

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie der  
Medizinischen Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

## **Dissertation**

### **Zytoreduktive Therapie und hypertherme intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C oder Gemcitabin als Therapieansatz der Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom im Rattenmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von  
Anna Makareinis  
aus Berlin

Gutachter:            1. : Priv.-Doz. Dr. med. J. Hartmann  
                             2. : Priv.-Doz. Dr. med. C. Braumann  
                             3. : Priv.-Doz. Dr. med. J. W. Mall

Datum der Promotion: 30.11.2012

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AUC	Area under the concentration-time curve
°C	Grad Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPT-11	Irinotecan
CT	Komputertomographie
DIMATE	Dimethylthioampal
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenamidessigsäure
ePCI	experimentelle Peritoneal-Cancer-Index
FBS	Fetales Bovines Serum
5- FU	Fünf- Fluorouracil
GEW	Gewicht
HIPEC	Hypertherme Intraperitoneale Chemotherapie
HSP 70	Hitzeschockprotein 70
kg	Kilogramm
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter

Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCI	Peritoneal-Carcinose-Index
p.o.	postoperativ
RIT	Radioimmuntherapie
s.	siehe

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel Mitomycin C [41].....	4
Abbildung 2: Mechanismus der enzymatischen Aktivierung von Mitomycin C [40].....	5
Abbildung 3: Strukturformel Gemcitabin [45] .....	7
Abbildung 4: Peritoneal-Carcinose-Index nach Sugarbaker [79] .....	11
Abbildung 5: Zeitschema der Versuchsreihe .....	16
Abbildung 6: Dokument ePCI Score und Tumorknotenanzahl.....	20
Abbildung 7: Versuchsaufbau intraperitoneale hypertherme Chemotherapie.....	23
Abbildung 8: Temperaturmessung.....	23
Abbildung 10: hohe Ausprägung des Tumorwachstums .....	28
Abbildung 11: geringe Ausprägung des Tumorwachstums.....	28
Abbildung 12: Gewicht der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf .....	32
Abbildung 13: Gewicht der Debulking Gruppe im zeitlichen Verlauf.....	33
Abbildung 14: Gewicht der Mitomycin C Gruppe im Zeitlichen Verlauf.....	34
Abbildung 15: Gewicht der Gemcitabin Gruppe im zeitlichen Verlauf.....	35
Abbildung 16: Der ePCI Score zum Zeitpunkt der Obduktion.....	39
Abbildung 17: Die Tumorknotenanzahl zum Zeitpunkt der Obduktion.....	40
Abbildung 18: Die Tumormasse zum Zeitpunkt der Obduktion.....	41
Abbildung 19: Aszites in der Kontrollgruppe .....	43
Abbildung 20: Aszites in der Debulking Gruppe .....	44
Abbildung 21: Aszites in der Mitomycin C Gruppe.....	45
Abbildung 22: Aszites in der Gemcitabin Gruppe .....	46

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: AUC-Ratio von peritonealer Medikamentenkonzentration gegenüber systemischer [20].....	4
Tabelle 2: Letalität innerhalb der Gruppen.....	27
Tabelle 3: Maschinentemperaturen der Gruppen 3 und 4 als Median (Minimum – Maximum).....	29
Tabelle 4: Abdominaltemperatur der Gruppen 3 und 4 als Median (Minimum- Maximum).....	30
Tabelle 5: Rektale Temperatur der Gruppen 3 und 4 als Median (Minimum-Maximum) .....	31
Tabelle 6: Ergebnisse von ePCI, Tumorknotenanzahl, Tumormasse für jede Versuchsgruppe als Median (Minimum- Maximum) .....	38
Tabelle 7: Vorkommen von Aszites innerhalb jeder Versuchsgruppe.....	42

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
2. Zielstellung.....	12
3. Material und Methoden.....	13
3. 1 Tierhaltung und Pflege.....	13
3. 2 Zellkultivierung von Tumorzellen CB 2974.....	13
3. 3 Das Studiendesign.....	16
3. 3. 1 Die Zellinjektion.....	18
3. 3. 2 Die multimodale Therapie.....	18
3. 3. 2. 1 Die Quantifizierung des Tumorwachstums.....	18
3. 3. 2. 2 Die zytoreduktive Therapie.....	21
3. 3. 2. 3 Die intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Mitomycin C.....	21
3. 3. 2. 4 Die intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Gemcitabin..	22
3. 3. 2. 5 Die Obduktion der Tiere zur Auswertung der multimodalen Therapie.....	25
3. 4 Die Dokumentation und Verarbeitung der Daten.....	26
4. Ergebnisse.....	27
4.1 Letalität.....	27

Inhaltsverzeichnis	Anna Makareinis
4.2 Perioperative Ergebnisse .....	29
4.2.1 Maschinentemperatur .....	29
4.2.2 Abdominelle Temperatur .....	30
4.2.3 Rektale Temperatur .....	31
4.2.4 Gewichtsverlauf .....	32
4.3 Auswertung der Tumorlast .....	36
4.3.1 Der experimentelle Peritonealkarzinose Index .....	36
4.3.2 Die Tumorknotenanzahl .....	37
4.3.3 Die Tumormasse .....	37
4.4 Aszites .....	42
5. Diskussion .....	47
6. Zusammenfassung und Ausblick .....	62
7. Literaturverzeichnis .....	65
Danksagung .....	74
Erklärung .....	75



## 1. Einleitung

Jedes Jahr erkranken allein in Deutschland etwa 20.000 Menschen neu an einer Peritonealkarzinose [1]. Als häufigster Entstehungsgrund eines Malignoms im Bereich des Bauchfells ist die Metastasierung eines gastrointestinalen Tumors, sowie eines Pankreas- oder Ovarialkarzinoms anzusehen. Seltener tritt eine primäre Peritonealkarzinose im Sinne eines Pseudomyxoms, Sarkoms oder Mesothelioms auf. Das Fortschreiten einer bestehenden Peritonealkarzinose führt meist zu mechanischem Darmverschluss durch den Tumor und zu symptomatischem malignen Aszites. Häufig bedeuten diese Komplikationen für den Patienten den rapiden Verlust von Lebensqualität durch Schmerzen und raschen körperlichen Verfall, auch bei isoliertem Bestehen einer Peritonealkarzinose ohne weitere systemische Ausbreitung in etwa Leber, Lunge oder Knochen.

Aufgrund der großen Oberfläche des Peritoneums ist eine rasche Progredienz des Tumors möglich, weshalb die Prognose als infaust anzusehen war. In den drei größten prospektiven Studien dazu konnten mittlere Überlebenszeiten bei palliativer Begleitung von 5,2, 6 und 7 Monaten beobachtet werden [2-4].

Das Peritoneum ist eine seröse Haut, die den Peritonealraum auskleidet. Es hat eine Gesamtausdehnung von etwa 1,6- 2m<sup>2</sup> und unterteilt sich in ein viszerales und ein parietales Blatt. Das viszerale Blatt überzieht die intraperitoneal gelegenen Organe des Bauchraumes, während das parietale die Bauchwand von innen auskleidet. Beide Blätter stehen über die Mesenterien miteinander in Verbindung. Histologisch betrachtet besteht das Peritoneum aus einem einschichtigen Mesothel mit einer Dicke von 2,5- 3  $\mu$ m, das einer Basalmembran aufsitzt. In seiner Funktion als seröses Organ sezerniert und reabsorbiert das Peritoneum die Peritonealflüssigkeit, die die Reibung an seiner Oberfläche herabsetzt, um die Bewegung der intraperitoneal gelegenen Organe gegeneinander zu erleichtern. Das Bauchfell wirkt wie eine semipermeable Membran, die einen bidirektionalen Austausch von Flüssigkeit, kleinmolekularen Substanzen und einigen Makromolekülen zwischen der Bauchhöhle und dem Plasma erlaubt.

Nach der Metastasierung in die Leber ist das Bauchfell der zweithäufigste Ort der Streuung eines kolorektalen Karzinoms. So sind 10-20% der Patienten mit kolorektalem Karzinom zum Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors bereits von

einer Ausbreitung auf das Peritoneum betroffen [5, 6]. Zusätzlich ist in 10-35% der Fälle nach Resektion eines primären kolorektalen Karzinoms das Peritoneum der Ort eines erneuten Tumorwachstums [7, 8].

Da das Vorhandensein einer Peritonealkarzinose bei primärem Kolonkarzinom als Schritt zwischen lokalem Tumor und systemischer Ausbreitung gesehen werden kann [9, 10], und einen wichtigen prognostischen Faktor darstellt, hat der American Joint Committee on Cancer (AJCC) 2000, auf Grundlage der prospektiven Studie von Shepherd et al. [11], empfohlen, die T4- Kategorie bei Beteiligung des viszeralen Peritoneums in T4b zu modifizieren [12].

Während als Hauptwege der Metastasierung gastrointestinaler Tumoren der hämatogene über die Pfortader in die Leber oder lymphogene über die abführenden Lymphbahnen gelten, erfolgt die peritoneale Besiedlung entweder als Resultat einer Serosainvasion [13], durch deren spontane oder iatrogene Perforation oder durch frei in der Bauchhöhle vorkommende Tumorzellen, wie sie schon in frühen Stadien vorkommen [14]. So wurden im Rahmen von Peritonealspülungen in 10-25 % der Fälle ohne vorherige Manipulation am Tumor maligne Zellen in der Flüssigkeit gefunden [15-18]. Zeng und Mitarbeiter [19] haben nachgewiesen, dass sich in 24-50% der Patienten mit vollständig rezidiertem kolorektalen T3-T4 Karzinomen bereits Karzinomzellen auf der serosalen Kolonseite befanden.

Einen wichtigen Faktor zum Verständnis der Entstehung einer Peritonealkarzinose und der sich daraus über die vergangenen 2-3 Jahrzehnte entwickelten therapeutischen Ansätze, stellt die von Paul H. Sugarbaker entwickelte so genannte „Tumorcell entrapment hypothesis“ dar. Danach wird das Versagen der rein operativen Therapie der Peritonealkarzinose ausgelöst durch Neuimplantation der durch den Chirurgen freigesetzten nur mikroskopisch quantifizierbaren Tumorzellen. Zusätzlich werden diese Zellen in an Wundgewebe gebildetem Fibrin eingeschlossen. Das fortschreitende Wachstum der Einschlüsse wird durch Wachstumsfaktoren hervorgerufen, die am normalen Wundheilungsprozess beteiligt sind [20].

Die Peritonealkarzinose wurde erstmals 1931 durch Sampson et al. als Metastase eines Ovarialkarzinomes beschrieben [21].

Als erste therapeutische Ansätze erhielten die Patienten eine systemische Chemotherapie. Die wenigen publizierten Erfolge dieses Therapieweges zeigten keine kurative Tendenz. So lag die mittlere Überlebenszeit einer Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom unter palliativer systemischer Chemotherapie mit 5- FU/ Folinsäure bei 7,7 Monaten [22]. Die gleiche Tendenz zeigte eine Studie die anstatt von 5 FU/ Folinsäure Irinotecan einsetzte [23].

Aufgrund der Komplikationen einer Peritonealkarzinose, wie vor allem dem Ileus, wurde auch die konventionelle Chirurgie zur Bildung von Anastomosen und Anlage von Stomata mit vorrangig palliativer Intention eingesetzt.

Durch konventionelle Chirurgie allein können nur die makroskopisch sichtbaren Tumorknoten entfernt werden. Gegen Mikrometastasen, freie Tumorzellen, die für das Auge des Operateurs unsichtbar in der Peritonealflüssigkeit oder im Bauchraum vorkommen, sowie Tumoranteile, die aufgrund ihrer Lokalisation und ihres Ausmaßes für eine Resektion nicht zugänglich sind, kann eine rein operative Therapie nicht erfolgreich sein.

Da in 90 % der Fälle Tumorzellen in Blut und Gewebeflüssigkeit aus dem Operationsgebiet nachgewiesen werden konnten [24], resultierte daraus eine Therapie, die zum einen eine Tumorzellfreisetzung in den Bauchraum minimieren und zum anderen die Reimplantation der Zellen verhindern soll.

Weissberger et al waren 1955 die ersten, die eine intraperitoneale Chemotherapie bei einer Peritonealkarzinose durch ein Endstadium Ovarialkarzinom durchführten [25].

Histologisch betrachtet ist das Peritoneum aus hydrophoben Zellschichten bestehendes Mesothel, das den Bauchraum vom systemischen Kreislauf abgrenzt [26, 27]. Daraus folgt, dass hydrophile Medikamente mit höherer Molekülgröße das Peritoneum erschwert und verlangsamt durchdringen, so dass sie in weit höherer Konzentration bei geringeren systemischen Nebenwirkungen im Bauchraum vorliegen [28, 29]. Damit ist die Peritoneal- Plasma- Schranke der Ansatz einer erfolgreichen Therapie durch hohe intraperitoneal lokale Wirkstoffspiegel. So hat Dedrick 1978 gezeigt, dass sich ein ansteigendes Molekulargewicht eines Medikamentes indirekt proportional zu seiner peritonealen Clearance verhält [30].

Für verschiedenste Chemotherapeutika, die im Rahmen der Therapie der Peritonealkarzinose eingesetzt werden, wurde dieses pharmakokinetische

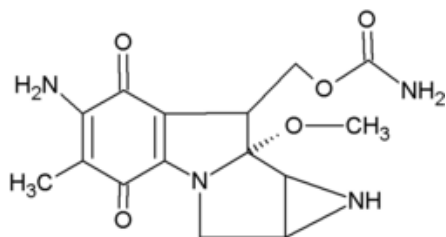
Phänomen untersucht und in einer Area under the concentration-time curve (AUC) dargestellt [31-35]. Dabei wurde bei steigendem Molekulargewicht auch annähernd eine größere AUC-Ratio für peritoneale gegenüber systemischen Konzentrationen gezeigt (siehe Tabelle 1).

Medikament	Molekulargewicht (Da)	AUC-Ratio
5- Fluorouracil	130	250
Gemcitabin	263	50
Cisplatin	300	20
Mitomycin C	334	75
Doxorubicin	544	500
Paclitaxel	808	1000

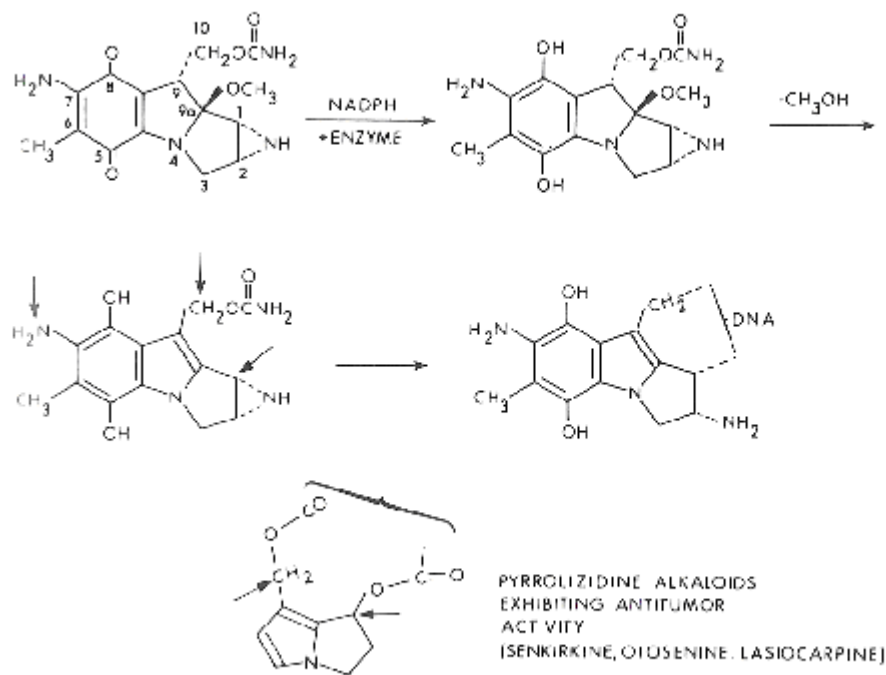
**Tabelle 1: AUC-Ratio von peritonealer Medikamentenkonzentration gegenüber systemischer [20]**

Basierend auf der Studienlage zum gegenwärtigen Zeitpunkt muss Mitomycin C als Standardmedikament innerhalb der Therapie der Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom angesehen werden, und wird daher auch in der Praxis der intraperitonealen hyperthermen Chemotherapie als dieses verwendet [36-39]. Mitomycin C wurde aus diesem Grund im Rahmen dieses Versuches als intraperitoneale hypertherme Spüllösung eingesetzt und mit anderen therapeutischen Ansätzen in Bezug auf Wirksamkeit und Nebenwirkungen verglichen.

Mitomycin C besitzt drei reaktive Gruppen, die seine antineoplastische Aktivität bedingen, einen Azidinring, ein Carbamat und ein Chinon [40]. Damit es seine therapeutische Wirkung entfalten kann, muß das Carbamat zunächst enzymatisch reduziert und demethyliert werden [40] (s. Abb. 2)



**Abbildung 1: Strukturformel Mitomycin C [41]**



**Abbildung 2: Mechanismus der enzymatischen Aktivierung von Mitomycin C [40]**

Der Wirkmechanismus von Mitomycin C beruht auf einer Hemmung der DNA-Synthese. Dabei interkaliert es an den in der Abbildung durch Pfeile markierten Stellen zwischen zwei DNA-Strängen. Diese werden dann kovalent gebunden. Dadurch kann die Dissoziation der Stränge, wie sie zur DNA-Replikation und Transkription notwendig ist, nicht erfolgen. Als Konsequenz geht die Tumorzelle in die Apoptose.

Bei höherer Dosierung hemmt Mitomycin C zusätzlich die zelluläre RNA- und Proteinbiosynthese.

Es zeichnet sich durch verschiedenen Merkmale aus, die es für die intraperitoneale Applikation besonders prädestinieren. Seine Wirkung erfolgt unabhängig vom Zellzyklus, wodurch es bereits nach kurzer Expositionszeit zu einem Wirkeintritt kommt. Aufgrund seines vergleichsweise hohen Molekulargewichtes von 334 Dalton ist durch die Peritoneal-Plasma-Schranke eine längere intraperitoneale Persistenz bei verlängerter Wirkzeit und gleichzeitig verminderter systemischer Toxizität gegeben. Mitomycin C kann jedoch eine myelotoxische Wirkung haben.

Außerdem ist Mitomycin C gut wasserlöslich, und somit unkompliziert zu applizieren.

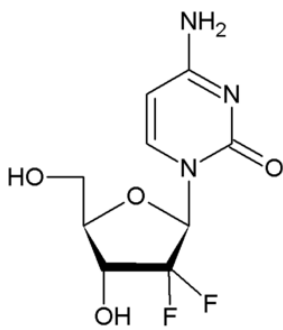
Im Rahmen eines Reviews wurde bei intraperitonealer Gabe eine zwanzigfach höhere intraperitoneale Konzentration des Chemotherapeutikums im Vergleich zum Plasma beschrieben. Dabei wurde auch eine Reduktion der Knochenmarktoxizität gegenüber der intravenösen Applikation festgestellt [42].

Von Sugarbaker et al. [43] wurde im Rahmen einer Studie darauf hingewiesen, dass sowohl die Konzentration von Mitomycin C als auch Menge der Spüllösung für die optimale Wirkungsentfaltung eine Rolle spielen. Eine zu niedrige Dosierung hat aufgrund der Halbwertszeit und der raschen systemischen Clearance keine ausreichende Wirkung. Eine hohe Konzentration hingegen birgt das Risiko von zunehmender Toxizität und ausgeprägter Leukopenie. Die empfohlene Dosis soll sich nach Sugarbaker et al. an der Körperoberfläche des Patienten errechnen. Sie beträgt  $15 \text{ mg/m}^2/\text{Körperoberfläche}$  Mitomycin C [44].

Das Zytostatikum Gemcitabin (2,2- Difluorodeoxycytidin) gehört zu der Gruppe der Pyrimidinantimetabolite. In zahlreichen Studien wurde seine antineoplastische Aktivität bereits untersucht und auch nachgewiesen. So wird es heute vor allem gegen das Pankreaskarzinom als Monotherapie und in der Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms in Kombination mit Cisplatin eingesetzt. Desweiteren findet Gemcitabin Anwendung in Verbindung mit Paclitaxel gegen das Mammakarzinom, sowie zusammen mit Cisplatin gegen das Harnblasenkarzinom. Als Kombinationstherapie gegen Ovarialkarzinome wird Gemcitabin mit Carboplatin angewandt. Seltener ist seine Indikation in der Rezidivtherapie von Hodgkin und Non-Hodgkin Lymphomen zusammen mit Dexamethason [45].

Gegenwärtig zählt Gemcitabin zwar noch nicht zu den Standardtherapien bei Kolonkarzinomen, oder gar dessen peritonealen Metastasen, seine Wirksamkeit ist jedoch bereits in zahlreichen tierexperimentellen und auch klinischen Studien erwiesen [46-50]. Eine synergetische Wirkung mit dem zur Zeit in der Therapie der Peritonealkarzinose am häufigsten beschriebenen Mitomycin C, wird außerdem diskutiert, wobei eine geringere Toxizität von Gemcitabin von Vorteil zu sein scheint [48]. Daher wurde in diesem Versuch Gemcitabin als ein Therapieansatz gegen die Peritonealkarzinose durch Kolonkarzinome eingesetzt, untersucht und mit anderen Ansätzen verglichen. Die Dosierung von  $24 \text{ mg/kg}$  Körpergewicht Gemcitabin richtete sich dabei nach Erfahrungswerten klinischer Studien [50].

Gemcitabin ist ein Prodrug, das erst intrazellulär enzymatisch aktiviert werden muss. Als Nukleosidanalogen des natürlichen Deoxycytidin ist es dann wirksam und führt zur Inhibition in der S-Phase der Zellteilung. Dies erfolgt durch die Hemmung der Ribonukleotid Reduktase. Es kommt zur Unterbrechung der DNA- Synthese und schließlich zum Zelltod.



**Abbildung 3: Strukturformel Gemcitabin [45]**

Der Abbau von Gemcitabintriphosphat erfolgt in Leber, Niere und im Blut, so dass es dann renal ausgeschieden werden kann.

In einer Studie von Ridwelski et al. [51] zeigte man bei Ratten eine signifikante Reduktion der Tumormasse einer zuvor implantierten Adenokarzinom Zelllinie nach intraperitonealer Applikation von Gemcitabin.

In einem Artikel, den das Institut für Pathologie aus Essen [52] veröffentlichte, wurde von einem Patienten mit Pseudomyxoma peritonei berichtet, bei dem die intravenöse Gabe von Gemcitabin zu einer Verringerung der Tumormasse geführt hatte. Die zuvor angewandten Therapieansätze der operativen Tumorreduktion sowie der intraperitonealen Chemotherapie mit Mitomycin C und Gemcitabin waren ohne Erfolg geblieben. Erst nachdem ein intraabdominal implantiertes Portsystem zur Durchführung der Chemotherapie durch Obstruktion insuffizient wurde, musste auf den intravenösen Weg ausgewichen werden.

Durch die Kombination aus operativer zytoreduktiver Therapie und direkt anschließender intraoperativer intraperitonealer Chemotherapie konnte eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit erreicht werden [53-55]. Dabei zeigte sich die komplette Entfernung allen makroskopisch sichtbaren Tumormaterials als

prognostisch wichtigster Faktor. Dies gründete sich zum einen auf die limitierte Eindringtiefe der Chemotherapeutika, wodurch ein größerer Residualtumor in der Tiefe nur unvollständig erreicht werden konnte und dadurch die Möglichkeit zur weiteren Ausbreitung bestand. Zum anderen wies ein Residualtumor auf ein bereits fortgeschrittenes Stadium hin.

Im Rahmen weiterer Optimierungsansätze wurde zuerst 1980 in einem experimentellen Kaninchenmodell die zytoreduktive Therapie mit einer hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie kombiniert [56].

In der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts wurde die Beobachtung gemacht, dass nach hoch fieberhaften Infekten bei einzelnen Patienten eine Besserung ihrer Tumorerkrankung, und in wenigen Fällen sogar eine vollständige Heilung, eintrat [57]. So entstand die so genannte „Fiebertherapie“, in deren Rahmen hohe Körpertemperaturen durch die Gabe pyrogener Stoffe erzeugt wurden. Die Erfolge dieser Therapie blieben jedoch fragwürdig, und durch ihre hohe Zahl an Nebenwirkungen und durch die schlechte Steuerbarkeit limitiert.

Seit den 70er Jahren wurde die Hyperthermie im Labor untersucht, und seit den 80ern sogar unter immer weiter verbesserten technischen Voraussetzungen in der Klinik eingesetzt. Heute ist die Hyperthermie, sowohl in der Kombination mit einer Radio- oder Chemotherapie, als auch im alleinigen Einsatz, fester Bestandteil in der Tumorthherapie [58, 59].

Unter Hyperthermie wird je nach Applikationsform, die Überwärmung des ganzen Körpers oder einzelner Körperareale verstanden. Dabei werden künstlich Temperaturen zwischen 40 und 43 °C erzeugt. Bei diesen Temperaturen sind Zellen mit einem niedrigen pO<sub>2</sub> und einem erhöhten PH-Wert besonders anfällig. Dies trifft auf Tumorzellen im Vergleich zu normalem Gewebe zu, und kann so therapeutisch nutzbar gemacht werden [60, 61]. Die Temperaturerhöhung wird dabei zum Beispiel durch Ultraschall, elektromagnetische Wellen wie Radiowellen oder Mikrowellen oder durch Infusion einer erwärmten Flüssigkeit erreicht. Das primäre Ziel ist nicht das direkte Abtöten von Krebszellen durch die Überwärmung. Die dazu notwendigen Temperaturen würden auch gesundes Gewebe schädigen oder den Patienten gefährden. Tumorzellen sollen vielmehr sensibler für natürliche Abbauprozesse und Strahlen- oder Chemotherapie werden.



