

Aus der Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität Ulm  
Ärztliche Direktorin Prof. Dr. med. Doris Henne-Bruns

---

**Abschätzung der Wirksamkeit von Irinotecan zur  
regionalen Chemotherapie bei kolorektalen  
Lebermetastasen anhand des Human Tumor  
Colonyforming Assays**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von  
Carmen Anja Wörz (geb. Hofmann)  
aus Ellwangen a. d. Jagst

2005

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin  
1. Berichterstatter: PD Dr. M. Kornmann  
2. Berichterstatter: PD Dr. J. Sträter  
Tag der Promotion: 24.11.2005

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>8</b>
3.1	Verwendete Zelllinien	8
3.2	Karzinomgewebe	8
3.3	Human Tumor Colonyforming Assay (HTCA)	9
3.3.1	Zelllinien	9
3.3.2	Tumorgewebe	11
3.3.3	Zählung der Kolonien	14
3.4	MTT-Wachstumsassay	15
3.4.1	Zelllinien	15
3.4.2	Versuchsdurchführung	16
3.4.3	Versuchsauswertung	16
3.5	FACS	17
3.5.1	Versuchsdurchführung	17
3.5.2	Versuchsauswertung	18
3.6	Statistische Methoden	18
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>19</b>
4.1	Zelllinien	19
4.1.1	HTCA	19
4.1.2	MTT	24
4.1.3	FACS	29
4.2	HTCA mit Karzinomgewebe	30
4.2.1	HTCA mit Lebermetastasengewebe	31
4.2.2	HTCA mit Primärtumoren	35
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf</b>	<b>51</b>

# Abkürzungsverzeichnis

---

<b>5-FU</b>	5-Fluorouracil	<b>IC<sub>50</sub></b>	Inhibiting Concentration: Konzentration, die Hemmung um 50% hervorruft
<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>I<sub>z</sub></b>	Inkubationszeit
<b>AUC</b>	Area under the Curve	<b>K</b>	Konzentration
<b>CAI</b>	Celiac Artery Infusion	<b>KBR</b>	Koloniebildungsrate
<b>CIS</b>	Cisplatin	<b>KZP</b>	Konzentrations-Zeit-Produkt
<b>Comp.</b>	Company	<b>m</b>	metachron
<b>CPT-11</b>	Irinotecan	<b>M</b>	Metastasen
<b>DME</b>	Dulbecco´s Modified Eagle	<b>mind.</b>	mindestens
<b>DNA</b>	2'-Desoxyribonucleinsäure	<b>MMC</b>	Mitomycin C
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>MTT</b>	(3-(4,5-Methylthiazol-2-yl))-2,5-Diaphenyl-Tertrazolium Bromid
<b>EPI</b>	Epirubicin	<b>NOV</b>	Mitoxantrone
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum	<b>OXA</b>	Oxaliplatin
<b>FS</b>	Folinsäure	<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>GEM</b>	Gemcitabine	<b>PT</b>	Primärtumor
<b>HAI</b>	Hepatic Artery Infusion	<b>s</b>	synchron
<b>HBSS</b>	Hanks' Balanced Salt Solution	<b>s.c.</b>	subcutan
<b>HTCA</b>	Human Tumor Colonyforming Assay	<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>HWZ</b>	Halbwertszeit	<b>SEM</b>	Standard Error of Mean
<b>i.a.</b>	intraarteriell	<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>i.v.</b>	intravenös		

# Einleitung

---

In den westlichen Industrienationen sind Krebskrankheiten bei Männern im Alter zwischen 60 und 79 Jahren und bei Frauen zwischen 40 und 79 Jahren die häufigste Todesursache. Das kolorektale Karzinom steht bei beiden Geschlechtern in der Mortalitätsstatistik an dritter Stelle hinter dem Prostata-Karzinom und dem Bronchialkrebs beim Mann und dem Brustkrebs und Bronchialkarzinom bei der Frau [Jemal et al., 2003]. Jemal und Mitarbeiter [Jemal et al., 2003] beziffern allein für die USA die geschätzten Neuerkrankungen am kolorektalen Karzinom auf 147.500 Fälle. Trotz einfacher Screening-Methoden haben zum Zeitpunkt der Diagnose bereits 37% regionale Infiltrationen und über 20% synchrone Lebermetastasen [Jemal et al., 2003]. Insgesamt treten im Verlauf bei bis zu 70% der Patienten mit kolorektalem Karzinom Lebermetastasen auf [Penna und Nordlinger, 2002]. Jedoch stellt trotz guter Ansprechraten von Chemotherapeutika [Giachetti et al., 1999; Saltz et al., 2000] und dadurch verlängerter Überlebensraten die operative Leberresektion die einzige potentiell kurative Therapie dar. Mit einer Leberteilresektion lassen sich 5-Jahres-Überlebensraten von bis zu 40% erreichen, eine komplette Heilung ist bei 25% erzielbar [Bismut und Adam, 1998]. Im Vergleich hierzu liegt bei Fernmetastasierung des kolorektalen Karzinoms die 5-Jahres-Überlebensrate bei nur 9% [Jemal et al., 2003]. Jedoch verspricht die R<sub>0</sub>-Resektion, also die vollständige Entfernung aller hepatischer Tumormanifestationen, Heilungschancen. Der Erhalt einer ausreichenden Restleberfunktion gestaltet sich bei multiplen oder auch solitären, zentral gelegenen Metastasen jedoch oft schwierig. Dies erklärt die geringe Rate an primär R<sub>0</sub>-resezierbaren Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose: Sie wird auf etwa 10% geschätzt [Bismut und Adam, 1998]. Eine Strategie, die Zahl der Patienten mit resektablen Lebermetastasen zu erhöhen, stellt die Durchführung einer neoadjuvanten Chemotherapie dar. Durch eine neoadjuvante Chemotherapie könnten die kolorektalen Lebermetastasen verkleinert werden, und somit könnten die Patienten mit primär nicht resektablen Lebermetastasen einer R<sub>0</sub>-Resektion zugänglich gemacht werden. Bismuth und Adam [Bismut und Adam, 1998] gelang es mit Hilfe eines chronomodulierten Therapieregimes von 5-FU/FS und Oxaliplatin, bei 16% der behandelten Patienten mit zuvor inoperablen Lebermetastasen, ein Downsizing zu erreichen. Giacetti und Mitarbeiter [Giachetti et al., 1999] zeigten, dass die Überlebensraten der

Patienten nach neoadjuvanter Chemotherapie mit sekundärer kompletter Tumorentfernung nahezu mit denen übereinstimmten, die primär komplett reseziert wurden. Aus diesem Grund sollte ein Schwerpunkt auf die Behandlung von Patienten mit primär nicht resektablen isolierten kolorektalen Lebermetastasen gelegt werden. Bei so vielen Patienten wie möglich sollte mit effizienten neoadjuvanen Chemotherapie-Strategien eine Tumorverkleinerung und anschließend eine sekundäre komplette Tumorresektion erreicht werden [Borner, 1999].

Sehr viel versprechende Resultate im Bezug auf Tumorreduktion und Langzeitüberleben von Patienten mit isolierten kolorektalen Lebermetastasen sind mit der intraarteriellen hepatischen Chemotherapie-Infusion (HAI) erreichbar [Benson, 1998]. Sie basiert auf den gefäßphysiologischen Grundlagen der Leber: Im Gegensatz zur systemischen Chemotherapie werden die Zytostatika über die Arteria hepatica verabreicht und erreichen so direkt das Tumorgewebe, das überwiegend durch arterielles Blut versorgt wird, wohingegen das normale Lebergewebe durch venöses Blut aus der Pfortader versorgt wird [Kemeny, 2002]. Auf diese Weise lassen sich hohe lokale Zytostatikakonzentrationen bei relativ geringer lokaler und systemischer Toxizität erreichen [Link et al., 1999a]. Besonders wenn die verwendeten Chemotherapeutika eine kurze HWZ und hohe hepatische Aufnahme sowie ein möglichst niedriges toxisches Profil für die Leber aufweisen, können die systemischen Nebenwirkungen erheblich minimiert werden. Zahlreiche Beispiele von Langzeitüberlebenden mit nicht resektablen Lebermetastasen bekräftigen die viel versprechende Rolle der HAI bei Patienten mit primär sehr schlechter Prognose [Link et al., 1999c; Kornmann und Link, 2002]. Dennoch werden auch mit den meisten bisher publizierten HAI-Protokollen nur Ansprechraten von annähernd 50% erreicht [Link et al., 1999b].

Ein Weg, die Ansprechraten weiter zu steigern, ist, Patienten, die auf eine Chemotherapie potentiell ansprechen und Patienten, die auf die gleiche Therapie nicht ansprechen, vor Therapiebeginn zu identifizieren. Dies kann mittels *in vitro* Chemosensitivitäts-Testung von Tumorzellen, gefolgt von individueller Behandlung jedes Patienten entsprechend des *in vitro* Ergebnisses, erreicht werden. Zusätzlich zur höheren Ansprechraten kann man den Patienten unnötige Toxizität ersparen. Die Durchführung eines so genannten Human Tumor Colonyforming Assays (HTCA), nach der Methode von Hamburger und Salmon [Hamburger und Salmon, 1977], stellt einen Weg der *in vitro* Chemosensitivitäts-Testung dar. Anhand dieses Tests können zwei Gesichtspunkte untersucht werden:

1. Die Abschätzung der Wirksamkeit von Chemotherapeutika zur regionalen Che-

motherapie bei gastrointestinalen Tumoren.

2. Die Auswahl potenter Chemotherapien zur Behandlung unterschiedlicher gastrointestinaler Tumoren.

In einer Studie wurde von Patienten mit verschiedenen gastrointestinalen Tumoren Gewebe gewonnen und im HTCA auf 7 verschiedene Zytostatika getestet [Link et al., 1996]. Patienten, die mindestens eines als sensitiv getestetes Zytostatikum erhielten, zeigten im Verlauf der Chemotherapie eine Progressionsrate von 7%. Im Gegensatz hierzu zeigten Patienten, die nur als resistent getestete Zytostatika verabreicht bekamen, eine Progressionsrate von 57%. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass der HTCA aktive Chemotherapeutika zur individualisierten HAI-Chemotherapie identifizieren kann und dass Patienten von der Anwendung von *in vitro* sensitiv getesteter Substanzen profitieren können [Link et al., 1996]. Das Resultat wären effizientere Behandlungsmöglichkeiten und im Falle einer diagnostizierten Resistenz die Vermeidung einer toxischen, Zeit kostenden und teuren Behandlung.

Des Weiteren kann der HTCA zur Überprüfung der Wirksamkeit und Optimierung der Applikationszeit und -konzentration bei regionaler Chemotherapie eingesetzt werden [Link et al., 1998]. So testeten Kornmann und Mitarbeiter z.B. kürzlich die potentielle Eignung von Oxaliplatin für die HAI-Therapie [Kornmann et al., 2000]. Hierfür wurden die antiproliferativen Effekte von Oxaliplatin auf humane HT29 und NMG 64/84 Kolonkarzinom-Zelllinien und Colo357, Mia PaCa2 und PMH 2/89 Pankreaskarzinom-Zelllinien getestet. Um die OXA-Konzentrationen und Inkubationszeiten festzulegen, die in einer effizienten Hemmung der Koloniebildung resultieren, wurden die Zellkulturen mit ansteigenden Zytostatikum-Konzentrationen für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Die Verlängerung der Inkubationszeit resultierte in einer stärkeren Hemmung der Koloniebildungsrate. Basierend auf den Konzentrations-Zeit-Produkten (AUC) ließ sich ableiten, dass eine Inkubationszeit von 120 min optimal ist. Auf die erzielten Ergebnisse mit den Zelllinien aufbauend, wurden Tumorzellsuspensionen, die aus Lebermetastasengewebe gewonnen wurden, mit aufsteigenden Konzentrationen von Oxaliplatin für die Dauer von 120 min inkubiert. Die errechnete theoretisch erreichbare OXA-Konzentration während einer HAI der Leber reichte bei 9 von 10 Patienten aus, um eine Hemmung der Koloniebildungsrate der Tumorzellen um 50% zu erreichen [Kornmann et al., 2000]. Hieraus konnte gefolgert werden, dass Oxaliplatin sehr gut für die HAI-Chemotherapie geeignet ist. Dies konnte in den ersten klinischen Anwendungen bestätigt werden [Guthoff et al., 2003].

In der Therapie des kolorektalen Karzinoms rückte Irinotecan (CPT-11) in den



letzten Jahren aufgrund guter Forschungsergebnisse zunehmend in die Mitte des Blickfeldes. So konnten Saltz und Mitarbeiter sowie Douillard und Mitarbeiter [Saltz et al., 2000; Douillard et al., 2000] eine sehr gute Aktivität von Irinotecan in Kombination mit 5-FU/Folinsäure in der Therapie des fortgeschrittenen metastasierten kolorektalen Karzinoms nachweisen. Irinotecan ist ein semisynthetisches Analogon von Camptothecin einem natürlichen Alkaloid gewonnen aus dem chinesischen Baum *Camptotheca accuminata* [Wall et al., 1966]. Der Wirkmechanismus von Irinotecan beruht auf einer Hemmung der DNA-Topoisomerase I, die zur Entwirrung der DNA vor der Synthese wichtig ist. Dies hat irreversible Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA zu Folge und führt letztendlich zur Hemmung der Zellproliferation und zum Absterben der Zelle. CPT-11 wird intrazellulär durch Carboxyesterasen in einen sehr aktiven Metaboliten SN-38 hydrolysiert. Für SN-38 konnte eine 1000fach höhere Aktivität in der Hemmung der DNA-Topoisomerase I nachgewiesen werden als für CPT-11 [Kawato et al., 1991]. Jonsson und Mitarbeiter [Jonsson et al., 2000] zeigten jedoch in einer Vergleichsstudie von Topotecan, Irinotecan und SN-38, dass in kolorektalen Karzinom-Proben nur Irinotecan bedeutende Wirkung besaß. SN-38 war nahezu inaktiv. Die Studie [Jonsson et al., 2000] kam zu dem Ergebnis, dass Irinotecan größere Wirkung bei soliden Tumoren entfaltet als SN-38 und dass Irinotecan *in vivo* bei gastrointestinalen Tumoren deutlich aktiver ist als SN-38. Dies legt den Schluss nahe, dass in der Gruppe der gastrointestinalen Tumoren andere Mechanismen für die Antitumor-Aktivität von Irinotecan verantwortlich sein könnten, als nur die Tatsache, dass Irinotecan ein Prodrug von SN-38 ist [Jonsson et al., 2000]. In mehreren Studien wurden mit Irinotecan in der Second-Line sowie in der First-Line-Therapie gute Ansprechraten erzielt. In der Studie von Douillard und Mitarbeitern [Douillard et al., 2000] führte die Gabe von Irinotecan in Kombination mit 5-FU/FA zu einer signifikant ( $p=0,031$ ) längeren medianen Überlebenszeit (+3,3 Monate) als die alleinige 5-FU/FA-Therapie (14,1 Monate). Die Lebensqualität wurde von allen Patienten in der Kombinationstherapie besser empfunden als unter 5-FU/FA alleine [Douillard et al., 2000]. Zudem war der Zeitraum bis zu einer Progression der Krankheit unter der Irinotecan-Kombinationstherapie signifikant länger als unter der 5-FU/FA-Monotherapie [Douillard et al., 2000]. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in anschließenden Studien erzielt [Saltz et al., 2000].

Aufgrund der guten Wirkung bei systemischer Applikation im kolorektalen Karzinom bei beherrschbaren Nebenwirkungen wäre durchaus denkbar, dass durch CPT-11 bei regionaler Applikation durch die höheren lokalen Konzentrationen ein besserer zytostatischer Effekt bei lokal begrenzter Tumorerkrankung zu erwarten ist. Hierzu gibt es bisher jedoch keine präklinischen Untersuchungen.

**Zielsetzung:**

Die Therapieergebnisse von Patienten mit fortgeschrittenem kolorektalen Karzinom sollen in Bezug auf die Überlebenszeit und die Rezidivhäufigkeit verbessert werden.

Eine Gruppe, deren Therapieergebnisse noch erheblich verbessert werden könnten, stellen die Patienten mit nicht resektablen isolierten Lebermetastasen dar. Bei regionaler Chemotherapie von kolorektalen Lebermetastasen wurden bisher Ansprechraten um 50% erreicht [Link et al., 1999b]. Ein Weg zur Verbesserung der Behandlung ist, die Ansprecher und Therapieversager durch *in vitro* Sensitivitäts-Testung zu selektieren, um letztendlich dem resistenten Patienten die aufwendige Therapie zu ersparen.

