

*Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. M.D. Menger*

**Effektivität einer regionären EmboCept® S Therapie in
Kombination mit Irinotecan und/oder Bevacizumab auf das
Wachstum kolorektaler Lebermetastasen sowie deren
Nebenwirkungen auf das gesunde Leberparenchym**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES*

2022

vorgelegt von:

Kira Keller

Geb. am: 25.08.1990 in St. Wendel

Tag der Promotion: 26.05.2023

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael D. Menger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marcin Krawczyk

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 2. Summary | 3 |
| 3. Einleitung | 5 |
| 3.1. Klinischer Hintergrund | 5 |
| 3.1.1. Kolorektales Karzinom | 5 |
| 3.1.2. Lebermetastasen | 8 |
| 3.1.3. Chirurgische Resektion und systemische Chemotherapie..... | 9 |
| 3.2. Regionäre Therapien..... | 10 |
| 3.2.1. Geschichte | 10 |
| 3.2.2. Interventionelle Ablationsverfahren..... | 11 |
| 3.2.3. Hepatoarterielle Infusion (HAI)..... | 11 |
| 3.2.4. Transarterielle Chemoembolisation (TACE) | 12 |
| 3.3. Bevacizumab..... | 12 |
| 3.3.1. Historie | 12 |
| 3.3.2. Pharmakologie | 13 |
| 3.3.3. Klinische Untersuchungen | 14 |
| 3.4. Irinotecan..... | 15 |
| 3.4.1. Historie | 15 |
| 3.4.2. Pharmakologie | 15 |
| 3.4.3. Klinische Untersuchungen | 17 |
| 3.5. EmboCept® S | 17 |
| 3.5.1. Pharmakologie | 17 |
| 3.5.2. Klinische Untersuchungen | 18 |
| 4. Zielsetzung und Fragestellung | 19 |
| 5. Material und Methoden | 20 |
| 5.1. Versuchstiere | 20 |
| 5.2. Tumorzelllinie | 20 |
| 5.3. Experimentelles Protokoll..... | 21 |
| 5.4. Tumorimplantation..... | 21 |
| 5.5. EmboCept® S | 23 |
| 5.6. Irinotecan..... | 23 |
| 5.7. Bevacizumab..... | 23 |
| 5.8. Modelle..... | 23 |
| 5.8.1. Anästhesie und chirurgische Präparation | 23 |
| 5.8.2. Präparation der hepatoarteriellen Infusion | 24 |
| 5.9. Hepatoarterielle Infusion | 25 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.10. | Blutentnahme..... | 25 |
| 5.11. | 3-D-Sonographie | 26 |
| 5.12. | Organentnahme..... | 26 |
| 5.13. | Untersuchungsparameter | 27 |
| 5.13.1. | Sonographie..... | 27 |
| 5.13.2. | Enzymaktivitäten | 27 |
| 5.13.3. | Histomorphologie | 28 |
| 5.13.4. | Immunhistochemie | 31 |
| 5.14. | Datenerfassung und Statistik..... | 33 |
| 6. | Ergebnisse..... | 34 |
| 6.1. | Tumorimplantation..... | 34 |
| 6.2. | Tumorwachstum | 34 |
| 6.3. | Histologische Untersuchungen..... | 35 |
| 6.3.1. | Hämatoxylin-Eosin (HE)..... | 35 |
| 6.3.2. | Nekrotischer Zelltod | 38 |
| 6.3.3. | AS-D Chloracetatesterase (CAE)..... | 40 |
| 6.4. | Immunhistochemische Untersuchungen | 40 |
| 6.4.1. | Apoptose, Caspase-3..... | 40 |
| 6.4.2. | Proliferation, PCNA | 41 |
| 6.4.3. | PECAM-1, Vaskularisierung..... | 42 |
| 6.5. | Gewicht der Versuchstiere | 44 |
| 6.6. | Laborparameter | 44 |
| 6.6.1. | Leukozyten | 44 |
| 6.6.2. | Hämoglobin | 45 |
| 6.6.3. | Thrombozyten | 45 |
| 7. | Diskussion..... | 46 |
| 7.1. | Diskussion von Material und Methoden | 46 |
| 7.1.1. | Chirurgische Präparation und Tumorimplantation..... | 46 |
| 7.1.2. | Sonographie..... | 47 |
| 7.1.3. | Hepatoarterielle Infusion eines Embolisates mit einem Chemotherapeutikum | 47 |
| 7.2. | Diskussion der Ergebnisse..... | 50 |
| 7.3. | Schlussfolgerung..... | 57 |
| 8. | Literaturverzeichnis..... | 58 |
| 9. | Publikationen | 72 |
| 10. | Danksagung | 73 |
| 11. | Lebenslauf..... | 74 |

1. Zusammenfassung

Nach Angaben des Robert Koch-Instituts wurden im Jahr 2018 rund 498.000 Krebserkrankungen erstdiagnostiziert. Davon betrafen 60.630 den Dickdarm. Es erkrankten 33.920 Männer sowie 26.710 Frauen an einem kolorektalen Karzinom. Damit stellt das kolorektale Karzinom bei der Frau mit 11,5% aller Krebsneuerkrankungen die zweithäufigste (nach Mammakarzinom mit 30%) und beim Mann mit 12,8% die dritthäufigste (nach Prostatakarzinom mit 24,6% und Bronchialkarzinom mit 13,3%) Tumorentität dar.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegen bei 15 - 20% der Patienten bereits Lebermetastasen vor. Etwa 80% der Patienten entwickeln im Verlauf Lebermetastasen. Bei circa 20 - 30% der Patienten ist die Leber die einzige Organmanifestation der Metastasierung. Ohne eine Therapie haben die Patienten mit hepatischer Metastasierung eine mediane Überlebenszeit von etwa 10 Monaten. Die chirurgische Therapie ist derzeit der einzige kurative Therapieansatz bei kolorektalen Lebermetastasen. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen zwischen 30 - 50%. Jedoch kommen nur 25% der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung für eine chirurgische Resektion in Frage. Eine palliative Therapie ist mit einer Chemotherapie sowie durch verschiedene ablativen Methoden möglich. Die hepatisch arterielle Applikation eines Chemotherapeutikums stellt ein Verfahren dar, welches den Vorteil einer hohen lokalen Wirkstoffkonzentration bei geringen systemischen Nebenwirkungen verbindet und so ein Downstaging von primär irresektablen kolorektalen Lebermetastasen ermöglicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Effektivität einer regionären EmboCept® S Therapie in Kombination mit Irinotecan und/oder Bevacizumab auf das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen sowie der Nebenwirkungen auf das gesunde Leberparenchym. Es wurden 40 Wistar Albino Glaxo Rijswijk (WAG/Rij) - Ratten in 5 Gruppen randomisiert. Diese erhielten eine subkapsuläre Implantation von 5×10^5 kolorektalen Tumorzellen (CC531) in den linkslateralen Leberlappen. Bei allen Gruppen wurde an Tag 8 eine Embolisation mit EmboCept® S über die Arteria hepatica durchgeführt. Zusätzlich wurde das Zytostatikum Irinotecan und/oder der monoklonale anti-VEGF Antikörper Bevacizumab appliziert. Die Tiere erhielten entsprechend der Zuordnung zu den Versuchsgruppen:

1. EmboCept® S (6,43 mg/kg KG)
2. EmboCept® S (6,43 mg/kg KG) plus Irinotecan (90 mg/m²)
3. EmboCept® S (6,43 mg/kg KG) plus Bevacizumab (5 mg/kg KG) oder
4. EmboCept® S (6,43 mg/kg KG) plus Irinotecan (90 mg/m²) plus Bevacizumab (5 mg/kg KG)

Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine äquivalente Menge Kochsalzlösung.

Die Tumorgröße wurde an den Tagen 8 und 11 unter Verwendung eines dreidimensionalen 40-MHz-Ultraschalls gemessen. Am Tag 11 wurden das Tumorgewebe sowie die Restleber für histologische und immunhistochemische Analysen entnommen. Des Weiteren erfolgte eine Blutentnahme zur Anfertigung eines Blutbildes.

In allen Gruppen mit Embolisation konnte eine Inhibition des Tumorwachstums erzielt werden. Die Monotherapie mit EmboCept® S konnte ein weiteres Tumorwachstum verhindern. Durch zusätzliche Verabreichung von Irinotecan konnte keine Verkleinerung des Tumolvolumens festgestellt werden. Im Gegensatz dazu erreichte die Kombination von EmboCept® S mit Bevacizumab gegenüber der EmboCept® S Monotherapie eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens. Die Dreierkombination von EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab konnte ein signifikant geringeres Tumolvolumen gegenüber der Sham-Gruppe, der EmboCept® S Monotherapie Gruppe und der Zweierkombination aus EmboCept® S und Irinotecan erzielen.

Die Angiogenese im Tumor konnte durch die intraarterielle Anwendung von EmboCept® S, insbesondere aber in Kombination mit Irinotecan und Bevacizumab signifikant gesenkt werden.

Nach der Applikation von EmboCept® S mit Irinotecan und/oder Bevacizumab kam es zu einer signifikant erhöhten Tumorzellapoptose im Vergleich zur Sham-Gruppe. Die Proliferationsrate der Hepatozyten war insgesamt niedrig. Bei der Kombination von EmboCept® S mit Bevacizumab fand sich eine signifikant geringere hepatozelluläre Proliferation gegenüber der EmboCept® S Monotherapie.

Die Analyse der Nebenwirkungen auf das normale Lebergewebe zeigte vor allem in den Gruppen mit Irinotecan eine signifikante Leberzellschädigung. Eine erhöhte Schädigung des venulären Gefäßsystems der Leber war in allen Gruppen nach Gabe von EmboCept® S zu erkennen.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass eine transarterielle Embolisation mit EmboCept® S ein effektiver therapeutischer Ansatzpunkt darstellt, um das Wachstum von kolorektalen Lebermetastasen zu hemmen. Durch die Zugabe von Bevacizumab konnte eine signifikante Tumorregression erreicht werden. Damit könnte die Embolisation mit EmboCept® S in Kombination mit Bevacizumab mit und ohne Irinotecan eine vielversprechende Strategie zur Therapie von primär inoperablen kolorektalen Lebermetastasen sein.

2. Summary

According to the Robert Koch Institute around 498.000 new cases of cancer were reported in 2018. Of these, 60.630 were colon cancers. 33.920 men and 26.710 women were diagnosed with colorectal carcinoma in 2018. Thus colorectal carcinoma is the second most common cancer in women with 11.5% of all new cancer cases (after breast carcinoma with 30%) and in third most common in men with 12.8% (after prostate carcinoma with 24.6% and bronchial carcinoma with 13.3%).

In approximately 15 - 20% of patients, liver metastases are already present at the time of diagnosis. About 80% of patients develop liver metastases during the course of the disease. In about 20 - 30% of the patients, the liver is the only organ manifestation of metastasis. Without therapy patients with liver metastases have a median survival time of about 10 months. Surgical resection is currently the only curative approach in the treatment of liver metastases. The five-year survival rates are 30 - 50%. However, only 25% of patients with colorectal liver metastases are eligible for surgical resection. Palliative approaches include chemotherapy as well as various ablative techniques. Transarterial embolisation is a method that combines the advantage of high local drug concentrations at the site of the metastases with low systemic side effects. This may enable of the downstaging of primarily irresectable colorectal liver metastases.

The aim of the present study was to investigate the efficacy of a transarterial embolisation with EmboCept[®] S in combination with Irinotecan and/or Bevacizumab on the growth of colorectal liver metastases and the side effects on the liver parenchyma.

40 Wistar Albino Glaxo Rijswijk (WAG/Rij) rats were randomised into 5 groups. The animals received subcapsular implantation of 5×10^5 colorectal tumor cells (CC531) into the left lateral lobe of the liver. In all groups, embolisation with EmboCept[®] S via the hepatic artery was performed on day 8 after tumor cell implantation. In addition, the cytostatic drug Irinotecan and/or the anti-VEGF antibody Bevacizumab were applied in the hepatic artery. According to the allocation to the experimental groups the animals received:

1. EmboCept[®] S (6,43 mg/kg BW)
 2. EmboCept[®] S (6,43 mg/kg BW) plus Irinotecan (90 mg/m²)
 3. EmboCept[®] S (6,43 mg/kg BW) plus Bevacizumab (5 mg/kg BW) or
 4. EmboCept[®] S (6,43 mg/kg BW) plus Irinotecan (90 mg/m²) plus Bevacizumab (5 mg/kg BW)
- Animals in the control group received an equivalent amount of saline solution.

The tumor size was measured on days 8 and 11 using three-dimensional 40 MHz ultrasound. On day 11 the liver including the tumor tissue was harvested for histological and immunohistochemical analyses. Furthermore, a blood sample was taken for blood count analysis.

In all treatment groups tumor growth was inhibited. The application of EmboCept® S alone completely prevented tumor growth. The addition of Irinotecan did not further inhibit the tumor growth. In contrast, the combination of EmboCept® S with Bevacizumab showed a significant reduction in tumor volume compared to EmboCept® S monotherapy. The combination of EmboCept® S, Irinotecan and Bevacizumab resulted in a significantly lower tumor volume compared to Sham, EmboCept® S monotherapy and the combination of EmboCept® S and Irinotecan.

In addition, a significantly increased rate of apoptotic tumor cell death was found after the application of EmboCept® S with Irinotecan and/or Bevacizumab compared to the Sham group. The rate of hepatocellular proliferation was overall low. The combination of EmboCept® S with Bevacizumab showed significantly lower hepatocellular proliferation compared to EmboCept® S monotherapy.

The angiogenesis within the tumor was significantly reduced by the intra-arterial application of EmboCept® S, in particular in combination with Irinotecan and Bevacizumab.

All groups with Irinotecan showed a significant increase in hepatocellular damage. After administration of EmboCept® S, there was an increased damage to the hepatic venular vascular system in all groups.

In summary, the data of the present study show that trans-arterial embolisation with EmboCept® S is an effective therapeutic strategy to inhibit the growth of colorectal liver metastases. The addition of Bevacizumab improved this effect, resulting in significant tumor regression. Thus, embolisation with EmboCept® S in combination with Bevacizumab with and without Irinotecan could be a promising strategy to treat primarily irresectable colorectal liver metastases.

3. Einleitung

3.1. Klinischer Hintergrund

3.1.1. Kolorektales Karzinom

Bösartige Neubildungen stellen nach den Herz-/Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar [Abb. 1].

Unter den malignen Erkrankungen stellt der Darm die zweithäufigste Tumorlokalisation bei Frauen bzw. die dritthäufigste Lokalisation bei Männern dar [Abb. 2].

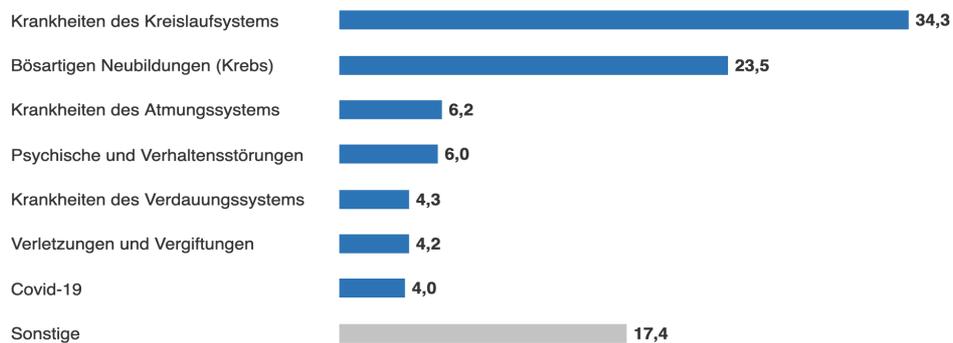


Abbildung 1 – Todesursachen nach Krankheitsarten in Prozent [Statistisches Bundesamt 2022]

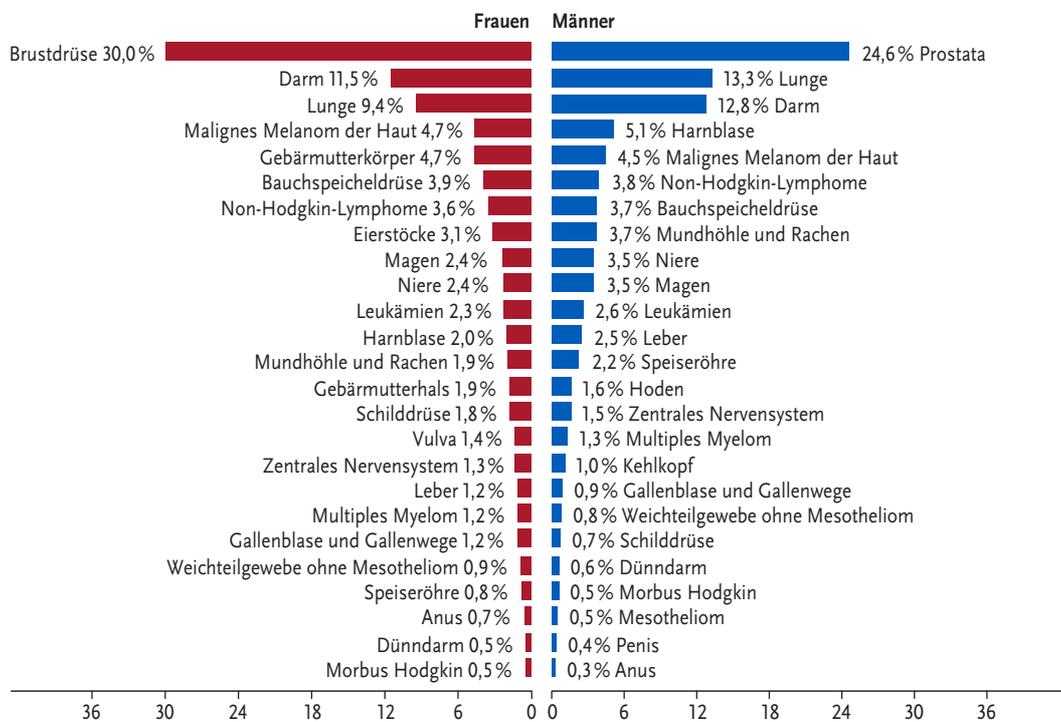


Abbildung 2 – Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen in Deutschland 2018 [Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2016/2017 13. Ausgabe, 2021]

Betrachtet man die Sterbefälle, so sind Krebserkrankungen des Darms nach der Lunge und der Brustdrüse bei Frauen bzw. Prostata bei Männern die dritthäufigste Todesursache bei malignen Erkrankungen [Abb. 3].

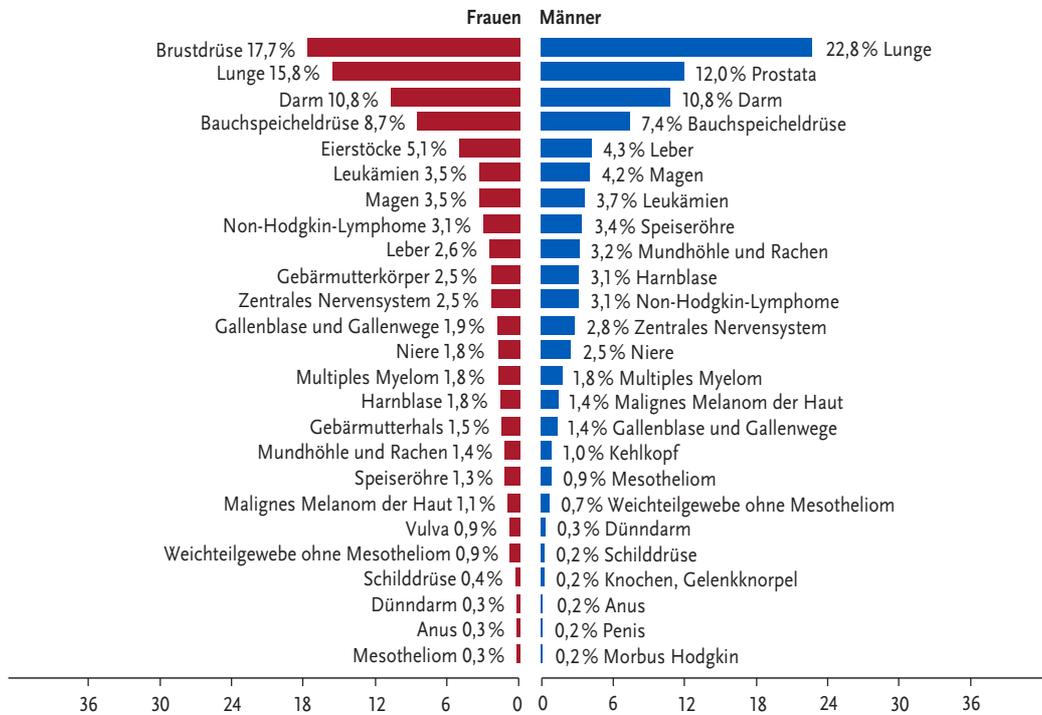


Abbildung 3 – Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2018 [Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2016/2017 13. Ausgabe, 2019]

Nach Angaben des Robert Koch-Institutes erkrankten im Jahr 2018 in Deutschland rund 33.920 Männer und 26.710 Frauen an einem kolorektalen Karzinom (CRC). Die Anzahl der Sterbefälle lag bei 13.240 Männern und 11.008 Frauen [Abb. 4].

Weltweit gab es 2018 über 1,8 Millionen neue Darmkrebsfälle und 881.000 Todesfälle [Bray et al. 2018].

Über die Hälfte der Patienten ist bei der Erstdiagnose über 70 Jahre alt, nur etwa 10% unter 55 Jahren. Somit ergibt sich ein mittleres Erkrankungsalter von 72 Jahren bei Männern und 75 Jahren bei Frauen [Robert Koch-Institut].

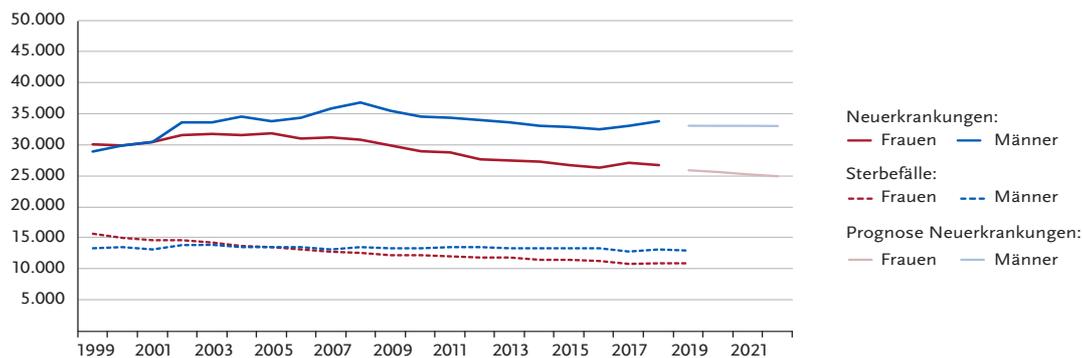


Abbildung 4 – Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle nach Geschlecht, ICD-10 C18 – C20, Deutschland 1999 – 2018/2019, Prognose (Inzidenz) bis 2022 [Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2016/2017 13. Ausgabe, 2021]

Kolorektale Karzinome sind Adenokarzinome, welche sporadisch oder erblich auftreten können. Exogene Risikofaktoren für die sporadische Form sind unter anderem Übergewicht, Bewegungsmangel oder eine ballaststoffarme, fettreiche Nahrung mit hohem Fleisch- und geringem Gemüseanteil. Regelmäßiger Alkohol- und Tabakkonsum stellen weitere Risikofaktoren dar. Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa sind bekannte endogene Risikofaktoren.

Als entscheidender Pfad bei der sporadischen Entstehung eines Kolonkarzinoms gilt seit den 1980er Jahren die „Adenom-Karzinom-Sequenz“. Diese wurde erstmalig von Morson formal pathologisch beschrieben [Morson 1962] und von Fearon et al. molekularbiologisch bewiesen [Fearon et al. 1990]. Etwa 60% der sporadischen Karzinome entstehen über diese Adenom-Karzinom-Sequenz. Die Schlüsselmutation betrifft das APC-Gen (adenomatous polyposis coli gene). Weiterhin spielen sekundäre genetische Alterationen wie Mutationen von TP53 und KRAS sowie die Entwicklung chromosomaler Instabilitäten eine wichtige Rolle [Hamilton et al. 2000].

Adenome sind also Vorläuferläsionen für ein Karzinom, die sich nach unterschiedlichen Zeitabständen zu Karzinomen entwickeln können. Sie lassen sich nach ihrem histologischen Wachstumsmuster in tubuläre, tubulo-villöse sowie villöse Adenome einteilen. Tubuläre Adenome stellen mit 70 - 80% das häufigste Wachstumsmuster dar. Das Risiko für die Entstehung eines invasiven Karzinoms steigt mit zunehmender Größe des Adenoms, einer villösen Architektur sowie dem Auftreten multipler Adenome und dem Alter des Patienten [Chao et al. 2020]. So liegt zum Beispiel die Inzidenz eines invasiven Karzinoms bei tubulären Adenomen <1cm bei etwa 1 - 2%, während sie bei villösen Adenomen >2 cm auf 50% ansteigt [Cross et al. 2020].

Neben der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz wurden in den letzten Jahren anhand molekulargenetischer Befunde weitere Pfade der Karzinomentwicklung beschrieben: zum einen der sogenannte serratierte Karzinogeneseweg, als dessen Vorläuferläsion das sessile

serratierte Adenom gilt, zum anderen ein Mischtyp, dessen Vorläuferläsionen serratierte oder villöse Adenome sein können.

Bei der selteneren erblichen familiären adenomatösen Polyposis FAP sowie dem hereditären, nichtpolypösen Kolonkarzinom-Syndrom HNPCC bestehen schon in jüngeren Jahren ein erhöhtes Erkrankungsrisiko [Robert Koch-Institut]. Das Entartungsrisiko der Kolonpolypen liegt in diesen Fällen zwischen 70 und 100%.

Insgesamt zählt das kolorektale Karzinom zu den malignen Erkrankungen mit einer mittleren Prognose, das heißt die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt etwa 50 - 60% [Abb. 5].