Der genaue Wirkmechanismus der Hyperthermie auf das Tumorzellgewebe ist noch nicht ausreichend geklärt. Eine Modellvorstellung geht davon aus, dass unter Wärmeeinwirkung Gewebenekrosen auftreten, die zur Freisetzung von Hitzeschockprotein 70 (HSP 70) aus den Zellen führen. HSP 70 wiederum aktiviert die Killerzellen des Immunsystems, so dass es zur Tumorzelllyse kommt [57].

Gleichzeitig führt die Erwärmung des Gewebes zu einer vermehrten Durchblutung und damit in Kombination mit einer Chemo- oder Strahlentherapie zu einer verbesserten Wirksamkeit dieser Therapien durch die erhöhte Anreicherung der Therapeutika im Tumorgewebe [57, 62].

Eine alleinige Hyperthermie kann theoretisch durch eine erhöhte Durchblutung des Gewebes auch zu einer vermehrten Ausschwemmung von Tumorzellen und damit Gefahr der Metastasierung führen. Dies ist ein Grund, weshalb die Hyperthermie, mit Ausnahme von Hirntumoren, in der Tumortherapie als Kombination eingesetzt [57].

Bei Untersuchungen am Baylor University Medical Center in Dallas, Texas wurde gezeigt, dass durch das Einsetzen von Hyperthermie sich eine größere Menge von Mitomycin C im Bereich des Tumorgewebes anreichern konnte [62], und somit auch seine Wirksamkeit vermehrt werden konnte. Bei einer Temperatur von 42°C wurde eine schnellere Aktivierung von Mitomycin C beobachtet. Außerdem zeigten sich zuvor resistente Tumorzellen unter Hyperthermie sensibel auf Mitomycin [63]. Durch die Hyperthermie wurden des Weiteren intrinsische DNA- Reparatonsmechanismen im Tumorgewebe inhibiert [62]. Die Eindringtiefe von Mitomycin C in das Gewebe erhöht sich unter Hyperthermie um > 3 mm auf maximal 5 mm [64-68].

In einer prospektiv randomisierten Studie des Netherlands Cancer Institute wurde gezeigt, dass eine hypertherme intraperitoneale Chemotherapie zusätzlich zu einer systemischen Chemotherapie eine Verlängerung der Überlebenszeit bedeutet [53, 54]. Die 5 Jahre Überlebensrate konnte von 0% auf 30% angehoben werden [39]. So beschrieben auch Glehen et al. [55] in einer Multicenter- Studie für Patienten, die eine hypertherme intraperitoneale Chemotherapie erhalten hatten, eine mediane Überlebenszeit von 19.2 Monaten für alle insgesamt. Wobei Patienten ohne makroskopischen Residualtumor eine mediane Überlebenszeit von 35.4 Monaten aufwiesen, während sie für solche mit inkompletter Zytoreduktion nur 8.4 Monate war. Die mediane Überlebenszeit nach systemischer intravenöser Chemotherapie mit Irinotecan oder Oxaliplatin wurde mit 24 Monaten angegeben [69-71]. Die gleiche Tendenz wurde für das peritoneale Mesotheliom gezeigt. Während in der

Vergangenheit unter palliativer Therapie nur eine mittlere Überlebenszeit von 9- 12 Monaten erreicht werden konnte [72-74], stieg sie nach vollständiger Peritonektomie und gleichzeitiger intraoperativer intraperitonealer Chemotherapie bei einer 3 Jahres Überlebensrate von 60% auf 30- 66 Monate [75-77].

Auf Grundlage der Kenntnisse über die Entstehung und Ausbreitung der Peritonealkarzinose entwickelten und etablierten Sugarbaker et al. [20, 78] innerhalb der vergangenen 20 Jahre ein multimodales Therapiekonzept, welches seitdem gegen Bauchfellkrebs beim Menschen in der Praxis eingesetzt wurde. Es vereinigt die operative Tumorentfernung mit einer anschließenden intraoperativen intraperitonealen hyperthermen Chemotherapie, was zu einer deutlichen Lebenszeitverlängerung und Lebensqualitätsverbesserung führte [39, 51].

Dabei stellt zunächst die Auswahl der für diese Therapie in Frage kommenden Patienten einen wichtigen Ausgangspunkt dar. Denn als Zielkriterium für eine an die operative Tumorentfernung anschließende intraperitoneale Chemotherapie gilt vor allem die möglichst vollständige makroskopische Tumorentfernung, die nur im weniger fortgeschrittenen Stadium realisiert werden kann. Zur Objektivierung des Ausmaßes der Peritonealkarzinose wurden verschiedene intraoperative Stagingssysteme entwickelt [79]. Nach dem Peritoneal-Carcinose-Index (PCI) von Sugarbaker et al. werden das Peritoneum und die damit überzogenen abdominalen Organe in 13 Abschnitte unterteilt. In jedem wird anhand der Größe und Anzahl der Tumorknoten ein Score erhoben, deren Summe den PCI ergibt (siehe Abb.). Dabei kann pro Abschnitt ein Score zwischen 0- 3 erhoben werden (0= kein Tumor, 1= < 0,5 cm, 2= < 5, 0 cm, 3= > 5,0 cm oder konfluierend), so dass maximal ein PCI von insgesamt 39 bestehen kann.

Andere untersuchte Konzepte zum Staging einer Peritonealkarzinose sind das System von Gilly, ein Japanisches Stagingssystem sowie der „Dutch Simplified Peritoneal Cancer Index“ [79]. Innerhalb einer Studie durch Portilla et al. [79] wurden diese Stagingssysteme unter verschiedenen Gesichtspunkten beleuchtet und verglichen. Nach der mehrheitlichen Meinung der Experten ist der PCI von Sugarbaker am besten geeignet, um das Ausmaß einer Peritonealkarzinose objektiv zu quantifizieren, so dass empfohlen wurde diesen im klinischen Alltag zu verwenden.

1995 wurde von Sugarbaker durch die Veröffentlichung der „Peritonectomy Procedures“ [78] eine wichtige Grundlage für eine allgemein gültige operative Therapie mit gering möglichem makroskopischen Residualtumor geschaffen. Darin beschreibt er detailliert die Methodik der zytoreduktiven Therapie unter anderem mit parietaler und viszeraler Entfernung des Peritoneums.

Region	Ausdehnung		
0 zentral	-		
1 rechst oben	-		
2 epigastrisch	-		
3 links oben	-		
4 linke Flanke	-		
5 links unten	-		
6 Becken	-		
7 rechts unten	-		
8 rechte Flanke	-		
9 oberes Jejunum	-	LS 0	kein Tumor
10 unteres Jejunum	-	LS 1	< 0,5 cm
11 oberes Ileum	-	LS 2	> 5,0 cm
12 unteres Ileum	-	LS 3	> 5,0 cm oder konfluierend

**Abbildung 4: Peritoneal-Carcinose-Index nach Sugarbaker [79]**

## 2. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die experimentelle Untersuchung verschiedener Therapiekonzepte der Peritonealkarzinose mit multimodalem Ansatz. Dafür soll ein Rattenmodell realisiert werden, anhand dessen die komplexen Therapieansätze analysiert und nach weiterer intensiver Prüfung als mögliche Therapieoptionen sogar als Behandlungskonzept in den klinischen Alltag übernommen werden könnten. Ein solches Tiermodell ließ sich in der Literatur bisher nicht nachweisen und wäre ein großer Fortschritt in der Entwicklung weiterer Therapiemöglichkeiten der Peritonealkarzinose. Im Zusammenspiel der tierexperimentellen Untersuchungen und der klinischen Anwendung wird eine Verbesserung der bisher schlechten Prognose der Patienten mit einer Peritonealkarzinose erwartet.

Diese Arbeit fokussiert auf der Durchführbarkeit des Rattenmodells sowie dem Erfolg der verschiedenen multimodalen Therapieansätze. Das Erfolgskriterium ist dabei jeweils die Tumorlast innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen, die anhand von Tumormasse, Tumorknotenanzahl, einem Tumorindex und dem Vorhandensein von Aszites gemessen wurde.

### **3. Material und Methoden**

#### **3. 1 Tierhaltung und Pflege**

Die Ratte ist in der experimentellen Tumorforschung die am häufigsten verwendete Tierart. Es wurden an der Charite-Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. med. C.A. Jacobi bereits ausgiebige Erfahrungen mit BD IX/HansHsd-Ratten gemacht [80-83].

Insgesamt 90 männliche BD IX/HansHsd Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln) im Alter von 4-6 Wochen, deren Aufnahmegewicht zwischen 170g und 280g lag, wurden entsprechend den Bedingungen des Tierschutzgesetzes unter standardisierten Bedingungen im Labor gehalten. Unter einem Tag/Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden, hatten sie Zugang zu Wasser und Standard-Laborfutter ad libitum. An Operationstagen wurden die entsprechenden Tiere ab sechs Stunden vor Beginn nüchtern belassen.

Die Ratten waren zur Gewöhnung bereits eine Woche vor dem geplanten Eingriff in dem klimatisierten Raum mit einer Temperatur von 22-24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60 % in dafür vorgesehenen Boxen untergebracht worden.

Es wurde ein Antrag an die Tierschutzkommission gestellt, dem durch die Senatsverwaltung für Gesundheit der Stadt Berlin unter der Registriernummer Reg 0210/04 zugestimmt wurde.

#### **3. 2 Zellkultivierung von Tumorzellen CB 2974**

Die synergetischen Zellen (CB 2974) wurden in einem Nährmedium kultiviert.

Das Medium setzte sich aus 250 ml Dulbecco's MEM (Biochrom AG, Deutschland), 250 ml HAM's F 10 Medium (Biochrom AG, Deutschland), 5 ml Penicillin/Streptomycin (1000 U/ 10000 ul/ ml, Gibco, Deutschland) und 50 ml inaktivem fetalem Kälberserum (FBS) zusammen.

Da Kälberserum und Penicillin/ Streptomycin bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden, mussten diese zur Ansetzung des Mediums aufgetaut werden. Dazu wurden 500 ml FBS bei  $56^{\circ}\text{C}$  eine Stunde lang inkubiert.

Das ausgesetzte Medium war ca. vier Wochen im Kühlschrank haltbar. Des Weiteren war die Verwendbarkeit an der Indikatorfarbe rot ablesbar, die bei abgelaufener Haltbarkeit lila und bei verbrauchtem Nährmedium gelb wurde.

Es wurden 2-4 neue Zellkulturflaschen vorbereitet, d.h. mit Datum, Zellart, Name und Passagierungsnummer beschriftet, deren Menge aus Erfahrung die gewünschte Zellzahl ergab. In diese wurde je ca. 15 ml frisches Nährmedium gegeben. Je nach Gebrauch der Zellen wurde eine Kulturflasche dicht mit 0,5 ml der Zellsuspension oder mit 5 Tropfen, die nur der Zellerhaltung dienten, besät.

Die Zelldichte wurde unter dem Mikroskop kontrolliert.

Dann kamen die Flaschen bei  $37^{\circ}\text{C} + 5\% \text{CO}_2$  in den Brutschrank.

Anhand der Indikatorfarbe des Mediums konnte entschieden werden, ob die Zellen mit weiterem Nährmedium nachgefüttert werden mussten.

Zur Passagierung der Tumorzellen, deren Durchführung ca. bei einem Alter der Zellen von 5- 6 Tagen statt fand, wurde zunächst Nährmedium im Wasserbad auf Zimmertemperatur erwärmt. Die Werkbank musste mindestens für 20 Minuten warm laufen und desinfiziert werden, um ein steriles Arbeiten zu garantieren.

Von den zuvor angesetzten Zellkulturflaschen wurde das gesamte alte Medium mit einer sterilen Glas- Pasteurpipette abgezogen und verworfen.

Die so übrig gebliebenen Zellen wurden mit 10 ml Pufferlösung (PBS- Dulbecco's w/o  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen. Je nach Bedarf konnte mehrfach gewaschen werden, falls die rötliche Färbung des Nährmediums noch zu stark zu sehen war.

Damit sich die Tumorzellen von Boden der Kulturflaschen ablösten, wurde dieser mit 4-5 ml Trypsin (0,5 % EDTA- Trypsin) bedeckt. Danach mussten sie 5-8 Minuten im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubieren.

Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen sichtbar ablösten. Ein weißlicher Schleim sollte zu sehen sein.

Die Zellen wurden nun vereinzelt, indem die Kulturflasche mehrmals kräftig in die Hand geschlagen wurde.

Die Wirkung des Trypsins musste nun gestoppt werden, um zu verhindern, dass die Zellen durch Zerplatzen zerstört wurden. Hierfür wurden die Zellen mit 10 ml Fertigmedium verdünnt und gut suspendiert.

Die gesamte Suspension wurde auf Blue Caps verteilt und bei 1100 U/min. für 10 Minuten zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen und verworfen, so dass die Zellen als festes Sediment sichtbar waren.

Dieses Zellsediment wurde mit 5- 10 ml frischem Medium, das kein FBS enthält, versetzt, und gut suspendiert. Für den Fall, dass makroskopisch Zellklumpen in der Suspension zu sehen waren, sollte sie in eine Pipette aufgezogen werden, und durch ein Zellsieb aus Nylon mit der Siebgröße 100 µm in ein Blue Cap gegeben werden.

Es erfolgte die Zellzählung in der Neubauer- Zählkammer.

Dazu wurden die Oberfläche der Zählkammer, sowie das geeignete Deckglas, mit 70 % igem Ethanol gereinigt. Das Deckglas wurde, leicht angefeuchtet, auf die Zählkammer gelegt, bis die so genannten „Newton´schen Ringe“ anzeigen, dass es richtig positioniert ist. Durch Ansetzen der Pipette an der Kante der Zählkammer, wurde die Suspension durch die Kapillarkräfte in die Rinnen zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. Nun konnte die Kammer unter das Mikroskop gelegt werden. Die Einteilungslinien wurden sichtbar. Es wurden mindestens vier der großen Quadrate ausgezählt, aus denen dann der Mittelwert errechnet wurde. Dieser wurde wiederum mit  $10^4$  multipliziert, wodurch sich die Zellzahl pro Milliliter ergab. Die Gesamtzellzahl konnte dann aus dem Volumen der Suspension, die mit der Zellzahl pro Milliliter multipliziert wurde, gebildet werden.

Die hier applizierte Menge betrug 0,2 ml und enthielt  $2 \times 10^5$  Zellen.

Mittels der Trypan- Blau- Methode wurden die lebenden von den schon toten Tumorzellen differenziert. Dadurch wurde sichergestellt, dass sich in der applizierten Zellmenge auch die gewünschte Menge an Tumorzellen befand, die noch wirksam war.

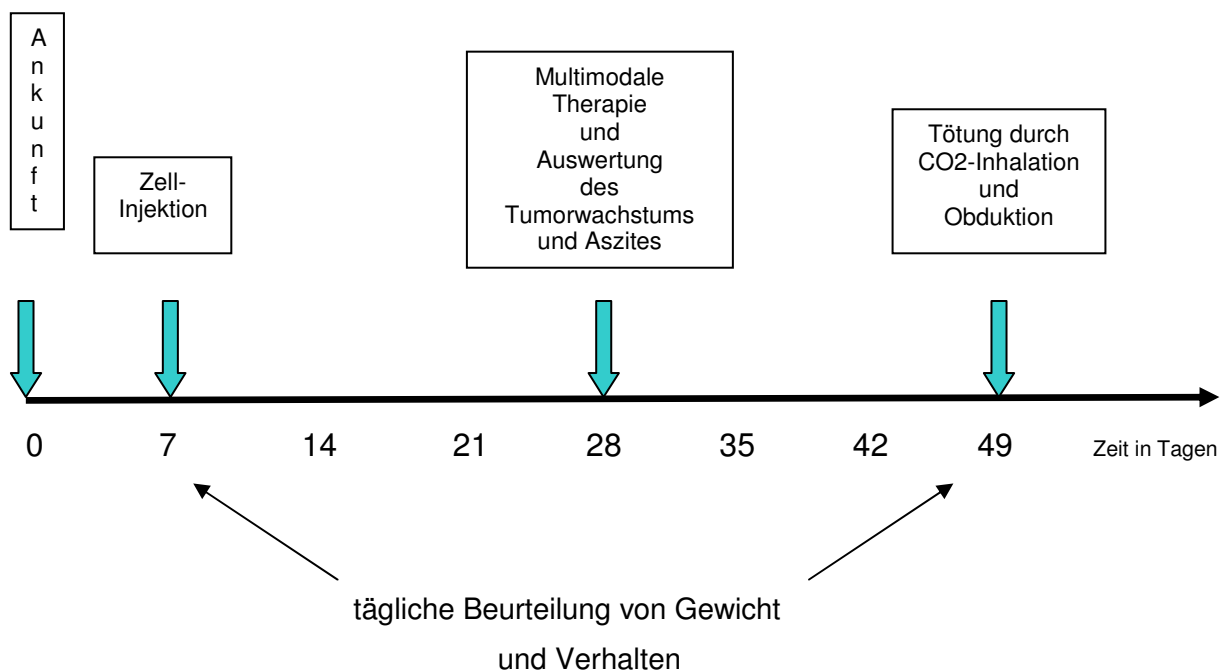
In ein Eppendorfgefäß wurden 10 µl Trypan- Blau und 25 µl der Zellsuspension gegeben. Es wurde mehrmals suspendiert, und anschließend 1- 2 Minuten inkubiert.

Die Neubauer- Zählkammer wurde nach dem oben genannten Prinzip bestückt. Unter dem Mikroskop ließen sich lebendige Zellen, die sich grün darstellen, von den

toten in blauer Farbe unterscheiden. Die blaue Farbe resultierte dabei aus dem sich intrazellulär befindlichen Trypan-Blau, was auf die nicht mehr vorhandene Zellbarriere und damit den Tod der Zellen hinwies.

Von den so gezählten toten Tumorzellen, konnte auf deren Gesamtmenge geschlossen werden, die bei ca. 1 % liegen sollte. Bei einer höheren Zahl könnten diese noch abpipettiert werden.

### 3.3 Das Studiendesign



**Abbildung 5: Zeitschema der Versuchsreihe**

Um die Gewöhnung an die neue Umgebung sowie an die anderen Tiere zu gewährleisten, wurde eine Eingewöhnungszeit von sieben Tagen eingehalten.

Am Tag der Ankunft im Labor wurden die Tiere in die jeweilige Therapiegruppe bzw. Kontrollgruppe randomisiert.

Als Grundlage der Fallzahlberechnung wurde sich auf ein an der Charité etabliertes Rattenmodell bezogen [80-83]. Es werden daher in jede Gruppe 15 Tiere



randomisiert, damit ein klinisch relevanter Unterschied von 30% zwischen den einzelnen Therapiegruppen nachgewiesen werden könnte.

Als Hypothese ist davon auszugehen, dass bei erfolgter Therapie ein Unterschied von 30% der Tumormasse bzw. des Tumorindex oder der Tumorknotenanzahl erwartet wird. Die Fallzahl wurde neben empirisch ermittelten Werten unter folgenden Voraussetzungen ermittelt: Normalverteilung numerischer Parameter; Fehler 1. Art ( $\alpha=0,05$ ) und 2. Art ( $\beta=0,4$ ), einseitiger Test. Weiterhin wird die Drop out Rate auf ca. 2 Tiere (13%) pro Gruppe geschätzt, so dass die im Rahmen der Fallzahlschätzung ermittelten Stichprobenumfänge um diesen Wert erhöht werden. Als Grundlage zur Berechnung wird von einer Variabilität von 10% in der Bestimmung der Tumormasse ausgegangen. Die ermittelte Power des Tests liegt bei 0,4 für einen einseitigen Test [84].

- Gruppe 1: Kontrollgruppe: diese Tiere erhielten die Zellinjektion ohne nachfolgende Therapie
- Gruppe 2: diese Tiere erhielten die Zellinjektion und therapeutisch ein Tumordebulking
- Gruppe 3: diese Tiere erhielten die Zellinjektion und therapeutisch ein Tumordebulking mit anschließender intraperitonealer hyperthermer Chemotherapie mit Mitomycin C
- Gruppe 4: diese Tiere erhielten die Zellinjektion und therapeutisch ein Tumordebulking mit anschließender intraperitonealer hyperthermer Chemotherapie mit Gemcitabin

Im Rahmen des gesamten Versuches wurden zwei weitere Therapieansätze durchgeführt. Diese wurden in einer anderen Arbeit untersucht, und sollen hier nur erwähnt werden.

- Gruppe 5: diese Tiere erhielten die Zellinjektion und therapeutisch ein Tumordebulking mit anschließender intraperitonealer Chemotherapie mit Taurolidin
- Gruppe 6: diese Tiere erhielten die Zellinjektion und therapeutisch ein Tumordebulking mit anschließender photodynamischer Therapie

### **3. 3. 1 Die Zellinjektion**

Am Tag sieben erfolgte die Injektion von 0,2 ml mit  $2 \times 10^5$  Tumorzellen der syngenetischen Zelllinie DHD/K12/TRb der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, England. Das Tier erhielt dafür eine intraperitoneale Allgemeinanästhesie mit Rompun<sup>®</sup> 2% (12 mg/ kg Körpergewicht) (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und Ursotamin<sup>®</sup> (80 mg/ kg Körpergewicht) (Serumwerk Bernburg AG, Deutschland). Der Bauch wurde rasiert und anschließend mit Freka<sup>®</sup>- DERM gefärbt (Fresenius) desinfiziert. Das Tier wurde auf dem Rücken gelagert. Es erfolgte die Implantation der Kolonkarzinomzellen über eine Medianlaparatomie von 2 cm Länge im rechten oberen Quadranten als subperitoneale Quaddel. Der Verschluss der Wunde wurde zweischichtig durch Naht der Bauchwand und der Haut jeweils fortlaufend mit Vicryl<sup>®</sup> 4/0 (Ethicon) durchgeführt. Es erfolgte die Desinfektion der Wunde. Abschließend wurde ein Sprühpflaster Leukospray<sup>®</sup> (Beiersdorf) aufgetragen.

### **3. 3. 2 Die multimodale Therapie**

#### **3. 3. 2. 1 Die Quantifizierung des Tumorwachstums**

Durch Erfahrungen vorangegangener Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. C.A. Jacobi und durch eigene Voruntersuchungen [85, 86] konnte davon ausgegangen werden, dass 21 Tage nach der Implantation der Kolonkarzinomzellen eine ausreichende intraperitoneale Tumordissemination stattgefunden haben musste. Bis zu diesem Zeitpunkt hatte sich die Metastasierung auf das Peritoneum beschränkt und hatte sich insbesondere nicht auf Leber und Lunge ausgeweitet [82, 83].

Daher erhielten die Tiere der Gruppen 2, 3, und 4 an Tag 28 die jeweilige multimodale Therapie. Dazu wurde wiederholt eine intraperitoneale Allgemeinanästhesie mit Rompun<sup>®</sup> 2% (12 mg/ kg Körpergewicht) (Bayer Vital

GmbH, Leverkusen, Deutschland) und Ursotamin<sup>®</sup> (80 mg/ kg Körpergewicht) (Serumwerk Bernburg AG, Deutschland) durchgeführt. Das Tier wurde im Operationsfeld am Bauch rasiert und dort anschließend mit Freka<sup>®</sup>- DERM gefärbt (Fresenius) desinfiziert.

Es erfolgte eine mediane Laparotomie von ca. 6 cm Länge.

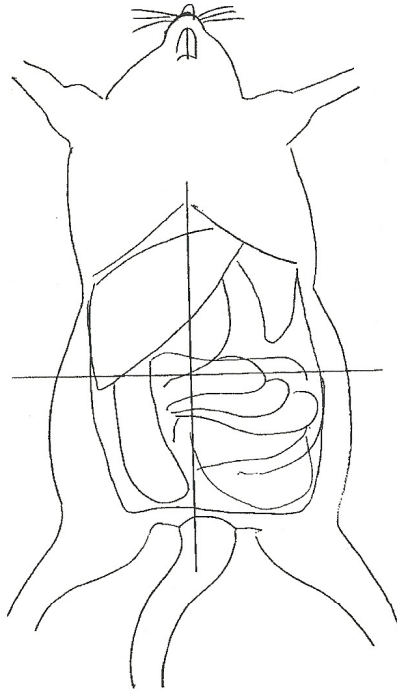
Der Eingriff stellte analog zum Menschen die Probelaparotomie bei einem intraabdominalen Tumorleiden wie einem Kolonkarzinom dar. Das Wachstum von Tumorknoten auf dem Peritoneum durch die zuvor implantierten Kolonkarzinomzellen repräsentierte das fortgeschrittene metastasierte Tumorstadium mit Peritonealkarzinose.