Ein weiterer Weg besteht darin, bisher in der systemischen Therapie gut wirksame Substanzen der regionalen Chemotherapie zugänglich zu machen und so lokal höhere Chemotherapie-Konzentrationen bei geringeren systemischen Nebenwirkungen zu erzielen, um in einem größeren Anteil der Patienten eine Tumorverkleinerung und dadurch die Möglichkeit einer sekundären Lebermetastasenresektion zu erreichen. Das Ziel dieser Studie ist die Austestung der möglichen Wirksamkeit von Irinotecan in der regionalen HAI-Chemotherapie. Auf die zugänglichen präklinischen und klinischen Daten aufbauend, sollen die antiproliferativen Effekte von Irinotecan an humanen Kolon- und Pankreaskarzinom-Zelllinien *in vitro* im HTCA getestet werden, indem man die Zellkulturen mit ansteigenden Konzentrationen von Irinotecan für unterschiedliche Zeiten inkubiert, um die optimale Inkubationszeit zu ermitteln (kleinstes Konzentrations-Zeit-Produkt). Um für die regionale Chemotherapie in Frage zu kommen, sollte Irinotecan eine deutliche dosisabhängige Hemmung der Koloniebildung zu einer bestimmten Inkubationszeit zeigen.

Im zweiten Teil der Studie sollen dann die antiproliferativen Effekte von Irinotecan nach Ermittlung der optimalen Inkubationszeit an Tumorzellsuspensionen aus Lebermetastasengewebe und primären kolorektalen Tumoren untersucht werden. Irinotecan eignet sich dann zur HAI-Chemotherapie, wenn sich auch bei den primären Tumorzellkulturen der Patienten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Koloniebildung zeigt. Zudem sollten sich die in den Zellversuchen errechneten Konzentrationen, die eine Hemmung der Koloniebildungsrate um 50% bewirken ( $IC_{50}$ ), auch *in vivo* bei einer regionalen Chemotherapie durch den Blutfluss in der Leber erreichen lassen.

Aus den in dieser Studie gewonnenen Ergebnissen soll sich dann ein mögliches klinisches Protokoll zur regionalen Chemotherapie von Lebermetastasen kolorektaler Primärtumoren, welches Irinotecan beinhaltet, planen lassen.

## 3.1 Verwendete Zelllinien

Für die Zellkulturversuche wurden HT29 und NMG 64/84 humane Kolonkarzinom- und COLO-357, MIA PaCa-2 und PANC-1 Pankreaskarzinom-Zelllinien verwendet. HT29 sowie MIA PaCa-2 und PANC-1 Zellen erwarb man von der American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). COLO-357 Zellen stellte Prof. M. Korc (University of California, Irvine, CA, USA) zur Verfügung. NMG 64/84 Zellen etablierte Prof. K.H.Link aus einem primären Kolonkarzinom [Link et al., 1998]. COLO-357, MIA PaCa-2 und PANC-1 wurden in DME-Medium kultiviert, HT29 und NMG 64/84 in HAM F12-Medium. Den Medien waren 10% FKS und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt und alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tabelle 1: Materialien für die Zellkultur

---

<b>DME-Medium</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x), Invitrogen
<b>HAM-F12 Medium</b>	F12-Nutrient Mixture (Ham) (1x), Invitrogen
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum, PAA Laboratories.
<b>Penicillin/ Streptomycin</b>	Penicillin (10 <sup>4</sup> U/ml)/Streptomycin (10 <sup>4</sup> µg/ml), Invitrogen

---

## 3.2 Karzinomgewebe

Bei 18 Patienten mit Leberfiliae (17 kolorektale Karzinome und 1 Mamma-Karzinom) und 3 Patienten mit primären Karzinomen (2 kolorektale Karzinome und 1 hepatozelluläres Karzinom) wurde Tumorgewebe gewonnen. Die Probenentnahme erfolgte im Rahmen der Leberteil- bzw. Primärtumorresektion. Nach der Resektion begutachtete der jeweils zuständige Pathologe der Universität Ulm das Präparat makroskopisch und stellte ein repräsentatives Tumorstück für diese Untersuchung zur Verfügung. Dieser

Teil der Untersuchung war durch die Ethikkommission der Universität Ulm mit einem positiven Votum belegt worden (174/2001).

## 3.3 Human Tumor Colonyforming Assay (HTCA)

### 3.3.1 Zelllinien

**Gewinnung und Zellzählung** Die Zytostatikaexposition wurde an Einzelzellsuspensionen in flüssigem Kulturmedium an exponentiell wachsenden Zellen durchgeführt (Materialien siehe Tabelle 2). Zur Herstellung der Zellsuspension erfolgte zuerst das Absaugen des Mediums von den Kulturschalen. Eine darauf folgende Spülung mit 10 ml PBS-Lösung beseitigte den noch vorhandenen Zelldetritus. Die am Boden haftenden Zellen wurden durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung gewonnen. Eine 10-minütige Zentrifugation (1000 g) trennte die Zellen von der Trypsin/EDTA-Lösung, anschließend resuspendierte man mit 5 ml Mc Coy´s Lösung. Um die Schalen unterschiedlicher Versuche mit derselben Zahl von Zellen zu beimpfen, wurde zunächst eine Zellzählung durchgeführt. Dazu mischte man von der Zellsuspension 0,1 ml mit 0,9 ml PBS (1x). Nach Beladen der Neubauerkammer wurden unter einem Lichtmikroskop die Zellen ausgezählt. Mit folgender Berechnungsformel ließ sich die Anzahl der Zellen pro ml Suspension ermitteln:

$$N \cdot 2000 \cdot V = \text{Zellen/ml}$$

**N:** Anzahl der gezählten Zellen

**V:** Verdünnungsfaktor 10

Nach dieser Kalkulation wurde die Zellsuspension auf  $3,33 \cdot 10^5$  Zellen pro ml eingestellt.

**Inkubation mit Irinotecan und Aussaat in Weichagar** Um die Abhängigkeit der Zytostatika-Toxizität von Konzentration und Inkubationszeit zu messen, wurden  $3 \cdot 10^5$  Zellen (900  $\mu$ l der eingestellten Zellsuspension) mit Irinotecan-Konzentrationen von 0,1, 1, 10, 100 und 1000  $\mu$ g/ml versetzt. Bei diesen Testkonzentrationen erfuhren die Zellen über 30 min, 90 min, 180 min und 24 h bei 37°C eine Inkubation in Suspension im Schüttelwasserbad. Zusätzlich befand sich bei jeder Versuchsreihe eine unbehandelte positive Wachstumskontrolle. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit Mc Coy´s Lösung gewaschen.

Die Aussaat der Zellen in Weichagar erfolgte nach der Methode von Hamburger und Salmon [Hamburger und Salmon, 1977] mit den in Tabelle 3 aufgeführten

### 3.3. HUMAN TUMOR COLONYFORMING ASSAY (HTCA)

Tabelle 2: Materialien für die Zellgewinnung und Zellzählung

---

<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline, Invitrogen
<b>Trypsin/EDTA</b>	Trypsin/EDTA-Lösung (0,25%/0,02%), Biochrom
<b>Mc. Coy´s Medium</b>	Mc. Coy´s Medium 5A, Invitrogen
<b>FKS</b>	Siehe Tabelle 1
<b>Mc Coy´s Lösung</b>	500 ml Mc. Coy´s 5A Medium, Invitrogen 50 ml FKS 5 ml Penicillin ( $10^4$ U/ml), Invitrogen 5 ml Streptomycin ( $10^4$ U/ml), Invitrogen
<b>Neubauerkammer</b>	Hämozytometer, Brand

---

Materialien. Die 35mm-Schalen waren nach dem Prinzip des Doppelschichtverfahrens mit 1 ml einer ausgehärteten angereicherten-Medium-A-Agar-Schicht als ernährende Bodenschicht vorbereitet. Die gewaschenen Zellen wurden mit 2,1 ml angereichertem Medium B und 0,9 ml Agar resuspendiert und je 1 ml ( $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Schale) in jede Schale als Deckschicht gegossen. Nach Anlage von 3 Schalen pro Testpunkt wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Tabelle 3: Materialien für die Irinotecan-Inkubation und die Zellkulturen in Weichagar

---

<b>Irinotecan</b>	Campto (20 mg/ml), Aventis Pharma, Frankfurt-Höchst; abgefüllt in 50 µl Aliquots
<b>Irinotecan-Verdünnungsreihe</b>	50 µl Campto + 50 µl Mc Coys 5A ⇒ 1000 µg/ml 50 µl Stock + 950 µl Mc Coys 5A ⇒ 100 µg/ml 100 µl (100 µg/ml) + 900 µl Mc Coys 5A ⇒ 10 µg/ml 100 µl (10 µg/ml) + 900 µl Mc Coys 5A ⇒ 1 µg/ml 100 µl (1 µg/ml) + 900 µl Mc Coys 5A ⇒ 0,1 µg/ml ⇒ je 100 µl + 900 µl Zellsuspension
<b>Mc Coy´s 5A Medium</b>	Invitrogen

### 3.3. HUMAN TUMOR COLONYFORMING ASSAY (HTCA)

---

<b>Medium A</b>	100 ml	Mc Coy´s 5A Medium
	15 ml	FKS, siehe Tabelle 1
	1 ml	Natriumpyruvat (0,22 mg/ml), Sigma
	0,2 ml	L-Serin (0,21 mg/ml), Sigma
	1 ml	Penicillin (10 <sup>4</sup> U/ml), Invitrogen
	1 ml	Streptomycin (10 <sup>4</sup> U/ml), Invitrogen
<b>Angereichertes Medium A</b>	40 ml	Medium A
	10 ml	Tryptic Soy Broth (7,5 mg/ml), Becton and Dickinson Comp., Sparks
	0,6 ml	L-Asparagin (6,6 mg/ml), Sigma
<b>Medium-A-Agar-Mischung</b>	16,5 ml	angereichertes Medium A
	3,5 ml	Agar (3%-ig), Becton and Dickinson Comp.
<b>Medium B</b>	100 ml	RPMI 1640 (1x), Invitrogen
	15 ml	FKS, siehe Tabelle 1
	2 ml	Insulin (1 mg/ml), Sigma
	1 ml	Vitamin C, Sigma
	2 ml	L-Glutamin (250 mM), Sigma
	1 ml	Penicillin (10 <sup>4</sup> U/ml), Invitrogen
	1 ml	Streptomycin (10 <sup>4</sup> U/ml), Invitrogen
<b>Angereichertes Medium B</b>	40 ml	Medium B
	0,6 ml	L-Asparagin, Sigma
<b>Medium-B-Agar-Mischung</b>	2,1 ml	angereichertes Medium B
	0,9 ml	Agar (3%-ig), Becton and Dickinson Comp.

---

#### 3.3.2 Tumorgewebe

**Gewinnung und enzymatische Aufbereitung** Tabelle 4 zeigt die für die Gewebepräparation verwendeten Lösungen auf. Sofort nach Exzision wurde zu den 5-10 g Tumorgewebe 20 ml Transportmedium gefüllt. Es folgte unter sterilen Bedingungen das Zerkleinern des Tumorgewebes, nach Entfernen des Fett- und Bindegewebes, mit

### 3.3. HUMAN TUMOR COLONYFORMING ASSAY (HTCA)

---

einer Schere und Pinzette in einer 10 cm Petrischale. Das klein geschnittene Gewebe wurde in eine sterile Flasche mit 50 ml Enzymlösung umgefüllt und im Kühlschrank bei 4°C über Nacht auf einem Magnetrührer langsam gerührt und verdaut. Dieser Schritt diente zur Gewebeverdauung und Herstellung einer Einzelzellsuspension.

Tabelle 4: Materialien für die enzymatische Aufbereitung des Tumorgewebes

---

<b>PYM-Medium</b>	500 ml	Nutrient Mixture F12 (1x), HAM F 12, Invitrogen
	7,5 ml	1 M Hepes Puffer (Ph 7,3), Invitrogen
	6,7 ml	Natriumbikarbonat-Lösung (7,5%), Invitrogen
	1 ml	Insulin (1 mg/ml), Sigma
	0,5 ml	Epidermal Growth Factor (10 µg/ml), Sigma
	125 µl	Hydrocortison (2000 µg/ml), Sigma
	3 ml	L-Glutamin (200 mM), Sigma
	je 1 ml	Penicillin (10 <sup>4</sup> U/ml) und Streptomycin (10 <sup>4</sup> U/ml), Invitrogen
	40 ml	hitzeinaktiviertes FKS, PAA Laboratories
	5 ml	1 M NaOH, Merck
	Ansatz in 500 ml Originalflasche des HAM F 12	
<b>Transportmedium</b>	100 ml	PYM
	je 1,8 ml	Penicillin (10 <sup>4</sup> U/ml) und Streptomycin (10 <sup>4</sup> U/ml), Gibco
	2,0 ml	Amphotericin B (2,5 mg/ml), Sigma
<b>Enzymlösung</b>	0,14%-ige Collagenase- und 0,01%-ige DNase-Lösung	
	140 mg Collagenase, 240 U/mg Solid, Sigma	
	Mc Coy´s 5A Medium, Invitrogen	
	Mit Mc Coy´s 5A Medium auf 100 ml auffüllen, lösen und steril filtrieren	
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline, Invitrogen	
<b>Mc Coy´s Lösung</b>	Siehe Tabelle 1	

---

Nach guter Gewebeverdauung wurde die Tumorzellsuspension durch sterile, 12-lagige und mit PBS angefeuchtete Kompressen in einen Erlenmeyerkolben filtriert,

### 3.3. HUMAN TUMOR COLONYFORMING ASSAY (HTCA)

für 10 Minuten bei 1000g abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellsuspension zweimal mit 10 ml PBS gewaschen (mischen, 10 min abzentrifugieren, Überstand absaugen) und mit Mc Coy´s Lösung resuspendiert.

**Vitalitätsprüfung und Zellzählung** Die Zellzählung erfolgte hier ebenfalls mit Hilfe der Neubauerkammer nach der Herstellung der Verdünnung und Vitalitätsprüfung: 0,8 ml PBS, 0,1 ml gewonnene Tumorzellsuspension und 0,1 ml Trypanblau (Trypan Blue Stain, Sigma). Trypanblau färbt avitale Zellen blau an, vitale dagegen nicht. Die Anzahl der vitalen Tumorzellen in der Zellsuspension wurde berechnet und mit Mc Coy´s Lösung auf eine Zelldichte von  $3,33 \cdot 10^6$  pro ml eingestellt.

**Inkubation mit Irinotecan und Aussaat in Weichagar** Die Inkubation mit Irinotecan erfolgte hier ebenfalls mit den Konzentrationen 0,1, 1, 10, 100 und 1000  $\mu\text{g/ml}$  zuzüglich einer unbehandelten positiven Wachstumskontrolle. Die Tumorzellsuspension wurde über einen Zeitraum von 30 min bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert und am Ende der Inkubationszeit zweimal mit Mc Coy´s Lösung unter Zentrifugation über 5 min bei 1000 g gewaschen. Zählte man in der Tumorzellsuspension genügend vitale Zellen, so schlossen sich der Testung zusätzlich als vergleichende Untersuchungen folgende Chemotherapeutika an: Mitomycin C (MMC), Epirubicin (EPI), Mitoxantrone (NOV), Cisplatin (CIS), Oxaliplatin (OXA) und Gemcitabine (GEM). Die verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten sind in Tabelle 5 zusammen gefasst.

Tabelle 5: Zusätzlich getestete Chemotherapeutika bei ausreichend vitalen Zellen in der Tumorzellsuspension

<b>Chemotherapeutika</b>	<b>K<sup>1</sup> (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>I<sub>z</sub><sup>2</sup> (min)</b>	<b>Beschreibung</b>
Mitomycin (MMC)	1,9	30	Medac GmbH, Hamburg
Epirubicin (EPI)	13,4	30	Farmorubicin, Pfizer GmbH, Deutschland
Mitoxantrone (NOV)	1,1	60	Wyeth Pharma GmbH, Münster
Cisplatin (CIS)	6,4	60	Platinex, Bristol Arzneimittel GmbH München
Oxaliplatin (OXA)	8,2	120	Eloxatin, Sanofi-Synthelabo GmbH, Berlin, Deutschland



### 3.3. HUMAN TUMOR COLONYFORMING ASSAY (HTCA)

Gemcitabine (GEM)	100	120	2',2'-Difluorodeoxycytidin Gemzar, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutsch- land
-------------------	-----	-----	--

<sup>1</sup>K: Konzentration

<sup>2</sup>I<sub>z</sub>: Inkubationszeit

Die Aussaat erfolgte, wie bereits beschrieben, nach der Methode von Hamburger und Salmon. Der Aussaat schloss sich ebenfalls die Inkubation der Zellen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit an.

#### 3.3.3 Zählung der Kolonien

Die Agarschalen wurden, wenn sich nach einem Zeitraum von 14-20 Tagen in der unbehandelten Kontrolle mindestens 30 Kolonien gebildet hatten, mit Hilfe eines umgekehrten Lichtmikroskops (Leitz Diavert) ausgewertet. Zellaggregate von mindestens 30 Zellen galten als Kolonie; die zu deren Zählung verwendeten Materialien führt Tabelle 4 auf. Um das Austrocknen der Agarkulturen bis zu diesem Zeitpunkt zu vermeiden, wurde in entsprechenden Zeitabständen mit 0,5 ml Medium-B-Agar-Mischung nachgefüttert. Die Inkubation der Agarkulturen für ca. 4 Stunden mit MTT-Lösung vor der Auswertung erleichterte das Auszählen der gebildeten Kolonien.