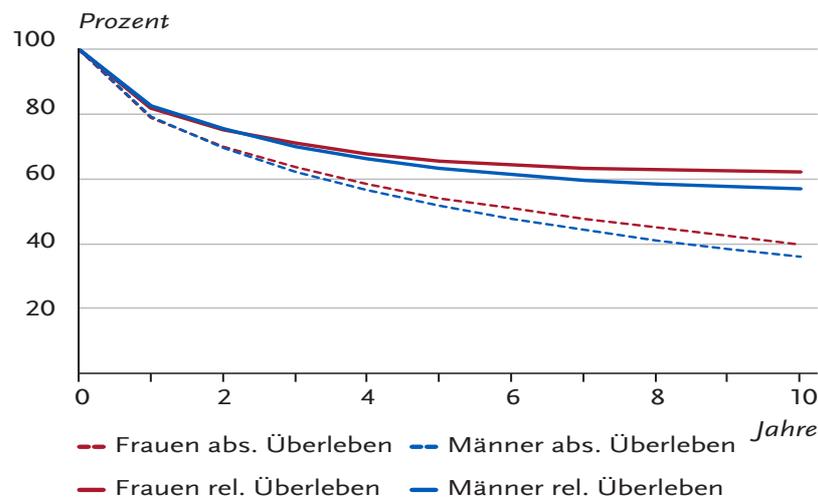


Abbildung 5 – Absolute und relative Überlebensrate bis 10 Jahre nach Erstdiagnose, nach Geschlecht, ICD-10 C18 – C20, Deutschland 2017 – 2018 [Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland 2016/2017 13. Ausgabe, 2021]

3.1.2. Lebermetastasen

Die Leber stellt den Hauptmanifestationsort kolorektaler Metastasen dar [Ferlay et al. 2015]. Bei einer hämatogenen Streuung gelangen die Tumorzellen über die Pfortader, der venösen Drainage des Darms, in die Leber [Bird et al. 2006]. Lebermetastasen treten bei etwa 60% der Patienten mit kolorektalen Karzinomen auf [Cohen et al. 2003; Ruers et al. 2017]. Bei 15 - 20% der Patienten sind bereits bei der Erstdiagnose des Kolonkarzinoms Lebermetastasen nachweisbar [Reinacher-Schick et al. 2007]. Die Metastasierung in die Leber stellt den wichtigsten Prognosefaktor dar und beeinflusst das Gesamtüberleben erheblich. Ohne eine Therapie haben Patienten mit Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms eine mediane Überlebenszeit zwischen 5 - 20 Monaten [Adam et al. 2017; Valderrama-Treviño et al. 2017]. Wird ein kolorektales Karzinom in einem frühen Stadium diagnostiziert, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei 90%, bei einer metastasierten Erkrankung sinkt sie auf 13% [American Cancer Society 2014].

3.1.3. Chirurgische Resektion und systemische Chemotherapie

Die chirurgische Resektion stellt den einzigen kurativen Therapieansatz bei Lebermetastasen dar und ist somit nach wie vor die beste Therapieoption [Vera et al. 2020]. Jedoch sind nur etwa 25% der Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen aufgrund der Anzahl, der Größe oder der Lokalisation der Metastasen für eine chirurgische Resektion geeignet [Devaud et al. 2014; Schreckenbach et al. 2015].

Nach radikaler Resektion der Lebermetastasen ist bei alleiniger hepatischer Metastasierung ein 5-Jahres-Überleben von über 50% zu erzielen [Nordlinger et al. 2013; Frankel et al. 2014]. Creasy et al. beschreiben eine 10-Jahres-Überlebensrate nach einer Resektion von 24% mit einer Heilungsrate von 20% [Creasy et al. 2018].

Der am häufigsten gebrauchte Score für die Bestimmung des Gesamtüberlebens wurde von Fong et al. beschrieben und beinhaltet 5 Risikofaktoren [Fong et al. 1999]:

- Lymphknotenpositives Tumorstadium
- Krankheitsfreies Intervall <12 Monaten
- >1 Läsion
- Größe der Läsion >5cm
- CEA (carcinoembryonic antigen) >200 ng/mL

Patienten mit allen 5 Risikofaktoren haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von 14% mit einem medianen Überleben von 22 Monaten. Bei Vorliegen eines Risikofaktors liegt das 5-Jahres-Überleben bei 44% mit einem mittleren Überleben von 51 Monaten [Fong et al. 1999]. Eine internationale Studie von Adam et al., die Daten von etwa 4500 Patienten mit präoperativ behandelten kolorektalen Lebermetastasen einschloss, bestätigte die schlechte Prognose von lymphknotenpositiven Tumorstadien, einem erhöhten CEA-Wert und einer hohen Anzahl an Metastasen [Adam et al. 2011].

Im Allgemeinen werden ein postoperatives Restlebertumorenvolumen von weniger als 30%, schwerwiegende Begleiterkrankungen, eine aggressive Tumorbilologie und/oder das Vorliegen von nicht resektablen extrahepatischen Manifestationen als Kontraindikationen für die Leberchirurgie angesehen [Nordlinger et al. 2009].

Primär nicht resektable Metastasen des kolorektalen Karzinoms können mit einer systemischen Chemotherapie behandelt werden. Daneben existieren lokale ablative Verfahren wie Mikrowellenablation oder Radiofrequenzablation zur Therapie irresektabler Lebermetastasen.

Die systemische Chemotherapie dient in diesem Zusammenhang vor allem dem Downstaging der Metastasen mit dem Ziel, im weiteren Verlauf eine chirurgische Resektion zu ermöglichen. Da die Resektion die beste Chance auf ein Langzeitüberleben ist, haben sich die Bemühungen darauf konzentriert, mehr Patienten in einen resektablen Zustand zu bringen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass ein Downstaging von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen von

ursprünglich inoperablen zu potenziell resektablen Lebermetastasen möglich ist. Die 5-Jahres-Überlebensrate ist vergleichbar mit der von Patienten mit ursprünglich resektablen Metastasen [Folprecht et al. 2014; Vera et al. 2020].

In den letzten Jahren etablierten sich neue Chemotherapeutika sowie zielgerichtete Substanzen in der Therapie kolorektaler Lebermetastasen. Die 5-Fluorouracil (5-FU) Monotherapie stellte lange Zeit die einzige verfügbare Therapie beim metastasierten kolorektalen Karzinom dar. Es konnten damit Ansprechraten von 20% und ein medianes Gesamtüberleben von etwa 12 Monaten erzielt werden [Adam et al. 2001]. Durch die zusätzliche Gabe von Oxaliplatin oder Irinotecan konnte sowohl die Ansprechrate als auch das Gesamtüberleben verbessert werden [Goldberg et al. 2004]. Die Kombination von Irinotecan, Oxaliplatin, 5-FU und Folinsäure in der Erstlinien-Therapie konnte die Ansprechrate weiter auf 60 - 70% und das Gesamtüberleben auf über 25 Monaten steigern [Masi et al. 2006]. Heutzutage sind FOLFOX (Oxaliplatin/5-FU/Leucovorin) und FOLFIRI (Irinotecan/5-FU/Leucovorin) die am häufigsten verwendeten Regime für eine first-line Chemotherapie. Sie ermöglichen eine Überlebensrate von etwa 20 Monaten [Goldberg et al. 2004]. Eine weitere Möglichkeit stellt eine Chemotherapie mit FOLFIRINOX (Leucovorin/ 5-FU/Irinotecan/Oxaliplatin) dar.

Da die systemische Chemotherapie das Überleben jedoch nur um wenige Monate verlängert [Rougier et al. 2003; Vera et al 2020], mussten alternative Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden. Zu diesen zählen zum Beispiel die Leberarterien-Chemotherapie (HAC = hepatic artery chemotherapy) und die Leberarterien-Chemoembolisation (HACE = hepatic artery chemoembolisation).

3.2. Regionäre Therapien

3.2.1. Geschichte

1954 wurde in einer Arbeit von Breedis und Young erstmals die Leber- sowie Tumorperfusion untersucht. Sie beschrieben, dass das normale Leberparenchym zu 75% über die Vena porta perfundiert wird, wohingegen Metastasen größer 3 mm aus der Arteria hepatica versorgt werden [Breedis et al. 1954]. Der internationale Durchbruch einer regionären Chemotherapie konnte durch den deutschen Chirurgen Karl Reinhard Aigner erzielt werden. Aigner begann Ende der Siebziger Jahre an einer weiteren Anwendung der regionalen Chemotherapie zu forschen. Bis dahin wurde diese nur bei Hautkrebs angewandt. 1981 führte Aigner die weltweit erste isolierte Leberperfusion mit einer Herz-Lungenmaschine am Menschen durch [Aigner et al.1988].

Das Prinzip der Chemoembolisation wurde erstmals im Jahre 1981 durch Kato et al.

beschrieben, welche die Wirkung der arteriellen Chemoembolisation mit mikroverkapseltem Mitomycin C auf verschiedene Karzinome untersucht haben [Kato et al. 1981].

3.2.2. Interventionelle Ablationsverfahren

Die nicht-operativen Ablationsverfahren stellen eine weitere Therapiemöglichkeit bei Lebermetastasen dar [Hao et al. 2020]. Bei der interventionellen Thermoablation kann mittels lokal angewandter Hitze pathologisches Gewebe selektiv zerstört werden. Zu den thermischen Ablationsverfahren zählen die laserinduzierte Thermoablation (LITT), die Radiofrequenzablation (RFA) und die Mikrowellenablation (MWA). Bei der Thermoablation werden durch Laser- oder Hochfrequenzstrom Temperaturen zwischen 50 – 100 Grad Celsius erzeugt, worauf irreversible Koagulationsnekrosen entstehen. Neben diesen hyperthermen Verfahren existiert auch die Kryotherapie [Weaver et al. 1998] als hypothermes Ablationsverfahren.

3.2.3. Hepatoarterielle Infusion (HAI)

Die Leber ist das einzige Organ mit einer dualen Blutversorgung, zum einen über die Pfortader (1000 - 1200 mL/min), zum anderen über die Arteria hepatica (400 mL/min) [Breen et al. 2004]. Daher ist die Leber ideal für eine regionäre Therapie geeignet. Segall hatte bereits 1923 die fast vollständige arterielle Versorgung von Lebermetastasen im Gegensatz zum restlichen Leberparenchym beschrieben [Segall 1923]. Auch Breedis und Young bestätigten in ihrer Arbeit von 1954, dass das normale Leberparenchym vorwiegend aus der Vena porta, Metastasen größer 3 mm jedoch aus der Arteria hepatica versorgt werden [Breedis et al. 1954]. Archer et al. konnten 1989 zeigen, dass bereits Mikrometastasen ab 0,5 mm ein eigenes arterielles Gefäßsystem besitzen [Archer et al. 1989]. Des Weiteren drainiert die Pfortader direkt in die Lebersinusoide, während das arterielle Blut erst in die peribiliären Plexus drainiert, bevor es in die Sinusoide gelangt [Burkel 1970]. Metastasen beziehen ihr Blut von arteriellen Gefäßen, die in peribiliäre Plexus drainieren [Gonda et al. 2000].

Mit einer regionären Applikation soll eine selektivere Anreicherung des Zytostatikums im Tumor und damit ein höherer Wirkstoffspiegel als bei einer systemischen Gabe erreicht werden, ohne dass eine Schädigung des gesunden Leberparenchyms auftritt.

Bereits in den 60er Jahren therapierten Sullivan et al. Patienten mit Lebermetastasen mit einer HAI und erreichten Ansprechraten von circa 62% [Sullivan et al. 1964]. In einer Metaanalyse von Cohen et al. mit Studien von 1987 bis 2003 konnte ein signifikanter Vorteil der HAI gegenüber einer intravenösen Chemotherapie in Hinblick auf das Ansprechen und die 2-Jahres-Überlebensrate gezeigt werden [Cohen et al. 2003].

So hat sich die hepatische arterielle Infusionschemotherapie als interessante Strategie entwickelt, um die Resektabilität zu erhöhen und/oder den Krankheitsprogress bei Patienten

mit primär nicht resektablen Lebermetastasen zu verlangsamen [Ammori et al. 2010; Zhang et al. 2021].

3.2.4. Transarterielle Chemoembolisation (TACE)

Das normale Leberparenchym wird zu 75% durch die Vena portae und nur zu 25% durch die Arteria hepatica versorgt. Demgegenüber werden Lebertumoren bis zu 95% durch Leberarterien versorgt. Dank dieser einzigartigen Blutversorgung der Leber wurde die TACE bzw. HAI eine effektive Alternative in der Therapie von primär nicht-resezierbaren hepatischen Neoplasien [Miura et al. 2015].

Transarterielle Chemoembolisation ist ein regionäres Therapieverfahren, das bisher am häufigsten bei der Behandlung von hepatozellulären Karzinomen (HCC) eingesetzt wird [Llovet et al. 2003; Lo et al. 2002]. Es konnte hierbei ein Überlebensvorteil im Vergleich zur best-supportive care beim inoperablem HCC gezeigt werden [Llovet et al. 2002].

Auch bei kolorektalen Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms kann eine wiederholte TACE zu Downstaging führen [Vogl et al. 2012].

Bei der Verwendung einer TACE als postoperative adjuvante Therapie nach Metastasenresektion ergaben sich signifikant reduzierte Rezidivraten, längere krankheitsfreie Überlebensraten sowie eine längere Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit chirurgischer Resektion allein [Ambiru et al. 1999].

Bei einer TACE wird ein Chemotherapeutikum zusammen mit einem Embolisat in einen den Tumor versorgenden Ast der Leberarterie injiziert. Durch die Embolisation entsteht eine Anoxie im Tumor, wodurch eine ischämische Reaktion ausgelöst wird, die zur Tumornekrose führt. Das umgebende Leberparenchym bleibt aufgrund der Blutversorgung durch die Pfortader von diesem nekrotischen Effekt verschont. Durch die zusätzliche lokale Applikation von Chemotherapeutika kann die TACE einen synergistischen Effekt erzielen mit einer hohen lokalen Chemotherapeutikakonzentration, die zu einer höheren Rate an Tumorzellnekrosen führt [Memon et al. 2012; Hatzidakis et al. 2022].

Als häufige Nebenwirkung einer TACE wird das Postembolisationssyndrom beschrieben, das bei 5 - 50% in unterschiedlicher Ausprägung auftritt. Es beinhaltet eine Schmerzsymptomatik, Fieber, Übelkeit und Erbrechen. In den meisten Fällen tritt es nach Stunden bis zu einigen Tagen nach einer TACE auf.

3.3. Bevacizumab

3.3.1. Historie

1997 beschrieben Presta et al. erstmals die Verwendung von Bevacizumab [Presta et al. 1997]. Bevacizumab stellt den ersten klinisch verfügbaren, die Angiogenese hemmenden

Antikörper dar. Die Technik zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern wurde bereits 1975 von Köhler und Milstein beschrieben [Köhler et al. 1975], wofür sie 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten.

2004 erhielt Bevacizumab von der U.S. Food and Drug Administration seine Zulassung für die Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und für die first-line Therapie beim metastasierten Kolonkarzinom. 2008 schloss sich die Zulassung für metastasierte Mammakarzinome und 2009 für das Glioblastoma multiforme an.

Bevacizumab ist zugelassen in der first- und second-line Chemotherapie bei fortgeschrittenen oder metastasierten kolorektalen Karzinomen mit LV/5-FU, IFL, FOLFOX oder XELOX [Hurwitz et al. 2004; Kabbinavar et al. 2004].

3.3.2. Pharmakologie

Bevacizumab (rhuMAb VEGF) ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler IgG Antikörper, der an Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), einem Wachstumsfaktor der Angiogenese, bindet und somit dessen Interaktion mit seinen Rezeptoren verhindert. Bevacizumab leitet sich von dem murinen Antikörper A.4.6.1. ab und besteht zu 93% aus einem humanen IgG-Gerüst und zu 7% aus murinen Antigenbindungsstellen. Die Humanisierung führte zu einer längeren Halbwertszeit und zu einer geringeren Immunogenität. VEGF ist ein 43-46 kd Glykoprotein, welches die Proliferation und Migration von Gefäßendothelzellen induziert. Diese Aktivität wird über 2 Rezeptoren gesteuert, flt-1 (VEGF-Rezeptor 1) und KDR/Flk-1 (VEGF-Rezeptor 2), die sich überwiegend auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen befinden [Ferrara et al. 1997].

VEGF stellt den Schlüsselregulator der physiologischen Angiogenese während der Embryogenese und dem Skelettwachstum dar. Außerdem ist VEGF an der pathologischen Angiogenese beteiligt, wie zum Beispiel bei Tumoren [Ferrara et al. 1997]. Auch bei weiteren Erkrankungen, wie z.B. rheumatischer Arthritis, Endometriose und verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen spielt VEGF eine Rolle [Roy et al. 2006].

Zu der Genfamilie von VEGF gehört der Placentawachstumsfaktor, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E. Diese haben verschiedene physikalische und biologische Eigenschaften und binden an verschiedene spezifische Tyrosinkinase-Rezeptoren. VEGF-A reguliert das Wachstum von Blutgefäßen, VEGF-C und VEGF-D die lymphatische Angiogenese [Karkkainen et al. 2002]. VEGF-A wird in vielen menschlichen Tumoren exprimiert und triggert nach der Bindung an den Rezeptor VEGFR-2 eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden in Endothelzellen, was zur Bildung und Ausdehnung des Gefäßsystems im Tumor führt.

Durch die gezielte Blockade von VEGF inhibiert Bevacizumab die Angiogenese [Bock et al. 2007; Papathanassiou et al. 2008]. Außerdem führt Bevacizumab zu einer Verminderung von

inflammatorischen Zellen sowie Zytokinen [Oh et al. 2009] und reduziert die Gefäßpermeabilität [Abcouwer et al. 2010].

Es wird proteolytisch überall im Körper abgebaut, einschließlich den Endothelzellen. Der Abbau ist somit unabhängig von der Leber- und Nierenfunktion.

3.3.3. Klinische Untersuchungen

Die Einführung molekularer, zielgerichteter Substanzen konnte die Therapie von Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom verbessern. Tumore sind durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität gekennzeichnet, was das Anfluten der Chemotherapeutika erschwert [Netti et al. 1996; Baish et al. 1997]. Bevacizumab kann die Wirkung der Chemotherapie verbessern, indem es die Gefäßstruktur des Tumors normalisiert, die Gefäßpermeabilität senkt [Abcouwer et al. 2010] und so zu einer effektiveren Versorgung des Tumors mit Chemotherapeutika führt [Jain et al. 2005]. Weiterhin führt Bevacizumab durch die Hemmung der Angiogenese zu einer verminderten Durchblutung des Tumors, sodass der Tumor schließlich aufgrund der Hypoxie abstirbt [Itatani et al. 2018].

Die zusätzliche Gabe von Bevacizumab zu einer konventionellen Chemotherapie kann das Gesamtüberleben und die Ansprechrate steigern. So beschrieben Hurwitz et al. eine Steigerung des medialen Überlebens der Patienten von 15,6 auf 20,3 Monate und eine Verbesserung der Ansprechrate von 34,8% auf 44,8% [Hurwitz et al. 2004]. Auch Goldberg und Kollegen wiesen in einer Studie auf den Nutzen der zielgerichteten Therapie hin und schrieben Bevacizumab einen signifikanten Nutzen für Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom zu [Goldberg et al. 2006].

Eine Metaanalyse zeigte, dass die zusätzliche Gabe von Bevacizumab zu einer Chemotherapie zu einer statistisch signifikanten Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens der Patienten führt [Hurwitz et al. 2013]. In einer randomisierten Phase III Studie von Kubicka et al. wurde durch die Zugabe von Bevacizumab zu einer fluoropyrimidinhaltigen Chemotherapie eine statistisch signifikante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen gezeigt [Kubicka et al. 2013].

So konnte durch den Zusatz von Bevacizumab in der first- und second-line Therapie in vielen Studien ein Überlebensvorteil gezeigt werden.

Welch et al. berichteten, dass Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom, die eine Fluoropyrimidin-basierte Chemotherapie als Erstlinien-Therapie erhielten, durch die Zugabe von Bevacizumab eine verlängerte Gesamtüberlebenszeit hatten. Die Autoren folgerten, dass Bevacizumab in Kombination mit einer Fluoropyrimidin-basierten Chemotherapie wirksamer ist als eine Fluoropyrimidin-basierte Chemotherapie allein [Welch et al. 2010].

Chen et al. bestätigen in ihrer Studie eine hohe Wirksamkeit und akzeptable Sicherheit der kombinierten Chemotherapie aus Bevacizumab plus FOLFIRI oder IFL (Irinotecan, Bolus Fluorouracil, Leucovorin) bei der Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen [Chen et al. 2016].

Mehrere Phase IIIb/IV Studien bestätigten ebenfalls das Sicherheitsprofil von Bevacizumab in der Therapie bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen mit Chemotherapien wie FOLFOX, XELOX, FOLFIRI oder Capecitabin [Van Cutsem et al. 2009; Grothey et al. 2008]. Häufigste Nebenwirkungen waren Diarrhö, Leukopenie, Fieber und Stomatitis [Fernando et al. 2004].

Zusammenfassend ist die zielgerichtete Therapie gegen VEGF ein vielversprechender Ansatz in der Behandlung von Tumoren. Bevacizumab hat hierbei bereits beachtenswerte Erfolge bei der Behandlung von kolorektalen Karzinomen gezeigt [Fernando et al. 2004].

3.4. Irinotecan

3.4.1. Historie

Irinotecan ist ein halbsynthetisches Derivat des Pflanzeninhaltsstoffes Camptothecin. Dieses kommt natürlich in Blättern, Samen und Rinde des Baumes *Camptotheca acuminata* vor. 1966 wurde es auf der Suche nach neuen, natürlich vorkommenden Substanzen mit antineoplastischer Wirkung erstmalig isoliert [Wall et al. 1966]. Camptothecin erwies sich in klinischen Studien durch ein ungünstiges pharmakologisches Profil für den klinischen Gebrauch ungeeignet. Daraufhin wurde in den 1990er Jahren Irinotecan als Camptothecinanalogon entwickelt und für die onkologische Therapie zugelassen [Hsiang et al. 1985].

3.4.2. Pharmakologie

Irinotecan (CPT-11) ist die internationale chemische Kurzbezeichnung (INN) des (+)-(S)-4,11-Diethyl-4,12-dihydro-4-hydroxy-3,14-dioxo-1H-pyrano-[3',4':6,7]indolizino-[1,2b]chinolin-9-yl[1,4'-bipiperidin]-1'-carboxylats (IUPAC) [Abb. 6]. Die Summenformel lautet $C_{33}H_{38}N_4O_6$, die molare Masse beträgt 586,68 g/mol.

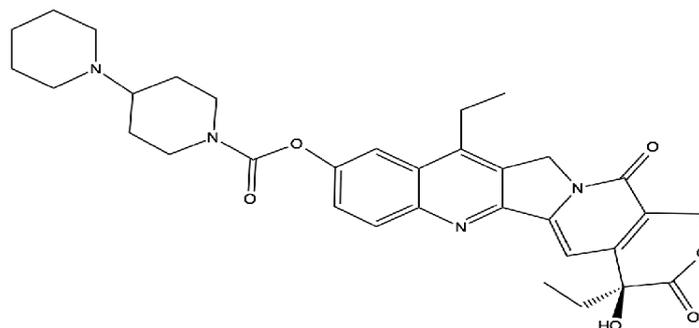


Abbildung 6 – chemische Struktur von Irinotecan, $C_{33}H_{38}N_4O_6$

Bei Irinotecan handelt es sich um einen antineoplastischen Wirkstoff, der als spezifischer Inhibitor der DNA Topoisomerase-I agiert. Irinotecan wird als Prodrug verabreicht und wird vor allem in der Leber durch eine Carboxylesterase (Spaltung der Carbamatgruppe zum Phenol) zu SN-38 metabolisiert, welches ein etwa 1000-fach stärkerer Hemmstoff der Topoisomerase-I ist als Irinotecan selbst [Mathijssen et al 2001].

Die Hemmung der DNA Topoisomerase-I durch Irinotecan oder SN-38 verursacht DNA-Einzelstrang-Brüche [Hsiang et al. 1985], wodurch die Proliferation in malignen Geweben reduziert wird. Außerdem lagern sich Irinotecan und SN-38 an den Komplex aus Topoisomerase-I und DNA an und verhindern somit den Wiederverschluss des zuvor erzeugten Einzelstrangbruches. Die mittlere Plasma-Halbwertszeit beträgt 14,2 Stunden. SN-38 zeigt ein Eliminationsprofil mit einer mittleren Halbwertszeit von 13,8 Stunden. Die Exposition gegenüber Irinotecan und SN-38 steigt proportional mit der verabreichten Dosis an. Ihre Kinetik ist unabhängig von der Anzahl der vorangegangenen Zyklen und dem Anwendungsschema. Die Plasmaproteinbindung für Irinotecan und SN-38 beträgt in vitro circa 65% bzw. 95%. Irinotecan wird über zwei Abbauwege metabolisiert. Zum einen wird Irinotecan durch eine Carboxylesterase in den aktiven Metaboliten SN-38 hydrolysiert. SN-38 wiederum wird hauptsächlich durch Glukuronidierung und darauffolgend durch biliäre und renale Elimination ausgeschieden. Trotz der Glukuronidierung werden nur etwa 10 - 20% des Irinotecans unverändert über die Nieren ausgeschieden. Die Hauptausscheidung erfolgt mit über 60% über den Darm. Des Weiteren kann Irinotecan durch Cytochrom P450 3A unter Öffnung des äußeren Piperidin-Rings oxidativ abgebaut werden.

In der Klinik wird Irinotecan-Actavis® Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung verwendet. Als Darreichungsform liegt es als eine klare, farblose bis leicht gelbliche Lösung vor. Zu den Anwendungsmöglichkeiten gehört zum einen die Kombination mit 5-Fluorouracil und Folinsäure bei Patienten ohne vorausgegangene Chemotherapie eines fortgeschrittenen Tumorstadiums (Dosierung 180 mg/m² Körperoberfläche als intravenöse Infusion über 30 - 90 min im Abstand von jeweils drei Wochen). Weiterhin kann Irinotecan als Monotherapie bei Patienten, die auf eine Vorbehandlung mit einem etablierten, 5-Fluorouracil-enthaltenden Regime nicht angesprochen haben, eingesetzt werden (Dosierung 350 mg/m² Körperoberfläche).

Zu den möglichen Nebenwirkungen zählen Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen, Dehydratation, Obstipation, Neutropenie, Thrombozytopenie, Niereninsuffizienz, Hypotension, Herzkreislaufversagen, akutes cholinerges Syndrom, interstitielle Lungenerkrankung, reversible Alopezie, allergische Reaktionen sowie ein Ansteigen der Serumtransaminasen, der alkalischen Phosphatase oder des Bilirubins. Außerdem kann Irinotecan zu einer Steatohepatitis führen [Fernandez et al. 2005].