Von zwei unabhängigen Untersuchern wurde zunächst das allgemeine Tumorwachstum auf dem Peritoneum eingeschätzt. Dazu wurde der experimentelle Peritoneal Cancer Index (ePCI) verwandt. Der ePCI, angelehnt an den Peritoneal Cancer Index (PCI) von Sugarbaker et al. [20, 79], wurde für experimentelle Zwecke von Steller et al. modifiziert [87]. Für dessen Bestimmung wurde die Bauchhöhle in vier Quadranten eingeteilt und innerhalb jedem ein Score bestimmt. Der Score reichte von 0 bis 5. Ein Score von 0 bedeutete, dass makroskopisch keine Tumormasse sichtbar war. Bei einem Score von 1 wies der Quadrant eine Tumorgöße von < 0,5 cm auf. Der Score 2 hieß, der Tumor ist zwischen 0,5 und 1 cm groß. Bei einem Score von 3 entspricht die Tumorgöße einem Durchmesser von 1- 2 cm. Ein Score von 4 bedeutet einen Tumordurchmesser zwischen 2 und 3 cm innerhalb des Quadranten. Bei Erreichen des maximalen Scores von 5 ist der Tumor > 3 cm im Durchmesser. Die so bestimmten Ergebnisse aller vier Quadranten wurden addiert, so dass sich eine Summe von minimal 0 bis maximal 20 als ePCI ergab.

Neben der Bestimmung des ePCI galt die Gesamtanzahl an Tumorknoten als weiteres Kriterium zur Quantifizierung der Ausbreitung und des Wachstums der Kolonkarzinomzellen auf dem Peritoneum. Die Tumorknotenanzahl wurde ebenfalls von zwei voneinander unabhängigen Untersuchern erhoben. Abbildung 6 zeigt den Bogen, auf dem für jedes Tier ePCI und Tumorknotenanzahl dokumentiert wurden.

**ePCI Score**

- 0 = no tumor
- 1 =  $\leq 0,5$  cm
- 2 = 0,5 - 1,0 cm
- 3 = 1,0 - 2,0
- 4 = 2,0 - 3,0 cm
- 5 =  $\geq 3,0$  cm



Observer	e PCI Score		Tumorknotenzahl	
	1	2	1	2
Level 1:	_____	_____	_____ / _____	
Level 2:	_____	_____	_____ / _____	
Level 3:	_____	_____	_____ / _____	
Level 4:	_____	_____	_____ / _____	
Summe :	_____	_____	_____ / _____	

**Abbildung 6: Dokument ePCI Score und Tumorknotenanzahl**

### **3. 3. 2. 2 Die zytoreduktive Therapie**

Es folgte die operative zytoreduktive Therapie oder Tumordebulking. Vereinzelte Tumorknoten konnten mittels Elektrokauter entfernt werden, wobei zeitweise eine Eventeration des Dünndarmes notwendig wurde. Bei disseminiertem Befall des Peritoneums wurde eine partielle parietale Peritonektomie durchgeführt.

Dabei war die Zielsetzung die möglichst vollständige Entfernung allen makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes bei minimalem Stress für das Tier.

Im Anschluss an die zytoreduktive Therapie wurde durch den Operateur das Stadium des Residualtumors festgelegt und dokumentiert. R0: kein Residualtumor oder R2: makroskopisch sichtbarer Residualtumor.

Die Tiere aus der Versuchsgruppe 2 erhielten einen Wundverschluss durch zweischichtige Naht mit Vicryl<sup>®</sup> 4/0 (Ethicon) sowie eine Wunddesinfektion. Zum Schutz wurde abschließend ein Sprühpflaster Leukospray<sup>®</sup> (Beiersdorf) aufgetragen.

### **3. 3. 2. 3 Die intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Mitomycin C**

Die Tiere der Gruppe 3 wurden direkt nach dem Tumordebulking einer intraperitonealen hyperthermen Chemotherapie mit Mitomycin C zugeführt.

Dazu wurde in das offene Abdomen eine Drainage eingebracht, die die Spüllösung zuführte, sowie eine, die diese wieder abführte. Der Situs wurde mit Operationsfolie abgedeckt, um vor Wärmeverlusten zu schützen. Der zuführende Schlauch lag im rechten oberen Abdominalquadranten, während der abführende im linken unteren positioniert wurde. Beide Drainagen hatten einen Durchmesser von 6 mm und waren aus Silikon. Eine Rollerpumpe mit zwei synchron laufenden Masterflex<sup>®</sup> Pumpköpfen (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, Illinois USA) führte die Schläuche, zwischen denen sich ein Reservoir mit der Spüllösung befand.

Es wurde jeweils über einen Zeitraum von 60 Minuten kontinuierlich mit einer Flussrate von 60ml/min. mit NaCl- Lösung 0,9 % gespült. In 250 ml NaCl- Lösung 0,9% wurde Mitomycin C 15 mg/m<sup>2</sup> gegeben. Die Körperoberfläche wurde dabei nach der Formel  $A(m^2) = 0.007178 \times \text{Gewicht (kg)}^{0,425} \times \text{Länge (cm)}^{0,725}$  berechnet. Die Dosis wurde halbiert, wobei die erste Hälfte zu Beginn der Spülung dem Reservoir zugegeben wurde, während die zweite nach 30 Minuten appliziert wurde. Innerhalb des Reservoirs wurde die chemotherapeutische Spüllösung über einen Heatexchanger erwärmt, so dass die zuführende Drainage die hypertherme Flüssigkeit nach intraabdominal leitete, wo sie am Peritoneum auf den möglichen Residualtumor und auf durch das Tumorbulking freigesetzte Tumorzellen wirken konnte. Es wurden dabei Temperaturen der Spüllösung von 41,2 – 42,3 °C erreicht. Auch die Temperatur der Maschine wurde im Abstand von fünf Minuten gemessen und dokumentiert. Die hypertherme intraperitoneale Spülung wurde in der offenen „Colliseum“ Technik durchgeführt (s. Abb. 7- 9).

Während der gesamten Spüldauer wurde die Körpertemperatur des Tieres jeweils über eine rektal und eine intraabdominal eingebrachte 0,5 mm durchmessende Temperatursonde im Abstand von fünf Minuten gemessen und dokumentiert (s. Abb. 8).

Nach 60 Minuten wurde der Bauchraum mit reiner NaCl- Lösung 0,9 % für fünf Minuten gespült. Es erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluss mit fortlaufender Naht Vicryl<sup>®</sup> 4/0 (Ethicon), eine abschließende Desinfektion sowie das Aufsprühen von Leukospray<sup>®</sup> (Beiersdorf).

#### **3. 3. 2. 4 Die intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Gemcitabin**

Die Tiere der Versuchsgruppe 4 erhielten im Anschluss an die zytoreduktive Therapie eine intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Gemcitabin. Es wurde analog der Spülung mit Mitomycin C verfahren. Die Dosierung von Gemcitabin war dabei 24 mg/ kg Körpergewicht in 250 ml NaCl 0,9%.

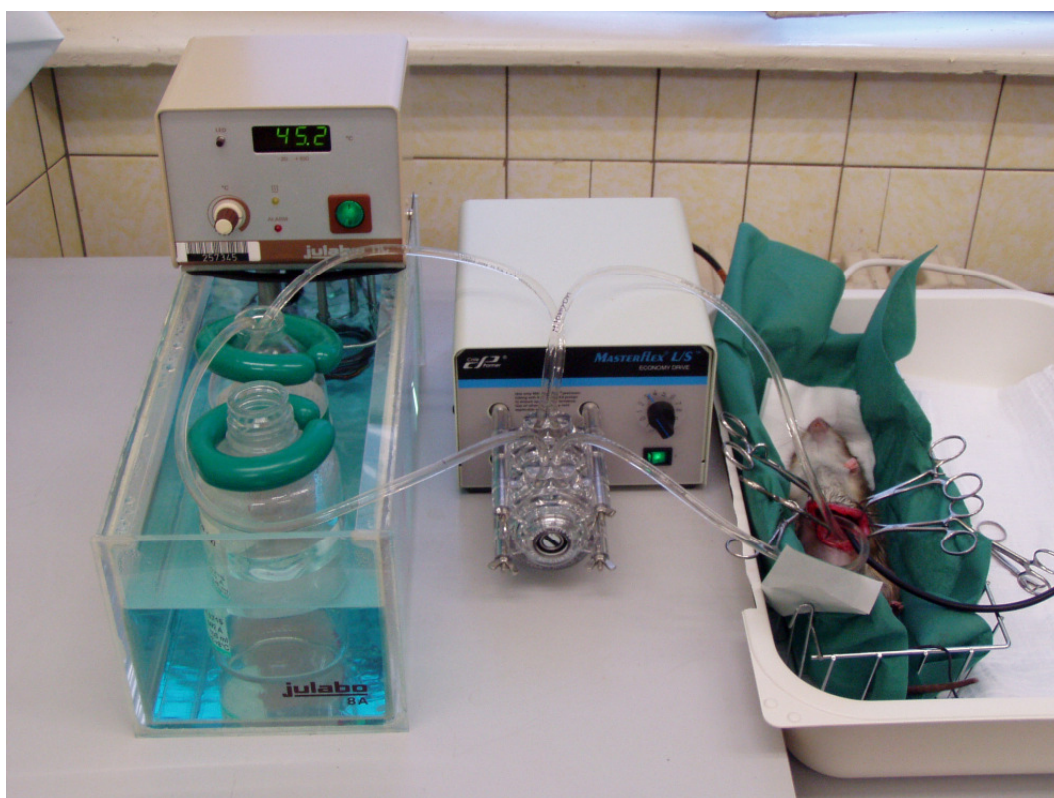


Abbildung 7: Versuchsaufbau intraperitoneale hypertherme Chemotherapie

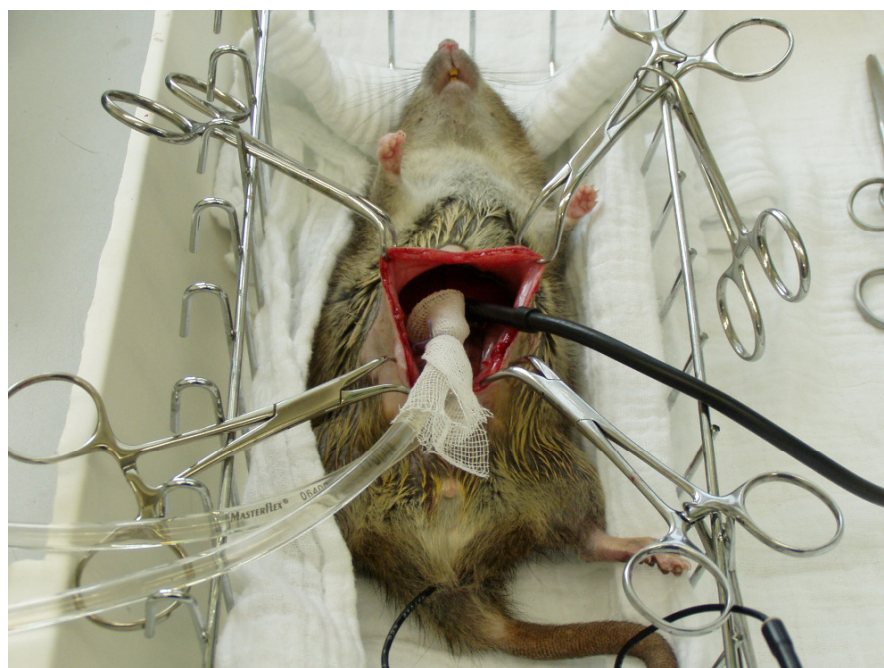
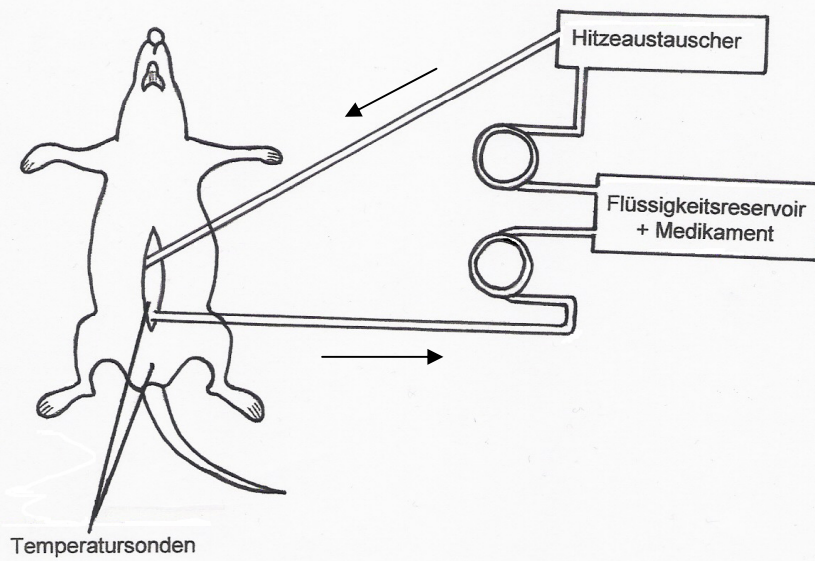


Abbildung 8: Temperaturmessung



**Abbildung 9: Versuchsaufbau Colliseum Technik**



Durch die täglich durchgeführten Beobachtungen und Dokumentationen, konnte auf eventuelle deutlich anhaltende Veränderungen des Putz- und Fressverhaltens nach der Zellinjektion bzw. nach der durchgeführten Therapie reagiert werden. In einem solchen Fall wurde die Untersuchung abgebrochen und das Tier vorzeitig eingeschläfert.

### **3. 3. 2. 5 Die Obduktion der Tiere zur Auswertung der multimodalen Therapie**

Am 49. Tag des Versuches wurde jedes Tier durch tiefe CO<sub>2</sub>- Inhalation eingeschläfert und durch zwei Untersucher obduziert.

Zunächst wurde analog dem vorangegangenen therapeutischen Eingriff das Tier am Bauch rasiert und zur besseren Beurteilung des gesamten Bauchraumes durch einen Kreuzschnitt (Median- und Quer- Laparatomie) eröffnet. Die Gesamtanzahl an Tumorknoten, die nach der multimodalen Therapie der Gruppen 2, 3, und 4 nachgewachsen waren, bzw. alle überhaupt entstandenen Tumorknoten der Versuchsgruppe 1, wurden gezählt und dokumentiert. Für jedes Tier wurde der ePCI erhoben. Es wurde außerdem auf das Vorhandensein von Aszites geachtet und dies mit ja oder nein beschrieben.

Zur weiteren Quantifizierung der Tumormasse erfolgte die komplette Resektion allen makroskopisch sichtbaren Tumorgewebes. Das gesamte Gewebe wurde gewogen und das Ergebnis dokumentiert.

Die Lagerung der Tierkadaver erfolgte bis zur Abholung der Tierkörperverwertung sachgerecht bei -21°C.

### 3. 4 Die Dokumentation und Verarbeitung der Daten

Bereits bei der Ankunft der Ratten im tierexperimentellen Labor wurde jede durch eine nummerierte Lochstanze im Ohr markiert.

Für jedes der Tiere wurde ein eigener Ordner angelegt, der mit der jeweiligen Nummer bezeichnet wurde. Darin wurden alle Daten, die während des Versuches über dieses Tier erhoben wurden, dokumentiert.

Aufgrund der kleinen Fallzahl kann nicht von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden. Daher erfolgten die Vergleiche der Parameter für die Tumorlast aller Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test. Die folgenden Einzelvergleiche der einzelnen Gruppen untereinander wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung von alpha- Fehlerkumulierung durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0.05$  festgelegt.

Die Berechnungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS<sup>®</sup> 17.0 für Windows<sup>®</sup> durchgeführt.

Die Daten im Text wurden als Median, Minimum und Maximum angegeben.

Die Grafiken wurden mittels „box-whisker-plots“ dargestellt. Neben dem Median wurden die obere und untere Quartile (box) sowie 1.5 Quartildifferenzen (whisker) abgebildet. Ausreißer werden als kleine Punkte und Extremwerte als Sternchen in den jeweiligen Abbildungen dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Letalität

Alle 90 Tiere wurden nach Randomisierung ihrer jeweiligen Therapiegruppe zugeführt wie es im Studienprotokoll vorgesehen war. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden analog den Vorgaben des Protokolls durchgeführt. Dabei zeigten sich keine Probleme, sowohl in der praktischen Umsetzung der Tumorzellimplantation, der zytoreduktiven Therapie, der hyperthermen intraperitonealen Spülung mit Mitomycin C und Gemcitabin, als auch in der perioperativen Beobachtung.

Sieben Tiere starben vor dem 49. Tag des Experimentes (Mortalität 8%), so dass insgesamt nur die erhobenen Daten von 83 Tieren in die Ergebnisse einfließen (siehe Tabelle 2).

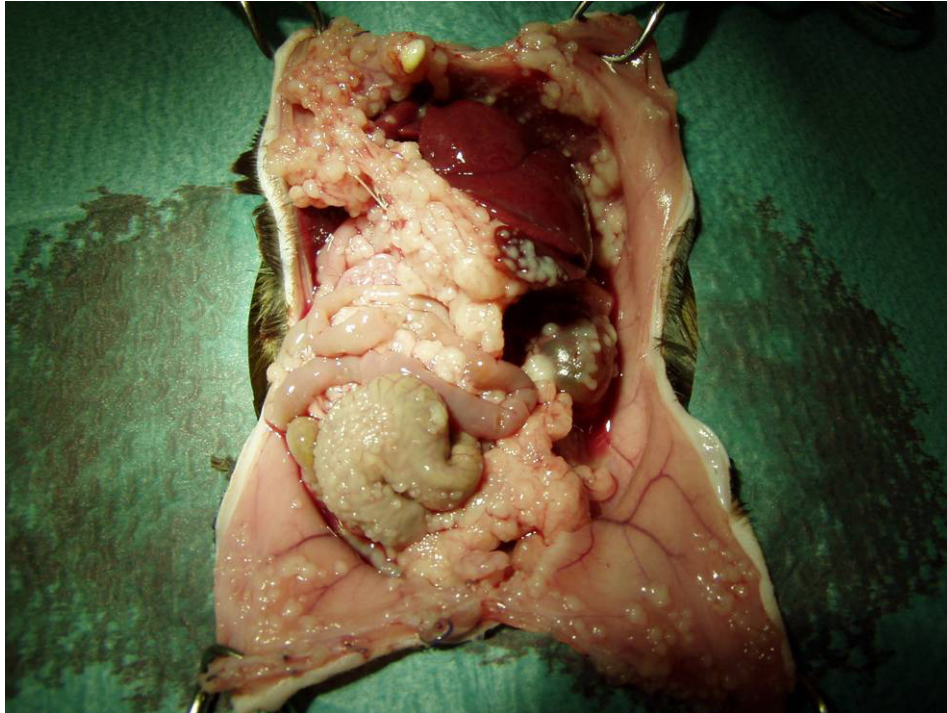
Gründe für den vorzeitigen Tod waren postoperative Blutung (n= 2), Ileus (n= 2), Ischämie durch Mesenterialinfarkt (n= 2) und die Narkose selbst (n= 1).

Gruppe	Insgesamt	gestorben	nicht gestorben
<b>1 (Kontrolle)</b>	<b>n= 15</b>	-	<b>n= 15 (100%)</b>
<b>2 (Debulking)</b>	<b>n= 15</b>	<b>n= 1 (6.7%)</b>	<b>n= 14 (93.3%)</b>
<b>3 (Mitomycin C)</b>	<b>n= 15</b>	<b>n= 2 (13.3%)</b>	<b>n= 13 (86.7%)</b>
<b>4 (Gemcitabin)</b>	<b>n= 15</b>	<b>n= 1 (6.7%)</b>	<b>n= 14 (93.3%)</b>
5 (Taurolidin)	n= 15	n= 3 (20%)	n= 12 (80%)
6 ( PDT)	n= 15	-	n= 15 (100%)

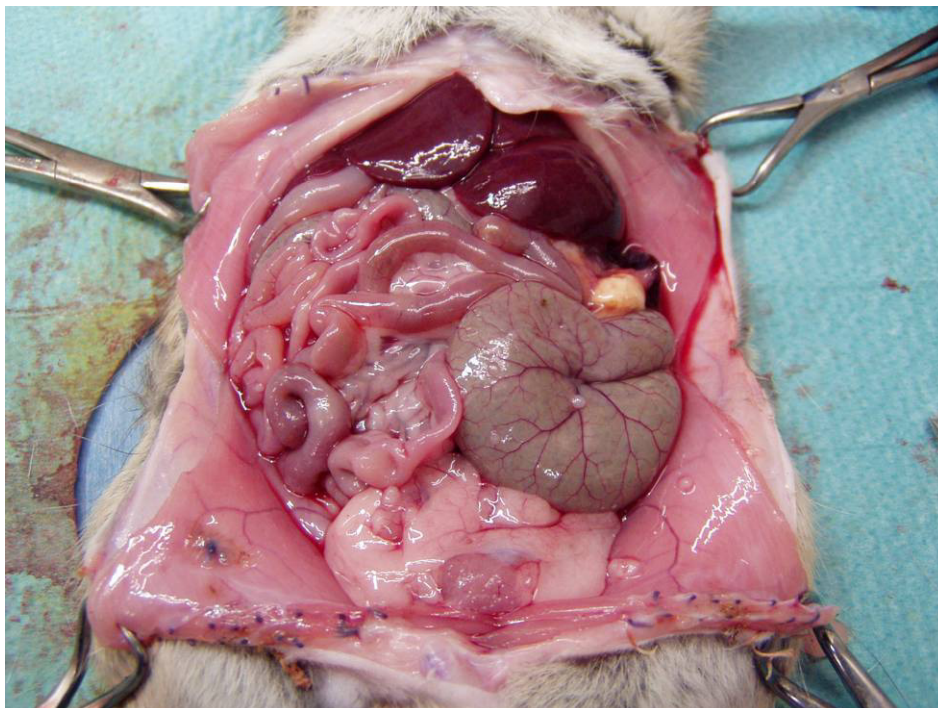
**Tabelle 2: Letalität innerhalb der Gruppen**

Bei zwei Tieren zeigte sich 21 Tage nach der Zellimplantation kein Tumorwachstum. Diese Tiere aus Therapiegruppe 4 und 5 wurden dennoch behandelt wie randomisiert. Die unterschiedliche Ausprägung des Tumorwachstums ist in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

In den folgenden Ausführungen stehen die Daten der Therapiegruppen 1- 4 im Zentrum. Wobei zur statistischen Analyse der Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen alle sechs einbezogen wurden. Die Gruppen 5 (Taurolidin) und 6 (Photodynamische Therapie) sind jedoch Inhalt einer anderen Arbeit.



**Abbildung 10: hohe Ausprägung des Tumorwachstums**



**Abbildung 11: geringe Ausprägung des Tumorwachstums**

## 4.2 Perioperative Ergebnisse

### 4.2.1 Maschinentemperatur

Die Messungen der Maschinentemperatur zeigten in der Mitomycin C Gruppe einen konstanten durchschnittlichen Wert um 45.2 – 45.3 °C an. Die absolut niedrigste Temperatur wurde dabei zu den Zeitpunkten 0, 35 und 60 Minuten mit 44.1 °C gemessen und die höchste mit 46.7 °C bei 50 Minuten.

In der Gruppe 4 (Gemcitabin) bewegte sich die Maschinentemperatur durchschnittlich zwischen 45.4 – 45.7 °C. Die minimale Temperatur wurde mit 44.6°C bei 35 Minuten Spülzeit gemessen. Die maximal erreichte Maschinentemperatur betrug nach 5 Minuten 47.0 °C (siehe Tabelle 3).

Zeit in Minuten	Gruppe 3 (Mitomycin C)	Gruppe 4 (Gemcitabin)
0	45.2 (44.1- 46.6)	45.6 (44.7- 46.3)
5	45.3 (44.6- 46.6)	45.6 (44.7- 47.0)
10	45.2 (44.5- 46.5)	45.6 (44.7- 46.5)
15	45.2 (44.3- 46.1)	45.6 (44.7- 46.0)
20	45.2 (44.3- 46.3)	45.5 (44.7- 46.1)
25	45.2 (44.4- 46.2)	45.6 (44.7- 46.4)
30	45.2 (44.2- 46.2)	45.7 (44.7- 46.8)
35	45.2 (44.1- 46.2)	45.4 (44.6- 46.8)
40	45.2 (44.3- 46.6)	45.6 (44.7- 46.8)
45	45.2 (44.3- 46.6)	45.6 (44.7- 46.8)
50	45.2 (44.2- 46.7)	45.6 (44.7- 46.6)
55	45.2 (44.2- 46.3)	45.6 (44.7- 46.8)
60	45.2 (44.1- 46.5)	45.6 (44.7- 46.8)

**Tabelle 3: Maschinentemperaturen der Gruppen 3 und 4 als Median (Minimum – Maximum)**

### 4.2.2 Abdominelle Temperatur

Die durchschnittlichen Messungen der intraabdominellen Temperatur zeigten in Gruppe 3 (Mitomycin C) wie auch in Gruppe 4 (Gemcitabin) von Beginn der Spülung bis zum Ende bei 60 Minuten eine steigende Tendenz.

In der Mitomycin C Gruppe wurde der niedrigste Wert bei 0 Minuten mit 39.8 °C gemessen. Die Temperatur stieg bis 41.2 °C bei 35, 40, 45 und 55 Minuten. Der absolute Minimalwert der Abdominaltemperatur wurde innerhalb der Gruppe 3 bei 60 Minuten mit 33.9 °C festgestellt. Der absolute Maximalwert lag dabei nach 10 Minuten bei 48.8 °C.

In der Gemcitabin Gruppe wurde der niedrigste durchschnittliche Wert der intraabdominellen Temperatur ebenfalls zu Beginn (0 Minuten) mit 39.6 °C gemessen. Die Temperatur stieg dann bis zum Ende (60 Minuten) der Spülzeit auf 41.2 °C. Die absolute Minimaltemperatur lag in Gruppe 4 bei 38.1 °C bei 5 Minuten, und die absolute Maximaltemperatur wurde nach 45, 50, und 55 Minuten mit 42.1 °C erreicht (siehe Tabelle 4).