MTT-Lösung färbt die vitalen Kolonien blau an (siehe Tabelle 6), dadurch kann die fälschliche Auswertung von Zelldetritus und Agarartefakten vermieden werden.

Tabelle 6: Materialien zur Zählung der Kolonien

<b>MTT</b>	Sigma Aldrich Chemie; Steinheim
<b>MTT-Stock-Lösung</b>	25 mg MTT (3-(4,5-Methylthiazol-2-yl))-2,5-Diaphenyl-Tertrazolium Bromid + 5 ml PBS, (1x) Phosphate Buffered Saline, Invitrogen; mit Vortex lösen und mischen; steril filtrieren; mit Aluminiumfolie schützen, bei 4°C im Kühlschrank 1 Woche haltbar
<b>MTT-Lösung</b>	Pro Agarschale 50 µl MTT-Stock-Lösung + 950 µl RPMI 1640 (1x), Invitrogen

Es schloss sich die Ermittlung der Anzahl der gebildeten Kolonien pro Schale

an. Die Koloniebildungsrate (KBR) ( $\pm$  SD) einer Probe wurde definiert als Mittelwert der Anzahl der gebildeten Kolonien einer Irinotecan-Konzentration ( $n = 3$ ) bzw. der Kontrolle. Da für die Zelllinien drei unabhängige Versuche mit je drei Messpunkten pro Konzentration und Zeit durchgeführt wurden, resultierte der KBR-Wert ( $\pm$  Standard Error of Mean (SEM)) aus den KBR-Mittelwerten dieser Versuche. Bei den Lebermetastasen erfolgte je ein Versuch mit jeweils drei Messpunkten. Die Irinotecan-Sensitivität resultierte aus dem Quotienten der Koloniebildungsraten von Proben mit Irinotecan und der Kontrolle. Der KBR-Mittelwert der positiven Kontrollkulturen entsprach definitionsgemäß 100%. Aus den Werten wurde diejenige Konzentration ermittelt, bei der eine Hemmung der Koloniebildungsrate um 50% eintrat, und als Inhibiting Concentration ( $IC_{50}$ -Wert) definiert.

## 3.4 MTT-Wachstumsassay

### 3.4.1 Zelllinien

Dem Absaugen des Mediums von den Kulturschalen folgte das Entfernen des Zelldetritus mit 10 ml PBS-Lösung. Die Zellen wurden durch Inkubation mit der Trypsin/EDTA-Lösung gewonnen, in 10 ml-Röhrchen gefüllt und mit ca. 3 ml entsprechenden Medium resuspendiert. Für die Kolonkarzinom-Zelllinien war HAM F 12-Medium notwendig, für die Pankreaskarzinom-Zelllinien DME-Medium (siehe Tabelle 1). Nach Beladen der Neubauerkammer und der Zellzählung unter dem Lichtmikroskop wurde mit der folgenden Berechnungsformel die Anzahl der Zellen pro ml Suspension ermittelt und anschließend die Zellgrundsuspension für jede Zelllinie individuell auf den in Vorversuchen ermittelten optimalen Wert (Tabelle 7) eingestellt.

$$\frac{N}{4 \cdot 10000} = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

**N:** Anzahl der gezählten Zellen

**4:** Anzahl der ausgezählten Quadrate der Neubauerkammer

Tabelle 7: individuelle Kalkulation der Zellgrundsuspension

<b>HT29</b>	80.000 Zellen/ml
<b>NMG 64/84</b>	60.000 Zellen/ml
<b>Colo-357</b>	60.000 Zellen/ml
<b>MIA PaCa-2</b>	40.000 Zellen/ml
<b>PANC-1</b>	80.000 Zellen/ml

### 3.4.2 Versuchsdurchführung

Zur Versuchsdurchführung verwendete man 96-Loch-Platten, pro Versuchspunkt waren 4 Messpunkte angelegt. Zunächst wurden pro Loch 200  $\mu\text{l}$  der vorbereiteten Zellsuspension ausgesät, dann 24 h inkubiert und anschließend erhielten die unbehandelten Kontrollversuchspunkte, nach Absaugen des Mediums, 100  $\mu\text{l}$  frisches Medium. Die anderen Versuchspunkte wurden mit je 100  $\mu\text{l}$  Medium von aufsteigenden Irinotecan-Konzentrationen für 90 min inkubiert. Eine Hälfte der Versuchspunkte wurde danach wieder mit 100  $\mu\text{l}$  Medium versorgt und im Brutschrank weiter inkubiert, die andere im Anschluss noch für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen von 5-Fluorouracil (5-FU, Lederle Arzneimittel GmbH, Wolfratshausen) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein vierter Teil von Versuchspunkten erfuhr über einen Zeitraum von 24 h die Inkubation im Brutschrank nur mit unterschiedlichen 5-FU-Konzentrationen. Im Anschluss daran wurde am 3. Tag in allen Messpunkten das Medium gewechselt und nach 24 h ausgewertet. Aufgrund verschiedener Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien verwendete man unterschiedliche Konzentrationen von Irinotecan und 5-Fluorouracil. Alle Versuchspunkte mit je 4 Messpunkten wurden in mindestens 3 unabhängigen Versuchsansätzen überprüft. Die Platzierung der Versuchspunkte innerhalb der Reihen 1 bis 8 variierte für jeden Versuchsansatz.

### 3.4.3 Versuchsauswertung

Am 4. Tag wurde in jedes Loch zum Medium 12,5  $\mu\text{l}$  MTT-Stock-Lösung (siehe Tabelle 6: 25 mg MTT + 5 ml PBS) gegeben und nach Inkubation von 4 Stunden wieder abgesaugt. Die verbleibenden Zellen in jedem Loch wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Isopropanol + 0,04 N HCl aufgelöst und die Platten 15 min auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Es bildete sich eine homogene bläuliche Suspension nach Intensität proportional zur Zellzahl/Loch. Die Auswertung des Ansatzes erfolgte im Spektrum eines ELISA-

Messgeräts (Tecan) bei einer Wellenlänge von 590 nm (von diesem Wert wurde der Hintergrund (650 nm) abgezogen). Der Mittelwert aus den Messpunkten der Kontrolle wurde als 100% Wachstum definiert. Die Mittelwerte der Messpunkte der behandelten Versuchspunkte sind als Wachstum in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle angegeben.

## 3.5 FACS

### 3.5.1 Versuchsdurchführung

Sowohl mit allen Pankreaskarzinom-Zelllinien, als auch mit allen Kolonkarzinom-Zelllinien wurden drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Zellen säte man in einer 6-Loch-Platte aus. Pro Versuch und Platte wurden zwei Punkte als Kontrolle unbehandelt belassen, zwei für 30 min mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und zwei mit 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Irinotecan inkubiert. Colo-357, Mia PaCa-2 und PANC-1 waren mit DME-Medium + 1% Penicillin/Streptomycin + 5% FKS versorgt, HT29 und NMG 64/84 mit HAM F12-Medium + 1% Penicillin/Streptomycin + 5% FKS. Bei einer Konfluenz von 70% wurden die Zellen über 24 Stunden im Inkubator mit serumfreiem Medium versorgt und anschließend für 30 min mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Irinotecan inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie mit 1 ml serumfreiem Medium resuspendiert und 24 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert, dann mit einem Scraper vom Plattenboden entfernt und mit dem Medium in ein 17 x 100-mm Röhrchen (Becton and Dickinson Falcon®) gefüllt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur und 300 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und ca. 50  $\mu\text{l}$  im Röhrchen belassen, um das entstandene Pellet nicht zu verletzen. Nun resuspendierte man die Proben mit 1 ml Puffer-Lösung (Tabelle 8) und mischte sie vorsichtig mit dem Vortex bei niedriger Geschwindigkeit. von diesen Proben wurde ein Teil in einer Mischung von Trockeneis und 99% Ethanol eingefroren, bei -80°C gelagert und zu einem späteren Zeitpunkt weiterverarbeitet. Mit den in Tabelle 8 aufgeführten Lösungen wurde der andere Teil sofort bearbeitet.

Der Zentrifugation der Zellsuspensionen bei Raumtemperatur und 400 g für 5 min schloss sich das komplette Dekantieren des Überstandes an. Zu jeder Probe wurden 250  $\mu\text{l}$  Lösung A gegeben, durch leichtes Schütteln mit den enthaltenen Zellen gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erhielt jedes Röhrchen 200  $\mu\text{l}$  Lösung B. Nach vorsichtigem Mischen und 10-minütiger Inkubation gab man in jedes Röhrchen 200  $\mu\text{l}$  kalte (2°C-8°C) Lösung C und inkubierte sie 10 min abgedunkelt auf Eis oder

Tabelle 8: Verwendete Lösungen zur FACS-Analyse

---

<b>Lösung A</b>	Enthält Trypsin in einem tetrahydrochloridhaltigen Puffer zur enzymatischen Verdauung der Zellmembranen und des Zytoskeletts. Wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.
<b>Lösung B</b>	Enthält einen Trypsin-Hemmer und Ribonuklease A in citratstabilisierendem Puffer mit Tetrahydrochlorid, um die Trypsinaktivität zu hemmen und die RNA zu verdauen. Wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.
<b>Lösung C</b>	Enthält Propidium
<b>Puffer Lösung</b>	Dimethylsulfoxid in Saccharosezitratpuffer, Becton und Dickinson Comp.

---

im Kühlschrank. Anschließend wurden die Zellsuspensionen durch ein 50  $\mu\text{m}$  dickes Nylon-Netz gefiltert, in beschriftete 12 x 75-mm Röhrchen gefüllt, abgedunkelt auf Eis gelagert und innerhalb drei Stunden nach Zugabe der Lösung C analysiert.

### 3.5.2 Versuchsauswertung

Die Röhrchen wurden direkt vor der Analyse noch einmal vorsichtig geschüttelt, um eine gleichmäßige Zellsuspension zu erhalten. Zur Zellzyklusanalyse diente ein FACScan Analyse-System (Becton Dickinson Comp., Franklin Lakes, NJ), das aus einer FACStation, einem Computer (Macintosh power PC) und der CellQuest Erfassungssoftware bestand.

## 3.6 Statistische Methoden

Die Zellkulturergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm\text{SD}$  oder  $\pm\text{SEM}$  und als absolute oder relative Häufigkeiten angegeben. Zum Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Zytostatika-Konzentrationen mit der Kontrolle wurde der Student's t-Test oder der Mann-Whitney-Rang-Summen-Test verwendet (Sachs, 1986). Hierzu fand die Sigma Stat Software (Jandel Scientific; San Raphael, CA, USA) Verwendung. Ein P-Wert  $< 0,05$  (zweiseitig) wurde als Signifikanzniveau festgelegt.

## 4.1 Zelllinien

### 4.1.1 HTCA

Mit den HT29 und NMG 64/84 Kolonkarzinom-Zelllinien und COLO-357, MiaPaCa-2 und PANC-1 Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden jeweils drei voneinander unabhängige Versuche mit je drei Messpunkten zu jeder verwendeten Konzentration und jeder angegebenen Zeitspanne durchgeführt. Abbildung 1 zeigt als Beispiel einen Versuchsansatz der Zelllinie NMG 64/84 nach Inkubation mit MTT-Lösung.

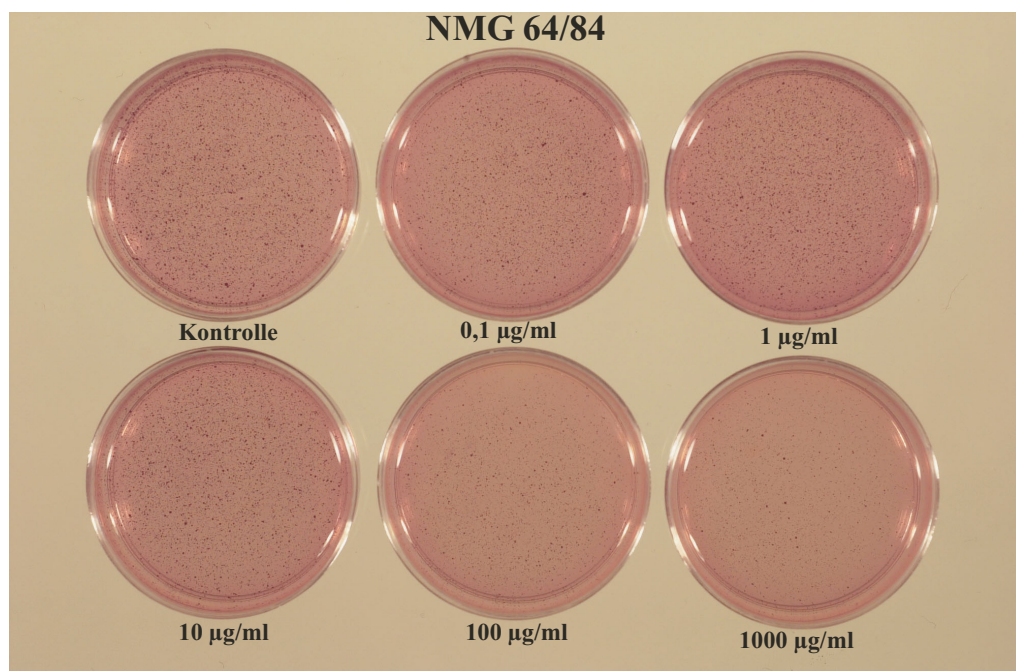


Abbildung 1: HTCA nach Inkubation mit MTT-Lösung. Mit ansteigender Irinotecan-Konzentration steigt auch der antiproliferative Effekt. Eine deutliche Reduzierung der Koloniebildungsrate (KBR) ist zwischen der Kontrolle und den Konzentrationen 100 µg/ml und 1000 µg/ml zu erkennen.

Es konnte eine deutliche dosisabhängige und zudem eine ebenso deutliche zeitabhängige Hemmung der Koloniebildung in allen Zelllinien beobachtet werden. Die gewonnenen Daten sind als KBR-Mittelwerte ( $\pm$ SEM) in % im Vergleich zur jeweiligen

unbehandelten Kontrolle dargestellt. Für jede Zelllinie und jede Inkubationszeit wurde anschließend an den Kurven der  $IC_{50}$ -Wert ermittelt. Der  $IC_{50}$ -Wert entspricht der Konzentration von Irinotecan, bei der eine Hemmung der Koloniebildungsrate um 50% erreicht wird. Es konnte bei allen Zelllinien eine Hemmung der KBR von mindestens 50% erreicht werden. Einzige Ausnahme bildet die Zelllinie HT29 mit der Inkubationszeit von 180 min, bei der nur eine Hemmung von 49% erzielt werden konnte.

In Abbildung 2 sind die Dosis-Wirkungskurven für die jeweiligen 4 Inkubationszeiten für die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HT29 und NMG 64/84 dargestellt, und in Abbildung 3 und 4 sind die für die humanen Pankreaskarzinom-Zelllinien Colo-357, MIA PaCa-2 und PANC-1 erfasst.

Zusätzlich wurde das Konzentrations-Zeit-Produkt (KZP) aus dem ermittelten  $IC_{50}$ -Wert und der angewandten Inkubationszeit berechnet. Das KZP dient zur Ermittlung der effektivsten Inkubationsdauer. Die gewonnenen Daten sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9:  $IC_{50}$  und KZP der Zelllinien im HTCA.

Zelllinien	Inkubationszeit							
	30 min		90 min		180 min		1440 min	
	$IC_{50}^1$	KZP <sup>2</sup>	$IC_{50}^1$	KZP <sup>2</sup>	$IC_{50}^1$	KZP <sup>2</sup>	$IC_{50}^1$	KZP <sup>2</sup>
<b>HT29</b>	200	6000	400	36000	>100	>18000	400	576000
<b>NMG 64/84</b>	160	4800	200	18000	60	10800	150	216000
<b>Colo-357</b>	100	300	100	9000	70	12600	13	18720
<b>MIA PaCa-2</b>	400	12000	330	29700	120	21600	35	50400
<b>PANC-1</b>	150	4500	150	13500	35	6300	80	115200

<sup>1</sup>  $IC_{50}$ : Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), die eine Hemmung der Koloniebildungsrate um mind. 50% bewirkt.

<sup>2</sup> KZP: Konzentration x Zeit Produkt ( $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$ ), bei der eine Hemmung der Koloniebildungsrate um mind. 50% erfolgt.

Bei allen Zelllinien fand sich das kleinste KZP bei einer Inkubationszeit von 30 min. Bei dieser Inkubationszeit waren Colo-357 Zellen am empfindlichsten und MIA PaCa-2 Zellen am resistantesten. Aus dem gemeinsamen kleinsten KZP bei 30 min kann man folgern, dass bei dieser Inkubationszeit Irinotecan am effektivsten wirkt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die nachfolgende Untersuchung an Gewebekulturen die Inkubationszeit auf 30 min festgelegt.