3.4.3. Klinische Untersuchungen

Irinotecan war nach 5-FU bei intravenöser Anwendung der erste Stoff mit einem signifikanten Nutzen bei metastasierten kolorektalen Karzinomen. Irinotecan wurde zur Standardtherapie bei der Behandlung von Metastasen des kolorektalen Karzinoms [Eyol et al. 2008].

Eine Phase III Studie von Douillard et al. konnte die Wirkung von Irinotecan bei Patienten mit 5-FU refraktärem kolorektalem Karzinom aufzeigen. Das mediane Überleben stieg von 14,1 auf 17,4 Monaten, das progressionsfreie Intervall von 4,4 auf 6,7 Monaten. Auch das Ansprechen auf die Therapie verbesserte sich durch Irinotecan von 31 auf 49% [Douillard et al. 2000].

Die Kombinationschemotherapie von Leucovorin, 5-FU und Irinotecan oder Oxaliplatin zeigten eine signifikante antineoplastische Aktivität und einen Überlebensvorteil gegenüber einer Bolusgabe oder kontinuierlichen Infusion von 5-FU [Punt 2004].

Die Sicherheit und Effektivität von Irinotecan wurde unter anderem in einer Studie von Cunningham et al. bei Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom bestätigt [Cunningham et al. 1998].

3.5. EmboCept® S

3.5.1. Pharmakologie

EmboCept® S ist eine Suspension aus pflanzlichen Stärkemikrosphären (DSM = degradable starch microspheres 35/50) mit einem mittleren Durchmesser von 50 µm. Die Stärkemikrosphären bestehen aus einer dreidimensionalen, horizontal und vertikal vernetzten hydrophilen Stärkematrix. Durch das Enzym α -Amylase können die Stärkemikrosphären vollständig abgebaut werden. Die Halbwertszeit beträgt etwa 35 min. Der Blutfluss wird nach der Injektion innerhalb einer Stunde wiederhergestellt.

Die intraarterielle Verabreichung von EmboCept® S führt zu einem vorübergehenden Verschluss der kleineren, arteriolären Gefäße. Die Menge an appliziertem Embolisat ist für den Grad der Reduktion des Blutflusses im Zielorgan verantwortlich. In Kombination mit einem Chemotherapeutikum ergeben sich folgende Vorteile [Fachinfo Pharma Cept: EmboCept®]:

- Spezifische Anreicherung des gleichzeitig applizierten Wirkstoffes im Tumorgewebe (Verhinderung des raschen Auswaschens aus dem Parenchym des Zielorganes)
- Geringe systemische Wirkstoffspiegel (deutliche Verringerung der Nebenwirkungsrate)
- Tumorschädigung durch kurzzeitige Ischämiewirkung
- Kurzfristige Wiederholbarkeit der Chemoembolisation

3.5.2. Klinische Untersuchungen

Im Rahmen der Therapie von hepatisch-metastasierten Karzinomen kann durch eine regionäre Therapie mit Embolisaten wie Lipiodol [Raoul et al. 1992] oder abbaubaren Stärkemikrosphären [Fournier et al. 1994] eine Verbesserung der Arzneimittelkonzentration und Expositionsdauer durch Reduktion des arteriellen Blutflusses erreicht werden. Stärkemikrosphären werden in den Blutgefäßen angereichert und verursachen eine temporäre Embolisation für 15 - 30 Minuten, bis sie enzymatisch durch Amylase abgebaut werden [Civalleri et al. 1991]. Eine temporäre Embolisation der Arteria hepatica mit DSM ist bei Schweinen mit einer kompletten Reperfusion nach 30 Minuten durchführbar. Selbst nach einer kompletten Stase des arteriellen Blutflusses wurden keine erheblichen Gewebeschäden des embolisierten Leberparenchyms bei der histologischen Untersuchung beobachtet [Pieper et al. 2015].

Die Verwendung von Stärkemikrosphären erhöht die Konzentration der mitverabreichten Substanzen im Tumor um ein Vielfaches. Lorelius et al. beschreiben eine 11-fach höhere Konzentration durch die zusätzliche Injektion der Stärkemikrosphären [Lorelius et al. 1984]. Entsprechend führt die zusätzliche Verabreichung von DSM zu niedrigeren systemischen Konzentrationen der verabreichten zytotoxischen Substanzen im Vergleich zur alleinig systemisch durchgeführten Chemotherapie [Dakhil et al. 1982].

4. Zielsetzung und Fragestellung

Die transarterielle Embolisation der Leber bei Lebermetastasen und primären hepatozellulären Karzinomen stellt ein bereits etabliertes Verfahren dar. Die in dieser Studie verwendeten Medikamente Irinotecan und Bevacizumab gehören zur first-line Therapie bei kolorektalen Lebermetastasen. Allerdings gibt es keine vergleichenden Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombination von EmboCept® S mit Bevacizumab und/oder Irinotecan. Daher haben wir in der vorliegenden Studie die Effektivität der verschiedenen Kombinationen auf das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen sowie die Auswirkungen auf das Leberparenchym untersucht. Hierfür wurden folgende Fragen beantwortet:

- Wie wirkt sich die Gabe von
 - a) EmboCept® S (6,43 mg/kg KG)sowie die Kombination von
 - b) EmboCept® S (6,43 mg/kg KG) plus Irinotecan (90 mg/m²)
 - c) EmboCept® S (6,43 mg/kg KG) plus Bevacizumab (5 mg/kg KG) oder
 - d) EmboCept® S (6,43 mg/kg KG plus Irinotecan (90 mg/m²) plus Bevacizumab (5 mg/kg KG)auf die Tumorgröße aus?

- Wird die Tumorregression nach einer derartigen Therapie durch Tumorzell-Apoptose oder Nekrose verursacht?

- Wie beeinflussen die einzelnen Substanzen bzw. eine Kombination der Substanzen die Proliferation der Tumorzellen?

- Kann die Vaskularisierung des Tumors durch die einzelnen Substanzen oder aber durch die Kombination der Substanzen vermindert werden?

- Beeinträchtigen die Substanzen bzw. eine Kombination der Substanzen das gesunde Leberparenchym?

5. Material und Methoden

5.1. Versuchstiere

Alle Experimente wurden von der Ethikkommission des Saarlandes genehmigt und in Übereinstimmung mit den UKCCCR-Richtlinien für das Wohlergehen von Tieren bei experimentellen Neoplasien [United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research, 1998] und den interdisziplinären Grundsätzen und Richtlinien für den Einsatz von Tieren in der Forschung durchgeführt.

Die Tiere wurden von Charles Rivers, Sulzfeld, BRD käuflich erworben.

40 männliche WAG-Ratten wurden in 5 Gruppen zu je 8 Tieren randomisiert. Während der Versuche wurden die Tiere unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur 22°C, Luftfeuchtigkeit 55% +/- 10%) mit einem Hell-/Dunkelrhythmus von 12/12 Stunden in der Versuchstierhaltung des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg, gehalten (Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. Monika Frings). Das Körpergewicht der Ratten betrug 150 – 175 g. Die Tiere wurden mit Standardlaborfutter (Firma Altromin, Lage, BRD) sowie mit Wasser ad libitum gefüttert. Als postoperative Schmerztherapie wurde Capropfen (Pfizer Inc., New York, USA) in einer Dosierung von 5 mg/kg KG verabreicht.

5.2. Tumorzelllinie

Als rattenspezifisches Kolonkarzinom wurde die Tumorzelllinie CC531 (CLS, Cell Lines Service and Tumor-Cellbanc, Heidelberg, BRD) eingesetzt. Die Zelllinie wurde vor Versuchsbeginn bei -180°C in flüssigem Stickstoff in 1,8 mL Kryogefäßen (Nunc, Roskilde, DK) kryokonserviert. Zum Versuch wurden die Gefäße in 37°C warmem Wasser aufgetaut und in 50 mL Zentrifugenröhrchen (Roth, Karlsruhe, BRD) mit FCS-haltigem Kulturmedium (FCS, Fetal calf serum, Gold, PAA, Cölbe, BRD) überführt. Nach zwei jeweils fünfminütigen Zentrifugationsschritten (Universal 30F, Hettisch, Tuttlingen, BRD) bei 1600 U/min wurden die Zellen in Petrischalen (Cellstar, 100/20 mm, Greiner Bio-One, Frickenhausen, BRD) ausgesät und bei 37°C unter 5%iger humiden CO₂-Atmosphäre in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium kultiviert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt. Lag eine Konfluenz von 70-80% vor, wurden die Zellen zur Vermehrung passagiert.

Für die Injektion der Tumorzellen wurden diese mit einer 0,02%igen Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 g/l, 0,2 g/l, Viorolex, PAA) versetzt und die Zellen anschließend mit dem Enzym Accutase (PAA) aus den Kulturgefäßen gelöst. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Inkubation bei 37°C. Nach der Neutralisation der Enzymwirkung mit FCS-haltigem Kulturmedium wurden die Zellen erneut 5 Minuten zentrifugiert (1600 U/min) und somit gewaschen. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS (Phosphat buffered solution, PAA) behandelt, erneut zentrifugiert, im

Verhältnis 1:2 ausgedünnt und zu einer 70-80%igen Konfluenz kultiviert. In der darauffolgenden zweiten Passage wurden die Zellen noch einmal 1:4 bis 1:5 ausgedünnt. Am zweiten Tag nach der Passagierung waren die Zellen für die Experimente einsatzbereit. Mit einem inversen Lichtmikroskop (Leica DMIL, Solms, BRD) wurde eine Zellzählung bei 100-facher Vergrößerung (Objectiv Leica C Plan 10x/0,22, PHI, Okkular Leica 10x/18) in einer Neubauer-Zählkammer (auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen / 50 μ l PBS eingestellt) durchgeführt.

5.3. Experimentelles Protokoll

Die 40 Versuchstiere wurden in 5 experimentelle Gruppen randomisiert (jeweils n=8). An Tag 0 wurde jeweils eine Tumorsuspension mit 5×10^5 Tumorzellen CC531 in den linken Leberlappen implantiert. Acht Tage nach der Tumorimplantation wurde eine hepatoarterielle Infusion über die Arteria hepatica durchgeführt. Eine Gruppe erhielt zur Therapie EmboCept[®] S (6,43 mg/kg KG). Die zweite Gruppe erhielt EmboCept[®] S zusammen mit Irinotecan (90 mg/m²) und die dritte Gruppe EmboCept[®] S plus Bevacizumab (5 mg/kg KG). Die vierte Gruppe erhielt eine Kombinationstherapie mit EmboCept[®] S, Bevacizumab und Irinotecan. Die Tiere der Sham-Gruppe erhielten eine äquivalente Menge 0,9%iger Kochsalzlösung (ecotainer[®], Braun, Melsungen, BRD) und dienten somit als Kontrollgruppe. Die Applikation erfolgte innerhalb eines Zeitraumes von einer Minute. Anschließend erfolgte eine Sonographie der Leber von ventral mit dem 40 MHz-Ultraschallkopf eines Vevo 770 (Visual Sonics, Inc., Toronto, Kanada) zur Messung der Tumorgöße. Des Weiteren erfolgte eine Entnahme von 1 mL Blut aus der Vena cava inferior. Drei Tage später erfolgten eine erneute Relaparotomie und Sonographie der Leber. Nach einer weiteren Blutentnahme aus der Vena cava wurden die Tiere mit Pentobarbital (400 mg/kg KG) eingeschläfert und Gewebeproben für die histologische und immunhistochemische Analyse entnommen.

5.4. Tumorimplantation

An Tag 0 wurden die mit Isofluran narkotisierten Versuchstiere (Isofluran Baxter, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, BRD) in Rückenlage auf einem elektronisch geregelten Heizkissen positioniert, das die Körpertemperatur auf 37°C hielt. Danach wurde die Bauchregion rasiert (Elektra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, BRD). Dann wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt, der linkslaterale Leberlappen mobilisiert, ausgelagert und anschließend pro Injektion eine Tumorsuspension mit 5×10^5 CC531-Zellen in 0,5 mL PBS mit einer 27 G Nadel (Omnicon F, Braun, Melsungen, BRD) dorsalseits unter die Leberkapsel injiziert [Abb. 7]. Beim Herausziehen der Kanüle aus der Leber wurde die Injektionsstelle unter

leichtem Druck mit Hilfe eines Wattestäbchens (Finkler & Walter GmbH, Merchweiler, BRD) verschlossen, um das Risiko einer Nachblutung zu verringern. Weiterhin sollte der Rückfluss der Tumorzellen mit Ausbildung einer Peritonealkarzinose vermieden werden. Die injizierte Tumorsuspension war dorsalseits am Leberlappen deutlich zu erkennen [Abb. 8]. Danach wurde die Laparotomie zweireihig mit einer Muskel-, Fasziennaht sowie einer Hautnaht verschlossen.



Abbildung 7 – WAG Ratte an Tag 0 nach medianer Laparotomie, Injektion von 5×10^5 CC531 Tumorzellen in den mobilisierten und ausgelagerten linkslateralen Leberlappen



Abbildung 8 – Anreicherung der CC531 Tumorzellsuspension (*) nach subkapsulärer Injektion in den linkslateralen Leberlappen einer WAG Ratte an Tag 0 nach Implantation; Kompression der Injektionsstelle mit einem Wattestäbchen zur Vermeidung einer Tumorzellaussaat und Nachblutung

5.5. EmboCept® S

EmboCept® S (Pharmacept GmbH, Berlin, BRD) ist eine sterile Suspension, welche aus Stärkemikrosphären mit einem mittleren Durchmesser von 50 µm besteht. Diese pflanzlichen Stärkemikrosphären sind aus einer dreidimensionalen, horizontal und vertikal vernetzten Stärkematrix aufgebaut. Enzymatisch ist die Stärke durch α-Amylase vollständig abbaubar. Die Halbwertszeit beträgt 35 Minuten. Verwendet wurde EmboCept® S in einer Dosierung von 6,43 mg/kg Körpergewicht.

5.6. Irinotecan

Irinotecan (Actavis Deutschland GmbH, München, BRD) ist ein antineoplastischer Wirkstoff aus der Gruppe der Topoisomerase-I-Hemmer. Durch die Hemmung der Topoisomerase-I entstehen Einzelstrang-DNA-Brüche, welche die Replikation der DNA blockieren. Diese zytotoxische Wirkung ist spezifisch für die S-Phase. Verwendet wurde das Zytostatikum in einer Dosierung von 90 mg/m² Körperoberfläche.

5.7. Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, BRD) ist ein rekombinanter humanisierter monoklonaler Antikörper, der mittels DNA-Technologie aus Ovarialzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen) gewonnen wird. Er bindet an den Gefäßwachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und verhindert die Bindung von VEGF an seine Rezeptoren auf Endothelzellen. Verwendet wurde der Antikörper in der Dosierung 5 mg/kg Körpergewicht.

5.8. Modelle

5.8.1. Anästhesie und chirurgische Präparation

In der beschriebenen Versuchsreihe wurde die Embolisation mittels EmboCept® S in Kombination mit verschiedenen Medikamenten sowie eine Kochsalz-Applikation zur Kontrolle als Infusion in die Arteria hepatica untersucht. Folgende Kombinationen wurden untersucht:

- a) Natriumchlorid (Sham) n=8
- b) EmboCept® S * n=8
- c) EmboCept® S + Irinotecan * n=8
- d) EmboCept® S + Bevacizumab * n=8
- e) EmboCept® S + Irinotecan + Bevacizumab * n=8

* Dosierungen: EmboCept® S 6,43 mg/kg KG, Irinotecan 90mg/m², Bevacizumab 5 mg/kg KG

Die Anästhesie sowie die chirurgische Präparation wurden wie folgt durchgeführt:

Die Versuchstiere wurden mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wurden die Tiere gewogen, ihre Bauchregion rasiert (Elektra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, BRD) und in Rückenlage mittels Pflasterstreifen auf dem Versuchstisch fixiert. Der Operationstisch bestand aus einer Metallplatte mit einem integrierten Heizelement (Effenberger, Pfaffing/Attel, BRD), mit welchem über eine rektale Temperatursonde die Temperatur der Versuchstiere konstant zwischen 35°C und 37°C gehalten werden konnte. Zu Beginn wurde erneut eine mediane Laparotomie entlang der Naht der Tumorimplantation vorgenommen. Um das Operationsgebiet optimal darzustellen, wurde der Situs durch Wundhaken aufgespannt. Verwachsungen wurden beseitigt und die Leberligamente (Ligamentum falciforme hepatis, Ligamentum teres hepatis, Ligamenta triangulare dextrum et sinistrum) gelöst. Dann wurde das Interstitium auf der linken Körperseite der Versuchstiere auf eine befeuchtete Mullkomresse ausgelagert und während der gesamten Operationszeit kontinuierlich durch Befeuchtung mit Kochsalz vor dem Austrocknen geschützt.

5.8.2. Präparation der hepatoarteriellen Infusion

Nachdem der Situs wie unter 5.8.1 beschrieben präpariert worden war, wurde die Arteria gastroduodenalis freipräpariert und mit 6-0 Seidefäden (Resorba Wundversorgung GmbH & Co KG, Nürnberg, BRD) zweifach angeschlungen. Nun wurde der Blutfluss kurzzeitig mittels einer feinen Gefäßklemme unterbrochen und eine Arteriotomie mit Hilfe einer feinen Präparationsschere durchgeführt. Anschließend wurde ein heparinisierte Katheter (PE-50, ID 0,28, Portex, Hythe, UK) in die Arterie eingeführt und retrograd bis zum Abgang aus der Arteria hepatica vorgeschoben [Abb. 9 und 10].

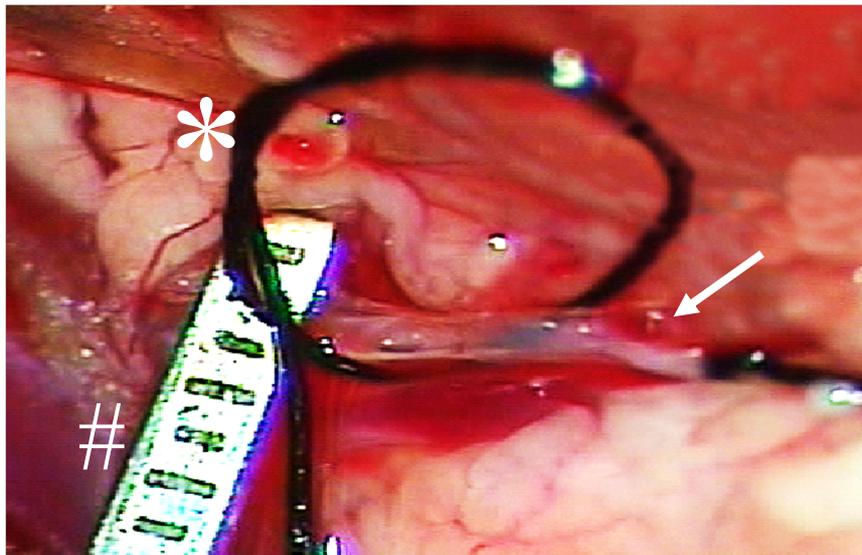


Abbildung 9 – Situs einer WAG Ratte nach Laparotomie an Tag 8. Die Arteria gastroduodenalis (Pfeil) ist freipräpariert, mit 6-0 Seidefäden (*) angeschlungen und mit einer feinen Gefäßklemme (#) verschlossen. Nach Arteriotomie wird hier der Portex-Katheter bis zum Abgang aus der Arteria hepatica vorgeschoben

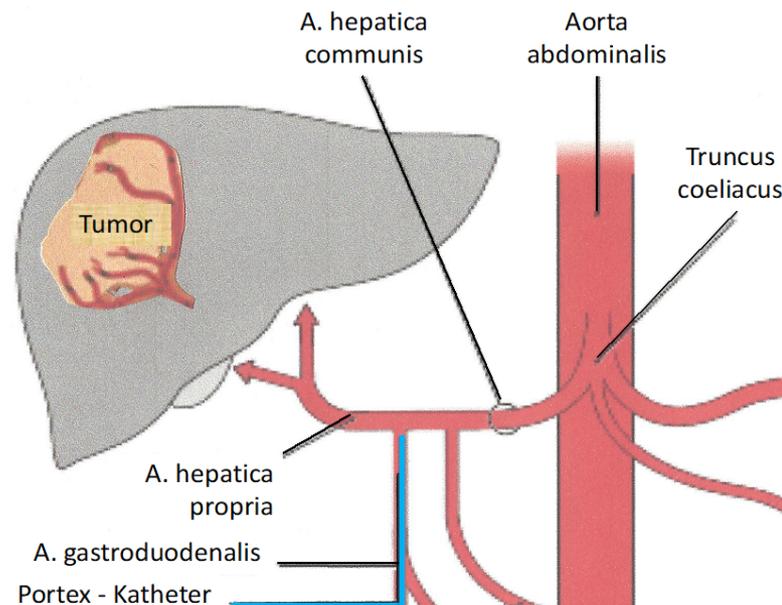


Abbildung 10 – Schematische Darstellung der hepatoarteriellen Infusion [modifiziert nach Thieme Bilddatenbank, Überblick über das arterielle Versorgungsgebiet des Truncus coeliacus]. Der Portex – Katheter wird über die A. gastroduodenalis bis zum Abgang aus der A. hepatica propria vorgeschoben

5.9. Hepatoarterielle Infusion

Nachdem der Katheter wie in 5.8.2 beschrieben über die Arteria gastroduodenalis eingebracht worden war, erhielten die Versuchstiere über diesen Zugang kontinuierlich über 1 Minute die den Versuchsgruppen entsprechenden Substanzen. Die Sham-Gruppe erhielt eine äquivalente Menge an Kochsalz (NaCl). Im Anschluss an die Applikation wurde der Katheter entfernt, die Arteria gastroduodenalis ligiert, das Interstitium rückverlagert und der Situs durch eine zweireihige Naht der Muskelfasziën und der Haut verschlossen.

5.10. Blutentnahme

Mit einer 23 G Nadel (Troge Medical GmbH, Hamburg, Germany) wurde den Tieren an Tag 8 sowie an Tag 11 jeweils etwa 1 mL Blut aus der Vena cava inferior zur späteren Analyse abgenommen und in EDTA-Röhrchen im Kühlschrank gelagert. Später wurde das Blut bei 4000 U/min und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert, das Serum in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -70°C tiefgefroren. Als Indikator für einen eventuellen hepatozellulären Schaden wurden mit Hilfe eines Spektrometers die Serumaktivitäten der Leberenzyme GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), LDH (Laktatdehydrogenase), GLDH (Glutamatdehydrogenase) und γ -GT (Gamma-Glutamyl-Transferase) bestimmt.

5.11. 3-D-Sonographie

Zur Ultraschalluntersuchung der Versuchstiere diente der 40 MHz Ultraschallkopf des hochauflösenden Ultraschallgerätes Vevo 770 (VisualSonics, Inc., Toronto, Ontario, Kanada). Die Ultraschallanalysen der Tumore wurden in situ direkt auf der Leberoberfläche nach der hepatoarteriellen Infusion an Tag 8 sowie zum Ende des Experiments an Tag 11 durchgeführt. Während der Untersuchung waren die Tiere unter der in 5.8.1 beschriebenen Anästhesie auf einer Heizplatte gelagert und fixiert. Der tumortragende linkslaterale Leberlappen wurde von seinen Ligamenten frei präpariert und auf einer Kompresse ausgelagert. Der Schallkopf wurde über einem Kissen von Ultraschallgel aufgesetzt [Abb. 11].

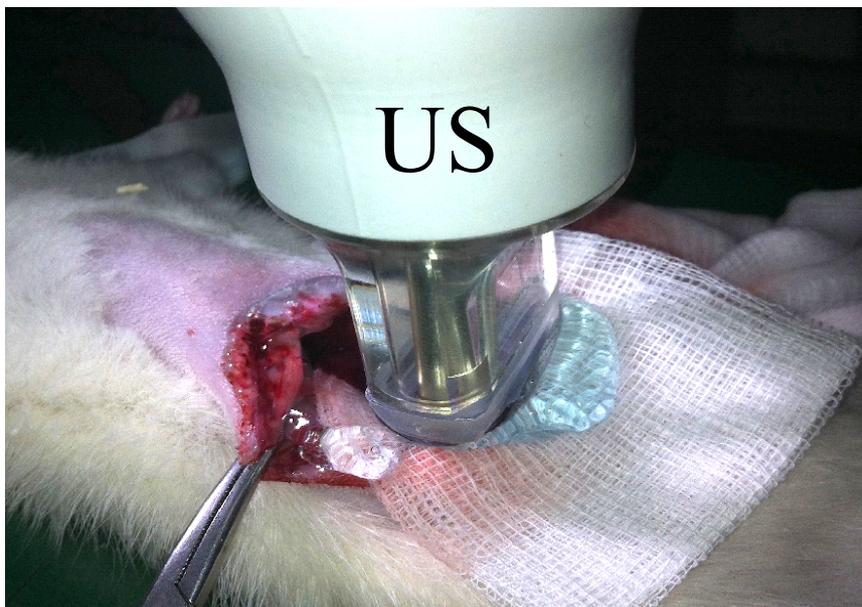


Abbildung 11 – Mit Isofluran narkotisierte WAG Ratte in Rückenlage nach Relaparotomie an Tag 8. Ultraschallbildgebung mittels 40-MHz-Ultraschallsonde (US) Vevo 770 in situ direkt auf der Leberoberfläche

5.12. Organentnahme

An Tag 11 des Versuchs wurden die Versuchstiere mit 80 mg/kg KG Ketamin sowie 5 mg/kg KG Rompun® narkotisiert, erneut gewogen, rasiert und auf der Heizplatte gelagert und fixiert. Der Situs wurde durch eine mediane Relaparotomie eröffnet. Daraufhin wurde den Tieren intraperitoneal eine Überdosis Nacoren (Merial GmbH, Halbergmoos, BRD) verabreicht um sie einzuschläfern, sodass eine Organentnahme möglich war. Es wurden der tumortragende Leberlappen sowie der gesunde tumorfreie Leberlappen entnommen. Jeweils ein Stück der Proben wurde in Formalin und Tissue-tek (Weckert Labortechnik, Kitzingen, BRD) fixiert beziehungsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C eingelagert.

