

Phospholipide inhibieren Tumorzellinvasivität in vitro

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Marcin Suchocki

aus Goldap, Polen

Berichter: Herr Professor
Dr. med. Marc Jansen

Herr Universitätsprofessor
Dr. rer. nat. Edgar Dahl

Tag der mündlichen Prüfung: 1. September 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	1
1	Einführung	5
1.1	Kolorektales Karzinom	5
1.1.1	Epidemiologie.....	5
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren	6
1.1.3	Pathologie	8
1.1.3.1	Makroskopie.....	8
1.1.3.2	Mikroskopische Klassifikation.....	9
1.1.3.3	Anatomische Abgrenzung des Kolons vom Rektum	12
1.1.4	Therapie.....	12
1.1.4.1	Kolonkarzinom	13
1.1.4.2	Rektumkarzinom	14
1.1.5	Prognose.....	16
1.2	Peritonealkarzinose	17
1.2.1	Pathophysiologie.....	17
1.2.2	Klinik	21
1.2.3	Diagnostik	21
1.2.4	Prognose.....	21
1.2.5	Therapie.....	23
1.2.5.1	Chirurgische Therapie.....	23
1.2.5.2	Intraperitoneale Chemotherapie (IPC).....	24
1.2.6	Prävention	28
1.2.6.1	Inhibition Chirurgieassozierten Tumorzelldissemination und Wachstums	28
1.2.6.2	Inhibition der intraperitonealen Tumorzelladhäsion.....	29
1.3	Phospholipide	29
1.3.1	Physiologie.....	29
1.3.2	Adhäsionsprophylaxe	30
2	Zielsetzung.....	31
3	Material und Methodik.....	32
3.1	Material.....	32
3.1.1	Chemikalien	32

I Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Biochemikalien	32
3.1.3	Zellen	33
3.1.4	Nährmedien und Gebrauchslösungen	33
3.1.5	Sonstiges	34
3.1.5.1	Phospholipidemulsion	34
3.1.5.2	BD Matrigel Basement Membrane Matrix.....	34
3.1.5.3	Nuclepore Polycarbonate Filter	34
3.1.5.4	<i>Cell Tracker</i>	34
3.2	Methodik	36
3.2.1	Zellkultivierung	36
3.2.1.1	Auftauen der Tumorzellen.....	36
3.2.1.2	Tumorzellexpansion	36
3.2.1.3	Passagieren der Tumorzellen	36
3.2.1.4	Isolation von humanen <i>Omentum Majus Cells</i> (HOMC).....	37
3.2.1.5	Zellkultivierung und Passagieren von HOMC	37
3.2.1.6	Zellzahlbestimmung	37
3.2.2	Versuche	37
3.2.2.1	Boydenkammer und modifiziertes Boydenkammer System	38
3.2.2.2	Migration durch Filter ohne Matrigel-Beschichtung	38
3.2.2.3	Invasionsassay mit Matrigelbeschichtung	39
3.2.2.4	Filter im Querschnitt	40
3.2.2.5	Invasionsassay durch HOMC-Monolayerschicht.....	40
3.2.3	Auswertung	41
3.2.3.1	Färbung der migrierten Zellen	41
3.2.3.2	Zellzählung	41
3.2.3.3	Statistik.....	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Tumorzellmigration durch Filter.....	42
4.2	Tumorzellinvasionsassay durch Matrigelbeschichtete Filter	43
4.3	Tumorzellinvasionsassay durch HOMC-Monolayerschicht.....	46
5	Diskussion	48
6	Zusammenfassung	54
II	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	56
III	Abkürzungsverzeichnis.....	57

I Inhaltsverzeichnis

IV	Literaturverzeichnis.....	59
V	Danksagung	72
VI	Erklärung zur Datenaufbewahrung.....	73
VII	Lebenslauf	74

1 Einführung

Die sekundäre Peritonealkarzinose (PK) ist ein allgemeines Zeichen für fortgeschrittenes Tumorstadium, Krankheitsverschlechterung oder Wiederauftreten einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten gastrointestinaler und gynäkologischer Herkunft.

Bei annähernd einem von vier Patienten mit einem kolorektalen Karzinom werden freie Tumorzellen in der Peritonealflüssigkeit vor der Resektion des Tumors gefunden und in einem von fünf Patienten entwickelt sich eine *peritoneal minimal residual disease* nach dem kurativen Eingriff. Bei etwa einem von sieben Patienten mit einem kolorektalen Karzinom kommt es zur Entwicklung von Peritonealkarzinose, welche mit einer infausten Prognose einhergeht (Sadeghi, Arvieux et al. 2000; Guller, Zajac et al. 2002; Jayne, Fook et al. 2002; Shen, Hawksworth et al. 2004; Koppe, Boerman et al. 2006; Lloyd, McIver et al. 2006; Hara, Nakanishi et al. 2007).

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Karzinome des Kolons und des Rektums zählen in Europa zu den häufigsten Krebserkrankungen mit ca. 412900 neuerkrankten Menschen jährlich. Weltweit beträgt die Inzidenz 945000 Fälle. Diese Krebsform ist sowohl für Frauen, wie auch für Männer das zweithäufigste Karzinom, bei einem mittleren Erkrankungsalter von 75 Jahren für Frauen und 69 Jahren für Männer. Es versterben an den Folgen des kolorektalen Karzinoms jährlich 207400 Patienten in Europa und 492000 weltweit (Weitz, Koch et al. 2005; Ferlay, Autier et al. 2007).

Länder mit der höchsten Inzidenz für das kolorektale Karzinom sind Nordamerika, Australien/Neuseeland, Westeuropa und Japan, wobei Japan für Männer weltweit die höchste Rate aufweist. Die niedrigste findet man für Süd- und Zentralasien und Mittelfrika (Parkin, Bray et al. 2005). Einwanderungsstudien zeigen, dass die Inzidenz des KKR bei Immigranten und deren Nachkommen nach dem Umsiedeln der Population von *low-risk* in *high-risk* Regionen rasch ansteigt (Kolonel, Hinds et al. 1980; McMichael, McCall et al. 1980). In den USA geborene Japaner weisen z.B. eine doppelt so hohe Inzidenz als heimgeborne Japaner auf und etwa 60% höhere als die in den USA geborenen Weißen. Japanischen Frauen haben im Vergleich zu den beiden korrespondierenden Gruppen etwa 40% höhere Neuerkrankungsraten (Flood, Weiss et al. 2000). Dies legt sowohl einen genetischen Einfluss, wie auch Umweltfaktoren für die Entstehung des KKR nahe.

Ein Geschlechterunterschied für die Inzidenz des Kolonkarzinoms (Kolon-Ca) besteht nahezu nicht. In den Vereinigten Staaten z.B. wurden 2005 73470 neue Fälle für Frauen und 71820 für Männer geschätzt. In Europa verhält es sich vergleichbar. Das Lebenszeitrisiko am

kolorektalen Karzinom zu sterben beträgt für Frauen 1,2% und 1,98% für Männer. Insgesamt macht es etwa 12,2% aller Krebssterbefälle aus (Boyle and Ferlay 2005; Jemal, Murray et al. 2005; Ferlay, Autier et al. 2007). Die Mortalität des KRK ist in den letzten Dekaden rückläufig. Allein in der Zeitspanne von 1996 - 2005 wurde in den USA ein Rückgang von 19,6% (ohne Geschlechts- und Rassenunterscheidung) verzeichnet (Ries LAG 2007). Die Lebenserwartung verbesserte sich in Deutschland von den 70er-Jahren bis in die Mitte der 80er-Jahre ebenfalls deutlich. Dies ist, neben der zeitigeren Diagnosestellung bei Erkrankten auch auf verbesserte Therapieverfahren zurückzuführen. Die 5-Jahres-Überlebensraten (5-JÜR) für das Rektumkarzinom z.B. haben sich von 45% für Männer und 47% für Frauen in den 80ern auf 52% bzw. 55% im Jahre 2004 verbessert und liegen für das KRK sowohl bei Männern wie auch für Frauen inzwischen bei 60% (RKI und GEKiD 2004, 2008).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Ursächlich für die Ausbildung des kolorektalen Karzinoms sind neben endogenen (genetische Veränderungen), exogene (Umwelteinflüsse, Lebensstil) Faktoren (Thomas and Karagas 1987; Kinzler and Vogelstein 1996). Die pathogenetische Grundlage für die Entstehung des KRK stellt die sog. „intraepitheliale Neoplasie“ dar, die als eindeutige Neoplasie ohne Vorliegen eines invasiven Wachstums definiert und histologisch durch zelluläre Atypie, abweichende Differenzierung und gestörte epitheliale Architektur charakterisiert ist (Klimpfinger, Hauser et al. 1992). Die Ansammlung der morphologischen und genetischen Veränderungen in den Stammzellen der Dickdarmkrypten, führen in einem kontinuierlichen Übergang vom normalen Epithel zu Schleimhauthyperplasie, zur Entwicklung von Adenomen und über zunehmende Neoplasieschweregrade in einem Adenom bis hin zum infiltrativen Karzinom (Jass 1989). Dieser Sequenz liegen detaillierte molekulargenetische und –biologische Veränderungen und kaskadenförmige Abläufe zugrunde, die den Weg vom Adenom zum invasiven und metastasierenden Karzinom bestimmen. Hierzu zählen chromosomale Deletionen (z.B. DCC, Peutz-Jeghers Gen), Mutationen (z.B. APC, p53, K-ras) und Hypermethylierungen durch Abschalten von Tumorsuppressorgenen (z.B. Mismatch-Repair-Genen) (Fearon and Vogelstein 1990; Young and Wilson 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse haben Fearon und Vogelstein das Modell der sogenannten „Adenom-Karzinom Sequenz“ aufgestellt, welches die genetische Basis des kolorektalen Karzinoms als einen mehrstufigen Prozess erklärt. Wie in Abbildung 1 zu erkennen ist, können den unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumorgenese zumindest grob einzelne genetische Veränderungen zugeordnet werden. Dabei ist die abgebildete Reihenfolge weniger wichtig als die Akkumulation der einzelnen Ereignisse.

Adenome stellen ca. 90% der präkanzerösen Läsionen des kolorektalen Karzinoms dar. Das Entartungsrisiko steigt direkt mit der Adenomgröße und ist abhängig vom histologischen Typ, wobei das Risiko beim tubulären am geringsten und beim villösen Adenom am größten ist. Tubuläre Polypen mit einem Durchmesser von < 1cm haben ein Risiko vom 1%. Entsprechend große villöse Adenome bereits 10%. Über 2cm große tubuläre Adenome

zeigen eine Entartungsfrequenz von 35% und villöse von über 50%. Aus diesem Grund sollten alle polypoiden kolorektalen Adenome abgetragen werden (Link, Hauser et al. 2008).

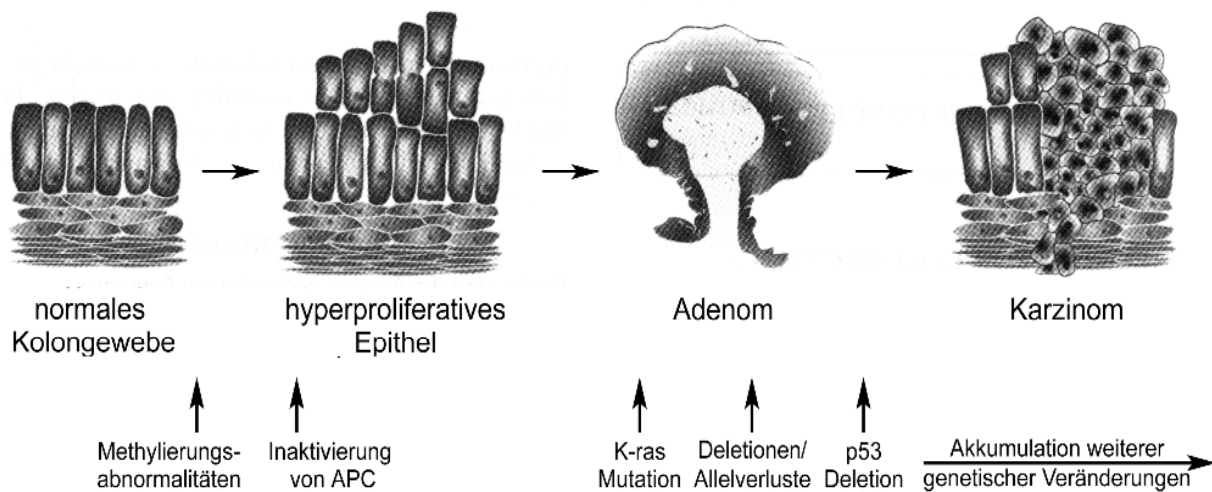


Abbildung 1: Karzinogenese KRK (nach Fearon und Vogelstein 1990, aktualisiert von Toribara 1995)

Neben der oben beschriebenen, als sporadisch zu bezeichnenden und über 90% ausmachenden kolorektalen Karzinomen, gibt es hereditäre Syndrome, die mit der Entstehung von kolorektalen Karzinomen vergesellschaftet sind. Darunter die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und die *hereditary non-polyposis colorectal cancer* (HNPCC), die in ihrer Summe für ca. 6% der KRK verantwortlich gemacht werden. Sie werden ausschließlich autosomal-dominant vererbt (Burt, Bishop et al. 1990; Bishop and Hall 1994; Lynch, Smyrk et al. 1996). Bei der FAP ist die Mutation des Suppressorgen APC für die Entstehung von kolorektalen Karzinomen verantwortlich (Herrera, Kakati et al. 1986).

Dies führt bei der FAP zu mehr als 100 Polypen im Kolorektum. Je höher die Polypendichte, umso früher manifestiert sich die Erkrankung. Das HNPCC-Syndrom ist durch ein erhöhtes Entstehungsrisiko eines kolorektalen Karzinom ohne erhöhte Anzahl von Kolonpolypen definiert (Lynch, Shaw et al. 1966; Lynch, Smyrk et al. 1993). Molekulargenetisch findet hier eine Mutation von Mismatch-Repair-Genen statt, durch die sie fehlerhafte DNA nicht mehr reparieren können. Hierbei spricht man von Mikrosatelliteninstabilität (Cruz-Correa and Giardiello 2002; Wright and Stewart 2003). Die Diagnose erfolgt durch eine molekulargenetische Absicherung, sowie Familienanamnese nach den Amsterdam- und/oder Bethesda-Kriterien (Vasen, Mecklin et al. 1991; Umar, Boland et al. 2004).

Entzündliche Darmerkrankungen, wie z.B. *Morbus Crohn*, zeigen im Allgemeinen ein sehr geringes Entartungsrisiko. Anders verhält es sich für die Karzinomentwicklung bei Patienten mit *Colitis ulcerosa*. Auf der Basis von chronischer Entzündung und hyperproliferativem Epithel, über den Weg der intraepithelialen Neoplasie mit entsprechender Stammzellaktivierung kommt es zur Ausbildung von kolorektalen Karzinomen, wobei der Erkrankungszeitpunkt im Vergleich zur Normalbevölkerung 10-20 Jahre früher liegt. Das

Karzinomrisiko bei einer Pankolitis beträgt nach 10 Jahren 2,1% und nach 30 Jahren 17,8% (Ekblom, Helmick et al. 1990).

Neben dem Alter, der familiären Belastung, den hereditären und inflammatorischen Darmerkrankungen, den adenomatösen Polypen und kolorektalen Karzinom in der Anamnese haben auch Bewegungsmangel, fettreiche und ballaststoffarme Kost und exzessiver Alkoholkonsum einen begünstigen Effekt auf die Karzinomentstehung (Prentice and Sheppard 1990; Bingham, Day et al. 2003; Cho, Smith-Warner et al. 2004; Norat, Bingham et al. 2005; Bingham 2006; Marques-Vidal, Ravasco et al. 2006).

1.1.3 Pathologie

1.1.3.1 Makroskopie

Kolorektale Karzinome weisen unterschiedliche makroskopische Wachstumsformen auf. Man findet polypoid, plattenartige, ulzerierte und diffus infiltrierende Tumoren (s. Abbildung 2). Außerdem lassen sich makroskopisch insuläre von zirkulären Karzinomtypen unterscheiden. Die makroskopische Wuchsform ist wichtig für die Entnahme des Biopsiematerials und erlaubt eine grobe Vorbeurteilung des Tumors insofern, als dass die polypoiden Tumorformen später und seltener metastasieren als die nicht-polypoiden und die diffus infiltrierenden (Tanaka, Haruma et al. 1995).

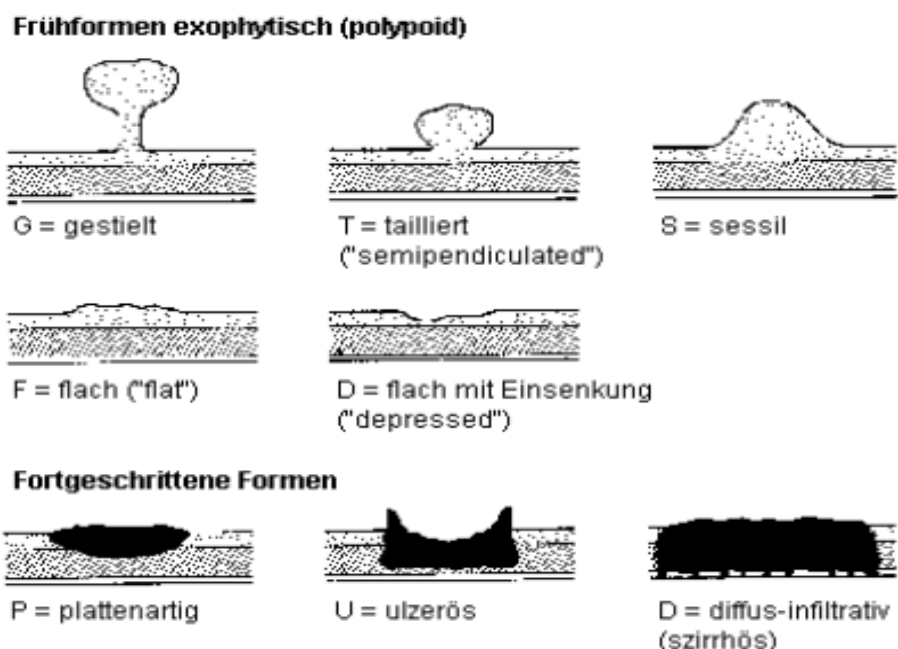


Abbildung 2: Makroskopischer Tumortyp bei frühen und fortgeschrittenen Formen

Karzinome in unteren Rektumbereich lassen sich mit der digital-rektalen Untersuchung tasten. Dabei kann die Größe des Tumors, die exakte Lage, Verschieblichkeit und Ausbreitung bestimmt werden. Hierauf beruht das klinische Staging (KS) nach Mason (s. Tabelle 1), womit man verlässlich die therapeutischen Optionen abschätzen kann (Mason 1976). Als Screeningmethode ist die Untersuchung unumstritten, die Einteilung jedoch für die detaillierte Therapieplanung zu grob und deshalb unbrauchbar (Krones, Stumpf et al. 2009).