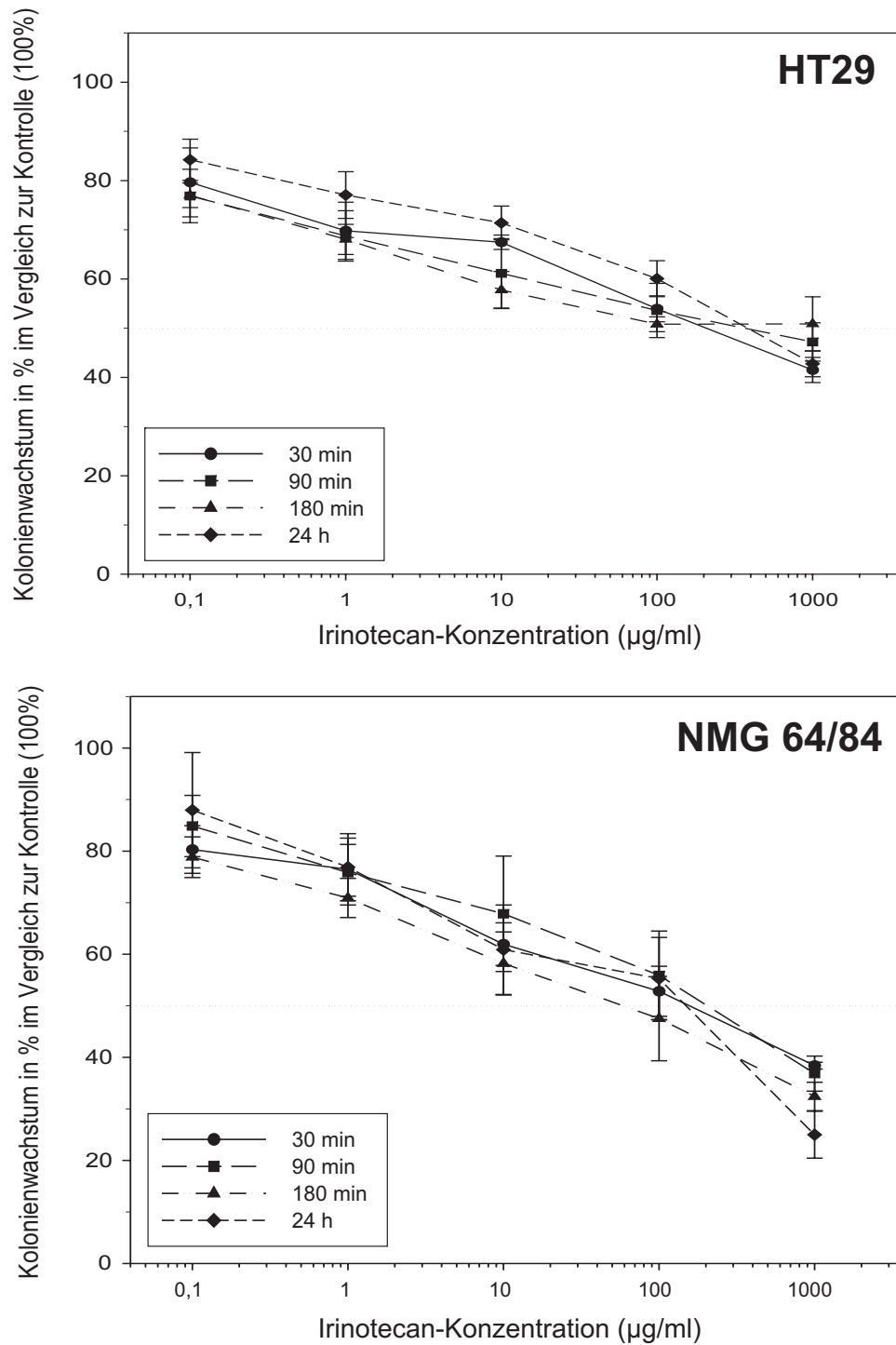


Abbildung 2: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan auf die Koloniebildungsrate (KBR) von HT29 und NMG 64/84 Kolonkarzinom-Zelllinien im HTCA (Human Tumor Colonyforming Assay). Die Zelllinien wurden jeweils 30 min (●), 90 min (■), 180 min (▲) und 24 h (◆) mit steigenden Irinotecan-Konzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Dann wurden sie nach dem Prinzip des Doppelschichtverfahrens in Weichagar ausgesät. Die Resultate sind als Koloniebildungsrate in % im Vergleich zur korrespondierenden unbehandelten Kontrolle dargestellt und sind Mittelwerte ( $\pm\text{SEM}$ ) von 3 unabhängigen Versuchen mit je 3 Messpunkten pro Konzentration und Zeit.



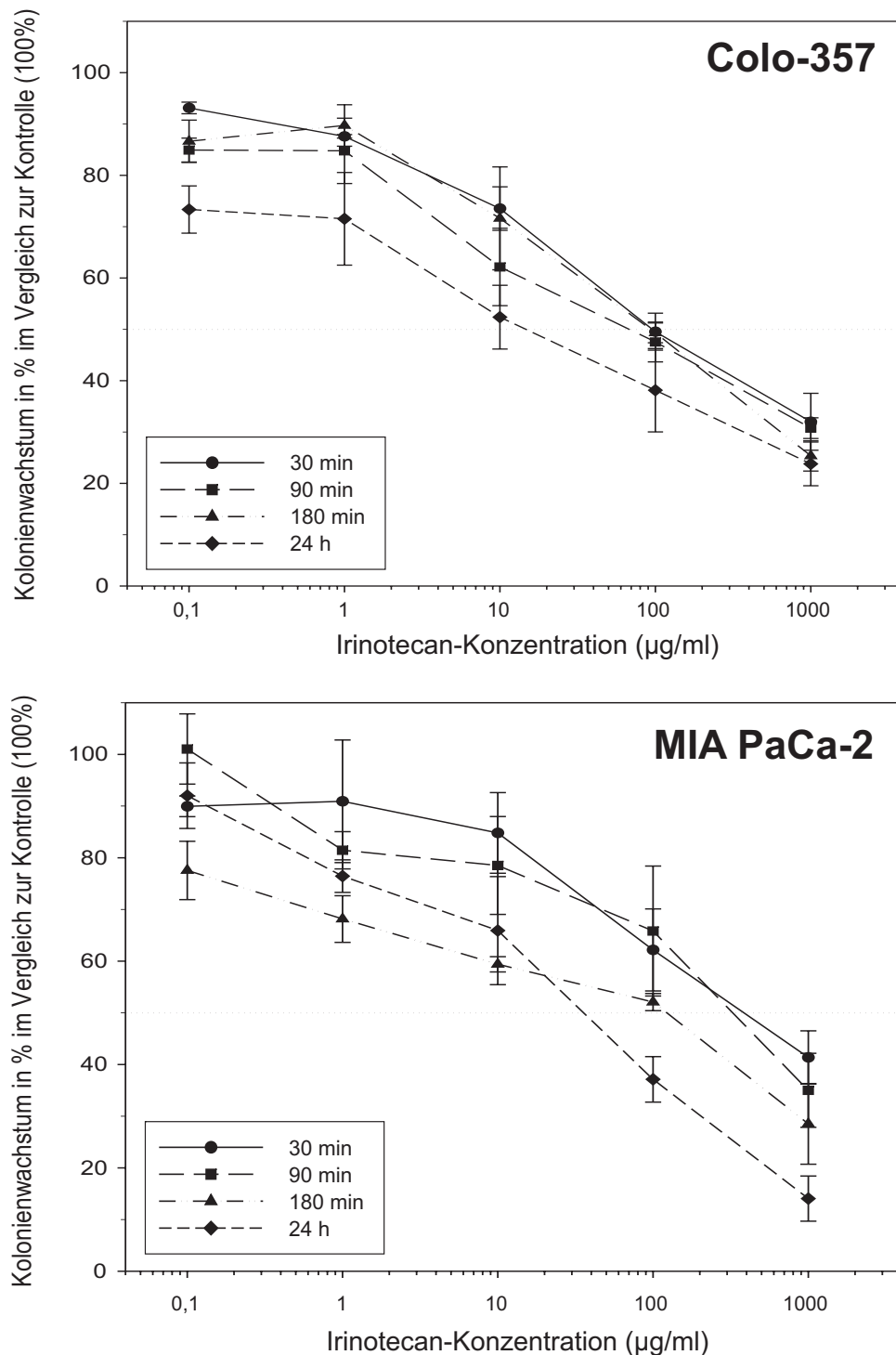


Abbildung 3: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan auf die Koloniebildungsrate von Colo-357 und MIA PaCa-2 Pankreaskarzinom-Zelllinien im Human Tumor Colonyforming Assay (HTCA). Die Zelllinien wurden jeweils 30 min (●), 90 min (■), 180 min (▲) und 24 h (◆) mit steigenden Irinotecan-Konzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Dann wurden sie nach dem Prinzip des Doppelschichtverfahrens in Weichagar ausgesät. Die Resultate sind als Koloniebildungsrate in % im Vergleich zur korrespondierenden unbehandelten Kontrolle dargestellt und sind Mittelwerte ( $\pm\text{SEM}$ ) von 3 unabhängigen Versuchen mit je 3 Messpunkten pro Konzentration und Zeit.

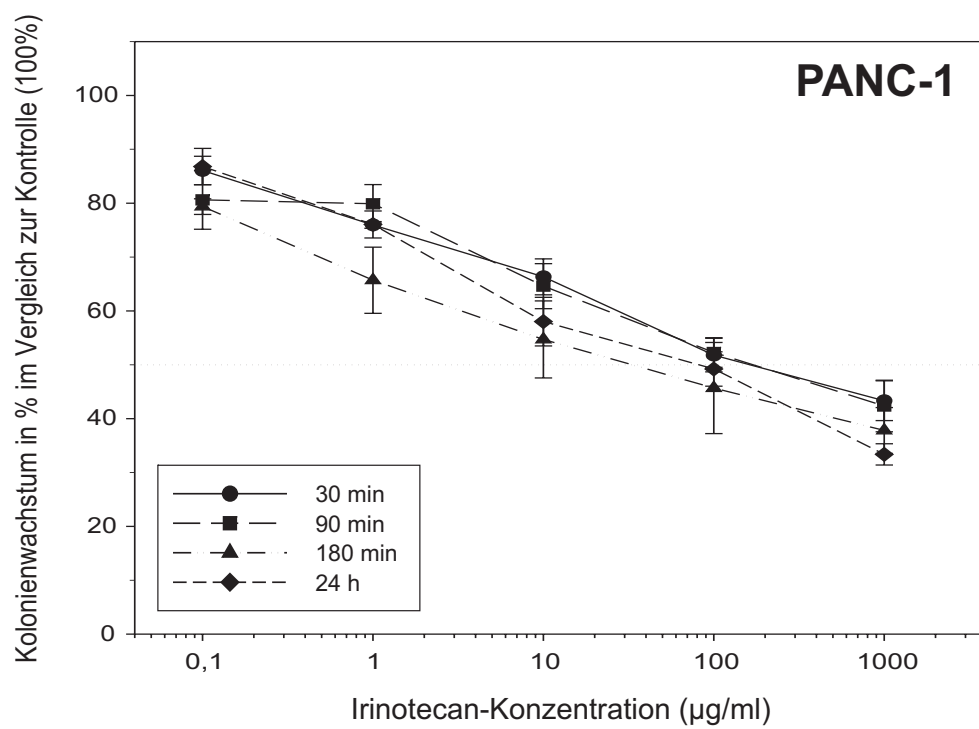


Abbildung 4: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan auf die Koloniebildungsrate der PANC-1 Pankreaskarzinom-Zelllinie im Human Tumor Colonyforming Assay (HTCA). Vorgehen siehe Abbildung 3.

### 4.1.2 MTT

Um die Effektivität der Kombination von Irinotecan und 5-Fluorouracil zu testen setzte man den MTT-Assay ein. Abbildung 5 soll als Beispiel für einen kompletten Versuchsansatz dienen.

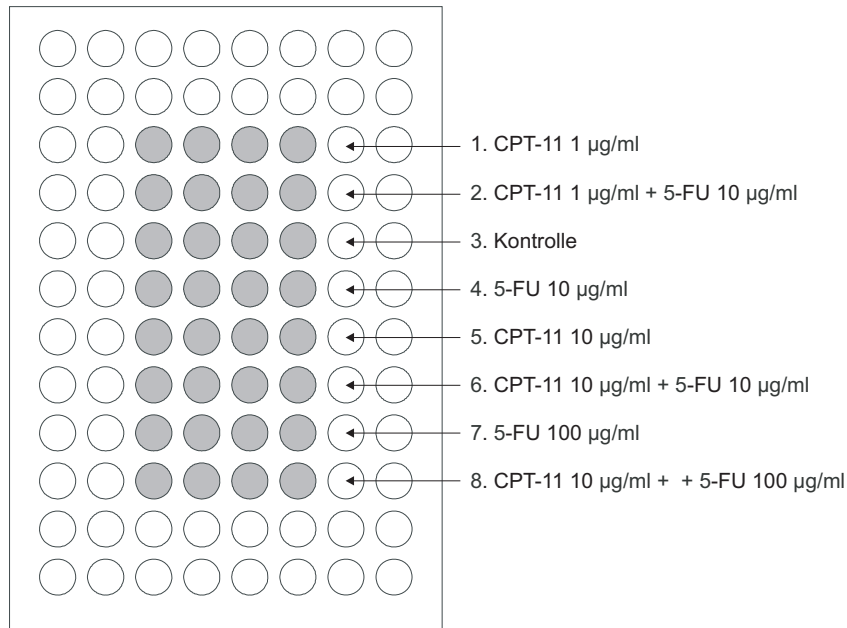


Abbildung 5: Beispiel eines MTT-Assay in einer 96-Loch-Platte. Die grau dargestellten Löcher wurden mit je 200 µl der jeweiligen eingestellten Zellsuspension beimpft und mit den pro Spalte angegebenen Konzentrationen von Irinotecan bzw. 5-FU inkubiert.

Die MTT-Ergebnisse sind für die beiden Kolonkarzinom-Zelllinien HT29 und NMG 64/84 in Abbildung 6, für die Pankreaskarzinom-Zelllinien Colo-357, MIA PaCa-2 in Abbildung 7 und PANC-1 in Abbildung 8 dargestellt.

Die Kombination von Irinotecan und 5-Fluorouracil zeigte keine synergistischen Effekte in den Zelllinien. Additive Effekte konnten nur bei HT29, NMG64/84, MIA PaCa-2 und PANC-1 beobachtet werden und dies bei 10 µg/ml Irinotecan, gefolgt von niedrigen bis mittleren Dosierungen von 5-FU. In der empfindlichsten Zelllinie COLO-357 konnte nur ein additiver Effekt bei 1 µg/ml Irinotecan, gefolgt von 1 µg/ml 5-FU beobachtet werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte und das KZP wurden für den Teil des Versuchsansatzes, der nur mit Irinotecan behandelt wurde, ermittelt. Die Daten sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: IC<sub>50</sub>- und KZP- Werte der Zelllinien im MTT-Assay.

Zelllinien	Inkubationszeit	
	90 min	
	IC <sub>50</sub> <sup>1</sup> (µg/ml)	KZP <sup>2</sup> (µg/ml/min)
<b>HT29</b>	100	9000
<b>NMG 64/84</b>	50	4500
<b>Colo-357</b>	5,4	486
<b>MIA PaCa-2</b>	23	2070
<b>PANC-1</b>	46	4140

<sup>1</sup>IC<sub>50</sub>: Konzentration (µg/ml), die eine Hemmung der Zellproliferation um mind. 50% bewirkt.

<sup>2</sup>KZP: Konzentration x Zeit Produkt, bei der eine Hemmung der Zellproliferation um mind. 50% erfolgt.

Es ergab sich eine signifikante dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation in allen Zelllinien. Die Ergebnisse korrelieren sehr gut mit denen, die bei den Versuchen mit dem HTCA bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten gefunden wurden. Wie im HTCA waren auch im MTT-Assay die Colo-357-Zellen am empfindlichsten auf Irinotecan.