5.13. Untersuchungsparameter

5.13.1. Sonographie

Zur dreidimensionalen Darstellung der Tumore wurden mit Hilfe der hochauflösenden Sonographie zwei parallele zweidimensionale Bildserien in 50 µm Intervallen angefertigt. Für die dreidimensionale Rekonstruktion des Tumors wurden die Daten in zweidimensionalen Bildern (200 µm) offline skizziert. Diese Daten wurden von der integrierten Software des Ultraschallgeräts verwendet, um ein dreidimensionales Bild zu erhalten und das Tumolvolumen zu berechnen [Abb. 12]. Die Validität der Ultraschallbilder und der berechneten Tumorumfänge im Vergleich zu den histologisch bestimmten Volumina wurde bereits in vorhergegangenen Studien belegt. So zeigte sich in den Arbeiten von Laschke et al. nur eine geringe Abweichung, die auf den Flüssigkeitsverlust während der Fixierung der histologischen Proben zurückzuführen ist [Laschke et al. 2010].

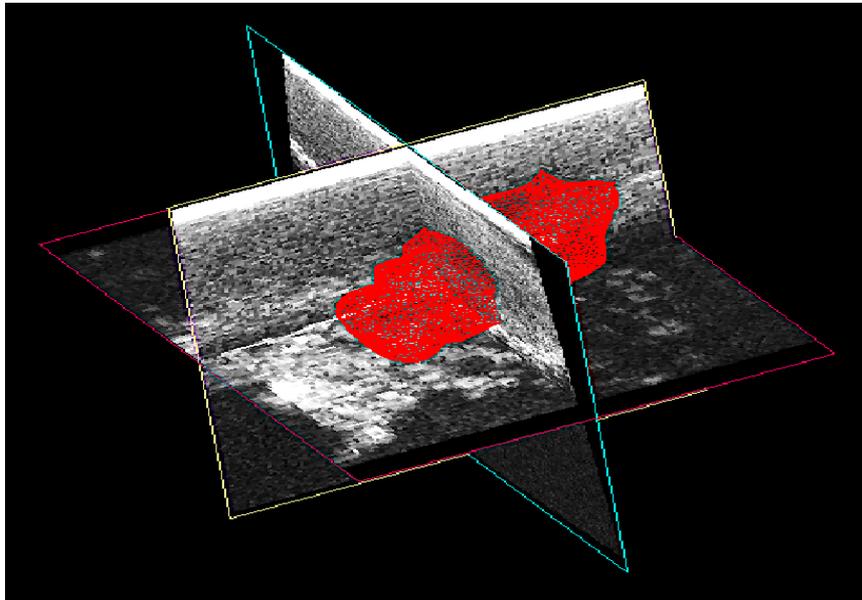


Abbildung 12 – 3-D-Rekonstruktion des Tumors (in rot) mit Hilfe der im Ultraschallgerät integrierten Software zur Berechnung des Tumolvolumen

5.13.2. Enzymaktivitäten

An Tag 8 und 11 erfolgte jeweils die Entnahme von 1 mL Blut aus der Vena cava inferior. Ein Teil des Blutes wurde mit einem EDTA Röhrchen entnommen und daraus umgehend ein Differentialblutbild bestimmt (Coulter AcT diff, Coulter Electronics Ltd., Buckinghamshire, UK). Der andere Teil des Blutes diente einer späteren Bestimmung von Enzymaktivitäten. Die Proben wurden in einer Kühlzentrifuge (Universal 30RF, Hettich, Tuttlingen) bei 3000 U/min und 4°C für 3 Minuten zentrifugiert. Das Serum wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bei -70°C tiefgefroren. Um eine mögliche hepatozelluläre Schädigung festzustellen, erfolgte die

Bestimmung der Serumaktivität der Leberenzyme GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase), GPT (Glutamat-Pyruvat-Transaminase), LDH (Laktatdehydrogenase), GLDH (Glutamatdehydrogenase) und γ -GT (Gamma-Glutamyl-Transferase). Ein Anstieg der Transaminasen GOT und GPT korreliert mit dem Ausmaß der Leberschädigung. LDH ist nicht organspezifisch, nur die Isoenzyme LDH 4 und 5 sind leberspezifisch. Kommt es zu einer Schädigung von Hepatozyten, wird das Enzym freigesetzt und dient somit als Marker einer Leberzellschädigung. Auch ein erhöhtes GLDH weist auf einen Leberparenchymschaden hin. Es kommt in den Hepatozyten ausschließlich intramitochondrial vor und wird bei einer Zellschädigung freigesetzt. Die γ -GT ist im Gegensatz zu den anderen Leberenzymen membrangebunden. Sie katalysiert den Transfer von Aminosäuren in die Zelle. Ihre Erhöhung ist proportional zum Ausmaß der Leberschädigung.

5.13.3. Histomorphologie

Das nach Versuche an Tag 11 wie in 5.12 beschrieben entnommene Gewebe von Leber und Tumor wurde in 4%igem phosphatgepuffertem Formalin für zwei bis drei Tage fixiert und dann in Paraffin eingebettet.

Für die histologische Untersuchung wurde von dem entnommenen Gewebe 5 μ m dicke Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) oder mit AS-D Chloracetatesterase (CAE) gefärbt.

Folgende Parameter wurden an HE-gefärbten Präparaten analysiert:

1. in Hepatozyten [Abb. 13]:
 - Grobscholligkeit des Zytoplasmas
 - hepatozelluläre Vakuolisierung

Es wurden jeweils 25 High Power Fields (HPF) pro Leberschnitt ausgewertet. Die hepatozelluläre Vakuolisierung ist ein Maß für die hepatozelluläre Schädigung und wurde mit einem semiquantitativen Score analysiert [Calabrese et al. 1997]:

- Grad 0 = Keine Schädigung (0% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 1 = Leichte Schädigung (< 30% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 2 = Mäßige Schädigung (30-70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)
- Grad 3 = Schwere Schädigung (>70% der Hepatozyten weisen das Merkmal auf)

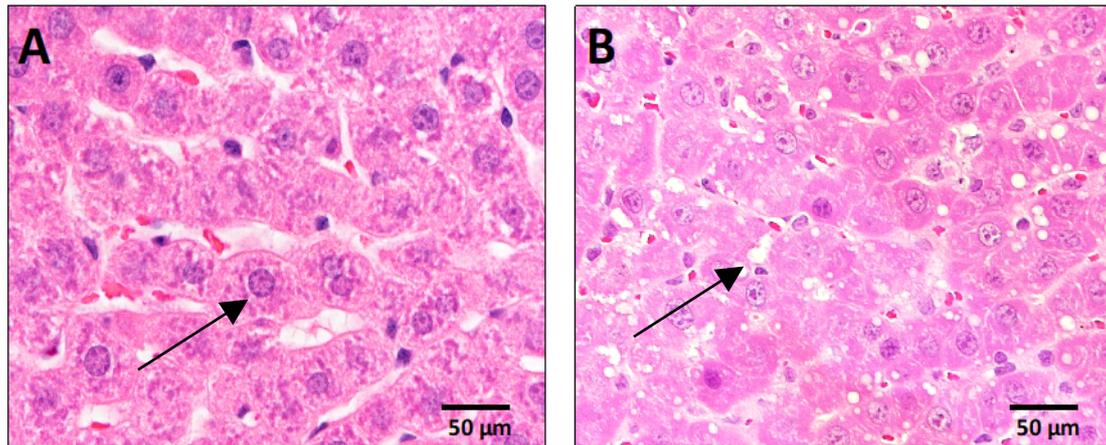


Abbildung 13 – HE gefärbte histologische Präparate einer Leber von WAG Ratten in 400-facher Vergrößerung 11 Tage nach Therapie mit (A, B) EmboCept® S und Irinotecan . Bild (A) zeigt grobschollige (Pfeil) und (B) vakuolierte Hepatozyten (Pfeil) als Hinweis auf eine Zellschädigung

2. in Gefäßen [Abb. 14]:

- Fibrinthrombosierung
- Endothelablösung
- Wandständigkeit der Erythrozyten

Auch hier wurden 25 HPF analysiert. Die venuläre Endothelablösung wurde durch Zählen der Anzahl der Venolen mit Ablösung der Endothelzellen pro HPF bewertet.

Um die venuläre Fibringerinnung anzuzeigen, wurde die Anzahl der Venolen mit Fibringerinnseln in Prozent aller Venolen angegeben.

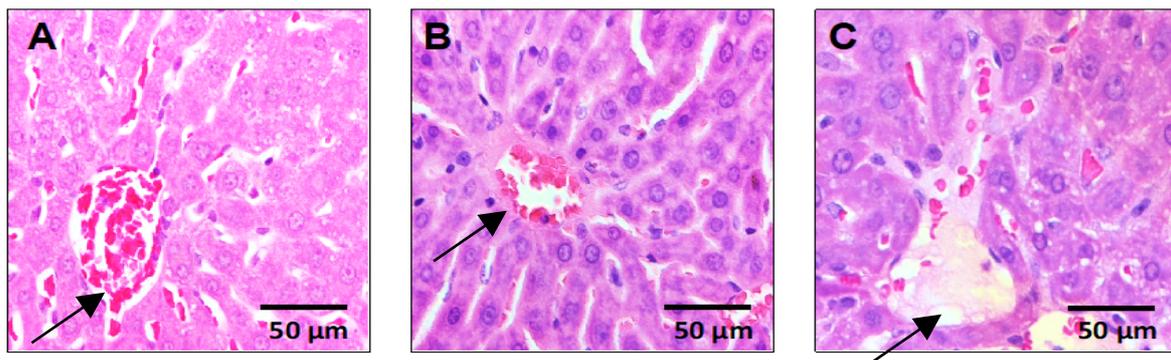


Abbildung 14 – HE gefärbte histologische Präparate einer Leber von WAG Ratten in 400-facher Vergrößerung 11 Tage nach Therapie mit (A) EmboCept® S und Irinotecan, (B) EmboCept® S und Bevacizumab und (C) EmboCept® S und Irinotecan. Bild A zeigt eine Endothelablösung, Bild B Erythrozytenwandadhärenz und Bild C Fibrinthrombosierung (s. jeweils Pfeil)

3. NekrotischerZelltod

Weiterhin wurden mit den HE gefärbten Schnitten des Tumorgewebes der nekrotische Zelltod Tumorgewebe analysiert. Die nekrotischen Bereiche im Tumorgewebe wurden als Prozentsatz der gesamten Tumorfläche gemessen [Abb. 15].

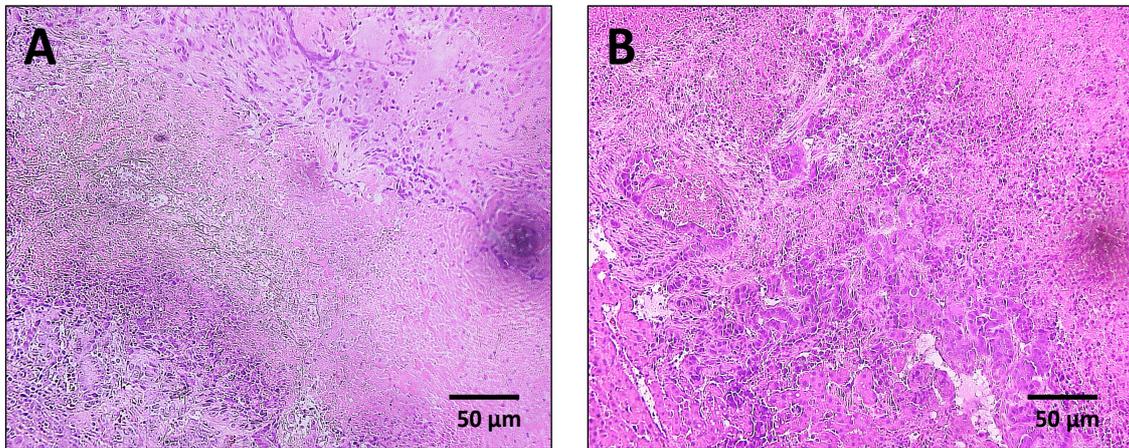


Abbildung 15 – E gefärbte histologische Präparate von tumortragendem Lebergewebe von WAG Ratten in 100-facher Vergrößerung 11 Tage nach Therapie mit (A) Kochsalz (Sham-Gruppe) und (B) EmboCept® S und Bevacizumab. Die Bilder zeigen die Nekroseareale im Tumor.

Mit den CAE-gefärbten Schnitten wurde die Leukozytenakkumulation im Lebergewebe als Hinweis für eine Entzündungsreaktion untersucht. In 48 HPF (12 HPF Sinusoide, 12 HPF Portalfeld intravasal, 12 HPF Portalfeld extravasal, 12 HPF Venolen) wurden CAE-positive Leukozyten ausgezählt [Abb. 16]. Das Ergebnis wurde in Absolutwerten pro HPF angegeben.

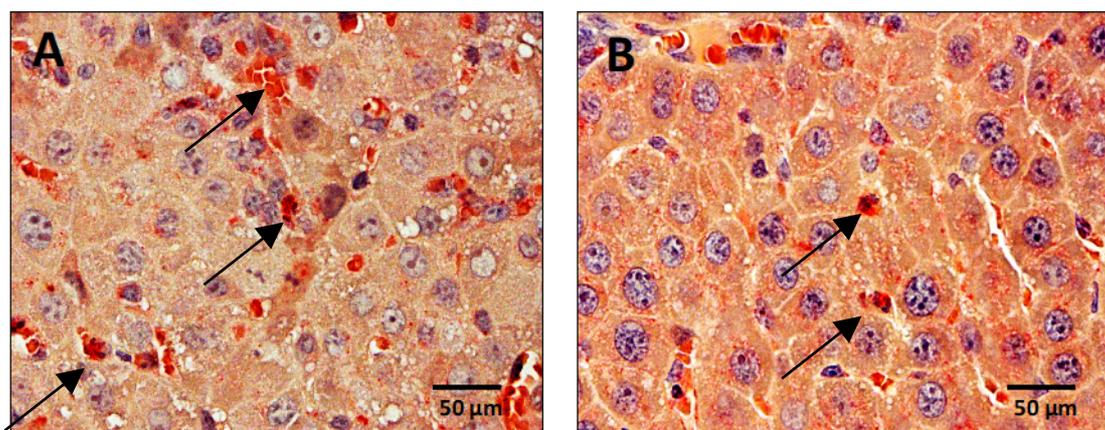


Abbildung 16 – CAE-gefärbte Präparate von tumorfreiem Lebergewebe von WAG Ratten in 400-facher Vergrößerung 11 Tage nach Therapie mit (A) EmboCept® S und Irinotecan sowie (B) EmboCept® S und Bevacizumab. Die Leukozyten sind rot angefärbt (s. Pfeile)

5.13.4. Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die in Tissue-tek aufbewahrten Gewebeproben analysiert. Gespaltene Caspase-3 (Cystein-Asparagin-Proteasen) wurde als Indikator für die Apoptose herangezogen [Abb. 17]. Hierfür wurden 5 µm große Schnitte von tumortragende Leberproben bei Raumtemperatur über Nacht mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen gespaltene Caspase-3 (1:100, New England Biolabs, Frankfurt, BRD) inkubiert. Dieser Antikörper identifiziert das große Fragment (17/19 kDa) der aktivierten Caspase-3, aber nicht die volle Länge der Caspase-3. Für die Streptavidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Färbung diente ein biotinylierter Anti-Kaninchen-Ig-Antikörper als sekundärer Antikörper (ready-to-use, Abcam, Cambrige, UK). Als Chromogen diente 3,3'-Di-Aminobenzidin. Die Schnitte wurden mit Hämalaun gegengefärbt. In 25 HPF pro Schnitt wurden die positiv gefärbten Zellen ausgezählt und das Ergebnis als Zahl pro HPF angegeben.

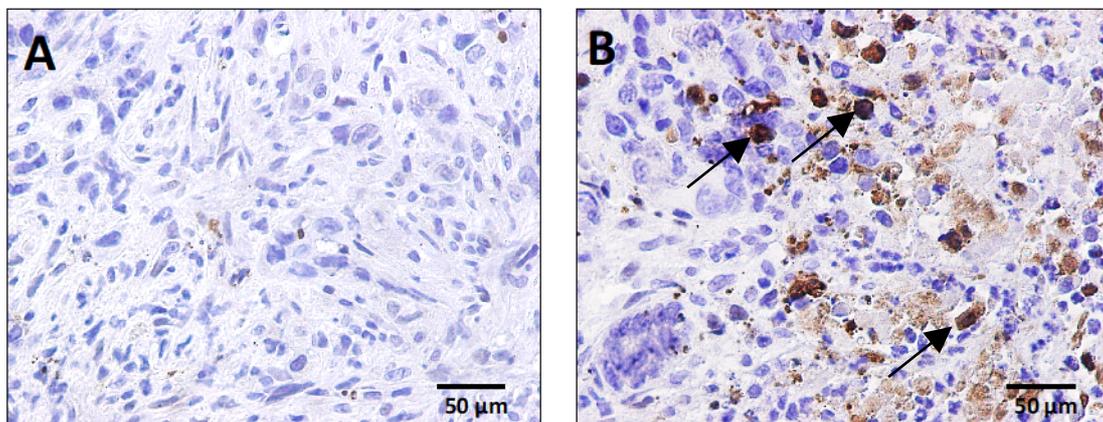


Abbildung 17 – Caspase-3-Färbung von Lebergewebe von WAG Ratten 11 Tage nach der Therapie mit (A) Kochsalz (Sham-Gruppe) sowie (B) EmboCept® S und Irinotecan jeweils in 400-facher Vergrößerung. Die apoptotischen Zellen sind braun gefärbt (s. Pfeile)

Zur Bestimmung der Zellproliferation diente PCNA (proliferating-cell-nuclear-antigen). In Paraffin eingebettete Proben von 5 µm wurden für 18 Stunden bei 4°C mit einem polyklonalen Kaninchen anti-PCNA-Antikörper (1:50, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, BRD) sowie mit einem mit alkalischer Phosphatase konjugierten anti-Kaninchen-IgG (1:20, Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Fuchsin als Chromogen und Hämalaun gegengefärbt. Die Schnitte wurden mittels eines semiquantitativen Scoringindexes (0: <1%, 1: 1-10%, 2: 10-30%, 3: 30-50%, 4: >50% der PCNA-positiven Zellen) ausgewertet [Abb. 18].

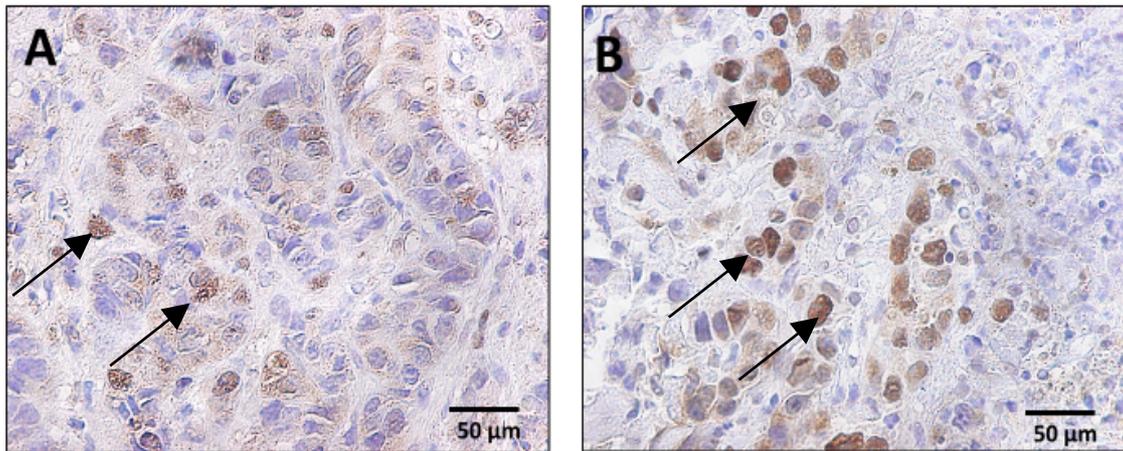


Abbildung 18 – PCNA Färbung von Lebergewebe von WAG Ratten 11 Tage nach der Therapie mit (A) Kochsalz (Sham-Gruppe) sowie (B) EmboCept® S und Irinotecan in 400-facher Vergrößerung. Die proliferierenden Zellen sind braun gefärbt (s. Pfeile)

Als Indikator für die Vaskularisierung wurde das PECAM-1-Molekül (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1; CD31) verwendet, welches ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird [Abb. 19].

Um dieses immunhistochemisch nachzuweisen, wurden primäre Ratten-anti-Maus-Antikörper (1:250; BioRad, Puchheim, BRD) und kreuzreagierende peroxidase-konjugierte Kaninchen-Anti-Human-Antikörper (1:200; BioRad, Puchheim, Deutschland) verwendet. PECAM-1-positive Gefäße wurden in 25 HPF ausgezählt und als Zahl pro HPF festgehalten.

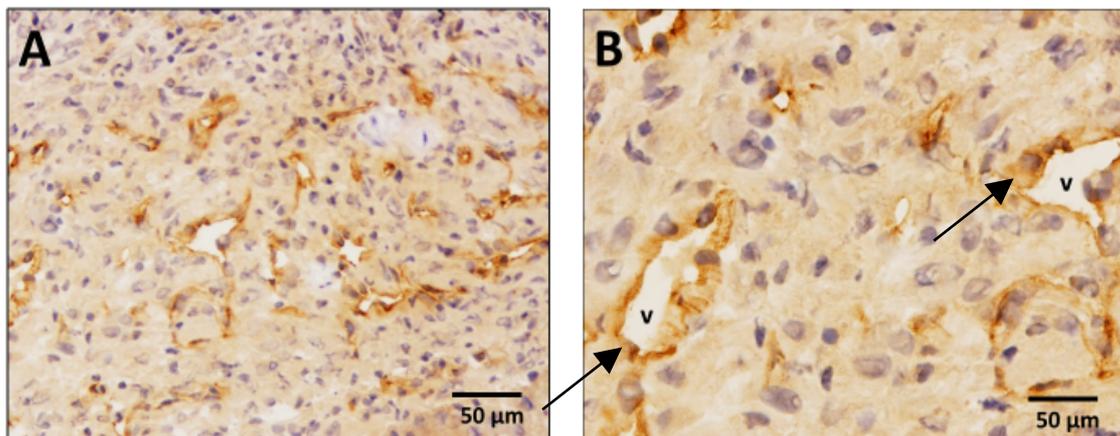


Abbildung 19 – PECAM-1-Färbung von tumortragendem Lebergewebe von WAG Ratten 11 Tage nach der Therapie mit EmboCept® S, Bevacizumab und Irinotecan in (A) 200-facher und (B) 400-facher Vergrößerung zur Auswertung der Angiogenese; die Endothelzellen der Gefäße (V) sind hervorgehoben (s. Pfeile)

5.14. Datenerfassung und Statistik

Alle erhobenen Daten und ausgewerteten Parameter wurden zunächst handschriftlich notiert und später in Excel-Tabellen übertragen (Microsoft®Excel, Microsoft Cooperation, USA) und elektronisch gespeichert.

Diese Datensätze wurden dann zur Erfassung der Mittelwerte und des Standardfehlers (standard error of the mean, SEM) herangezogen. Außerdem wurden die Varianzgleichheit sowie die Normalverteilung der Werte untersucht. Anschließend konnten die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mittels Einweg-Varianzanalyse (ANOVA = one-way analysis of variance) aufgezeigt werden. Es folgte ein Post-hoc Test, der eine Korrektur des Alpha-Fehlers (Bonferroni) zur Kompensation multipler Vergleiche beinhaltet. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden bei $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Zur statistischen Auswertung und graphischen Darstellung dienten die Programme SigmaStat und SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

6. Ergebnisse

6.1. Tumorimplantation

Die Tumorimplantation wurde an Tag 0 komplikationslos in Isoflurannarkose durchgeführt. Sie wurde von allen Tieren gut vertragen. Bei der Relaparotomie zur Durchführung der Embolisation an Tag 8 zeigten alle Ratten einen auf den linken Leberlappen beschränkten Tumor. Sowohl an Tag 8 als auch an Tag 11 zur Organentnahme konnte bei keinem der Tiere eine Peritonealkarzinose oder ein Anzeichen auf eine extrahepatische Metastasierung nachgewiesen werden. Keines der Tiere war während der Versuchszeit hinsichtlich Putz- oder Fressverhalten auffällig.

6.2. Tumorwachstum

Zur Bestimmung der Tumorgröße wurde sowohl an Tag 8 als auch an Tag 11 eine Ultraschalluntersuchung bei den Versuchstieren durchgeführt. Dabei zeigte sich in der Sham-Gruppe eine über 60%-ige Zunahme des Tumolvolumens von Tag 8 auf Tag 11. Durch die Anwendung von EmboCept® S (EMB) konnte das Tumorwachstum vollständig verhindert werden und war damit signifikant verringert im Vergleich zur Sham-Gruppe. Durch zusätzliche Kombination von EmboCept® S mit Irinotecan (IR) konnte keine weitere signifikante Reduktion des Tumolvolumens erzielt werden [Abb. 20]. Im Gegensatz dazu konnte durch die Kombination von EmboCept® S mit Bevacizumab eine signifikante Verkleinerung des Tumors gegenüber der Monotherapie mit EmboCept® S erzielt werden. Die Dreierkombination aus EmboCept® S mit Irinotecan und Bevacizumab zeigte ein signifikant reduziertes Tumolvolumen im Vergleich zur Monotherapie mit EmboCept® S, zur Therapie mit EmboCept® S und Irinotecan als auch zur Sham-Gruppe. Es fand sich durch die Kombination aus EmboCept® S mit Irinotecan und Bevacizumab ein um 50% reduziertes Tumolvolumen gegenüber dem Ausgangswert vor der Therapie.