Tabelle 1: Klinische Tumorklassifikation nach Mason (1976)

Mason-Klassifikation	
KS I	Tumor mit Mukosa verschieblich
KS II	Tumor mit Darmwand verschieblich
KS III	Verschieblichkeit eingeschränkt, Tumor teilfixiert
KS IV	Tumor fixiert
KS V	disseminierte Erkrankung, Fernmetastasen

1.1.3.2 Mikroskopische Klassifikation

Zur Beschreibung der exakten anatomischen Tumorausbreitung wird die Klassifikation der *Union International Contre le Cancer* (UICC) mit der TNM-Einteilung und Stadiengruppierung empfohlen. Aufgrund der präoperativen, interdisziplinären Diagnostik (Staging) kann ein klinisches (cTNM) TNM-Stadium abgeleitet werden, welches als Rationale für die geplante Therapie dient. Für die Prognose des KRK ist das pathologische (pTNM) TNM-Stadium entscheidend. Besonders im Hinblick auf eine genauere Beurteilung prognostischer Subgruppen, wie auch die bessere Anwendbarkeit auf verschiedene moderne diagnostische, z.B. die Endosonographie und auch therapeutische Verfahren hat die aktuelle Fassung von 2002 der UICC-Klassifikation sich gegenüber der Dukes-Klassifikation durchgesetzt (UICC 2003). Dort finden sich auch die Errungenschaften einer Studie wieder, die auf der ASCO 2003 vorgestellt wurde (Greene, Stewart et al. 2004). Dabei wurden anhand der nationalen Tumor Datenbank der USA 5987 Patienten mit Rektumkarzinomen im UICC-Stadium III ermittelt und in 3 neue Subgruppen unterteilt (IIIA: T1/2, N1; IIIB: T3/4, N1; IIIC: jedes T, N2) und bezüglich des Gesamtüberlebens stratifiziert. Die 5-JÜR der nur chirurgisch bzw. adjuvant radiochemotherapierten Patienten ergaben einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Stadien sowie eine hohe Signifikanz des Benefits einer postoperativen adjuvanten Therapie.

1 Einführung

TNM-Klassifikation: nach UICC, Stand 2002

Primärtumor: (T)

- Tx Primärtumor kann nicht beurteilt werden
- T0 kein Anhalt für Primärtumor
- Tis *Carcinoma in situ*, intraepithelial oder Infiltration der *Lamina propria*
- T1 Tumor infiltriert Submukosa
- T2 Tumor infiltriert *Muscularis propria*
- T3 Tumor infiltriert durch die *Muscularis propria* in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Fettgewebe
- T4 Tumor perforiert das viszerale Peritoneum oder infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen *

* Direkte Ausbreitung in T4 schließt auch die Infiltration anderer Segmente des Kolorektums auf dem Weg über die Serosa ein, z.B. die Infiltration des Sigmas durch ein Zökumkarzinom.

Ein Tumor, der makroskopisch an anderen Organen oder Strukturen adhärent ist, wird als T4 klassifiziert. Ist bei der histologischen Untersuchung in den Adhäsionen kein Tumorgewebe nachweisbar, soll der Tumor als pT3 klassifiziert werden.

Regionäre Lymphknoten: (N)

- Nx regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
- N0 keine regionären Lymphknotenmetastasen
- N1 Metastasen in 1-3 perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten*
- N2 Metastasen in 4 oder mehr perikolischen bzw. perirektalen Lymphknoten*

* Ein mehr als 3 mm großes Tumorknötchen im perirektalen oder perikolischen Bindegewebe ohne histologischen Anhalt für Reste eines Lymphknotens wird als regionäre Lymphknotenmetastase klassifiziert. Ein Tumorknötchen bis 3 mm Größe wird in der T-Kategorie als diskontinuierliche Ausbreitung, d.h. T3 klassifiziert.

Fernmetastasen: (M)

- Mx Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M0 keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen

Residualtumoren: (R)

- Rx Residualtumor kann nicht beurteilt werden
- R0 kein Residualtumor
- R1 mikroskopischer Residualtumor
- R2 makroskopischer Residualtumor

Es müssen bezüglich der Residualtumorklassifikation nicht nur der aborale longitudinale Resektionsrand, sondern v.a. die lateralen chirurgischen Resektionsflächen (= tiefer oder zirkumferentieller Resektionsrand) histologisch untersucht werden.

Die pT-, pN- und pM- Kategorien der pathologischen Klassifikation entsprechen den T-, N- und M-Kategorien. pN0 erfordert die Ektomie und die histologische Untersuchung von 12 oder mehr regionärer Lymphknoten (UICC 2003).

Aus diesen Kriterien ergibt sich folgende Stadiengruppierung der UICC für das kolorektale Karzinom:

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC und korrespondierende Einteilung nach Dukes

Stadium	TNM-Klassifikation	Einteilung nach Dukes
0	Tis, N0, M0	
I	T1/2, N0, M0	Dukes A
IIA	T3, N0, M0	Dukes B
IIB	T4, N0, M0	
IIIA	T1/2, N1, M0	Dukes C
IIIB	T3/4, N1, M0	
IIIC	jedes T, N2, M0	
IV	jedes T, jedes N, M1	Dukes D

Die WHO unterscheidet nach der histologischen Ähnlichkeit des Karzinoms zum Ausgangsgewebe entsprechend der Drüsenformation, den Kernpolymorphismus sowie der Zahl der Mitosen 3 verschiedene Differenzierungsgrade. Dem hohen Differenzierungsgrad der WHO entspricht die Bezeichnung G1 der UICC, dem mitteldifferenzierten G2 und dem niedrig differenzierten G3. Der zusätzlich in der UICC vorgesehene Differenzierungsgrad G4 entspricht dem eigenen histologischen Tumortyp des undifferenzierten Karzinoms der WHO-Nomenklatur. G1- und G2-Tumore werden auch als low-risk-Karzinome, G3- und G4-Tumore als highrisk-Karzinome bezeichnet. Das histopathologische Grading hat praktische

Bedeutung, da nur Karzinome vom niedrigen Malignitätsgrad (also hoch- und mitteldifferenzierte Tumore) für lokale Therapieverfahren (endoskopische Polypektomie oder chirurgische Lokalexzision) geeignet sind (UICC 2003).

Dickdarmkarzinome kommen vor als:

- Adenokarzinom (70%), davon
 - 20% hoch differenziert (G1)
 - 50% mitteldifferenziert (G2)
 - 30% niedrig differenziert (G3)
- verschleimendes Karzinom (20%): Siegelringzellkarzinom (intrazelluläre Schleimablagerung) und Gallertkarzinom (extrazelluläre Schleimablagerung) mit insgesamt schlechter Prognose
- anaplastisches Karzinom: undifferenzierter (G4) Tumor
- Adenoakanthom, Plattenepithelkarzinom (Raritäten)

(Kurzlehrbuch Chirurgie, Volker Schumpelick, Thieme 2006)

1.1.3.3 Anatomische Abgrenzung des Kolons vom Rektum

Nach den aktuellen UICC-/TNM-Kriterien gelten Tumoren als Rektumkarzinome, sobald deren aboraler Rand $\leq 16\text{cm}$ von der Anokutanlinie entfernt liegt. Demnach werden alle Tumoren, die $> 16\text{cm}$ von der Anokutanlinie lokalisiert werden, als Kolonkarzinome definiert und therapiert (Soreide, Norstein et al. 1997; UICC 2003). Trotz der eindeutigen Bezeichnung durch die UICC-Klassifikation wird im klinischen Alltag die Grenze zwischen Kolon und Rektum verwischt mit der Folge einer völlig unterschiedlichen Tumorthherapie. In den USA werden z.B. sämtliche Tumoren, die $> 12\text{cm}$ ab anocutan entfernt sind, als Kolonkarzinome bezeichnet und dementsprechend therapiert (Nelson, Petrelli et al. 2001). Die endoskopische Einteilung durch die Abstandsbestimmung zwischen distalem Tumorrand und *Linea anocutanea* erfolgt am besten mit einem starren Rektoskop und teilt das Rektum in ein oberes - (12-16cm), ein mittleres – (6 -12cm) und ein unteres Drittel ($< 6\text{cm}$). In der klinischen Praxis wird der Abstand von bis zu 12 cm von der *Linea dentata* zur Definition des Rektums bevorzugt.

1.1.4 Therapie

Das Therapieprozedere folgt der Stadieneinteilung nach UICC. Trotz der Tatsache, dass die chirurgische Resektion die entscheidende Rolle in der Therapie des Kolon-, wie auch des Rektumkarzinoms darstellt, unterscheiden sich die Behandlungsstrategien, sowie die Prognose der beiden Tumorentitäten. Beim Kolonkarzinom ist bei standardisierter Therapie die stadienabhängige Heilungsmöglichkeit günstiger als beim Rektumkarzinom.

1.1.4.1 Kolonkarzinom

Über 90% der an einem Kolonkarzinom erkrankten Patienten können chirurgisch behandelt werden, 75% davon mit kurativen Ansatz (R0). Das Operationsausmaß hängt von der Lagebeziehung der Malignome zur individuellen Gefäßversorgung und der Größe des Tumors ab (s. Tabelle 3). Die chirurgische Therapie zielt auf die Resektion des Primärtumors mit dreidimensionalem Sicherheitsabstand von > 10cm, orientierend am Versorgungsgebiet der radikal durchtrennten Gefäße, wie auch auf die Entfernung der blutzuführenden Gefäße und potenziell befallener regionärer Lymphknoten im Abflussgebiet (Link, Sagban et al. 2005). Bei einem Tumor zwischen zwei zentralen Gefäßen werden beide mit entfernt. Die radikale Resektion wird mit *En-bloc*-Lymphknotendissektion angestrebt. Daneben versprechen luminale Darmligaturen nach Turnbull proximal und distal des Tumors zusätzlich eine Chance auf eine kurative R0 Resektion, sowie die *No-touch-isolation-technique*, dessen Anwendungen aber aufgrund widersprüchlicher Aussagen und Ergebnisse diskutabel bleiben (Turnbull, Kyle et al. 1967; Wiggers, Jeekel et al. 1988; Slanetz 1998).

Tabelle 3: Darstellung des lokalisationsabhängigen Resektionsausmaßes

Tumorlokalisierung	Gefäßversorgung	Resektionsausmaß
Zökum	<i>A. ileocolica</i>	Hemikolektomie rechts
<i>Colon ascendens</i>	<i>A. colica dextra</i>	
	<i>A. colica media</i>	
rechte Kolonflexur,	<i>A. ileocolica</i>	Erweiterte Hemikolektomie
rechtes <i>Colon transversum</i>	<i>A. colica dextra</i>	rechts
	<i>A. colica media</i>	
	<i>A. gastroepiploica dextra</i>	
linkes <i>Colon transversum</i> ,	<i>A. colica media</i>	nach rechts erweiterte
linke Kolonflexur	<i>A. colica sinistra</i>	Hemikolektomie links
		(Aszendosigmoidostomie oder Ileosigmoidostomie)
<i>Colon descendens</i>	<i>A. mesenterica inferior</i>	Hemikolektomie links
	(<i>A. colica media</i>)	
<i>Colon sigmoideum</i>	<i>A. mesenterica inferior</i>	Sigmaresektion

Patienten mit multiplen Kolonkarzinomen oder mit FAP oder HNPCC sollten für eine totale Kolektomie bzw. Proktokolektomie in betracht gezogen werden. Bei *Colitis ulcerosa* Karzinompatienten ist ebenfalls die Proktokolektomie indiziert (Nelson, Petrelli et al. 2001).

Prinzipiell besteht auch die Möglichkeit der laparoskopischen Resektion von Kolonkarzinomen. Da in der onkologischen Chirurgie die Radikalität mit guten Langzeitergebnissen oberste Priorität besitzt, treten die Vorzüge der laparoskopischen Chirurgie, wie z.B. geringes Trauma, schnellere Erholung und kürzere Liegezeiten zugunsten einer ausgedehnten Resektion in den Hintergrund. Dieses Verfahren sollte als vielversprechende Alternative zur offenen Resektion im Rahmen weiterer Studien eingesetzt werden (Schiedeck, Schwandner et al. 2000; Lacy, Garcia-Valdecasas et al. 2002). Die bisherigen Ergebnisse zumindest zeigen im Langzeit-Follow-up keine Nachteile der laparoskopischen Kolonkarzinomresektion im Vergleich zur offenen Resektion (Nelson, Sargent et al. 2004; Jayne, Guillou et al. 2007). Die Frage nach der Inzidenz von Trokarmetastasen und der Provokation der Tumorzell dissemination durch die Laparoskopie bleibt kontrovers diskutiert (Targarona, Martinez et al. 1998; Canis, Botchorishvili et al. 2000; Abu-Rustum, Rhee et al. 2004; Zivanovic, Sonoda et al. 2008).

Patienten, bei denen ein kurativer Ansatz nicht möglich ist, werden vor allem palliativen Operationsmethoden unterzogen, wobei nach Möglichkeit eine Tumorexstirpation angestrebt wird oder Umgehungsanastomosen geschaffen werden. Eine Stomaanlage zur Darmentlastung ist die letztmögliche Maßnahme bei lokaler Inoperabilität.

Eine adjuvante Therapie beeinflusst die Heilungsrate des Kolon-Ca positiv. Insbesondere für das UICC Stadium III sind signifikante Steigerungen der 5-JÜR erreicht worden. Die Indikation zur adjuvanten Therapie ist abhängig von der Tumorausbreitung zum Zeitpunkt der Operation, d.h. von der histopathologischen Stadienbestimmung, insbesondere der Bestimmung des Lymphknotenstatus (pN). Im Stadium I ist eine adjuvante Chemotherapie nicht indiziert, im Stadium II kann eine erwogen und in Rahmen von Studien durchgeführt werden. Der Nutzen einer Chemotherapie im Stadium III ist unumstritten. Auch ist das Alter des Patienten keine Kontraindikation. Patienten im Alter über 67 Jahre im guten Allgemeinzustand, so zeigen Studienergebnisse, profitieren von der Therapie (Schmiegel, Reinacher-Schick et al. 2008).

Die adjuvante Chemotherapie basiert auf den Substanzen 5-Fluorouracil (5-FU) und Folinsäure (FS). Durch die Applikation konnte eine signifikante Senkung der Rezidivrate und Steigerung des Gesamtüberlebens erreicht werden. Die Hinzunahme von Oxaliplatin optimierte das Ergebnis zusätzlich. In der randomisierten „MOSAIC-Studie“ mit 2246 Patienten wurde eine signifikante Steigerung des Überlebens durch 5-FU/FS/Oxaliplatin im Vergleich zu 5-FU/FS erzielt. Aufgrund dessen und wegen der geringeren Toxizität wird das FOLFOX Regime bevorzugt und die Bolusinfusion mit 5FU/FS (z.B. Mayo-Schema) nicht mehr empfohlen (Schmiegel, Reinacher-Schick et al. 2008).

1.1.4.2 Rektumkarzinom

Um die Aussicht auf Heilung zu wahren, ist das Ziel der Therapie beim Rektumkarzinom die Reduktion der Lokalrezidivrate, welche im Vergleich zum Kolonkarzinom mit einer höheren Anzahl assoziiert ist, sowie die Reduktion der Fernmetastasierung. Die Basistherapie ist die Operation, wobei neben der radikalen Tumorentfernung der Erhalt der für die Blasen- und Sexualfunktion wichtigen autonomen Innervation als oberstes Gebot gilt. Unter

Berücksichtigung der Lokalisation, des Abstandes zu Levatorenschenkel und *Linea dentata*, wie auch der Sphinkterfunktion und Infiltrationstiefe bestehen die Möglichkeiten der (tiefen) anterioren Resektion, der abdominoperinealen Exstirpation und der intersphinktären (abdominoperianalen) Resektion (Krones, Stumpf et al. 2009). Das Wachstumsverhalten von Rektumkarzinomen, die intramural nur wenige mm über den makroskopischen Tumorrand hinaus reichen, extramural dagegen tief zirkumferenziell im Mesorektum Tumorabsiedlungen aufweisen, führte zur Etablierung der totalen mesorektalen Exzision (TME) als Standardverfahren. Hiermit ist es gelungen, die Lokalrezidivrate von vormals ca. 20% auf ca. 5-7% signifikant zu senken (MacFarlane, Ryall et al. 1993; Dahlberg, Glimelius et al. 1999). Im Mesorektum, dem Bindegewebsfettkörper, befinden sich alle Lymphknoten des kleinen Beckens. Diese drainieren das Rektum, entlang der Lymphspalten erfolgt die Tumorausbreitung. Aufgrund dessen ist es wichtig, das Mesorektum scharf unter direkter Sicht in einer exakt definierten Ebene zwischen viszeraler und parietaler Beckenfaszie *En-bloc* aus dem Beckenboden zu lösen, wobei die TME über diesen technischen Unterschied zu konventionellen Chirurgie verfügt und zudem eine bestmögliche Schonung der autonomen Nerven erlaubt (Stelzner 1962). Abbildung 3 zeigt die Präparationswege der TME. Bei Tumoren des oberen Rektumdrittels erfolgt die partielle Mesorektumexzision bis 5cm distal des Tumorrandes. Bei tiefer liegenden Tumoren wird die TME angewandt, wobei als minimaler Abstand 1cm gilt, vor allem auch nach neoadjuvanter Radiochemotherapie.

Erlaubt der operative Eingriff primär nicht die zu erwartende R0-Resektion mit negativen zirkumferentiellen Resektionsrand und die Senkung der lokalen Rezidivrate, sowie den wahrscheinlich nicht möglichen Schließmuskelerhalt, stellen diese Punkte die Indikation zur neoadjuvanten Radio (RT)- oder Radiochemotherapie (RCT), dessen Einsatz nachweislich diese Punkte positiv beeinflusst (Swedish rectal cancer trial, 1997; Kapiteijn, Marijnen et al. 2001; Merkel, Meyer et al. 2002; Bujko, Nowacki et al. 2004; Sauer, Becker et al. 2004). In den aktuellen Leitlinien von 2008 der Deutschen Krebsgesellschaft wird in diesem Fall, in dem ein „down-staging“ bzw. „down-sizing“ zum Erreichen einer R0-Resektion oder zum Sphinktererhalt angestrebt wird, die präoperative RCT gegenüber der RT empfohlen, da die Kurzzeitradiotherapie diesen Effekt nicht erzielt, wo hingegen bei Karzinomen im Stadium II und III, auf die jene Kriterien nicht zutreffen, sowohl die Kurzzeitradiotherapie als auch die konventionell fraktionierte RCT angewendet werden kann (Schmiegel, Reinacher-Schick et al. 2008). Sicher ist, dass der präoperativen Therapie der Vorzug gegeben wird gegenüber der postoperativen, die bis 2004 Standard war. Die Ergebnisse der prospektiven Studie der Deutschen Rektumkarzinomgruppe ergaben eine signifikante Reduzierung der Lokalrezidivrate durch die präoperative RCT im Vergleich zur postoperativen RCT. Dabei war außerdem keine Erhöhung der postoperativen Komplikationen nach neoadjuvanter RCT im Vergleich zur sofortigen Operation zu verzeichnen und die akute und chronische Toxizität war signifikant erniedrigt (Sauer, Becker et al. 2004). Ein signifikanter Vorteil für das Gesamtüberleben besteht aber nicht. Postoperative RCT wird nur noch empfohlen, wenn bei fortgeschrittenen Rektumkarzinomen keine neoadjuvante Therapie durchgeführt wurde. Außerdem wird grundsätzlich eine adjuvante Chemotherapie nach neoadjuvanter RCT empfohlen (Schmiegel, Reinacher-Schick et al. 2008).

Als Schema stehen für die präoperative Radiotherapie die Kurzzeitradiotherapie mit 5x5 Gy, gefolgt von sofortiger Operation und die konventionell fraktionierte RCT mit einer Gesamtdosis von 50,4 Gy, kombiniert mit einer 5-FU basierten Chemotherapie, zur Verfügung. Welches Schema wann zum Einsatz kommt, wird zum jetzigen Zeitpunkt national und international kontrovers diskutiert.