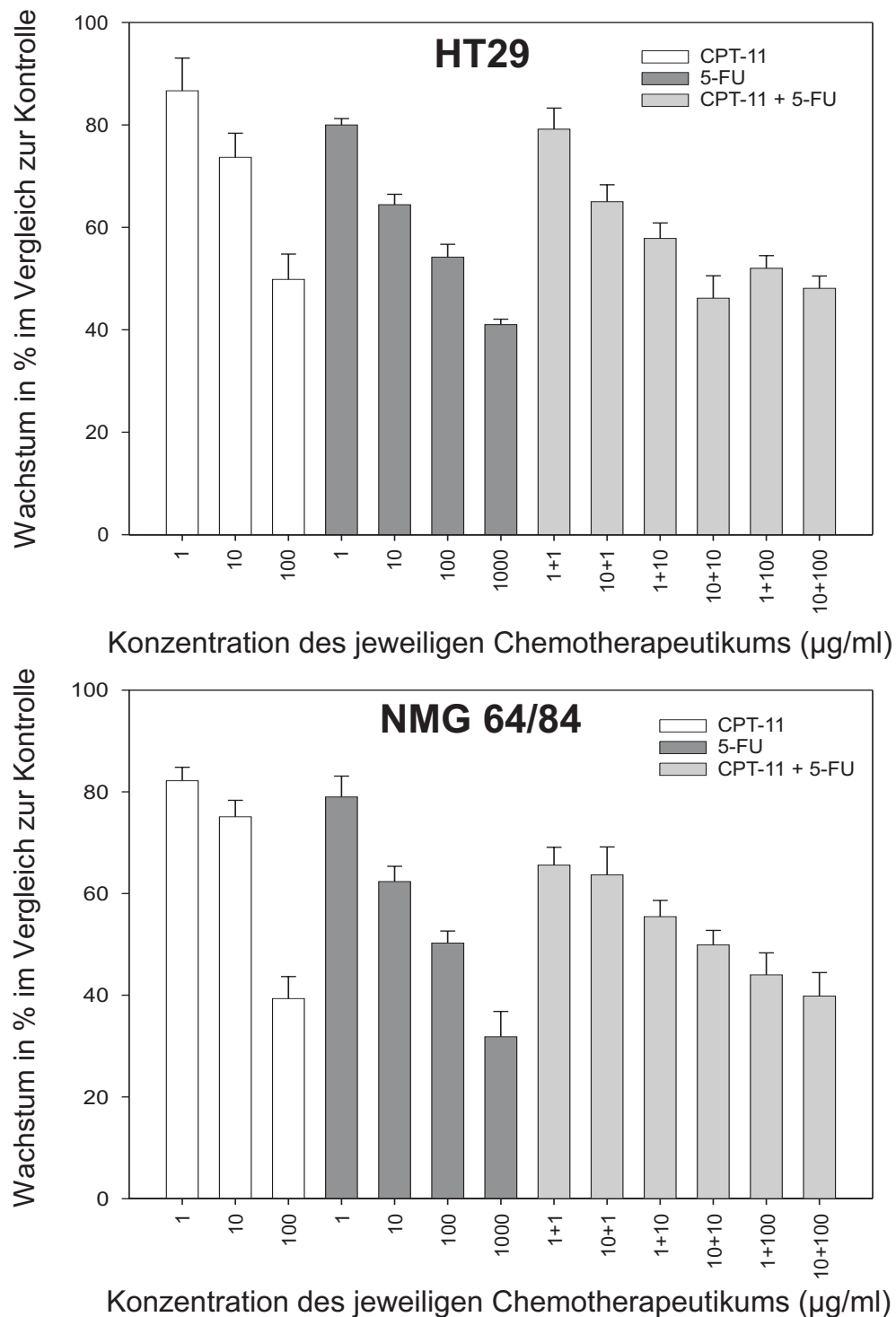


Abbildung 6: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan und 5-FU auf das Zellwachstum von HT29 und NMG 64/84 Kolonkarzinom-Zelllinien im MTT-Assay. Die Zelllinien wurden 90 min mit steigenden Konzentrationen von Irinotecan und anschließend für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-FU inkubiert. Die Resultate sind als Zellwachstum in % im Vergleich zur korrespondierenden unbehandelten Kontrolle dargestellt und sind Mittelwerte ( $\pm$ SEM) von mindestens drei unabhängigen Versuchen mit je 4 Messpunkten pro Konzentration und Zeit.

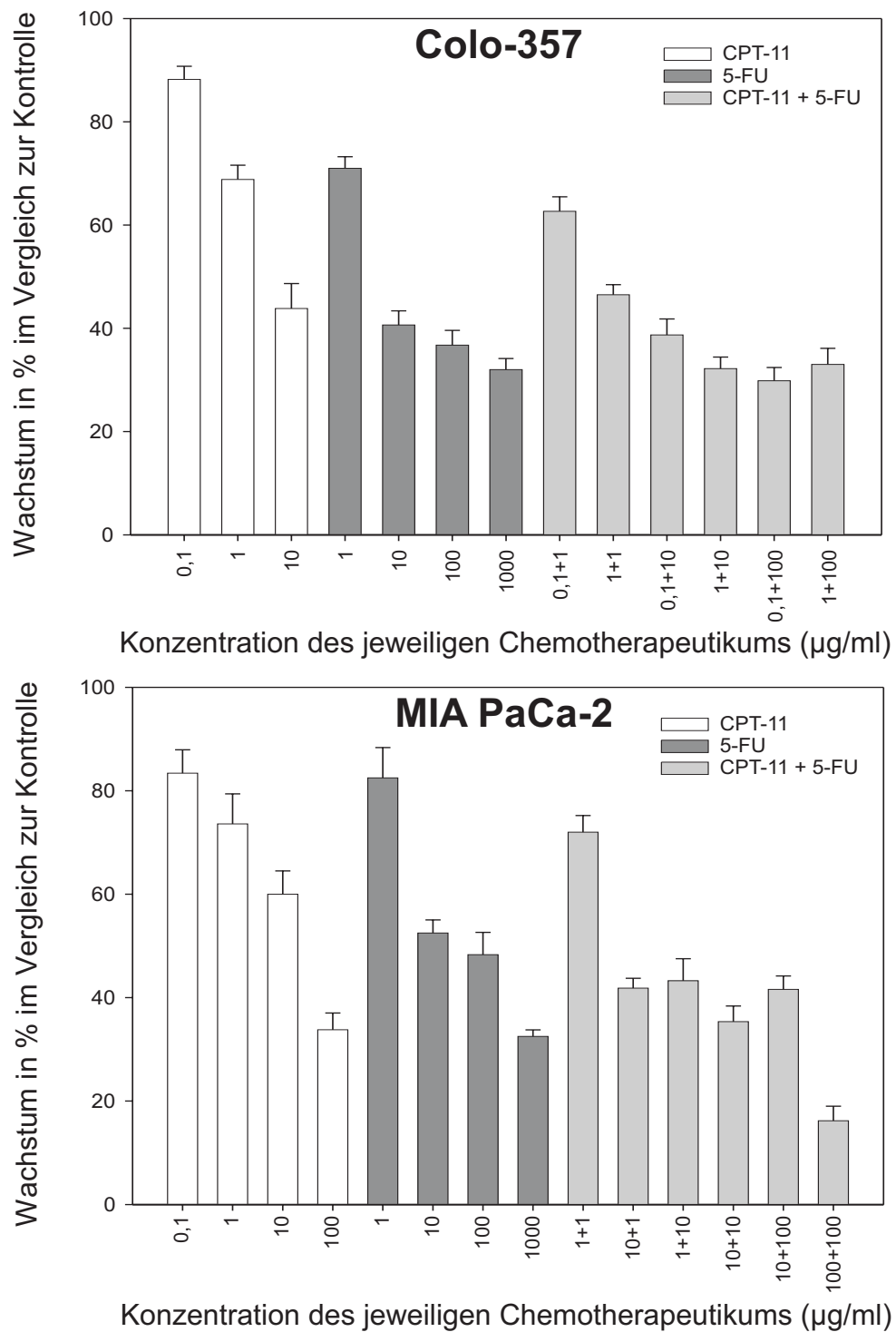


Abbildung 7: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan und 5-FU auf das Zellwachstum von Colo-357, MIA PaCa-2 Pankreaskarzinom-Zelllinien im MTT-Assay. Vorgehen siehe Abbildung 6.

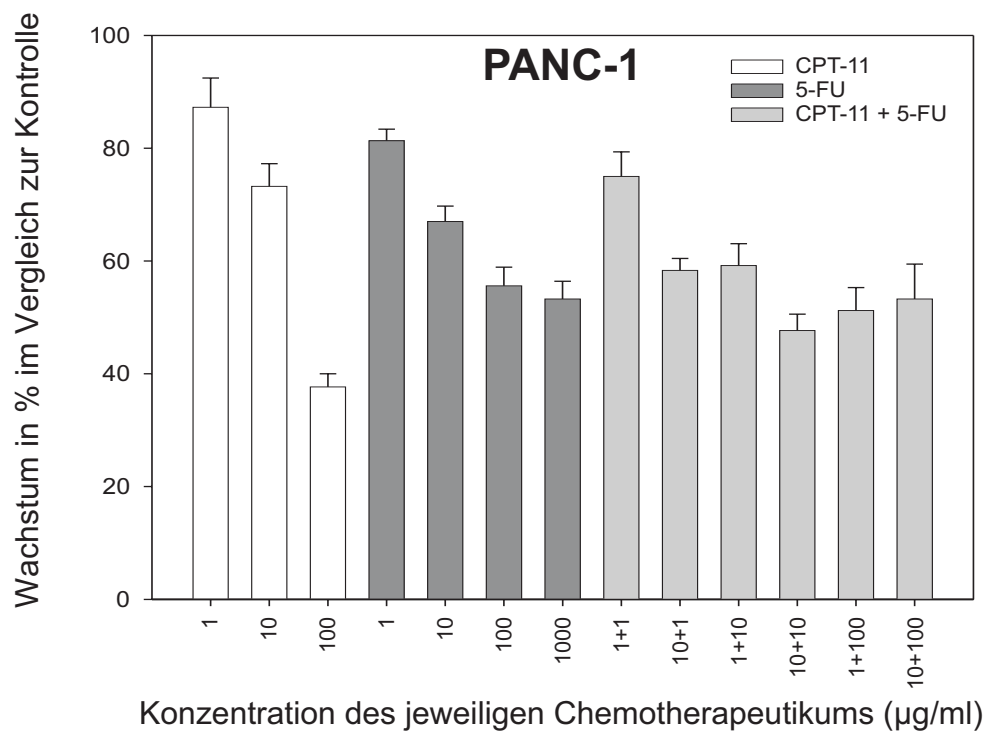


Abbildung 8: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan und 5-FU auf das Zellwachstum der PANC-1 Pankreaskarzinom-Zelllinie im MTT-Assay. Vorgehen siehe Abbildung. 7

### 4.1.3 FACS

FACS-Analysen dienen zur Ermittlung der Auswirkung von Irinotecan auf den Zellzyklus der jeweiligen Zelllinie. Mit den HT29 und NMG 64/84 Kolonkarzinom-Zelllinien und COLO-357, MiaPaCa-2 und PANC-1 Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden jeweils drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Abbildung 9 zeigt die gewonnenen Daten für die beiden Kolonkarzinom-Zelllinien und Abbildung 10 stellt die Ergebnisse für die drei Pankreaskarzinom-Zelllinien dar.

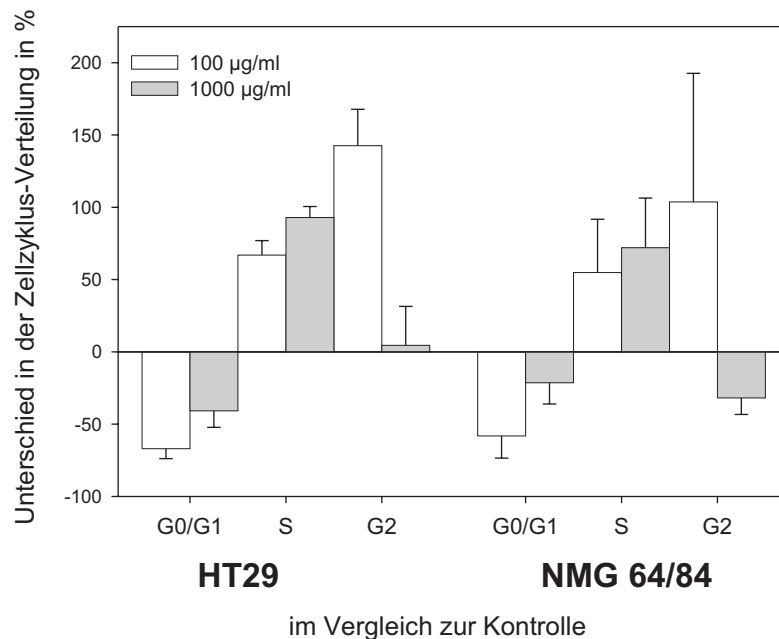


Abbildung 9: Zellzyklusanalyse: Unterschiede in der Zellzyklusverteilung der Zelllinien HT29 und NMG 64/84 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 30 min Inkubation mit 100 µg/ml Irinotecan (weiß) und mit 1000 µg/ml Irinotecan. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD dreier unabhängiger Versuche dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Unterschied in der Reaktion der Kolonkarzinom-Zelllinien und der Pankreaskarzinom-Zelllinien. Bei HT29 und NMG64/84 sind eine Erniedrigung der Zellzahl in der  $G_0/G_1$ -Phase und eine deutliche Erhöhung der Zellfraktion in der S-Phase zu finden. Die Zellfraktion in der  $G_2$ -Phase ist bei niedrigen Irinotecan-Konzentrationen erhöht, wohingegen sie bei hohen Irinotecan-Konzentrationen in den Zelllinien HT29 und NMG64/84 unverändert bleibt oder reduziert wird. Im Gegensatz hierzu zeigen COLO-357, Mia PaCa-2 und PANC-1 einen  $G_0/G_1$ -Arrest; die Zellfraktion ist deutlich erhöht. In der S- und  $G_2$ -Phase fiel die Zellfraktion ab. Mia PaCa-2 stellte sich als resistanteste Zelllinie heraus.



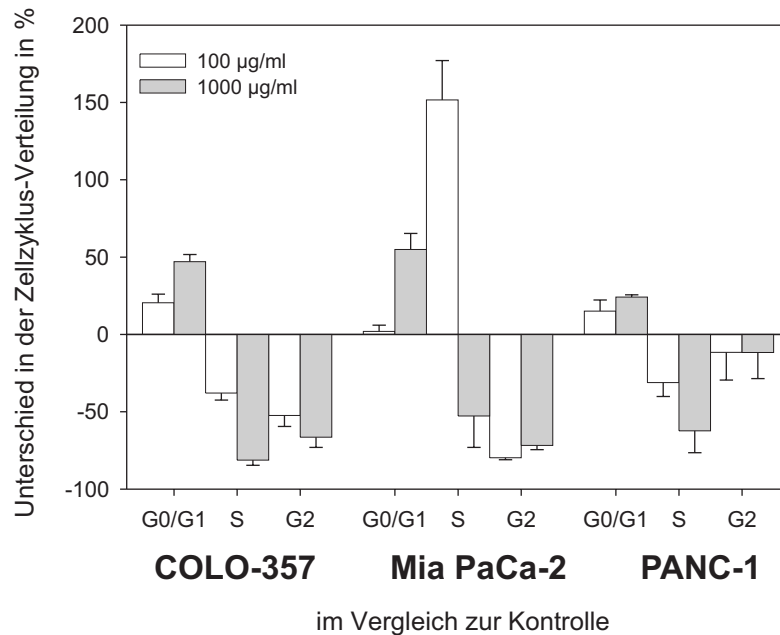


Abbildung 10: Unterschiede in der Zellzyklusverteilung der Pankreaskarzinom-Zelllinien COLO-357, MIA PaCa-2 und PANC-1 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 30 min Inkubation mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Irinotecan (weiß) und mit 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Irinotecan. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD dreier unabhängiger Versuche dargestellt.

## 4.2 HTCA mit Karzinomgewebe

Es wurde Tumorgewebe von 16 Patienten mit kolorektalen Lebermetastasen, von einer Leberfilia eines Mamma-Karzinoms, von zwei Patienten mit kolorektalen Primärtumoren und von einem Patient mit hepatozellulärem Primärtumor untersucht (Tabelle 11).

Tabelle 11: Im HTCA kultivierte Tumoren; KBR = Koloniebildungsrate

Tumortyp	erhalten	auswertbar	% mit Ergebnis	Mediane KBR	Bereich der KBR
Lebermetastase	18	11	61(11/18)	66	37-84
Primärtumor	3	2	67(2/3)	45	40-49
<b>Total</b>	21	13	612(13/21)	61,3	37-84

Von den 18 ausgesäten Filiae konnten letztlich 11 ausgewertet werden, von den drei ausgesäten Primärtumoren waren es zwei. In der Gruppe der ausgesäten Leberfiliae zeigten 5 Proben kein Wachstum und zwei Proben waren kontaminiert. In der Gruppe der ausgesäten primären Karzinome zeigte eine Probe kein Wachstum. Die mediane

Koloniebildungsrate (KBR) der 11 Filiae betrug 66 Kolonien (37-84), bei den zwei Primärtumoren 45 Kolonien (40-49).