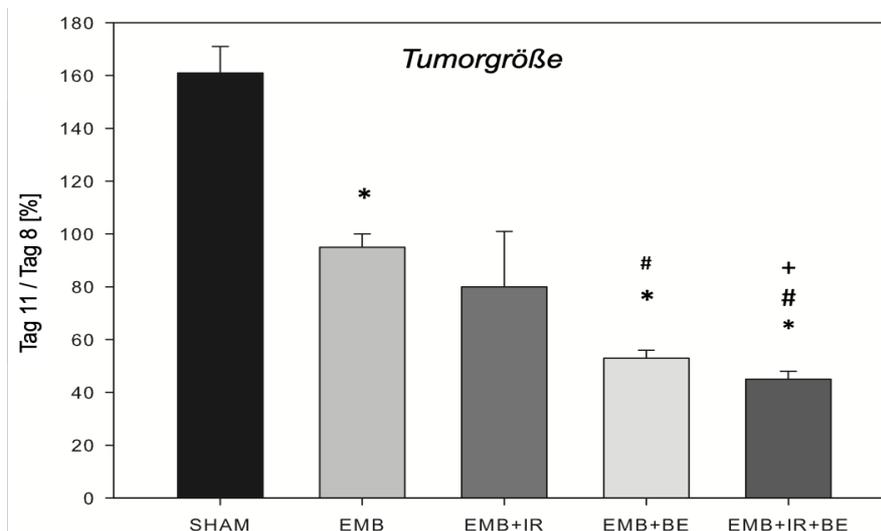


Abbildung 20 – Prozentuales Volumen der CC531 Tumore nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE) an Tag 11 im Vergleich zu Tag 8. Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

* $p < 0,05$ vs. SHAM; # $p < 0,05$ vs. EMB; + $p < 0,05$ vs. EMB+IR

6.3. Histologische Untersuchungen

6.3.1. Hämatoxylin-Eosin (HE)

Zur Detektion der Leberzellschädigung wurden die Grobscholligkeit sowie die Vakuolisierung der Hepatozyten analysiert. Die histomorphologische Analyse ergab hierbei eine moderate Zellschädigung, welche die stärkste Ausprägung nach einer intraarteriellen Therapie mit Irinotecan hatte. Es zeigte sich eine signifikant vermehrte hepatozelluläre Grobscholligkeit bei der kombinierten Anwendung von EmboCept® S mit Irinotecan [Abb. 21] sowie eine signifikant vermehrte Vakuolisierung bei der Therapie mit EmboCept® S und Irinotecan mit und ohne Bevacizumab [Abb. 22].

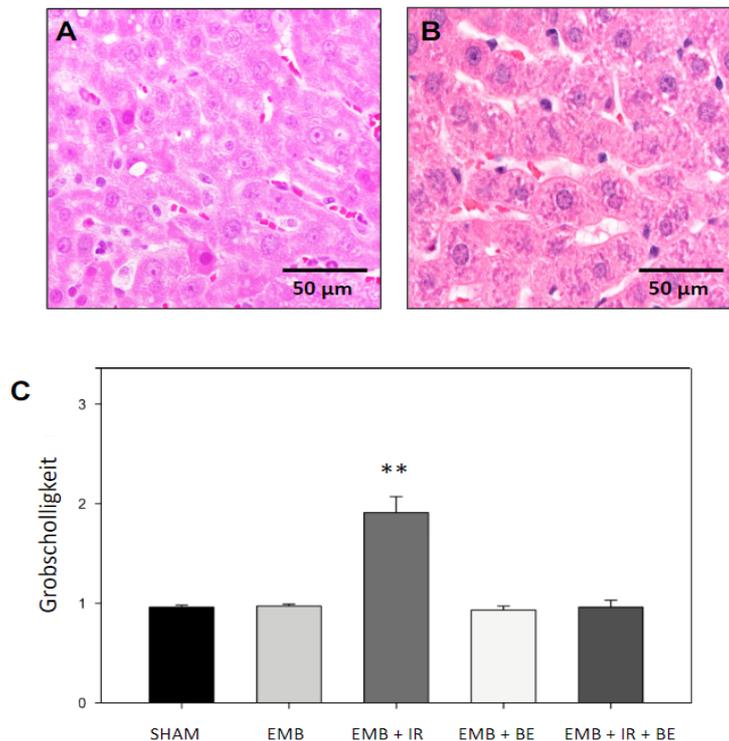


Abbildung 21 – A und B: HE Färbung der Leber (A) eines Sham-Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + IR) mit histomorphologischer Darstellung der hepatozellulären Grobscholligkeit C: Ausmaß der hepatozellulären Grobscholligkeit an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

** $p < 0,05$ vs. alle Gruppen

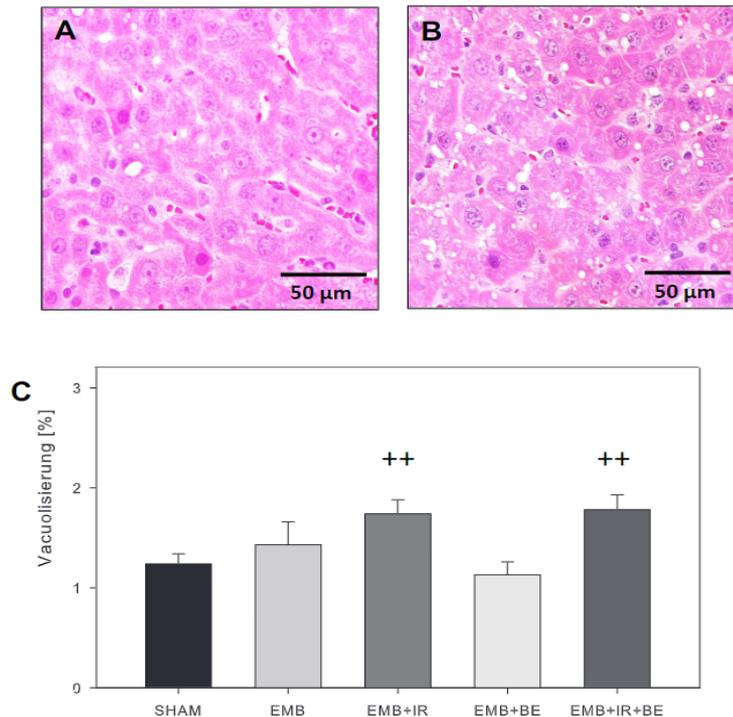


Abbildung 22 – A und B: HE Färbung der Leber (A) eines Sham-Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + IR) mit histomorphologischer Darstellung der hepatozellulären Vakuolisierung
 C: Ausmaß der hepatozellulären Vakuolisierung an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM
 ++ $p < 0,05$ vs. EMB+BE

Zur Beurteilung der venulären Schädigung diente das Ausmaß der Endothelablösung, die Fibrinthrombosierung des Gefäßes sowie die Wandadhärenz der Erythrozyten.

Die Endothelablösung zeigte sowohl bei der Behandlung mit EmboCept® S allein als auch in Kombination mit Irinotecan sowie Irinotecan plus Bevacizumab ein signifikant höheres Ausmaß im Vergleich zur Sham-Gruppe [Abb. 23].

Bei der Auswertung der Fibrinthrombosierung fand sich lediglich nach der EmboCept® S Monotherapie ein Anstieg im Vergleich zur Sham-Gruppe. Bei allen Kombinationstherapien konnte eine signifikant geringere Fibrinthrombosierung festgestellt werden [Abb. 24].

Die Erythrozytenwandadhärenz war insgesamt bei allen Gruppen gering [Abb. 25]. Die Therapiegruppen zeigten gegenüber der Sham-Gruppe nur einen minimalen Anstieg mit dem Höchstwert in der EmboCept® S Gruppe.

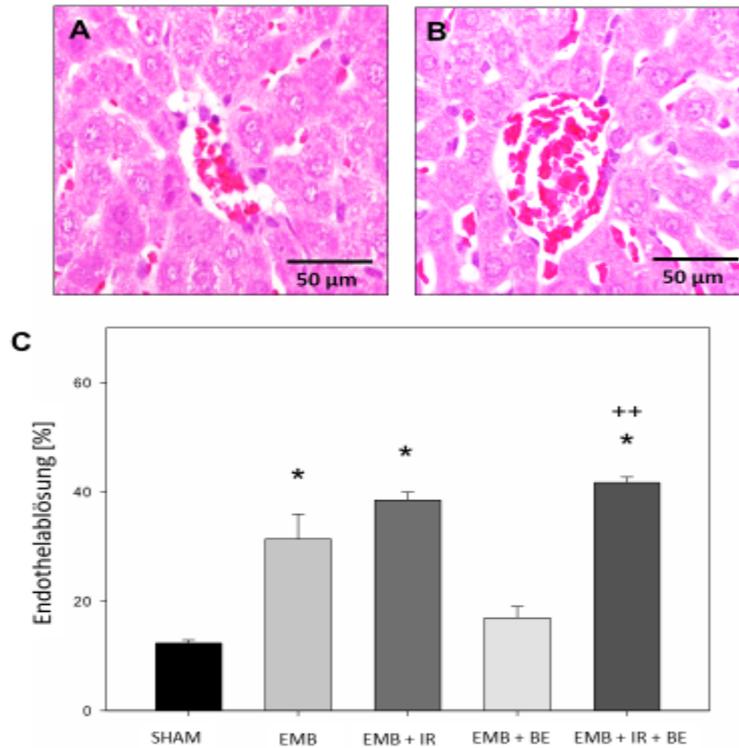


Abbildung 23 – A und B: HE Färbung der Leber (A) eines Sham-Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + IR) mit histomorphologischer Darstellung der Endothelablösung. C: Ausmaß der Endothelablösung [%] an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM
* $p < 0,05$ vs. Sham; ** $p < 0,05$ vs. EMB+BE

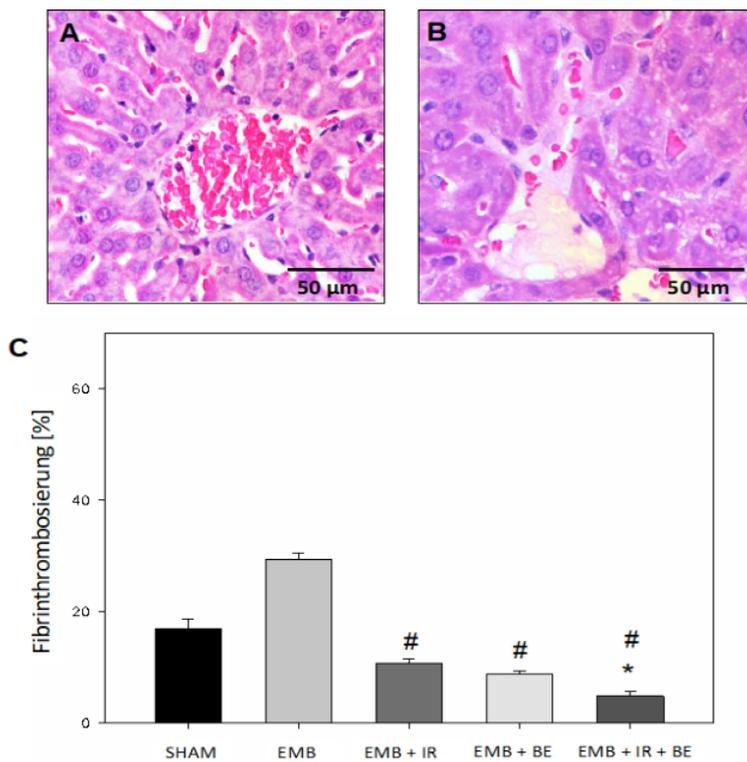


Abbildung 24 – A und B: HE Färbung der Leber (A) eines Sham-Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + IR) mit histomorphologischer Darstellung der Fibrinthrombosierung. C: Ausmaß der Endothelablösung [%] an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM
* $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,05$ vs. EMB

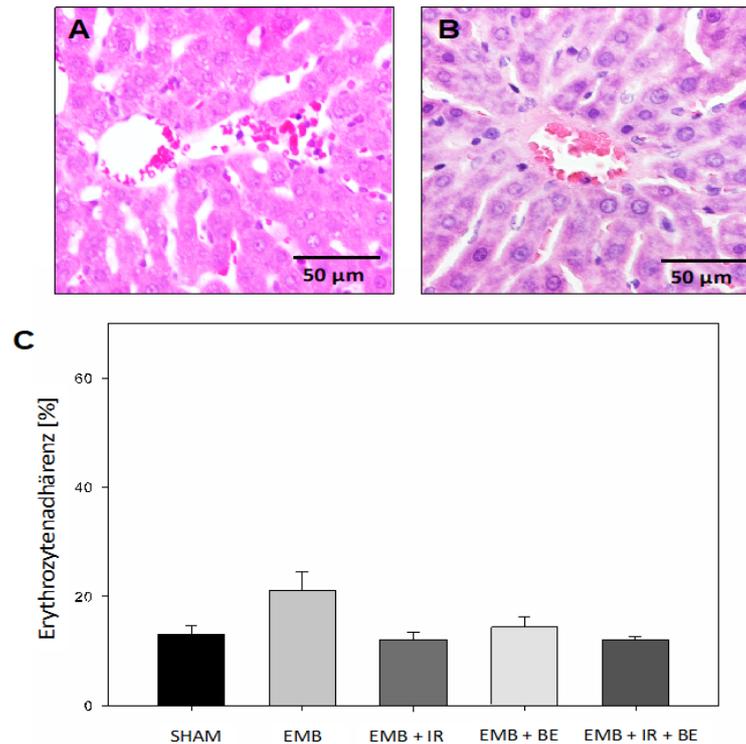


Abbildung 25 – A und B: HE Färbung der Leber (A) eines Sham-Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + BE) mit histomorphologischer Darstellung der Erythrozytenadhärenz. C: Ausmaß der Erythrozytenadhärenz [%] an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

6.3.2. Nekrotischer Zelltod

Die Analyse des nekrotischen Zelltods anhand der HE gefärbten Schnitte ergab 20% nekrotische Fläche bei der Sham-Gruppe. Alle Therapiekombinationen führten zu einer signifikant erhöhten Nekrosefläche im Tumor mit dem Höchstwert mit 70% nekrotischen Zellen in der Gruppe mit EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab [Abb 26].

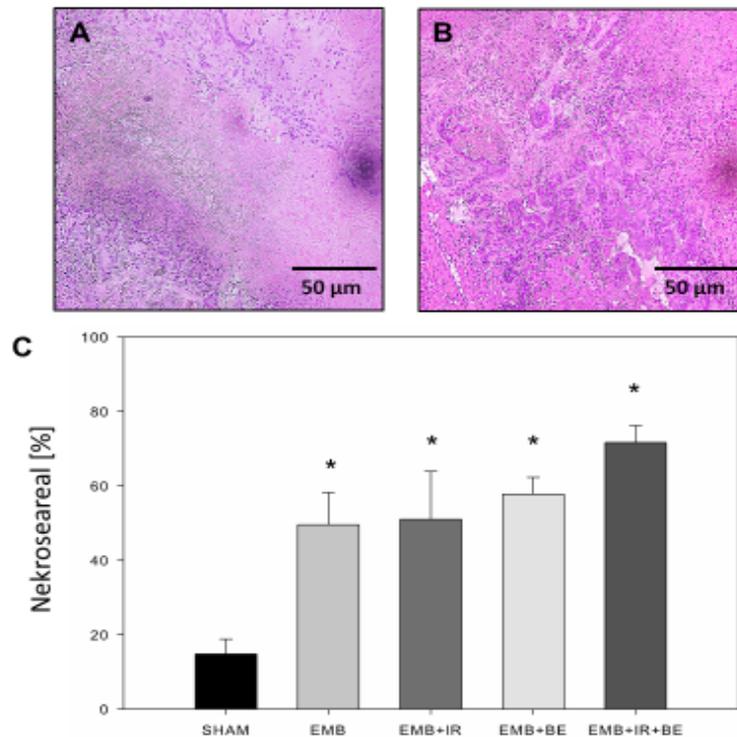


Abbildung 26 – A und B: HE Färbung der tumortragenden Leber (A) eines Sham-Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + BE) mit histomorphologischer Darstellung des nekrotischen Zelltods
 C: Quantitative Analyse der Nekrose [nekrotische Fläche in % der gesamten Tumorfläche] an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

* $p < 0,05$ vs. Sham

6.3.3. AS-D Chloracetatesterase (CAE)

Anhand einer CAE Färbung wurde quantitativ die Leukozytenadhärenz sowie die hepatische Leukozyteninfiltration ermittelt. Hierbei zeigte sich in den Gruppen mit einer EmboCept® S Kombinationstherapie eine signifikant vermehrte Leukozyteninfiltration in den Sinusoiden gegenüber der Sham-Gruppe [Tabelle 1].

| | SHAM | EMB | EMB + IR | EMB + BE | EMB+IR+BE |
|-----------------------|--------------|--------------|----------------|------------------|----------------|
| Sinusoide | 0 (±0) | 0,75 (±0,31) | 5,86 (±1,45) * | 7,38 (±1,92) * # | 4,38 (±0,86) * |
| Portalfeld intravasal | 0,13 (±0,13) | 0,75 (±0,31) | 0,71 (±0,42) | 0,25 (±0,25) | 1,00 (±0,46) |
| Portalfeld extravasal | 0,38 (±0,26) | 1,63 (±0,91) | 3,00 (±1,00) | 1,38 (±0,75) | 1,13 (±0,44) |
| Venole intravasal | 2,00 (±0,73) | 2,00 (±1,10) | 1,00 (±0,65) | 1,13 (±0,23) | 1,25 (±0,41) |
| Venole extravasal | 1,88 (±0,48) | 1,13 (±0,41) | 1,29 (±0,75) | 0,23 (±0,23) | 0,63 (±0,38) |

Tabelle 1 – Ausmaß der Leukozytenadhärenz anhand der Auswertung der CAE Färbung an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

* $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,05$ vs. EMB

6.4. Immunhistochemische Untersuchungen

6.4.1. Apoptose, Caspase-3

Die Auswertung der Caspase-3 Färbung zur Beurteilung der Apoptose zeigte bei der intraarteriellen Applikation von EmboCept® S eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe [Abb. 27]. Bei der kombinierten Applikation von EmboCept® S mit Irinotecan sowie bei der Applikation von EmboCept® S mit Bevacizumab fand sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate gegenüber der Sham-Gruppe und gegenüber der Therapie mit EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab. Außerdem waren bei der intraarteriellen Infusion von EmboCept® S und Bevacizumab gegenüber der Monotherapie mit EmboCept® S signifikant vermehrt Caspase-3 positive Zellen zu finden.

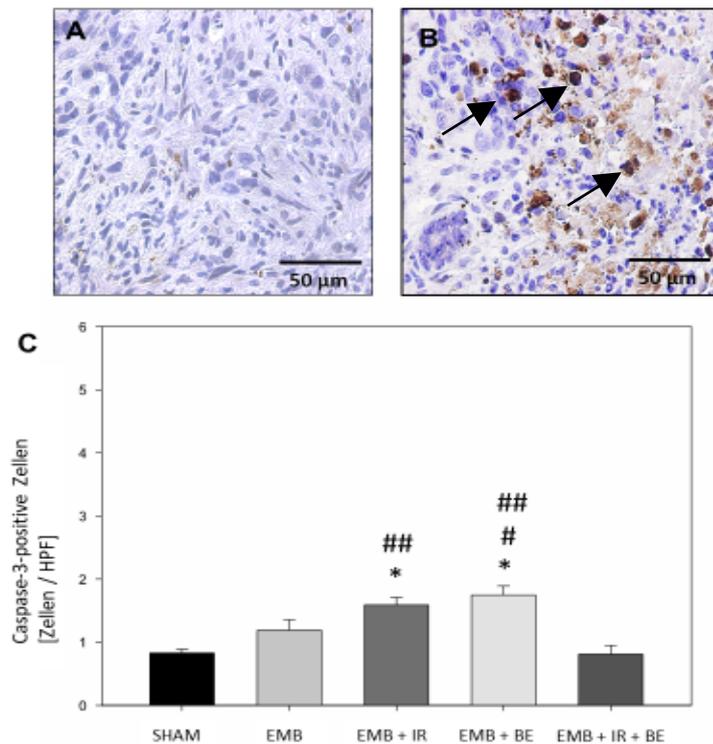


Abbildung 27 – A und B: Caspase-3 Färbung der Leber (A) eines Sham-Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + IR) mit immunhistochemischen Darstellung von Caspase-3-positiven Zellen (s. Pfeil) zur Beurteilung der hepatozellulären Apoptose.

C: Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen [Zellen/HPF] an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert \pm SEM

* $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,05$ vs. EMB; ## $p < 0,05$ vs. EMB+IR+BE

6.4.2. Proliferation, PCNA

Die Analyse der Proliferation gemessen an den PCNA-positiven Zellen ergab bei der Sham-Gruppe im gesunden Lebergewebe unter 1% positive Zellen. Die PCNA-positiven Zellen zeigten im Lebergewebe nach hepatoarterieller Infusion der Medikamente keine signifikanten Unterschiede. Auch die Therapiegruppen zeigten eine Proliferationsrate von unter 1%, mit einem Höchstwert bei der intraarteriellen Infusion von EmboCept® S als Monotherapie [Abb. 28].

Im Tumorgewebe zeigten sich bei der Sham-Gruppe 30% der Zellen als PCNA-positiv. Die größte Proliferation war auch hier bei einer EmboCept® S Monotherapie mit etwa 40% PCNA-positiven Zellen zu finden. Durch die Kombination von EmboCept® S mit Irinotecan oder Bevacizumab und auch bei der Kombination des Embolisates mit beiden Medikamenten konnte die Tumorpheriferation unter 15% gesenkt werden. Durch die Kombination von EmboCept® S mit Bevacizumab konnte sogar eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Sham-Gruppe erzielt werden [Abb. 28].

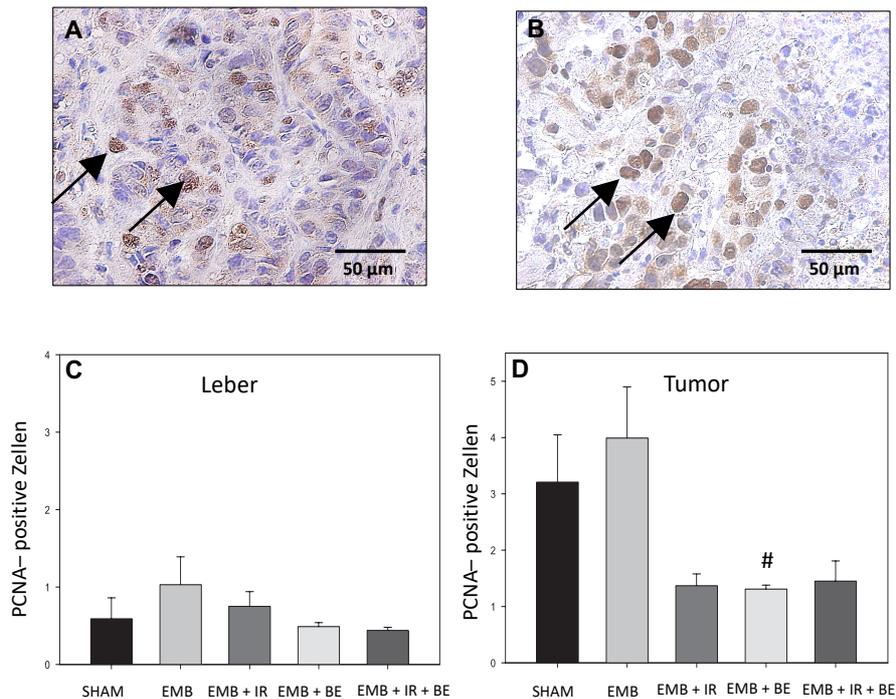


Abbildung 28 – A und B: PCNA Färbung (A) eines Sham-behandelten Tieres sowie (B) eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + IR) mit immunhistochemischen Darstellung von PCNA-positiven Zellen (s. Pfeil) zur Beurteilung der Zellproliferation.

C und D: Anzahl der PCNA-positiven Zellen an Tag 11 in einer tumorfreien Leber (C) sowie im Tumorgewebe (D) nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

[semiquantitativer Scoringindex (0: <1%, 1: 1-10%, 2: 10-30%, 3: 30-50%, 4: >50% der PCNA-positiven Zellen)]

p<0,05 vs. EMB

6.4.3. PECAM-1, Vaskularisierung

Die Analyse der PECAM-1-positiven Zellen im Tumor zeigte bei allen Gruppen mit intraarterieller Applikation eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Sham-Gruppe [Abb. 29]. Außerdem konnte durch die Kombination von EmboCept® S mit Irinotecan sowie bei der Kombination mit Bevacizumab als auch bei der Dreierkombination die Tumolvaskularisierung im Vergleich zur Monotherapie mit EmboCept® S signifikant reduziert werden. Die intraarterielle Applikation von EmboCept® S zusammen mit Irinotecan und Bevacizumab zeigte weiterhin signifikant weniger PECAM-1-positive Zellen im Vergleich zu EmboCept® S plus Bevacizumab.

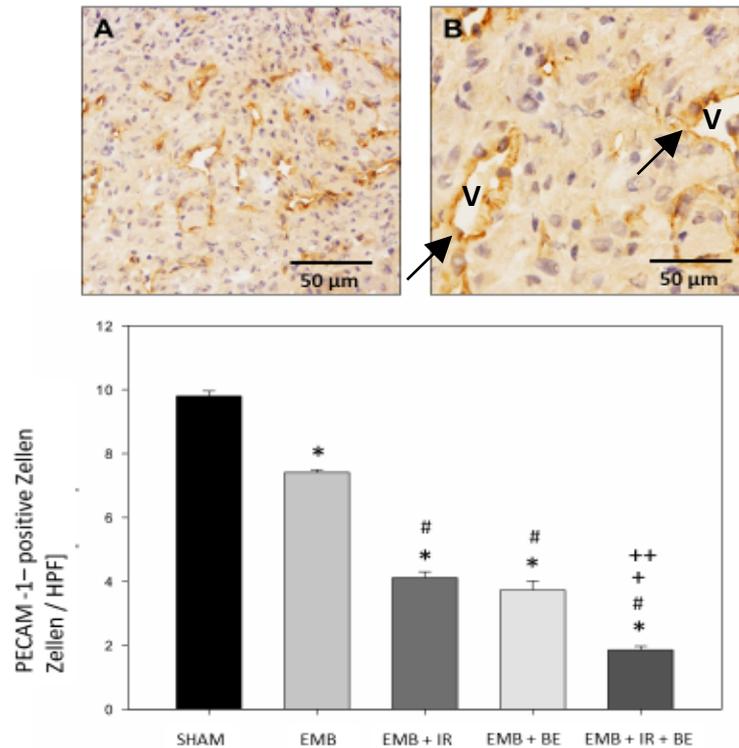


Abbildung 29 – A und B: PECAM-1 Färbung von tumortragenden Lebergewebe eines EmboCept® S behandelten Tieres (EMB + IR + BE) in 20-facher (A) und 40-facher Vergrößerung (B) mit immunhistochemischen Darstellung von PECAM-1 positiven Zellen (s. Pfeil) zur Beurteilung der Angiogenese.