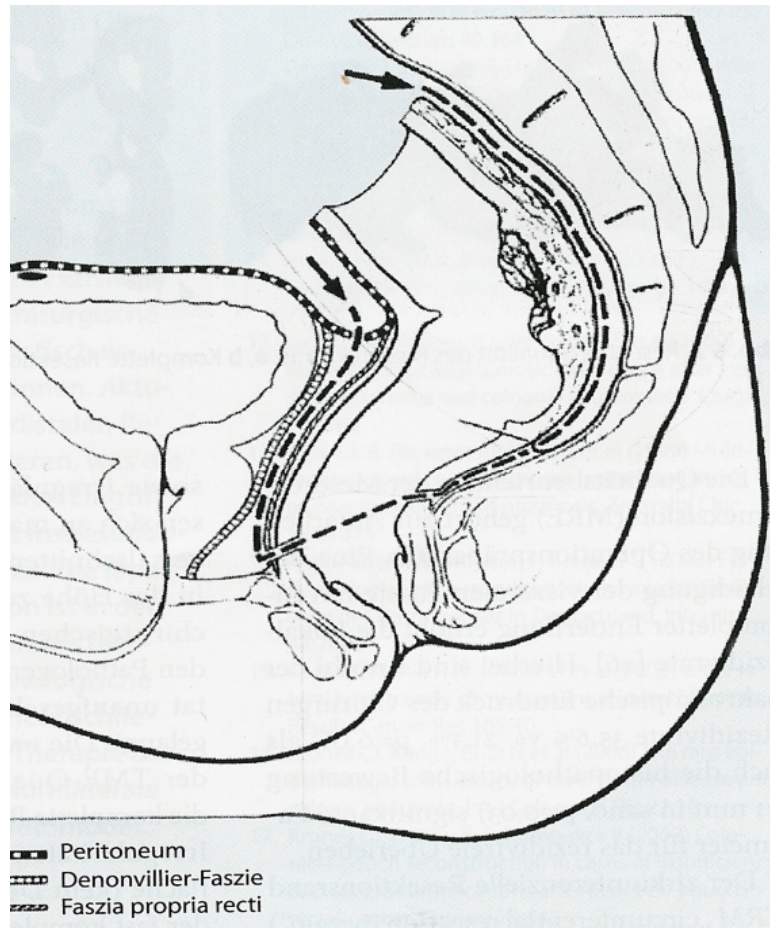


Abbildung 3: Präparationswege der totalen mesorektalen Exzision (nach Stelzner, Anatomie- und Evolutionsmorphologie als eine Grundlage der Chirurgie, 2003)

1.1.5 Prognose

Die Prognose des KRK ist relativ günstig. Die 5-JÜR liegt in Deutschland zurzeit bei 60% (RKI und GEKiD 2008). Als wesentlicher prognostischer Faktor gelten das Tumorstadium und die Qualität des chirurgischen Eingriffes. Nach kurativer Resektion beträgt die 5 JÜR in erfahrenen Zentren bei prognostisch günstigen UICC I Stadium > 80%, die Überlebensrate bei nodalpositiven (UICC III) liegt dagegen bei lediglich 50% (Hermanek, Wiebelt et al. 1994; Schrag, Cramer et al. 2000; Staib, Link et al. 2002; Schrag, Panageas et al. 2003). Je nach Tumorstadium sind für R0-Resektionen 5-JÜR von 90, 80, 60% (Kolon), bzw. 90, 70, 40% (Rektum) zu erwarten (Hauser 2006). Weitere Prognosefaktoren sind Tumordifferenzierung und venöse Invasion. Insbesondere die Anzahl der befallenen Lymphknoten ist ein wichtiger

Parameter zur Prognoseabschätzung. Zur Festlegung eines nodalnegativen Stadiums sind mindestens 12 tumorfreie Lymphknoten gefordert (s. Kap. 1.1.3.2). Eine wiederholte Analyse der Intergroup-Studie 0089 zeigte, dass die Anzahl der untersuchten Lymphknoten ein entscheidender Parameter für die Abschätzung des Überlebens ist. Unabhängig davon, ob es nodal positive oder nodal negative Stadien sind, ist die Prognose der Patienten mit vielen untersuchten Lymphknoten besser. In dieser Studie liegt erst ab 20 tumorfreien Lymphknoten eine maßgeblich verbesserte Prognose vor (Le Voyer, Sigurdson et al. 2003).

Das Schicksal der KRK Patienten entscheidet sich in den ersten 2 Jahren nach der Operation, in den 90% aller Rezidive auftreten. (UICC 2003) Bei einem von 5 Patienten entwickelt sich eine *peritoneal minimal residual disease* nach dem kurativen Eingriff. Bei etwa einem von sieben Patienten mit einem KRK kommt es zur Entwicklung von Peritonealkarzinose (Jayne, Fook et al. 2002; Shen, Hawksworth et al. 2004; Koppe, Boerman et al. 2006).

1.2 Peritonealkarzinose

1.2.1 Pathophysiologie

Primäre Tumore des Peritoneums (Mesotheliom, Pseudomyxoma peritonei) sind selten, während sekundäre Peritonealkarzinose (PK) eine häufige Metastasierungsform bei gastrointestinalen (Magen, Pankreas, Kolon und Rektum) und gynäkologischen Tumoren darstellt. Die Invasion der serösen Darmwand durch Tumoren kann eine Beimpfung des angrenzenden und entfernten Peritoneums durch die Zellen des Primarius bewirken, welches sich am häufigsten als s.g. *milky spots* des *Omentum majus* darstellt (Tsuji moto, Hagiwara et al. 1996). Nach Yonemura (s. Abbildung 4) verläuft die peritoneale Tumordissemination in vier wesentlichen Schritten: 1.) Es lösen sich zunächst Zellen vom Primärtumor, 2.) mit anschließender Adhäsion der freien Tumorzellen am Peritoneum. Es folgen 3.) die Invasion der Tumorzellen in den Subperitonealraum und 4.) die Proliferation der Tumorzellen und Neovaskularisation (Yonemura, Endou et al. 2000).

Das Lösen der Primärtumorzellen erfolgt spontan oder als nachteiliger Effekt einer Behandlung. Spontane Exfoliation wird verursacht durch hohen interstitiellen Druck im soliden Tumor, als Resultat einer schnellen Zellproliferation und ineffektiven lymphatischen Drainage (Hayashi, Jiang et al. 2007). Weitere Ursachen für erhöhten Druck im Interstitium sind Fibrose, Kontraktion der Intestitialmatrix und erhöhter osmotischer Druck verursacht durch anaerobe Glykolyse und Plasmaproteinverlust. Ferner wurde gezeigt, dass eine Downregulation von Zell-Zell Adhäsionsmolekülen, wie z.B. E-Cadherin, eine Tumorzell disseminat ion bedingt (Kokenyesi, Murray et al. 2003). Die Freisetzung von Tumorzellen intraperitoneal ist abhängig vom Ausmaß des serösen Tumorbefalls. Für das KRK konnten mehrere Studien eine Verschlechterung der Ergebnisse (peritoneale Tumorausbreitung, 5-Jahres Überlebensrate) zeigen, bei den Patienten, dessen Resektat in

der pathologischen Aufarbeitung eine Mitbeteiligung der serösen Darmwand (pT4, Stadium II-III) aufwiesen (Baskaranathan, Philips et al. 2004; Keshava, Chapuis et al. 2007; Stewart, Morris et al. 2007).

Technische Schwierigkeiten während der Operation können ebenfalls zur Ausbreitung von Tumorzellen intracavital führen. Dies ist bei einer R1- oder R2-Resektion möglich, wie auch durch eine Ruptur, eine Eröffnung oder Einschneiden des Tumors. Beispiel hierfür ist das Rektumkarzinom, wobei eine deutliche Relation zwischen inkompletter Resektion (positiver zirkumferentieller Resektionsrand) und Fernmetastasierung gezeigt wurde (Nagtegaal and Quirke 2008). Auch Sugarbaker hat die iatrogenen Mechanismen der Pathogenese der Peritonealkarzinose beschreiben und als wesentlichen Punkt ein chirurgisches Trauma des Primärtumors aufgezählt (Sugarbaker 1996). Hansen und Mitarbeiter konnten ferner zeigen, dass ein Tumorzellüberlauf während einer Operation aus Blut- und Lymphgefäßleckagen in die Peritonealhöhle zu intraperitonealen Tumorabsiedlung führen kann. (Hansen, Wolff et al. 1995). Sugarbaker und Kollegen haben eine Theorie aufgestellt, die das Auftreten von PK nach chirurgischer Behandlung eines kolorektalen Karzinoms erklärt. Demnach entsteht Peritonealkarzinose durch freie intraperitoneale Tumorzellemboli nach Serosapenetration des Tumors, Ausbreitung der Tumorzellen über eröffnete Lymphwege, Verschleppung der Tumorzellen durch direkte chirurgische Traumatisierung oder venösen Blutrückfluss, Fibrinausschüttung an traumatisierten Peritonealoberflächen sowie eine im Rahmen der Wundheilung durch Wachstumsfaktoren vermittelte Tumorzellproliferation (Sugarbaker 1999).

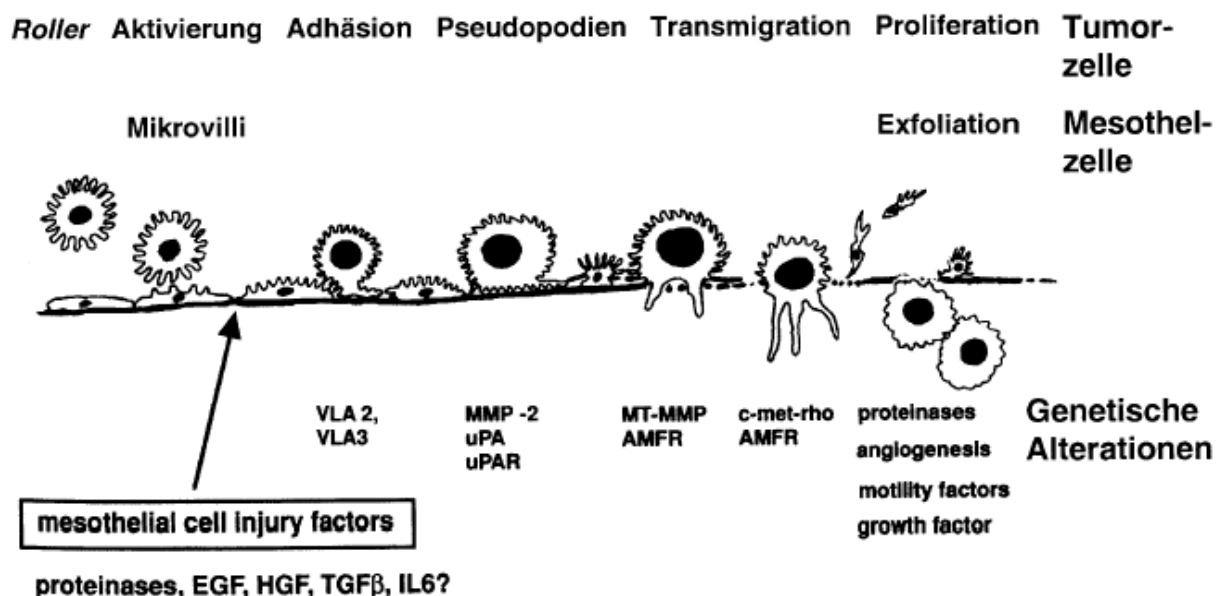


Abbildung 4: Pathogenese Peritonealkarzinose nach Yonemura

Die Adhäsion freier Tumorzellen an das Mesothel der Peritonealhöhle und die Extrazellulärmatrix (ECM), sowie die Invasion dieser Strukturen folgen in der Kaskade der peritonealen Metastasierung. Untersucht wurde von Bracke die Rolle von Adhäsionsmolekülen bei der Entstehung von peritonealen Tumoren. Gezeigt wurde, dass

eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle die Anlagerung von Tumorzellen an Mesothelzellen vermitteln, wobei einige ebenfalls vom Endothelium exprimiert werden (Bracke 2007). Dabei spielen Mesothelzellen selbst eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion und der subperitonealen Invasion der Tumorzellen, als Träger diverser Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren (ICAM-1, VCAM-1, PCAM-1, Integrine), sowie als Produktionsort verschiedener Wachstumsfaktoren und ECM Strukturen, (PDGF, FGF, HGF, KGF, Laminin, Fibronectin, Kollagene, Elastin) welche die Zellproliferation anregen, einen hohen regenerativen Wert bei Verletzungen des Peritoneums, wie sie z.B. bei Entzündungen oder mechanischen Traumen entstehen, haben, aber auch eine erhöhte Adhäsions- und Invasionsbereitschaft von Tumorzellen bedingen (Welch, Fabra et al. 1990; Offner, Feichtinger et al. 1996; Tietze, Borntraeger et al. 1999; Mutsaers and Wilkosz 2007). Abbildung 5 veranschaulicht die Interaktionen der beteiligten Moleküle. Ziprin und Mitarbeiter haben *in vitro* gezeigt, dass die Adhäsion eher über Interaktion zwischen mesotheliale ICAM-1 und tumorösen CD43 (Sialophorin) vermittelt wird als zwischen ICAM-1 und β_2 Integrinen, den ubiquitären ICAM-1 Liganden (Ziprin, Alkhamesi et al. 2004). Untersuchungen haben verdeutlicht, dass bei Entzündungsprozessen durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- α , IL-1 β , IL-6 und *Epidermal Growth Factor* (EGF), die mesotheliale Expression von ICAM-1 und anderen Adhäsionsmolekülen wesentlich ansteigt. Downreguliert wird die Expression durch Heparin, wobei *in vitro* und *in vivo* auch eine Reduktion des Tumorwachstums gezeigt wurde (Klein, Bittinger et al. 1995; Alkhamesi, Ziprin et al. 2005). Den Tumorzell-Integrinen kommt ebenfalls eine Bedeutung in der Entstehung der PK zu, welches an verschiedene ECM Proteine binden kann und in mehreren Studien eine Korrelation zwischen Expression von β_1 Integrinen und metastatischen Potential eines Tumors, sowie dem Einsatz von Antikörpern und Reduktion der Zelladhäsion, gezeigt werden konnte (Lessan, Aguiar et al. 1999; Casey and Skubitz 2000; Kawamura, Endo et al. 2001; Burleson, Casey et al. 2004; Takatsuki, Komatsu et al. 2004; Ahmed, Riley et al. 2005). Beobachtet wurde auch die adhäsive Interaktion zwischen der mesothelialen Hyaluronschicht und dem transmembranem Glykoprotein CD44, einem Molekül, welches vom Kolon-Ca und vielen anderen Tumoren exprimiert wird (Cannistra, Kansas et al. 1993). Auch Harada und Mitarbeiter zeigten am Beispiel des Kolonkarzinoms die Rolle des CD44 als Vermittler und Akteur der Tumor-Mesothelzellen Adhäsion und beschrieben die Möglichkeit der Downregulation der Expression durch Antisense CD44 (Harada, Mizoi et al. 2001). Stimuliert wird die Produktion von CD44 durch intratumorales TGF- β , was auch die Adhäsion von Tumorzellen an das Mesothel des Peritoneums steigert (Koyama, Yashiro et al. 2000). Ferner nehmen diverse Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Ausbreitung und Invasion von Tumorzellen. HGF z.B. induziert beim Mesothelzellen die Auflösung von interzellulären Junctions, so dass die ECM freigelegt wird (Yashiro, Chung et al. 1996; Warn, Harvey et al. 2001). Außerdem stellt sich die Überexpression des HGF Rezeptors, c-MET, als ein prognostischer Faktor dar und die Ausschaltung von c-Met beeinflusst die Integrin vermittelte Invasion (Sawada, Radjabi et al. 2007).

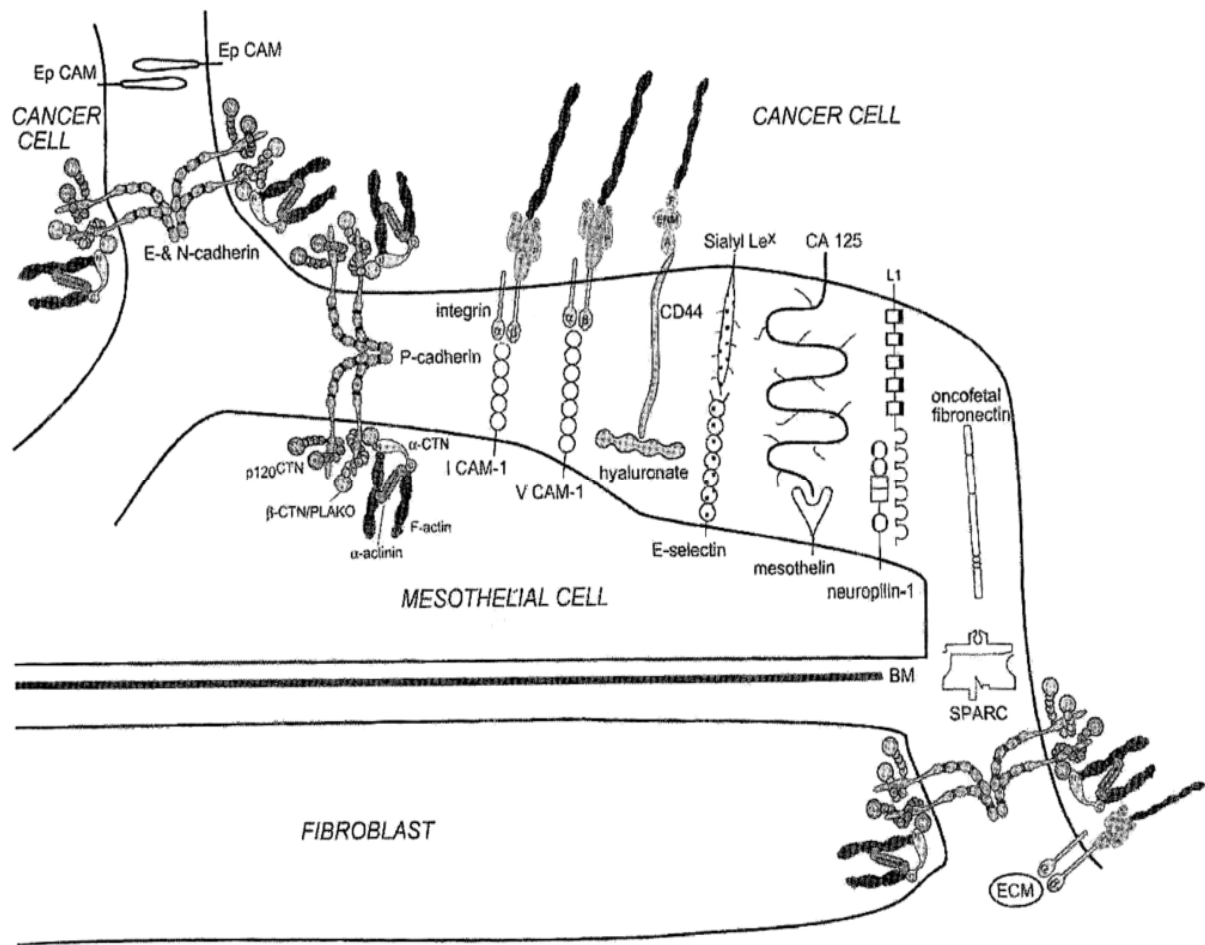


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Adhäsionsmolekülen der Pathogenese der PK (nach Ceelen, Peritoneal Carcinomatosis 2007)

Als Gründe für eine Erhöhung mesothelialer Wachstumsfaktoren in der Peritonealflüssigkeit ist hier der chirurgische Eingriff selbst zu nennen. Alternativ können Tumorzellen Apoptose des Mesothels induzieren und das submesotheliale Gewebe freilegen. Heath und Kollegen haben es für das KRK als FAS (Transmembranes Protein der TNF Familie)-abhängigen Mechanismus gezeigt (Heath, Jayne et al. 2004). Damit Tumorzellen das Interstitialgewebe überhaupt invadieren können, sind Proteasen nötig, wie z.B. Matrix Metalloproteinasen (MMP). Am Beispiel des Magenkarzinoms wurde der Einfluss der MMP-1, MMP-2 und MMP-7 auf die Progression des Tumors beschrieben. Es ist bekannt das MMP-2 Kollagen Typ IV, Laminin und Fibronectin (alle Komponenten der Basalmembran) spaltet, während MMP-1 die Kollagene Typ I und III. Zusätzlich konnte die spontane Expression von mesothelialen MMP-1 und MMP-2 während des Tumorzell-Mesothel-Kontakts gezeigt werden, was auf eine parakrin-ähnliche Wirkung der Matrix Metalloproteinasen als Reaktion auf den Tumorzellkontakt zurückgeführt wurde. Dies scheint eine wichtige Rolle in der Progression der Tumorzellinvasion zu spielen (Mizutani, Kofuji et al. 2000; Yonemura, Endou et al. 2000).

