter: Die Komponenten müssten für den Einsatz als Medizinprodukt für den Anwender entweder leicht zu mischen sein bzw. in einer stabilen haltbaren Form vorliegen, so dass das Gel schnell einsatzbereit wäre und zur Therapie verwendet werden könnte.

5.4.1 Anwendbarkeit in der Klinik

Die lokale Tumor-Therapie mittels beschichteter Ballonkatheter oder Injektion eines wirkstoffhaltigen Gels könnte beim Menschen durchgeführt werden (Speck, 2011). In diesem Fall wäre es auch einfacher, einen schonenderen minimalinvasiven Eingriff unter Lokalanästhesie im CT durchzuführen. Der Patient wird sich vermutlich weitaus kooperativer zeigen als ein Tier in Vollnarkose und könnte unter anderem für die Dauer der Expansion des Ballons dazu aufgefordert werden, einzusatmen und den Atem anzuhalten. Dadurch könnte man ein Herausrutschen des Ballonkatheters aus dem zu behandelnden Areal verhindern. Dies war auch der Hauptgrund weshalb leider auf eine minimalinvasive Methode bei den Versuchstieren verzichtet werden musste.

Die Versuche zeigen, dass die Belastung für den Patienten anfangs durch den operativen Eingriff, insbesondere wenn er patientenbedingt doch mit einer Vollnarkose verbunden wäre, größer sein mag, als bei der Durchführung einer systemischen Chemotherapie, allerdings könnte auf diese Weise auch der Tumor - trotz geringerer Dosis effektiver - direkt therapiert werden. Gemäß den Ergebnissen würden die unerwünschten Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus entfallen bzw. stark vermindert auftreten.

5.5 Vergleich Dosis VX2-Tumor mit systemischer Humandosis

Paclitaxel wurde, verglichen mit der systemischen Humandosis, in der niedrigsten Dosis von allen verwendeten Substanzen im Tierversuch eingesetzt. Dennoch wurde immer noch eine sehr hohe Dosis im Zielgewebe abgegeben. Die applizierte Dosis an Paclitaxel pro Tumor betrug 1,8 mg. Die geringen Beschichtungsrückstände auf den Ballonkathetern nach der Verwendung sind vernachlässigbar. Wenn man davon ausgeht, dass ein Tumor ein Gewicht von 50 g besitzt und die entsprechende systemische Humandosis auf ebenfalls 50 g herunter rechnet, so erhält man eine vergleichbare Dosis von 0,2 mg (0,6% der vergleichbaren systemischen Humandosis). Für die anderen Wirkstoffe liegen die Werte der Humandosis viel niedriger. Daher fällt der prozentuale Anteil der Wirkstoffkonzentration im Vergleich zur systemischen Humandosis höher aus, insbesondere für das Arsentrioxid bei dem Werte bis zu 195,5% erreicht werden.

Bei den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde beispielsweise bei Arsentrioxid mit anderen Dosierungen gearbeitet. So wurde eine Wachstumshemmung von Metastasen mit weitaus geringeren Dosen als in dieser Studie publiziert (Zhao et al., 2009). Kim et al. (2009) erreichten beim Kaninchen im VX2-Modell mit einer vielfach höheren Dosis (5mg/kg KG) mittels TACE einen Anti-Tumor-Effekt.

Bei bestehender Notwendigkeit bestünde auch noch technisch die Möglichkeit, die Ballonkatheter mit einer konzentrierteren Lösung oder mehreren Durchgängen wiederholt zu beschichten. Limitierender Faktor ist hierbei zum einen die Löslichkeit der Substanzen im Lösungsmittel und zum anderen die Anzahl der Beschichtungsdurchgänge. Zweimaliges Beschichten funktioniert in der Regel gut, ein dreimaliges Beschichten ist in Einzelfällen auch möglich. Darüber hinaus gestaltet sich der Beschichtungsvorgang jedoch problematisch. Beim wiederholten Auftrag löst man die trockene vorangegangene Schicht wieder auf. Diese verflüssigt sich wieder und man erhält eine zu große Flüssigkeitsmenge auf dem Ballon, die nur noch schwer zu kontrollieren ist und die Gefahr des „Tropfens“ in sich birgt. Dadurch kommt es dann zu Wirkstoffverlust und die Dosis des Ballons ist nicht mehr kalkulierbar.

5.6 Bildgebung CT

Nicht nur die Größenveränderung des Perfusionsdefekts im CT-Bild gibt Aufschluss über den Therapieerfolg, vielmehr muss auch der Zustand des Gewebes bekannt sein, da dieser aus den CT-Aufnahmen nicht ersichtlich ist. Eine Größenzunahme des Perfusionsdefekts kann durch Tumorwachstum oder durch Absterben von gesundem Gewebe als Reaktion auf hohe

Zytostatika-Konzentration bedingt sein. Vitale Tumorteile wachsen weiter; nekrotische Anteile stellen sich im CT zwar ebenso wie vitales Tumorgewebe dar, wachsen aber nicht (Speck, 2007). So kann ein im CT kleiner wirkender Tumor weitaus destruirendere Auswirkungen auf das Lebergewebe besitzen als ein größerer nekrotischer Tumor.

Gemäß meiner Untersuchungen im CT konnte ausschließlich die Fläche und das Volumen des Perfusionsdefektes berechnet werden. Das Ausmaß der Vitalität konnte erst nach der Tumorentnahme bei einer makroskopischen Begutachtung eingeschätzt und nach einer weiteren Behandlung mit dem TTC-Test endgültig bewertet werden (Speck, 2007). Bei fast allen bearbeiteten Wirkstoffen stimmten die CT-Aufnahmen mit dem Ist-Zustand relativ gut überein. Eine Substanz erreichte jedoch bei den Tumoren eine außergewöhnliche Wirkung und zeigte bei der Präparation ein abweichendes Bild von den CT-Aufnahmen zuvor.

Dieser Effekt wurde eindrucksvoll bei den Behandlungen mit dem Arsentrioxid-Gel beobachtet. Bei der visuellen Auswertung der CT-Aufnahmen ergaben sich beträchtliche Läsionen – die sich jedoch später bei der Präparation der Leber als relativ kleine avitale Tumore mit einem breiten defekten Lebersaum darstellten.

5.7 Histologie, Auswertung Nekrosen

Obwohl das Doxorubicin während des Zeitraumes zwischen Therapie und Euthanasie ständigen Auswaschungen durch den Blutkreislauf ausgesetzt war, konnten die doxorubicinroten Areale während der Leberentnahme immer noch deutlich auf der Tumoroberfläche und im Bereich des Injektionskanals erkannt werden.

Zur Herstellung des Arsentrioxid-Gels wurde Spongostan-Powder[®] eingesetzt. Dabei handelt es sich um gereinigte Schweinegelatine, die zum Teil aus Knochenmark gewonnen wird. Das stützt meine Vermutung, dass es sich bei den histologisch angefärbten blauen ungewöhnlichen Bereichen um verbliebene Restbestandteile des Arsentrioxid-Gels handeln könnte. Es besteht die Möglichkeit, dass das Arsentrioxid sich teilweise oder vollständig mit der Gelatine verbunden hat und nicht ausgewaschen wurde. Es ist aber nicht auszuschließen, dass das Arsentrioxid nicht mehr vorhanden ist und sich nur noch die Gelatinereste im Stichkanal zeigen.

Mit diesen Gel-Varianten vom Arsentrioxid und auch vom Doxorubicin könnte also möglicherweise eine ausgesprochen gute Depotwirkung im Tumor erreicht werden. Dadurch könn-

te mit einer einmaligen Applikation und Manipulation am Patienten eine längerfristige medikamentelle Behandlung des Tumors erfolgen.

5.8 Ausblick und Schlussfolgerung

Die Zielsetzung in diesem Projekt war die Erarbeitung eines lokalen Therapieverfahrens zur Bekämpfung von Lebertumoren/-metastasen, welches entweder als neoadjuvante, adjuvante oder ausschließliche Behandlung angewendet werden kann.

Bei den aus den in vitro Versuchen selektierten Substanzen Paclitaxel, Fantolon, Doxorubicin und Arsentrioxid zeigte sich bei allen vieren auch in vivo eine Wirkung. Für die Zytostatika Paclitaxel, Fantolon und Doxorubicin fiel der Wirkungsgrad relativ ähnlich aus – das Arsentrioxid bildete jedoch einen Kontrast dazu, infolgedessen es vom behandelten Tumorgewebe ausgehend weit in das gesunde Lebergewebe reichende Gewebnekrosen verursachte. Bei den anderen zuvor genannten Substanzen wurden die Tumore anscheinend nicht flächendeckend von den lokalen Therapieverfahren erfasst. Es ließ sich zwar zerstörtes Tumorgewebe erkennen, jedoch bildeten sich lediglich unvollständige Tumornekrosen aus.

Die Therapie mit Arsentrioxid zeigte bei hinreichender Dosis erstaunliche und hoffnungsvolle Veränderungen am Tumor und dem angrenzenden Lebergewebe, die sich von den Beobachtungen aller anderen getesteten Substanzen unterschieden. Mit den hier beschriebenen Versuchen konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es sich um eine erwünschte Wirkung oder eher unkontrollierbare lokale Toxizität handelt. Daher wäre es von wissenschaftlichem Interesse, diesen Versuchsteil mit den Auswirkungen von Arsentrioxid auf den VX2-Tumor weiter zu bearbeiten.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das kolorektale Karzinom wird in vielen Fällen erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Zu diesem Zeitpunkt ist es daher bereits häufig in die Leber metastasiert. In diesen Fällen müssen beim Patienten nicht nur der Ursprungstumor, sondern auch die Metastasen therapiert werden. Für die Behandlung der Lebermetastasen, aber auch primären Lebertumoren bieten sich lokale Verfahren an.