Zeit in Minuten	Gruppe 3 (Mitomycin C)	Gruppe 4 (Gemcitabin)
0	39.8 (38.5- 41.0)	39.6 (39.0- 40.8)
5	40.1 (38.5- 41.3)	39.8 (38.1- 41.2)
10	40.5 (38.8- 48.8)	40.2 (39.0- 41.1)
15	40.7 (39.2- 41.5)	40.2 (39.8- 41.0)
20	40.7 (39.4- 41.8)	40.6 (39.6- 41.0)
25	40.8 (39.8- 42.0)	40.7 (40.2- 41.1)
30	40.9 (39.0- 42.2)	40.9 (39.2- 41.1)
35	41.2 (39.0- 41.8)	41.0 (40.2- 41.4)
40	41.2 (40.0- 41.8)	40.8 (40.1- 41.8)
45	41.2 (40.1- 41.9)	41.0 (40.4- 42.1)
50	41.1 (39.8- 41.9)	40.8 (40.3- 42.1)
55	41.2 (40.4- 42.2)	40.9 (40.4- 42.1)
60	41.0 (33.9- 42.0)	41.2 (40.2- 41.8)

**Tabelle 4: Abdominaltemperatur der Gruppen 3 und 4 als Median (Minimum-Maximum)**

### 4.2.3 Rektale Temperatur

Die rektalen Temperaturen in sowohl Gruppe 3 (Mitomycin C) wie auch in Gruppe 4 (Gemcitabin) zeigten durchschnittlich von Beginn der Spülung bis zum Ende bei 60 Minuten eine steigende Tendenz.

In der Mitomycin C Gruppe wurde der niedrigste Wert bei 0 Minuten mit 34.8 °C und der höchste mit 38.0 °C nach 60 Minuten gemessen. Der absolute Minimalwert der rektalen Temperatur dieser Gruppe lag bei 33.1 °C nach 15 Minuten Spülzeit. Der absolute Maximalwert für die Mitomycin C Gruppe wurde bei 30 Minuten mit einer Temperatur von 40.0 °C erreicht.

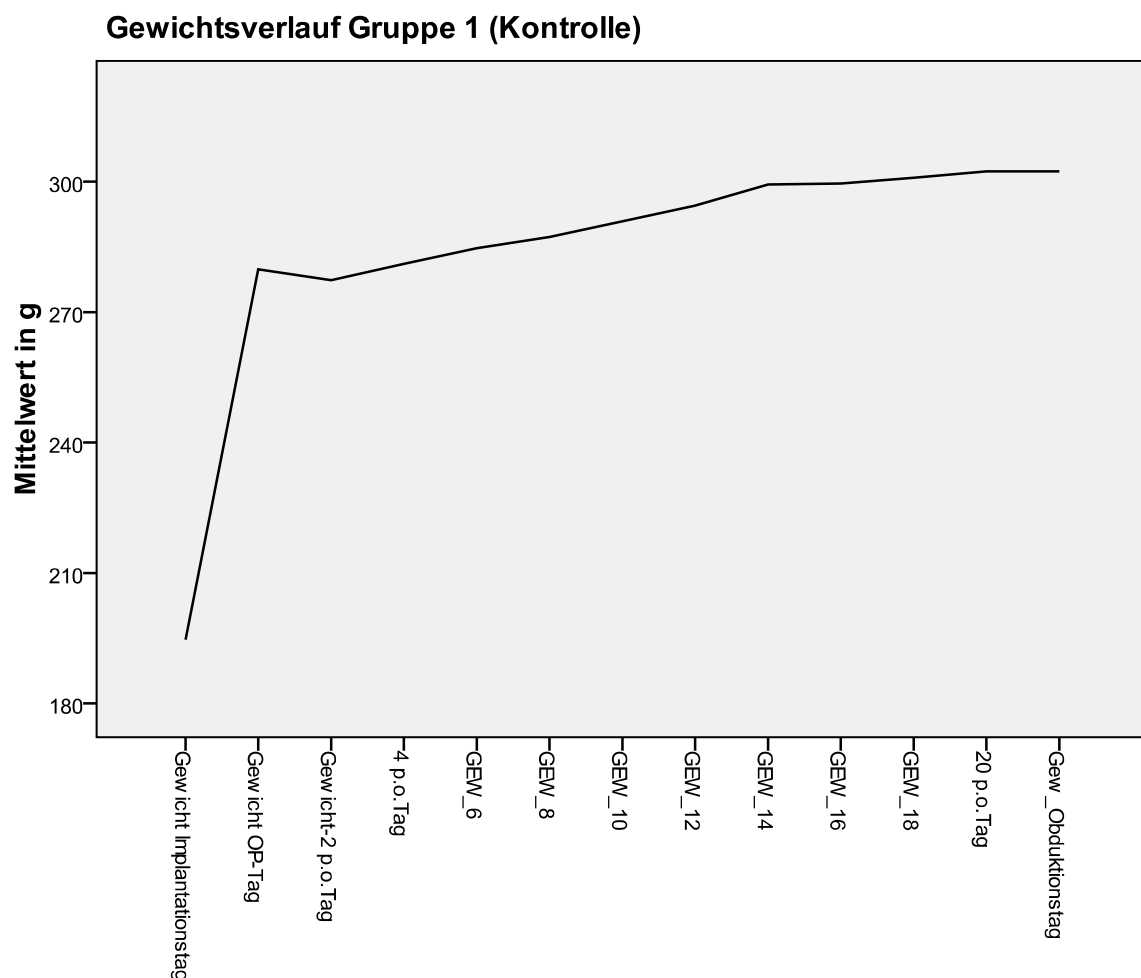
In der Gruppe 4 (Gemcitabin) wurde zu Beginn der Spülung (0 Minuten) der niedrigste durchschnittliche Wert mit 34.6 °C festgestellt. Der Anstieg erfolgte bis 36.8 °C bei 60 Minuten. Der absolute Minimalwert der rektalen Temperatur für die Spülung mit Gemcitabin war 32.8 °C bei 10 Minuten, während der absolute Maximalwert bei 60 Minuten mit einer Temperatur von 40.2 °C erreicht wurde (siehe Tabelle 5).

Zeit in Minuten	Gruppe 3 (Mitomycin C)	Gruppe 4 (Gemcitabin)
0	34.8 (33.2- 36.6)	34.6 (33.0- 36.8)
5	35.0 (32.4- 36.8)	35.0 (33.3- 36.9)
10	35.0 (33.0- 37.4)	34.9 (32.8- 37.5)
15	35.1 (33.1- 37.6)	34.9 (33.0- 38.0)
20	35.8 (33.4- 37.8)	35.1 (33.4- 38.2)
25	36.0 (33.8- 38.2)	35.4 (33.2- 38.7)
30	36.4 (34.0- 40.0)	35.7 (33.6- 38.9)
35	36.8 (34.1- 38.5)	35.8 (33.8- 38.9)
40	37.0 (34.1- 38.1)	35.6 (34.1- 39.0)
45	37.2 (33.9- 38.4)	35.6 (34.6- 39.2)
50	37.3 (33.8- 38.7)	36.0 (34.4- 39.6)
55	37.4 (33.8- 38.8)	36.5 (34.2- 39.4)
60	38.0 (33.9- 39.0)	36.8 (33.8- 40.2)

**Tabelle 5: Rektale Temperatur der Gruppen 3 und 4 als Median (Minimum-Maximum)**

#### 4.2.4 Gewichtsverlauf

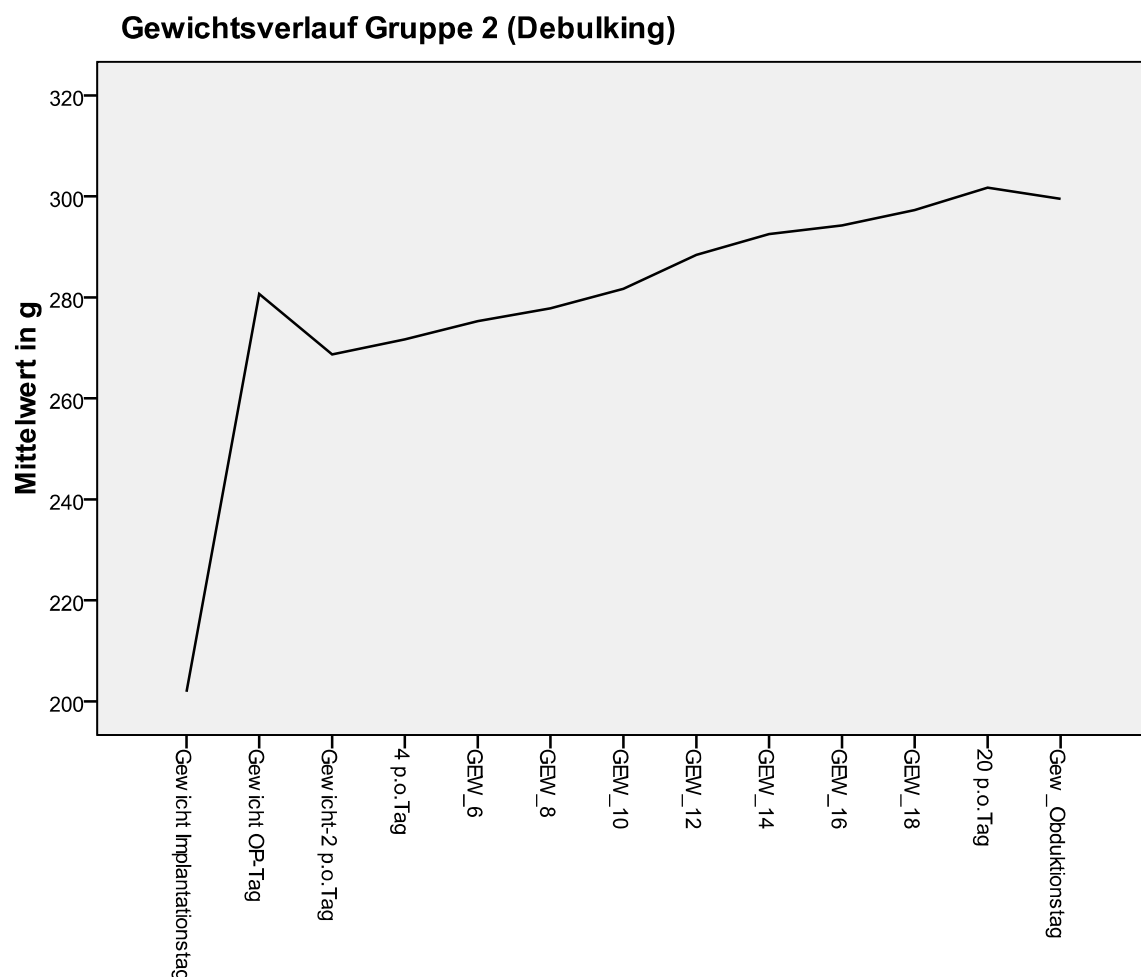
Abbildung 12 zeigt das Körpergewicht der Tiere der Kontrollgruppe im Mittelwert zu wichtigen Zeitpunkten des Versuchsablaufes. Bei Zellimplantation betrug das Gewicht etwa 200 g. Während der kommenden 21 Tage stieg das Körpergewicht der Kontrollgruppe auf etwa 280 g. In den folgenden zwei Tagen, war ein Gewichtsverlust von etwa 5 g zu beobachten. Während der darauf folgenden 12 Tage stieg das Gewicht im Mittelwert kontinuierlich auf 300 g an. Bis zum Zeitpunkt der Tötung der Tiere, und damit dem Ende des Versuches weitere 7 Tage später, zeigte der Gewichtsverlauf nur noch einen geringen Anstieg um etwa 5 g, so dass das Endgewicht der Kontrollgruppe im Mittelwert 305 g betrug.



**Abbildung 12: Gewicht der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf**

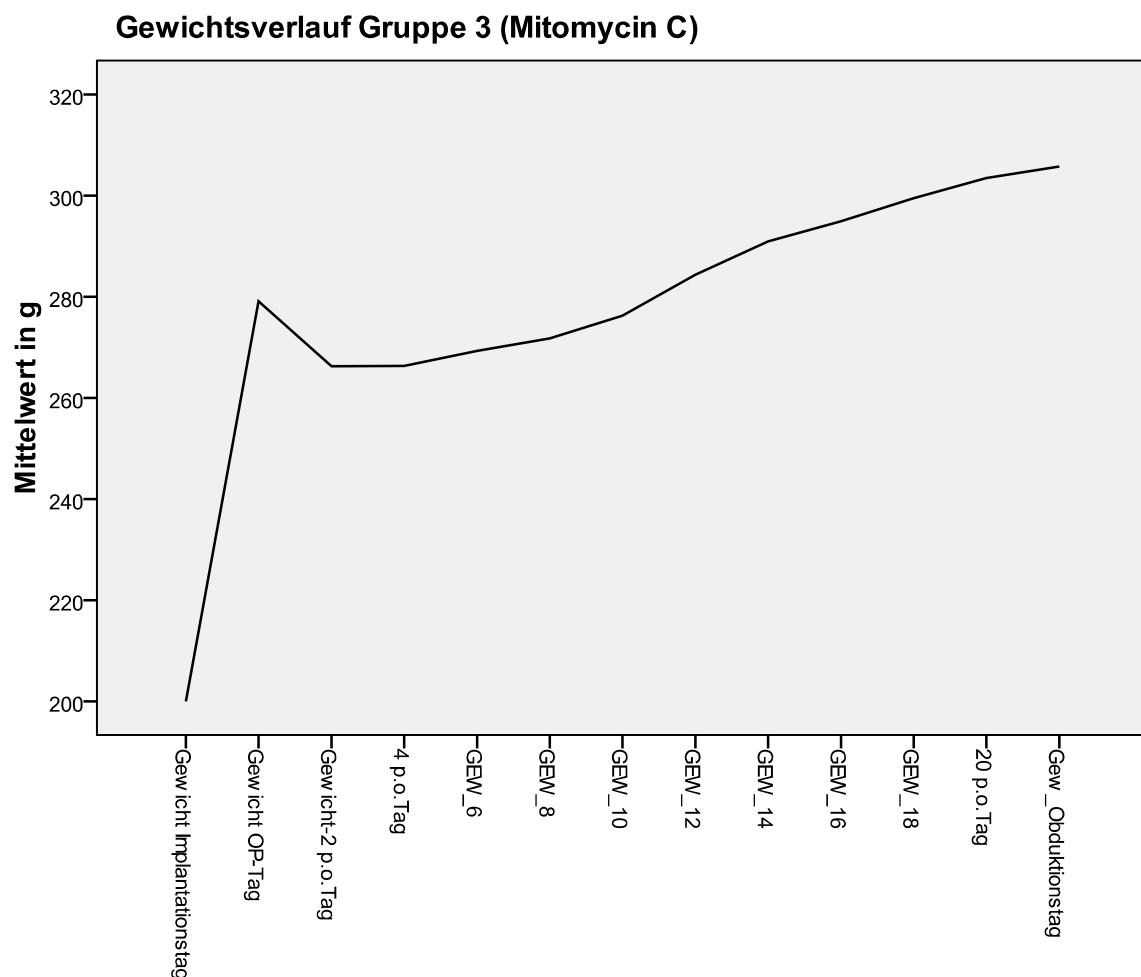


In Abbildung 13 wird der Gewichtsverlauf der Tiere der Debulking Gruppe während des Versuches dargestellt. Zum Zeitpunkt der Zellimplantation wogen die Ratten im Mittelwert etwa 200 g. Es folgte eine Zunahme des Gewichts innerhalb der folgenden 21 Tage bis zum Operationstag auf etwa 285 g. In den ersten zwei postoperativen Tagen, war ein Gewichtsverlust von etwa 20 g zu beobachten. Bis zum 20. Tag nach dem Tumordebulking stieg das Gewicht langsam kontinuierlich auf etwa 300 g an. Bei Versuchende einen Tag später hatte das Gewicht der Debulking Gruppe im Mittelwert um etwa 5 g verloren, so dass es bei etwa 295 g lag.



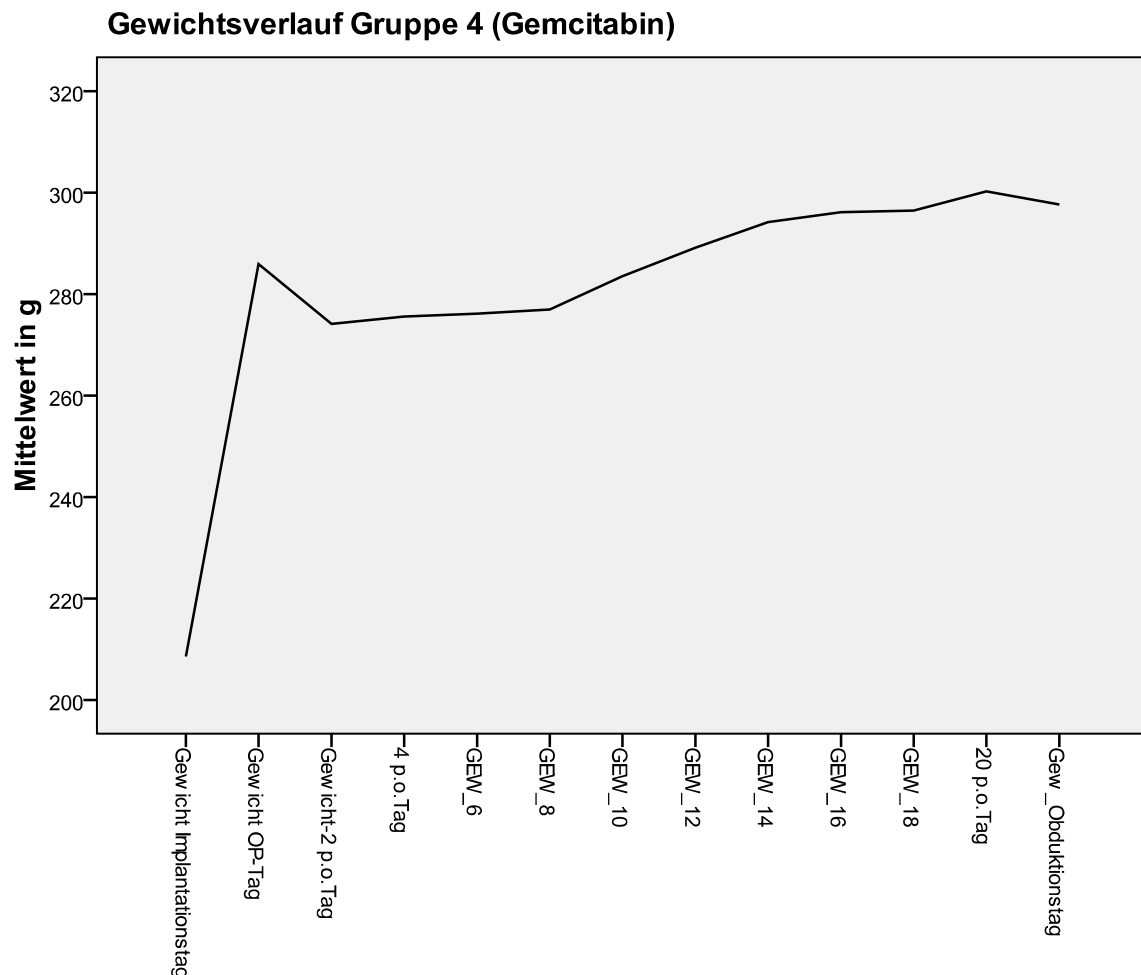
**Abbildung 13: Gewicht der Debulking Gruppe im zeitlichen Verlauf**

Abbildung 14 zeigt das Gewicht der Mitomycin C Versuchsgruppe im zeitlichen Verlauf. Bei Zellimplantation wogen die Tiere im Mittelwert etwa 200g. Am Tag des Tumordebulkings mit anschließender intraperitonealer hyperthermer Chemotherapie mit Mitomycin C war ihr Gewicht auf etwa 280 g angestiegen. Innerhalb der zwei ersten postinterventionellen Tage sank das Körpergewicht auf etwa 265 g. Bis zum vierten Tag nach Therapie war das Gewicht der Tiere im Mittel gleich bleibend. Vom vierten bis zum zehnten Tag nach Debulking und HIPEC, war eine langsame Gewichtszunahme auf 275 g zu beobachten. Bis zum Zeitpunkt der Tötung der Ratten aus der Mitomycin C Gruppe stieg das Gewicht weiter auf den Endwert von etwa 307g an.



**Abbildung 14: Gewicht der Mitomycin C Gruppe im Zeitlichen Verlauf**

In Abbildung 15 wird das Gewicht der Tiere der Gemcitabin Gruppe während des Versuchsverlaufes gezeigt. Am Tag der Zellimplantation betrug es etwa 210 g. In den darauf folgenden 21 Tagen bis zum Therapiezeitpunkt stieg es um etwa 77 g auf 287 g an. Bis zum zweiten postoperativen Tag, war ein Gewichtsverlust auf etwa 272 g zu beobachten. Vom zweiten Tag nach der multimodalen Therapie mit Gemcitabin bis zum achten Tag danach wurde im Mittel nur eine sehr geringe Gewichtszunahme um etwa 3 g gemessen. Bis zum 20. postinterventionellen Tag erfolgte eine Gewichtszunahme auf etwa 300g. Am Tag der Tötung war zum Vortag im Mittel ein Gewichtsverlust der Gemcitabin Versuchsgruppe von etwa 3 g zu beobachten, so dass der Endwert bei etwa 297 g lag.



**Abbildung 15: Gewicht der Gemcitabin Gruppe im zeitlichen Verlauf**

### 4.3 Auswertung der Tumorlast

#### 4.3.1 Der experimentelle Peritonealkarzinose Index

Zur objektiven Quantifizierung der Tumorlast wurde der experimentelle Peritonealkarzinose Index (ePCI) für jede Versuchsgruppe erhoben.

Innerhalb der einzelnen Gruppen wurden in der Obduktion der Tiere signifikant unterschiedliche Tumorindices, also unterschiedliche Ausprägungen an Tumorlast, nachgewiesen ( $p= 0.003$ ).

Den höchsten Tumorindex wies die Kontrollgruppe (Gruppe 1) mit einem ePCI von 18 (8- 20) auf (siehe Tabelle 6). Die Tumorlast konnte durch die alleinige zytoreduktive Therapie signifikant verringert werden ( $p= 0.02$ , siehe Abb. 16). In Gruppe 2 (Debulking) betrug der ePCI nur 9 (0-20) (siehe Tabelle 6).

Durch die zusätzliche hypertherme intraperitoneale Spülung mit Mitomycin C konnte zum einen eine signifikante Verringerung der Tumorlast im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden ( $p= 0$ , siehe Abb. 11). Zum anderen wurde eine signifikant größere Tumorreduktion, als durch das Tumordebulking allein erzielt ( $p= 0.02$ , siehe Abb. 16). Durch die multimodale Therapie mit Mitomycin C wurde innerhalb dieser Gruppe der niedrigste ePCI von 4 (0-14) erreicht (siehe Tabelle 6).

Die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie mit Gemcitabin angeschlossen an eine Zytoreduktion verringerte die Tumorlast im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ( $p= 0.03$ , siehe Abb. 16). Es konnte jedoch keine weitere Verringerung der Tumorlast im Vergleich zum alleinigen Tumordebulking (Gruppe 2) gezeigt werden ( $p= 0.5$ , siehe Abb. 11). Der ePCI in der Versuchsgruppe 4 (Gemitabin) betrug 7.5 (0- 20) (siehe Tabelle 6).

Bei der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie mit Gemcitabin konnte keine signifikant größere Reduktion der Tumorlast im Vergleich zu der mit Mitomycin C anhand des ePCI gezeigt werden ( $p= 0.1$ , siehe Abb. 16).

### 4.3.2 Die Tumorknotenanzahl

Anhand der Tumorknoten wurde ebenfalls gezeigt, dass sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Tumorlast zum Zeitpunkt der Obduktion zwischen den einzelnen Therapiegruppen feststellen ließ ( $p= 0.02$ ).

Die höchste Tumorknotenanzahl von 120 (14.5- 120) (siehe Tabelle 6) wurde in der Kontrollgruppe gezählt.

Durch eine alleinige Zytoreduktion konnte in Bezug auf die Tumorknotenanzahl keine signifikante Verbesserung zur Kontrollgruppe geschaffen werden ( $p= 0.07$ , siehe Abb. 17). Lediglich durch die zusätzliche hypertherme intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C wurde die Tumorknotenanzahl signifikant auf 16 (0- 112) (siehe Tabelle 6) sowohl gegenüber der Kontrolle ( $p= 0.001$ , siehe Abb. 17), als auch gegenüber dem reinen Tumordebulking ( $p= 0.04$ , siehe Abb. 17) gesenkt.

Durch die Spülung mit Gemcitabin wurde keine signifikante Reduktion der Tumorknotenanzahl erreicht, weder gegenüber der Kontrollgruppe ( $p= 0.09$ , siehe Abb. 17), noch gegenüber der alleinigen Zytoreduktion ( $p= 0.8$ , siehe Abb. 17). Auch wenn die Mitomycin C Gruppe im Bezug auf die Tumorknotenanzahl als einzige die Tumorlast signifikant reduzieren konnte, lässt sich jedoch keine signifikant größere Reduktion im Vergleich zur Gemcitabin Gruppe nachweisen ( $p= 0.1$ , siehe Abb. 17).

### 4.3.3 Die Tumormasse

Auch in Bezug auf die Tumormasse konnten durch die Obduktion der Tiere signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bei der entstandenen Tumorlast festgestellt werden ( $p= 0.02$ ).