1.2.2 Klinik

Die Beschwerden, die von einer Peritonealkarzinose im frühen Stadium ausgelöst werden, sind eher untypisch und wenig richtungsweisend für die Diagnostik. Ziehende, wandernde abdominelle Schmerzen können ebenso die Symptomatik bestimmen wie zunehmende Obstipation und allgemeiner Kräfteverfall. Komplikationen wie Darmobstruktionen, ein aufgetriebenes Abdomen wie auch maligner Aszites sind Zeichen eines fortgeschrittenen Befalls des Bauchfells, welcher meist erst diagnostiziert wird, wenn das Abdomen zur chirurgischen Entfernung des Primärtumors eröffnet wird.

1.2.3 Diagnostik

Präoperativ ist eine PK meist schwer zu diagnostizieren. Dies ist jedoch ausschlaggebend für die Operationsplanung sowie den Therapieerfolg. Demnach sind Untersuchungen wie Körperliche Untersuchung, Laborparameter, Tumormarker (CA19-9, CEA, CA125, CA72-4), CT des Thorax, des Abdomens und des Beckens mit intravenösem und oralem/rektalem Kontrastmittel und die Endoskopie mit oder ohne endoluminalem Ultraschall (Kolorektales Karzinom und Magenkrebs) unabdingbar. Ausgehend vom Primärtumor und Tumorausbreitung können in machen Fällen zusätzlich abdominaler Ultraschall und MRT und/oder PET-CT hilfreich sein (Yan, Morris et al. 2008). Das CT und die Sonographie ermöglichen die Lokalisation und Quantifizierung einer Peritonealkarzinose, jedoch ist die Sensitivität dieser Methoden gerade bei geringem Befall und kleinen Tumoraläsionen sehr niedrig. So beträgt die Sensitivität einer CT für Läsionen > 2cm noch 70%, sinkt aber für Läsionen < 1cm auf 28% (Jacquet, Jelinek et al. 1993). Eine Sonographie kann intraabdominelle Flüssigkeitsmengen als indirektes Zeichen einer PK nachweisen (Sano 2001).

Die explorative Laparoskopie ermöglicht eine histologisch gesicherte Diagnosestellung. Die optische Beurteilung des Peritoneum und der Peritonealhöhle, kombiniert mit der Möglichkeit der zytologischen Untersuchung der Abdominalflüssigkeit und Biopsie, machen das Prozedere zur effektiven Methode der Diagnostik, obwohl die Verantwortlichkeit für die Verbreitung maligner Zellen kontrovers bleibt (Targarona, Martinez et al. 1998; Canis, Botchorishvili et al. 2000; Abu-Rustum, Rhee et al. 2004; Zivanovic, Sonoda et al. 2008). Dabei zeigt diese Untersuchungsmethode eine hohe Sensitivität und Spezifität.

Eine weitere, an Wichtigkeit zunehmende diagnostische Maßnahme ist die Peritoneallavage, die entweder laparoskopisch oder intraoperativ durchgeführt wird. Zumeist wird die Lavage anschließend zytologisch oder immunhistochemisch untersucht.

1.2.4 Prognose

Die PK ist eine häufige Todesursache bei Patienten mit resezierten intraabdominellen Tumoren (Pilati, Rossi et al. 2001). Laut Sugarbaker ist die Tumorzellpersistenz in der

Abdominalhöhle oder im Becken verantwortlich für den Tod von 30- 50% der Patienten, die an der Primärerkrankung sterben (Sugarbaker 1999).

Wenige Studien befassen sich mit dem natürlichen Krankheitsverlauf der Peritonealkarzinose kolorektaler Herkunft. 1989 berichtete Chu über ein 6 monatiges medianes Überleben von kolorektal Karzinompatienten mit einer PK (Chu, Lang et al. 1989). Die Ergebnisse der französischen Multicenter Studie EVOCAPE 1, welche die Inzidenz und Langzeitprognose bei Patienten mit nicht gynäkologischer Peritonealkarzinose beschreibt, zeigten eine mediane Überlebenszeit von 5,2 Monaten. Außerdem ging aus den Resultaten hervor, dass die 118 Patienten eine synchrone PK in 58,5% der Fälle aufwiesen (Sadeghi, Arvieux et al. 2000). In der aktuellsten und bisher größten Studie geben Jayne und Kollegen die mediane Überlebenszeit mit 7 Monaten an (Jayne, Fook et al. 2002). Den Ausführungen nach ist die PK eine häufige Form der Progression bei Patienten mit Tumoren kolorektaler Herkunft. Von 3019 Patienten mit kolorektalem Karzinom hatten 349 (13%) eine PK, 214 Patienten davon eine synchrone. Diese Autoren stellen fest, dass das Überleben nachteilig beeinflusst wird vom Ausmaß der PK und dem T-Stadium des Primärtumor.

Die klinische Aussagekraft von freien Tumorzellen in der Peritonealhöhle wurde bereits in *in vitro* Studien und an Tiermodellen demonstriert (Umpleby, Fermor et al. 1984; Fermor, Umpleby et al. 1986; Skipper, Cooper et al. 1987). Obwohl in verschiedenen Arbeiten gezeigt wurde, dass die intraoperative Detektion von freien intraperitonealen Tumorzellen (FPTC *free peritoneal tumor cells*) einen Einfluss auf die Prognose anderer abdominaler Tumoren hat, vor allem beim Magenkrebs (Bentrem, Wilton et al. 2005; Ribeiro, Safatle-Ribeiro et al. 2006; Rosenberg, Nekarda et al. 2006), ist dieser Stellenwert für das KRK noch nicht klar definiert (Kienle and Koch 2001). Die Besichtigung der Arbeiten, die in Rahmen einer Meta-Analyse von Rekhraj und Mitarbeitern 2008 über einen Zeitraum von Januar 1990 bis Juli 2007 zusammen getragen wurden, um die Auswirkung von FPTC prä- und postresektionell auf die Inzidenz des Wiederauftretens von kolorektalem Karzinom bei Patienten nach kurativer Therapie zu ermitteln, zeigen zwei Studien, die die peritoneale Rezidivrate mit dem Vorhandensein von FPTC vergleichen, einen signifikanten Unterschied wenn die Peritoneallavage positiv für FPTC war (präresektionell: 36% und 25% zu 2% und 6%; postresektionell: 33% zu 7%) (Hase, Ueno et al. 1998; Yamamoto, Akasu et al. 2003). Die Ergebnisse der Studien die das Auftreten von FPTC mit der Überlebenszeit verglichen haben, suggerieren allesamt eine Verschlechterung des Überlebens, wenn Tumorzellen intraperitoneal detektiert wurden (Schott, Vogel et al. 1998; Wind, Norklinger et al. 1999; Kanellos, Demetriades et al. 2003; Yamamoto, Akasu et al. 2003; Baskaranathan, Philips et al. 2004; Kanellos, Zacharakis et al. 2006; Lloyd, McIver et al. 2006; Gozalan, Yasti et al. 2007). Die Korrelation zwischen FPTC und Überlebenszeit, außerdem auch zwischen peritonealen Tumormarkern und Überleben konnten ebenfalls Lee und Kollegen zeigen. Die Studie untersuchte die klinische Signifikanz der Tumormarker, CEA und CA 19-9 und der Zytologie im peritonealen Ausfluss und Spülung, die bei 234 kolorektalen Tumorpatienten während der Operation gewonnen wurden als prognostischen Indikator für peritoneales Tumorauftreten und Überlebenszeit. Die Multivarianzanalyse zeigte die Korrelation zwischen peritonealen Tumormarker, peritonealen Metastasen und Zytologie. Ferner gab es einen

statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Höhe von CEA in der Peritonealflüssigkeit und der peritonealen Rezidivrate bei Zytologie-negativen Patienten (Lee, Kim do et al. 2009). Die Ergebnisse deuten auf die große Bedeutung der Peritoneallavage als wichtiges Diagnostikum dieser Erkrankung mit prognostischer Relevanz hin.

1.2.5 Therapie

Während in der Vergangenheit die Therapie der Wahl aus palliativer systematischer Chemotherapie und chirurgischer Intervention, als Prävention oder Therapie von Tumor-assoziierten Komplikationen bestand und meist nur unterstützende medizinische und pflegerische Maßnahmen bei fortgeschrittenen Krebsleiden durchgeführt wurden, wird in den letzten Jahren in spezialisierten Zentren eine aufwendige kombinierte chirurgische und medikamentöse Therapie der Erkrankung durchgeführt. In den 1980ern stellten Sugarbaker *et al.* die zytoreduktive Peritonektomie (ZRP) und die intraperitoneale Chemotherapie vor als eine neue, innovative Therapieoption für ausgewählte Patienten mit PK (Sugarbaker, Kern et al. 1987; Sugarbaker 1988; Sugarbaker 1991). Techniken und Materialien unterscheiden sich zwischen den Zentren, doch einheitlich sind die Behandlungsergebnisse vergleichbar und beweisen den Vorteil der kombinierten Therapie. Sowohl beim Langzeitüberleben, wie auch bei der Lebensqualität konnte für Patienten ohne systemische Metastasierung eine Verbesserung erreicht werden und Sugarbaker sieht in dieser Therapieform eine Möglichkeit zur kurativen Behandlung der PK kolorektaler Herkunft (Stephens, Alderman et al. 1999; Verwaal, van Ruth et al. 2003; Glehen, Kwiatkowski et al. 2004; Shen, Hawksworth et al. 2004; Sugarbaker 2005; Elias, Raynard et al. 2006; Elias, Benizri et al. 2007; Verwaal, Bruin et al. 2008).

Die zytoreduktive Peritonektomie mit der HIPEC (*Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy*) stellt an vielen Zentren derzeit das Standardtherapieverfahren bei *Pseudomyxoma peritonei*, peritonealem Mesotheliom sowie bei der Peritonealkarzinose kolorektalen Ursprungs dar (Brigand, Monneuse et al. 2006; Sugarbaker 2006; Sugarbaker, Yan et al. 2006; Yan, Stuart et al. 2006).

1.2.5.1 Chirurgische Therapie

Das Ziel jeder Behandlung mit kurativer Absicht in der onkologischen Chirurgie ist die vollständige Entfernung (R0) vom malignen Tumorgewebe. Dieses Prinzip wurde ausreichend für die Primärtumor- und Metastasen Chirurgie von Leber und Lunge demonstriert (Gertsch 2003).

Das Ziel einer zytoreduktiven Operation besteht darin, makroskopische peritoneale Tumorerkrankungen komplett zu exstirpieren (Sugarbaker 1999). 1934 war Meigs, der amerikanische Gynäkologe, der erste Befürworter zytoreduktiver Chirurgie bei Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom, einer Erkrankung mit hoher Bereitschaft für peritoneale Dissemination (Meigs 1934). Die Überlebensrate postoperativ blieb weiterhin schlecht, so dass die operativen Strategien nicht optimiert wurden bis in den Jahren 1968 und 1975,

Munnell und Griffiths, von einander unabhängig demonstrierten, dass es möglich ist, mit ausgedehnten Operationen bessere Überlebensraten zu erzielen und stellten außerdem die Restgröße der verbleibenden Tumormasse als wichtigsten prognostischen Faktor dar (Munnell 1968; Griffiths 1975; Griffiths, Parker et al. 1979). Es war Sugarbaker der später die radikale onkologische zytoreduktive Peritonektomie bei Patienten mit Peritonealkarzinose einführte (Sugarbaker 1995). Die ZRP wird ausschließlich in Bereichen des Peritoneum mit sichtbaren Tumoren angewandt, mit der Absicht, die Läsionen auf ein mikroskopisches Ausmaß zu reduzieren (Pestieau and Sugarbaker 2000). Der Nachteil der ZRP liegt in der Unmöglichkeit einer kompletten Resektion, da eine Dissemination von Tumorzellen in die Abdominalhöhle immer vorherrscht. Erfahrungen haben gezeigt, dass die alleinige chirurgische Therapie nicht ausreicht und in 90%- 100% der Fälle ein Rezidiv auftritt, trotz der augenscheinlichen umschriebenen Wucherung und kompletten Resektion (Dube, Lasser et al. 1997; Miner, Shia et al. 2005).

1.2.5.2 Intraperitoneale Chemotherapie (IPC)

Ergänzend zur zytoreduktiven Peritonektomie erfolgt die intraperitoneale Chemotherapie. Dabei werden Chemotherapeutika direkt in die Bauchhöhle appliziert, um einerseits eine höhere Konzentration der Zytostatika am Resttumorgewebe zu erzielen und andererseits die systemischen toxischen Effekte zu minimieren. Untersuchungen zeigten, dass die Reduktion der Konzentration der Substanz in der Chemotherapieflüssigkeit die Penetrationstiefe in die Tumorknötchen negativ beeinflusste (Elias and Sideris 2003; Sugarbaker, Stuart et al. 2006). Umgekehrt bedeutet dies, dass durch Erhöhung der Konzentration auch der Wirkungsgrad von zytostatisch wirksamen Substanzen erhöht werden kann und eine solche Steigerung der lokalen Konzentration entsprechend auch zu einer Verbesserung des Wirkungsgrades und damit der Ansprechrate führt. Die Höhe der Konzentration ist aus dem Grund wichtig, da eine ungenügende Penetration in das Tumorgewebe den größten limitierenden Faktor in der klinischen Anwendung der IPC darstellt (Dedrick, Myers et al. 1978). Es wird angenommen, dass Zytostatika maximal zwischen 1-3mm in das Tumorgewebe diffundieren (Katz and Barone 2003). Daraus ergibt sich ebenfalls die entscheidende Bedeutung der Größe des Resttumorgewebes für den Erfolg der Therapie und somit die Notwendigkeit einer kompletten Zytoreduktion vor Applikation der Chemotherapeutika (Elias, Dube et al. 1999; Sugarbaker 1999; Sugarbaker 2003).

Die Installation der Chemotherapeutika erfolgt präoperativ, intraoperativ und/oder postoperativ. Präoperativ, im Sinne einer neoadjuvanten Therapie, werden die Zytostatika, auch in einer Kombination mit systemischer Chemotherapie als s.g. NIPS (*neoadjuvant intraperitoneal and systemic chemotherapy*) appliziert um das Ausmaß der intraperitonealen Tumorausbreitung und Tumorzelldissemination vor der ZRP zu reduzieren oder als Maßnahme für Patienten für welche eine komplette Zytoreduktion zunächst ausgeschlossen wird. Ergänzend zur direkten Wirkung an Tumor intraperitoneal, erhöht die systemische Komponente dieses Ansatzes den Wirkungsgrad durch die Entstehung eines bidirektionalen Diffusionsgradienten, der die Bereitstellung der Chemotherapie am Wirkort optimiert. Das Ansprechen der NIPS, sowohl klinisch als auch radiologisch konnte gezeigt werden

1 Einführung

(Sugarbaker 1996; Yonemura, Bandou et al. 2006), aber auch die hohe Morbidität und Mortalität der nachfolgenden Operation (Esquivel, Vidal-Jove et al. 1993; Sugarbaker 1996).

Die intraoperative Therapie mit der HIPEC ist der am häufigsten angewandte und erforschte Ansatz der multimodalen Therapie der PK. Der therapeutische Gebrauch von Wärme ist bereits bekannt seit Hippokrates (Sektion VII, #83), der sagte, dass das, was die Medizin nicht heilt, Eisen (das Skalpell) heilt; was aber Eisen nicht heilt, heilt Feuer und was Feuer nicht heilt ist wirklich unheilbar (Sticca and Dach 2003).

Wärme, z.B. in Form der angewandten Hyperthermie hat einen zytotoxischen Effekt infolge ihres Einflusses auf DNA Reparatur, Proteindenaturierung, Induktion von Hitze-Schock-Proteinen, Induktion von Apoptose und Inhibition von Angiogenese. Die Inhibition des oxidativen Stoffwechsels senkt den pH-Wert und die erhöhte Azidität steigert die lysosomale Aktivität und den nachfolgenden Zelltod selektiv bei malignen Zellen. Zusätzlich steigert Hitze die Penetration der Zytostatika in das Gewebe und die Zytotoxizität ausgewählter Chemotherapeutika. HIPEC verinnerlicht die Vorteile der Hyperthermie und der lokoregionalen Chemotherapie.

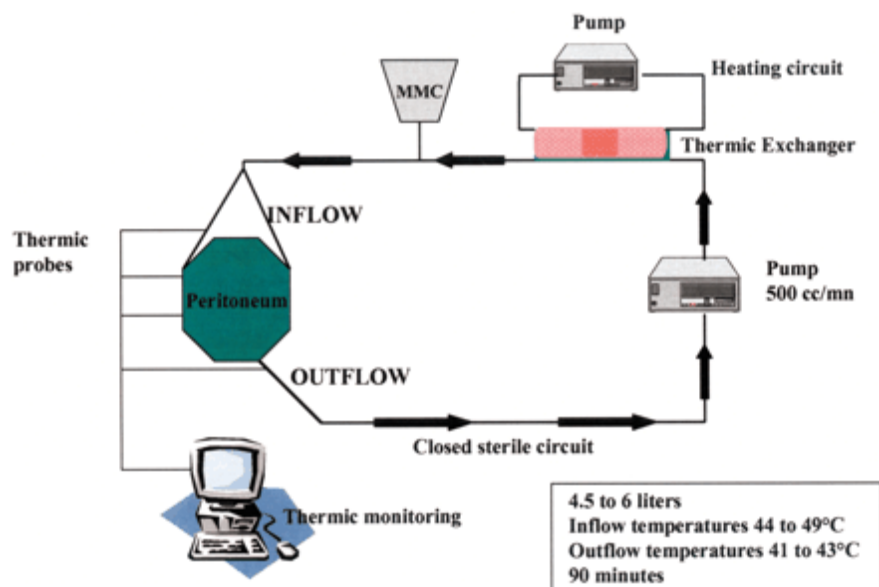


Abbildung 6: HIPEC Apparatur, Schemazeichnung; 90min. HIPEC mit Mitomycin C (MMC) (nach Glehen 2003, J. Clin. Oncol. 21:799-806.)

Die Anwendung von HIPEC erfolgt in offener oder geschlossener Technik. Das Prinzip ist das Selbe: Mehrere Katheter/Drainagen werden durch die Bauchwand in der Abdominalhöhle so platziert, dass durch den Fluss eine homogene Verteilung der Substanzen erfolgen kann, z.B. subdiaphragmal und im Douglasraum. Die Ein- und Ausflusskatheter sind mit einem Perfusionssystem verbunden, das sich aus Rollerpumpen und einem Hitzeaustauscher zusammensetzt. Ein Heizer/Kühler Aggregat liefert die Quelle für die 44°C- 49°C Wassertemperatur, das den Hitzeaustauscher durchfließt und die Perfusionslösung (Lösungen für die Peritonealdialyse) erwärmt. Die Peritonealhöhle wird kontinuierlich mit der Perfusionslösung gespült bis die ideale intraperitoneale Temperatur

von 41°C- 43°C erreicht ist. Anschließend wird das Zytostatikum in den Kreislauf hinzugefügt und die HIPEC für 30- 90 Minuten, abhängig vom Chemotherapeutikum, ausgeführt.