Die Zielsetzung in diesem Projekt war die Untersuchung eines lokalen Therapieverfahrens zur Bekämpfung von Lebertumoren/-metastasen, welches entweder als neoadjuvante, adjuvante oder ausschließliche Behandlung angewendet werden kann.

In der vorliegenden Studie sollte im Tierversuch eine möglichst schonende lokale Tumortherapie untersucht werden, die mit einer geringen Medikamenten-Dosis auskommt. Die Versuche zur Wirksamkeit und Verträglichkeit der Methode wurden an 20 Kaninchen mit in die Leber implantierten VX2-Tumoren durchgeführt. Der Grundgedanke war, durch die Beschichtung von Ballonkathetern eine lokale perkutane Behandlung mit therapeutisch wirksamen Substanzen zu ermöglichen. Durch die Zunahme der Oberfläche des Ballons bei der Expansion wird eine große Gewebefläche erreicht. Ferner wird durch den Druck des Ballonkatheters die Beschichtung nachhaltig in das Gewebe gepresst. Die Wirkstoffe sollten sich nur langsam auflösen bzw. aus dem Tumor abgeschwemmt werden.

Die folgenden Zytostatika wurden ausgewählt: Paclitaxel, Arsentrioxid, 5-Fluorouracil, Fantolon, Bortezomib, Doxorubicin und Mitoxantron. Außerdem wurde allen Wirkstoffen jeweils eine wirkstofffreie Kontrolle gegenübergestellt.

Die sieben genannten Substanzen wurden bezüglich ihrer Zytotoxizität gegenüber VX2-Tumorzellen in vitro in Zellkultur überprüft. Dazu wurde jede einzelne Substanz in vier unterschiedlich hohen Konzentrationen (von 2 bis 32 $\mu\text{mol/l}$ für Paclitaxel, Arsentrioxid, Fantolon, 5-Fluorouracil und Mitoxantron; von 10 bis 25 $\mu\text{mol/l}$ für Doxorubicin; von 0,1 bis 0,4 $\mu\text{mol/l}$ für Bortezomib) jeweils für 24, 48 und 72 Stunden zu den VX2-Zellen gegeben. Als Kontrolle wurden Tumorzellen mit wirkstofffreier Lösung inkubiert.

Die insgesamt verbleibende intramitochondriale Dehydrogenaseaktivität als Maß für die Vitalität der Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle war bei Verwendung des für jede Substanz niedrigsten ermittelbaren Mittelwertes bei Doxorubicin mit $12 \pm 3\%$ (16 $\mu\text{mol/l}$ nach 72 h) am geringsten und bei Arsentrioxid mit $52 \pm 4\%$ (15 $\mu\text{mol/l}$ bei 48 h) am höchsten von allen eingesetzten Wirkstoffen. Alle geprüften Substanzen waren wirksam und die Auswahl der

Substanzen für die tierexperimentelle Studie erfolgte daher aufgrund der physikochemischen Eigenschaften, des Wirkmechanismus und der Erfahrung mit den Substanzen in früheren Untersuchungen für andere Indikationen.

Limitierend auf die in vivo Versuche wirkte sich aus, dass nicht alle zuvor ausgewählten Testsubstanzen sich für das Auftragen auf die Ballonkatheter als geeignet erwiesen. Aus diesem Grund mussten für die Erprobung dieser Wirkstoffe im Tiermodell andere Applikationsformen gefunden werden. Arsentrioxid und Doxorubicin wurden mit einer Spritze direkt in den Tumor injiziert (je Gruppe vier Tiere). Pro Wirkstoff wurden vier Kaninchen behandelt. Die applizierte Dosis betrug bei Paclitaxel 1,57 bis 1,78 mg, bei Arsentrioxid 11,5 bis 22,0 mg, bei Fantolon 1,12 bis 1,16 mg und bei Doxorubicin 5,94 bis 20,78 mg. Im Studienverlauf wurden die Dosierungen für Arsentrioxid und Doxorubicin wegen guter Verträglichkeit und mangelnder Wirkung erhöht. Die Hälfte der Kontrollgruppe wurde mit einem unbeschichteten Ballonkatheter behandelt (zwei Tiere), bei der anderen Hälfte der Gruppe (zwei Tiere) eine Injektion mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt, um die mechanische Manipulation des Tumors bei der medikamentengestützten Behandlung zu imitieren.

Die Wirksamkeit der Behandlung auf das Tumorwachstum wurde nach 1-2 Wochen mittels Computertomographie während und kurz nach Kontrastmittelinjektion kontrolliert. Im Computertomogramm ist der Tumor aufgrund einer gegenüber dem gesunden Lebergewebe geringeren Durchblutung als Perfusionsdefekt dargestellt. Eine Verminderung der Größe des Perfusionsdefekts nach der Therapie würde eine Abnahme der Tumorgöße anzeigen, während eine Zunahme der Größe des Perfusionsdefektes durch Tumorwachstum oder Nekrose bedingt sein kann. Deshalb wurde eine Anfärbung vitaler Gewebeanteile nach der Entnahme des Lebergewebes mit Perfusionsdefekt mittels TTC-Färbung durchgeführt.

Die Wirkung der in vivo untersuchten Substanzen entsprach insgesamt nicht vollständig den Ergebnissen aus den im Vorfeld durchgeführten Zellversuchen. Nur bei zwei von insgesamt zwanzig Tieren wurde eine Verringerung des für den Tumor typischen Perfusionsdefektes in der Leber beobachtet: Ein Tier aus der mit Fantolon behandelten Gruppe (-36% gegenüber der Messung in der Vorwoche) sowie ein mit einem unbeschichteten Ballonkatheter behandeltes Kontrolltier (-6%). Bei den restlichen Tieren aus der Studie konnte nur anhand der unterschiedlichen Vergrößerung des Perfusionsdefektes eine Aussage über die Wirkung der eingesetzten Substanzen getroffen werden. Dabei schnitt die Gruppe der mit Paclitaxel behandelten Tiere mit der durchschnittlich geringsten prozentualen Größenzunahme ($271 \pm 186\%$) am besten ab, gefolgt von der Kontrollgruppe ($903 \pm 925\%$). Eine äußerst hohe Zunahme des Perfusionsdefektes in der Leber zeigte sich bei dem Therapieversuch mit Arsentrioxid ($3.580 \pm 4.871\%$), wobei der größte Teil des nicht oder minder-perfundierten Gewebes nekrotisch war.

Keine der in dieser Studie erprobten Substanzen und Formulierungen hat in vivo die erwünschte überzeugende lokale zytotoxische Eigenschaft gezeigt. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Paclitaxel und Arsentrioxid nach lokaler Verabreichung eine nützliche, das Tumorstadium hemmende Wirkung haben. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der ex vivo Tumormessungen und der Tumorphathologie gestützt. Daher sollten weitere Experimente speziell mit Arsentrioxid durchgeführt werden, die Dosis, Formulierung und Applikationsart der Substanz betreffen, um Gewissheit in Bezug auf die Vitalität des als Perfusionsdefekt dargestellten Gewebes zu erhalten, die Reproduzierbarkeit der Befunde zu belegen und eine Abschätzung des möglichen Nutzens für die lokale Tumorthherapie zu erlauben.

7 SUMMARY

Title: “Evaluation of new methods for local tumor therapy in a VX2 rabbit model”

In many cases, only advanced stage colorectal cancer is diagnosed. At this point, it has often already metastasised to the liver. In these cases, not only the patient's primary tumor, but also metastases have to be treated. For the treatment of both liver metastases and primary tumors there are local procedures to be offered.

The objective of this project was to investigate new methods of local therapy of liver tumors/metastases, which can be used either as neoadjuvant, adjuvant or stand-alone treatment.

It was the aim of this study to investigate minimally invasive local tumor therapy using a low dose of drugs. The study on efficacy and tolerance of this method was conducted in 20 rabbits with implanted VX2 liver tumors. The initial idea was to allow local percutaneous treatment of tumors with therapeutically active substances delivered by drug-coated balloon catheters. In this way, a large tissue surface area will be attained by the increased surface of the balloon through its expansion. In addition, the coating will be sustainably pressed into the tumor tissue. After that, the active substance should be slowly dissolved in the tissue or slowly washed away from its location.

The following cytostatics were selected: paclitaxel, arsenic trioxide, 5-fluorouracil, fantolon, bortezomib, doxorubicin and mitoxanthrone. In addition, the drugs were compared with appropriate drug-free controls.

The above mentioned substances were tested *in vitro* for their cytotoxicity against the VX2 tumor cells in culture. The cells were exposed to any substance at four different concentrations (2-32 $\mu\text{mol/l}$ for paclitaxel, arsenic oxide, fantolon, 5-fluorouracil and mitoxanthrone, 10-25 $\mu\text{mol/l}$ for doxorubicin, 0.1-0.4 $\mu\text{mol/l}$ for bortezomib) for 24, 48 and 72 hours. As a control, tumor cells were incubated without drugs.

The total remaining intramitochondrial dehydrogenase activity as a measure of the cellular vitality compared to the control was the lowest for doxorubicin with $12 \pm 3\%$ (16 $\mu\text{mol/l}$ after 72 h incubation) and the highest for arsenic trioxide with $52 \pm 4\%$ (15 $\mu\text{mol/l}$ after 48 h) when the lowest value was selected for each substance.

All tested substances were shown to be effective, and their selection for the investigation in the animal study was based on their physicochemical properties and mechanism of action, as well as on the experience with these substances in previous studies for other indications.