### 4.2.1 HTCA mit Lebermetastasengewebe

Die Daten der ausgewerteten Patienten mit Leberfiliae sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Daten der Patienten mit Leberfiliae

Nr.	PT <sup>1</sup> /M <sup>2</sup>	Alter	Sex	IC <sub>50</sub> <sup>3</sup>	KZP <sup>4</sup>	Vorherige Therapie
01/02	Coecum/s	70	♀	1000	30000	keine
08/02	Rectum/m	62	♂	200	6000	5-FU/FS, i.v., adjuvant
10/02	Colon/s	60	♀	35	1050	5-FU/FS + OXA,i.v.
11/02	Colon/m	69	♂	300	9000	5-FU/FS, i.v., adjuvant
12/02	Rectum/m	67	♀	43	1290	5-FU/FS, i.v., adjuvant
03/03	Sigma/s	61	♂	180	5400	keine
04/03	Sigma/m	42	♂	23	690	Novantron, 5 FU/FS, Mitomycin C, i.a., 5 FU/FS, i.v.
05/03	Colon/m	53	♂	74	2220	5-FU/FS, i.v., adjuvant
06/03	Rektum/m	61	♂	200	6000	5-FU/FS,i.v., adjuvant
07/03	Colon/m	61	♂	105	3150	Keine
09/03	Colon/m	58	♀	30	900	5-FU/FS, i.v., adjuvant

<sup>1</sup>PT: Primärtumor(-Lokalisation)

<sup>2</sup>M: Lebermetastasen, s: synchron, m: metachron

<sup>3</sup>IC<sub>50</sub>:Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ), die eine Hemmung der Koloniebildungsrate um mind. 50% bewirkt.

<sup>4</sup> KZP:Konzentration x Zeit (30 min) Produkt ( $\mu\text{g/ml/min}$ ), bei der eine Hemmung der Koloniebildungsrate um mind. 50% erfolgt.

Für jede Tumorprobe wurde ein Versuch mit je drei Messpunkten zu jeder verwendeten Konzentration und einer Inkubationszeit von 30 min durchgeführt. Diese Zeitspanne ergab sich aufgrund der Ergebnisse aus den HTCA mit den Zelllinien. Sie hatten alle ihr kleinstes KZP bei einer Inkubationszeit von 30 min. Die gewonnenen Daten sind als mittlere KBR ( $\pm\text{SD}$ ) in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in Abbildung 11 zusammengefasst.

Bei allen untersuchten Gewebeproben ermittelte man die IC<sub>50</sub>-Werte. Es konnte bei allen 11 Versuchsansätzen eine Hemmung der KBR von mindestens 50% erreicht

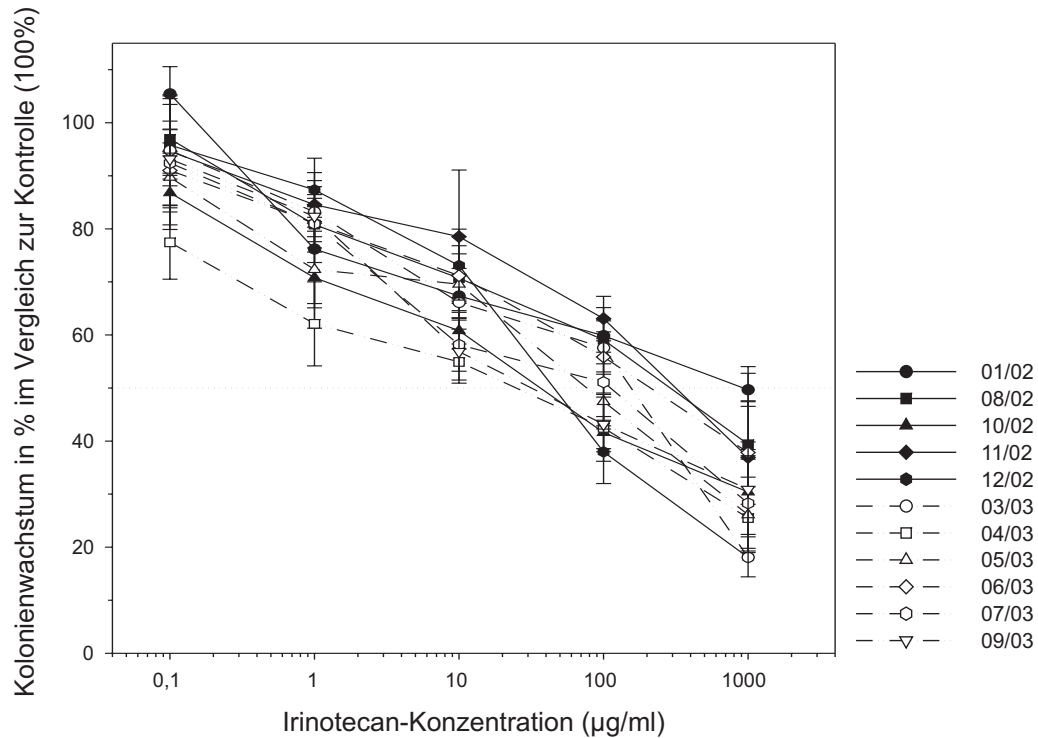


Abbildung 11: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan auf die KBR von Tumorgewebe-Proben von Patienten mit Leberfiliae im HTCA. Die Tumorzellen wurden 30 min mit steigenden Irinotecan-Konzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Dann wurden sie nach dem Prinzip des Doppelschichtverfahrens in Weichagar ausgesät. Die Resultate sind als KBR in % im Vergleich zur korrespondierenden unbehandelten Kontrolle dargestellt und sind Mittelwerte ( $\pm$  SD) von einem Versuch mit je 3 Messpunkten pro Konzentration.

werden. Der niedrigste  $\text{IC}_{50}$ -Wert trat mit  $23 \mu\text{g/ml}$  bei Gewebeprobe 04/03, der höchste bei Gewebeprobe 01/02 mit  $1000 \mu\text{g/ml}$  auf. Alle  $\text{IC}_{50}$ -Werte und die dazugehörigen KZP sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Der durchschnittliche  $\text{IC}_{50}$ -Wert aller ausgewerteten Lebermetastasen-Gewebeproben betrug  $199 \mu\text{g/ml}$ . Der mediane  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei  $105 \mu\text{g/ml}$ . Bei den Nummern 05/03 und 09/03 waren ausreichend vitale Tumorzellen vorhanden, um zusätzlich weitere Chemotherapeutika zu testen. In beiden Fällen wurde Mitomycin C, Epirubicin, Novantron, Cisplatin, Oxaliplatin und Gemcitabine getestet. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Ergebnisse dieser Ansätze.

In beiden Versuchen konnte bei den zusätzlich getesteten Chemotherapeutika für Mitomycin C die geringste und für Oxaliplatin die größte Hemmung der KBR nachgewiesen werden. Tabelle 14 vergleicht die antiproliferativen Effekte der unterschiedlichen Substanzen bei Konzentrationen, die theoretisch in der HAI erreichbar wären.

Irinotecan nimmt in beiden getesteten Präparaten in der *in vitro* Sensibilität den dritten Platz hinter Oxaliplatin und Mitoxantrone ein.

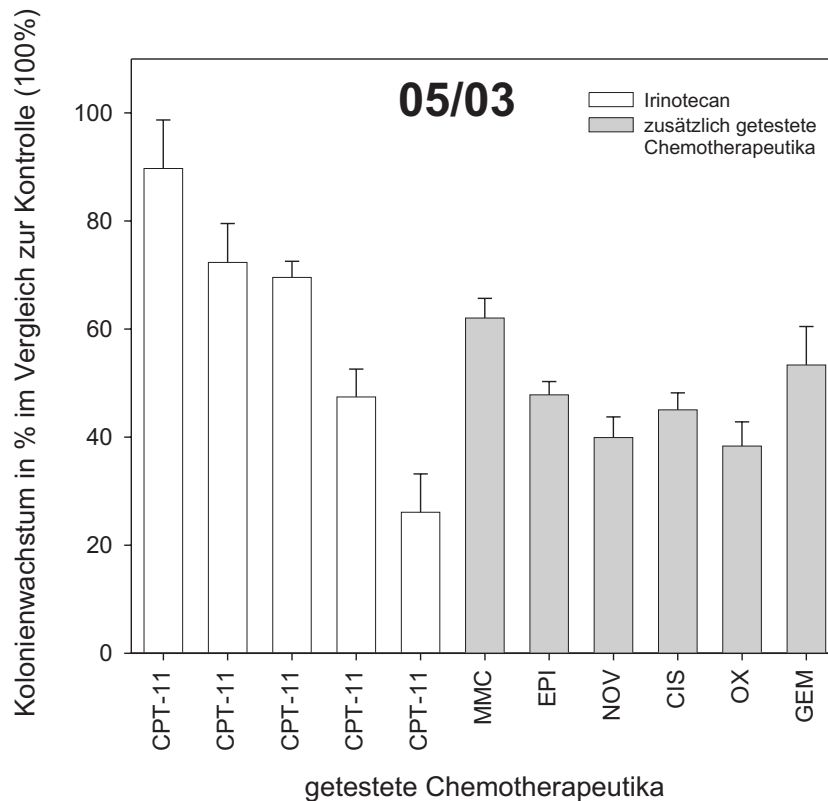


Abbildung 12: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan auf die KBR von Leberflia-Gewebe 05/03. Die Zellen wurden 30 min mit steigenden (0,1; 1; 10; 100; 1000) Irinotecan-Konzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Ebenso wurden Teile der Tumorzellsuspension mit Mitomycin C (MMC) für 30 min mit  $1,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Epirubicin (EPI) für 30 min mit  $13,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Mitoxantrone (NOV) für 60 min mit  $1,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Cisplatin (CIS) für 60 min mit  $6,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Oxaliplatin (OXA) für 120 min mit  $8,2 \mu\text{g}/\text{ml}$  und Gemcitabine (GEM) für 120 min mit  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  inkubiert.

Tabelle 13: Antiproliferative Effekte von Irinotecan und anderen Chemotherapeutika, die bereits im HTCA verwendet werden

Nr.	CPT-11 (91) <sup>1</sup>	OXA (8,2) <sup>2</sup>	CIS (6,4)	EPI (13,4)	GEM (65)	MMC (1,9)	NOV (1,1)
05/03	46% <sup>3</sup>	38%	45%	48%	53%	62%	40%
09/03	41%	36%	52%	45%	44%	56%	41%

<sup>1</sup>Theoretisch erreichbare Konzentration von Irinotecan in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bei HAI mit  $350 \text{ mg}/\text{m}^2$  Körperoberfläche in 30 min.

<sup>2</sup>Theoretisch erreichbare Konzentration in  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mittels HAI, im HTCA verwendet.

<sup>3</sup>KBR in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Resultate sind Mittelwerte aus einem Versuch mit drei Messpunkten pro Chemotherapeutikum. Für Irinotecan wurden die Werte für  $91 \mu\text{g}/\text{ml}$  aus Abbildung 11 entnommen.

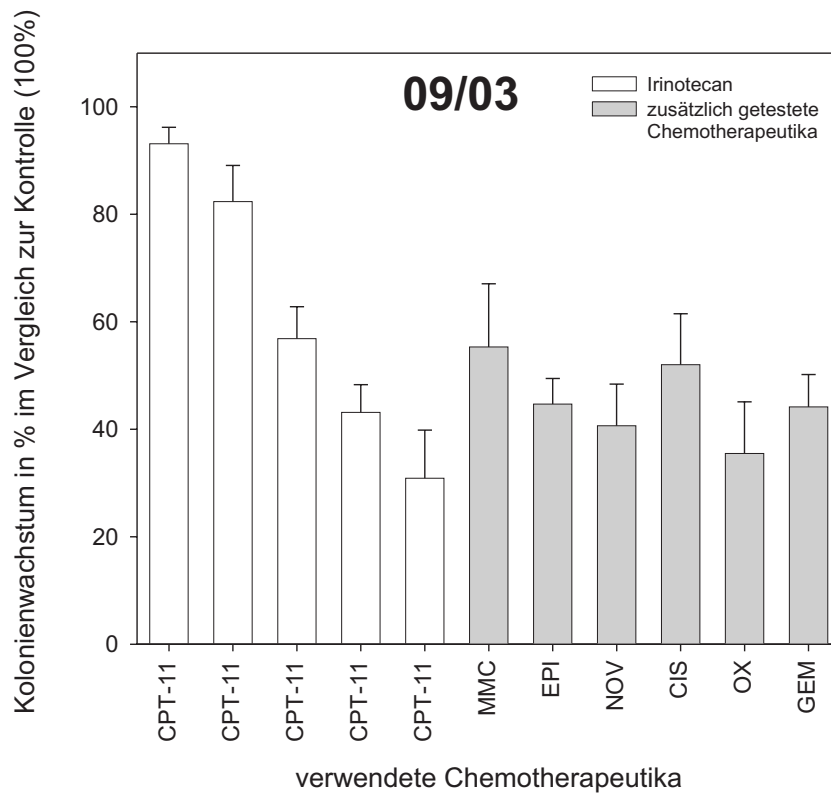


Abbildung 13: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan auf die KBR von Leberfilia-Gewebe 09/03. Die Zellen wurden 30 min mit steigenden (0,1; 1; 10; 100; 1000) Irinotecan-Konzentrationen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert. Ebenso wurden Teile der Tumorzellsuspension mit Mitomycin C (MMC) für 30 min mit  $1,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Epirubicin (EPI) für 30 min mit  $13,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Mitoxantrone (NOV) für 60 min mit  $1,1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Cisplatin (CIS) für 60 min mit  $6,4 \mu\text{g}/\text{ml}$ , Oxaliplatin (OXA) für 120 min mit  $8,2 \mu\text{g}/\text{ml}$  und Gemcitabine (GEM) für 120 min mit  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  inkubiert.

### 4.2.2 HTCA mit Primärtumoren

Bei den ausgewerteten Primärtumoren handelte es sich in beiden Fällen um ein Rektumkarzinom. Beide Patienten waren männlich und 69 Jahre alt. Die Daten der ausgewerteten Patienten mit Rektumkarzinom sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 14: Daten der Patienten mit untersuchten Primärtumoren

Nr.	PT <sup>1</sup>	Alter	Sex	IC <sub>50</sub> <sup>2</sup>	KZP <sup>3</sup>	Vorherige Therapie
06/02	Rektum	69	♂	400	12000	keine
07/02	Rektum	69	♂	150	4500	keine

<sup>1</sup>PT: Primärtumor(-Lokalisation)

<sup>2</sup>IC<sub>50</sub>: Konzentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), die eine Hemmung der Koloniebildungsrate um mind. 50% bewirkt.

<sup>3</sup>KZP: Konzentration x Zeit (30 min) Produkt ( $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$ ), bei der eine Hemmung der Koloniebildungsrate um mind. 50% erfolgt.

Genau wie für die untersuchten Leberfiliae wurde auch für jede Primärtumorprobe ein Versuch mit je drei Messpunkten zu jeder verwendeten Konzentration und einer Inkubationszeit von 30 min durchgeführt. Die gewonnenen Daten sind als mittlere KBR ( $\pm\text{SD}$ ) in % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in Abbildung 14 dargestellt.

Bei beiden untersuchten Gewebeproben konnte eine Hemmung der KBR um mindestens 50% erreicht werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen bei 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Der durchschnittliche IC<sub>50</sub>-Wert wurde bei 275  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gefunden und war damit deutlich höher als bei den untersuchten Leberfiliae.

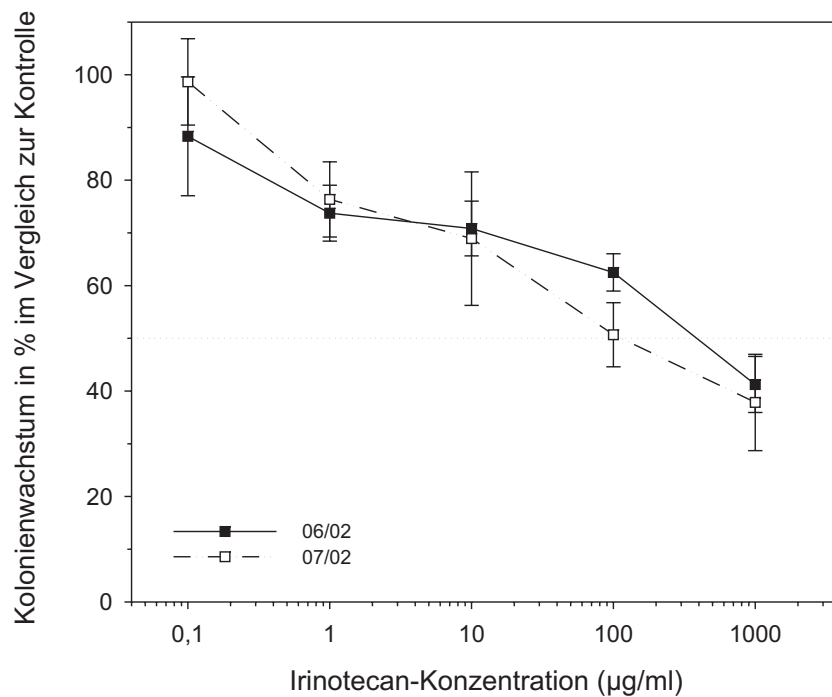


Abbildung 14: Antiproliferativer Effekt von Irinotecan auf die KBR von Tumorgewebeproben von Patienten mit Primärtumoren im HTCA. Die Tumorzellen wurden 30 min mit steigenden Irinotecan-Konzentrationen ( $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Dann wurden sie nach dem Prinzip des Doppelschichtverfahrens in Weichagar ausgesät. Die Resultate sind als KBR in % im Vergleich zur korrespondierenden unbehandelten Kontrolle dargestellt und sind Mittelwerte ( $\pm\text{SD}$ ) von einem Versuch mit je 3 Messpunkten pro Konzentration.