Bei der offenen Methode, auch Kolliseum-Technik (s. Abbildung 7) genannt, wird die geöffnete Bauchdecke mittels Nahtmaterial an ein Haltegerät befestigt und aufgespannt. Die Bauchdecke wird mittels Folie bedeckt und die Ausdünstungen über ein spezielles Absaugsystem abgesaugt. Während der Perfusion kann der Chirurg in das Geschehen eingreifen und die homogene Verteilung der Perfusionslösung und Chemotherapeutikum aktiv steuern durch manuelles schütteln der Darmschlingen. Diese Methode bietet eine bessere räumliche Verteilung der Lösung auf dem Peritoneum und ermöglicht eine einheitliche Temperaturverteilung. Bei der geschlossenen Methode wird die Bauchdecke nach Kathetereinlage verschlossen. Dies ermöglicht die Applikation größerer Volumina (ca. 3 Liter) der Chemotherapielösung. Die Verteilung ist hierbei ausschließlich lageabhängig. Die geschlossene HIPEC weist einen geringeren Verlust von Wärme auf und bietet eine sichere Handhabung für das chirurgische Personal. Für beide Techniken ist das Fehlen von intraabdominellen Verwachsungen ausschlaggebend für die optimale Verteilung der Chemotherapie.

Zusätzlich zur HIPEC kann der Einsatz einer intraoperativen systemischen Chemotherapie erfolgen, im Sinne einer bidirektionalen intraoperativen Chemotherapie aber auch in den ersten postoperativen Tagen eine intraperitoneale Chemotherapie (EPIC, *Early Postoperative Intraperitoneal Chemotherapy*) über die bereits vorhandenen Katheter verabreicht werden, welche unter normothermischen Bedingungen abläuft.

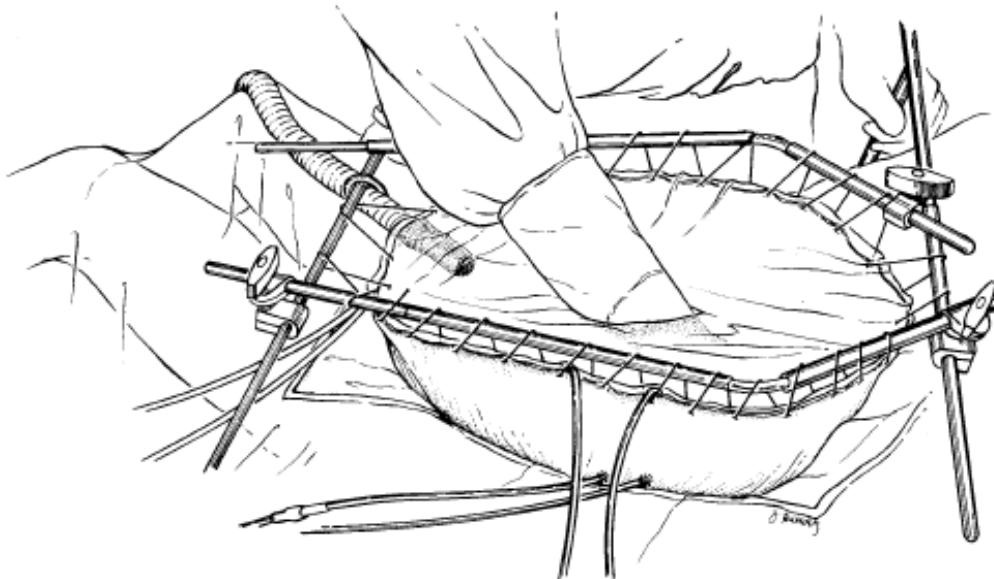


Abbildung 7: HIPEC, Kolliseum-Technik (nach Sugarbaker, 1999)

Für die Durchführung der IPC haben sich mehrere Zytostatika bewährt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über intraperitoneale Chemotherapeutika, die zum Einsatz kommen.

Die multimodale Therapie aus der HIPEC und der vorgeschalteten ZRP stellt einen sehr komplexen Eingriff dar mit hohen Komplikationsraten. Die Morbiditäts- und Mortalitätsraten

bei PK Patienten kolorektalen Ursprungs zeigen in der Literatur eine weite Streuung. Die Morbidität wird mit einer Spanne von 22% bis 55% und die Mortalität mit einer Spanne von 0% bis 12% angegeben (Stephens, Alderman et al. 1999; Elias, Blot et al. 2001; Pilati, Mocellin et al. 2003; Verwaal, van Ruth et al. 2003; Glehen, Kwiatkowski et al. 2004; Shen, Hawksworth et al. 2004). Die Morbidität kann unterschieden werden nach Chirurgieabhängigen und Chemotherapieabhängigen Komplikationen. Zu den Chirurgieabhängigen Komplikationen gehören z.B. postoperativer Ileus, Anastamoseninsuffizienz, Wundinfektionen, Blutung, Peripankreatitis, Thrombose und Lungenembolie. Die gebräuchlichen Zytostatika können zur Leukopenie, Anämie, Thrombopenie, aber auch zur Leckagen von Anastamosen führen und sind herz-, leber- oder nierentoxisch. Dementgegen steht die verbessernde Prognose, die mit dieser Kombinationstherapie erreicht wird. Zahlreiche Studien diverser Architektur zeigten eine Verbesserung der Überlebenszeit durch die HIPEC und/oder EPIC für KRK Patienten mit PK. Als Beispiel in diesem Zusammenhang dient die, bis zu diesem Zeitpunkt einzige randomisierte, prospektive Studie von Verwaal und Kollegen (Verwaal, van Ruth et al. 2003). Diese Studie untersuchte die Wertigkeit der ZRP und anschließenden HIPEC bei Patienten mit PK kolorektaler Herkunft. 105 Patienten wurden eingeschlossen, wobei im HIPEC-Arm eine ZRP und HIPEC mit adjuvanter systemischer Chemotherapie durchgeführt wurde, entgegen dem Kontrollarm, in dem die Behandlung sich auf systemische Chemotherapie mit/ohne palliativen Chirurgie beschränkte. Mit einem medianem Überleben von 22,4 Monaten versus 12,6 Monaten, trotz makroskopischer Zytoreduktion (R1) in nur 38% und HIPEC-Dauer von 60 Minuten zeigte die Studie ein positives Ergebnis der untersuchten Behandlung, so dass aus ethischen Gründen die Vorenthaltung dieser Therapie nicht verantwortet und die Studie abgebrochen wurde. Der Langzeitverlauf dieser Patienten mit kompletter Zytoreduktion zeigte ein 5-Jahres Überleben von 43% bei einem medianem Überleben von 42,9 Monaten (Verwaal, van Ruth et al. 2005). Auch die aktualisierten Ergebnisse von 2008 zeigen den signifikanten Beitrag zur Verlängerung der Lebenszeit durch die komplette Zytoreduktion (R1) und HIPEC mit einer 5-Jahres Überlebensrate von 45% (Verwaal, Bruin et al. 2008).

Tabelle 4: Intraperitoneale Chemotherapeutika

Intraoperative Anwendung (hypertherm)	Postoperative Anwendung (normotherm)	
häufige Zytostatika	seltene Zytostatika	
Mitomycin C	Mitoxantron	5-FU
Cisplatin	Gemcitabin	Paclitaxel
Doxorubicin	Carboplatin	
Oxaliplatin	Docetaxel	
Irinotecan	Etoposid	

1.2.6 Prävention

Das Verständnis der Pathogenese der Peritonealkarzinose, zeigt die Möglichkeiten der präventiven Intervention auf. Zum einen lässt sich die PK durch eine frühe Diagnose des Primärtumors und zum anderen durch eine Verhinderung der intraoperativen Tumorzellaussaat und durch Inhibition der Tumorzelladhäsion reduzieren.

1.2.6.1 Inhibition Chirurgieassoziiierter Tumorzell dissemination und Wachstums

Zur Vermeidung intraoperativer Tumorzellaussaat erfolgt die chirurgische Therapie bei, über die Organgrenzen, fortgeschrittenen Primärtumoren in der s.g. *no touch technique* als *en-bloc* Resektion. Dabei wird der Tumor, samt infiltrierten Nachbarorganen, dem Lymph- und Gefäßsystem einzeitig exstirpiert. In der Literatur wurde durch diese Technik eine gleiche 5-JÜR beschrieben, wie bei nicht infiltrierenden Tumoren (Pittam, Thornton et al. 1984; Hunter, Ryan et al. 1987; Orkin, Dozois et al. 1989). Außerdem setzt die Minimierung von Traumen am Peritoneum die Implantation von Tumorzellen herab. Die Laparoskopie ist im Vergleich zur offenen Chirurgie schonender und es wird in Zusammenhang gebracht mit geringerem peritonealen, wie metastatischem Tumorwachstum (Carter, Feingold et al. 2003). Chirurgische Eingriffe verursachen bekanntermaßen eine postoperative Reduktion der Immunabwehr. Eine Hemmung oder Modulation der Immunantwort kann die Chirurgie-abhängige Stimulation des Tumorwachstums vorbeugen. Eine Immuntherapie hat den Vorteil gegenüber der Chemotherapie, dass die Effektivität unabhängig vom Zellzyklus und pharmakokinetischen Parametern ist. Tumorzellen können auch in der *dormant cell phase* durch eine Immuntherapie behandelt werden. Nachdem in mehreren Tierstudien eine intraperitoneale Tumormassenverringerung durch Interleukin-2 (IL-2, ein anti-Tumor Zytokine) gezeigt werden konnte (Eggermont and Sugarbaker 1987; Ottow, Steller et al. 1987) und klinische Studien den positiven Einfluss von IL-2 gegen die postoperative Immunsuppression bei Krebspatienten gezeigt haben (Brivio, Lissoni et al. 1992; Nichols, Ramsden et al. 1992), zeigten Brivio und Kollegen in ihrer kleinen klinischen Studie, dass die präoperative Applikation von IL-2 bei KRK Patienten signifikant die VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Produktion reduziert und den Abfall des antiangiogenen Zytokin IL-12 in der postoperativen Periode verhindert (Brivio, Lissoni et al. 2002). Weitere klinische Studien zeigten an Patienten mit gastrointestinalen Tumoren, dass die intraperitoneale Applikation von IL-2 zusätzlich eine verbesserte 3 JÜR ausweist (Fu, Meng et al. 2002). Direkte Hemmung von VEGF postoperativ wird aus Gründen von Anastomosen- und Wundheilungskomplikationen vermieden (McCormack and Keam 2008). Die Ergebnisse einer aktuellen Arbeit zeigen jedoch, dass der kombinierte intraperitoneale Einsatz von Chemotherapie und anti-VEGF, *Bevacizumab*, einen rekombinaten, monoklonalen Antikörper gegen VEGF, welcher in Kombination zur Firstlinetherapie von metastasierten kolorektalem Karzinom zugelassen ist, eine Reduktion der Tumordurchblutung, eine Erhöhung der Tumorpenetration der Zytostatika, eine Reduktion der Tumorlast und eine Verlängerung der Lebenszeit und Heilung der Versuchstiere bewirkt (Shah, Shin et al. 2009).

1.2.6.2 Inhibition der intraperitonealen Tumorzelladhäsion

Alkhamesi und Kollegen zeigten, dass der intraperitoneale Einsatz von Heparin eine signifikante Reduktion der Tumor-Zell-Adhäsion herbeiführt, vergesellschaftet mit einem Abfall der ICAM-1 Expression und der vollständigen Hemmung des Tumorwachstums *in vivo* (Alkhamesi, Ziprin et al. 2005). Außerdem hemmt Heparin die Tumorinduzierte Produktion von Thrombin, Fibrin und Thromboplastin, die in Zusammenhang mit primärem und metastatischem Tumorwachstum gebracht werden (Niers, Klerk et al. 2007). Die Behandlung mit Antikörpern gegen spezifische Adhäsionsmoleküle, wie z.B. gegen Integrine, resultiert ebenfalls in einer effektiven Prävention von Tumorzelladhäsion und Wachstum (Takatsuki, Komatsu et al. 2004; Oosterling, van der Bij et al. 2008).

Alternativ können Mittel zur Adhäsionsprophylaxe eingesetzt werden. Durch die intraperitoneale Gabe von hochmolekularem Dextran konnte die Überlebenszeit der behandelten Versuchstiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren verlängert werden (Hagiwara, Sawai et al. 1997). Hyaluronsäure, welches ebenfalls zur Reduktion postoperativer Adhäsionen eingesetzt wird, zeigte in der Prävention der Peritonealkarzinose keine signifikante Reduktion der Tumorzelladhäsion und in einigen Fällen sogar eine Zunahme, was auf die Interaktion zwischen Hyaluronsäure und CD44 zurückgeführt wurde (Haverlag, van Rossen et al. 1999; Tan, Wang et al. 2001). Die intraperitoneale Applikation von Phospholipiden hingegen, so zeigen zahlreiche *in vitro*-, sowie Tiermodellarbeiten, hemmen die Adhäsion von Tumorzellen an das Peritoneum und haben damit einen positiven Einfluss auf die Reduktion der sekundären Peritonealkarzinose (Jansen, Treutner et al. 2004; Jansen, Treutner et al. 2005; Jansen, Jansen et al. 2006; Otto, Jansen et al. 2007).

1.3 Phospholipide

1.3.1 Physiologie

Phospholipide (PL) sind als bipolare Phosphorsäure-di-Ester natürlicher Bestandteil aller Zellmembranen und kommen in Flüssigkeiten als „Schmiermittel“ im Bereich der Peritonealblätter der Bauchhöhle, der Pleurablätter der Lunge, des Perikards des Herzens und in Gelenkhöhlen vor.

In der Peritonealhöhle werden Phospholipide von Mesothelzellen gebildet und in die Peritonealflüssigkeit sezerniert (Beavis, Harwood et al. 1994). Sie zeigen Surfactantartige, oberflächenaktive Eigenschaften, die sich durch ihre Polarität erklären lassen. Demnach binden Phospholipide mit ihren negativ geladenen Molekülanteilen an die positiv geladene Peritonealoberfläche (Beavis, Harwood et al. 1994; Chailley-Heu, Rubio et al. 1997). Anhand fluoreszenz- und elektronenmikroskopischer Bilder zeigte Hills die oligolamelläre Anordnung der Phospholipide, dessen Schichtaufbau und abriebfeste Struktur auf peritonealen Oberflächen (Hills 2002). Die Intensivste Anreicherung wurde am verletzten Mesothel beobachtet (Chen and Hills 2000).

Absorbiert werden PL ebenfalls durch das Mesothel. Nach chirurgischen Eingriffen und bei Entzündungen wurden erhöhte Absorptionsraten festgestellt (Chen and Hills 2000).

1.3.2 Adhäsionsprophylaxe

Irritationen des Peritoneums durch chirurgische Eingriffe, thermische Reize, Fremdkörper oder Infektionen, die mit einer Verletzung der mesothelialen Kontinuität einhergehen, resultieren in der Ausbildung peritonealer Adhäsionen (Thompson 1998). Postoperativ kommt es zur Reduktion der Aktivität von t-PA. Inflammatorische Zytokine, wie TNF, IL-1, IL-6 und Plasminogen Aktivator Inhibitoren sind erhöht. Aufgrund der ungleichen fibrinolytischen Aktivität werden die fibrinösen Adhäsionen organisiert und durch die Einwanderung von Fibroblasten kommt es zur Einlagerung von Kollagenen und folgend zur Formation von Adhäsionen. Dies führt zu dauerhaften fibrinösen Gewebsverbindung zwischen den ursprünglich vorhandenen Peritonealdefekten. Die Eigenschaften von PL, durch ihren oligolamellären Schichtaufbau am Peritoneum und ihre Abriebfestigkeit, geben die Möglichkeit vor, bei intraperitonealer Anwendung peritoneale Adhäsionen zu verringern bzw. zu verhindern (Ar'Rajab, Snoj et al. 1995). Weitere präklinische Arbeiten zeigen am Tiermodell die antiadhäsive Wirkung der Phospholipide auf peritoneale Verwachsungen (Muller, Treutner et al. 2003; Muller, Treutner et al. 2003; Butz, Muller et al. 2007). Die intensivste Anreicherung wurde am verletzen Mesothel beobachtet (Chen and Hills 2000). So reichen während der Heilungsphase nach Serosadefekten bereits geringe Mengen PL aus um das Peritoneum zu bedecken (Beavis, Harwood et al. 1994; Chailley-Heu, Rubio et al. 1997). Dabei ist die intraperitoneale Anwendung der PL unproblematisch. Sie sind gut verträglich und es kommt zu keinen nennenswerten Nebenwirkungen oder negativen Einflüssen auf die Wundheilung (Muller, Treutner et al. 2001; Jansen 2003).

Die Pathophysiologie der PK (s. Kapitel 1.2.1) zeigt Parallelen zur Entstehung von postoperativen Verwachsungen, im speziellen, der Schritt der Adhäsion. Bei der PK bilden sich Brücken zwischen der Tumorzelle und dem Peritoneum. Die Trennung von defektem Peritoneum und Tumorzelle lässt sich mit einer Trennung von defektem Peritoneum und Gewebe vergleichen.

Aufgrund der sehr guten Ergebnisse bei der Adhäsionsprophylaxe durch PL wurde die Wirkung intraperitoneal applizierter PL auf die intraperitoneale Tumorzelladhäsion mehrfach präklinisch *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei zeigten die Ergebnisse einstimmig, dass PL die Adhäsion freier Tumorzellen an das Peritonealmesothel, wie an die ECM erfolgreich reduzieren (Jansen 2003; Jansen, Treutner et al. 2004; Jansen, Treutner et al. 2005; Otto, Jansen et al. 2007), sowie negativen Einfluss nehmen auf die Ausprägung tumoraler Adhäsionsmoleküle (Jansen, Jansen et al. 2006).

2 Zielsetzung

Mit Erfolg wurde bereits anhand mehrerer Tierexperimenteller – und *in vitro*-Arbeiten die hemmende Wirkung von Phospholipiden auf die intraperitoneale Tumorzelladhäsion gezeigt und bestätigt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Phospholipiden auf die Invasion von Tumorzellen *in vitro* untersucht. Dabei orientierte sich die Arbeit an den folgenden Fragen:

- Beeinflussen Phospholipide die Migration von Tumorzellen *in vitro*?
- Reduzieren Phospholipide das Invasionspotential von Tumorzellen *in vitro*?
- Reduzieren Phospholipide das Invasionspotential von Tumorzellen durch eine HOMC (*Human Omentus Majus Cell*) Monolayerschicht?
- Ist der Einfluss der Phospholipide auf die Invasivität von Tumorzellen konzentrationsabhängig?

3 Material und Methodik

3.1 Material

Die verwendeten Materialien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet.

3.1.1 Chemikalien

- Aqua ad injectabilia PH. Eur., delta pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland
- *Cell Tracker*TM CM-Dil 1mg, Invitrogen-Molecular Probes Inc., Eugene, USA
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Merck, Darmstadt, Deutschland
- *Dulbecco's Phosphate buffered saline* (PBS), Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
- Ethanol 70% Merck, Darmstadt, Deutschland
- Gelatine 0,2%, Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Methanol, Apotheke, Universitätsklinikum RWTH Aachen
- Microscopy Hemacolor® Schnellfärbelösung – Lösung 1 Fixierlösung, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Microscopy Hemacolor® Schnellfärbelösung – Lösung 2 Farbreagenz rot, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Microscopy Hemacolor® Schnellfärbelösung – Lösung 3 Farbreagenz blau, Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.2 Biochemikalien

- Agarose, Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Fetales Kälber Serumprotein (FCS), Sigma Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Humanes Serum Protein (HSP), von gesunden Spendern, Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum RWTH Aachen
- L-Glutamin (29,20g/l), PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Penicillin/Streptomycin (10000U/ml bzw. 10mg/l), PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

- Trypsin-Fertiglösung 2,5%, Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland

3.1.3 Zellen

Humane kolorektale Karzinomzellen der Linie HRT-18 bezogen aus der *Japanese Cancer Research Resources Bank* (Tokio, Japan).