C: Anzahl der PECAM-1 positiven Zellen [Zellen/HPF] an Tag 11 nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE). Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

* $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,05$ vs. EMB; + $p < 0,05$ vs. EMB+IR; ++ $p < 0,05$ vs. EMB+BE

6.5. Gewicht der Versuchstiere

Die Versuchstiere der einzelnen Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied bei der Entwicklung des Körpergewichts an Tag 11 im Vergleich zu Tag 0 [Abb. 30].

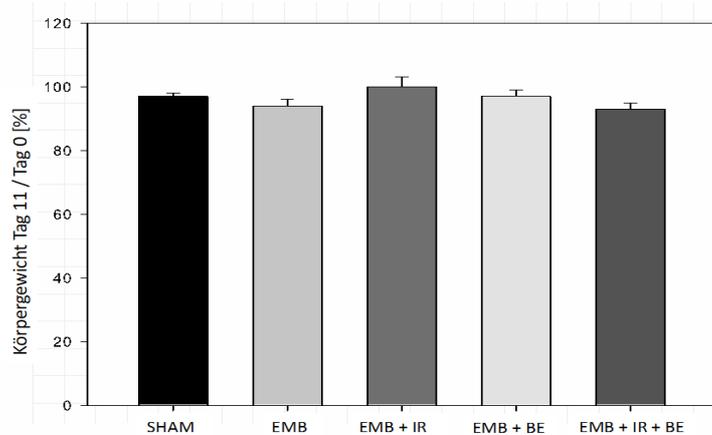


Abbildung 30 – Prozentuales Körpergewicht der WAG Ratten nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE) an Tag 11 im Vergleich zu Tag 0. Sham - behandelte Tiere dienen zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert \pm SEM

6.6. Laborparameter

6.6.1. Leukozyten

Als Indikator für eine systemische Entzündung wurde die Leukozytenanzahl im Blut bestimmt. Zwischen den einzelnen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede an Tag 11 in Relation zu Tag 8 [Abb. 31].

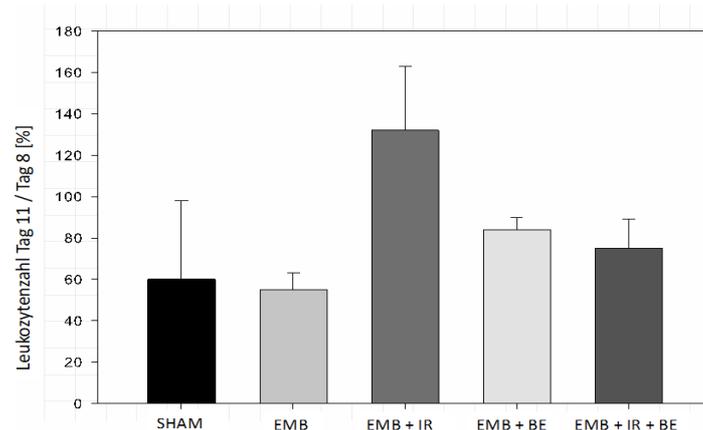


Abbildung 31 – Verhältnis der Leukozytenzahl im Blut nach Blutentnahme aus der Vena cava inferior von WAG Ratten nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE) an Tag 11 im Vergleich zu Tag 8. Sham - behandelte Tiere dienen zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert \pm SEM

6.6.2. Hämoglobin

Bei der Analyse der Blutwerte fanden sich bei dem Hämoglobinwert (Hb) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen [Abb. 32].

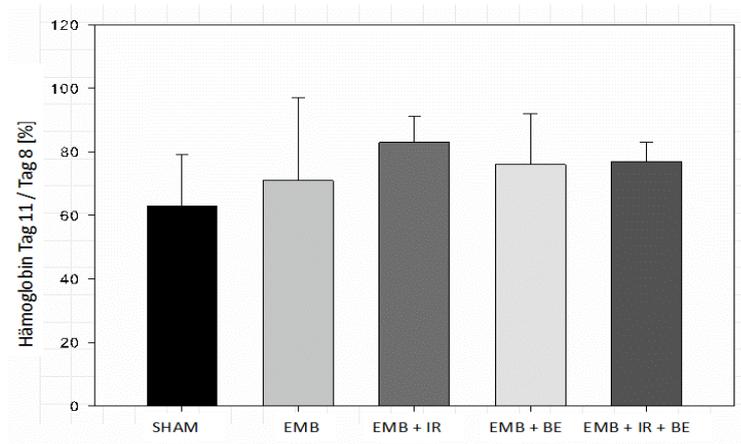


Abbildung 32 – Verhältnis des Hämoglobin Wertes im Blut nach Blutentnahme aus der Vena cava inferior von WAG Ratten nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE) an Tag 11 im Vergleich zu Tag 8. Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

6.6.3. Thrombozyten

Bei der Auswertung der Thrombozytenzahl im Blut zeigten sich außer in der Gruppe mit intraarterieller Infusion mit EmboCept® S plus Irinotecan erniedrigte Thrombozytenwerte an Tag 11 im Vergleich zu Tag 8 [Abb. 33]. Nach der Therapie mit EmboCept® S und Irinotecan fand sich an Tag 11 fast eine Verdopplung der Thrombozytenzahl im Vergleich zu Tag 8.

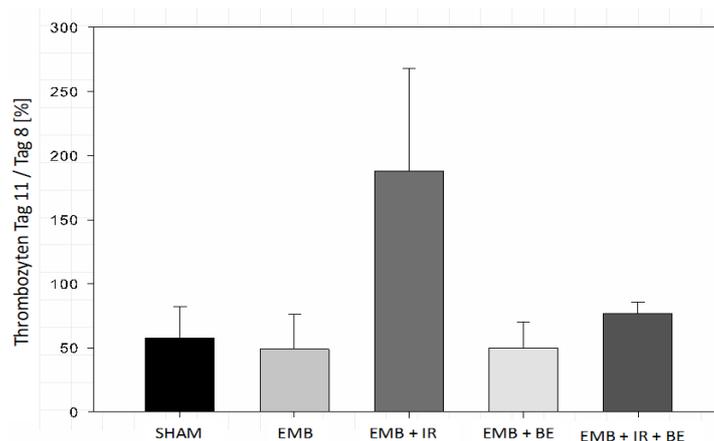


Abbildung 33 – Verhältnis des Thrombozyten Anzahl im Blut nach Blutentnahme aus der Vena cava inferior von WAG Ratten nach Therapie mit EmboCept® S (EMB), EmboCept® S und Irinotecan (EMB + IR), EmboCept® S und Bevacizumab (EMB + BE) sowie EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab (EMB + IR + BE) an Tag 11 im Vergleich zu Tag 8. Sham - behandelte Tiere dienten zur Kontrolle (SHAM). Mittelwert ± SEM

7. Diskussion

Die transarterielle Embolisation stellt bei Lebermetastasen und primären hepatozellulären Karzinomen ein bereits etabliertes Verfahren dar. Die in dieser Studie verwendeten Medikamente Irinotecan und Bevacizumab gehören zur first-line Therapie bei kolorektalen Lebermetastasen. Allerdings gibt es keine vergleichenden Untersuchungen zur Wirksamkeit der Kombination von EmboCept® S mit Bevacizumab und/oder Irinotecan. Daher soll die vorliegende Studie die Effektivität der verschiedenen Kombinationen auf das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen sowie die Auswirkungen auf das gesunde Leberparenchym im Rattenmodell untersuchen.

Die Versuche wurden an anästhesierten WAG-Rij-Ratten durchgeführt. Zur Bestimmung des Tumolvolumens wurde zu bestimmten Zeitpunkten eine Sonographie der Leber durchgeführt. Des Weiteren wurden zur Analyse der Wirkung der verschiedenen Substanzen mittels histologischer und immunchemischer Untersuchungen der nekrotische Zelltod, die Apoptoserate, die Tumorzellproliferation und die Angiogenese ermittelt.

Da es sich in der vorliegenden Arbeit um eine in-vivo-Studie handelt, ergibt sich im Gegensatz zu einer in-vitro-Studie die Möglichkeit, die Auswirkungen der eingesetzten Substanzen auf den gesamten Organismus und somit auf alle Organsysteme zu untersuchen und die physiologischen und pathologischen bzw. toxischen Interaktionen zu analysieren [Menger et al. 1993].

7.1. Diskussion von Material und Methoden

7.1.1. Chirurgische Präparation und Tumorimplantation

In der vorliegenden Arbeit wurde als Adenokarzinom die CC531-Tumorzelllinie gewählt, die sich bereits in verschiedenen Studien als zuverlässiges Rattenlebermetastasen-Modell erwiesen hat [Marquet et al. 1984; Germer et al. 1999; Hagenaars et al. 2000]. Als Versuchstiere wurden WAG-Rij-Ratten aufgrund ihrer genetischen Eignung zur Implantation der CC531-Tumorzelllinie gewählt.

Das Modell der Implantation von CC531 als kolorektale Lebermetastasen in WAG-Rij-Ratten [White et al. 2016] ist für den Einsatz einer HAI [Sperling et al. 2012; Sperling et al. 2013; van Duijnhoven et al. 2005] etabliert.

In verschiedenen Studien wurde die mikrovaskuläre Struktur der Leber untersucht. Es wird beschrieben, dass die terminalen hepatischen Arteriolen und die terminalen Portalvenolen, welche in die Lebersinusoide drainieren, einen Durchmesser von 15 - 35 µm aufweisen [Vollmar et al. 2009; Oda et al. 2003]. Auch die mikrovaskuläre Struktur der Rattenleber wurde analysiert [Koo et al. 1975] und es kann von einer vergleichbaren mikrovaskulären Struktur der Leber von Ratten und Menschen ausgegangen werden.

Die Implantationstechnik wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [Marinelli et al. 1991]. Die Tumorzellen wurden direkt unter die Leberkapsel injiziert, um für die sonographische Analyse des Tumorzellvolumens ein standardisiertes, reproduzierbares Modell zu erhalten. Andere Implantationsmöglichkeiten wie die Injektion der Tumorzellen in die Vena cava [Scheringa et al. 1989], Vena porta [Griffini et al. 1996] oder Vena lienalis [Zhong et al. 2010] würden zwar den hämatogenen Metastasierungsweg der Tumorzellen am ehesten nachahmen, jedoch zu einer unkontrollierteren Aussaat der Tumorzellen in der Leber führen. Dies würde einen Nachteil für eine standardisierte sonographische Analyse darstellen. Somit bietet das in der vorliegenden Arbeit gewählte Implantationsmodell den besten Kompromiss zwischen der Pathophysiologie und einem reproduzierbaren, im Verlauf messbaren Tumorzellvolumen.

Die Größe und das Gewicht der WAG-Rij-Ratten richtete sich nach der Möglichkeit einer mikrochirurgischen Präparation der Arteria gastroduodenalis. Alle Präparationen wurden zur Reduzierung eines intraoperativen Traumas unter einem Mikroskop mit speziellen mikrochirurgischen Instrumenten durchgeführt.

7.1.2. Sonographie

Die Literatur liefert bis dato noch wenig Informationen bezüglich der 3-D-Sonographie im Kleintiermodell zur Bestimmung von Tumorzellvolumina. Studien von Kuriyama et al. [Kuriyama et al. 1999] sowie Echevarria Uruga et al. [Echevarria Uruga et al. 2010] beschrieben die Bestimmung des Tumorzellvolumens mittels 3-D-Sonographie als ein valides Verfahren. Die Validität dieses Verfahrens konnte auch in vorausgegangenen Versuchen durch den Vergleich der sonographisch bestimmten Tumorzellvolumina mit der Auswertung der histologisch berechneten Tumorzellvolumina bestätigt werden [Laschke et al. 2010]. Die Technik ermöglicht eine Visualisierung des Leber- und Tumorgewebes am offenen Abdomen sowie die Berechnung des Tumorzellvolumens zu verschiedenen Zeitpunkten.

7.1.3. Hepatoarterielle Infusion eines Embolisates mit einem Chemotherapeutikum

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden die Medikamente intraarteriell in die Leberarterie verabreicht. Die möglichen Vorteile einer arteriellen Applikation gegenüber einer intravenösen oder intraportalen Infusionstherapie wurden von Bartkowski et al. an solitären Lebertumoren bewertet [Bartkowski et al. 1986]. Dabei konnte durch eine intraarterielle Applikation eine signifikante Reduktion des Tumorzellwachstums erreicht werden bei gleichzeitig geringerer systemischer Toxizität. Ein weiteres Argument, das für eine intraarterielle Verabreichung der Medikamente spricht, ist die Tatsache, dass Lebertumore arteriell mit Blut versorgt werden, während das Leberparenchym hauptsächlich über die Pfortader perfundiert

wird. Breedis und Young haben 1954 die Perfusion von Lebermetastasen durch die Injektion von Färbemittel erforscht. Sie fanden heraus, dass sich bei Injektion des Färbemittels in die Leberarterie die Tumore anfärbten, während das restliche Leberparenchym ungefärbt blieb. Sie schlossen daraus, dass Lebermetastasen ihre Hauptblutversorgung aus der Leberarterie beziehen [Breedis et al. 1954].

Die transarterielle Chemoembolisation beinhaltet die periodische Injektion eines Chemotherapeutikums zusammen mit einem Embolisat in den Ast der Leberarterie, der den Tumor versorgt. So kann eine höhere Konzentration der verabreichten Substanz im Tumor bei gleichzeitig geringerer systemischer Konzentration erreicht werden. Kauffels et al. haben die Konzentrationen von CPT-11 und seinem aktiven Metaboliten SN-38 im Plasma, in der Leber und im Tumorgewebe nach hepatischer arterieller Infusion von Irinotecan mit oder ohne Anwendung von Embolisat in einem Rattenmodell mit kolorektalen Lebermetastasen untersucht. Hierbei war die Konzentration von SN-38 im Tumorgewebe nach der HAI mit Irinotecan zusammen mit EmboCept® S im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant erhöht [Kauffels et al. 2019]. Durch die HAI mit Irinotecan allein oder in Kombination mit EmboCept® S konnte eine höhere Konzentration an SN-38 im Tumorgewebe nachgewiesen werden als durch die systemische Anwendung von Irinotecan.

Vorteile einer arteriellen Chemoembolisation gegenüber einer arteriellen Chemotherapie ohne Embolisat wurden auch durch Bödeker et al. gezeigt [Bödeker et al. 2003]. In deren Studie zeigten Novikoff-Hepatom tragende Ratten eine vermehrte Tumorzellreduktion nach einer arteriellen Chemoembolisation im Vergleich zur alleinigen HAI.

TACE gilt heute als Standard für Patienten mit hepatozellulären Karzinomen [Hatzidakis et al. 2022]. Nach den aktuellen EASL-Leitlinien (European Association for the Study of the liver) ist eine TACE die empfohlene Erstlinientherapie für Patienten im intermediären Stadium, das definiert ist als multinoduläre Tumorlast, erhaltene Leberfunktion und guter Allgemeinzustand des Patienten [Galle et al. 2018]. Die Empfehlungen für die TACE im intermediären Stadium stützen sich hauptsächlich auf zwei randomisierte Studien, die einen Überlebensvorteil der TACE im Vergleich zur Best supportive care zeigten [Llovet et al. 2002; Lo et al. 2002].

Doch auch bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms konnte die TACE überzeugen. Mehrere retrospektive Studien haben gezeigt, dass TACE eine verlängerte Überlebensrate bei Patienten mit chemorefraktären Lebermetastasen von kolorektalen Karzinomen ohne schwerwiegende Nebenwirkung bewirkt [Hong et al. 2009; Vogl et al. 2009; Albert et al. 2011; Nishiofuku et al. 2013].

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Kombination aus einer Chemoembolisation mit EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab am Rattenmodell getestet. Irinotecan und Bevacizumab gehören beide zum Therapiestandard der first- und second-line Therapien bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen.

Die Effektivität der Kombination einer Chemoembolisation zusammen mit einer zielgerichteten Therapie (Bevacizumab, Aflibercept, Regorafenib) wurde von Fiorentini et al. beschrieben. Durch sie konnte sowohl die Lebensqualität der Patienten als auch das Ansprechen auf die Therapie verbessert werden [Fiorentini et al. 2014].

In den letzten Jahren wurden Irinotecan und Bevacizumab in der klinischen Praxis in großem Umfang mittels HAI verabreicht, was zu einer längeren Überlebenszeit von mehr als 20 Monaten bei Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen führte [Saltz et al. 2000; Kemeny et al. 2011]. Diese Daten weisen auf das Potenzial von einer HAI für die Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen hin.

Eine Analyse von Zhang et al. mit 18 prospektiven randomisierten kontrollierten Studien zeigte, dass Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen signifikant höhere Gesamtüberlebensraten hatten nach einer Behandlung mit einer HAI als bei einer systemischen Chemotherapie. Die Autoren folgerten, dass eine HAI ein potenzielles Therapieschema sein kann, um das Outcome von Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen zu verbessern, indem es das Fortschreiten und auch das Wiederauftreten von Tumoren wirksam reduzieren kann [Zhang et al 2021].

Obwohl SN-38 die Anti-Tumor-Wirkung von Irinotecan liefert, ist es jedoch auch für unerwünschte Nebenwirkungen der Irinotecan-Therapie wie Durchfall oder Hämatotoxizität verantwortlich [Xie et al. 2002]. Daher ist es von großem Interesse, eine Applikationsform von Irinotecan zu verwenden, die eine hohe Konzentration von SN-38 im Tumorgewebe ermöglicht. Kauffels et al. beschreiben, dass die intraarterielle Anwendung in der Lage ist, unerwünschte Nebenwirkungen durch eine geringere systemische Exposition gegenüber dem Chemotherapeutikum abzuschwächen. Daher scheint eine lokoregionale Applikationsform wie HAI ideal zu sein, um diese Ziele zu erreichen [Kauffels et al. 2019].

Als Hauptnebenwirkung einer Chemoembolisation wird in der Literatur das Postembolisationssyndrom mit Fieber, Schmerzen im rechten Oberbauch, Übelkeit und Erbrechen beschrieben [Tellez et al. 1998]. Es tritt bei etwa 67% der Patienten noch während des Krankenhausaufenthaltes auf [Memon et al. 2012; Mahnken et al. 2013]. Nicht alle dieser Symptome lassen sich auf Ratten übertragen. Jedoch zeigte keines unserer Versuchstiere Anzeichen, die auf eines der oben genannten Symptome hinweisen könnte. Das Putz- und Fressverhalten der Tiere war zu jedem Zeitpunkt unauffällig. Eine Schmerztherapie wurde prophylaktisch durchgeführt. Eine weitere in der Literatur genannte Komplikation ist die biliäre Sklerose. Diese entsteht aufgrund der beeinträchtigten Versorgung der Gallengänge durch die Leberarterie [Kim et al. 2001]. Weitere seltenere Komplikationen sind Leberversagen, Leberabszess, Tumorruptur oder Lungenembolie [Xia et al. 2006]. Für alle diese Nebenwirkungen gab es in der vorliegenden Versuchsreihe keine Anzeichen.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass eine intraarterielle Applikation von EmboCept® S, Irinotecan sowie Bevacizumab effektiv das Wachstum kolorektaler Lebermetastasen hemmt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination von EmboCept® S, Irinotecan und Bevacizumab nicht nur das Tumorstadium gehemmt wird, sondern auch das Tumorstadium und die Tumorstadiumsignifikant reduziert werden kann. Dies entspricht einer Tumorstadiumregression. Sie wird zum einen durch eine erhöhte ischämische Nekrose im Tumor und zum anderen durch eine verminderte Proliferation und Angiogenese im Tumorgewebe verursacht.

Eine Studie von Gujral et al. zeigte, dass der Zelltod während warmer Ischämiezeit und anschließender Reperfusion hauptsächlich durch Nekrose verursacht wird [Gujral et al. 2011]. Im Tumorgewebe beobachteten wir einen vermehrten nekrotischen Zelltod nach Embolisierung mit EmboCept® S, welcher in allen Gruppen signifikant erhöht war gegenüber der Sham-Gruppe. Dies spiegelt auch die Ergebnisse anderer Studien wieder, welche die Wirkung von Embolisaten auf Leber und Tumorgewebe untersuchten [Ziemann et al. 2019]. Weitere Studien beschrieben die Nekrose als den wichtigsten Modus des ischämischen Zelltods [Gujral et al. 2011]. Vogl et al. beschrieben in ihrer Studie, dass eine Embolisierung über die Leberarterie zur Nekrose des Lebertumors führt, während das gesunde Leberparenchym geschont wird [Vogl et al. 2003]. Volk et al. zeigten in ihrer Studie, dass Bevacizumab eine Schädigung der Hepatozyten durch Chemotherapeutika wie Irinotecan und Oxaliplatin reduziert [Volk et al. 2016]. Auch andere Studien, wie zum Beispiel von Meguro et al. oder Vollmar et al. beschreiben, dass 180 Minuten nach warmer Ischämie und 24 Stunden nach Wiedereinsetzen der Reperfusion der Zelltod hauptsächlich durch Nekrose verursacht wird [Meguro et al. 2003; Vollmar et al. 2009]. Im Gegensatz hierzu beschreiben Kohli et al. in ihrer Studie ca 50% apoptotische Hepatozyten in Rattenlebern nach 60 Minuten warmer Ischämie und Reperfusion [Kohli et al. 1999].

Andere Studien wiederum, wie zum Beispiel die Studie von Sperling et al. zeigen, dass eine HAI mit Bevacizumab das Tumorstadium durch eine Zunahme der Apoptose reduziert [Sperling et al. 2012]. Im Tumorgewebe war dies mit einer Abnahme der Vaskularisierung und Zellproliferation sowie einer Zunahme der Zellapoptose verbunden, was durch eine verringerte Anzahl von PECAM-1- und PCNA-positiven Zellen und eine erhöhte Anzahl von Caspase-3-positiven Zellen angezeigt wurde. Somit ist die antineoplastische Wirkung von Bevacizumab nicht nur auf der Reduzierung der Gefäßdichte, sondern auch auf eine Induktion der Apoptose zurückführbar [Sperling et al. 2012].

Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, bei der durch die intraarterielle Gabe von Bevacizumab zusammen mit EmboCept® S eine erhöhte Apoptoserate gemessen an den Caspase-3-positiven Zellen verzeichnet werden konnte.

Auch bei der kombinierten Applikation von EmboCept® S mit Irinotecan fand sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate gegenüber der Sham-Gruppe. Dies steht im Einklang mit der Studie von Kauffels et al., bei der die Anzahl apoptotischer Zellen nach einer HAI mit Irinotecan und EmboCept® S ebenfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe [Kauffels et al. 2019].

EmboCept® S schafft eine vaskuläre Okklusion, die zu einer verminderten oder ganz aufgehobenen Perfusion des Tumors führt. Als Suspension aus pflanzlichen Stärkemikrosphären (DSM = Degradable Starch Microspheres) mit einem mittleren Durchmesser von 50 µm hat EmboCept® S die geeignete Größe, um diese vaskuläre Okklusion zu erreichen. Während die Größe der Lebersinusoide zwischen 10 und 15 µm beträgt [Menger et al. 1991], haben die Kapillaren der Leberarterie einen mittleren Durchmesser von 8 bis 10 µm [Burkel 1970]. Eine effektive Tumorembolisation kann somit nur mit einer Partikelgröße erreicht werden, die größer als der Kapillardurchmesser ist, was auf EmboCept® S zutrifft.

So zeigen die vorliegenden Untersuchungen, dass EmboCept® S allein oder in Kombination mit den anderen Substanzen das Tumorwachstum am Tag 11 signifikant hemmte. EmboCept® S kann terminale hepatische Arteriolen peripher der Shunt-Verzweigung verschließen. Dies führt zu einer fast vollständigen Unterbrechung des Blutflusses in den Tumor, was auf seine Blutversorgung aus der Arteria hepatica zurückzuführen ist. Das gesunde Leberparenchym hingegen bezieht den Hauptteil seiner Blutversorgung von der portalvenösen Achse und nur einen geringeren Teil von der arteriellen Leberachse [Breedis et al. 1954] und ist somit durch die Therapie mit EmboCept® S nur geringfügig beeinträchtigt.

Die Unterbindung der Blutversorgung des Tumors bewirkt eine verlängerte Verweildauer einer gemeinsam in die Leberarterie verabreichten zytotoxischen pharmakologischen Substanz in situ. Es resultiert eine längere Exposition des Tumors gegenüber der Substanz und dadurch eine verbesserte Wirksamkeit [Goldberg et al. 1991]. Dies wird unter anderem durch einen Konzentrationsgradienten des Zytostatikums zum Tumorgewebe erklärt, der in einer höheren Gewebe-Arzneimittelkonzentration und damit in einer erhöhten antitumoralen Wirkung resultiert [Johansson 1996]. Die Studie von Kauffels et al. bestätigt durch den temporären arteriellen Verschluss eine höhere Umwandlung von CPT-11 in SN-38 im Tumorgewebe [Kauffels et al. 2019]. Der Effekt einer temporären arteriellen Okklusion wurde auch von Pieper et al. am Schweinmodell beschrieben [Pieper 2015]. Hierbei wurde eine HAI eines Leberlappens mit EmboCept® S durchgeführt. Hiernach war die arterielle Durchblutung wieder vollständig wiederhergestellt und es gab keinen nennenswerten Leberschaden.

Auch in der vorliegenden Studie bewirkt die Kombination von EmboCept® S mit Irinotecan und/oder Bevacizumab eine ausgeprägtere Reduktion des Tumolvolums im Vergleich zu der Therapie mit EmboCept® S alleine.

Die Blutversorgung des gesunden Leberparenchyms wird durch die intraarterielle Applikation und Embolisation nur wenig beeinträchtigt. Dies wird durch die nur geringe hepatozelluläre Schädigung gemessen an Grobscholligkeit und Vakuolisierung der Hepatozyten in den HE-Schnitten bestätigt.

Zusätzlich könnte die Tumorregression in der vorliegenden Studie durch Effekte auf Tumorangiogenese und Tumorzellproliferation beeinflusst worden sein. Das kolorektale Karzinom zeigt eine erhöhte Expression von VEGF-Rezeptoren in kolorektalen Lebermetastasen [Warren et al. 1995]. Bevacizumab kann die pathologische Angiogenese durch Hemmung der VEGF Signalwege blockieren, indem es freies VEGF bindet und so die Bindung an vaskuläre Endothel- und Tumorzellen verhindert [Vangestel et al. 2011]. Auch in der vorliegenden Studie zeigte der Einsatz von Bevacizumab einen Einfluss auf die Tumorangiogenese. Durch die Kombination von EmboCept® S mit Bevacizumab konnten wir eine signifikant geringere Vaskularisierung des Tumors im Vergleich zur Sham-Gruppe und der EmboCept® S Monotherapie Gruppe feststellen. Des Weiteren zeigte sich durch EmboCept® S plus Bevacizumab im Vergleich zu einer EmboCept® S Monotherapie eine signifikante Reduktion der Tumorzellproliferation bei unveränderter Leberproliferation.