In der Kontrollgruppe zeigte sich die größte Tumormasse mit 6.4 g (0.6- 23.5) (siehe Tabelle 6). Es konnte durch ein Tumordebulking eine dauerhaft signifikante Reduktion der Tumormasse erreicht werden ( $p= 0.05$ , siehe Abb. 18). Die berechnete Tumormasse der Versuchsgruppe 2 (Debulking) lag bei 1.4 g (0- 21.5) (siehe Tabelle 6). Auch die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie zeigte sowohl mit Mitomycin

C ( $p= 0.002$ , siehe Abb. 18) als auch mit Gemcitabin ( $p= 0.02$ , siehe Abb. 18) eine signifikante Verringerung an Tumormasse gegenüber der Kontrollgruppe. Es konnte jedoch durch die intraperitonealen Spülungen mit Gemcitabin ( $p= 0.6$ , siehe Abb. 18) und Mitomycin C ( $p= 0.1$ , siehe Abb. 18) zusätzlich zur rein zytoreduktiven Therapie keine weitere signifikante Tumormassenreduktion stattfinden. Auch der Vergleich zwischen den beiden multimodalen Therapiewegen untereinander erbrachte für keinen Ansatz eine signifikant größere Verringerung der Tumormasse ( $p= 0.2$ , siehe Abb. 18). Insgesamt wurde bei der mit Mitomycin C behandelten Therapiegruppe die niedrigste Tumormasse mit 0.4 g (0- 10.8) beobachtet (siehe Tabelle 6). Die Tumormasse der Gruppe 4 (Gemcitabin) lag bei 1.5 g (0- 13.3) (siehe Tabelle 6).

	Gruppe 1 (Kontrolle)	Gruppe 2 (Debulking)	Gruppe 3 (Mitomycin C)	Gruppe 4 (Gemcitabin)
ePCI	18 (8- 20)	9 (0- 20)	4 (0- 14)	7.5 (0- 20)
Tumorknoten- anzahl gesamt	120 (14.5- 120)	41.5 (0- 120)	16 (0- 112)	47 (0- 120)
Tumormasse gesamt (g)	6.4 (0.6- 23.5)	1.4 (0- 21.5)	0.4 (0- 10.8)	1.5 (0- 13.3)

**Tabelle 6: Ergebnisse von ePCI, Tumorknotenanzahl, Tumormasse für jede Versuchsgruppe als Median (Minimum- Maximum)**

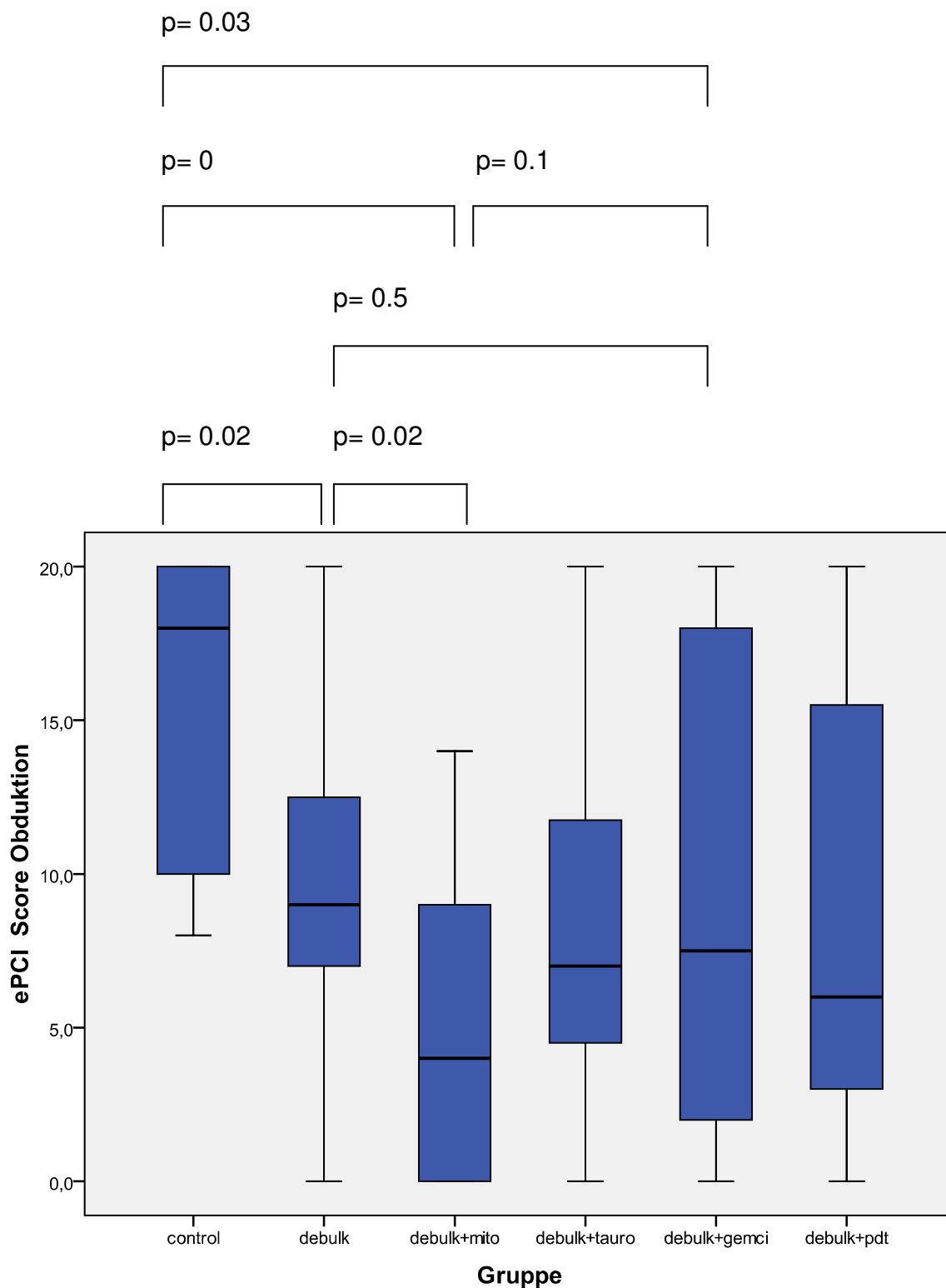


Abbildung 16: Der ePCI Score zum Zeitpunkt der Obduktion

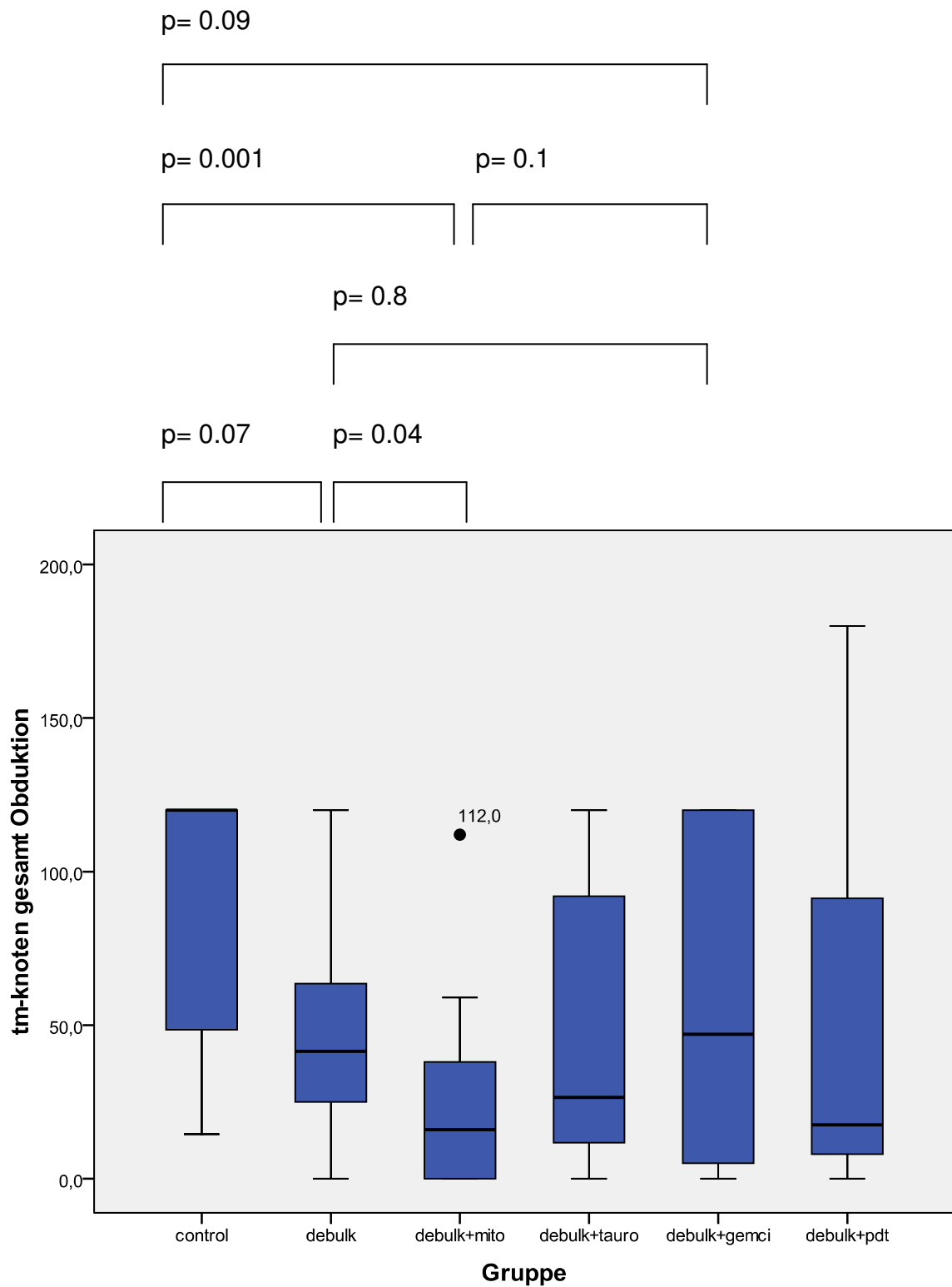


Abbildung 17: Die Tumorknotenanzahl zum Zeitpunkt der Obduktion



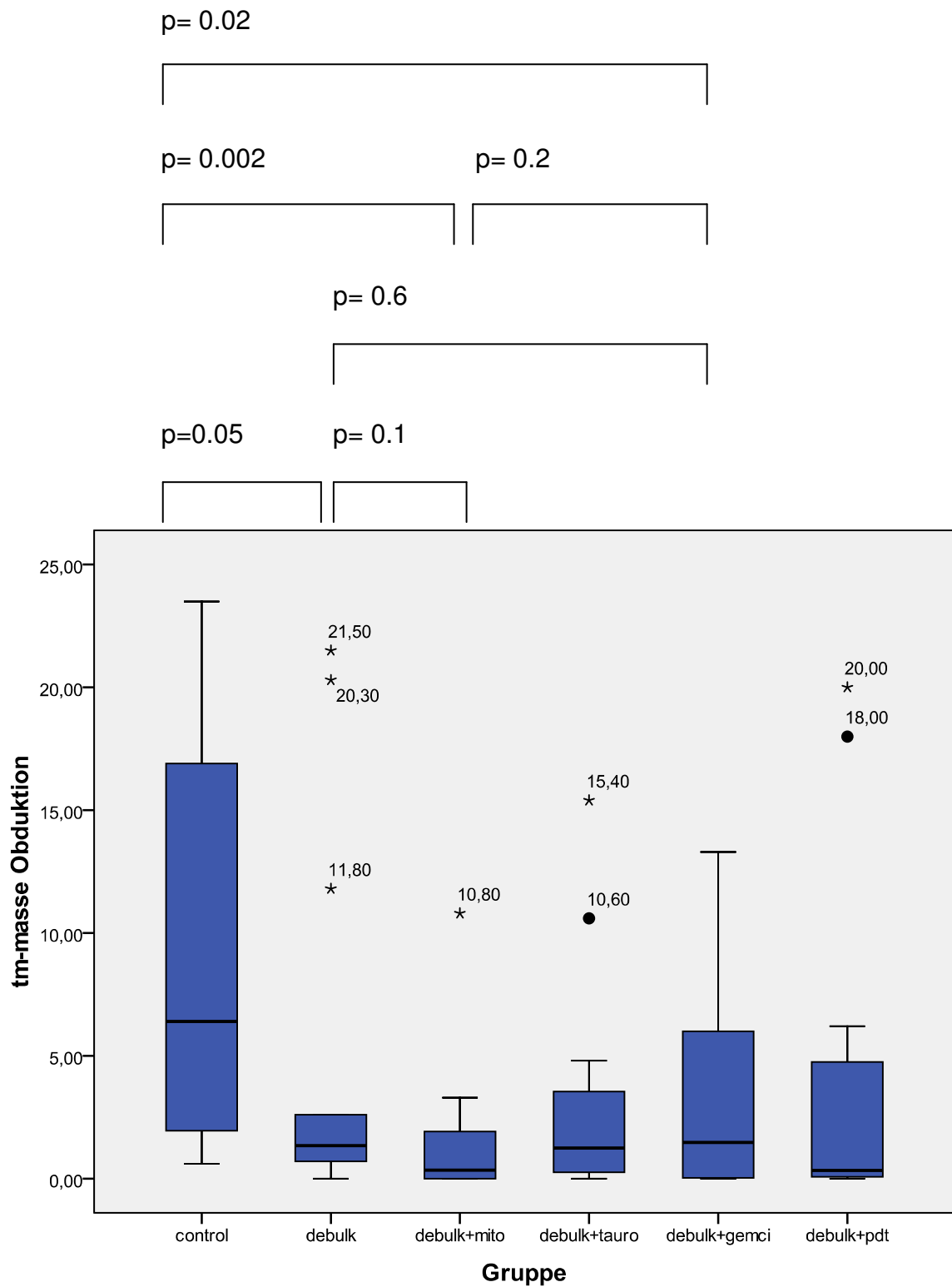


Abbildung 18: Die Tumormasse zum Zeitpunkt der Obduktion

#### 4.4 Aszites

Zur weiteren Quantifizierung der Tumorlast wurde das Vorhandensein von Aszites bestimmt (siehe Tabelle 7).

In jeder der Versuchsgruppen befanden sich Tiere mit Aszites, aber auch welche, die keinen aufwiesen.

In der Kontrollgruppe befanden sich die meisten Tiere mit Aszites ( $n= 9 = 60\%$ ) (siehe Abb. 19) Am geringsten war der Aszites in der Mitomycin C Gruppe ausgeprägt ( $n= 2 = 15.4\%$ ) (siehe Abb. 21). In der Gemcitabin Gruppe wurde bei gleich vielen Tieren sowohl Aszites festgestellt, als auch keiner gesehen ( $n= 7 = 50\%$ ) (siehe Abb. 22). In der rein operativ behandelten Gruppe (Debulking) zeigte sich weniger Aszites, als in der Kontrollgruppe, jedoch mehr als in den beiden Gruppen mit zusätzlicher hyperthermer intraperitonealer Spülung ( $n= 8 = 57.1\%$ ) (siehe Abb. 20).

	Gruppe 1 (Kontrolle)	Gruppe 2 (Debulking)	Gruppe 3 (Mitomycin C)	Gruppe 4 (Gemcitabin)
Aszites ja	$n= 9= 60\%$	$n= 8= 57,1\%$	$n= 2= 15,4\%$	$n= 7= 50\%$
Aszites nein	$n= 6= 40\%$	$n= 6= 42,9\%$	$n= 11= 84,6\%$	$n= 7= 50\%$