# Diskussion

---

Die Leber ist der Hauptabsiedlungsort von Metastasen des kolorektalen Karzinoms. Die Hälfte aller Patienten mit kolorektalem Karzinom können im Verlauf Lebermetastasen entwickeln [Nordlinger et al., 1996]. Vor dem Hintergrund, dass zum Zeitpunkt der Diagnose von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms die R<sub>0</sub>-Resektion nur in 10% der Fälle möglich ist [Bismuth und Adam, 1998] und dass der Profit von einer sekundären Leberresektion nach neoadjuvanter Chemotherapie in gleichem Maße vorhanden ist, sollten weitere Therapiemöglichkeiten abgeklärt werden, die ein Downsizing der Metastasen und somit eine eventuelle R<sub>0</sub>-Resektion möglich machen. Aus diesem Grund sollten Substanzen, die bereits erfolgreich in die systemische Chemotherapie-Behandlung eingeführt wurden, auf die Tauglichkeit in einem HAI-Chemotherapie-Regime geprüft werden.

Basierend auf der *in vitro* Chemosensitivitäts-Testung mittels HTCA konnte unter Bedingungen, die klinisch erreichbar sind, gezeigt werden, dass Patienten, die *in vitro* als chemosensitiv getestete Zytostatika erhielten, deutlich höhere Ansprechraten zeigten, als diejenigen, die nur als *in vitro* resistent getestete Substanzen erhielten [Link et al., 1996]. Unter Verwendung des HTCA konnte bereits ein wirksames HAI-Chemotherapie-Protokoll mit Mitoxantrone, 5-FU/FA und Mitomycin C etabliert werden, welches hohe Überlebens- und sekundäre Resektionsraten erreichte [Link et al., 2001]. Oxaliplatin wurde ebenfalls, auf guten HTCA-Ergebnissen basierend [Kornmann et al., 2000b], in die HAI-Chemotherapie eingeführt. Erste Ergebnisse einer Phase II-Studie mit diesem Protokoll deuten auf eine hohe Ansprechraten bei tolerabler Toxizität hin [Guthoff et al., 2003]. Ähnlich wie Oxaliplatin konnte auch Irinotecan in Kombination mit 5-FU die Wirksamkeit der systemischen Behandlung des metastasierten kolorektalen Karzinoms deutlich verbessern [Saltz et al., 2000; Douillard et al., 2000]. Deshalb ist eine Verbesserung der Wirksamkeit von HAI-Chemotherapie-Protokollen, welche Irinotecan enthalten, auf isolierte kolorektale Lebermetastasen ebenfalls möglich.

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Studie, die Wirksamkeit von Irinotecan in HAI-Protokollen allein und in Kombination mit 5-FU für sich anschließende klinische Phase II-Studien *in vitro* abzuschätzen. In einem ersten Schritt wurde die Wirkung



der Kombination von Irinotecan und 5-FU ausgetestet. Hierbei fand der MTT-Assay Verwendung, weil er einfache Handhabung und schnelle Auswertbarkeit verbindet, sogar bei der Austestung von Chemotherapie-Kombinationen. Da keine synergistische Wirkung gemessen werden konnte, unter bestimmten Bedingungen allenfalls additive Effekte, lag im weiteren Verlauf der Studie der Schwerpunkt auf der Wirkung von Irinotecan als Einzelsubstanz. In Anlehnung an die von Kornmann und Mitarbeitern [Kornmann et al., 2000a] publizierte Studie zur Abschätzung der zytotoxischen Wirkung von Gemcitabine, wurden zunächst Versuche an im Labor etablierten Kolonkarzinom- und Pankreaskarzinom-Zelllinien durchgeführt. Die Inkubation der Zelllinien erfolgte mit aufsteigenden Konzentrationen von Irinotecan im Bereich von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  bis  $1000 \mu\text{g/ml}$ . Um den Einfluss der Zeitdauer der Inkubation beurteilen zu können, wurden Zeitspannen von 30 min, 90 min, 180 min und 24 h gewählt. Sowohl bei den Kolonkarzinom- als auch bei den Pankreaskarzinom-Zelllinien ergab sich eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung sowie eine ebenfalls deutliche Zeit-Wirkungsbeziehung. Damit erfüllt Irinotecan grundsätzlich die Voraussetzungen für den Einsatz bei intraarterieller Chemotherapie. Obwohl van Riel und Kollegen [van Riel et al., 2002] in einer pharmakokinetischen Studie über die kontinuierliche Irinotecan-Infusion via Arteria hepatica keinen Unterschied in der systemischen Konzentration und Toxizität von SN-38, einem Metabolit von Irinotecan, im Vergleich zur systemischen Verabreichung von Irinotecan fanden, ist dennoch aufgrund der gezeigten dosisabhängigen Wirkung von Irinotecan die HAI zu favorisieren, da deutlich höhere Konzentrationen von Irinotecan in der Leber zu erwarten sind [Cohen and Kemeny, 2003].

Anhand der Konzentrations-Zeit-Produkte (KZP) stellte sich heraus, dass bei allen Zelllinien 30 min die beste Inkubationszeit mit den niedrigsten KZP darstellt. Bei dieser Inkubationszeit würde man mit der geringsten Konzentration pro Zeiteinheit im Vergleich zu anderen Zeiten den größten zytostatischen Effekt erzielen. Daher wurde für die Versuche mit Tumorgewebe eine Inkubationszeit von 30 min gewählt. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden zwei unterschiedliche HAI-Therapieregime mit Irinotecan publiziert: Im einen wird Irinotecan kontinuierlich über 5 Tage mit  $15\text{-}25 \text{ mg/m}^2/\text{d}$  verabreicht [van Riel et al., 2002], das andere Regime verwendet eine Kurzinfusion über 30 min mit  $200 \text{ mg/m}^2$  alle drei Wochen [Fiorentini et al., 2003]. Bei Fiorentini und Kollegen erhielten zwölf Patienten genanntes Schema über 6 Zyklen. Hierunter zeigten 33% ein partielles Ansprechen bis zu 24 Wochen lang, 25% hielten sich im Krankheitsstadium stabil über mehr als zwölf Wochen und 41% zeigten einen Progress bei insgesamt akzeptabler Toxizität. Da die maximal in der Leber erreichbare Dosis bei Langzeitinfusionen zwei bis dreimal niedriger ist als beim Verabreichen von

Kurzinfusionen [Garcia-Carbonero und Supko, 2002] und angesichts der gewonnenen Ergebnisse dieser Studie, wird das Regime von Fiorentini und Kollegen [Fiorentini et al.; 2003] favorisiert. Eine definitive Entscheidung zu Gunsten eines der beiden Regime sollte durch ein größeres Patientenkollektiv gewonnen werden, und bleibt abzuwarten.

Insgesamt konnten anhand des HTCA 11 der 18 ausgesäten Leberfiliae (Angehrate 61%) und zwei der drei Primärtumoren (Angehrate 66%) auf ihre *in vitro* Chemosensitivität getestet werden. Die mediane Koloniebildungsrate (KBR) der 11 Filiae betrug 66 Kolonien bei einem Streubereich zwischen 37 und 84 Kolonien. Bei den Primärtumoren betrug sie 45 Kolonien bei einem Streubereich von 40 bis 49 Kolonien. Damit lagen die hier erzielten HTCA-Wachstumsraten von Primärtumoren und Lebermetastasen im Bereich der aus der Literatur bekannten Resultate. In verschiedenen Veröffentlichungen konnten von den eingegangenen kolorektalen Tumoren etwa 58% ausgewertet werden, ohne Berücksichtigung der Unterschiede in der Kulturtechnik [von Hoff, 1990; Kornmann et al., 2003]. Für alle untersuchten Gewebeproben wurden die IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt, sie lagen zwischen 23 µg/ml und 1000 µg/ml. In allen Zelllinien fand sich ebenfalls eine deutliche dosisabhängige Hemmung der Koloniebildung. Das Ergebnis weist eine große Spanne von Konzentrationswerten auf, die benötigt wurden, um eine Hemmung der Koloniebildungsrate um 50% zu erreichen. Deutliche Unterschiede ergaben sich zwischen den Konzentrationen für Lebermetastasengewebe und kolorektalen Primärtumoren. Diese Befundkonstellation stimmt mit den Beobachtungen von Guichard und Kollegen [Guichard et al., 1999] überein, die variable Effekte von Irinotecan auf Carboxylesterase- und Topoisomerase-I-Aktivitäten in kolorektalen Primärtumoren und kolorektalen Lebermetastasen beschrieben.

Dass Patienten, die eine regionale Chemotherapie erhalten, mit einer Substanz, die zuvor als *in vitro* sensibel getestet wurde, ein signifikant besseres Ansprechen aufweisen, als Patienten, die mit *in vitro* resistent getesteten Substanzen therapiert wurden, konnten Link und Kollegen [Link et al., 1996+2000] zeigen. Die unter Nachahmung klinischer Konditionen mittels HTCA gewonnenen Ergebnisse korrelierten sehr gut mit dem klinischen Ansprechen der betroffenen Patienten. Ausgewählte Patienten könnten also von einer *in vitro* Austestung verschiedener Chemotherapeutika mit anschließender Verabreichung des potentesten deutlich profitieren. Bei zwei der 18 ausgesäten Leberfiliae war eine ausreichende Menge an vitalem Tumorgewebe vorhanden, um mehrere Substanzen auszutesten. Es wurde im Vergleich zu Irinotecan (CPT-11), Oxaliplatin (OXA), Cisplatin (CIS), Epirubicin (EPI), Gemcitabine (GEM), Mitomycin C (MMC) und Mitoxantrone (NOV) getestet. Irinotecan ist hier im Vergleich der 7 Substanzen in der *in vitro* Sensibilität hinter Oxaliplatin und Mitoxantrone an dritter Stelle. Mit-

omycin C erwies sich in beiden Fällen als resistenteste Substanz.

Dass nur bei zwei von 18 getesteten Leberfiliae eine ausreichende Menge an vitalen Tumorzellen vorhanden war, zeigt andererseits einen weiteren Nachteil des bewährten HTCA. Sollen 6 oder 7 verschiedene Zytostatika getestet werden, so ist, bei oft geringer Anzahl von vitalen Tumorzellen im Verhältnis zum Volumen des Tumorgewebes, eine große Gewebeprobe erforderlich. Diese kann nur durch ein offenes chirurgisches Verfahren (Leberteilresektion) entnommen werden. Die alleinige Operation zur Gewebegewinnung sollte hieraus jedoch nicht zu folgern sein, da eine Abwägung zwischen Nutzen und Belastung für den Patient gewährleistet bleiben sollte. Zieht man unter diesen Umständen also in Betracht, dass nur von 50% aller Patienten mit malignen Erkrankungen ohne zusätzliche operative Eingriffe Tumorgewebe gewonnen werden kann, so lassen sich nur bei 20-30% aller Patienten verwertbare HTCA-Ergebnisse erwarten. Aus diesem Grund und den bisher vorgelegten viel versprechenden Daten [Link et al., 1996+2003] sollte weiter an einer Optimierung der Methodik und einer Verbesserung der Rate der auswertbaren Ansätze gearbeitet werden.

Ähnlich der regionalen Chemotherapie bei Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms können auch Patienten mit Pankreaskarzinom von regionaler Chemotherapie profitieren. Bisher wurde z.B. über den Truncus coeliacus ein Regime mit Mitoxantrone, 5-FU/Folinsäure und Cisplatin verabreicht [Beger et al., 1999]. Unter diesem Regime konnte das Auftreten von Lebermetastasen deutlich reduziert werden, zusätzlich wurde eine 4-Jahres-Überlebensrate von 54% erreicht. Im Vergleich hierzu lag die 4-Jahres-Überlebensrate in der Gruppe ohne CAI bei 9,5%. Es bleibt als Nachteil, die Aufwendigkeit und Kostspieligkeit dieses Therapieschemas zu erwähnen. Die in den Versuchen mit den Pankreaskarzinom-Zelllinien gewonnenen Ergebnisse zeigen für Irinotecan eine ähnlich gute Hemmung der Koloniebildungsrate wie bei den Kolonkarzinom-Zelllinien. Dies legt den Schluss nahe, dass Irinotecan in Zukunft auch eine Erfolg versprechende Rolle in der Therapie des Pankreaskarzinoms spielen kann.

Dennoch zeigten sich bei den Zellzyklus-Untersuchungen klare Unterschiede zwischen Kolon- und Pankreaskarzinom-Zellen. Irinotecan hemmt die DNA-Synthese in der S-Phase durch Hemmung der Topoisomerase I [Mathijssen et al., 2001]. Die Wirkung, die Irinotecan auf Kolonkarzinom-Zelllinien und Pankreaskarzinom-Zelllinien entfaltet, wurde bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für einen Zeitraum von 30 min ermittelt. In allen Kolonkarzinom-Zelllinien wurde durch Irinotecan die Zellzahl in der  $G_0/G_1$ -Phase reduziert und in der S-Phase erhöht. Im Gegensatz hierzu verursachte Irinotecan bei allen getesteten Pankreaskarzinom-Zelllinien eine Zunahme der Zellzahl in der  $G_0/G_1$ -Phase und einen Abfall der Zellzahl in der S- und  $G_2$ -

Phase. In wie weit das unterschiedliche Verhalten der Kolonkarzinom-Zelllinien und der Pankreaskarzinom-Zelllinien in der FACS-Analyse durch andere Irinotecan-Metabolite oder durch mögliche andere Angriffspunkte im ablaufenden Zellzyklus bedingt ist, bleibt jedoch durch nachfolgende Studien zu klären.

In systemischen Therapieregimen wird der Topoisomerase-I-Hemmer Irinotecan mit Infusionszeiten zwischen 30 min und 90 min und Dosierungen von 80-100 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche wöchentlich verabreicht [Vanhoefer et al., 2001]. Außerdem wird Irinotecan momentan in Europa im Rahmen eines Second-Line-Therapieregimes als Einzelsubstanz wie folgt verabreicht: 350 mg/m<sup>2</sup> in 30 min i.v. alle 3 Wochen [Rougier et al., 1996]. Legt man dieses Regime den theoretischen Berechnungen zu Grunde und nimmt man einen Blutfluss von 250 ml/min in der Leberarterie sowie eine Körperoberfläche von 1,95 m<sup>2</sup> an, so ist im Rahmen einer HAI-Chemotherapie mit Irinotecan eine theoretische Konzentration von 91 µg/ml in der Leber erreichbar. Unter den gegebenen Bedingungen lagen die IC<sub>50</sub>-Werte von 5 der 11 ausgewerteten Leberfiliae-Versuchsansätze unter der theoretisch erreichbaren intrahepatischen Konzentration, entsprechend einem Prozentsatz von 45%. Bei systemischer Therapie mit Irinotecan als Einzelsubstanz wurden unabhängig von vorausgegangener anderweitiger Zytostatikatherapie oder von 5-FU-Resistenz Ansprechraten zwischen 10% und 35% erreicht [Rougier et al., 1997; Rothenberg et al., 1999]. Vergleicht man beide Ergebnisse, so könnte die Ansprechrate von Irinotecan, verabreicht über die Arteria hepatica, über der bei systemischer Verabreichung liegen. Dies unterstreicht die potentielle Wirksamkeit von Irinotecan im Rahmen eines HAI-Therapieregimes. Interessanterweise wies ein Patient, der nicht mit einem anderen Zytostatikum vorbehandelt war, einen sehr hohen IC<sub>50</sub>-Wert von 1000 µg/ml auf. Ob es in nachfolgenden Studien zur Erfassung ähnlicher Befundkonstellationen kommt und ob eine Ursache hierfür gefunden werden kann, bleibt abzuwarten.

Obwohl die pharmakokinetische Studie und Phase I-Studie mit Irinotecan zur Chemotherapie via Arteria hepatica keine niedrigeren systemischen SN-38-Konzentrationen ergaben und nicht weniger Nebenwirkungen im Vergleich zur systemischen Verabreichung beobachtet wurden, resultierte aus der HAI eine höhere metabolische Rate von Irinotecan in der Leber [van Riel et al., 2002]. Zieht man zudem in Betracht, dass Abigeres und Kollegen [Abigeres et al., 1995] die Dosierung von 350 mg/m<sup>2</sup> unter intensiver Behandlung der bisher dosislimitierenden Diarrhoe mit Loperamid auf 600 mg/m<sup>2</sup> erhöhen konnten, bis die Neutropenie dosislimitierend wurde, und legt man dies erneut den theoretischen Berechnungen für eine HAI von 30 min zugrunde, so erhält man eine theoretisch erreichbare Konzentration von 156 µg/ml. Unter diesen

Bedingungen würden 7 von 11 der getesteten Tumorgewebeproben  $IC_{50}$ -Werte unter  $156 \mu\text{g/ml}$  zeigen, somit einer Ansprechrate von 64% unter Monotherapie. Auch wenn die zuletzt berechneten Konzentrationen wohl aufgrund dosislimitierender Faktoren wie Diarrhoe, Neutropenie und Myelosuppression in der Praxis nicht erreichbar sein werden, so untermauern diese Ergebnisse doch die potentielle Wirksamkeit von Irinotecan in der HAI-Chemotherapie.