Vergleichbare Ergebnisse zeigte auch eine Studie von Yang et al. [Yang et al. 2010] über die Auswirkungen von Bevacizumab bei Mikrometastasen der Leber von okulären Melanomen. Hier fand sich eine signifikante Reduktion der Ki67 Expression in den Tumorzellen als Hinweis auf eine verminderte Tumorzellproliferation. Der Einfluss von Bevacizumab auf die Tumorangiogenese ist durch seine direkte antiangiogene Wirkung als VEGF Antikörper zu erklären. Weitere Studien wie zum Beispiel von Patruno et al. beschreiben, dass Bevacizumab mit hoher Affinität VEGF bindet und dessen Interaktion mit seinen Rezeptoren und somit das Tumorstadium, die Freisetzung parakriner/autokriner Wachstumsfaktoren und die Tumormetastasierung hemmt [Patruno et al. 2009].

Die in der vorliegenden Studie gezeigten Einflüsse von Bevacizumab auf die Tumorangiogenese stehen auch in Einklang mit den Ergebnissen von Myers et al. sowie Huang et al. die eine antiangiogene Wirkung mit Normalisierung der Gefäße bei Versuchstieren und auch Menschen zeigten [Myers et al. 2010; Huang et al. 2010].

Nach Anwendung von Bevacizumab fand sich kein erhöhter hepatozellulärer Schaden im Vergleich zur Sham-Gruppe. Es zeigte sich auch keine vermehrte Venenschädigung. Die Fibrinthrombosierung konnte im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant verringert werden. Weiter von Interesse ist, dass durch die intraarterielle Verabreichung von Bevacizumab mit EmboCept® S nicht nur das Tumorstadium gehemmt, sondern sogar eine Tumorregression

induziert wird. Es wurde im Vergleich zur Sham- und EmboCept® S Gruppe ein signifikant verkleinertes Tumolvolumen bei zusätzlich vermehrter Apoptose gemessen werden. Auch war nach EmboCept® S plus Bevacizumab die Tumorregression auch stärker ausgeprägt als nach EmboCept® S plus Irinotecan.

In der vorliegenden Studie konnten wir keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der PCNA-positiven Zellen feststellen. Dies deutet darauf hin, dass die Behandlung mit EmboCept® S in der vorliegenden Studie die Tumorzellproliferation nicht beeinflusst. Allerdings hemmte die Embolisierung mit DSM die Tumorangiogenese, wie durch eine signifikant reduzierte Anzahl von PECAM-1-positiven Zellen in allen Gruppen mit EmboCept® S gezeigt werden konnte. Darüber hinaus zeigten mit EmboCept® S behandelte Tiere eine deutlich erhöhte Schädigung des Endothels der postsinusoidalen Venolen. Die mikrovaskuläre Perfusion in der Leber umfasst bekanntermaßen arterio-portalvenöse Shunts, um die Homogenität der Versorgung aufrechtzuerhalten. Die Arteriolen, die Shunts bilden, messen einen Durchmesser von etwa 50-100 µm [Burkel 1970]. Somit wäre eine erhöhte Rate an Fibrinthromben in post-sinusoidalen Venolen von mit Embolisat behandelten Tieren zu erwarten, da die DSM Partikel einen kleineren Durchmesser als die Arteriolen aufweisen und diese so passieren können. Jedoch zeigte unsere Auswertung keine erhöhte Fibrinthrombosierung in den Venolen.

Irinotecan ist ein bekanntes Chemotherapeutikum mit antiproliferativer Wirkung und verursacht einen Abbruch der DNA-Replikation durch DNA-Doppelstrangbrüche in der S-Phase des Zellzyklus [Hsiang et al. 1985]. So zeigte auch die vorliegende Arbeit in allen Gruppen, in denen eine Embolisierung mit Irinotecan kombiniert wurde, eine signifikante Abnahme der proliferativen Zellen im Tumorgewebe im Vergleich zu Sham-Gruppe oder EmboCept® S-behandelten Tieren. Im normalen Lebergewebe wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Darüber hinaus zeigte EmboCept® S mit Irinotecan und Bevacizumab in der vorliegenden Studie die stärkste antiangiogene Wirkung im Vergleich zu allen anderen experimentellen Gruppen.

In früheren Studien konnte die Kombination von Irinotecan und Bevacizumab eine bessere Penetration in neoplastischen Zellen und eine positive Tumorantwort zeigen [Vangestel et al. 2011]. Jain et al. beschreiben in ihrer Studie, dass antiangiogene Wirkstoffe die abnormale Struktur und Funktion der Tumorgefäße vorübergehend normalisieren können und sie so für die Zufuhr von Sauerstoff und Medikamenten empfänglicher machen. Dadurch kann die Wirksamkeit konventioneller Therapien erhöht werden [Jain et al. 2005]. So kann auch Irinotecan besser in das Tumorgewebe eindringen. Ein weiterer Grund könnte die Normalisierung des onkotischen Drucks im Tumorgewebe durch Bevacizumab sein [Tong et al. 2004]. In Tumoren ist der interstitielle Druck aufgrund einer beeinträchtigten lymphatischen Funktion und einer veränderten Gefäßstruktur sowie Gefäßfunktion erhöht [Padera et al. 2002;

Jain et al. 2003]. Außerdem behindert die erhöhte Durchlässigkeit der Tumorgefäße oft die Anlieferung der Chemotherapeutika [Netti et al. 1996; Baish et al. 1997]. Willett et al. beschrieben in ihrer Studie, dass bereits die einmalige Gabe von Bevacizumab die Tumorperfusion, das Gefäßvolumen, die Gefäßdichte und den interstitiellen Druck verringert [Willett et al. 2004]. Sie folgerten, dass die VEGF-Blockade durch Bevacizumab einen direkten und schnellen antivaskulären Effekt in menschlichen Tumoren hat. Durch eine reduzierte Tumolvaskularisation und dadurch bessere Irinotecan-Penetration ins Tumorgewebe kommt es zu einem besseren antineoplastischen Effekt.

In der vorliegenden Studie zeigte eine Behandlung mit EmboCept® S plus Irinotecan und Bevacizumab die beste antiangiogene Wirkung. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion des Tumorumfanges nach der Behandlung mit EmboCept® S plus Bevacizumab und EmboCept® S plus Irinotecan und Bevacizumab.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination von EmboCept® S mit Irinotecan sowohl das Tumorumfang als auch die Tumorproliferation sowie die Tumolvaskularisation reduziert werden konnte.

Auch andere Studien zeigten bereits einen Benefit durch die Kombination eines Embolisates mit einem Zytostatikum. So beschrieben Håkansson et al. eine verbesserte antineoplastische Wirkung von Zytostatika bei der Kombination mit Embolisaten sowohl in tierexperimentellen Modellen als auch in randomisierten klinischen Studien [Håkansson et al. 1997]. Da EmboCept® S zu einem temporären Gefäßverschluss führt, ist die Passagezeit durch die Leber von gleichzeitig intraarteriell verabreichten zytotoxischen Medikamenten verlängert. Damit ist eine erhöhte Aufnahme in das Gewebe rund um das embolisierte Gefäß möglich [Starkhammar et al. 1987]. Diese Tatsache ermöglicht auch die Verwendung von Pharmaka, die keinen wesentlichen First-pass Effekt haben. In einer Studie von Saenger et al. wurde in einem Rattenmodell die therapeutische Wirksamkeit von Irinotecan im Rahmen einer Embolisation untersucht. In dem Metastasenmodell zeigte Irinotecan in Verbindung mit der Injektion von Stärkemikrosphären eine bessere antineoplastische Wirkung gegen CC531-lac-Z Tumorzellen als eine Chemoembolisation in Kombination mit 5-Fluorouracil [Saenger et al. 2004]. Somit konnte sich Irinotecan im Rahmen einer Chemoembolisation gegen 5-FU, einem Medikament mit hohem First-pass Effekt durchsetzen [Kuan et al. 1996]. Auch die vorliegende Studie spiegelt diese Ergebnisse wieder. So konnte durch die Kombination von Irinotecan mit EmboCept® S eine stärkere Hemmung des Tumorzustands im Vergleich zur EmboCept® S Monotherapie erzielt werden, welche allerdings nicht signifikant gegenüber der Sham-Gruppe war.

Darüber hinaus beeinflussen die Stoffwechselprozesse von Chemotherapeutika in vivo, einschließlich Absorption, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung, auch die klinische Wirksamkeit. Über eine HAI verabreichtes Bevacizumab hat eine kurze Halbwertszeit und wird

hauptsächlich in der Leber verstoffwechselt, was extrem niedrige Medikamentenkonzentrationen im peripheren Blut ermöglicht und die Auswirkungen des hepatischen First-Pass-Stoffwechsels verringert. Infolgedessen eignet sich HAI für die Verabreichung wirksamer höherer Dosen von Arzneimitteln direkt an den Tumor und senkt damit das Risiko unerwünschter systemischer Ereignisse [Sadahiro et al. 2013].

EmboCept® S plus Irinotecan und EmboCept® S plus Irinotecan und Bevacizumab verursachten einen signifikanten Anstieg der hepatozellulären und endothelialen Schäden. Irinotecan führt durch die zuvor gezeigten Nebenwirkungen zu einer signifikanten endothelialen und hepatozellulären Schädigung. Die stärkste hepatozelluläre Schädigung wurde nach der Behandlung mit Irinotecan und die schwerste endotheliale Schädigung nach der Behandlung mit EmboCept® S plus Irinotecan und Bevacizumab gezeigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie implizieren, dass die therapeutische Verlängerung der Chemotherapie mit einem VEGF-Inhibitor als hepatische arterielle Infusion in Kombination mit einer Embolisation eines überwiegend arteriell versorgten Tumors effektiv ist, um das Tumolvolumen zu reduzieren, ohne das normale Lebergewebe zu schädigen.

Für eine TACE stehen zwei Embolisationsmittel zur Verfügung: Lipiodol (ethiodiertes Öl) und abbaubare Stärkemikrosphären (DSM). Beide Mittel verlängern die Dauer der chemotherapeutischen Wirkung auf Tumore durch Gefäßokklusionen. Während Lipiodol eine mittlere Embolisationszeit von 4 bis 12 Wochen hat, zeichnen sich DSM durch eine pharmakologische Gesamtembolisationszeit von maximal 90 - 120 Minuten aus. Die zeitliche Okklusion durch DSM führt im Vergleich zur konventionellen TACE mit Lipiodol nur zu einem moderaten Anstieg des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und damit wahrscheinlich zu einer geringeren Neoangiogenese [Schicho et al. 2016].

In einer Studie von Vogl et al. wurde die DSM-TACE mit der konventionellen TACE mit Lipiodol verglichen. Hierbei konnte die DSM-TACE gegenüber der konventionellen TACE einen signifikanten Unterschied bei der Verringerung des Tumolvolumens und beim Ansprechen des Tumors mit einem höheren Anteil an Respondern (78% vs. 38%) zeigen [Vogl et al. 2021]. Die Autoren folgerten, dass Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen nicht nur von dem kürzeren Embolisationseffekt der DSM-TACE profitieren, sondern auch von einem besseren Ansprechen des Tumors. Diese Daten unterstreichen auch unsere Wahl für EmboCept® S als Embolisat.

In der Klinik wird bei kolorektalen Karzinomen als alternatives Chemotherapeutikum zu Irinotecan oft Oxaliplatin, ein Diaminocyclohexanplatin, eingesetzt. Eine randomisierte Phase II Studie von Kalofones et al. zeigte, dass die wöchentliche Gabe von Irinotecan/Leukovorin/5FU oder Oxaliplatin/Leukovorin/5FU in der first-line Behandlung von

Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalem Karzinom vergleichbar effektiv ist [Kalofonos et al. 2005]. Auch zeigten beide Regime manageable Nebenwirkungen. Jedoch dürfte nach Meinung der Autoren das Irinotecan-Regime die vorzuziehende Therapie sein, da Oxaliplatin mit einer der signifikant höheren Inzidenz von peripheren Neuropathien Grad 3 einhergeht. So wurde auch in der vorliegenden Studie Irinotecan als Chemotherapeutikum eingesetzt und nicht Oxaliplatin.

Zu den möglichen Nebenwirkungen von Irinotecan zählen Diarrhö oder Obstipation, Übelkeit und Erbrechen, Dehydratation, Neutropenie, Nierenschädigung, akutes cholinerges Syndrom, reversible Alopezie und allergische Reaktionen, jedoch alles in einem akzeptablen Ausmaß. Außerdem kann Irinotecan zu einer Steatohepatitis führen [Fernandez et al. 2005]. In der vorliegenden Studie zeigten sich in der Irinotecan-Gruppe keine schwerwiegenden Nebenwirkungen. Jedoch waren bei einer intraarteriellen Gabe von Irinotecan zusammen mit EmboCept® S in den Hämatoxylin-Eosin gefärbten Schnitten signifikant vermehrt grobschollige Zellen als Hinweis für einen hepatozellulären Schaden zu finden. Auch die Vakuolisierung der Zellen war durch die intraarterielle Gabe von Irinotecan zusammen mit EmboCept® S signifikant erhöht, was für eine erhöhte hepatozelluläre Schädigung spricht. Außerdem zeigte allein die Therapie mit EmboCept® S und Irinotecan erhöhte Leukozyten- und Thrombozytenwerte. Allerdings bedürfte es einen längeren Beobachtungszeitraum, um eine valide Aussage möglicher Nebenwirkungen treffen zu können und um mögliche schwere Nebenwirkungen auszuschließen.

Verglichen mit anderen Embolisaten zeigen sich bei der Verwendung von DSM im Rahmen einer TACE nur selten schwerwiegende Nebenwirkungen wie das Postembolisationssyndrom. Dies ist dadurch zu erklären, dass durch vollständigen Abbau der DSM durch die α -Amylase nur ein temporärer Gefäßverschluss erzeugt wird, was auch eine wiederholte TACE mit DSM erlaubt [Ebert et al. 2013]. Auch bei unseren Versuchen zeigten sich keine Nebenwirkungen. Bevacizumab war in einer Phase I Studie von Gordon et al., welche die Arzneimittelsicherheit und Pharmakokinetik von rekombinatem humanisiertem Anti-VEGF untersuchte, sicher anzuwenden ohne Nebenwirkungen in einer Konzentration bis zu 10mg/kgKG [Gordon et al. 2001]. Es wurden klinisch keine signifikanten Veränderungen in biochemischen, hämatologischen und gerinnungsassozierten Parametern festgestellt, was auch mit Ergebnissen der vorliegenden Studie übereinstimmt. Andere klinische Studien, die mehrere Inhibitoren von VEGF benutzten, wiesen auf ein potentiell erhöhtes Risiko von Blutungen oder thrombotischen Ereignissen hin [Bergsland et al. 2000]. Auch hierfür fanden wir in der vorliegenden Studie bei normalen laborchemischen Parametern keine Anzeichen.

7.3. Schlussfolgerung

Zusammengefasst zeigt die vorliegende Studie, dass eine transarterielle Embolisation als Kombination aus EmboCept[®] S, Irinotecan und Bevacizumab ein effektiver therapeutischer Ansatz ist, um das Wachstum von kolorektalen Lebermetastasen zu hemmen. Alle Gruppen mit intraarteriell verabreichten Medikamenten zeigten ein verkleinertes Tumolvolumen. Durch die Zugabe von Bevacizumab zu EmboCept[®] S und Irinotecan konnte eine signifikante Tumorregression erreicht werden. Diese ist durch die antiangiogene Effekte und der daraus resultierenden verbesserten Wirkung des Chemotherapeutikums zu erklären.

Damit scheint eine Chemoembolisation mit EmboCept[®] S in Kombination mit Bevacizumab mit oder ohne Irinotecan ein vielversprechender Ansatz zur Therapie von primär inoperablen kolorektalen Lebermetastasen zu sein und verdient das Interesse weiterer Studien.

8. Literaturverzeichnis

1. Abcouwer SF, Lin CM, Wolpert EB, Shanmugam S, Schaefer EW, Freeman WM, Barber AJ, Antonetti DA: Effects of ischemic preconditioning and bevacizumab on apoptosis and vascular permeability following retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(11): 5920 - 5933
2. Adam R, Avisar E, Ariche A, Giachetti S, Azoulay D, Castaing D, Kunstlinger F, Levi F, Bismuth F: Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Ann Surg Oncol.* 2001;8(4):347 - 353
3. Adam R, Barroso E, Laurent C, Nuzzo G, Hubert C, Mentha G: Impact of the type and modalities of preoperative chemotherapy on the outcome of liver resection for colorectal metastases. *J Clin Oncol* 2011; 29
4. Adam R, Yi B, Innominato PF, Barroso E, Laurent C, Giuliante F: Resection of colorectal liver metastases after second-line chemotherapy: is it worthwhile? A LiverMetSurvey analysis of 6415 patients. *Eur J Cancer.* 2017; 78: 7 - 15.
5. Aigner KR, Patt YZ, Link KH, Kreidler J: Regional Cancer Treatment. *Contrib Oncol.* Basel, Karger, 1988, vol 29, pp 205 - 216
6. Albert M, Kiefer MV, Sun W, Haller D, Fraker DL, Tuite CM, Stavropoulos SW, Mondschein JI, Soulen MC: Chemoembolization of colorectal liver metastases with cisplatin, doxorubicin, mitomycin C, ethiodol, and polyvinyl alcohol. *Cancer.* 2011; 117(2): 343 - 352
7. Ambiru S, Miyazaki M, Ito H, Nakagawa K, Shimizu H, Nakajima N: Adjuvant regional chemotherapy after hepatic resection for colorectal metastases. *Br J Surg.* 1999; 86(8):1025 - 1031
8. American Cancer Society: colorectal cancer facts and figures 2014–2016. *Am Cancer Soc.* 2014
9. Ammori JB, Kemeny NE: Regional hepatic chemotherapies in treatment of colorectal cancer metastases to the liver. *Semin Oncol.* 2010; 37(2): 139 - 148
10. Archer SG, Gray BN: Vascularization of small liver metastases. *Br J Surg.* 1989; 76(6):545 - 548
11. Baish JW, Netti PA, Jain RK: Transmural coupling of fluid flow in microcirculatory network and interstitium in tumors. *Microvasc Res.* 1997; 53(2): 128 - 141
12. Bartkowski R, Berger MR, Aguiar JL, Henne TH, Dörsam J, Geelhaar GH, Schlag P, Herfarth C: Experiments on the efficacy and toxicity of locoregional chemotherapy of liver tumors with 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) and 5-fluorouracil (5-FU) in an animal model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1986;111(1): 42 - 46
13. Bergsland E, Hurwitz H, Fehrenbacher: A randomized phase II trial comparing rhuMAb VEGF (recombinant humanized antibody to vascular endothelial growth factor) plus 5-

- fluorouracil/ leucovorin (FU/LV) to FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 200; 19: 242a
14. Bird NC, Mangnall D, Majeed AW: Biology of colorectal liver metastases: A review. *J Surg Oncol.* 2006; 94(1): 68 - 80
 15. Bock F, Onderka J, Dietrich T, Bachmann B, Kruse FE, Paschke M, Zahn G, Cursiefen C: Bevacizumab as a potent inhibitor of inflammatory corneal angiogenesis and lymphangiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48(6): 2545 - 2552
 16. Bödeker H, Kamphorst EJ, Wünsch PH, Linnemann U, Berger MR: Superiority of combined chemo-embolization and portal infusion with 5-fluorouracil over locoregional infusion concepts in Novikoff hepatoma-bearing rats. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2003; 129(11): 655 - 661
 17. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68: 394 - 424
 18. Breedis C, Young G: The blood supply of neoplasms in the liver. *Am J Pathol.* 1954; 30(5): 969 - 977
 19. Breen DJ, Rutherford EE, Stedman B, Lee-Elliott C, Hacking CN: Intrahepatic arteriportal shunting and anomalous venous drainage: understanding the CT features in the liver. *Eur Radiol.* 2004;14(12): 2249 - 2260
 20. Burkel WE: The fine structure of the terminal branches of the hepatic arterial system of the rat. *Anat Rec.* 1970; 167(3): 329 - 349
 21. Chao G, Zhu Y, Fang L: Retrospective study of risk factors for colorectal adenomas and non-adenomatous polyps. *Transl Cancer Res.* 2020; 9(3):1670 - 1677
 22. Chen K, Gong Y, Zhang Q, Shen Y, Zhou T: Efficacy and safety of addition of bevacizumab to FOLFIRI or irinotecan/bolus 5-FU/LV (IFL) in patients with metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95(46): e5221
 23. Civalleri D, Esposito M, Fulco RA, Vannozzi M, Balletto N, De Cian F, Percivale PL, Merlo F: Liver and tumor uptake and plasma pharmacokinetic of arterial cisplatin administered with and without starch microspheres in patients with liver metastases. *Cancer.* 1991; 68(5): 988 - 994
 24. Cohen AD, Kemeny NE: An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. *Oncologist* 2003; 8: 553 - 566
 25. Creasy JM, Sadot E, Koerkamp BG, Chou JF, Gonen M, Kemeny NE, Balachandran VP, Kingham TP, DeMatteo RP, Allen PJ, Blumgart LH, Jarnagin WR, D'Angelica MI: Actual 10-year survival after hepatic resection of colorectal liver metastases: what factors preclude cure? *Surgery.* 2018; 163(6): 1238 - 124

26. Cross AJ, Robbins EC, Pack K, Stenson I, Kirby PL, Patel B, Rutter MD, Veitch AM, Saunders BP, Duffy SW, Wooldrage K: Long-term colorectal cancer incidence after adenoma removal and the effects of surveillance on incidence: a multicentre, retrospective, cohort study. *Gut*. 2020; 69(9): 1645 - 1658
27. Cunningham D, Pyrhönen S, James RD, Punt CJ, Hickish TF, Heikkila R, Johannesen TB, Starkhammar H, Topham CA, Awad L, Jacques C, Herait P: Randomised trial of irinotecan plus supportive care versus supportive care alone after fluorouracil failure for patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet*. 1998; 352(9138): 1413 - 1418
28. Devaud N, Kanji ZS, Dhani N: Liver resection after chemotherapy and tumour downsizing in patients with initially unresectable colorectal cancer liver metastases. *HPB (Oxford)*. 2014;16(5):475 - 480
29. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, Jandik P, Iveson T, Carmichael J, Alakl M, Gruia G, Awad L, Rougier P: Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000; 355(9209): 1041 - 1047
30. Ebert M, Ebert J, Berger G: Intravital microscopic research of microembolization with degradable starch microspheres. *J Drug Deliv*. 2013; 242060
31. Echevarria Uruga JJ, García-Alonso Montoya I, Díaz Sanz I, Herrero de la Parte B, Miguélez Vidales JL, Zabalza Estévez I, Fernández-Ruanova B: Caracterización ecográfica de un modelo experimental de metástasis hepáticas de carcinoma de colon [Ultrasonographic characterization of an experimental model of liver metastases from colon carcinoma in rats]. *Radiologia*. 2010; 52(1): 37 - 44
32. Eyol E, Boleij A, Taylor RR, Lewis AL, Berger MR: Chemoembolisation of rat colorectal liver metastases with drug eluting beads loaded with irinotecan or doxorubicin. *Clin Exp Metastasis*. 2008; 25(3): 273 - 282
33. Dakhil S et al. (1982): Improved regional selectivity of hepatic arterial BCNU with degradable microspheres. *Cancer* 59: 631 - 635
34. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Esser S, Mathers C, Rebelo M: Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136: 359 - 386
35. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759 - 767
36. Fernandez FG, Ritter J, Goodwin JW, Linehan DC, Hawkins WG, Strasberg SM: Effect of steatohepatitis associated with irinotecan or oxaliplatin pretreatment on resectability of hepatic colorectal metastases. *J Am Coll Surg*. 2005; 200(6): 845 - 853
37. Fernando NH, Hurwitz HI: Targeted therapy of colorectal cancer: clinical experience with bevacizumab. *Oncologist*. 2004; 9 Suppl 1: 11 - 18

38. Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 1997; 18(1): 4 - 25
39. Fiorentini G, Aliberti C, Mulazzani L, Coschiera P, Catalano V, Rossi D, Giordani P, Ricci S: Chemoembolization in colorectal liver metastases: the rebirth. *Anticancer Res.* 2014; 34(2): 575 - 584
40. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein W, Raab HR, Weitz J, Lordick F, Hartmann JT, Stoehlmacher-Williams J, Lang H, Trarbach T, Liersch T, Ockert D, Jaeger D, Steger U, Suedhoff T, Rentsch A, Köhne CH: Survival of patients with initially unresectable colorectal liver metastases treated with FOLFOX/cetuximab or FOLFIRI/cetuximab in a multidisciplinary concept (CELIM study). *Ann Oncol.* 2014; 25(5): 1018 - 1025
41. Fong Y, Fortner J, Sun RL, Brennan MF, Blumgart LH: Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg.* 1999; 230(3): 309 - 318
42. Fournier C, Hamon M, Wannebroucq J, Petiprez S, Pruvo JP, Hecquet B: Preparation and preclinical evaluation of bioresorbable hydroxyethylstarch microspheres for transient arterial embolization, *Int. J. Pharm.* 1994; 106: 41 - 49
43. Frankel TL, D'Angelica MI: Hepatic resection for colorectal metastases. *J Surg Oncol.* 2014;109(1): 2 - 7
44. Galle PR, Forner A., Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul JL, Schirmacher P, Vilgrain V: EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2018; 69: 182 - 236
45. Germer CT, Isbert C, Albrecht D, Roggan A, Pelz J, Ritz JP, Müller G, Buhr HJ: Laser-induced thermotherapy combined with hepatic arterial embolization in the treatment of liver tumors in a rat tumor model. *Ann Surg.* 1999; 230(1): 55 - 62
46. Goldberg JA, Kerr DJ, Blackie R, Whately TL, Pettit L, Kato T, McArdle CS: Mitomycin C-loaded microcapsules in the treatment of colorectal liver metastases. Pharmacokinetics of regionally administered particulate chemotherapy. *Cancer.* 1991; 67(4): 952 - 955
47. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Alberts SR: A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2004;22(1): 23 - 30
48. Goldberg RM, Hurwitz HI, Fuchs CS: The role of targeted therapy in the treatment of colorectal cancer. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2006; 4(8 Suppl 17): 1 - 10
49. Gonda T, Ishida H, Yoshinaga K, Sugihara K: Microvasculature of small liver metastases in rats. *J Surg Res.* 2000; 94(1): 43 - 48