**Tabelle 7: Vorkommen von Aszites innerhalb jeder Versuchsgruppe**

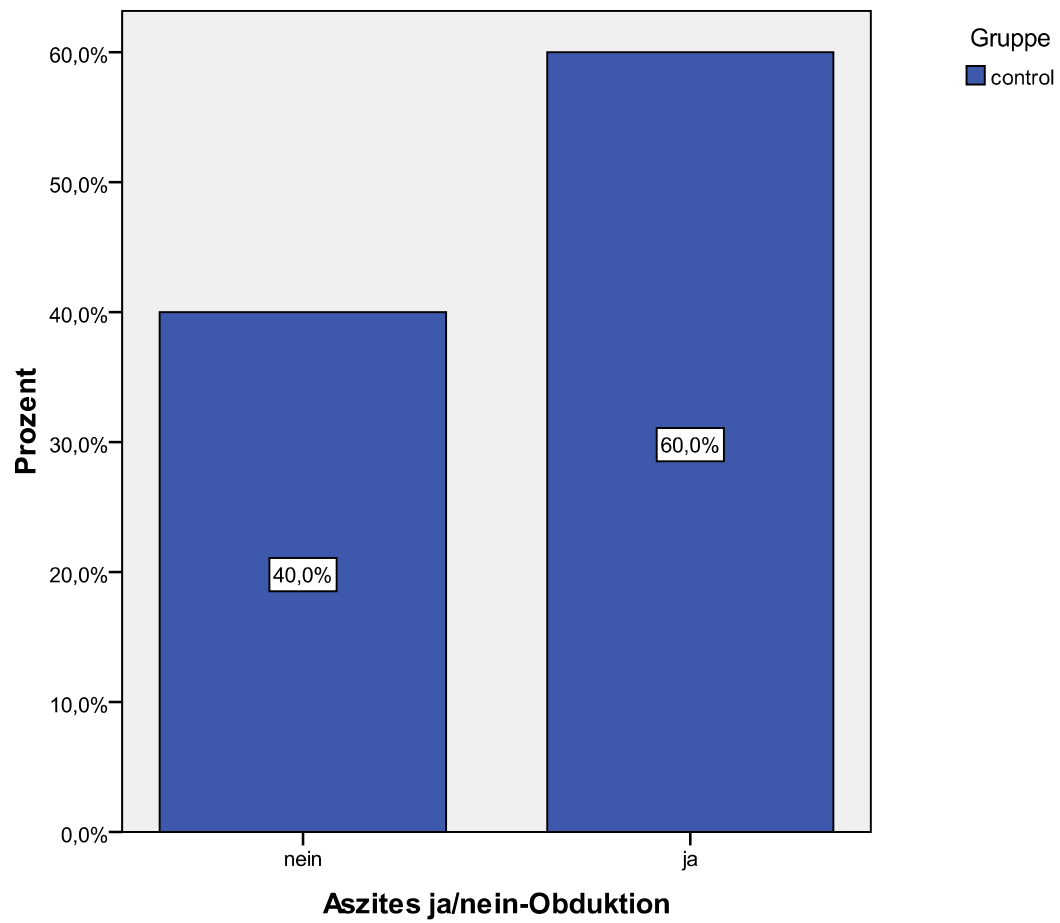


Abbildung 19: Aszites in der Kontrollgruppe

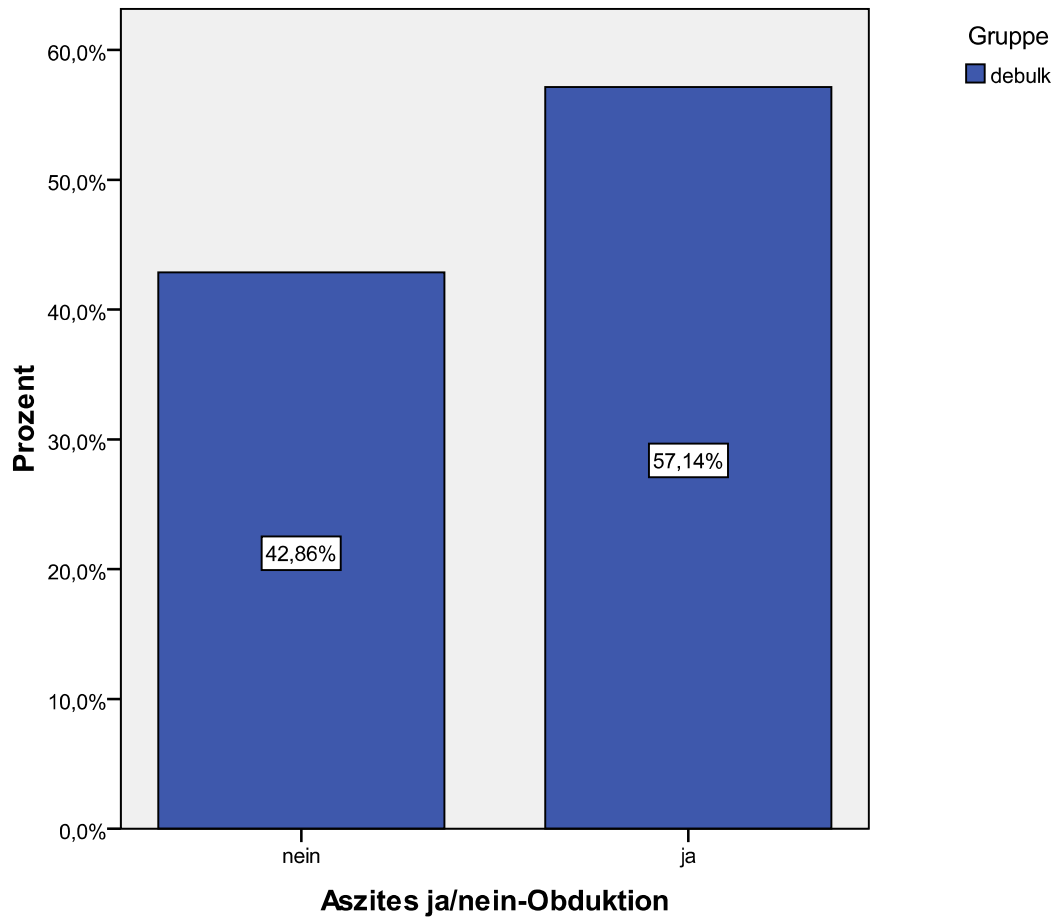


Abbildung 20: Aszites in der Debulking Gruppe

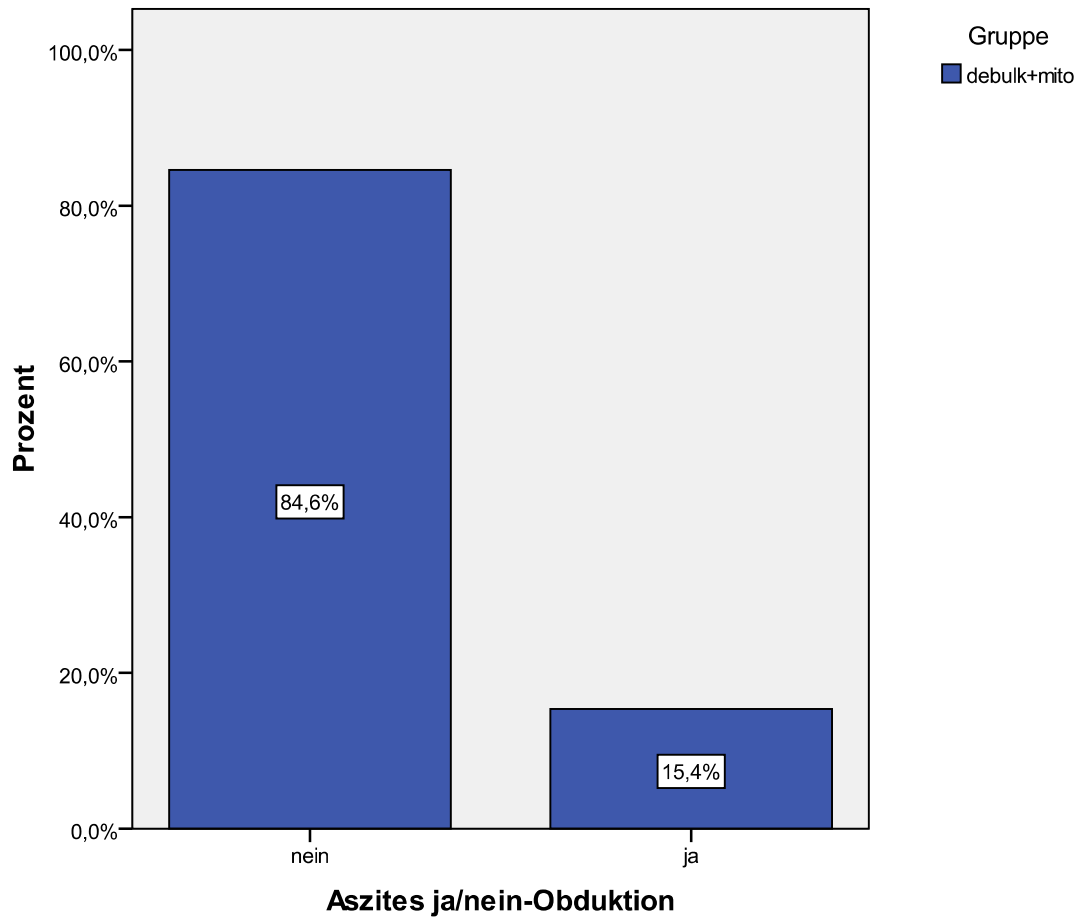


Abbildung 21: Aszites in der Mitomycin C Gruppe

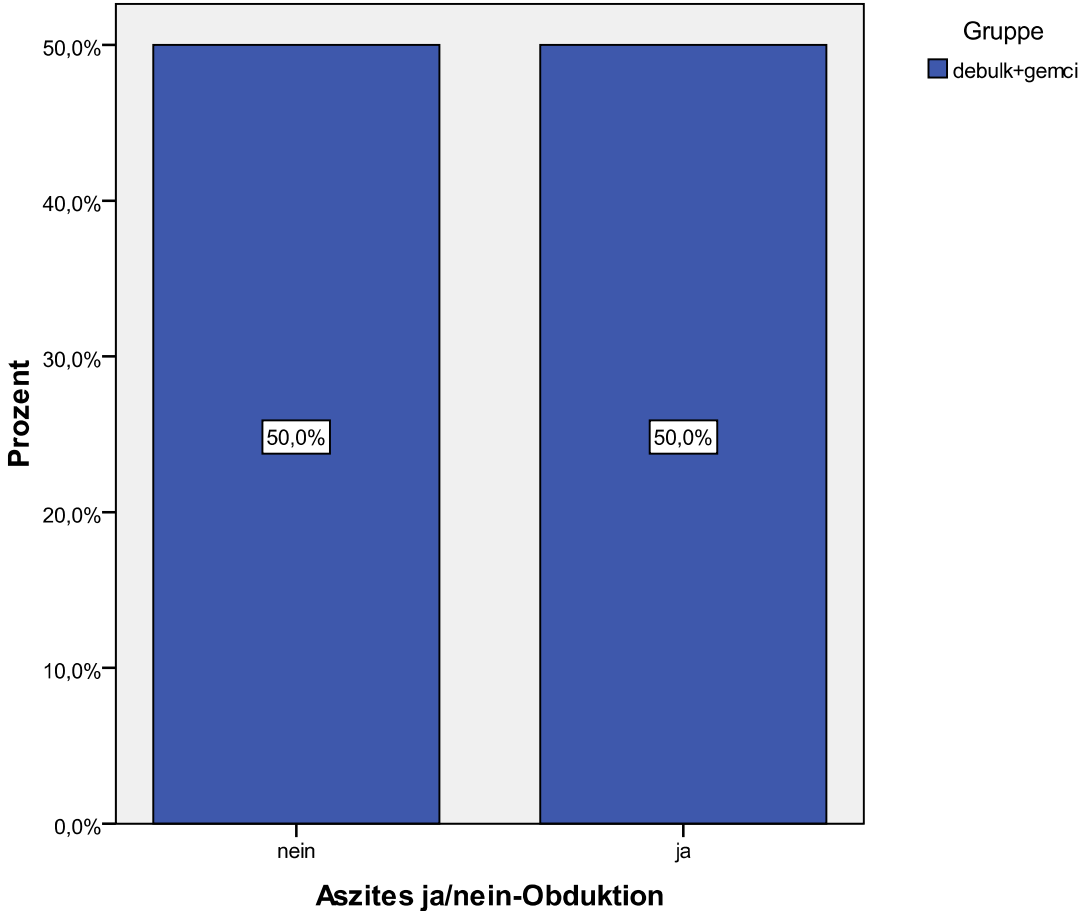


Abbildung 22: Aszites in der Gemcitabin Gruppe

## 5. Diskussion

Während in Deutschland die Mortalität der kolorektalen Karzinome innerhalb der vergangenen 20 Jahre geringfügig gesenkt werden konnte, stieg jedoch die Zahl der Neuerkrankungen um 40 %. Jedes Jahr werden etwa 70.000 Fälle mit Karzinomen kolorektalen Ursprungs allein in Deutschland diagnostiziert. Von diesen Patienten wiesen bereits 10% zum Zeitpunkt der Primärdiagnose eine Peritonealkarzinose auf [88]. 25% der Fälle zeigen im weiteren Verlauf keinen Anhalt für eine Metastasierung des Primärtumors, während andere 25% eine Peritonealkarzinose entwickeln [4, 89]. Die chirurgische Resektion gilt für Patienten mit Kolonkarzinomen mit kurativem Therapieansatz immer als Mittel der Wahl, da sie die Möglichkeit der Tumorfreiheit, in jedem Fall aber ein adäquates Staging bietet, um eventuell anschließende adjuvante intravenöse Chemotherapien einleiten zu können. In den vergangenen Jahren haben sich die Therapieoptionen für nicht resektable, bereits metastasierte Kolonkarzinome signifikant verbessert. So zeigt ein Review zu Stadium IV kolorektalen Karzinomen ein Überleben von > 20 Monaten unter intravenöser Chemotherapie in Kombination mit Biologika [90].

Das Auftreten einer Peritonealkarzinose sowie eines lokalen Rezidivs im operierten Tumorbett stellen in der Chirurgie gastrointestinaler Tumoren noch immer ein weit reichendes, in Teilen ungelöstes Problem dar. Die Prognose gilt für den Patienten bei einer mittleren Überlebenszeit von 6 Monaten unter palliativer Therapie als infaust, gleich ob die peritoneale Aussaat ihren Ursprung in einem Pankreas-, Magen- oder Kolonkarzinom hatte [3]. Das zentrale Problem der operativen Therapie liegt in dem rapiden Auftreten der Peritonealkarzinose nach erfolgreicher R0- Resektion solider gastrointestinaler Tumoren. Die Gründe dafür beschreibt Sugarbaker mit seiner „Tumorcell entrapment hypothesis“ [20]. Zum anderen liegen sie auch bei den bereits fortgeschrittenen Karzinomen, die schnell die Serosa dünnwandiger Organe penetrieren und direkt angrenzendes Peritoneum infiltrieren.

Seit 1990 hat vor diesen Hintergründen Sugarbaker sein multimodales Therapiekonzept aus zytoreduktiver Therapie und hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie vorgestellt [78]. Seitdem wurde in zahlreichen amerikanischen und europäischen Zentren mit Spezialisierung auf die Behandlung und Prävention der

Peritonealkarzinose durch gastrointestinale Tumoren nachhaltig an dessen Optimierung gearbeitet. Chirurgische Techniken, die Peritonektomie Prozeduren beinhalten, sowie die Durchführung von intraperitonealer hyperthermer Chemotherapie sollten standardisiert werden. Es mussten eindeutige Selektionskriterien für Patienten, die für ein solches Verfahren in Frage kommen, geschaffen werden, um die Erfolgchancen der Therapien zu verbessern. Des Weiteren bestand die Notwendigkeit die Wirksamkeiten und Nebenwirkungen der verschiedenen eingesetzten Medikamente zu analysieren, um einem einheitlicheren chemotherapeutischen Protokoll näher zu kommen.

In vielen innerhalb der vergangenen Jahre veröffentlichten Studien konnte ein positiver Einfluss des multimodalen Therapieansatzes gezeigt werden. Durch Horsell et al. [91] konnte bei Patienten mit bestehender Peritonealkarzinose bei Kolon- oder Appendixkarzinomen durch Peritonektomie mit anschließender intraperitonealer Chemotherapie mit Mitomycin C und 5- FU (Mitomycin C: 10 mg/m<sup>2</sup> + 5- FU: 15 mg/kg) eine mediane Überlebenszeit von 14,5 Monaten erreicht werden. 2003 wurde eine niederländische randomisierte Kontrollstudie veröffentlicht, in der die operative Therapie in Kombination mit intravenöser Chemotherapie mit dem neuen Therapieansatz der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie verglichen wurde [53]. Die Ergebnisse fielen dabei signifikant zu Gunsten der intraperitonealen Applikationsform aus. Achtundzwanzig internationale Behandlungszentren mit Spezialisierung auf intraperitoneale Chemohyperthermie zeigten 2004 in einer multiinstitutionellen Studie eine mediane Überlebenszeit von 19 Monaten bei einer 3-Jahres-Überlebensrate von 39% für 506 Patienten mit Peritonealkarzinose kolorektalen Ursprungs [55]. In einer randomisiert durchgeführten Studie von Scheithauer et al. [92] wurden 241 Patienten mit Stadium III Kolonkarzinomen postoperativ mit einer Kombination aus Leucovorin und 5- FU therapiert. Man fand weniger Tumorrezidive in der Gruppe, die sowohl eine intraperitoneale wie auch eine intravenöse Chemotherapie erhalten hatte, als bei Patienten, bei denen eine alleinige intravenöse Behandlung durchgeführt wurde. Auch für eine Peritonealkarzinose mit Ausgang von anderen gastrointestinalen Tumoren konnten Ergebnisse, die dieser Richtung folgten, erbracht werden. So führten Yu et al. [93] eine postoperative adjuvante intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C gefolgt von 5- FU bei Patienten mit Stadium III Magenkarzinomen durch. Eine signifikant verlängerte Überlebenszeit konnte gegenüber der alleinigen chirurgischen Therapie erzielt



werden. Sugarbaker et al. [94] behandelten fortgeschrittene Stadium IV Magenkarzinome mit einer neoadjuvanten intraperitonealen Chemotherapie mit Mitomycin C (10 mg/m<sup>2</sup>) und Cisplatin (75 mg/m<sup>2</sup>). Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Medikation intravenös. In der Behandlungsgruppe lagen die potenziell kurablen Fälle mit 38% höher als in der Kontrollgruppe mit 15%. In Fällen eines resektablen Magenkarzinoms mit Peritonealkarzinose wurde durch Sugarbaker eine postoperative intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C und 5-FU durchgeführt. Bei Erreichen einer makroskopisch kompletten Tumorentfernung, konnte ein verlängertes Überleben nachgewiesen werden. Dies zeigt wiederum gleichzeitig, dass die wichtigste Voraussetzung für ein positives Outcome die R0- bzw. R1- Resektion ist. Für eine peritoneale Metastasierung ausgehend von einem Appendixkarzinom fand Sugarbaker [95] innerhalb einer Studie mit 385 Patienten sogar eine 5-Jahres-Überlebensrate von 86%, nach einer sich an ein Tumordebulking anschließenden perioperativen intraperitonealen Chemotherapie.

Allerdings zeigen auch einige Studien zur Peritonealkarzinose durch das Magenkarzinom gegensätzliche Ergebnisse für die intraperitoneale Chemotherapie [96-98]. Fass et al. [99] führten eine intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Mitomycin C beim fortgeschrittenen Magenkarzinom durch. Es ergab sich jedoch kein Überlebensvorteil gegenüber einer Patientengruppe, die eine alleinige operative Therapie erhalten hatten. Die Studie musste sogar aufgrund von erhöhter Mortalität innerhalb der Therapiegruppe vorzeitig abgebrochen werden.

In einer europäischen multizentrischen prospektiven Studie wurden prä-, peri- und postoperative Ergebnisse von 370 Patienten mit Peritonealkarzinose nicht gynäkologischen Ursprungs zusammengetragen [4]. Eine mediane Überlebenszeit von nur 3,1 Monaten konnte gezeigt werden. Ein für das Überleben ausschlaggebender Faktor war dabei der Primärtumor, von dem die peritonealen Metastasen ihren Ausgang genommen hatten. So wurde innerhalb dieser so genannten EVOCAPE 1 Studie für 58 Patienten mit Pankreaskarzinom eine Überlebenszeit von 2,1 Monaten festgestellt. Während sie für 125 Patienten mit primärem Magenkarzinom bei 3,1 Monaten lag. Eine bessere Überlebenszeit konnte für die 118 Patienten der Studie mit kolorektalem Karzinom mit 5,2 Monaten gezeigt werden. Das Überleben des einzelnen Patienten war jedoch stark abhängig vom Tumorstadium, und somit der Möglichkeit der vollständigen Resektion, sowie dem Vorhandensein von Aszites. Für die Stadien 0, I und II lag die mediane

Überlebenszeit zwischen 5 und 10 Monaten, während sie bei Stadium III und IV nur zwischen 2,0 und 3,9 Monaten betrug.

In der Therapie der Peritonealkarzinose werden verschiedene Medikamente eingesetzt. Als Standard Therapeutikum gilt zur derzeitigen Studienlage Mitomycin C [100]. Es werden aber auch Kombinationen mit 5- FU, Cisplatin oder Oxaliplatin verwandt. Unterschiede bestehen auch in den Zeitpunkten der Applikation. So gibt es die direkt intraoperative, die so genannte perioperative, wenige Tage nach der Zytoreduktion, und die späte postoperative Chemotherapie. 2004 haben Hribaschek et al. eine tierexperimentelle Studie zu fünf häufig eingesetzten Therapeutika veröffentlicht [50]. Bei WAG/RIJ Ratten wurde mittels Injektion von CC-531 Adenokarzinomzellen eine Peritonealkarzinose induziert. Es erfolgte die intraperitoneale Applikation von entweder Mitomycin C, 5- FU, Cisplatin, Oxaliplatin oder CPT- 11 zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten. Sie konnten bei intraoperativer Spülung eine gute Wirksamkeit von Cisplatin und Mitomycin C zeigen. Hierbei war jedoch die Rate an Nebenwirkungen hoch. In der frühen postoperativen Therapie hatten sowohl Mitomycin C als auch Cisplatin keinen signifikanten Einfluss. Die Medikamente 5- FU, CPT- 11 und Oxaliplatin zeigten zu diesem Zeitpunkt hingegen eine hohe Effektivität und konnten die Tumorzellaussaat signifikant reduzieren. Die späte postoperative Chemotherapie sollte zeigen, ob die eingesetzten Substanzen einen therapeutisch wirksamen Effekt auf eine bereits etablierte Peritonealkarzinose haben könnten. Keine der verwendeten Medikamente konnte das Tumorgewicht signifikant senken. Dies ist auf die limitierte Eindringtiefe der Chemotherapeutika zurückzuführen, wodurch die Wichtigkeit der vorausgehenden zytoreduktiven Therapie im multimodalen Therapieansatz bekräftigt wird. Die Tumorlast kann so operativ reduziert werden, so dass die Substanzen zum einen nur noch auf einen Residualtumor, oder im besten Fall, auf einzelne freie Tumorzellen wirken können. Außerdem kann die Spüllösung auch noch an Bereichen des Peritoneums wirken, die zuvor durch größere Tumormassen verlegt gewesen wären.

Innerhalb der weltweiten Untersuchungen fielen die Unterschiede in der Durchführung der multimodalen Therapie deutlich auf. Es bestand kein einheitliches Konzept, sowohl bei der Patientenselektion, bei Methode, Zeitpunkt und Dauer der intraperitonealen Spülungen, als auch bei der Wahl der Chemotherapeutika. Daher

fanden sich Experten aus amerikanischen und europäischen Zentren zuerst 2006, dann wiederholt 2008, zusammen, um ein einheitliches Vorgehen zu beschließen [101, 102]. Es wurde ein klinischer Ablauf festgelegt, der best mögliche Ergebnisse sicherstellen sollte.

Sobald bei einem Patienten die Diagnose Peritonealkarzinose gestellt wurde, sollte als Basis des weiteren Verlaufs eine umfangreiche diagnostische Bildgebung stattfinden. Dazu zählen ein CT mit Kontrastmittel von Thorax, Abdomen und Becken, um das Ausmaß der peritonealen Beteiligung und eventuelle extraabdominelle Herde detektieren zu können. Außerdem sollte eine hohe Koloskopie durchgeführt werden. Für Fälle, in denen sich so noch weitere Herde mit extraabdomineller Lokalisation zeigten, sollte die best mögliche Kombination aus intravenöser Chemotherapie und Biologika eingesetzt werden. Bei gutem Ansprechen kann im Verlauf ein Tumordebulking mit anschließender intraperitonealer hyperthermer Chemotherapie erwogen werden. Patienten, deren Tumorausbreitung sich auf das Peritoneum beschränkt, müssen für jede weitere Behandlung unbedingt in ein Zentrum für Peritonealkarzinose überwiesen werden. Dort werden sie zunächst einer operativen Therapie zugeführt, die Peritonektomie Prozeduren nach Sugarbaker [78] beinhaltet. Im Falle einer makroskopisch kompletten Tumorresektion (R0 oder R1, bzw. CC- 0 oder CC- 1) wird eine intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Mitomycin C (15- 35 mg/m<sup>2</sup>) bei intraperitonealen Temperaturen von 39- 42 °C für 60- 120 Minuten durchgeführt. Dabei kann vom Operateur individuell entschieden werden, ob eine offene oder geschlossene Technik angewandt wird. Ebenso unterliegt eine frühe postoperative intraperitoneale Applikation von 5- FU für fünf Tage individuellen Erwägungen. Bei Vorhandensein von symptomatischem Aszites und bei unvollständiger Tumorresektion (R2 und höher, bzw. CC- 2 und höher) kann eine intraperitoneale Chemotherapie für individuelle Fälle in palliativer Intention eingesetzt werden. Im weiteren Verlauf sollte jeder Patient außerdem noch eine intravenöse Chemotherapie erhalten. Die Unterzeichnung durch zahlreiche führende Behandlungszentren aus dem amerikanischen und europäischen Raum dieser gemeinsam festgelegten Leitlinie für die Therapie der Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom bildete eine wichtige Grundlage für weiterführende Erkenntnisse auf diesem Gebiet. So konnte für jeden Patienten die best mögliche Behandlung zum derzeitigen

Forschungsstandpunkt innerhalb der großen Behandlungszentren gewährleistet werden.

Neben den voranschreitenden klinischen Erfahrungen und der wachsenden Bedeutung von zytoreduktiver Therapie mit nachfolgender hyperthermer intraperitonealer Chemotherapie existiert auf dem Gebiet der tierexperimentellen Grundlagenforschung zu diesem Thema bis zum aktuellen Zeitpunkt nur eine limitierte Anzahl an Studien. In diesem Versuch konnte ein durchführbares Tiermodell für multimodale Therapieansätze der Peritonealkarzinose vorgestellt werden. Dabei konnten zum ersten Mal die derzeitigen Standardtherapien mit neuen interventionellen Ansätzen verglichen werden. Das in diesem Versuch verwendete Rattenmodell basiert auf den Erfahrungen der Studiengruppe um Prof. Dr. Jacobi [80-82]. Das durch ihn an unserem Institut etablierte Verfahren der peritonealen Tumorinduktion bei der Ratte wurde analog erfolgreich durchgeführt. Wie auch durch Pelz et al. [103] beschrieben, erfolgte bei jedem Tier nach Laparotomie die Zellinjektion subperitoneal in den oberen rechten Quadranten. Nach 21 Tagen konnten wir bei 98% der Tiere ein Tumorwachstum feststellen. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von dem von Pelz et al. [103], der eine Tumorinduktionsrate von 100% beschreibt. Durch Los et al. [104] konnte ein Tumorwachstum in nur 80% der Fälle erreicht werden. Das fehlende makroskopische Tumorwachstum bei 2% unserer Kleintiere kann möglicher Weise auf eine abweichende Implantationsweise oder aber auf die Zellaufbereitung zurückgeführt werden.

Obwohl bei der Implantation der Tumorzellen streng auf die jeweils exakt gleiche Durchführung geachtet wurde, wies die Anzahl an Tumorknoten eine hohe Bandbreite auf. Dies spiegelte ebenfalls die die Spannweite des ePCI wieder. Beobachtungen dieser Art weist die Literatur bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht auf.

Sieben Tiere starben vor der geplanten Beendigung des Versuches. Dies entspricht einer Mortalität von 8%. Die Ursachen dafür lagen jedoch nicht in den an die zytoreduktive Therapie angeschlossenen Prozeduren. Ein Tier verstarb aufgrund von Komplikationen innerhalb der Narkose. Intraoperative, sowie postoperative chirurgische Komplikationen führten zum vorzeitigen Tod der anderen sechs Ratten. Bereits ein geringer Blutverlust kann bei einem kleinen Tier, wie einer Ratte, mit einem intravasalen Blutvolumen von nur ca. 6- 10 ml einen ausschlaggebenden Einfluss haben. In klinischen Studien mit vergleichbaren Therapiekonzepten finden

sich Mortalitätsraten zwischen 2% und 10% [100, 105, 106]. Daher kann die Mortalität von 8% innerhalb unseres Rattenmodells als vergleichbar angesehen werden.

Andere Komplikationen, wie vorübergehender Verlust von Appetit oder Lethargie, waren selten und von geringer Ausprägung. Als Ursachen müssten die lange Dauer des Versuches, sowie die wechselnden adjuvanten Therapieprotokolle in Betracht gezogen werden. Einen wichtigen Aspekt stellten auch die mit der Zeit zunehmende Erfahrung des Operateurs und der Lernzuwachs dar. Diese Tendenz fällt sowohl im experimentellen Tiermodell, als auch im klinischen Alltag auf [107].

Zur Beurteilung der Verträglichkeit der Therapiewege wurde unter anderem regelmäßig das Gewicht der Tiere bestimmt. Das Körpergewicht gilt als ein möglicher Parameter zur Einschätzung von Nebenwirkungen, da eine Beeinträchtigung des Tieres häufig zu einer Futterabneigung und somit einer einfach messbaren Gewichtsveränderung führen kann. Alle Tiere nahmen im Verlauf des Versuches an Gewicht zu. Lediglich nach der Therapie ist bei allen Gruppen mit Ausnahme der Kontrollgruppe ein geringer Gewichtsverlust zu bemerken gewesen. Dieser glich sich im weiteren Verlauf aber schnell wieder an. Bei der Betrachtung des Zeitraumes zwischen Therapiebeginn und Obduktion ist auffällig, dass die Tiere der Gemcitabin Gruppe eine deutlich geringere Gewichtszunahme zu verzeichnen haben, als alle anderen Gruppen. Dies kann als ein Hinweis auf eine besondere Belastung der Tiere durch die Therapie angesehen werden. Um eine statistisch eindeutige Aussage treffen zu können, muss jedoch eine größere Versuchstieranzahl pro Gruppe gewählt werden. Außerdem wiesen die Gruppen untereinander deutliche Abweichungen in ihrem Ausgangsgewicht von einander auf.

Die Erfahrungen von Sugarbaker [78] und die Leitlinie führender amerikanischer und europäischer Forschungszentren in ihrem „consensus statement“ [101, 102] weisen für Patienten mit kolorektalem Karzinom mit peritonealer Beteiligung als ersten therapeutischen Schritt das chirurgische Tumordebulking aus. Dabei sollte eine größtmögliche Entfernung allen makroskopisch sichtbaren Tumormaterials realisiert werden. Innerhalb einer Studie unseres Institutes wurde dieser Schritt in einem Rattenmodell bereits zuvor erfolgreich umgesetzt [85]. In 47.2% aller operierten Tiere konnte eine R0- Resektion erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem Resektionsstatus und sowohl der

Tumorknotenanzahl, als auch des ePCI zum Zeitpunkt der Obduktion bestand. Diese Beobachtungen finden sich ebenfalls in mehreren klinischen Studien wieder [38, 108]. Neben der Anzahl der Tumorknoten ist auch die Ausdehnung des Wachstums in chirurgisch nur schwer erreichbare Lokalisationen Wegweisend für den Resektionsstatus. Bereiche wie Hilus von Leber oder Milz, kleines oder großes Omentum und das abdominale Zwerchfell konnten im Rattenmodell chirurgisch nur teilweise erreicht werden. Auch unter Einsatz von Lupenbrillen, Mikroskopen und Mikroinstrumenten, war eine peritoneale Metastase dieser Lokalisation nicht vollständig zu resezieren.

Im Anschluss an die zytoreduktive Therapie wurde unabhängig vom Resektionsstatus und dem Vorhandensein von Aszites die Therapie fortgeführt, wie sie laut Randomisierung in die einzelnen Gruppen vorgesehen war. Das bedeutet, dass auch die Tiere, bei denen nur maximal eine R2- Resektion erreicht werden konnte, eine intraperitoneale hypertherme Chemotherapie erhielten. Da in unserem Versuch der Fokus auf der Durchführbarkeit der Therapieschritte lag, wurde von der klinischen Leitlinie der amerikanischen und europäischen Forschungszentren abgewichen [101, 102], in der Patienten mit Resektionsstadien von R2 und höher nur eine intravenöse Chemotherapie erhalten sollten. Eine intraperitoneale hypertherme Chemotherapie sollte in diesen Fällen nur als Palliativmaßnahme eingesetzt werden, da die Tumormasse zu groß für die limitierte Eindringtiefe der Medikamente wäre.

Für Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom gilt Mitomycin C in der intraperitonealen Anwendung als Standardmedikament [100]. Die in diesem Versuch eingesetzte Dosierung von 15 mg/m<sup>2</sup> Mitomycin C findet sich in anderen tierexperimentellen Studien wieder [100, 103]. Das gleiche gilt für die Technik der intraperitonealen Spülung mit einer Dauer von 60 Minuten bei einer angestrebten intraabdominellen Temperatur von maximal 42 °C [100, 103, 109]. Das Erreichen der höheren Temperatur hat einen wichtigen Einfluss auf die Wirksamkeit der intraperitonealen Chemotherapie. In unserem Versuch lag die mittlere intraabdominelle Temperatur in der Mitomycin C Gruppe bei 40,7 ± 2,0 °C. Die Gemcitabin Gruppe erreichte 41,0 ± 0,5 °C. Damit konnten die notwendigen Temperaturen für eine hypertherme Spülung erreicht werden und die Hyperthermie innerhalb unseres Rattenmodells umgesetzt werden.