Primäre *human Omentum Majus Cells* (HOMC) aus elektiven Laparotomien am Universitätsklinikum Aachen.

Für die Versuchsreihen wurden ausschließlich Zellen der Passage 99-105 (HRT-18) bzw. 1-2 (HOMC) verwendet.

3.1.4 Nährmedien und Gebrauchslösungen

- EDTA-Stammlösung 2,5%:

Nach Lösung von 2,5g EDTA in 90 ml PBS wurde der pH-Wert mittels 4N NaOH auf pH 7,55 eingestellt, um dann die Lösung auf 100ml mit PBS aufzufüllen, steril zu filtrieren und zu portionieren.

- Standardkulturmedium HRT-18:

Zu 450 ml RPMI 1640 wurden 50 ml fetales Kälberserum, 4 ml Penicillin/ Streptomycin und 4 ml L-Glutamin zugesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

- Standardkulturmedium HOMC:

450 ml RPMI 1640 wurden mit 50 ml humanem Serumprotein sowie 4 ml Penicillin/ Streptomycin und 4 ml L-Glutamin vermischt und bei 4°C gelagert.

- Trypsinlösung 0,05%:

20 ml EDTA-Stammlösung wurden mit 20 ml Trypsin-Fertiglösung und 160 ml Aqua bidest (*Aqua ad injectabile*) vermengt, steril filtriert, portioniert (6ml) und bei -20°C gelagert.

3.1.5 Sonstiges

3.1.5.1 Phospholipidemulsion

Die Phospholipide stammen von der Firma Fresenius-Kabi, Deutschland und wurden als 9%ige Emulsion geliefert. Für die Versuche wurden zwei verschiedene Konzentrationen der Phospholipidemulsion hergestellt, um eine eventuell vorhandene Relation zwischen Konzentration und Migrationspotential der Tumorzellen erkennen zu können.

Die Ausgangslösung wurde mit auf 37°C erwärmtem Standardkulturmedium auf 2%ige und 0,2%ige Arbeits-Lösungen zur weiteren Verwendung verdünnt. Die Lösungen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen hergestellt und bei 20°C gelagert.

3.1.5.2 BD Matrigel Basement Membrane Matrix

Matrigel ist ein aus einem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkom extrahiertes Proteingel. Das Gel bietet die Möglichkeit einer Imitation der Extrazellulärmatrix *in vitro*. Es besteht aus einer Proteinkonzentration von 10-12 mg/ml mit den Hauptkomponenten Laminin, Kollagen IV, Heparansulfatproteoglykanen und Entactin. Matrigel wurde von Becton Dickinson Biosciences in gefrorenem Zustand auf Trockeneis geliefert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Es ist bei 4°C flüssig und erstarrt bei 22-35°C.

3.1.5.3 Nuclepore Polycarbonate Filter

Es wurden die Polycarbonatfilter der Firma Whatman benutzt. Es wurde ein Porendurchmesser von 8 µm gewählt, damit eine Migration der Zellen einer Größe von 12-20 µm ermöglicht werden konnte. Die Filter hatten eine matte Oberseite und eine glänzende Unterseite. Sie wurden zwischen die beiden Kompartimente der Boydenkammer (s.a. 3.2.2.1) mit der matten Seite nach oben eingespannt.

3.1.5.4 Cell Tracker

Der *Cell Tracker* (1mg) wurde von Molecular Probes Inc. in Pulverform bei -20°C geliefert. Das Pulver wurde in 1 ml DMSO auf dem Schüttler gelöst und in Einzelportionen zu je 10 µl bei -20°C gelagert. Die Einzelportionen konnten für die Zellmarkierung dann aufgetaut werden um in 10ml Standardkulturmedium gelöst zu werden. Aufgrund der geringen Konzentration von DMSO war keine Zelltoxizität zu beobachten. Für die Markierung wurde eine Konzentration von 1µg/ml Standardkulturmedium benutzt, welches zu jedem Versuch neu hergestellt wurde.

- Begasungsbrutschrank, Typ BB6220 CU 02, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Boydenkammer, Neuro Probe Inc., USA

3 Material und Methodik

- Deckgläser, 24x60 mm, Automat Star, Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Deutschland
- Cellcounter CASY®1 Modell TT, Schäfer System, Reutlingen, Deutschland
- Fotokamera, Fuji Typ S304, Japan
- Gewebekulturflaschen, 75 cm², 250ml Volumen, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland,
- Heizplatte/Magnetrührer IKA-Combimac RCT, Janke & Kunkel GmbH&Co.KG, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Objektträger, Mattrand, 76x26 mm, R. Langenbrick, Emmendingen, Deutschland
- Präzisionswischtücher, KIM TECH, 4,8x8,4 mm, Kimberly-Clark GmbH, Koblenz, Deutschland
- Schüttelwasserbad, Typ 1083, GFL, Burgwedel, Deutschland
- Transwell®-Platten, 6 *well*, 8µm Porendurchmesser Polycarbonatfilter *Inserts*, Corning Inc., USA, #3428
- Vortex MS2 Minishaker, Janke & Kunkel GmbH&Co. KG, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Wärmeschrank, Typ B6120, Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- Zentrifuge, Megafuge 1.0 (Rotor: BS4402/A), Heraeus Sepatech GmbH, Osterode Deutschland
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, Polypropylen, konischer Boden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen 50 ml, Polypropylen, konischer Boden, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

3.2 Methodik

3.2.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten mit den Tumorzellen und primären Zellen wurden unter sterilen Bedingungen, d.h. unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien, wie Glasgefäße, Glaspipetten und Metallmaterialien wurden zuvor im Sterilisator bei 210°C über Nacht und Plastikmaterialien im Autoklaven bei 121°C sterilisiert.

3.2.1.1 Auftauen der Tumorzellen

Das Standardkulturmedium RPMI 1640 wurde im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt. Die Darmtumorzellen HRT-18 wurden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (Passage 96) gelagert. Die tiefgefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C angetaut und sobald eine Resteiskugel sichtbar wurde, wurde die Außenseite mit 70%igem Ethanol desinfiziert, anschließend der Inhalt in ein Zentrifugenröhrchen transferiert und mit 20ml Standardkulturmedium vermengt. Bei 1200 U/min (Rotortyp: BS4402/A) nach zehnminütiger Zentrifugation bildete sich am Röhrchenboden ein sichtbares Zellsediment. Der Überstand wurde verworfen, das Zellsediment in 10 ml Standardkulturmedium resuspendiert und die Suspension anschließend in eine Kulturflasche überführt. Die Zellen wurden in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und 10% O₂ bei einer konstanten Temperatur von 37°C im Brutschrank gelagert. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um mögliche Reste des toxischen DMSO zu entfernen.

3.2.1.2 Tumorzellexpansion

In Abstand von 2 bis 3 Tagen wurde das Kulturmedium gewechselt, um ein optimales Wachstum / Proliferation der Zellen zu garantieren. Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium aus der Kulturflasche vorsichtig abgesaugt und gegen 10 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Standardkulturmedium ausgetauscht. Vor jedem Mediumwechsel erfolgte eine mikroskopische Kontrolle des Zellwachstums und der Zellmorphologie.

3.2.1.3 Passagieren der Tumorzellen

Nach 4 bis 9 Tagen war der Boden der Kulturflasche mit einem konfluenten Tumorzellrasen bewachsen. Daraufhin wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:3 passagiert. Hierzu erfolgte zunächst das Absaugen des Mediums. Im Anschluß wurden die Zellen vom Kulturflaschenboden gelöst. Dazu wurden in die Kulturflasche 4 ml 0,05%iger Trypsinlösung gegeben und für ca. 3 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die Überprüfung der Ablösung der Zellen erfolgte mikroskopisch, um bei vollständiger Ablösung die Trypsinwirkung mittels 6 ml 37°C warmen Standardkulturmedium zu inaktivieren und anschließend die resultierende 10 ml Suspension in ein Zentrifugenröhrchen zu überführen. Diese wurde bei 1200 U/min (Rotortyp: s.o.) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde

danach verworfen, das Zellsediment in 30 ml Kulturmedium resuspendiert und je 10 ml dieser Zellsuspension in eine Kulturflasche überführt.

3.2.1.4 Isolation von humanen *Omentum Majus Cells* (HOMC)

Aus elektiven Laparotomien wurde eine ca. 3 cm² große humane Gewebeprobe (*Omentum majus*) entnommen. Diese wurde mit 4 ml Trypsin-Lösung und 16ml PBS in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad, unter ständiger Bewegung erwärmt. Anschließend wurde die Gewebeprobe aus dem Röhrchen entfernt und 20 ml Standardkulturmedium (für HOMC) dazugegeben. Nach zehnmünütiger Zentrifugation bei 1200 U/min (Rotortyp s.o.) wurde der Überstand verworfen, das abgesetzte Zellsediment in 10ml frischem Medium resuspendiert und in eine mit 0,2%iger Gelatine beschichtete Kulturflasche gegeben. Die Gelatine wurde zuvor abgesaugt. Die Lagerung erfolgte im Brutschrank bei 37°C, mit einer Begasung von 5% CO₂- und 10% O₂.

3.2.1.5 Zellkultivierung und Passagieren von HOMC

Die Zellen wurden in einem Abstand von 2 bis 3 Tagen, wie unter 3.2.1.2 bereits für die Darmtumorzellen beschrieben, mit frischem Medium versorgt.

Nach etwa 8 bis 10 Tagen bildeten die Zellen einen konfluenten Zellrasen am Boden der Kulturflasche, der, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, im Verhältnis 1:3 passagiert wurde.

3.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Mit dem elektronischen Zellzählgerät CASY 1 Modell TT, welches auf einem Widerstandsmessprinzip basiert und kombiniert mit einer Pulsflächenanalyse arbeitet, kann die Zellzahl einer Zellsuspension ermittelt werden. Die Zellen werden in isotoner Elektrolytlösung suspendiert und durch eine Messkapillare gesaugt, an die über zwei Platinelektroden eine elektrische Spannung angelegt wird. Sobald eine Zelle in die Kapillare eindringt, entsteht ein elektrischer Impuls. Die von den Zellen verursachten Impulse werden nach ihrer Größe differenziert. Die Impulsfläche ist proportional zum Zellvolumen. Dieses Prinzip erlaubt eine Aussage über die Größe der Zellen, wodurch zwischen toten und lebenden Zellen differenziert werden kann. Bei geschädigter Zellmembran, wie bei einer toten Zelle, wird nur der Zellkern bzw. Zellmembranfragmente gemessen, womit die Zelle bei der Zählung aufgrund ihrer geringeren Größe nicht berücksichtigt wird. Nach dem Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden mittels Trypsin (s.o. 3.2.1.3) wurden 100 µl Zellsuspension zu 10 ml CasyTon-Lösung gegeben und die Gesamtzellzahl der Ausgangssuspension ermittelt. Durch die nun bekannte Gesamtzahl der Zellen konnte für die Versuche eine gewünschte Zellzahl pro ml Standardmedium eingestellt werden.

3.2.2 Versuche

Die Versuche wurden im Dreifachansatz in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt (n=3).

3.2.2.1 Boydenkammer und modifiziertes Boydenkammer System

Die Boydenkammer besteht aus einem oberen, 800 μl fassendem Kompartiment und einem unteren Kompartiment welches 210 μl Flüssigkeit fasst. Wie in Abbildung 8 zu erkennen ist, wurde zwischen den verschraubbaren Kompartimenten ein Filterpapier (hier: Nuclepore Polycarbonate Filter, 8 μm Porendurchmesser) eingespannt. Das Invasionspotential der Tumorzellen konnte mittels kombinierter Matrigel-Boydenkammer Technologie *in vitro* untersucht werden. Vor jedem Versuch wurde die Kammer mit 70%igen Ethanol sorgfältig gesäubert und anschließend luftgetrocknet, so dass sich keine Ethanolreste in der Kammer befanden.

Bei den Versuchen Invasionsassay durch HOMC-Monolayerschicht (vgl. 3.2.2.5) wurde ein modifiziertes Boydenkammersystem verwendet. Die 6er Kavitäten Transwell-Platten der Firma Corning Inc., USA wurden steril verpackt mit 8 μm Porendurchmesser Polycarbonatfilter Einlagen (*Inserts*, oberes Kompartiment) geliefert. Diese wiesen eine Filterfläche von 4,7 cm^2 auf. Die Benutzung der Transwell®-Platten ermöglichte die mikroskopische Kontrolle des HOMC-Monolayers.

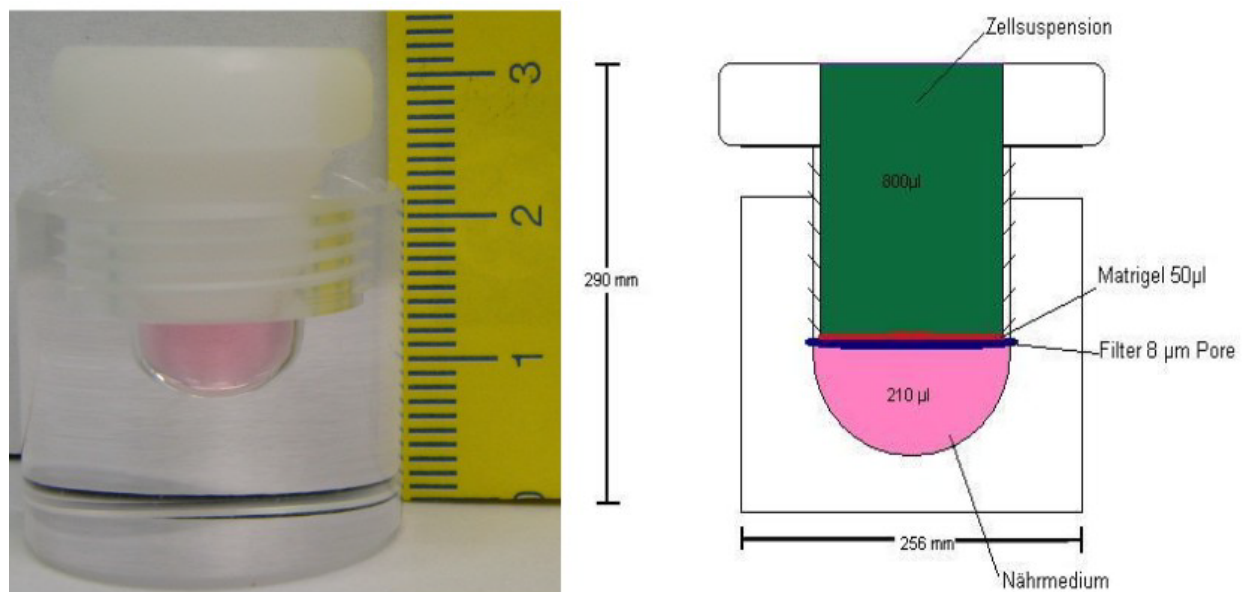


Abbildung 8: Das Boydenkammer-System, links Fotografie, rechts Schemazeichnung

3.2.2.2 Migration durch Filter ohne Matrigel-Beschichtung

In dieser Versuchsreihe sollten Tumorzellen durch einen Filter in der Boydenkammer migrieren. Dazu wurden die Tumorzellen in Medium, welches verschiedene Konzentrationen an Phospholipiden (PL) enthielt, in das obere Kompartiment der Kammer gegeben. Eine Versuchsreihe bestand aus neun Boydenkammern. Je drei Kammern mit 0,1 %iger Phospholipidlösung, 1%iger Phospholipidlösung und einer Kontrolle (Medium ohne Phospholipidzusatz). Das untere Kompartiment wurde mit 210 μl Standardkulturmedium befüllt. Als nächstes wurde der Filter mit Hilfe einer Pinzette in den Zwischenraum gelegt,

woraufhin die Kammern fest verschlossen und das obere Kompartiment, mit den mit 400 μ l Phospholipidemulsion bzw. Standardkulturmedium (Kontrollgruppe) vorbehandelten 400 μ l Zellsuspension, befüllt wurde (Gesamtvolumen 800 μ l). Für diesen Migrationsversuch wurde eine Zellzahl von 100.000 Zellen/ml eingesetzt. Die Boydenkammern wurden für 6 h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 10% O₂) inkubiert. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden zunächst 750 μ l Zellsuspension-PL-Mischung bzw. Zellsuspension (Kontrolle) abgesaugt, die Kammern aufgeschraubt sowie der Filter mittels Pinzette herausgenommen und der Filter dreifach mit der Oberseite über ein Präzisionswischtuch gestrichen um mögliche Zellen auf der Filteroberseite zu entfernen, die die Auszählung beeinflussen könnten. Zuletzt wurden diese Filter gefärbt (3.2.3.1), fotografiert und die Tumorzellen auf der Filterunterseite gezählt (3.2.3.2).

3.2.2.3 Invasionsassay mit Matrigelbeschichtung

Diese Versuchreihe wies einen identischen Versuchsaufbau auf, wie bereits unter 3.2.2.2 beschrieben. Der Unterschied war die Verwendung des Matrigel, welches zur Beschichtung des Polycarbonat-Filters genutzt wurde.

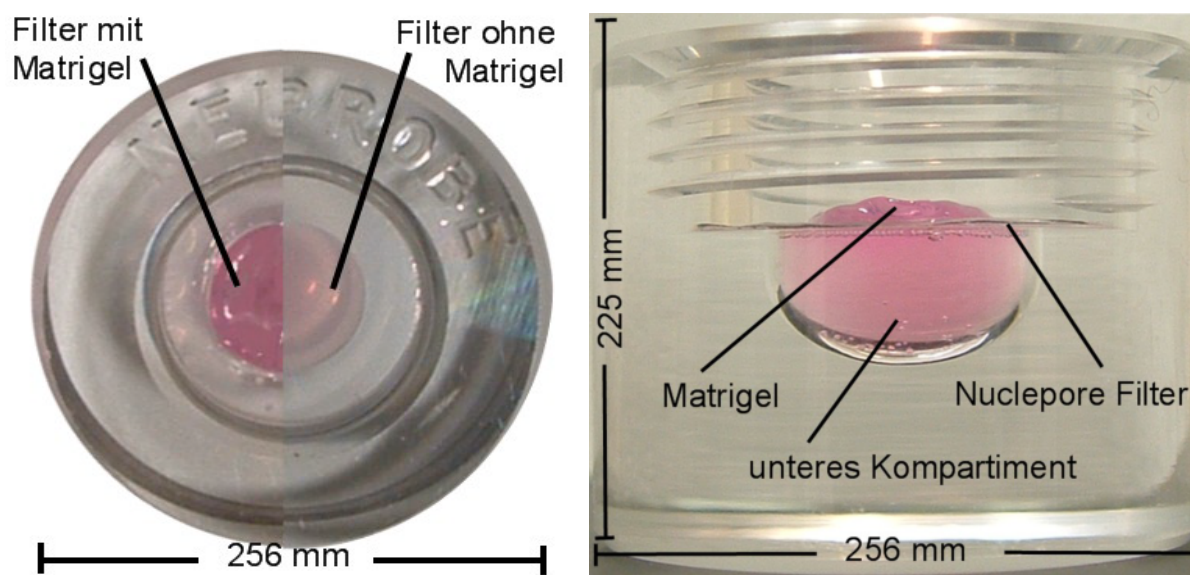


Abbildung 9: Boydenkammer-System, links: Boydenkammer von oben, rechts: Boydenkammer seitlich

Zu Anfang wurde das Matrigel über Nacht von -20°C im Eiswasserbad aufgetaut. Um eine mögliche vorzeitige Erstarrung des Gels zu verhindern, wurden alle Arbeitsmaterialien vorgekühlt und anschließend das Gel im Verhältnis 1:3 mit serumfreiem Standardkulturmedium verdünnt. Mit je 50 μ l des vorverdünnten Gels wurden die Filter beschichtet, unter vorsichtigen kreisförmigen Bewegungen der Kammer, um eine gleichmäßige Verteilung des Gels zu gewährleisten. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur war das Gel makroskopisch gut sichtbar verteilt und erstarrt (s. Abbildung 9) und die Kammer konnte für den Invasionsversuch eingesetzt werden. Hierzu wurde eine Zellzahl von 200000 Zellen/ml benutzt, bei einer Versuchslaufzeit von 24 Stunden.