Not all test substances selected in this study were shown to be suitable for the coating of balloon catheters, thereby limiting this method of administration in the *in vivo* experiments. For that reason another mode of administration of these substances had to be chosen. Arsenic trioxide and doxorubicin were injected directly into the tumor using a syringe (four animals per group). Four rabbits were used for each drug to be tested. The applied doses were between 1.57 to 1.78 mg for paclitaxel, 11.5 to 22.0 mg for arsenic trioxide, 1.12 to 1.16 for fantolon and 5.94 to 20.78 for doxorubicin. In the course of the study the doses for doxorubicin and arsenic trioxide could be increased due to their good tolerability and low effect. Half of the animals in the control group were treated with an uncoated balloon catheter (two animals), while the other half of the same group (two animals) received a physiological saline solution by injection to mimic mechanical manipulation of the tumor in treatment with the drugs.

The effectiveness of the treatment on tumor growth was controlled after 1-2 weeks by computer tomography during and shortly after injection of a contrast agent. In contrast-enhanced computed tomography the liver tumor is detected by its low blood supply, defined here as perfusion defect, when compared to the healthy liver tissue. A reduction in the size of the perfusion defect after therapy indicates a decrease in the tumor size, while an increase can be attributed to tumor growth or necrosis. Therefore, after dissection TCC staining of vital parts of the tissue with a perfusion defect was performed.

Overall, the effect of the investigated substances *in vivo* did not completely correspond to the results in cell culture experiments. In only two out of twenty animals a reduction of the tumor-related perfusion defect in the liver was observed: one animal in the group treated with fantolon (-36% of the value measured one week before) and one control animal treated with an uncoated balloon (-6% of the value measured one week before). In all other animals the assessment of the efficacy of the substances is only based on the increase of the perfusion defect. The lowest percentage growth in the perfusion defect was observed in animals treated with paclitaxel ($271 \pm 186\%$), followed by animals of the control group ($903 \pm 925\%$). The largest increase in the perfusion defect was seen after treatment with arsenic trioxide ($3580 \pm 4871\%$), where the largest proportion of the poorly or not perfused liver tissue was necrotic.

None of the substances and formulations tested in this study showed the desired local cytotoxic properties *in vivo*. However, it cannot be excluded that local administration of paclitaxel and arsenic trioxide inhibits tumor growth. This assumption is supported by the results of ex

vivo measurements of the tumor size and by pathological examination. Thus, further experiments regarding the dose, formulations and mode of administration should be conducted, especially for arsenic trioxide, in order to demonstrate reproducibility of the findings, gain insight certainty with respect to vitality of the damaged tissue defined as perfusion defect and to assess the potential benefits of these substances for local tumor therapy.

8 ANHANG

8.1 In vitro Zellversuche: Einzelwerte der Extinktionsmessungen

<u>Fluoruracil</u>	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,257	1,242	1,256	1,200	1,230	1,266	1,242	100,00
Konz.-Stufe 1	0,833	0,708	0,701	0,748	0,706	0,747	0,741	59,63
Konz.-Stufe 2	0,545	0,655	0,686	0,665	0,630	0,683	0,644	51,86
Konz.-Stufe 3	0,714	0,730	0,677	0,750	0,271	0,682	0,637	51,32
Konz.-Stufe 4	0,480	0,579	0,549	0,617	0,599	0,600	0,571	45,95

Konz.-Stufe 0	1,359	1,424	1,480	1,343	1,388	1,410	1,401	100,00
Konz.-Stufe 1	0,699	0,443	0,589	0,667	0,614	0,903	0,653	46,58
Konz.-Stufe 2	0,697	0,525	0,417	0,665	0,582	0,675	0,594	42,37
Konz.-Stufe 3	0,535	0,543	0,470	0,755	0,857	0,474	0,606	43,24
Konz.-Stufe 4	0,770	0,422	0,510	0,495	0,580	0,634	0,569	40,59

<u>Fluoruracil</u>	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,502	0,821	1,552	1,492	1,594	1,638	1,433	100,00
Konz.-Stufe 1	0,821	0,767	0,795	0,745	0,754	0,776	0,776	54,17
Konz.-Stufe 2	0,693	0,599	0,745	0,613	0,748	0,736	0,689	48,08
Konz.-Stufe 3	0,622	0,655	0,619	0,608	0,546	0,703	0,626	43,64
Konz.-Stufe 4	0,604	0,551	0,604	0,565	0,574	0,634	0,589	41,07

Fantolon	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,220	1,221	1,272	1,243	1,212	1,365	1,256	100,00
Konz.-Stufe 1	0,400	0,373	0,403	0,363	0,420	0,365	0,387	30,85
Konz.-Stufe 2	0,402	0,429	0,413	0,380	0,389	0,405	0,403	32,10
Konz.-Stufe 3	0,455	0,592	0,355	0,218	0,441	0,408	0,412	32,78
Konz.-Stufe 4	0,474	0,394	0,302	0,449	0,398	0,411	0,405	32,23

Fantolon	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 48 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,395	1,204	1,408	1,305	1,403	1,397	1,352	100,00
Konz.-Stufe 1	0,410	0,367	0,349	0,344	0,326	0,383	0,363	26,86
Konz.-Stufe 2	0,387	0,303	0,375	0,323	0,372	0,414	0,362	26,80
Konz.-Stufe 3	0,410	0,443	0,420	0,387	0,371	0,485	0,419	31,02
Konz.-Stufe 4	0,416	0,400	0,461	0,391	0,388	0,438	0,416	30,74

Fantolon	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,528	1,565	1,544	1,479	1,573	1,634	1,554	100,00
Konz.-Stufe 1	0,350	0,369	0,389	0,278	0,335	0,425	0,358	23,02
Konz.-Stufe 2	0,301	0,320	0,345	0,350	0,479	0,494	0,382	24,55
Konz.-Stufe 3	0,381	0,349	0,320	0,370	0,405	0,467	0,382	24,58
Konz.-Stufe 4	0,387	0,322	0,399	0,374	0,406	0,465	0,392	25,24

<u>Paclitaxel</u>	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,360	1,281	1,322	1,224	1,280	0,996	1,244	100,00
Konz.-Stufe 1	0,397	0,391	0,486	0,273	0,276	0,422	0,374	30,08
Konz.-Stufe 2	0,319	0,382	0,171	0,250	0,322	0,386	0,305	24,52
Konz.-Stufe 3	0,422	0,391	0,370	0,370	0,401	0,516	0,412	33,10
Konz.-Stufe 4	0,342	0,463	0,299	0,491	0,306	0,341	0,374	30,04

<u>Paclitaxel</u>	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 48 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,385	1,376	1,451	1,400	1,446	1,505	1,427	100,00
Konz.-Stufe 1	0,314	0,316	0,279	0,276	0,278	0,297	0,293	20,55
Konz.-Stufe 2	0,323	0,305	0,289	0,322	0,297	0,307	0,307	21,52
Konz.-Stufe 3	0,450	0,437	0,386	0,358	0,448	0,410	0,415	29,07
Konz.-Stufe 4	0,310	0,318	0,391	0,332	0,381	0,355	0,348	24,37

<u>Paclitaxel</u>	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,471	1,541	1,544	1,476	1,565	1,641	1,540	100,00
Konz.-Stufe 1	0,209	0,284	0,284	0,300	0,277	0,318	0,279	18,10
Konz.-Stufe 2	0,266	0,282	0,280	0,280	0,347	0,328	0,297	19,30
Konz.-Stufe 3	0,297	0,398	0,344	0,314	0,350	0,459	0,360	23,40
Konz.-Stufe 4	0,308	0,361	0,310	0,335	0,376	0,477	0,361	23,46

Bortezomib	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,224	1,082	1,201	1,097	1,261	1,198	0,729	100,00
Konz.-Stufe 1	0,707	0,731	0,742	0,618	0,844	0,733	0,636	87,25
Konz.-Stufe 2	0,537	0,640	0,885	0,668	0,464	0,623	0,610	83,70
Konz.-Stufe 3	0,544	0,562	0,562	0,637	0,691	0,666	0,574	78,74
Konz.-Stufe 4	0,538	0,477	0,570	0,641	0,643	0,576	0,574	78,74

Bortezomib	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 48 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,388	1,417	1,362	1,388	1,376	1,416	1,391	100,00
Konz.-Stufe 1	0,869	0,935	0,905	0,801	0,863	0,903	0,879	63,21
Konz.-Stufe 2	0,741	0,558	0,630	0,556	0,832	0,880	0,700	50,28
Konz.-Stufe 3	0,541	0,542	0,746	0,723	0,660	0,773	0,664	47,74
Konz.-Stufe 4	0,665	0,558	0,571	0,624	0,569	0,636	0,604	43,40

Bortezomib	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,462	1,519	1,492	1,477	1,501	1,525	1,496	100,00
Konz.-Stufe 1	0,784	0,766	0,877	0,844	0,853	0,934	0,843	56,35
Konz.-Stufe 2	0,849	0,795	0,760	0,902	0,780	0,850	0,823	54,99
Konz.-Stufe 3	0,776	0,814	0,786	0,727	0,847	0,926	0,813	54,32
Konz.-Stufe 4	0,713	0,715	0,675	0,745	0,733	0,763	0,724	48,40

Arsentrioxid	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,270	1,263	1,266	1,314	1,346	1,331	1,298	100,00
Konz.-Stufe 1	0,910	0,721	0,815	0,856	0,837	0,900	0,840	64,69
Konz.-Stufe 2	0,826	0,861	0,837	0,730	0,851	0,886	0,832	64,07
Konz.-Stufe 3	0,869	0,733	0,798	0,791	0,777	0,901	0,812	62,50
Konz.-Stufe 4	0,766	0,740	0,953	0,774	0,779	0,824	0,806	62,08