Mitomycin C besitzt mit 334 Dalton ein hohes Molekulargewicht sowie einen großen Durchmesser, weshalb es lokal besonders effektiv wirksam sein kann, ohne hohe systemische Nebenwirkungen aufzuweisen. Aufgrund der 20fach höher gemessenen Exposition des Peritoneums gegenüber anderen Lokalisationen im Körper, ist es für die intraperitoneale Applikation besonders prädestiniert [110, 111]. In einem experimentellen Setting konnte 5 Minuten nach intraperitonealer Tumorzellimplantation durch intraperitoneale Spülung mit Mitomycin C mit einer Dosis von 10 mg/m<sup>2</sup> eine Tumorausbreitung komplett verhindert werden [112]. Die Effektivität von Mitomycin C in der intraperitonealen Anwendung, wurde auch in anderen tierexperimentellen Studien schon in niedrigeren Dosierungen nachgewiesen [106, 113]. Durch Einsetzen von Hyperthermie kann der zytotoxische Effekt von Mitomycin C weiter gesteigert werden. Bei Temperaturen über 39 °C wurde sowohl in der klinischen Anwendung, als auch in experimentellen Tiermodellen eine erhöhte Wirksamkeit und Eindringtiefe in das Gewebe gezeigt [114, 115]. Im klinischen Alltag wird für die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C eine Dosis von 30- 35 mg/m<sup>2</sup> eingesetzt [116]. Dies entspricht einer Konzentration, die um fast 50 % höher ist, als die, die maximal intravenös toleriert wird (20 mg/m<sup>2</sup>). Dies ist möglich, da die Absorption des Agens aus der Spüllösung durch die Hyperthermie um ca. 70 % erhöht wird [110].

Pelz et al. untersuchten die Wirkung von intraperitonealer hyperthermer Chemotherapie mit Mitomycin C auf die Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom in einem Rattenmodell [103]. Der Focus lag auf der Umsetzbarkeit der intraperitonealen hyperthermen Chemotherapie im Tiermodell. Es wurde daher auch vor der HIPEC kein Tumordebulking durchgeführt. Pelz et al. [103] verwiesen jedoch auch darauf, dass für den größtmöglichen Erfolg der HIPEC die vorangehende zytoreduktive Therapie unerlässlich ist, da die Eindringtiefe der Chemotherapeutika auch unter Hyperthermie zu begrenzt ist [64, 104]. Daher richteten sie sich bei der Tumorzellinjektion nach einer durch Veenhuizen et al. [117] beschriebenen Methode, die eine diffuse Tumorausbreitung verhindern sollte und die Situation nach einem Debulking am besten simulieren konnte. 10 Tage nach der Tumorzellimplantation wurde bei einer Gruppe eine intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C in einer Dosierung von 15 mg/m<sup>2</sup> durchgeführt. Die andere Therapiegruppe erhielt eine normotherme intraperitoneale Spülung von 10 mg/m<sup>2</sup>. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant kleinere Tumormasse in der HIPEC Gruppe

gegenüber der Kontrolle. Während die Konzentration von 10 mg/m<sup>2</sup> nicht ausreichend war, um eine Tumorreduktion zu erzielen. Im Gegensatz dazu konnten Hribaschek et al. [112] für die gleiche niedrige Dosierung von 10 mg/m<sup>2</sup> signifikante Tumorlastverringerungen zeigen. In ihrer Studie wurde allerdings nur fünf Minuten nach der Zellimplantation mit der intraperitonealen Chemotherapie begonnen. So wurde die klinische Situation der intraoperativen Tumorzeldissemination simuliert. Eine Dosis von 10 mg/m<sup>2</sup> ist also in der frühen postoperativen Anwendung bei Vorhandensein nur einzelner Tumorzellen gerade noch ausreichend, während bei späterer intraperitonealer Spülung und bei einem Resektionsstatus von R2 und größer die Konzentration mit dem besten Effekt zwischen 10 und 20 mg/m<sup>2</sup> liegt.

Die Anwendung von Gemcitabin in einem multimodalen Therapiekonzept wurde bisher noch nicht beschrieben. Allerdings konnten Ridwelski et al. signifikant positive Einflüsse von Gemcitabin auf solide intraperitoneale Malignome zeigen [51]. Daher sollte innerhalb dieses Versuches Gemcitabin als neuer Ansatz in der multimodalen Therapie der Peritonealkarzinose mit dem etablierten Verfahren mit Mitomycin C verglichen werden. Beide Therapieansätze wurden außerdem dem alleinigen Tumordebulking gegenüber gestellt.

Die Effektivität der untersuchten Therapieansätze wurde anhand der Tumorlast in jeder Gruppe bestimmt. Die Tumorlast spiegelte sich in dem ePCI, der Tumorknotenanzahl, dem Vorhandensein von Aszites und der Tumormasse wieder. In Bezug auf den ePCI konnten alle Therapiegruppen gegenüber der Kontrollgruppe die Tumorlast signifikant reduzieren. Jedoch nur die intraperitoneale hypertherme Spülung mit Mitomycin C konnte einen signifikant größeren therapeutischen Vorteil erreichen, als eine alleinige zytoreduktive Therapie. Die Anwendung von Gemcitabin erbrachte keinen zusätzlichen Benefit. In der Mitomycin C Gruppe wurde der niedrigste ePCI- Wert mit 4 (0- 14) gezählt. Auch in Bezug auf die Tumorknotenanzahl zeigte allein Mitomycin C einen zusätzlichen Effekt zum Tumordebulking. Gemcitabin und auch das alleinige Debulking konnten nicht einmal einen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe aufweisen, das heißt sie zeigten keinerlei therapeutische Effektivität. Bei Betrachtung der Tumormasse hatten die Therapiegruppen lediglich einen signifikant positiven Einfluss auf die Tumorlast gegenüber der Kontrollgruppe. Hierbei konnte jedoch, weder von der Mitomycin C



noch von der Gemcitabin Gruppe, ein weiterer Vorteil zur zytoreduktiven Therapie erreicht werden. Auch zeigte die Spülung mit Mitomycin C keine höhere Tumormassenreduktion, als die mit Gemcitabin. Zusammenfassend konnten wir also durch den neu untersuchten Therapieansatz der intraperitonealen hyperthermen Chemotherapie mit Gemcitabin keinen Vorteil gegenüber dem derzeitigen Standard zeigen. Außerdem erwies sich eine zusätzliche Spülung mit Gemcitabin nicht als besser wirksam, als ein alleiniges Tumordebulking.

Ein Indiz eines fortgeschrittenen Tumorwachstums, und damit Kriterium zur Beschreibung der Tumorlast nach den erfolgten multimodalen Therapien in unserem Versuch, stellte das Vorhandensein von Aszites dar. Durch die hypertherme intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C wurde in nur einer geringen Anzahl von Tieren Aszites gesehen ( $n=2=15.4\%$ ). Ratten, die ein reines Tumordebulking ( $n=8=57.1\%$ ) oder eine zusätzliche Behandlung mit Gemcitabin ( $n=7=50\%$ ) erhalten hatten, wiesen vermehrt Aszites auf. Sie war nur wenig geringer, als die der Kontrollgruppe, in der die meisten Tiere Aszites hatten ( $n=9=60\%$ ). Die Beobachtungen, die das Auftreten von Aszites betreffen, stellen nur eine richtungweisende Tendenz dar. Um genauere Aussagen über das Vorhandensein von Aszites im Zusammenhang mit den einzelnen Therapien machen zu können, wäre zum einen eine Quantifizierung der Menge notwendig wie es Monneuse et al. [118] durchgeführt haben. Dies ermöglicht eine differenziertere Darstellung darüber, in wie weit ein einzelner Therapieweg das Auftreten von Aszites stark oder weniger stark beeinflusst. Es könnte sogar betrachtet werden, ob bei Tieren, die zum Zeitpunkt des Tumordebulkings eine bestimmte Menge an Aszites aufwiesen, diese Menge durch die jeweilige adjuvante Therapie verändert werden konnte. Die in diesem Versuch verwandte Stückzahl der Tiere konnte in Bezug auf den Aszites kein aussagekräftiges und für eine statistische Berechnung verwendbares Ergebnis erbringen. Für zukünftige Untersuchungen zu diesem Thema sollte die Anzahl der Tiere jeder Gruppe daher größer gewählt werden. Es kann jedoch eine Tendenz vermutet werden, nach der, unter der hyperthermen Spülung mit Mitomycin C das Auftreten von Aszites geringer ist, als bei alleiniger zytoreduktiver Therapie und unter der Anwendung von Gemcitabin. Die von uns neu betrachtete Therapieoption mit Gemcitabin könnte sich demnach nicht gegenüber dem derzeitigen Standard behaupten. Sie würde auch keinen Vorteil zur alleinigen operativen Tumorentfernung zeigen.

Monneuse et al. [118] betrachteten vor dem Hintergrund, neue Medikamente in der Therapie der Peritonealkarzinose zu etablieren, die intraperitoneale Chemotherapie mit Dimethylthioampal (DIMATE). DIMATE greift in den Zellzyklus ein, indem es die Apoptose induziert. Seine Effektivität, vor allem in der Therapie der Lymphome (murine lymphoid cells), aber auch anderen Malignomen, konnte durch mehrere Studien gezeigt werden [119-123]. Auf dem Gebiet der tierexperimentellen Forschung zur Peritonealkarzinose ist DIMATE zuerst durch Monneuse et al. [118] untersucht worden. Sie stellten ein Rattenmodell vor, das auf Grundlagen von Martin et al. basierte [124]. Bei insgesamt 40 BD IX Ratten wurde durch intraperitoneale Injektion von DHD/K12/pro B Adenokarzinomzellen erfolgreich eine Peritonealkarzinose induziert. Die Tiere wurden in fünf Gruppen randomisiert (n= 8). Gruppe eins stellte die Kontrollgruppe dar und erhielt keine weitere Behandlung. Es gab zwei Debulking- Gruppen, von denen eine an Tag 20 nach der Zellinjektion operiert wurde und anschließend eine Spülung mit Kochsalzlösung erhielt. Die andere Gruppe wurde an Tag 20 operiert und im Anschluss mit DIMATE gespült. Die zwei weiteren Gruppen wurden nicht operativ behandelt. Es wurde eine intraperitoneale Chemotherapie mit DIMATE durchgeführt. Eine Spülung wurde an Tag zwei durchgeführt, während die andere erst an Tag 20 stattfand. Zur Auswertung der Therapieeffektivität wurde ein Tumorscore sowie die Menge an Aszites erhoben. Es konnte gezeigt werden, dass die frühe Applikation von DIMATE an Tag zwei und die Kombination von zytoreduktiver Therapie mit DIMATE an Tag 20 den Tumorscore und das Aszitesvolumen signifikant senkten. Eine reine Operation und eine späte Spülung an Tag 20 konnten keinen positiven Einfluss zeigen.

Ein weiterer Therapieansatz, der anhand eines Rattenmodells untersucht worden ist, findet sich von Aarts et al. [109, 125]. Ihre Studien beschäftigen sich mit der Radioimmuntherapie (RIT) im Vergleich mit einem Tumordebulking und dem derzeitigen therapeutischen Standard, der hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie mit Mitomycin C. Ihre Beobachtungen fußen auf einer klinischen Studie von Liersch et al. [126], in der Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms nach erfolgreicher R0- Resektion mit dem <sup>131</sup>Iod- markierten anti-CEA-Antikörper Labetuzumab behandelt wurden. In den Ergebnissen der Radioimmuntherapie zeigte sich eine viel versprechende fünf Jahresüberlebensrate von 51,5%. Es konnte also gezeigt werden, dass radioaktiv markierte monoklonale

Antikörper, die sich direkt gegen die Tumor- Antigene richten, eine mögliche Therapieoption für Patienten mit geringem Residualtumor darstellen. Auf dieser Grundlage setzten Aarts et al. die Radioimmuntherapie in der Therapie der Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom ein. Die Effektivität einer adjuvanten RIT wurde mit zum einen einer reinen RIT und zum anderen mit einer alleinigen zytoreduktiven Therapie verglichen [127]. Das mediane Überleben war in der Gruppe, die die Kombination aus Tumordebulking und RIT erhielt mit 88 Tagen am größten. Die Tiere, bei denen eine zytoreduktive Therapie durchgeführt wurde, überlebten 51 Tage. Während in der Gruppe, die nur durch eine RIT behandelt wurde, eine mediane Überlebenszeit von 61.1 Tagen beobachtet wurde. Für den Vergleich der HIPEC mit Mitomycin C und der RIT [109] wurde bei WAG/Rij Ratten eine Peritonealkarzinose durch Injektion von CC- 531 Adenokarzinomzellen induziert. Sieben Tage nach der Zellimplantation wurde die jeweilige Therapie durchgeführt. Es konnte bei allen Tieren Tumorwachstum festgestellt werden. Die RIT bestand aus intraperitoneal applizierten 74 MBq Lutetium- 177 markiertem anti- CC-531 IgG2a Antikörper (= MG1). Die intraperitoneale Chemotherapie wurde mit Mitomycin C in einer Dosierung von 16 mg/L über eine Spüldauer von 60 Minuten durchgeführt. Die erreichte intraabdominelle Temperatur lag bei 41 °C (40.4- 41.6). In der HIPEC Gruppe zeigten sich die meisten Nebenwirkungen. Die Tiere waren lethargisch, hatten starke Diarrhöen und verloren während der ersten postoperativen Woche signifikant mehr Gewicht, als die der RIT Gruppe. Es konnte ein signifikant längeres medianes Überleben in der RIT Gruppe gegenüber der HIPEC Gruppe gezeigt werden. Durch das Einsetzen von RIT im direkten Anschluss an die zytoreduktive Therapie konnte also im Rattenmodell eine Option geschaffen werden, die, vor allem durch ihre geringere Toxizität, einen Vorteil gegenüber der derzeitigen Standardtherapie bietet.

Die verschiedenen Ansätze, die in der tierexperimentellen Grundlagenforschung zum Thema der multimodalen Therapie der Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom gefunden werden können, bieten Anlass, den Herangehensweg dieses Versuches kritisch zu überdenken und mit den anderen zu vergleichen. In unserem Versuch wurden zur Tumorinduktion syngenetische DHD/K12/TRb Kolonkarzinomzellen eingesetzt. Mit dieser Zelllinie hatte die Arbeitsgruppe unseres Institutes um Prof. Jacobi bereits zuvor bei BD IX/HansHsd Ratten erfolgreiche eine Peritonealkarzinose

induzieren können [81-83]. Daher richteten wir uns nach diesem etablierten Verfahren und arbeiteten ebenfalls mit der gleichen Rattenart und der gleichen Zelllinie. Monneuse et al. verwandten in ihren Untersuchungen zu DIMATE sowohl DHD/K12/TRb Kolonkarzinomzellen, als auch BD IX/HansHsd Ratten [118]. In anderen Rattenmodellen wurde mit WAG/Rij Ratten und CC- 531 Adenokarzinomzellen gearbeitet [103, 109, 125]. Es kann also die Frage gestellt werden, ob die Rattenart oder viel wahrscheinlicher die Zelllinie einen Einfluss auf das Ansprechen der Therapie nehmen. So müssten in zukünftigen Untersuchungen die verschiedenen Zelllinien dem gleichen Therapieansatz gegenüber gestellt werden.

Des Weiteren finden sich in der Literatur unterschiedliche Zeitabstände zwischen Tumorinduktion und der jeweiligen Therapie. Dieses Versuchsprotokoll sah einen Zeitraum von 21 Tagen vor. Pelz et al. führten eine HIPEC nach zehn Tagen durch [103]. In der Studie von Aarts et al. wurde nach sieben Tagen eine zytoreduktive Therapie mit anschließender HIPEC durchgeführt [109]. Monneuse et al. [118] betrachten unterschiedliche Therapiezeitpunkte. Sie zeigen damit, dass die Therapie zu einem frühen Zeitpunkt erfolgreicher war, als zu dem späteren. Obwohl in dieser Studie DIMATE untersucht wurde, kann vermutet werden, dass für andere Medikamente, und damit auch für Gemcitabin und Mitomycin C, derselbe Trend gilt. Da unsere Ergebnisse erbrachten, dass Gemcitabin 21 Tage nach Zellinjektion keinen therapeutischen Effekt hatte, müsste noch untersucht werden, ob es auch zu einem früheren Zeitpunkt wirkungslos ist. In unserem Versuch wurden beide Chemotherapeutika nach 21 Tagen verabreicht, und somit galten für Mitomycin C und Gemcitabin die gleichen Bedingungen. Da der Vergleich zeigte, dass allein Mitomycin C die Tumorlast senken konnte, kann zwar festgestellt werden, dass für den späten Einsatz Gemcitabin nicht geeignet ist, jedoch nicht, dass es zu einem früheren Zeitpunkt vollkommen unwirksam wäre. Dies zu zeigen, bleibt noch aus.

Das durch unseren Versuch erfolgreich durchgeführte Rattenmodell bietet die Möglichkeit, in Zukunft Gemcitabin weiter zu untersuchen. Zusätzlich zu den verschiedenen Zeitpunkten wäre auch der Einsatz verschiedener Dosierungen denkbar, um auf dieser Ebene die Therapie zu optimieren. Es wäre auch denkbar Gemcitabin in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, z. B. Mitomycin C, einzusetzen.

Die Spüldauer und auch die Temperatur der HIPEC lagen in allen oben genannten Rattenmodellen vergleichsweise nah bei einander. Sie liegen in dem Bereich der durch das 2006 und 2008 so genannte „Consensus Statement“ [101, 102] festgelegten klinischen Leitlinien. Durch die Techniken der intraperitonealen Spülungen besteht die Schwierigkeit, dass nicht vollkommen sichergestellt werden kann, dass jeder intraabdominelle Bereich ausreichend erreicht wird. Durch Darmschlingen, die Bereiche verlegen, oder durch Verwachsungen kann nicht sicher jede Stelle mit der therapeutisch notwendigen Medikamentenkonzentration in Kontakt kommen. Aarts et al. [109] haben daher die Spülflüssigkeit mit Methylene-Blau angefärbt, so dass nach Beendigung der HIPEC alle intraabdominellen Quadranten auf ihre blaue Färbung hin kontrolliert werden konnten.

Zahlreiche klinische Studien [55, 128, 129] weisen auf die Wichtigkeit einer größtmöglichen makroskopischen Tumorentfernung vor einer HIPEC hin. Dies konnte auch im Tierexperiment gezeigt werden [85]. Um ein best mögliches Operationsergebnis erzielen zu können, sollten daher die Patienten in großen Zentren von erfahrenen Operateuren behandelt werden. In unserem Tiermodell war die Erfahrung mit dem Tumordebulking bei einer Ratte zu Beginn noch gering. Daher müsste auch mit einbezogen werden, dass bei später operierten Tieren aufgrund des Lernzuwachses möglicher Weise bessere Ergebnisse erreicht werden konnten.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick

In westlichen Ländern zählen kolorektale Adenokarzinome zu immer häufiger werdenden malignen Tumorerkrankungen. Die Peritonealkarzinose nimmt in einem großen Anteil der Fälle ihren Ausgang von einem gastrointestinalen Karzinom, und wird aufgrund ihrer infausten Prognose als Terminalstadium mit einer kurzen mittleren Überlebenszeit angesehen [3, 4]. Ohne Therapie liegt das mediane Überleben bei nur sechs Monaten [3]. Durch palliative systemische Chemotherapien konnten gute Ansprechraten des Tumors erzielt werden. Jedoch wurde insgesamt die mittlere Überlebenszeit dadurch nicht verlängert [4, 130]. Innerhalb der vergangenen 20 Jahre rückten neue Therapieansätze in das Zentrum der Forschung der Peritonealkarzinose. Es wurden multimodale Therapien vorgestellt und optimiert. Eine zytoreduktive Therapie, die so genannte „Peritonektomie Prozeduren“ nach Sugarbaker [78] beinhaltet, bildet die Voraussetzung für die anschließende intraperitoneale hypertherme Chemotherapie. Dabei sollte die maximal mögliche makroskopische Tumorreduktion realisiert werden, um den Erfolg der lokal mit limitierter Eindringtiefe wirkenden Chemotherapeutika sicher zu stellen.

Aufgrund der noch immer schlechten Prognose und der engen Assoziation der Peritonealkarzinose mit dem häufigen Kolonkarzinom ist die experimentelle Grundlagenforschung von besonders großer Bedeutung. Auf diesem Gebiet existiert bis zum aktuellen Zeitpunkt nur eine limitierte Anzahl von Studien. Daher hat sich dieser Versuch zum Ziel gemacht, verschiedene multimodale Therapiekonzepte der Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom in einem Rattenmodell durchzuführen, und in Bezug auf Effektivität und Nebenwirkungen zu vergleichen.

Die Einteilung in die Versuchsgruppen erfolgte durch Randomisierung. In jeder Gruppe befanden sich 15 männliche BD IX/HansHsd Ratten. Bei allen Tieren wurden zu Beginn des Versuches syngenetische DHD/K12/TRb Kolonkarzinomzellen subperitoneal injiziert, um eine Peritonealkarzinose zu induzieren. Die Tiere der Versuchsgruppe eins erhielten keine weitere Therapie (Kontrollgruppe). Die Tiere der Gruppe zwei erhielten 21 Tage nach der Zellinjektion eine zytoreduktive Therapie. In der Gruppe drei wurde im Anschluss an das operative Tumordebulking eine intraperitoneale hypertherme Chemotherapie mit Mitomycin C durchgeführt. Die

Versuchsgruppe vier wurde nach der Zytoreduktion mit einer intraperitonealen hyperthermen Chemotherapie mit Gemcitabin therapiert. Zweiundvierzig Tage nach der Zellinjektion wurden die Tiere aller Versuchsgruppen durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Es erfolgte eine quantitative Auswertung der Tumormasse, Tumorknotenanzahl, des ePCI und dem Vorhandensein von Aszites.

Durch diesen Versuch konnte ein Rattenmodell etabliert werden, in dem Tumordebulking und intraperitoneale hypertherme Chemotherapie einer zuvor induzierten Peritonealkarzinose durchführbar sind. Durch vorzeitig verstorbene Tiere betrug die Mortalität 8%. Es konnten in allen Therapiegruppen signifikant verringerte Werte von Tumorknotenanzahl, Tumormasse und ePCI gegenüber der Kontrollgruppe erreicht werden. Eine signifikante Reduktion der Tumormasse bei zusätzlicher intraperitonealer hyperthermer Chemotherapie konnte im Vergleich zum alleinigen Tumordebulking nur durch die Spülung mit Mitomycin C erbracht werden. Der Einsatz von Gemcitabin konnte weder gegenüber der rein operativen Therapie, noch dem von Mitomycin C eine Verringerung der Tumormasse zeigen. Auch in Bezug auf das Vorhandensein von Aszites zeigte sich eine dieser Tendenz folgende Beobachtung. In jeder Gruppe gab es Tiere, die Aszites aufwiesen. Die meisten Fälle mit Aszites fanden sich in der Kontrollgruppe (n=9 = 60%). In der Mitomycin C Gruppe wurde am wenigsten Aszites beobachtet (n=2 = 15,4%), während die mit Gemcitabin behandelten Tiere kein signifikantes Ergebnis zeigten, da sie zu 50% Aszites aufwiesen und zu 50% keinen.

Die innerhalb unseres Versuches gefundenen Ergebnisse stützen die derzeit im klinischen Alltag eingesetzte Standardtherapie. Wir konnten zeigen, dass Mitomycin C die Tumormasse am meisten verringert hat. Diesem Ergebnis folgten auch andere tierexperimentelle Studien [50, 103]. Wir konnten außerdem keine Nebenwirkungen, die auf die HIPEC zurückzuführen waren, beobachten. Während in der Studie von Aarts et al. [109] die HIPEC mit Mitomycin C gegenüber einer RIT starke Nebenwirkungen in Form von Lethargie, Diarrhö und Gewichtsverlust zeigte. Der Einsatz von Gemcitabin hatte sich zwar in der Therapie von soliden intraperitonealen Malignomen bewährt [51], in unserem Versuch konnte Gemcitabin jedoch keinen positiven Effekt auf die Entstehung und die Ausbreitung einer Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom erzielen.

Es bleibt also festzustellen, dass durch diesen Versuch das Ziel erreicht wurde, ein experimentelles Rattenmodell aufzustellen, das die Durchführung der zytoreduktiven Therapie und einer anschließenden hyperthermen intraperitonealen Chemotherapie erlaubt. Dieses Tiermodell wird auch in Zukunft für eine weitere Optimierung zur Verfügung stehen können. Es bietet die Möglichkeit, die einzelnen Schritte innerhalb des Komplexen Ablaufs der multimodalen Therapie genauer betrachten zu können. So könnte in zukünftigen Versuchen beispielsweise mit unterschiedlichen Dosierungen von Mitomycin C gearbeitet werden. Ebenso könnte betrachtet werden, ob es für Spülzeit und die Temperatur einen noch optimaleren Bereich gäbe. Weiterführend ist durch dieses Rattenmodell auch die Möglichkeit gegeben, wieder neue Therapieansätze zu untersuchen. Es könnten sogar Kombinationen von Medikamenten eingesetzt werden.

Aufgrund der Notwendigkeit die noch immer infauste Prognose der Peritonealkarzinose zu verbessern, besteht die Dringlichkeit auf diesem Gebiet weiterhin in der tierexperimentellen Grundlagenforschung zu arbeiten. Durch dieses Rattenmodell könnten wir dem Ziel einer besseren Therapie für die Peritonealkarzinose und ihrer Umsetzung für den klinischen Alltag ein Stück näher gekommen sein.