3.2.2.4 Filter im Querschnitt

Zur mikroskopischen Darstellung und Veranschaulichung des Versuchsaufbaus in 3.2.2.3, wurden Filter nach Durchführung des Versuchs in Methanol fixiert und in 1,5% Agarosegel gegossen. Dazu wurden 7,5 g Agarose in 500 ml *Aqua ad Injctabilia* (Aqua dest.) gegeben und das Gemisch aufgeköcht. Nachdem die Filter in einer Kavitätenplatte ausgelegt und diese vorsichtig vom Rand mit Methanol bis zur vollständigen Bedeckung der Filter befüllt wurde, wurden die Filter nach dreiminütiger Einwirkzeit des Methanols in Agarosegel gegossen, welches zuvor auf einer Heizplatte unter ständigem Rühren bis zur vollständigen Verflüssigung erwärmt, anschließend auf 50°C abgekühlt und in eine Kavitätenplatte gegeben wurde. Es wurde darauf geachtet, dass die Filter mittig im Agarosegel platziert wurden. Das erstarrte Gel wurde so mit einem Skalpell geschnitten, das man einen Querschnitt durch Filter, Matrigel und Zellschicht erhielt. Die auf diese Weise vorbereiteten Gel-Filter-Stücke wurden in Alkohol entwässert und in Paraffin geblockt, um diese dann im Dünnschnittverfahren zuzuschneiden. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger gebracht, HE gefärbt und mit Deckgläsern verschlossen.

3.2.2.5 Invasionsassay durch HOMO-Monolayerschicht

Bei dieser Versuchsreihe wurden neben den Tumorzellen auch HOMO eingesetzt, wobei beide Zelltypen voneinander unterschieden werden sollten. Deshalb wurde die Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt, da die Tumorzellen 24 h vor Versuchsbeginn mit *Cell Tracker* (s. 3.1.5.4) markiert wurden. Dann wurden die Transwell Filter mit Matrigel mittels der s.g. *Thin Coating Method* beschichtet. Das Gel wurde hierzu, identisch der unter 3.2.2.3 erwähnten Anleitung, im Verhältnis 1:5 mit serumfreiem Medium verdünnt, daraufhin 100 µl dieses Gel-Medium-Gemisches auf die Filter gegeben und unter kreisförmigen Bewegungen die gleichmäßige Verteilung erzielt. Nach einer Stunde Einwirkzeit wurde das Gel mit 1,5 ml serumfreiem Medium gespült. Die Einsätze wurden mit einer Pinzette aus den Platten genommen, die unteren Kompartimente mit 2,6 ml Standardkulturmedium für HOMO beimpft und die Einsätze anschließend wieder eingefügt. Auf die vorbereiteten beschichteten Filter wurden HOMO in einer Konzentration von 400000 Zellen/ml ausgesät und im Brutschrank für 45 min inkubiert. Danach wurden die Filter mit 1,5 ml PBS gespült, um die nicht adhären Zellen zu entfernen. Es folgte eine mikroskopische Kontrolle der Monolayerschicht für jeden Filter. Darauffolgend wurden die markierten Tumorzellen in einer Konzentration von 200000 Zellen/ml mit der Kontrolle (0%), 0,1% und 1% PL-Emulsion vermischt und in der Menge von 1,5 ml in das obere Kompartiment des Transwell-Systems überführt. Die Inkubationszeit im Brutschrank (37° C, 5% CO₂, 10% O₂) betrug bei diesem Versuch 24 h. Danach wurde die Zellsuspension vorsichtig abgesaugt, die Filtereinlagen aus den Transwell-Platten herausgenommen und die Filter mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells aus den Einsätzen herausgeschnitten. Die Filter wurden anschließend mit 1 Tropfen PBS versehen und mit Deckgläsern auf den Objektträgern verschlossen. Bis zur mikroskopischen Auswertung mussten die Filter dunkel aufbewahrt werden. Die Fotos wurden mittels Fluoreszenzlampe unter blauem Licht bei 250-facher Vergrößerung erstellt.

3.2.3 Auswertung

3.2.3.1 Färbung der migrierten Zellen

Für die Färbung der sich auf dem Filter befindlichen Zellen wurden die Schnellfärbelösungen Microscopy Hämacolor 1 bis 3 der Firma Merck verwendet. Die in einem Färberahmen eingespannten Filter wurden für jeweils eine Minute in die verschiedenen Lösungen, in der Reihenfolge: 1. Fixierlösung, 2. Färbelösung Nummer 1, 3. Färbelösung Nummer 2, getaucht und anschließend mit der unteren Filterseite nach oben auf Objektträgern gelegt. Nachdem jeder Filter mit je einem Tropfen PBS-Lösung benetzt wurde, wurden die Filter mit Deckgläsern und Fixiergummi verschlossen.

3.2.3.2 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mittels Mikroskop, indem die Filter je fünf Mal an randomisierten Stellen fotografiert wurden. Die Zellen auf den Fotografien wurden gezählt und weiteren Berechnungen zugeführt. Die angefärbten Zellen auf dem Filter der Versuche 3.2.2.2 und 3.2.2.3 waren bei 100-facher Vergrößerung gut sichtbar (s. Abbildung 13 und Abbildung 14).

3.2.3.3 Statistik

Sämtliche Daten wurden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Test für unabhängige Stichproben, mit welchem beurteilt wurde, ob die Mittelwertunterschiede der beiden Stichproben auf zufälligen Schwankungen oder auf systemischen Unterschieden beruhten. Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet. (s. Abbildung 10, Abbildung 11 und Abbildung 15) Die Auswertung der Daten und die graphische Darstellung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism Version 5.

4 Ergebnisse

Für die Versuche wurden jeweils dreimal drei Filter pro PL-Konzentration mit je fünf Gesichtsfeldern (GF) pro Filter ausgezählt.

4.1 Tumorzellmigration durch Filter

Nach einer Versuchszeit von 6 h wurde für die Gruppe PL 0,1% eine mittlere Zellzahl von $26,1 \pm 16,7$ Zellen/GF ausgezählt und für Gruppe PL 1% eine mittlere Zellzahl von $16,3 \pm 3,2$ Zellen/GF ermittelt. Die Kontrollgruppe zeigte eine mittlere Zellzahl von $42,0 \pm 14,5$ Zellen/GF.

Die statistische Auswertung ergab in der Gruppe PL 1% eine signifikante Reduktion der Tumorzellmigration im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0399$). Der Vergleich der Resultate der Kontrollgruppe mit den Ergebnissen der 0,1% PL-Gruppe zeigte eine tendenzielle Reduktion der Zellzahl unter PL, jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,2793$). Es konnte kein signifikanter Unterschied der Reduktion der Zellen in den PL-Gruppen untereinander gezeigt werden ($p=0,3740$).

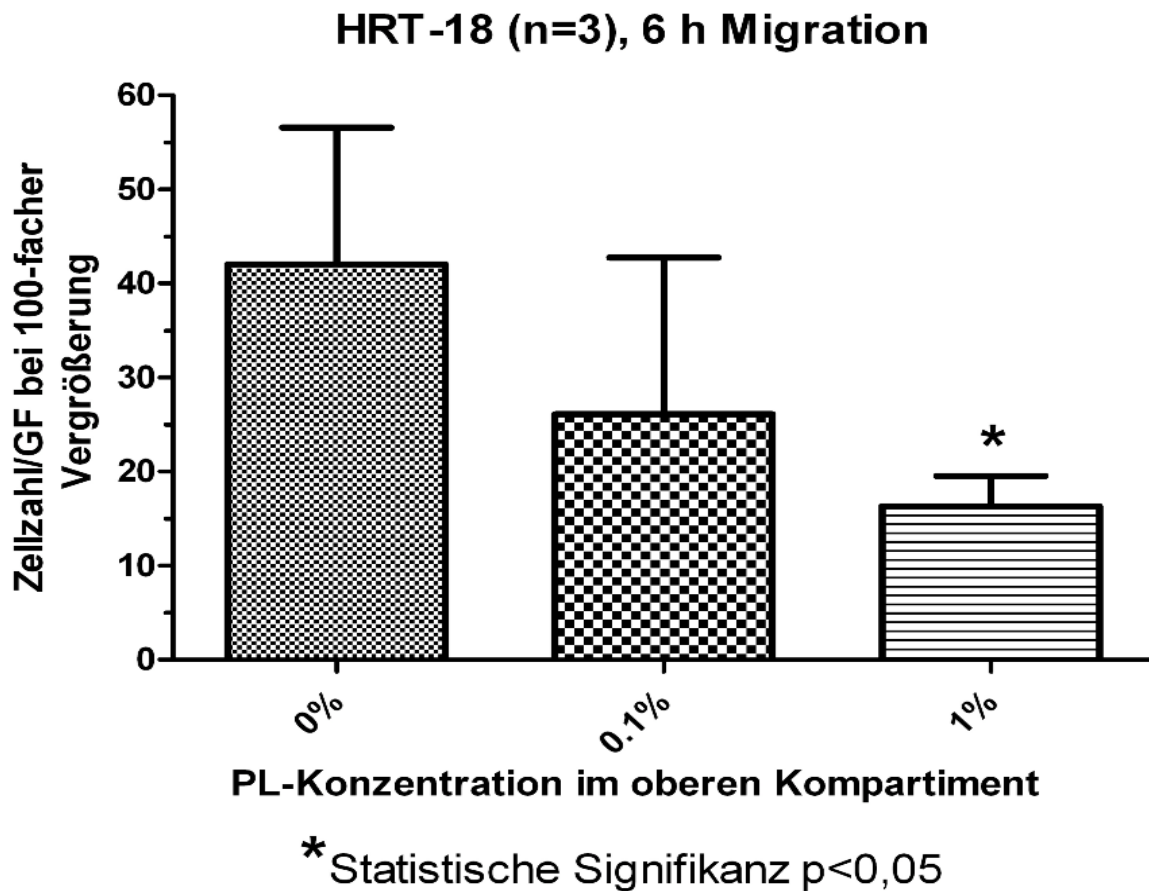


Abbildung 10: Zellzahl/GF nach 6 h Versuchslaufzeit; Boydenkammer Assay

4.2 Tumorzellinvasionsassay durch Matrigelbeschichtete Filter

Nach einer Inkubationszeit von 24 h betrug die mittlere Zellzahl für die Kontrollgruppe $116,6 \pm 9,6$ Zellen/GF. Die Behandlung der Tumorzellen mit 0,1%iger Phospholipidkonzentration ergab eine Reduktion der mittleren Zellzahl auf $50,3 \pm 18,8$ Zellen/GF. Unter Zugabe 1%iger PL-Emulsion wurde eine Reduktion der mittleren Zellzahl auf $28,4 \pm 12,2$ Zellen/GF erhoben. Die Ergebnisse für beide PL-Konzentrationen entsprachen statistisch signifikanten Reduktionen der Invasivität der Tumorzellen im Vergleich zur Kontrolle, mit dem errechneten Werten von $p=0,0055$ für die 0,1% PL-Gruppe und $p=0,0006$ für die 1% PL-Gruppe. Der Vergleich der 0,1%igen und 1%igen PL-Gruppen miteinander, ergab keinen signifikanten Unterschied ($p=0,1651$)

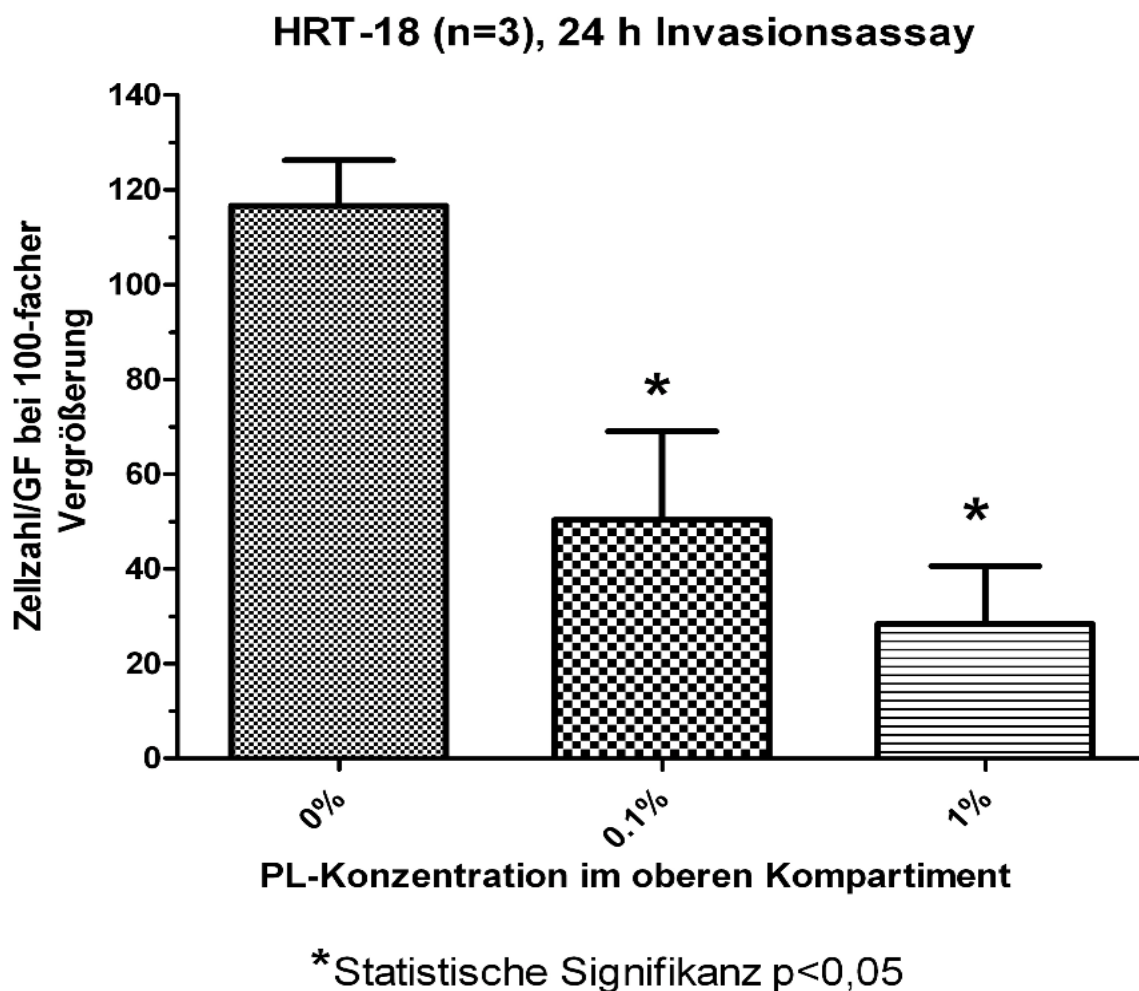


Abbildung 11: Zellzahl/GF nach 24 h Invasionsassay; Matrigelbeschichteter Filter

Die Abbildung 12 zeigt den mikroskopischen Aufbau dieses Versuches. Zu erkennen sind im Querschnitt der Filter, die Matrigelschicht und die, sich in den verschiedenen Stadien der Migration, darin befindlichen Tumorzellen. Diese sind aufgrund der Zellkerne, sowie der

4 Ergebnisse

unterschiedlichen Mitosestadien, im Querschnitt gut zu erkennen. Die Fixierung, wie die Entwässerung bedingen, dass das Gel am ursprünglichen Volumen optisch einbüsst.

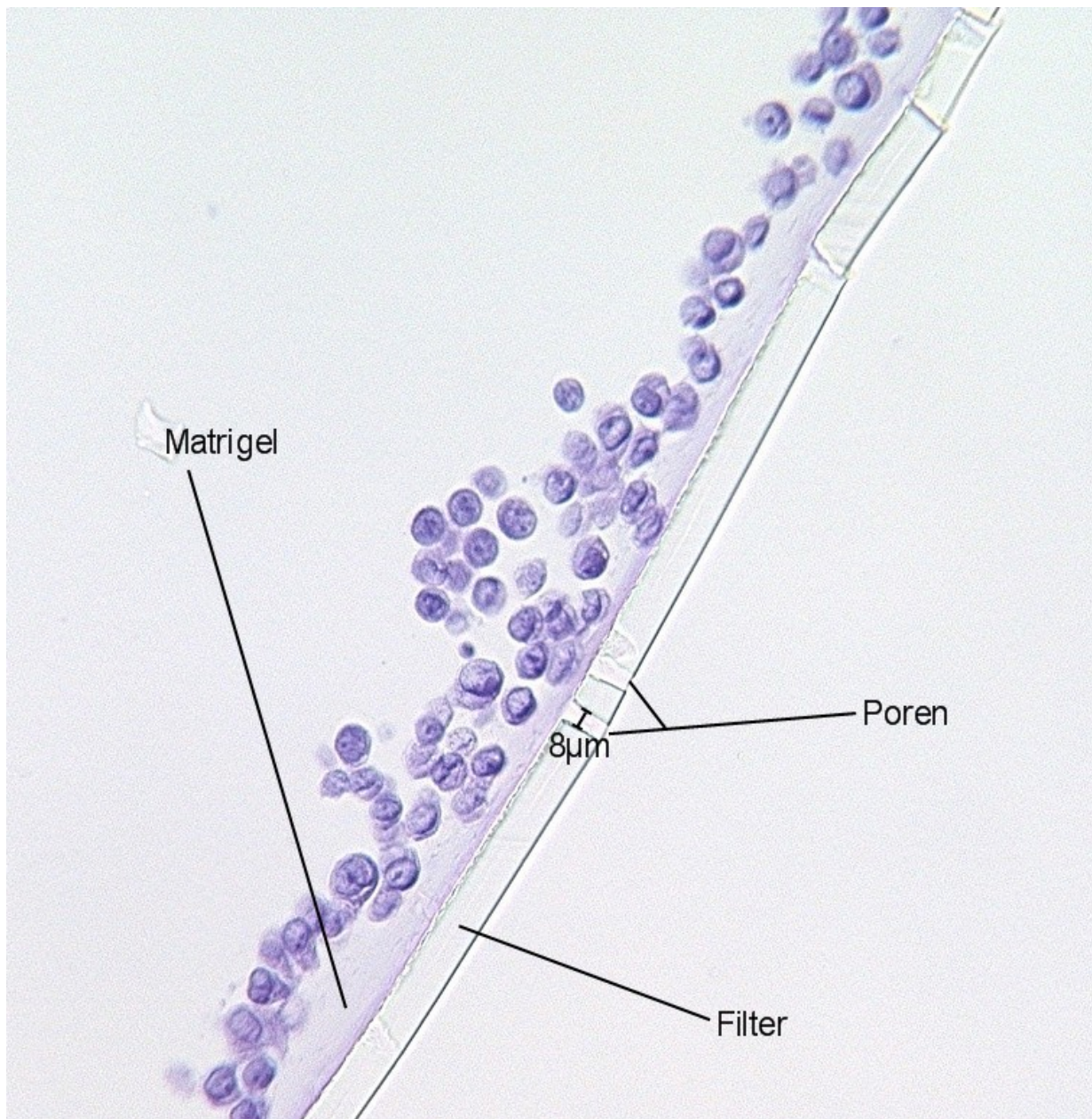


Abbildung 12: Versuchsaufbau im Querschnitt, 400-fache Vergrößerung, Photo

Die mikroskopische Betrachtung der Unterseite der Filter nach dem Invasionsversuch und der Färbung zur Auswertung sind in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt.