Arsentrioxid	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 48 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,204	1,404	1,372	1,398	1,385	1,468	1,372	100,00
Konz.-Stufe 1	0,653	0,902	0,765	0,862	0,764	0,803	0,792	57,70
Konz.-Stufe 2	0,769	0,668	0,700	0,783	0,628	0,720	0,711	51,85
Konz.-Stufe 3	0,821	0,730	0,786	0,799	0,701	0,711	0,758	55,25
Konz.-Stufe 4	0,789	0,650	0,734	0,759	0,800	0,797	0,755	55,02

Arsentrioxid	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,612	1,527	1,525	1,539	1,577	1,605	1,564	100,00
Konz.-Stufe 1	0,862	0,804	0,810	0,872	0,870	0,877	0,849	54,29
Konz.-Stufe 2	0,732	0,846	0,818	0,915	0,877	0,931	0,853	54,54
Konz.-Stufe 3	0,873	0,747	0,689	1,048	0,803	0,868	0,838	53,57
Konz.-Stufe 4	0,818	0,757	0,964	0,861	0,891	0,895	0,864	55,26

Doxorubicin	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,254	1,244	1,266	1,264	1,283	1,302	1,269	100,00
Konz.-Stufe 1	0,665	0,688	0,661	0,692	0,630	0,755	0,682	53,74
Konz.-Stufe 2	0,688	0,591	0,599	0,559	0,453	0,727	0,603	47,51
Konz.-Stufe 3	0,477	0,538	0,047	0,440	0,048	0,435	0,331	26,07
Konz.-Stufe 4	0,576	0,554	0,519	0,481	0,522	0,588	0,540	42,56

Doxorubicin	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 48 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,304	1,330	1,376	1,340	1,299	1,423	1,345	100,00
Konz.-Stufe 1	0,562	0,539	0,635	0,562	0,502	0,661	0,577	42,88
Konz.-Stufe 2	0,477	0,444	0,533	0,464	0,487	0,557	0,494	36,69
Konz.-Stufe 3	0,201	0,197	0,207	0,193	0,198	0,215	0,202	15,00
Konz.-Stufe 4	0,276	0,285	0,263	0,256	0,276	0,296	0,275	20,47

Doxorubicin	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,499	1,567	1,502	1,563	1,551	1,627	1,552	100,00
Konz.-Stufe 1	0,675	0,664	0,649	0,659	0,748	0,654	0,675	43,50
Konz.-Stufe 2	0,620	0,484	0,505	0,545	0,567	0,652	0,562	36,23
Konz.-Stufe 3	0,181	0,176	0,183	0,176	0,172	0,187	0,179	11,55
Konz.-Stufe 4	0,231	0,244	0,235	0,236	0,247	0,263	0,243	15,64

Mitoxanthron	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,130	1,160	1,117	1,166	1,174	1,278	1,171	100,00
Konz.-Stufe 1	0,475	0,509	0,699	0,862	0,920	0,754	0,703	60,06
Konz.-Stufe 2	0,610	0,632	0,525	1,015	0,755	0,623	0,693	59,22
Konz.-Stufe 3	0,524	0,601	0,477	0,542	0,478	0,556	0,530	45,24
Konz.-Stufe 4	0,557	0,531	0,511	0,536	0,499	0,604	0,540	46,09

Mitoxanthron	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 48 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,366	1,349	1,405	1,400	1,311	1,473	1,384	100,00
Konz.-Stufe 1	0,569	0,594	0,556	0,466	0,472	0,692	0,558	40,33
Konz.-Stufe 2	0,465	0,490	0,549	0,596	0,577	0,724	0,567	40,96
Konz.-Stufe 3	0,371	0,439	0,392	0,382	0,450	0,446	0,413	29,87
Konz.-Stufe 4	0,312	0,303	0,316	0,263	0,242	0,368	0,301	21,72

Mitoxanthron	Mikrotiterplatten mit Wirkstoff 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Konz.-Stufe 0	1,490	1,553	1,564	1,504	0,473	0,247	1,139	100,00
Konz.-Stufe 1	0,573	0,448	0,619	0,574	0,448	0,691	0,559	49,09
Konz.-Stufe 2	0,596	0,578	0,552	0,554	0,444	0,575	0,550	48,29
Konz.-Stufe 3	0,473	0,419	0,390	0,432	0,390	0,392	0,416	36,54
Konz.-Stufe 4	0,247	0,229	0,272	0,251	0,245	0,318	0,260	22,87

<u>2,5% DMSO</u>	Mikrotiterplatten 24 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Medium	0,755	0,718	0,649	0,693	0,608	0,797	0,703	100,00
DMSO	0,809	0,571	0,712	0,854	0,666	0,872	0,747	106,26

<u>2,5% DMSO</u>	Mikrotiterplatten 48 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Medium	0,815	0,724	0,905	0,883	0,794	0,872	0,832	100,00
DMSO	0,788	0,834	0,951	0,878	0,818	0,679	0,825	99,10

<u>2,5% DMSO</u>	Mikrotiterplatten 72 h inkubiert, Messung 4 h nach XTT-Test						Mittelwert	Anteil in %
Medium	1,121	0,962	1,175	1,155	1,200	1,217	1,138	100,00
DMSO	1,016	0,730	0,897	0,951	0,873	0,981	0,908	79,77

9 ABKÜRZUNGEN

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
AFB1	Aflatoxin B1
APL	Akute Promyelozytäre Leukämie
Bar	Bar (Einheit für Druck)
bzw.	beziehungsweise
CT	Computertomograph
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
HBsAg	Hepatitis B Surface Antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HE	Houncefield-Einheiten
HiTT	Hochfrequenzinduzierte Thermotherapie
i.a.	intraarteriell
IGF2R	Insulin-like-growth-factor-2-receptor
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
Le	Leber
LiTT	Laserinduzierte interstitielle Thermotherapie
mm	Millimeter
MWK	Mikrowellenkoagulation
NaCl	Natriumchlorid
NASH	Nicht alkoholische Fettleberhepatitis
PAI	Perkutane Essigsäureinjektion
PEI	Perkutane Ethanolinjektion
Proc.	Processus
p53	Protein mit einer Molekularmasse von 53 kDa
RFA	Radio-Frequenz-Ablation
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
s.	siehe
s.c.	subcutan
Tab.	Tabelle

TAC	Transarterielle Chemoperfusion
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TAE	Transarterielle Embolisation
TNM	„Tumor – Lymphknotenmetastasen – Fernmetastasen“
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
Tu	Tumor
V.	Vena
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium-hydroxide
z. B.	zum Beispiel
5-FU	5-Fluorouracil

10 MEDIKAMENTEN- UND CHEMIKALIENLISTE

Bezeichnung	Firma	Ort
Ketavet [®]	Pfizer Pharmacia GmbH	Karlsruhe/Deutschland
Rompun [®]	Bayer Vital GmbH	Berlin/Deutschland
Natriumchlorid 0,9 %	Fresenius Kabi Deutschland GmbH	Bad Homburg/Deutschland
Softasept [®]	B. Braun Melsungen AG	Melsungen/Deutschland
Braunoderm [®]	B. Braun Melsungen AG	Melsungen/Deutschland
Braunovidon-Salbe [®]	B. Braun Melsungen AG	Melsungen/Deutschland
Tardomyocel [®] comp. III	Bayer Vital GmbH	Bad Homburg/Deutschland
Novaminsulfon [®]	Ratiopharm GmbH	Ulm/Deutschland
Ultravist 300/370 [®]	Bayer Schering Pharma GmbH	Berlin/Deutschland
Dy EOB DTPA	Bayer Schering Pharma GmbH	Berlin/Deutschland
T 61 [®]	Intervet GmbH	Unterschleißheim/Deutschland
Gefriermedium	Serva GmbH	Heidelberg/Deutschland
RPMI-1640-Medium	Sigma Aldrich Chemie	St. Louis/USA
Paclitaxel	Indena	Mailand/Italien
Fantolon	Bayer Schering Pharma GmbH	Berlin/Deutschland
Doxorubicin	Davos Chemical Corporation	New Jersey/USA
Arsentrioxid	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen/Deutschland
Bortezomib	Takeda	Aachen/Deutschland
5-Fluorouracil	Sigma Aldrich Chemie	Taufkirchen/Deutschland
Mitoxantron	Auspure Bio-Technology Ltd.	China
Aceton	J.T. Baker	Deventer/Holland
Ethanol	Th. Geyer GmbH & Co. KG	Renningen/Deutschland
DMSO	Merck	Darmstadt/Deutschland
Cell Profilation Kit II (XTT) [®]	Roche Diagnostics GmbH	Deutschland
Methanol	Sigma Aldrich Chemie	St. Louis/USA
Spongostan Powder [®]	Ethicon, Johnson & Johnson Medical Ltd.	Berkshire/USA
Leukase N Kegel [®]	Dermapharm AG	Grünwald/Deutschland
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid	Merck	Darmstadt/Deutschland
Phosphatpuffer	Waldeck GmbH & Co KG	Münster/Deutschland
Formalinlösung 4%	J.T. Baker	Deventer/Holland