Angesichts der pharmakokinetischen und der Phase-I-Daten sowie der hier aktuell gewonnenen Ergebnisse lässt sich folgern, dass Irinotecan für Phase II-Studien von HAI-Therapieregimen sehr attraktiv erscheint, und dass ein ausgewähltes Patientengut mit kolorektalen Lebermetastasen von HAI-Therapieprotokollen mit Irinotecan sowie individueller Chemotherapie zukünftig profitieren könnte.

## Zusammenfassung

---

Die Leber ist der Hauptabsiedlungsort von Metastasen des kolorektalen Karzinoms. Die Hälfte aller Patienten mit kolorektalem Karzinom können im Verlauf Lebermetastasen entwickeln. Vor dem Hintergrund, dass zum Zeitpunkt der Diagnose von Lebermetastasen eines kolorektalen Karzinoms die R<sub>0</sub>-Resektion nur in 10% der Fälle möglich ist und dass der Profit von einer sekundären Leberresektion nach neoadjuvanter Chemotherapie in gleichem Maße vorhanden ist, sollten weitere Therapiemöglichkeiten, die ein Downsizing der Metastasen und somit eine eventuelle R<sub>0</sub>-Resektion möglich machen, abgeklärt werden. Aus diesem Grund sollten Substanzen, die bereits erfolgreich in die systemische Chemotherapie des kolorektalen Karzinoms eingeführt wurden, auf die Tauglichkeit in einem Hepatic-Artery-Infusion(HAI)-Chemotherapieregime geprüft werden. Daher wurde der antiproliferative Effekt von Irinotecan, das sowohl allein, als auch im Rahmen von Kombinationstherapie-Regimen mit 5-Fluorouracil (5-FU) bereits eine überzeugende Wirksamkeit unter Beweis gestellt hat, auf HT29 und NMG 64/84 Kolonkarzinom- und COLO-357, MIA PaCa-2 und PANC-1 Pankreaskarzinom-Zelllinien sowie auf Tumorgewebe von Patienten mit primärem Kolonkarzinom (n=2) und Lebermetastasen (n=11) *in vitro* untersucht. Zusätzlich wurde die Kombination mit 5-FU ausgetestet. Hierzu fanden der MTT((3-(4,5-Methylthiazol-2-yl))-2,5-Diaphenyl-Tertrazolium Bromid)-Wachstumsassay und der Human Tumor Colonyforming Assay (HTCA) Verwendung. Unter Inkubationszeiten von 30 min, 90 min, 120 min und 24 h sowie ansteigenden Konzentrationen von 0,1, 1, 10, 100 und 1000 µg/ml zeigte Irinotecan sowohl bei den Kolonkarzinom- als auch bei den Pankreaskarzinom-Zelllinien eine deutliche Dosis-Wirkungsbeziehung sowie eine ebenfalls deutliche Zeit-Wirkungsbeziehung. Die Testung von Irinotecan gefolgt von 5-FU ergab keine synergistische Wirkung. Die Konzentrationswerte, die zu einer Hemmung der Koloniebildungsrate um 50% führten, waren bei allen Zelllinien für die Inkubationszeit mit Irinotecan von 30 min am niedrigsten. Sie lagen für HT29, NMG64/84, COLO-357, MIA PaCa-2 und PANC-1 im HTCA bei 200, 160, 100, 400 und 150 µg/ml. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Lebermetastasen-Gewebeproben sowie die Gewebeproben der primären kolorektalen Karzinome für 30 min mit aufsteigenden Konzentrationen von Irinotecan inkubiert. Alle untersuchten Gewebeproben zeigten hierunter eine deutli-

che Dosis-Wirkungsbeziehung. Die  $IC_{50}$  (Inhibiting Concentration: Konzentration, die Hemmung um 50% hervorruft)-Werte für Irinotecan lagen bei 5 der 11 getesteten Lebermetastasen unter  $91 \mu\text{g/ml}$ , der Konzentration, die theoretisch im Rahmen einer HAI-Chemotherapie erreichbar wäre, entsprechend einem Prozentsatz von 45%. Im Vergleich zu einer Ansprechrate von 35% bei systemischer Monotherapie mit Irinotecan könnte also eine höhere Ansprechrate erreicht werden. Angesichts der hier aktuell gewonnenen Ergebnisse lässt sich also folgern, dass Irinotecan für Phase II-Studien von HAI-Therapieregimen sehr attraktiv erscheint, und dass ein ausgewähltes Patientengut mit kolorektalen Lebermetastasen von HAI-Therapieprotokollen mit Irinotecan sowie individueller Chemotherapie in der Zukunft profitieren könnte.

# Literaturverzeichnis

---

- [1] Abigeres D; Armand JP; Chabot GG; Da Costa L; Fadel E; Cote C; Herait P; Gandia D: *Irinotecan (CPT-11) high dose escalation using intensive high-dose loperamide to control diarrhea. J Natl Cancer Inst 86: 446-449, 1994*
- [2] Beger HG; Gansauge F; Buchler MW and Link KH: *Intraarterial adjuvant chemotherapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer: significant reduction in occurrence of liver metastases. World J Surg 23: 946-949, 1999*
- [3] Benson AB 3<sup>rd</sup>: *Regional and systemic therapies for advanced colorectal carcinoma: randomised clinical trial results. Oncology (Huntingt.) 12: 28-34, 1998*
- [4] Bismuth H and Adam R: *Reduction of nonresectable liver metastasis from colorectal cancer after oxaliplatin chemotherapy. Semin Oncol 25: 40-46, 1998*
- [5] Borner MM: *Neoadjuvant chemotherapy for unresectable liver metastases of colorectal cancer - too good to be true? Ann Oncol 10: 623-626, 1999*
- [6] Cohen AD and Kemeny NE: *An update on hepatic arterial infusion chemotherapy for colorectal cancer. Oncologist 8: 553-566, 2003*
- [7] Douillard JY; Cunningham D; Roth AD; Navarro M; James RD; Karasek P; Jandik P; Iveson T; Carmichael J; Alkal 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 355: 1041-1047, 2000*
- [8] Fiorentini G; Rossi S; Dentico P; Bernardeschi P; Calcinai A; Bonechi F; Cantore M; Guadagni S and De Simone M: *Irinotecan hepatic arterial infusion chemotherapy for hepatic metastases from colorectal cancer: a phase II clinical study. Tumori 89: 382-384, 2003*
- [9] Garcia-Carbonero R and Supko JG: *Current perspectives on the clinical experience, pharmacology and continued development of the camptothecins. Clin Cancer Res 8: 641-661, 2002*



- [10] Giachetti S; Itzhaki M; Gruia G; Adam R; Zidani R; Kunstlinger F; Brienza S; Alafaci E; Bertheault-Cvitkovic F; Jasmin C; Reynes M; Bismuth H; Misset JL and Levi F: *Longterm survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leukovorin, oxaliplatin and surgery. Ann Oncol 10: 663-669, 1999*
- [11] Guichard S; Terret C; Hennebelle I; Lochon I; Chevreau P; Fretigny E; Selves J; Chatelut E; Bugat R and Canal P: *CPT-11 converting carboxylesterase and topoisomerase I activities in tumour and normal colon and liver tissues. Br J Cancer 80: 364-370, 1999*
- [12] Guthoff I; Lotspeich E; Fester C; Wallin I; Schatz M; Ehrsson H and Kornmann M: *Hepatic artery infusion using oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil, folinic acid and mitomycin C: oxaliplatin pharmacokinetics and feasibility. Anticancer Res 23: 5203-5208, 2003*
- [13] Hamburger AW and Salmon SE: *Primary bioassay of human tumor stem cells, Science 197: 461-463, 1977*
- [14] Jemal A, PhD, DVM; Murray T; Samuels A, MPH; Ghafoor A, MPH; Ward E, PhD; Thun MJ, MD, MS: *Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin 53: 5-26, 2003*
- [15] Jonsson E; Dhar S; Jonsson B; Nygren P; Graf W; Larsson R: *Differential activity of topotecan, irinotecan and SN-38 in fresh human tumour cells but not in cell lines. Eur J Cancer 36: 2120-2127, 2000*
- [16] Kawato Y; Aonuma M; Hirota Y; Kuga H; Sato K: *Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivate cpt-11, in the antitumor effect of cpt-11. Cancer Res 51: 4187-4191, 1991*
- [17] Kemeny M: *Hepatic artery infusion of Chemotherapy as a treatment for hepatic metastases from colorectal cancer. Cancer J 8: 82-88, 2002*
- [18] Kornmann M; Butzer U; Blatter J; Begler HG; Link KH: *Pre-clinical evaluation of the activity of gemcitabine as a basis for regional chemotherapy of pancreatic and colorectal cancer. Eur J Surg Oncol, 26: 583-587, 2000a*
- [19] Kornmann M; Fakler H; Butzer U; Begler HG and Link KH: *Oxaliplatin Exerts Potent in vitro Cytotoxicity in Colorectal and Pancreatic Cancer Cell Lines and Liver Metastases. Anticancer Res 20: 3259-3264, 2000b*

- [20] Kornmann M; Link KH: *Conversion of locally inoperable primary rectal cancer with multiple liver metastases to an option for cure after local down-staging and hepatic arterial infusion chemotherapy. Langenbecks Arch Surg 387: 90-93, 2002*
- [21] Kornmann M; Beger HG; Link KH: *Chemosensitivity Testing and Test-Directed Chemotherapy in Human Pancreatic Cancer. Recent Results Cancer Res, 161: 180-195, 2003*
- [22] Link KH; Kornmann M; Leder G; Butzer U; Pillasch J; Staib L; Gansauge F and Beger HG: *Regional Chemotherapy directed by individual Chemosensitivity Testing in vitro: A prospective decision-aiding trail. Clin Cancer Res 2: 1469-1474, 1996*
- [23] Link KH; Leder G; Pillasch J; Butzer U; Staib L; Kornmann M; Bruckner U and Beger HG: *In vitro concentrations response studies and in vitro phase II tests as the experimental basis for regional chemotherapeutic protocols. Semin Surg Oncol 14: 189-201, 1998*
- [24] Link KH; Kornmann M; Formentini A; Leder G; Sunelaitis E; Schatz M; Pressmar J and Beger HG: *Regional chemotherapy of nonresectable liver metastases from colorectal cancer - literature and institutional review. Langenbecks Arch Surg 384: 344-353, 1999a*
- [25] Link KH; Kornmann M; Leder G; Pillasch J; Sunelaitis E; Schatz M; Pressmar J; Beger HG: *Basic research supported developments of chemotherapy in nonresectable isolated colorectal liver metastases to a protocol of hepatic artery infusion using mitoxantrone, 5-FU + folinic acid and mitomycin C. Gan To Kagaku Ryoho 26: 269-281, 1999b*
- [26] Link KH; Pillasch J; Formentini A; Sunelaitis E; Leder G; Safi F Kornmann M and Beger HG: *Regional chemotherapy in nonresectable isolated colorectal liver metastases (CRLM). Developments to a protocol with high remission and survival rates, and with the potential to induce secondary resectability after downstaging. Eur J Surg Oncol 25: 381-388, 1999*
- [27] Link KH; Kornmann M; Butzer U; Leder G; Sunelaitis E; Pillasch J; Salonga D; Danenberg KD; Danenberg PV and Beger HG: *Thymidylate synthase quantitation and in vitro chemosensitivity testing predicts responses and survival of patients with isolated nonresectable liver tumors receiving hepatic arterial infusion chemotherapy. Cancer 89: 288-296, 2000*

- [28] Link KH; Sunelaitis E; Kornmann M; Schatz M; Gansauge F; Leder G; Formentini A; Staib L; Pillasch J and Beger HG: *Regional chemotherapy of nonresectable colorectal liver metastases with mitoxantrone, 5-FU, folinic acid and mitomycin C may prolong survival. Cancer, 92: 2746-2753, 2001*
- [29] Mathijssen RH; van Alpen RJ; Verweij J; Loos WJ; Nooter K; Stoter G und Sparreboom A: *Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). Clin Cancer Res 7: 2182-2194, 2001*
- [30] Nordlinger B; Guiguet M; Vaillant JC; Balladur P; Boudjema K; Bachellier P and Jaeck D: *Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver. A prognostic scoring system to improve case selection, based on 1568 patients. Association Francaise de Chirurgie. Cancer, 77: 1254-1262, 1996*
- [31] Penna C and Nordlinger B: *Colorectal metasatasis (liver and lung). Surg Clin North Am 82: 1075-1090, 2002*
- [32] Rothenberg ML; Cox JV; DeVore RF; Hainsworth JD; Pazdur R; Rivkin SE; Macdonald JS; Geyer CE jr; Sandbach J; Wolf DL; Mohrland JS; Elfring GL; Miller LL and von Hoff: *A multicentre, phase II trial of weekly irinotecan (CPT-11) in patients with previously treated colorectal carcinoma. Cancer (Phila.) 85: 786-795, 1999*
- [33] Rougier P; Bugat R; Douillard JY; Culine S; Suc E; Brunet P; Becouarn Y; Yehou M; Marty M; Extra JM; Bonnetterre J; Adenis A; Seitz JF; Ganem G; Namer M; Conroy T; Negrier S; Merrouche Y; Burki F; Moussaieu M; Herait P and Mahjoubi M: *Phase II study of irinotecan in the treatment of advanced colorectal cancer in chemotherapy-naive patients and patients pretreated with fluorouracil-based chemotherapy. J Clin Oncol 15: 251-260, 1997*
- [34] Sachs L: *Angewandte Statistik (6. Auflage) Springer, Heidelberg: S. 230-238, 288-290 und 309-312, 1986*
- [35] Saltz LB; Cox JV; Blanke C; Rosen LS; Fehrenbacher L; Moore MJ; Maroun JA; Ackland SP; Locker PK; Pirodda N; Elfring GL and Miller LL: *Irinotecan plus fluorouracil and leukovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. N Engl J Med 343: 905-914, 2000*

- [36] Vanhoefer U; Harstrick A; Achterrath W; Cao S; Seeber S and Rustum YM: *Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. J Clin Oncol 19: 1501-1518, 2001*
- [37] Van Riel JM; van Groeningen CJ; Kedde MA; Gall H; Leisink JM; Gruia G; Pinedo HM; van der Vijgh WJ and Giaccone G: *Continuous administration of irinotecan by hepatic arterial infusion: a phase I and pharmacokinetic study. Clin Cancer Res 8: 405-412, 2002*
- [38] Von Hoff DD: *He's not going to talk about in vitro predictive assays again, is he? Natl Cancer Inst 82: 96-101, 1990*
- [39] Wall ME; Wani MC; Cook CE; Palmer KH; McPhail AT and Sim GA: *Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecine, a novel alkaloid leukemia and tumor inhibitor from Camptotheca acuminata. J Am Chem Soc 88: 3888-3890, 1966*

# Danksagungen

---

8

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen herzlichst bedanken, die zur Durchführung dieser Dissertation beigetragen haben.

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. med. D. Henne-Bruns danken, dass ich meine Dissertation in der Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universität Ulm erstellen durfte.

Herrn PD Dr. med. M. Kornmann gilt mein Dank für die außerordentlich gute Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit. In ihm hatte ich jederzeit einen Ansprechpartner für alle Fragen und Probleme.

Des Weiteren möchte ich Frau Iris Schneider besonders danken. Sie vermittelte mir ausgezeichnete Kenntnisse auf dem Gebiet der Tumorzellbiologie und stand mir geduldig bei methodischen Fragen zum Human Tumor Colonyforming Assay und MTT zur Seite. Bei den FACS-Analysen unterstützte sie mich ebenfalls außerordentlich.

# Tabellarischer Lebenslauf

---

# 9

## PERSÖNLICHE DATEN:

---

Name: Carmen Anja Wörz  
Geburtsname: Hofmann  
Geburtsdatum: 06. Juli 1977  
Geburtsort: Ellwangen an der Jagst  
Nationalität: deutsch

## SCHULBILDUNG:

---

1984 - 1988 Friedensschule, *Aalen-Unterkochen*  
1988 - 1997 Schubart-Gymnasium, *Aalen*  
1997 Abitur

## STUDIUM:

---

09/1997 Beginn des Studiums der Medizin, *Universität Ulm*  
08/1999 Ärztliche Vorprüfung, *Universität Ulm*  
08/2000 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, *Universität Ulm*  
04/2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, *Universität Ulm*  
04/2003 - 03/2004 Praktisches Jahr, *Klinikum Heidenheim; Wahlfach: Radiologie*  
04/2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, *Klinikum Heidenheim*  
06/2004 - 09/2004 Ärztin im Praktikum, *Virngrundklinik Ellwangen, Innere Abt.*

## BERUFLICHE TÄTIGKEIT:

---

seit 10/2004 Assistenzärztin, *Virngrundklinik Ellwangen, Innere Abteilung*