50. Gordon MS, Margolin K, Talpaz M, Sledge GW Jr, Holmgren E, Benjamin R, Stalter S, Shak S, Adelman D: Phase I safety and pharmacokinetic study of recombinant human anti-vascular endothelial growth factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19(3): 843 - 850
51. Griffini P, Smorenburg SM, Vogels IM, Tigchelaar W, Van Noorden CJ: Kupffer cells and pit cells are not effective in the defense against experimentally induced colon carcinoma metastasis in rat liver. *Clin Exp Metastasis.* 1996;14(4): 367 - 380
52. Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM, Dong W, Sargent D, Hedrick E, Kozloff M: Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *J Clin Oncol.* 2008; 26(33): 5326 - 5334
53. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H: Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology.* 2001; 33(2): 397 - 405
54. Hagens M, Koelemij R, Ensink NG, van Eendenburg JD, van Vlierberghe RL, Eggermont AM, van de Velde CJ, Fleuren GJ, Kuppen PJ: The development of novel mouse monoclonal antibodies against the CC531 rat colon adenocarcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2000; 18(4): 281 - 289
55. Håkansson L, Håkansson A, Morales O, Thorelius L, Warfving T: Spherex (degradable starch microspheres) chemo-occlusion--enhancement of tumor drug concentration and therapeutic efficacy: an overview. *Semin Oncol.* 1997; 24: 100 -109
56. Hao W, Binbin J, Wei Y, Kun Y: Can Radiofrequency Ablation Replace Liver Resection for Solitary Colorectal Liver Metastasis? A Systemic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 2020; 10: 561669
57. Hamilton S, Vogelstein B, Kudo S: Carcinoma of the colon and rectum. In: Hamilton S and Aaltonen L; *Pathology and Genetics Tumors of the Digestive System.* Lyon: IARC Press. 2000; 105 – 143
58. Hatzidakis A, Müller L, Krokidis M, KloECKner R: Local and Regional Therapies for Hepatocellular Carcinoma and Future Combinations. *Cancers (Basel).* 2022; 14(10): 2469
59. Hong K., McBride JD, Georgiades CS, Reyes DK, Herman JM, Kamel IR: Salvage Therapy for Liver-dominant Colorectal Metastatic Adenocarcinoma: Comparison between Transcatheter Arterial Chemoembolization versus Yttrium-90 Radioembolization. *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 2009; 20(3), 360 - 367
60. Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF: Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* 1985; 260(27): 14873 - 14878

61. Huang G, Chen L: Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136(8): 1201 - 1211
62. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2004; 350(23): 2335 - 2342
63. Hurwitz HI, Tebbutt NC, Kabbinavar F, Giantonio BJ, Guan ZZ, Mitchell L, Waterkamp D, Tabernero J: Efficacy and safety of bevacizumab in metastatic colorectal cancer: pooled analysis from seven randomized controlled trials. *Oncologist.* 2013; 18(9): 1004 - 1012
64. Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T and Sakai Y: Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer-Alterations to Anti-VEGF Pathway. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 1232
65. Jain RK: Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003; 9(6): 685 - 693
66. Jain RK: Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science.* 2005; 307(5706): 58 - 62
67. Johansson CJ: Pharmacokinetic rationale for chemotherapeutic drugs combined with intra-arterial degradable starch microspheres (Spherex). *Clin Pharmacokinet.* 1996; 31(3): 231 - 240
68. Kabbinavar F, Ellis LM: Can inhibition of angiogenic pathways increase the efficacy of intravenous 5-fluorouracil-based regimens? *Clin Colorectal Cancer* 2004; 69 - 73
69. Kalofonos HP, Aravantinos G, Kosmidis P, Papakostas P, Economopoulos T, Dimopoulos M, Skarlos D, Bamias A, Pectasides D, Chalkidou S, Karina M, Koutras A, Samantas E, Bacoyiannis C, Samelis GF, Basdanis G, Kalfarentzos F, Fountzilas G: Irinotecan or oxaliplatin combined with leucovorin and 5-fluorouracil as first-line treatment in advanced colorectal cancer: a multicenter, randomized, phase II study. *Ann Oncol.* 2005; 16(6): 869 - 877
70. Karkkainen MJ, Mäkinen T, Alitalo K. Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(1): E2 - 5
71. Kato T, Nemoto R, Mori H, Takahashi M, Tamakawa Y, Harada M: Arterial Chemoembolization With Microencapsulated Anticancer Drug: An Approach to Selective Cancer Chemotherapy With Sustained Effects. *JAMA.* 1981; 245(11): 1123 -1127
72. Kauffels A, Kitzmüller M, Gruber A, Nowack H, Bohnenberger H, Spitzner M, Kuthning A, Sprenger T, Czejka M, Ghadimi M, Sperling J: Hepatic arterial infusion of irinotecan and EmboCept® S results in high tumor concentration of SN-38 in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2019; 36(1): 57 - 66

73. Kemeny NE, Jarnagin WR, Capanu M, Fong Y, Gewirtz AN, Dematteo RP, et al. Randomized phase II trial of adjuvant hepatic arterial infusion and systemic chemotherapy with or without bevacizumab in patients with resected hepatic metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 884 - 889
74. Kim HK, Chung YH, Song BC, Yang SH, Yoon HK, Yu E, Sung KB, Lee YS, Lee SG, Suh DJ: Ischemic bile duct injury as a serious complication after transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2001; 32(5): 423 - 427
75. Köhler G, Milstein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517): 495 - 497
76. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA: Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation.* 1999; 67(8): 1099 - 1105
77. Koo A, Liang IY, Cheng KK: The terminal hepatic micro- circulation in the rat. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci.* 1975; 60: 261 - 266
78. Kuan HY, Smith DE, Ensminger WD, Knol JA, DeRemer SJ, Yang Z, Stetson PL: Regional pharmacokinetics of 5-fluorouracil in dogs: role of the liver, gastrointestinal tract, and lungs. *Cancer Res.* 1998; 58(8): 1688 - 1694
79. Kubicka S, Greil R, André T, Bennouna J, Sastre J, Van Cutsem E, von Moos R, Osterlund P, Reyes-Rivera I, Müller T, Makrutzki M, Arnold D; ML18147 study investigators including AIO, GERCOR, FFCD, UNICANCER GI, TTD, BGDO, GEMCAD, and AGMT groups: Bevacizumab plus chemotherapy continued beyond first progression in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with bevacizumab plus chemotherapy: ML18147 study KRAS subgroup findings. *Ann Oncol.* 2013; 24(9): 2342 - 2349
80. Kuriyama S, Tsujimoto T, Nakatani Y, Tsujinoue H, Yoshiji H, Mitoro A, Yamazaki M, Okuda H, Toyokawa Y, Nagao S, Nishiwaki I, Fukui H: Sonographic estimation of liver tumor development induced by oral administration of thioacetamide in rat. *In Vivo.* 1999; 13(2): 129 - 134
81. Laschke MW, Körbel C, Rudzitis-Auth J, Gashaw I, Reinhardt M, Hauff P, Zollner TM, Menger MD: High-resolution ultrasound imaging: a novel technique for the noninvasive in vivo analysis of endometriotic lesion and cyst formation in small animal models. *Am J Pathol.* 2010 Feb; 176(2): 585 - 593
82. Llovet JM, Real MI, Montaña X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Solà R, Rodés J, Bruix J; Barcelona Liver Cancer Group: Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable

- hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002; 359(9319): 1734 - 1739
83. Llovet JM, Beaugrand M: Hepatocellular carcinoma: present status and future prospects. *J Hepatol*. 2003;38: 136 - 149
84. Llovet JM, Bruix J: Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology*. 2003; 37(2): 429 - 442
85. Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J: Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2002; 35(5): 1164 - 1171
86. Lorelius LE, Benedetto AR, Blumhardt R, Gaskill HV 3rd, Lancaster JL, Stridbeck H: Enhanced drug retention in VX2 tumors by use of degradable starch microspheres. *Invest Radiol*. 1984; 19(3): 212 - 215
87. Mahnken AH, Pereira PL, de Baère T: Interventional oncologic approaches to liver metastases. *Radiology*. 2013; 266(2): 407 - 430
88. Marinelli A, van Dierendonck JH, van Brakel GM, Irth H, Kuppen PJ, Tjaden UR, van de Velde CJ: Increasing the effective concentration of melphalan in experimental rat liver tumours: comparison of isolated liver perfusion and hepatic artery infusion. *Br J Cancer*. 1991; 64(6): 1069 - 1075
89. Marquet RL, Westbroek DL, Jeekel J: Interferon treatment of a transplantable rat colon adenocarcinoma: importance of tumor site. *Int J Cancer*. 1984; 33(5): 689 - 692
90. Masi G, Cupini S, Marcucci L, Cerri E, Loupakis F, Allegrini G, Brunetti IM, Pfanner E, Viti M, Goletti O, Filipponi F, Falcone A: Treatment with 5-fluorouracil/folinic acid, oxaliplatin, and irinotecan enables surgical resection of metastases in patients with initially unresectable metastatic colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2006; 13(1): 58 - 65
91. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A: Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res*. 2001; 7: 2182 - 2194
92. Memon K, Lewandowski RJ, Mulcahy MF, Riaz A, Ryu RK, Sato KT: Radioembolization for neuroendocrine liver metastases: safety, imaging, and long-term outcomes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012; 83(3): 887 - 894
93. Memon K, Lewandowski RJ, Riaz A, Salem R: Chemoembolization and radioembolization for metastatic disease to the liver: available data and future studies. *Curr Treat Options Oncol*. 2012; 13(3): 403 - 415
94. Meguro M, Katsuramaki T, Kimura H, Isobe M, Nagayama M, Kukita K, Nui A, Hirata K: Apoptosis and necrosis after warm ischemia-reperfusion injury of the pig liver and their inhibition by ONO-1714. *Transplantation*. 2003; 75(5): 703 - 710

95. Menger MD, Marzi I, Messmer K: In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res.* 1991; 23: 158 - 169
96. Menger MD, Lehr HA: Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today.* 1993;14(11): 519 - 522
97. Miura JT, Gamblin TC: Transarterial chemoembolization for primary liver malignancies and colorectal liver metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2015; 24(1):149 - 166
98. Morson BC: Precancerous lesions of the colon and rectum. Classification and controversial issues. *JAMA* 1962; 179: 316 - 21
99. Myers AL, Williams RF, Ng CY, Hartwich JE, Davidoff AM: Bevacizumab-induced tumor vessel remodeling in rhabdomyosarcoma xenografts increases the effectiveness of adjuvant ionizing radiation. *J Pediatr Surg.* 2010 Jun; 45(6): 1080 - 1085
100. Netti PA, Roberge S, Boucher Y, Baxter LT, Jain RK: Effect of transvascular fluid exchange on pressure-flow relationship in tumors: a proposed mechanism for tumor blood flow heterogeneity. *Microvasc Res.* 1996; 52(1): 27 - 46
101. Nishiofuku H, Tanaka T, Matsuoka M, Otsuji T, Anai H, Sueyoshi S, Inaba Y, Koyama F, Sho M, Nakajima Y, Kichikawa K: Transcatheter arterial chemoembolization using cisplatin powder mixed with degradable starch microspheres for colorectal liver metastases after FOLFOX failure: results of a phase I/II study. *J Vasc Interv Radiol.* 2013; 24(1): 56 - 65
102. Nordlinger B, Van Cutsem E, Gruenberger T, Glimelius B, Poston G, Rougier P, Sobrero A, Ychou M: European Colorectal Metastases Treatment Group; Sixth International Colorectal Liver Metastases Workshop. Combination of surgery and chemotherapy and the role of targeted agents in the treatment of patients with colorectal liver metastases: recommendations from an expert panel. *Ann Oncol.* 2009; 20(6): 985 - 992
103. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B: Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(12): 1208 - 1215
104. Oda M, Yokomori H, Han JY: Regulatory mechanisms of hepatic microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003; 29: 167 - 182
105. Oh JY, Kim MK, Shin MS, Lee HJ, Lee JH, Wee WR: The anti-inflammatory effect of subconjunctival bevacizumab on chemically burned rat corneas. *Curr Eye Res.* 2009; 34(2): 85 - 91
106. Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK: Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science.* 2002; 296(5574): 1883 - 1886

107. Papathanassiou M, Theodossiadis PG, Liarakos VS, Rouvas A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Vergados IA: Inhibition of corneal neovascularization by subconjunctival bevacizumab in an animal model. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145(3): 424 - 431
108. Patruno R, Arpaia N, Gadaleta CD, Passantino L, Zizzo N, Misino A, Lucarelli NM, Catino A, Valerio P, Ribatti D, Ranieri G: VEGF concentration from plasma-activated platelets rich correlates with microvascular density and grading in canine mast cell tumour spontaneous model. *J Cell Mol Med.* 2009; 13(3): 555 - 561
109. Pieper CC, Meyer C, Vollmar B, Hauenstein K, Schild HH, Wilhelm KE: Temporary arterial embolization of liver parenchyma with degradable starch microspheres (EmboCept® S) in a swine model. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2015; 38(2): 435 - 441
110. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, Winkler M, Ferrara N: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res.* 1997; 57(20): 4593 - 4599
111. Punt CJ: New options and old dilemmas in the treatment of patients with advanced colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2004; 15(10): 1453 - 1459
112. Raoul JL, Heresbach D, Bretagne JF, Ferrer DB, Duvauferrier R, Bourguet P, Messner M, Gosselin M: Chemoembolization of hepatocellular carcinomas. A study of the biodistribution and pharmacokinetics of doxorubicin. *Cancer.* 1992; 70(3): 585 - 590
113. Reinacher-Schick AC, Bechstein WO: Colorectal liver metastases. Neoadjuvant chemotherapy: aspects of medical and surgical oncology. *Internist* 2007; 48(1): 51 - 58
114. Rougier P, Mitry E. Epidemiology, treatment and chemoprevention in colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2003;14: 3 - 5
115. Roy H, Bhardwaj S, Ylä-Herttuala S: Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett.* 2006; 580(12): 2879 - 2887
116. Ruers T, Van Coevorden F, Punt CJA, Pierie J-PEN, Borel-Rinkes I, Ledermann JA: Local treatment of unresectable colorectal liver metastases: results of a randomized phase II trial. *J Natl Cancer Inst.* 2017; 109: 15
117. Sadahiro S, Suzuki T, Tanaka A, Okada K, Kamata H, Koisumi J: Clinical significance of and future perspectives for hepatic arterial infusion chemotherapy in patients with liver metastases from colorectal cancer. *Surg Today.* 2013; 43: 1088 - 1094
118. Saenger J, Leible M, Seelig MH, Berger MR: Chemoembolization of rat liver metastasis with irinotecan and quantification of tumor cell reduction. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004; 130(4): 203 - 210
119. Saltz LB, Cox JV, Blanke C, Rosen LS, Fehrenbacher L, Moore MJ: Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med.* 2000; 343: 905 - 914

120. Scheringa M, Keizer A, Jeekel J, Marquet RL: Anti-tumor effect of recombinant murine TNF-alpha (rMuTNFa) given by continuous i.v. infusion as compared to repeated i.v. injections in a rat liver metastasis model. *Int J Cancer*. 1989; 43(5): 905 - 909
121. Schicho A, Hellerbrand C, Kruger K: Impact of different embolic agents for transarterial chemoembolization (TACE) procedures on systemic vascular endothelial growth factor (VEGF) levels. *J Clin Transl Hepatol*. 2016; 4: 288 - 292
122. Schreckenbach T, Malkomes P, Bechstein WO, Woeste G, Schnitzbauer AA, Ulrich F: The clinical relevance of the Fong and the Nordlinger scores in the era of effective neoadjuvant chemotherapy for colorectal liver metastasis. *Surg Today*. 2015; 45(12): 1527 - 1534
123. Segall HN: An experimental anatomical investigation of the liver. *Surg. Gynaecol. and Obstet*. 1923; 37: 152 - 187
124. Sperling J, Schäfer T, Ziemann C, Benz-Weiber A, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD: Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29(2): 91 - 99
125. Sperling J, Schäfer T, Benz-Weißer A, Ziemann C, Scheuer C, Kollmar O: Hepatic arterial infusion but not systemic application of cetuximab in combination with oxaliplatin significantly reduces growth of CC531 colorectal rat liver metastases. *Int J Colorectal*. 2012; 28: 555 - 562
126. Starkhammar H, Håkansson L: Effect of starch microspheres on the passage of labelled erythrocytes and a low molecular weight marker through the liver. *Acta Oncol*. 1987; 26(5): 361 - 365
127. Sullivan RD, Norcross JW, Watkins E Jr: Chemotherapy of metastatic liver cancer by prolonged hepatic-artery infusion. *N Engl J Med*. 1964; 270: 321 - 327
128. Tellez C, Benson AB 3rd, Lyster MT, Talamonti M, Shaw J, Braun MA, Nemcek AA Jr, Vogelzang RL: Phase II trial of chemoembolization for the treatment of metastatic colorectal carcinoma to the liver and review of the literature. *Cancer*. 1998; 82(7): 1250 - 1259
129. Tong RT, Boucher Y, Kozin SV, Winkler F, Hicklin DJ, Jain RK: Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res*. 2004; 64(11): 3731 - 3736
130. United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research. Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (second edition). *Br J Cancer*. 1998; 77: 1 - 10

131. Valderrama-Treviño AI, Barrera-Mera B, Ceballos-Villalva JC, Montalvo-Javé EE: Hepatic Metastasis from Colorectal Cancer. *Euroasian J Hepatogastroenterol.* 2017; 7(2): 166 - 175
132. Van Cutsem E, Rivera F, Berry S, Kretzschmar A, Michael M, DiBartolomeo M, Mazier MA, Canon JL, Georgoulas V, Peeters M, Bridgewater J, Cunningham D; First BEAT investigators: Safety and efficacy of first-line bevacizumab with FOLFOX, XELOX, FOLFIRI and fluoropyrimidines in metastatic colorectal cancer: the BEAT study. *Ann Oncol.* 2009; 20(11): 1842 - 1847
133. Van Duijnhoven FH, Tollenaar RA, Terpstra OT, Kuppen PJ: Locoregional therapies of liver metastases in a rat CC531 coloncarcinoma model results in increased resistance to tumour rechallenge. *Clin Exp Metastasis.* 2005; 22: 247 - 253
134. Vangestel C, Van de Wiele C, Van Damme N, Staelens S, Pauwels P, Reutelingsperger CP, Peeters M: (99m Tc-(CO) (3) His-annexin A5 micro-SPECT demonstrates increased cell death by irinotecan during the vascular normalization window caused by bevacizumab. *J Nucl Med.* 2011; 52(11): 1786 - 1794
135. Vera R, González-Flores E, Rubio C, Urbano J, Valero Camps M, Ciampi-Dopazo JJ, Orcajo Rincón J, Morillo Macías V, Gomez Braco MA, Suarez-Artacho G: Multidisciplinary management of liver metastases in patients with colorectal cancer: a consensus of SEOM, AEC, SEOR, SERVEI, and SEMNIM. *Clin Transl Oncol.* 2020; 22(5): 647 - 662
136. Vogl TJ, Mack MG, Balzer JO, Engelmann K, Straub R, Eichler K, Woitaschek D, Zangos S: Liver metastases: neoadjuvant downsizing with transarterial chemoembolization before laser-induced thermotherapy. *Radiology.* 2003; 229(2): 457 - 464
137. Vogl TJ, Gruber T, Balzer JO, Eichler K, Hammerstingl R, Zangos S: Repeated transarterial chemoembolization in the treatment of liver metastases of colorectal cancer: prospective study. *Radiology.* 2009; 250(1): 281 - 289
138. Vogl TJ, Jost A, Nour-Eldin NA, Mack MG, Zangos S, Naguib NN: Repeated transarterial chemoembolisation using different chemotherapeutic drug combinations followed by MR-guided laser-induced thermotherapy in patients with liver metastases of colorectal carcinoma. *Br J Cancer.* 2012; 106(7): 1274 - 1279
139. Vogl TJ, Marko C, Langenbach MC, Naguib NNN, Filmann N, Hammerstingl R, Gruber-Rouh T: Transarterial chemoembolization of colorectal cancer liver metastasis: improved tumor response by DSM-TACE versus conventional TACE, a prospective, randomized, single-center trial. *Eur Radiol.* 2021; 31(4): 2242 - 2251.
140. Volk AM, Fritzmann J, Reissfelder C: Impact of Bevacizumab on parenchymal damage and functional recovery of the liver in patients with colorectal liver metastases. *BMC Cancer.* 2016; 16, 84

141. Vollmar B, Menger MD: The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009; 89(4): 1269 -1339
142. Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA: Plant Antitumor Agents. I. The Isolation and Structure of Camptothecin, a Novel Alkaloidal Leukemia and Tumor Inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc.* 1966; 88(16): 3888 - 3890
143. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N: Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest.* 1995; 95(4): 1789 - 1797
144. Weaver ML, Ashton JG, Zemel R: Treatment of colorectal liver metastases by cryotherapy. *Semin Surg Oncol.* 1998;14(2):163 - 170
145. Welch S, Spithoff K, Rumble RB, Maroun J: Gastrointestinal Cancer Disease Site Group. Bevacizumab combined with chemotherapy for patients with advanced colorectal cancer: a systematic review. *Ann Oncol.* 2010; 21(6): 1152 – 1162
146. White SB, Procissi D, Chen J, Gogineni VR, Tyler P, Yang Y: Characterization of CC-531 as a rat model of colorectal liver metastases. *PLoS ONE.* 2016: e0155334
147. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, Jain RK: Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasular effects in human rectal cancer. *Nat Med.* 2004; 10(2): 145 - 147
148. Xia J, Ren Z, Ye S, Sharma D, Lin Z, Gan Y, Chen Y, Ge N, Ma Z, Wu Z, Fan J, Qin L, Zhou X, Tang Z, Yang B: Study of severe and rare complications of transarterial chemoembolization (TACE) for liver cancer. *Eur J Radiol.* 2006; 59(3): 407 - 412
149. Xie R, Mathijssen RH, Sparreboom A, Verweij J, Karlsson MO (2002) Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. *Clin Pharmacol Ther* 72:265–275
150. Yang H, Jager MJ, Grossniklaus HE: Bevacizumab suppression of establishment of micrometastases in experimental ocular melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010; 51(6): 2835 – 2842
151. Zhang Y, Wang K, Yang T, Cao Y, Liang W, Yang X, Xiao T: Meta-Analysis of Hepatic Arterial Infusion for Liver Metastases From Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2021; 11: 628558
152. Zhong H, Li R, Hao YX, Guo YL, Hua X, Zhang XH, Chen ZH: Inhibition effects of high mechanical index ultrasound contrast on hepatic metastasis of cancer in a rat model. *Acad Radiol.* 2010; 17(11): 1345 - 1349

153. Ziemann C, Roller J, Malter MM, Keller K, Kollmar O, Glanemann M, Menger MD, Sperling J: Intra-arterial EmboCept S[®] and DC Bead[®] effectively inhibit tumor growth of colorectal rat liver metastases. BMC Cancer. 2019; 19(1): 938

9. Publikationen

Originalpublikation:

Ziemann C, Roller J, Malter MM, Keller K, Kollmar O, Glanemann M, Menger MD, Sperling J. Intra-arterial EmboCept S[®] and DC Bead[®] effectively inhibit tumor growth of colorectal rat liver metastases. BMC Cancer. 2019; 19(1): 938

Abstract:

Ziemann C, Sperling J, Malter MM, Keller K, Roller J, Dold S, et al. Embocept S[®] and DC bead[®] are more effective to inhibit tumor growth of colorectal rat liver metastases compared to Lipiodol ultra fluid[®] (abstract). 131. Annual Meeting German Society of Surgery. 2014.

10. Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person. Daher möchte ich mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

An erster Stelle, und mögen mir andere verzeihen, muss mein Doktorvater Professor Dr. med. Menger, Direktor des Instituts für klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes, genannt werden. Ich möchte für die umfangreiche Unterstützung von der Projektplanung, über die Durchführung, Analyse und Auswertung bis zur Korrektur der Arbeit bedanken. Ohne sein fachübergreifendes Verständnis der thematischen Zusammenhänge und seine Unterstützung wäre die Erstellung der Studie nicht möglich gewesen.

Des Weiteren einen großen Dank an meinen Betreuer Herrn Dr. med. Christian Ziemann, nicht nur für die Vergabe dieser interessanten Dissertation und der Unterstützung beim Versuchsaufbau sowie bei der Durchführung der Experimente. Herr Dr. med. Ziemann hat mich mit seinen thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen stets gelenkt und stand mir für konstruktive Gespräche jederzeit zur Verfügung. Er hat mich in jeder schweren Phase aufgebaut und mir immer geholfen. Das habe ich nie als selbstverständlich angesehen. Besonders wertvoll war für mich auch die ehrliche und offene Kritik. Für diese Ehrlichkeit und Kollegialität bin ich sehr dankbar.

Auch meinen Kollegen sowie allen Mitarbeitern am Institut für experimentelle Chirurgie möchte ich hiermit meinen Dank ausdrücken für die Unterstützung jeglicher Art während meinen experimentellen Versuchen. Besonderen Dank gehen an Frau Janine Becker und Frau Sandra Schuler für die Anfertigung der histologischen Präparate und immunhistochemischen Färbungen, an Frau Claudia Scheuer und Frau Christina Marx für die Anzucht der Tumorzellen sowie Elisabeth Gluding und Kati Jordan für die Betreuung der Versuchstiere. Vielen Dank für die ausgezeichnete Arbeit und freundliche Art.

Nicht minder aufreibend war die Zeit in den vergangenen Jahren für meine Familie, die nicht nur dieses Werk in allen Phasen mit jeder nur denkbaren Unterstützung bedacht haben, sondern auch während meines gesamten Studiums und darüber hinaus immer eine große Stütze für mich waren. Eure Hilfe bedeutet mir mehr, als ich hier in Worte fassen könnte. Dafür bin ich euch auf ewig dankbar. Darüber hinaus gilt mein Dank allen Verwandten, Freunden und Bekannten, die mich während meines Studiums jahrelang unterstützt und immer wieder aufgerichtet haben. Vielen Dank für diesen wichtigen Rückhalt und euer Verständnis.

11. Lebenslauf