11 LITERATURVERZEICHNIS

- ABOU-ALFA, G. K., und VENOOK, A. P., 2008: The impact of new data in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Curr Oncol Rep*, **10**, 199-205.
- ADAMI, H. O., CHOW, W. H., NYREN, O., BERNE, C., LINET, M. S., EKBOM, A., WOLK, A., MCLAUGHLIN, J. K., und FRAUMENI, J. F., JR., 1996: Excess risk of primary liver cancer in patients with diabetes mellitus. *J Natl Cancer Inst*, **88**, 1472-7.
- AHN, J., and FLAMM, S. L., 2004: Hepatocellular carcinoma. *Dis Mon*, **50**, 556-73.
- AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F., STARKE, K., 2009: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer.
- ALACACIOGLU, A., SOMALI, I., SIMSEK, I., ASTARCIOGLU, I., OZKAN, M., CAMCI, C., ALKIS, N., KARAOGLU, A., TARHAN, O., UNEK, T., und YILMAZ, U., 2008: Epidemiology and Survival of Hepatocellular Carcinoma in Turkey: Outcome of Multicenter Study. *Jpn J Clin Oncol*.
- ALKADHI, H., LESCHKA, S., STOLZMANN, P., und SCHEFFEL, H., 2011: *Wie funktioniert Ct?* Berlin: Springer-Verlag Berlin, 1993; 4-21.
- AUSTIN, J. R., BYERS, R. M., BROWN, W. D., und WOLF, P., 1996: Influence of biopsy on the prognosis of cutaneous melanoma of the head and neck. *Head Neck*, **18**, 107-17.
- BANGARD, C., 2011: Radiofrequenzablation der Leber - eine aktuelle Übersicht. *RöFo*, **183**, 704-713.
- BARTSCH, V., 2004: *Das Taxol-Buch*. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- BHARDWAJ, N., GRAVANTE, G., STRICKLAND, A. D., AHMAD, F., DORMER, J., DENNISON, A. R., und LLOYD, D. M., 2010: Cryotherapy of the liver: a histological review. *Cryobiology*, **61**, 1-9.
- BLUTEAU, O., JEANNOT, E., BIOULAC-SAGE, P., MARQUES, J. M., BLANC, J. F., BUI, H., BEAUDOIN, J. C., FRANCO, D., BALABAUD, C., LAURENT-PUIG, P., und ZUCMAN-ROSSI, J., 2002: Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat Genet*, **32**, 312-5.
- BOSCH, F. X., RIBES, J., DIAZ, M., und CLERIES, R., 2004: Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology*, **127**, S5-S16.
- BRESSAC, B., KEW, M., WANDS, J., und OZTURK, M., 1991: Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, **350**, 429-31.
- BROCKMANN, H., BIRSACK, H.-J., 2006: Radioimmuntherapie mit 90-Y-Ibritumomab-Tiuxetan. *Dtsch Med Wochenschr* 2006, **131**, 438-440.
- BROUQUET, A., ANDREOU, A., und VAUTHEY, J. N., 2011: The management of solitary colorectal liver metastases. *Surgeon*, **9**, 265-72.
- BRUIX, J., BARRERA, J. M., CALVET, X., ERCILLA, G., COSTA, J., SANCHEZ-TAPIAS, J. M., VENTURA, M., VALL, M., BRUGUERA, M., BRU, C., und ET AL., 1989: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis. *Lancet*, **2**, 1004-6.
- BUEY, R. M., DIAZ, J. F., ANDREU, J. M., O'BRATE, A., GIANNAKAKOU, P., NIKOLAOU, K. C., SASMAL, P. K., RITZÉN, A., 2004: Interaction of Epothilone Analogs with the Paclitaxel Binding Site: Relationship between Binding Affinity, Microtubule Stabilization and Cytotoxicity. *Chemistry & Biology*, **11**, 225-236
- BUT, D. Y., LAI, C. L., und YUEN, M. F., 2008: Natural history of hepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **14**, 1652-6.
- CAO, X., WEI, R., LIU, X., ZENG, Y., HUANG, H., DING, M., ZHANG, K., und LIU, X. Y., 2011: Cancer targeting Gene-Viro-Therapy specific for liver cancer by {alpha}-fetoprotein-controlled oncolytic adenovirus expression of SOCS3 and IL-24. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*.
- CARRION, A. F., GHANTA, R., CARRASQUILLO, O., und MARTIN, P., 2011: Chronic Liver Disease in the Hispanic Population of the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*.
- CHARLES-RIVER-GMBH, 1996: Informationsbroschüre zu den Laborkaninchen. Sulzfeld.

- CHEN, C. L., YANG, H. I., YANG, W. S., LIU, C. J., CHEN, P. J., YOU, S. L., WANG, L. Y., SUN, C. A., LU, S. N., CHEN, D. S., und CHEN, C. J., 2008: Metabolic factors and risk of hepatocellular carcinoma by chronic hepatitis B/C infection: a follow-up study in Taiwan. *Gastroenterology*, **135**, 111-21.
- CHEN, H. W., LAI, E. C., ZHEN, Z. J., CUI, W. Z., LIAO, S., und LAU, W. Y., 2010: Ultrasound-guided percutaneous cryotherapy of hepatocellular carcinoma. *Int J Surg*, **9**, 188-91.
- CHEN, J. H., LIN, Y. C., HUANG, Y. S., CHEN, T. J., LIN, W. Y., und HAN, K. W., 2004: Induction of VX2 carcinoma in rabbit liver: comparison of two inoculation methods. *Lab Anim*, **38**, 79-84.
- COLOMBO, M., KUO, G., CHOO, Q. L., DONATO, M. F., DEL NINNO, E., TOMMASINI, M. A., DIOGUARDI, N., und HOUGHTON, M., 1989: Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet*, **2**, 1006-8.
- CREMERS, B., BIEDERMANN, M., MAHNKOPF, D., BOHM, M., und SCHELLER, B., 2009: Comparison of two different paclitaxel-coated balloon catheters in the porcine coronary restenosis model. *Clin Res Cardiol*, **98**, 325-30.
- CREMERS, B., CLEVER, Y., SCHAFFNER, S., SPECK, U., BOHM, M., und SCHELLER, B., 2010: Treatment of coronary in-stent restenosis with a novel paclitaxel urea coated balloon. *Minerva Cardioangi*, **58**, 583-8.
- DANIELL, H. W., 1988: Increased lymph node metastases at mastectomy for breast cancer associated with host obesity, cigarette smoking, age, and large tumor size. *Cancer*, **62**, 429-35.
- DAVILA, J. A., MORGAN, R. O., SHAIB, Y., MCGLYNN, K. A., und EL-SERAG, H. B., 2005: Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut*, **54**, 533-9.
- DE LUNA, W., SZE, D. Y., AHMED, A., HA, B. Y., AYOUB, W., KEEFFE, E. B., COOPER, A., ESQUIVEL, C., und NGUYEN, M. H., 2009: Transarterial chemoinfusion for hepatocellular carcinoma as downstaging therapy and a bridge toward liver transplantation. *Am J Transplant*, **9**, 1158-68.
- DELIS, S., BRAMIS, I., TRIANTOPOULOU, C., MADARIAGA, J., und DERVENIS, C., 2006: The imprint of radiofrequency in the management of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)*, **8**, 255-63.
- DI BISCEGLIE, A. M., 2002: Epidemiology and clinical presentation of hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol*, **13**, S169-71.
- DILDA, P. J., und HOGG, P. J., 2007: Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev*, **33**, 542-64.
- DINGERMANN, T., HÄNSEL, R., und ZÜNDORF, I., 2002: *Pharmazeutische Biologie*. Berlin: Springer Verlag
- DONATO, F., TAGGER, A., GELATTI, U., PARRINELLO, G., BOFFETTA, P., ALBERTINI, A., DECARLI, A., TREVISI, P., RIBERO, M. L., MARTELLI, C., PORRU, S., und NARDI, G., 2002: Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol*, **155**, 323-31.
- DOSIER, C. R., ERDMAN, C. P., PARK, J. H., SCHWARTZ, Z., BOYAN, B. D., und GULDBERG, R. E., 2012: Resveratrol effect on osteogenic differentiation of rat and human adipose derived stem cells in a 3-D culture environment. *J Mech Behav Biomed Mater*, **11**, 112-22.
- EDISON, E. S., BAJEL, A., und CHANDY, M., 2008: Iron Homeostasis: New Players, Newer Insights. *Eur J Haematol*.
- EL-SERAG, H. B., und MASON, A. C., 1999: Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N Engl J Med*, **340**, 745-50.
- ERHARD, W., HENKE, J., und HABERSTROH, J., 2003: *Anästhesie und Analgesie beim Klein- und Heimtier: Anästhesie beim Kaninchen*. Stuttgart: Schattauer Verlag.
- ESTLER, J.-C., und SCHMIDT, H., 2007: *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis*. Stuttgart: Schattauer Verlag