## 7. Literaturverzeichnis

1. Herwart Müller, M., FACS, Abteilung chirurgische Onkologie Krankenhaus Hammelburg, *Die Hyperthermie im Gesamtkonzept der Behandlung des Bauchfellkrebs*. Beitrag zur Deutschen Zeitschrift für Onkologie, Mai 2006.
2. Chu, D.Z., et al., *Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors*. Cancer, 1989. **63**(2): p. 364-7.
3. Jayne, D.G., et al., *Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer*. Br J Surg, 2002. **89**(12): p. 1545-50.
4. Sadeghi, B., et al., *Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study*. Cancer, 2000. **88**(2): p. 358-63.
5. Brodsky, J.T. and A.M. Cohen, *Peritoneal seeding following potentially curative resection of colonic carcinoma: implications for adjuvant therapy*. Dis Colon Rectum, 1991. **34**(8): p. 723-7.
6. Sugarbaker, P.H. and Y. Yonemura, *Clinical pathway for the management of resectable gastric cancer with peritoneal seeding: best palliation with a ray of hope for cure*. Oncology, 2000. **58**(2): p. 96-107.
7. Dawson, L.E., et al., *Adenocarcinoma of the sigmoid colon: sites of initial dissemination and clinical patterns of recurrence following surgery alone*. J Surg Oncol, 1983. **22**(2): p. 95-9.
8. Russell, A.H., et al., *Adenocarcinoma of the retroperitoneal ascending and descending colon: sites of initial dissemination and clinical patterns of recurrence following surgery alone*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1983. **9**(3): p. 361-5.
9. Sugarbaker, P.H., *Intraperitoneal chemotherapy for treatment and prevention of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis*. Dis Colon Rectum, 1994. **37**(2 Suppl): p. S115-22.
10. Sugarbaker, P.H., *Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role*. Langenbecks Arch Surg, 1999. **384**(6): p. 576-87.
11. Shephard NA, B.K., LOVE SB., *The prognostic importance of peritoneal involvement in colonic cancer: a prospective evaluation*. Gastroenterology 112:1096-1102, 1997.
12. Comton CC, F.-P.C., Pettigrew N, Fielding LP, *American Joint Committee on Cancer Prognostic Factors Conference: Colorectal Working Group*. Cancer 88:1739-57, 2000.
13. Willett, C.G., et al., *Failure patterns following curative resection of colonic carcinoma*. Ann Surg, 1984. **200**(6): p. 685-90.
14. Schott, A., et al., *Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker*. Ann Surg, 1998. **227**(3): p. 372-9.
15. Pomeranz, A.A. and J.H. Garlock, *Postoperative recurrence of cancer of colon due to desquamated malignant cells*. J Am Med Assoc, 1955. **158**(16): p. 1434-6.

16. Quan, S.H., *Cul-de-sac smears for cancer cells*. Surgery, 1959. **45**(2): p. 258-63.
17. Moore, G.E., et al., *Assessment of the exfoliation of tumor cells into the body cavities*. Surg Gynecol Obstet, 1961. **112**: p. 469-74.
18. Ambrose, N.S., et al., *Monoclonal antibody and cytological detection of free malignant cells in the peritoneal cavity during resection of colorectal cancer--can monoclonal antibodies do better?* Eur J Surg Oncol, 1989. **15**(2): p. 99-102.
19. Zeng, Z., et al., *Serosal cytologic study to determine free mesothelial penetration of intraperitoneal colon cancer*. Cancer, 1992. **70**(4): p. 737-40.
20. Sugarbaker, P.H., *Review of a personal experience in the management of carcinomatosis and sarcomatosis*. Jpn J Clin Oncol, 2001. **31**(12): p. 573-83.
21. J, S., *Implantation peritoneal carcinomatosis of ovarian origin*. Am J Pathol, 1931. **7**:423-43, 1931.
22. Kohne CH, C.D., Di CF, Glimelis B, Blijam G, Aranda E, Scheithauer W, Rougier P, Palmer M, Wils J, Baron B, Pignatti F, Schoffski P, Micheel S, Hecker H, *Clinical Determinants of Survival in Patients with 5 Fluorouracil-Based Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: Results of a Multivariate Analysis of 3825 Patients*. Ann Oncol 2002; **13**(2): 308-17.
23. Mitry, E., et al., *Predictive factors of survival in patients with advanced colorectal cancer: an individual data analysis of 602 patients included in irinotecan phase III trials*. Ann Oncol, 2004. **15**(7): p. 1013-7.
24. Hansen, E., et al., *Tumor cells in blood shed from the surgical field*. Arch Surg, 1995. **130**(4): p. 387-93.
25. Weisberger AS, e.a., *Use of nitrogen mustard in treatment of serous effusions of neoplastic origin*. JAMA 159:1704, 1995.
26. Markman, M., *Intraperitoneal chemotherapy*. Semin Oncol, 1991. **18**(3): p. 248-54.
27. Jacquet, P. and P.H. Sugarbaker, *Peritoneal-plasma barrier*. Cancer Treat Res, 1996. **82**: p. 53-63.
28. Dedrick, R.L., *Interspecies scaling of regional drug delivery*. J Pharm Sci, 1986. **75**(11): p. 1047-52.
29. Cho, H.K., et al., *Pharmacokinetics of cisplatin administered by continuous hyperthermic peritoneal perfusion (CHPP) to patients with peritoneal carcinomatosis*. J Clin Pharmacol, 1999. **39**(4): p. 394-401.
30. Dedrick, R.L., et al., *Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer*. Cancer Treat Rep, 1978. **62**(1): p. 1-11.
31. Bartlett, D.L., et al., *A phase I trial of continuous hyperthermic peritoneal perfusion with tumor necrosis factor and cisplatin in the treatment of peritoneal carcinomatosis*. Cancer, 1998. **83**(6): p. 1251-61.
32. Markman, M., et al., *Phase II trial of intraperitoneal paclitaxel in carcinoma of the ovary, tube, and peritoneum: a Gynecologic Oncology Group Study*. J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2620-4.
33. Kuzuya, T., et al., *Pharmacokinetic characteristics of 5-fluorouracil and mitomycin C in intraperitoneal chemotherapy*. J Pharm Pharmacol, 1994. **46**(8): p. 685-9.
34. Alberts DS, S.E., Peng YM, McCloskey T, Rivest R, Graham V, et al., *Phase I and pharmacological studies of adriamycin administered intraperitoneally to patients with ovarian cancer*. Cancer Res. **48**(20):5874-7, 1988.

35. Israel, V.K., et al., *Intraperitoneal 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) and (S)-leucovorin for disease predominantly confined to the peritoneal cavity: a pharmacokinetic and toxicity study*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1995. **37**(1-2): p. 32-8.
36. Witkamp AJ, d.B.E., Van Goethern R, Zoetmulder FA, *Rationale and techniques of intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*. *Cancer Treat Rev* 27:365-274, 2001.
37. Sugarbaker, P.H., *Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer*. *Cancer Chem Pharmacol* 43(S):15-25, 1999.
38. Elias D, B.A., Otomany El, Antoun S, Lasser P, Boigge V, et al., *Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy*. *Cancer* 92:71-71, 2001.
39. Zoetmulder FAN, V.V., Ruth S, *Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) with mitomycin C significantly improves survival in patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal origin*. *J Clin Oncol ASCO Abstr* 2002; 586.
40. Carter S. K., C.S.T., *Mitomycin C- Current Status and New Developments*. Academic Press Inc, 1979.
41. <http://de.wikipedia.org/wiki/Mitomycin>.
42. van Ruth S, V.V., Zoetmulder FAN, *Pharmacokinetics of intraperitoneal mitomycin C*. *Surg Oncol N Am* 2003 12:771-780.
43. Sugarbaker, P.H., Stuart O. A., Carmignani C. P., *Pharmacokinetic changes induced by the volume of chemotherapy solution in patients treated with hyperthermic intraperitoneal mitomycin C*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 57:703-708.
44. Sugarbaker, P.H., et al., *Pharmacokinetics of the peritoneal-plasma barrier after systemic mitomycin C administration*. *Cancer Treat Res*, 1996. **82**: p. 41-52.
45. <http://de.wikipedia.org/wiki/Gemcitabin>.
46. Carmichael, J., *The role of gemcitabine in the treatment of other tumours*. *Br J Cancer*, 1998. **78 Suppl 3**: p. 21-5.
47. Correale, P., et al., *Gemcitabine (GEM), 5-fluorouracil (5-FU) and folinic acid (FA) in patients with different gastroenteric malignancies*. *J Chemother*, 2004. **16**(2): p. 206-10.
48. Morgan, R.J., Jr., et al., *Phase I trial of intraperitoneal gemcitabine in the treatment of advanced malignancies primarily confined to the peritoneal cavity*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(4): p. 1232-7.
49. Correale, P., et al., *A novel biweekly multidrug regimen of gemcitabine, oxaliplatin, 5-fluorouracil (5-FU), and folinic acid (FA) in pretreated patients with advanced colorectal carcinoma*. *Br J Cancer*, 2004. **90**(9): p. 1710-4.
50. Hribaschek, A., et al., *[Five cytostatic substances in animal studies for prevention and treatment of experimentally induced peritoneal carcinomatosis]*. *Zentralbl Chir*, 2004. **129**(4): p. 328-34.
51. Ridwelski K, M.F., Hribaschek A, Kasper U, Lippert H, *Intraoperative and early postoperative chemotherapy into the abdominal cavity using gemcitabine may prevent postoperative occurrence of peritoneal carcinomatosis*. *J Surg Oncol* 2002; 79:10-16.
52. Lewin Eisele, S.-Y.S., Hannes Müller-Beißenhirtz, Anja Welt, Siegfried Seeber, *Response of Pseudomyxoma Peritonei to Gemcitabine*. *Acta Oncologica* 2006; 45:98-100.

53. Verwaal, V.J., et al., *Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2003. **21**(20): p. 3737-43.
54. Verwaal, V.J., et al., *8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(9): p. 2426-32.
55. Glehen, O., et al., *Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study*. J Clin Oncol, 2004. **22**(16): p. 3284-92.
56. Spratt, J.S., et al., *Clinical delivery system for intraperitoneal hyperthermic chemotherapy*. Cancer Res, 1980. **40**(2): p. 256-60.
57. [www.hyperthermie.org](http://www.hyperthermie.org).
58. Nielsen, O.S., *Status of hyperthermic oncology in Europe: results of an ESHO survey*. Int J Hyperthermia, 1995. **11**(3): p. 323-7.
59. Nielsen, O.S., M. Horsman, and J. Overgaard, *A future for hyperthermia in cancer treatment?* Eur J Cancer, 2001. **37**(13): p. 1587-9.
60. Dikomey E, J.H., *Correlation Between Thermal Radiosensitization and Heat-Induced Loss of DNA Polymerase Beta Activity in CHO Cells*. Int J Radiat Oncol Biol 1993; 63 (2): 215- 21, 1993.
61. Feldmann, H.J., et al., *Changes in oxygenation patterns of locally advanced recurrent tumors under thermoradiotherapy*. Adv Exp Med Biol, 1994. **345**: p. 479-83.
62. Teicher, B.A., et al., *Enhancement by hyperthermia of the in vitro cytotoxicity of mitomycin C toward hypoxic tumor cells*. Cancer Res, 1981. **41**(3): p. 1096-9.
63. Watanabe M, T.R., Hondo H, Kuroki M, *Effects of antineoplastic agents and hyperthermia on cytotoxicity of mitomycin C toward hypoxic tumor cells*. Int J Hyperthermia 1992; 8:131-8.
64. van Ruth, S., et al., *Heat penetration in locally applied hyperthermia in the abdomen during intra-operative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*. Anticancer Res, 2003. **23**(2B): p. 1501-8.
65. Elias, D., et al., *Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin alone and in combination with intraperitoneal irinotecan: Pharmacologic studies*. Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(6): p. 607-13.
66. Le Page, S., et al., *In vitro thermochemotherapy of colon cancer cell lines with irinotecan alone and combined with mitomycin C*. Hepatogastroenterology, 2006. **53**(71): p. 693-7.
67. Van der Speeten, K., et al., *A pharmacologic analysis of intraoperative intracavitary cancer chemotherapy with doxorubicin*. Cancer Chemother Pharmacol, 2009. **63**(5): p. 799-805.
68. Sugarbaker, P.H., *Getting chemotherapy into the cancerous tissue*. Ann Surg Oncol 2008;15:3320 author reply 3321.
69. Folprecht, G., et al., *Cetuximab and irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid is a safe combination for the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal carcinoma*. Ann Oncol, 2006. **17**(3): p. 450-6.
70. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.

71. Goldberg, R.M., et al., *Randomized controlled trial of reduced-dose bolus fluorouracil plus leucovorin and irinotecan or infused fluorouracil plus leucovorin and oxaliplatin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a North American Intergroup Trial*. J Clin Oncol, 2006. **24**(21): p. 3347-53.
72. Markman, M. and D. Kelsen, *Efficacy of cisplatin-based intraperitoneal chemotherapy as treatment of malignant peritoneal mesothelioma*. J Cancer Res Clin Oncol, 1992. **118**(7): p. 547-50.
73. Neumann, V., K.M. Muller, and M. Fischer, *[Peritoneal mesothelioma--incidence and etiology]*. Pathologe, 1999. **20**(3): p. 169-76.
74. Eltabbakh, G.H., et al., *Clinical picture, response to therapy, and survival of women with diffuse malignant peritoneal mesothelioma*. J Surg Oncol, 1999. **70**(1): p. 6-12.
75. Sugarbaker, P.H., et al., *A review of peritoneal mesothelioma at the Washington Cancer Institute*. Surg Oncol Clin N Am, 2003. **12**(3): p. 605-21, xi.
76. Loggie, B.W., et al., *Prospective trial for the treatment of malignant peritoneal mesothelioma*. Am Surg, 2001. **67**(10): p. 999-1003.
77. Kerrigan, S.A., et al., *Diffuse malignant epithelial mesotheliomas of the peritoneum in women: a clinicopathologic study of 25 patients*. Cancer, 2002. **94**(2): p. 378-85.
78. Sugarbaker, P.H., *Peritonectomy procedures*. Ann Surg, 1995. **221**(1): p. 29-42.
79. Portilla, A.G., et al., *The intraoperative staging systems in the management of peritoneal surface malignancy*. J Surg Oncol, 2008. **98**(4): p. 228-31.
80. Balague, C., et al., *Validation of a new experimental model of colon cancer*. Surg Endosc, 2001. **15**(8): p. 833-6.
81. Ordemann J, H.C., Braumann C et al., *Impact of pneumoperitoneum on expression of E-cadherin, CD44v6 and CD54 (ICAM-1) on Ht-29 colon-carcinoma cells*. Zentralbl Chir 2005 130(5):405-409.
82. Braumann, C., et al., *Local and systemic chemotherapy with taurolidine and taurolidine/heparin in colon cancer-bearing rats undergoing laparotomy*. Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(5): p. 387-94.
83. Jacobi, C.A., et al., *Inhibition of peritoneal tumor cell growth and implantation in laparoscopic surgery in a rat model*. Am J Surg, 1997. **174**(3): p. 359-63.
84. Burdette WJ, G.E., *Prospective Studies in Planning and Analysis of Clinical Studies*. Charles C Thomas Publisher, Springfield: 23-49.
85. Hartmann J, K.M., Atanassov V, Braumann C, Ordemann J, Jacobi CA., *First surgical tumor reduction of peritoneal surface malignancy in a rat's model*. Clin Exp Metastasis 2008; 25: 445- 449.
86. Raue W, K.M., Braumann C, Atanassov V, Makareinis A, Cardenas S, Schwenk W, Hartmann J, *Multimodal approach for the treatment of peritoneal surface malignancies in a tumor-bearing rat model*. Int J Colorectal Dis 25(2): 245-50, 2010.
87. Steller EP, O.R., Matthews W et al., *Recombinant interleukin-2 and adoptively transferred lymphokine-activated killer cells in the treatment of experimental peritoneal carcinomatosis*. Surg Forum 1985 36:390-392.
88. Glehen, O., et al., *Intraperitoneal chemohyperthermia using a closed abdominal procedure and cytoreductive surgery for the treatment of peritoneal carcinomatosis: morbidity and mortality analysis of 216 consecutive procedures*. Ann Surg Oncol, 2003. **10**(8): p. 863-9.

89. Russell, A.H., et al., *Adenocarcinoma of the proximal colon. Sites of initial dissemination and patterns of recurrence following surgery alone.* Cancer, 1984. **53**(2): p. 360-7.
90. Hurwitz, H.I., et al., *Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3502-8.
91. Horsell, K.W., et al., *Peritonectomy and intraperitoneal chemotherapy in appendiceal and colorectal cancer.* Aust N Z J Surg, 1999. **69**(10): p. 729-32.
92. Scheithauer, W., et al., *Combined intravenous and intraperitoneal chemotherapy with fluorouracil + leucovorin vs fluorouracil + levamisole for adjuvant therapy of resected colon carcinoma.* Br J Cancer, 1998. **77**(8): p. 1349-54.
93. Yu, W., et al., *Prospective randomized trial of early postoperative intraperitoneal chemotherapy as an adjuvant to resectable gastric cancer.* Ann Surg, 1998. **228**(3): p. 347-54.
94. Sugarbaker, P.H. and Y. Yonemura, *Palliation with a glimmer of hope: management of resectable gastric cancer with peritoneal carcinomatosis.* Hepatogastroenterology, 2001. **48**(41): p. 1238-47.
95. Sugarbaker, P.H. and D. Chang, *Results of treatment of 385 patients with peritoneal surface spread of appendiceal malignancy.* Ann Surg Oncol, 1999. **6**(8): p. 727-31.
96. Rosen, H.R., et al., *Adjuvant intraperitoneal chemotherapy with carbon-adsorbed mitomycin in patients with gastric cancer: results of a randomized multicenter trial of the Austrian Working Group for Surgical Oncology.* J Clin Oncol, 1998. **16**(8): p. 2733-8.
97. Samel, S., et al., *Problems with intraoperative hyperthermic peritoneal chemotherapy for advanced gastric cancer.* Eur J Surg Oncol, 2000. **26**(3): p. 222-6.
98. Sautner T, H.F., Depisch D, Schiessel R, Jakesz R., *Adjuvant intraperitoneal cisplatin chemotherapy does not improve long-term survival after surgery for advanced gastric cancer.* J Clin Oncol 1994; 12: 970- 974.
99. Fass, J., et al., *[Results of intraperitoneal active charcoal-mitomycin C therapy of stomach carcinoma with serosa invasion].* Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1998. **115**: p. 1363-6.
100. Yan, T.D., et al., *Systematic review on the efficacy of cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal carcinoma.* J Clin Oncol, 2006. **24**(24): p. 4011-9.
101. Esquivel, J., et al., *Consensus statement on the loco regional treatment of colorectal cancer with peritoneal dissemination.* J Surg Oncol, 2008. **98**(4): p. 263-7.
102. Esquivel, J., et al., *Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in the management of peritoneal surface malignancies of colonic origin: a consensus statement. Society of Surgical Oncology.* Ann Surg Oncol, 2007. **14**(1): p. 128-33.
103. Pelz, J.O., et al., *A new survival model for hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC) in tumor-bearing rats in the treatment of peritoneal carcinomatosis.* BMC Cancer, 2005. **5**: p. 56.
104. Los, G., et al., *Optimisation of intraperitoneal cisplatin therapy with regional hyperthermia in rats.* Eur J Cancer, 1991. **27**(4): p. 472-7.

105. Smeenk, R.M., V.J. Verwaal, and F.A. Zoetmulder, *Toxicity and mortality of cytoreduction and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in pseudomyxoma peritonei--a report of 103 procedures*. Eur J Surg Oncol, 2006. **32**(2): p. 186-90.
106. Stephens AD, A.R., Chang D, Edwards GD, Esquivel J et al., *Morbidity and mortality analysis of 200 treatments with cytoreductive surgery and hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy using a coliseum technique*. Ann Surg Oncol 1999; 6; 790-796.
107. Smeenk, R.M., V.J. Verwaal, and F.A. Zoetmulder, *Learning curve of combined modality treatment in peritoneal surface disease*. Br J Surg, 2007. **94**(11): p. 1408-14.
108. Glehen, O., F. Mohamed, and P.H. Sugarbaker, *Incomplete cytoreduction in 174 patients with peritoneal carcinomatosis from appendiceal malignancy*. Ann Surg, 2004. **240**(2): p. 278-85.
109. Aarts, F., et al., *A comparison between radioimmunotherapy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for the treatment of peritoneal carcinomatosis of colonic origin in rats*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(11): p. 3274-82.
110. Fernandez-Trigo, V., et al., *Surgically directed chemotherapy: heated intraperitoneal lavage with mitomycin C*. Cancer Treat Res, 1996. **81**: p. 51-61.
111. Witkamp, A.J., et al., *Extensive cytoreductive surgery followed by intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with mitomycin-C in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal origin*. Eur J Cancer, 2001. **37**(8): p. 979-84.
112. Hribaschek, A., et al., *Prophylaxis of peritoneal carcinomatosis in experimental investigations*. Int J Colorectal Dis, 2001. **16**(5): p. 340-5.
113. Barlogie, B., P.M. Corry, and B. Drewinko, *In vitro thermochemotherapy of human colon cancer cells with cis-dichlorodiammineplatinum(II) and mitomycin C*. Cancer Res, 1980. **40**(4): p. 1165-8.
114. Cavaliere, R., et al., *Selective heat sensitivity of cancer cells*. Biochemical and clinical studies. Cancer, 1967. **20**(9): p. 1351-81.
115. Marquet, R.L., D.L. Westbroek, and J. Jeekel, *Interferon treatment of a transplantable rat colon adenocarcinoma: importance of tumor site*. Int J Cancer, 1984. **33**(5): p. 689-92.
116. Verwaal, V.J., et al., *Toxicity of cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*. J Surg Oncol, 2004. **85**(2): p. 61-7.
117. Veenhuizen, R.B., et al., *Intraperitoneal photodynamic therapy of the rat CC531 adenocarcinoma*. Br J Cancer, 1996. **73**(11): p. 1387-92.
118. Monneuse, O., et al., *Intraperitoneal treatment with dimethylthioampal (DIMATE) combined with surgical debulking is effective for experimental peritoneal carcinomatosis in a rat model*. J Gastrointest Surg, 2005. **9**(6): p. 769-74.
119. Quash, G., et al., *Novel competitive irreversible inhibitors of aldehyde dehydrogenase (ALDH1): restoration of chemosensitivity of L1210 cells overexpressing ALDH1 and induction of apoptosis in BAF(3) cells overexpressing bcl(2)*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(8): p. 1279-92.
120. Canuto, R.A., et al., *The effect of a novel irreversible inhibitor of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 on tumour cell growth and death*. Chem Biol Interact, 2001. **130-132**(1-3): p. 209-18.
121. Quash, G., et al., *A thioester analogue of an amino acetylenic aldehyde is a suicide inhibitor of aldehyde dehydrogenase and an inducer of apoptosis in*

- mouse lymphoid cells overexpressing the bcl2 gene.* Adv Exp Med Biol, 1999. **463**: p. 97-106.
122. Roch, A.M., et al., *Methional, a cellular metabolite, induces apoptosis preferentially in G2/M-synchronized BAF3 murine lymphoid cells.* Cytometry, 1998. **31**(1): p. 10-9.
123. Quash, G., et al., *Methional derived from 4-methylthio-2-oxobutanoate is a cellular mediator of apoptosis in BAF3 lymphoid cells.* Biochem J, 1995. **305 (Pt 3)**: p. 1017-25.
124. Martin, F., et al., *A carcinofoetal antigen located on the membrane of cells from rat intestinal carcinoma in culture.* Cancer Res, 1975. **35**(2): p. 333-6.
125. Aarts, F., et al., *The effects of adjuvant experimental radioimmunotherapy and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy on intestinal and abdominal healing after cytoreductive surgery for peritoneal carcinomatosis in the rat.* Ann Surg Oncol, 2008. **15**(11): p. 3299-307.
126. Liersch, T., et al., *Phase II trial of carcinoembryonic antigen radioimmunotherapy with 131I-labetuzumab after salvage resection of colorectal metastases in the liver: five-year safety and efficacy results.* J Clin Oncol, 2005. **23**(27): p. 6763-70.
127. Koppe, M.J., et al., *Radioimmunotherapy is an effective adjuvant treatment after cytoreductive surgery of experimental colonic peritoneal carcinomatosis.* J Nucl Med, 2006. **47**(11): p. 1867-74.
128. Bijelic, L., T.D. Yan, and P.H. Sugarbaker, *Failure analysis of recurrent disease following complete cytoreduction and perioperative intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer.* Ann Surg Oncol, 2007. **14**(8): p. 2281-8.
129. Portilla, A.G., P.H. Sugarbaker, and D. Chang, *Second-look surgery after cytoreduction and intraperitoneal chemotherapy for peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: analysis of prognostic features.* World J Surg, 1999. **23**(1): p. 23-9.
130. Isacoff, W.H. and K. Borud, *Chemotherapy for the treatment of patients with metastatic colorectal cancer: an overview.* World J Surg, 1997. **21**(7): p. 748-62.



Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

An dieser Stelle sei sehr herzlich gedankt:

Herrn PD Dr. med. Jens Hartmann, meinem Doktorvater, der mir durch seine hervorragende Betreuung den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglichte und mir durch seine konstruktive Kritik sowie unendliche Geduld stets zur Seite stand.

Frau Führer, die mich in die Grundlagen des tierexperimentellen Arbeitens einwies.

Herrn Dr. med. Maik Kilian, der mich bei Fragen zur statistischen Auswertung unterstützte.

Mein besonderer Dank gilt Sonja Cardenas für die freundschaftliche Zusammenarbeit und stets aufmunternde Unterstützung.

Den größten Dank möchte ich meiner Familie aussprechen, die mich bereits mein Leben lang mit großer Geduld und viel unterstützendem Verständnis begleitet und mir besonders bei der Fertigstellung dieser Arbeit immer den Rücken gestärkt hat.

## Erklärung

„Ich, Anna Makareinis, geboren am 27.11.1982 erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zytoreduktive Therapie und hypertherme intraperitoneale Chemotherapie mit Mitomycin C oder Gemcitabin als Therapieansatz der Peritonealkarzinose durch ein Kolonkarzinom im Rattenmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 10.10.2011

Anna Makareinis