- EYOL, E., BOLEIJ, A., TAYLOR, R. R., LEWIS, A. L., und BERGER, M. R., 2008: Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *Clin Exp Metastasis*, **25**, 273-82.
- FARRES, M. T., DE BAERE, T., LAGRANGE, C., RAMIREZ, L., ROUGIER, P., MUNCK, J. N., und ROCHE, A., 1998: Percutaneous mitoxantrone injection for primary and secondary liver tumors: preliminary results. *Cardiovasc Intervent Radiol*, **21**, 399-403.
- FEITELSON, M. A., ZHU, M., DUAN, L. X., und LONDON, W. T., 1993: Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **8**, 1109-17.
- FIEGL, M., MLINERITSCH, B., HUBALEK, M., BARTSCH, R., PLUSCHNIG, U., und STEGER, G. G., 2011: Single-agent pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in the treatment of metastatic breast cancer: results of an Austrian observational trial. *BMC Cancer*, **11**, 373.
- FONG, Y., FORTNER, J., SUN, R. L., BRENNAN, M. F., und BLUMGART, L. H., 1999: Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg*, **230**, 309-18; discussion 318-21.
- FUJIKI, M., AUCEJO, F., und KIM, R., 2011: General overview of neo-adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma before liver transplantation: necessity or option? *Liver Int*, **31**, 755-63.
- GEIBLER, W., TANNAPFEL, UHLMANN, HAUSS, 1998: Nichtoperative regionale Therapieverfahren bei malignen Lebertumoren. *Chirurgische Gastroenterologie*, **14**, 206-211.
- GIMBRONE, M. A., JR., COTRAN, R. S., LEAPMAN, S. B., und FOLKMAN, J., 1974: Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst*, **52**, 413-27.
- GIOVANNINI, M., und SEITZ, J. F., 1994: Ultrasound-guided percutaneous alcohol injection of small liver metastases. Results in 40 patients. *Cancer*, **73**, 294-7.
- GOLDSTEIN, D. S., LU, M. L., HATTORI, T., RATLIFF, T. L., LOUGHLIN, K. R., und KAVOUSSI, L. R., 1993: Inhibition of peritoneal tumor-cell implantation: model for laparoscopic cancer surgery. *J Endourol*, **7**, 237-41.
- GONZALEZ, M. V., TANG, Y., PHILLIPS, G. J., LLOYD, A. W., HALL, B., STRATFORD, P. W., und LEWIS, A. L., 2008: Doxorubicin eluting beads-2: methods for evaluating drug elution and in-vitro:in-vivo correlation. *J Mater Sci Mater Med*, **19**, 767-75.
- GROOPMAN, J. D., SCHOLL, P., und WANG, J. S., 1996: Epidemiology of human aflatoxin exposures and their relationship to liver cancer. *Prog Clin Biol Res*, **395**, 211-22.
- GRUNER, N. H., GERLACH, T. J., JUNG, M. C., DIEPOLDER, H. M., SCHIRREN, C. A., SCHRAUT, W. W., HOFFMANN, R., ZACHOVAL, R., SANTANTONIO, T., CUCCHIARINI, M., CERNY, A., und PAPE, G. R., 2000: Association of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells with viral clearance in acute hepatitis C. *J Infect Dis*, **181**, 1528-36.
- HALL, F. M., 1997: Re: The birth of CT. *AJR Am J Roentgenol*, **168**, 1622.
- HALLE, M., und SCHOENBERG, M. H., 2009: Körperliche Aktivität in der Prävention und Therapie des kolorektalen Karzinoms. *Dtsch Arztebl*, 106(44): 722-7.
- HE, X., WANG, Y., HU, H., und ZHANG, Z., 2012: In vitro and in vivo antimammary tumor activities and mechanisms of the apple total triterpenoids. *J Agric Food Chem*, **60**, 9430-6.
- HEINZELLER, T., und BÜSING, C., 2001: *Histologie, Histopathologie und Zytologie für den Einstieg*. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag.
- HIRNER, A., und WEISE, A., 2004: *Chirurgie - Schnitt für Schnitt*. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., und HARRIS, C. C., 1991: p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- HOUBRACKEN, I., BAEYENS, L., RAVASSARD, P., HEIMBERG, H., und BOUWENS, L., 2012: Gene delivery to pancreatic exocrine cells in vivo and in vitro. *BMC Biotechnol*, **12**, 74.

- JANG, S. H., WIENTJES, M. G., LU, D., und AU, J. L., 2003: Drug delivery and transport to solid tumors. *Pharm Res*, **20**, 1337-50.
- JIANG, W., LIONBERGER, R., und YU, L. X., 2011: In vitro and in vivo characterizations of PEGylated liposomal doxorubicin. *Bioanalysis*, **3**, 333-44.
- JIN, K., GAO, W., LU, Y., LAN, H., TENG, L., und CAO, F., 2012: Mechanisms regulating colorectal cancer cell metastasis into liver (Review). *Oncol Lett*, **3**, 11-15.
- JORDAN, A., MAIER-HAUFF, K., WUST, P., RAU, B., und JOHANNSEN, M., 2007: Thermotheapie mit magnetischen Nanopartikeln. *Der Onkologe*, 894-902.
- JUNGRAITHMAYR, W., BURGER, D., OLSCHESKI, M., und EGGSTEIN, S., 2005: Cryoablation of malignant liver tumors: results of a single center study. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **4**, 554-60.
- KAGE, T., MOGI, M., KATSUMATA, Y., und CHINO, T., 1987: Regional lymph node metastasis created by partial excision of carcinomas induced in hamster cheek pouch with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *J Dent Res*, **66**, 1673-9.
- KANE, M., 1995: Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine*, **13 Suppl 1**, 47-9.
- KEESE, M., GASIMOVA, L., SCHWENKE, K., YAGUBLU, V., SHANG, E., FAISSNER, R., LEWIS, A., SAMEL, S., und LOHR, M., 2009: Doxorubicin and mitoxantrone drug eluting beads for the treatment of experimental peritoneal carcinomatosis in colorectal cancer. *Int J Cancer*, **124**, 2701-8.
- KELSCH, B., SCHELLER, B., BIEDERMANN, M., CLEVER, Y. P., SCHAFFNER, S., MAHNKOPF, D., SPECK, U., und CREMERS, B., 2011: Dose response to Paclitaxel-coated balloon catheters in the porcine coronary overstretch and stent implantation model. *Invest Radiol*, **46**, 255-63.
- KIDD, J. G., und ROUS, P., 1940: A Transplantable Rabbit Carcinoma Originating in a Virus-Induced Papilloma and Containing the Virus in Masked or Altered Form. *J Exp Med*, **71**, 813-838.
- KIM, H. J., SHIN, J. H., KIM, T. H., KIM, E. Y., PARK, Y. S., PARK, C. S., und SONG, H. Y., 2009: Efficacy of transarterial embolization with arsenic trioxide oil emulsion in a rabbit VX2 liver tumor model. *J Vasc Interv Radiol*, **20**, 1365-70.
- KIRCHNER, G., KIROVSKI, G., HEBESTREIT, A., SCHOLMERICH, J., SCHLITT, H. J., STOELTZING, O., und HELLERBRAND, C., 2010: Epidemiology and survival of patients with hepatocellular carcinoma in Southern Germany. *Int J Clin Exp Med*, **3**, 169-79.
- KNIGHT, D. J., SELWYN, D., und GIRLING, K., 2003: HIT/HITT and alternative anticoagulation: current concepts. *Br J Anaesth*, **91**, 445; author reply 445-6.
- KREUTER, K., EL-ABBADI, N., SHBEEB, A., TSENG, L., MAHON, S., NARULA, N., BURNEY, T., COLT, H., und BRENNER, M., 2008: Development of a rabbit pleural cancer model by using VX2 tumors. *Comp. Med.*, **58(3)**, 287-93.
- KRUKEMEYER, M., und SPIEGEL, H.-U., 2005: *Chirurgische Forschung*. Stuttgart: Thieme Verlag Stuttgart.
- KUBICKA, S., RUDOLPH, K. L., HANKE, M., TIETZE, M. K., TILLMANN, H. L., TRAUTWEIN, C., und MANNS, M., 2000: Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver*, **20**, 312-8.
- LANG, H., 2001: Leberlebenspende und Transplantation. *Lebenslinien*, 10-13.
- LARKIN, J. M.G., KAYE, S. B., 2006: Epothilones in the treatment of cancer. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **15(6)**, 691-702.
- LAURENT-PUIG, P., LEGOIX, P., BLUTEAU, O., BELGHITI, J., FRANCO, D., BINOT, F., MONGES, G., THOMAS, G., BIOULAC-SAGE, P., und ZUCMAN-ROSSI, J., 2001: Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, **120**, 1763-73.

- LEHMANN, K., RICKENBACHER, A., JANG, J., OBERKOFER, C., VONLANTHEN, A., VON BÖHMER, L., HUMAR, B., GRAF, R., GERTSCH, P., und CLAVIEN, P., 2012: New insight into hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: induction of oxidative stress dramatically enhanced tumor killing in in vitro and in vivo models. *Pubmed in Process*.
- LENCIONI, R. A., ALLGAIER, H. P., CIONI, D., OLSCHESKI, M., DEIBERT, P., CROCETTI, L., FRINGS, H., LAUBENBERGER, J., ZUBER, I., BLUM, H. E., und BARTOLOZZI, C., 2003: Small hepatocellular carcinoma in cirrhosis: randomized comparison of radio-frequency thermal ablation versus percutaneous ethanol injection. *Radiology*, **228**, 235-40.
- LIU, C. J., und KAO, J. H., 2007: Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc*, **70**, 141-5.
- LIU, C. J., KAO, J. H., und CHEN, D. S., 2005: Therapeutic implications of hepatitis B virus genotypes. *Liver Int*, **25**, 1097-107.
- LIVRAGHI, T., SOLBIATI, L., MELONI, M. F., GAZELLE, G. S., HALPERN, E. F., und GOLDBERG, S. N., 2003: Treatment of focal liver tumors with percutaneous radio-frequency ablation: complications encountered in a multicenter study. *Radiology*, **226**, 441-51.
- MAATAOUI, A., QIAN, J., MACK, M. G., STRAUB, R., OPPERMAN, E., KHAN, M. F., KNAPPE, V., und VOGL, T. J., 2005: [Laser-induced Interstitial thermotherapy (LITT) in hepatic metastases of various sizes in an animal model]. *Rofo*, **177**, 405-10.
- MACPHERSON, I. R., POONDRU, S., SIMON, G. R., GEDRICH, R., BROCK, K., HOPKINS, C. A., STEWART, K., STEPHENS, A., und EVANS, T. R., 2012: A phase 1 study of OSI-930 in combination with erlotinib in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer*.
- MAKUUCHI, M., DONADON, M., und TORZILLI, G., 2008: Hepatic resection for hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Ann Ital Chir*, **79**, 111-5.
- MARCHIO, A., PINEAU, P., MEDDEB, M., TERRIS, B., TIOLLAIS, P., BERNHEIM, A., und DEJEAN, A., 2000: Distinct chromosomal abnormality pattern in primary liver cancer of non-B, non-C patients. *Oncogene*, **19**, 3733-8.
- MARGOLIS, H. S., 1998: Hepatitis B virus infection. *Bull World Health Organ*, **76 Suppl 2**, 152-3.
- MESSMANN, H., 2012: *Klinische Gastroenterologie: Das Buch für Fort-und Weiterbildung*. Thieme-Verlag.
- MONTALTO, G., CERVELLO, M., GIANNITRAPANI, L., DANTONA, F., TERRANOVA, A., und CASTAGNETTA, L. A., 2002: Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*, **963**, 13-20.
- N'KONTCHOU, G., PARIES, J., HTAR, M. T., GANNE-CARRIE, N., COSTENTIN, L., GRANDO-LEMAIRE, V., TRINCHET, J. C., und BEAUGRAND, M., 2006: Risk factors for hepatocellular carcinoma in patients with alcoholic or viral C cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, **4**, 1062-8.
- NAKADE, Y., SATO, K., NAKAO, H., und YONEDA, M., 2012: [Hepatocarcinogenesis in NASH]. *Gan To Kagaku Ryoho*, **39**, 693-7.
- NICOLETTI, R., OBERLADTÄTTER, M., und KÖNIG, F., 2007: *Messtechnik und Instrumentierung in der Nuklearmedizin: Eine Einführung*. Deutsche Nationalbiographie, Deutsche Nationalbibliothek, 234-237.
- NISHIOKA, K., WATANABE, J., FURUTA, S., TANAKA, E., IINO, S., SUZUKI, H., TSUJI, T., YANO, M., KUO, G., CHOO, Q. L., und ET AL., 1991: A high prevalence of antibody to the hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma in Japan. *Cancer*, **67**, 429-33.
- ODEGAARD, A. O., KOH, W. P., YU, M. C., und YUAN, J. M., 2011: Body mass index and risk of colorectal cancer in Chinese Singaporeans: The Singapore Chinese Health Study. *Cancer*, **117**, 3841-9.
- OHTAKE, K., SHINGAKI, S., und NAKAJIMA, T., 1990: Effects of incision and irradiation on regional lymph node metastasis in carcinoma of the hamster tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, **70**, 62-9.

- OKUDA, K., 2000: Hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, **32**, 225-37.
- PALUMBO, A., GAY, F., BRINGHEN, S., FALCONE, A., PES COSTA, N., CALLEA, V., CARAVITA, T., MORABITO, F., MAGAROTTO, V., RUGGERI, M., AVONTO, I., MUSTO, P., CASCAVILLA, N., BRUNO, B., und BOCCADORO, M., 2008: Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone in advanced multiple myeloma. *Ann Oncol*, **19**, 1160-5.
- PANT, S., LIMBERT, G., CURZEN, N. P., und BRESSLOFF, N. W., 2012: Multiobjective design optimisation of coronary stents. *Biomaterials*, **32**, 7755-73.
- PARIKH, S., und HYMAN, D., 2007: Hepatocellular cancer: a guide for the internist. *Am J Med*, **120**, 194-202.
- PARKIN, D. M., BRAY, F., FERLAY, J., und PISANI, P., 2005: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
- PARLAR, H., und ANGERHÖFER, D., 1995: *Chemische Ökotoxikologie*. 2. Auflage edn.: Springer Verlag Heidelberg.
- PATERLINI-BRECHOT, P., SAIGO, K., MURAKAMI, Y., CHAMI, M., GOZUACIK, D., MUGNIER, C., LAGORCE, D., und BRECHOT, C., 2003: Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*, **22**, 3911-6.
- PERSSON, E. C., QURAIISHI, S. M., WELZEL, T. M., CARREON, J. D., GRIDLEY, G., GRAUBARD, B. I., und MCGLYNN, K. A., 2012: Risk of liver cancer among US male veterans with cirrhosis, 1969-1996. *Br J Cancer*, **107**, 195-200.
- PETRY, W., HEINTGES, T., HENSEL, F., ERHARDT, A., WENNING, M., NIEDERAU, C., und HAUSSINGER, D., 1997: [Hepatocellular carcinoma in Germany. Epidemiology, etiology, clinical aspects and prognosis in 100 consecutive patients of a university clinic]. *Z Gastroenterol*, **35**, 1059-67.
- POPESCU, S., RAJTOVÁ, V., und HORÁK, J., 1992: *A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals*. Wolfe Publishing Ltd.
- RADIOLOGIE UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M., Patienteninformation der Klinik Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main., [HTTP://RADIOLOGIE-UNI-FRANKFURT.DE/CONTENT/E1405/E1811/E1987/E3113/INFOBOXCONTENT3114/AUFKLRUNGLITTSTANDOKT2004.PDF](http://RADIOLOGIE-UNI-FRANKFURT.DE/CONTENT/E1405/E1811/E1987/E3113/INFOBOXCONTENT3114/AUFKLRUNGLITTSTANDOKT2004.PDF), 12.06.2012, 10:09 Uhr
- RAMIREZ, L. H., ZHAO, Z., ROUGIER, P., BOGNEL, C., DZODIC, R., VASSAL, G., ARDOUIN, P., GOUYETTE, A., und MUNCK, J. N., 1996: Pharmacokinetics and antitumor effects of mitoxantrone after intratumoral or intraarterial hepatic administration in rabbits. *Cancer Chemother Pharmacol*, **37**, 371-6.
- RANGWALA, F., WILLIAMS, K. P., SMITH, G. R., ALLENSWORTH, J., THOMAS, Z., LYERLY, H. K., DIEHL, A. M., MORSE, M. A., und DEVI, G. R., 2012: Differential effects of arsenic trioxide on chemosensitization in human hepatic tumor and stellate cell lines. *BMC Cancer*, **12**, 402.
- RAVINDRA, P. V., TIWARI, A. K., SHARMA, B., und CHAUHAN, R. S., 2009: Newcastle disease virus as an oncolytic agent. *Indian J Med Res*, **130**, 507-13.
- RICKE, J., SEIDENSTICKER, M., LUDEMANN, L., PECH, M., WIENERS, G., HENGST, S., MOHNIKE, K., CHO, C. H., LOPEZ HANNINEN, E., AL-ABADI, H., FELIX, R., und WUST, P., 2005: In vivo assessment of the tolerance dose of small liver volumes after single-fraction HDR irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **62**, 776-84.
- RODRIGUEZ-CUEVAS, S., LABASTIDA, S., BAENA, L., und GALLEGOS, F., 1995: Risk of nodal metastases from malignant salivary gland tumors related to tumor size and grade of malignancy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, **252**, 139-42.
- ROUS, P., KIDD, J. G., und SMITH, W. E., 1952: Experiments on the cause of the rabbit carcinomas derived from virus-induced papillomas. II. Loss by the Vx2 carcinoma of the power to immunize hosts against the papilloma virus. *J Exp Med*, **96**, 159-74.
- RUZZENENTE, A., VALDEGAMBERI, A., CAMPAGNARO, T., CONCI, S., PACHERA, S., IACONO, C., und GUGLIELMI, A., 2011: Hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with portal hypertension: Is liver resection always contraindicated? *World J Gastroenterol*, **17**, 5083-8.

- SAAD-HOSSNE, R., PRADO, R. G., und HOSSNE, W. S., 2006: Effects of acetylsalicylic acid and acetic acid solutions in VX2 carcinoma cells: in vitro analysis. *Acta Cir Bras*, **21**, 151-4.
- SABBATINI, P., SPRIGGS, D. R., , 2009: Epopilones: Better or More of the Same?. *Journal of Clinical Oncology*, **27**, 3079-3081.
- SALOMON, F.-V., GEYER, H., und GILLE, U., 2005: *Anatomie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke-Verlag.
- SARZAEEM, A., ZARE MIRAKABADI, A., MORADHASELI, S., MOROVVATI, H., und LOTFI, M., 2012: Cytotoxic Effect of ICD-85 (Venom-derived Peptides) on HeLa Cancer Cell Line and Normal LK Cells using MTT Assay. *Arch Iran Med*, **15**, 696-701.
- SCHNEEMANN, H., und WURM, G., 1995: *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Waren und Dienste*. Berlin: Springer Verlag.
- SEEBER, S., und SCHÜTTE, J., 2003: *Therapiekonzepte Onkologie*. Springer-Verlag Berlin, 4. Aufl., 185-188.
- SHAH, S. S., JACOBS, D. L., KRASINKAS, A. M., FURTH, E. E., ITKIN, M., und CLARK, T. W., 2004: Percutaneous ablation of VX2 carcinoma-induced liver tumors with use of ethanol versus acetic acid: pilot study in a rabbit model. *J Vasc Interv Radiol*, **15**, 63-7.
- SHANBHOGUE, A. K., KARNAD, A. B., und PRASAD, S. R., Tumor response evaluation in oncology: current update. *J Comput Assist Tomogr*, **34**, 479-84.
- SHANBHOGUE, A. K., KARNAD, A. B., und PRASAD, S. R., 2010: Tumor response evaluation in oncology: current update. *J Comput Assist Tomogr*, **34**, 479-84.
- SHERMAN, M., 2005: Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin Liver Dis*, **25**, 143-54.
- SMELA, M. E., CURRIER, S. S., BAILEY, E. A., und ESSIGMANN, J. M., 2001: The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **22**, 535-45.
- SPANGENBERG, H. C., 2006: Lokal-ablative Therapie.
- SPECK, U., 2007: Persönliche Mitteilung Oktober 2007.
- SPECK, U., 2008: Persönliche Mitteilung Januar 2008.
- SPECK, U., 2011: Persönliche Mitteilung, November 2011
- SPECK, U., CREMERS, B., KELSCH, B., BIEDERMANN, M., CLEVER, Y. P., SCHAFFNER, S., MAHNKOPF, D., HANISCH, U., BÖHM, M., und SCHELLER, B., 2011: Do Pharmacokinetics Explain Persistent Restenosis Inhibition by a Single Dose of Paclitaxel? *Circ Cardiovasc Interv* 2012; **5**; 392-400
- STATISTISCHES BUNDESAMT, D., 2011: Todesursachen 2010. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html>, 07.06.2012, 9:02 Uhr.
- STÄTTNER, S., KARNER J., 2010: Management des Hepatozellulären Karzinoms (HCC) In: *Österreichische Gesellschaft für Chirurgische Onkologie*.
- SURUKI, R. Y., MUELLER, N., HAYASHI, K., HARN, D., DEGRUTTOLA, V., RAKER, C. A., TSUBOUCHI, H., und STUVER, S. O., 2006: Host immune status and incidence of hepatocellular carcinoma among subjects infected with hepatitis C virus: a nested case-control study in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **15**, 2521-5.
- TANNAPFEL, A., und C., W., 2003: Pathologie des hepatozellulären Karzinoms. *Chirurgische Gastroenterologie*.
- THIEL, H., und ROEWER, N., 2009: *Anästhesiologische Pharmakotherapie: Von den Grundlagen der Pharmakologie zur Medikamentenpraxis*. Georg Thieme Verlag, 2009, 2. Aufl., 71-73.
- TOSO, C., MENTHA, G., KNETEMAN, N. M., und MAJNO, P., 2010: The place of downstaging for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, **52**, 930-6.
- TRAUNER, M., 2006: Die Leber im Fokus der Diabetologen. In: *Ärztewoche online*, (R. MAZHAR, ed. Wien, Springer-Verlag GesmbH.

- TSAI, W. L., CHENG, J. S., LAI, K. H., LIN, C. P., LO, G. H., HSU, P. I., YU, H. C., LIN, C. K., CHAN, H. H., CHEN, W. C., CHEN, T. A., LI, W. L., und LIANG, H. L., 2008: Clinical trial: percutaneous acetic acid injection vs. percutaneous ethanol injection for small hepatocellular carcinoma - a long-term follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther*, **28**, 304-11.
- TUYAMA, A. C., und CHANG, C. Y., 2012: Non Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Diabetes*.
- VAUPEL, P. W., 1994: *Blood Flow, Oxygenation, Tissue pH Distribution and Bioenergetic Status of Tumors* Mainz: Ernst Schering Research Foundation.
- VOGL, T. J., MACK, M., EICHLER, K., LEHNERT, T., und NABIL, M., 2006: Effect of laser-induced thermotherapy on liver metastases. *Expert Rev Anticancer Ther*, **6**, 769-74.
- VOGL, T. J., MACK, M. G., und BALZER, J. O., 2002: *Lebermetastasen, Diagnose - Intervention - Therapie*. Springer-Verlag, Berlin; 1-4, 11-17.
- WALKER, A. M., STEVENS, J. J., und TCHOUNWOU, P. B., 2010: Arsenic Trioxide Modulates DNA Synthesis and Apoptosis in Lung Carcinoma Cells. *Met Ions Biol Med*, **7**, 1996-2007.
- WEBER, S. M., JARNAGIN, W. R., DEMATTEO, R. P., BLUMGART, L. H., und FONG, Y., 2000: Survival after resection of multiple hepatic colorectal metastases. *Ann Surg Oncol*, **7**, 643-50.
- WEIHRAUCH, M., BENICKE, M., LEHNERT, G., WITTEKIND, C., WRBITZKY, R., und TANNAPFEL, A., 2001: Frequent k- ras -2 mutations and p16(INK4A)methylation in hepatocellular carcinomas in workers exposed to vinyl chloride. *Br J Cancer*, **84**, 982-9.
- WEINBERG, B. D., AI, H., BLANCO, E., ANDERSON, J. M., und GAO, J., 2007: Antitumor efficacy and local distribution of doxorubicin via intratumoral delivery from polymer millirods. *J Biomed Mater Res A*, **81**, 161-70.
- WEITZ, J., SCHALHORN, A., KADMON, M., EBLE, M., und HERFORTH, C., 2004: *Kolon- und Rektumkarzinom, In: Die Onkologie*. Hiddemann W, Huber H, Bertram CR.
- WESTPHAL, M., HILT, D. C., BORTEY, E., DELAVAUULT, P., OLIVARES, R., WARNKE, P. C., WHITTLE, I. R., JAASKELAINEN, J., und RAM, Z., 2003: A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol*, **5**, 79-88.
- WHO, Mortality database.
- WIDEROFF, L., GRIDLEY, G., MELLEMKJAER, L., CHOW, W. H., LINET, M., KEEHN, S., BORCH-JOHNSEN, K., und OLSEN, J. H., 1997: Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1360-5.
- WIECZOREK, A., 2004: Siemens Medical Solutions feiert 30 Jahre Computertomographie: Innovationsführer bei klinischer Anwendung, Nutzer- und Patientenfreundlichkeit. Pressemitteilung Siemens Medical Solutions AG vom 24.06.2004.
- WOLINSKY, J. B., COLSON, Y. L., und GRINSTAFF, M. W., 2012: Local drug delivery strategies for cancer treatment: gels, nanoparticles, polymeric films, rods, and wafers. *J Control Release*, **159**, 14-26.
- XIE, Q., TANG, N., WAN, R., QI, Y., LIN, X., und LIN, J., 2012: Recombinant Snake Venom Cystatin Inhibits Tumor Angiogenesis in vitro and in vivo Associated with Downregulation of VEGF-A165, Flt-1 and bFGF. *Anticancer Agents Med Chem*.
- XU, Q., XIA, Y., WANG, C. H., und PACK, D. W., 2012: Monodisperse double-walled microspheres loaded with chitosan-p53 nanoparticles and doxorubicin for combined gene therapy and chemotherapy. *J Control Release*, **163**, 130-5.
- YU, M. W., YEH, S. H., CHEN, P. J., LIAW, Y. F., LIN, C. L., LIU, C. J., SHIH, W. L., KAO, J. H., CHEN, D. S., und CHEN, C. J., 2005: Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst*, **97**, 265-72.
- ZHAO, X. S., SONG, P. L., SUN, B., JIANG, H. C., und LIU, T. F., 2009: Arsenic trioxide inhibits metastatic potential of mouse hepatoma H22 cells in vitro and in vivo. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, **8**, 510-7.

12 DANKSAGUNG

Bei Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. Johanna Plendl bedanke ich mich herzlich für das Übernehmen der Betreuung meiner Dissertation.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Speck für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit sowie den Beistand während der gesamten Dauer des Projektes.

Herrn PD Dr. med. Dipl. phys. Matthias Taupitz danke ich für die allgemeine Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Robert Klopffleisch danke ich sehr für die konstruktiven Anregungen.

Frau Dr. med. vet. Nicola Stolzenburg bin ich dankbar für die Einweisung in das verwendete Tiermodell.

Frau Dr. med. vet. Claudia Abramjuk danke ich für ihren Rückhalt und die Ermunterung am Ball zu bleiben sowie viele nützliche Ratschläge.

Frau Dr. med. vet. Ines Gemeinhardt gilt ein großes Dankeschön für die Einführung in die Geheimnisse der in vitro Versuche.

Bei Herrn Dr. med. vet. Ole Gemeinhardt bedanke ich mich für das Korrekturlesen auch während seines Urlaubes.

Ein Dankeswort an Herrn Uli Hanisch für die nützliche Unterstützung bei der statistischen Aufbereitung der Zellergebnisse und der Analytik der Substanzen.

Herrn Dr. rer. nat. Wolf-Dietrich Meyer danke ich für die Her- und Bereitstellung des von mir in dieser Arbeit eingesetzten Doxorubicin-Gels.

Frau Dr. rer. nat. Stephanie Schmitmeier danke ich für ihr Engagement beim Korrigieren der „Summary“.

Nicht vergessen möchte ich den Tierpfleger/innen der Ställe der Tierhaltung Charité Mitte zu danken.

Herzlichen Dank an Frau Nina Chan und Frau Dr. rer. nat. Maren Kutschera, die mir mental zur Seite gestanden haben und ihre Schokoladenvorräte „schwesterlich“ mit mir geteilt haben.

Dankeschön an Byron Biedermann für die gemeinsamen Spaziergänge, um wieder frischen Wind in eingefahrene Gedankengänge zu bringen.

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund Patrick Löchel, der immer für mich da ist.

13 SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Melanie Biedermann, dass ich auf der Grundlage der Hilfsmittel und Hilfen wie im Inhalts- und Literaturverzeichnis sowie in der Danksagung meiner Doktorarbeit deklariert, meine Dissertationsarbeit selbständig verfasst habe.

Die Arbeit wurde nicht schon einmal in einem früheren Promotionsverfahren angenommen oder abgelehnt.

Berlin, den 14.03.2013