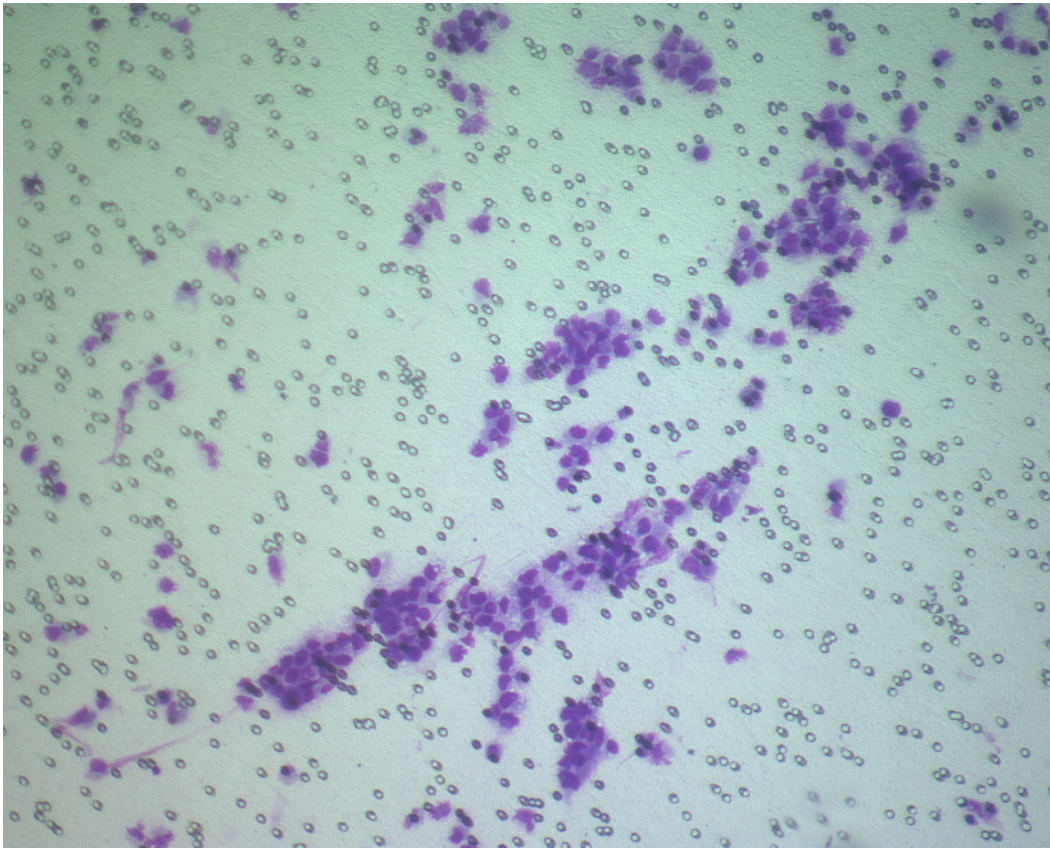


Abbildung 13: Filter Invasionsassay, 100-fache Vergrößerung, Kontrolle

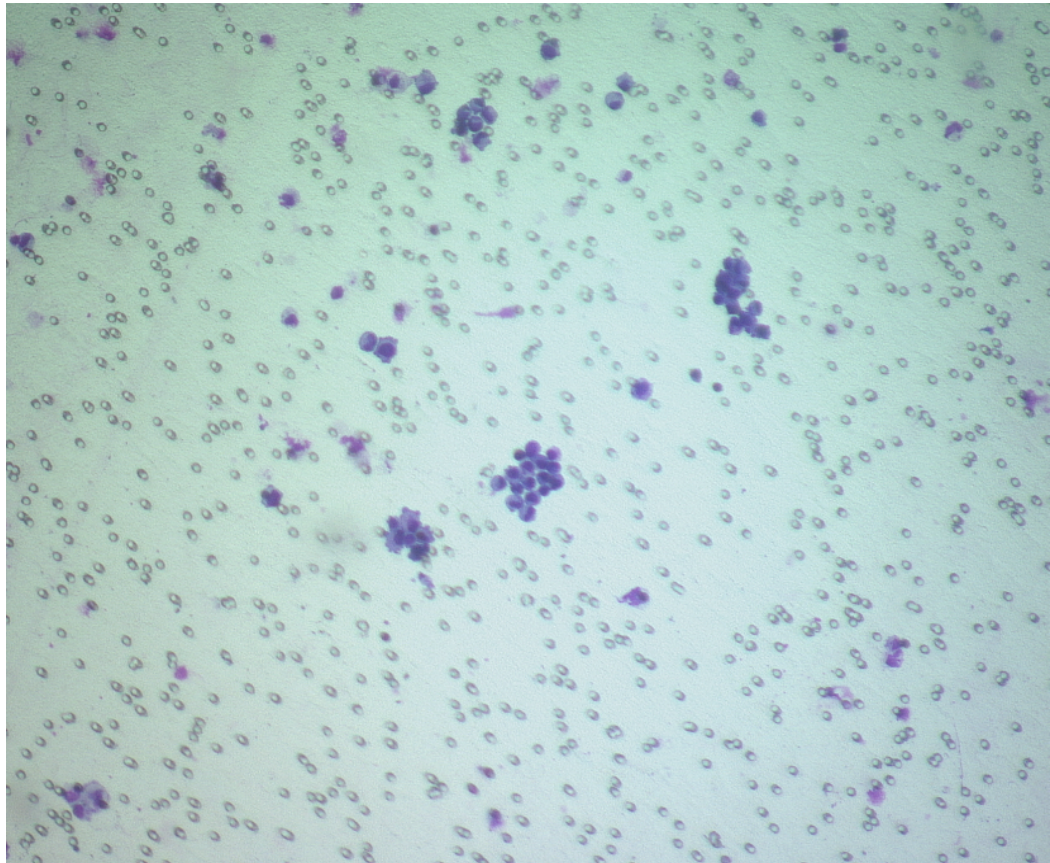


Abbildung 14: Filter Invasionsassay, 100-fache Vergrößerung, 1%ige PL-Emulsion

4.3 Tumorzellinvasionsassay durch HOMC-Monolayerschicht

Die Kontrollgruppe wies eine mittlere Zellzahl von $104,5 \pm 14,7$ Zellen/GF auf. Sowohl die 0,1% PL-Gruppe mit einer mittleren Zellzahl von $73,8 \pm 4,2$ Zellen/GF, als auch die 1% PL-Gruppe mit einer mittleren Zellzahl von $9 \pm 7,1$ Zellen/GF zeigten eine statistisch signifikante Reduktion der Passage der Tumorzellen durch die HOMC-Monolayerschicht im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,1% PL-Gruppe: $p=0,0256$; 1% PL-Gruppe: $p=0,0005$). Der Vergleich der beiden PL-Gruppen miteinander zeigte ebenfalls einen statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,0002$).

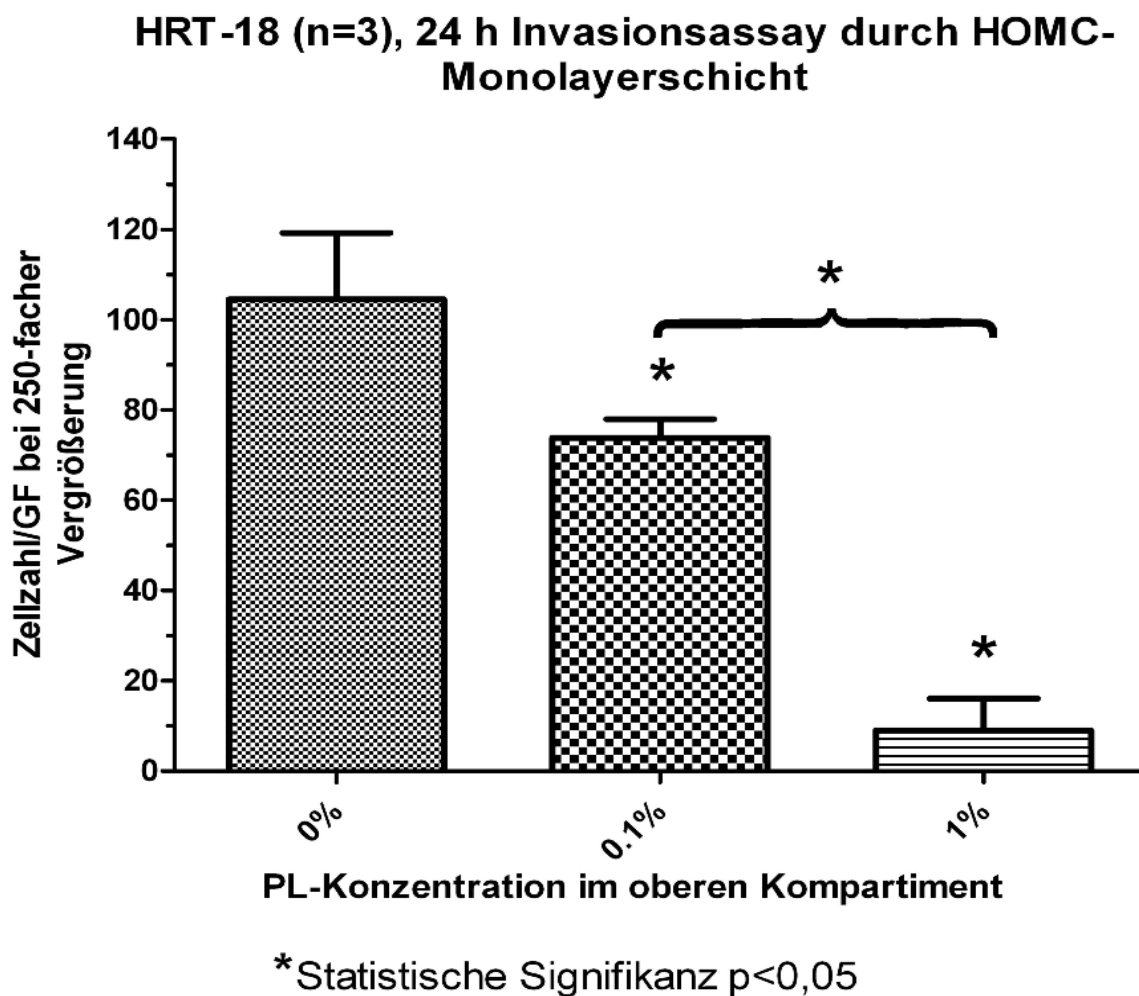


Abbildung 15: Zellzahl/GF nach 24 h Inkubation; Filter mit HOMC-Monolayer

Die Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen mikroskopische Aufnahmen der zur Auswertung herangezogenen Gesichtsfeldauschnitte der Unterseite der Filter nach den Versuchen bei 250-facher Vergrößerung. Mittels *Cell Tracker* stellen sich die markierten Tumorzellen fluoreszierend dar.

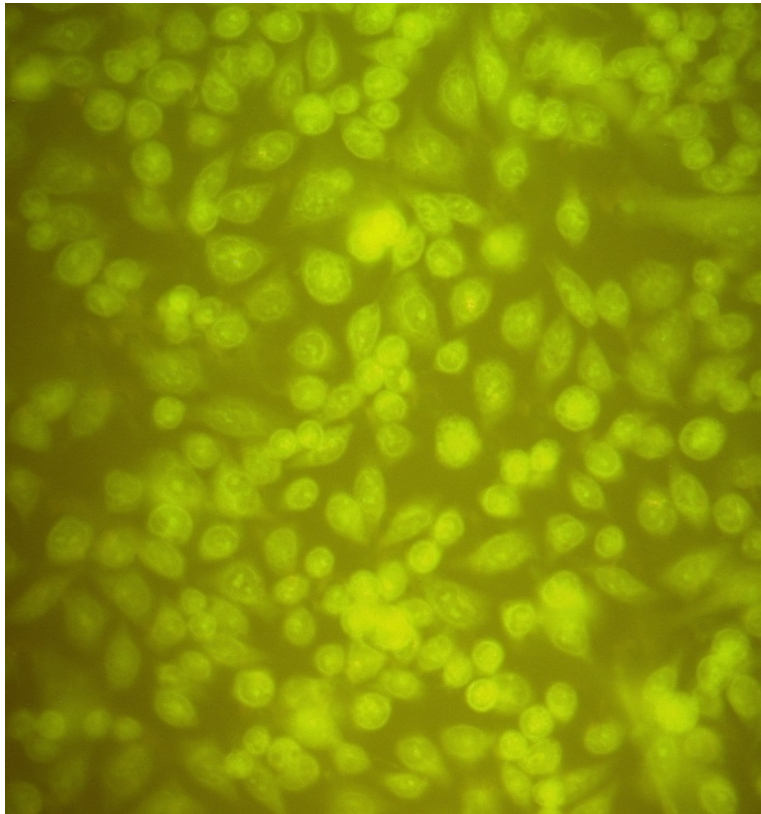


Abbildung 16: Filter mit Fluoreszenzmarkierten Tumorzellen, 250-fache Vergrößerung, Kontrollgruppe

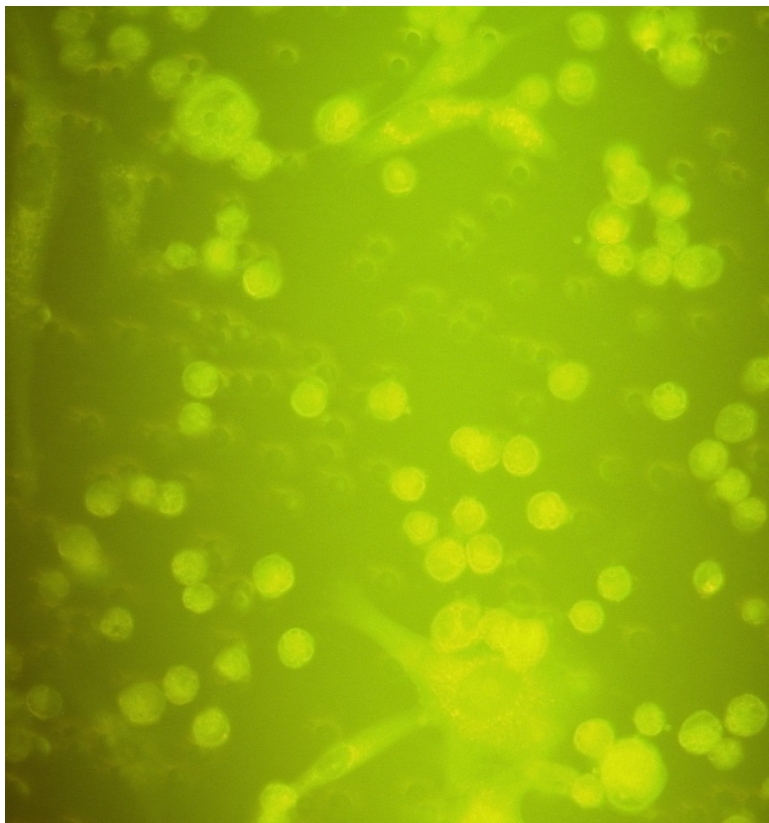


Abbildung 17: Filter mit Fluoreszenzmarkierten Tumorzellen, 250-fache Vergrößerung, 1%ige PL-Emulsion

5 Diskussion

Die Entstehung von Peritonealkarzinose ist ein multifaktorielles Geschehen, wobei Adhäsion an und Invasion des Peritoneums durch Tumorzellen wesentliche und grundlegende Schritte darstellen.

Der zurzeit in Zentren praktizierte therapeutische Ansatz der multimodalen Behandlung der PK nach Sugarbaker, bestehend aus zytoreduktiver Chirurgie kombiniert mit intraperitonealer Chemotherapie, zeigt in zahlreichen Studien unterschiedlicher Architektur verbesserte Überlebenszeiten, wie auch in der bis dato einzigen randomisierten, prospektiven Studie von Verwaal, in der sie die mediane Überlebenszeit ihrer Patienten nahezu verdoppeln (Verwaal, van Ruth et al. 2003; Verwaal, van Ruth et al. 2005; Verwaal, Bruin et al. 2008). Besteht aber die PK, bleibt diese Therapie *Ultima ratio*.

Aus diesem Grund sollte die Prävention der PK bereits mit der Therapie des Primärtumors beginnen, denn die PK ist eine häufige Todesursache bei Patienten mit resezierten intraabdominellen Primärtumoren und die Tumorzellpersistenz in der Abdominalhöhle und im Becken für den Tod von 30%- 50% der Patienten verantwortlich, die an den Folgen der Primärerkrankung sterben (Sugarbaker 1999; Pilati, Rossi et al. 2001). Schott et al. erbrachten den Nachweis, dass bereits vor einer Operation intraperitoneal freie Kolonkarzinomzellen (FPTC) zu detektieren sind und dass diese einen ungünstigen prognostischen Faktor darstellen (Schott, Vogel et al. 1998). Bei annähernd einem von vier Patienten mit einem kolorektalen Karzinom werden freie Tumorzellen vor der Resektion des Tumors in der Peritonealflüssigkeit gefunden und in einem von fünf Patienten entwickelt sich eine *peritoneal minimal residual disease* nach den kurativen Eingriff. Bei etwa einem von sieben Patienten mit einem kolorektalen Karzinom entsteht Peritonealkarzinose (Guller, Zajac et al. 2002; Jayne, Fook et al. 2002; Shen, Hawksworth et al. 2004; Lloyd, McIver et al. 2006; Hara, Nakanishi et al. 2007). Laut Schott kann durch eine Behandlung dieser Zellen die Überlebensrate der Patienten positiv beeinflusst werden (Schott, Vogel et al. 1998).

Bei der Adhäsion und Invasion der FPTC nimmt das Mesothelium des Peritoneums eine entscheidende Rolle ein. Einerseits stellt die mesotheliale Kontinuität eine anatomische Barriere dar, die die Tumorzellen erst mit Hilfe sogenannter „*mesothelial cell injury factors*“ wie Proteinasen, EGF, HGF, TGF β und IL-6 überwinden und somit ECM-Komponenten wie Laminin, Fibronectin und Kollagene freilegen, an diese die Tumorzellen über ihre Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren β 1 Intergrin, CD43 und CD44 binden können. Andererseits spielen die Mesothelzellen selbst einen wichtigen Part bei der Adhäsion und der subperitonealen Invasion der Tumorzellen, als Träger diverser Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren, darunter Integrine, sowie Produktionsort verschiedener ECM Strukturen und Wachstumsfaktoren, unter anderem TGF β , was eine erhöhte Adhäsions- und Invasionsbereitschaft von Tumorzellen zur Folge hat (siehe Kapitel 1.2.1) (Welch, Fabra et al. 1990; Offner, Feichtinger et al. 1996; Tietze, Borntraeger et al. 1999). Peritoneale Läsionen begünstigen somit die Adhäsion von Tumorzellen (Kiyasu, Kaneshima et al. 1981).

5 Diskussion

Phospholipide weisen adhäsionsprophylaktische Eigenschaften bei postoperativen peritonealen Verwachsungen auf. In zahlreichen Arbeiten wurde dies gezeigt und bestätigt (Bhandarkar, Nathanson et al. 1999; Muller, Treutner et al. 2001; Muller, Treutner et al. 2002; Muller, Treutner et al. 2003; Muller, Treutner et al. 2003; Butz, Muller et al. 2007). Dabei ist die intraperitoneale Anwendung der PL unproblematisch, da diese ein natürlicher Bestandteil aller Zellmembranen und der peritonealen Flüssigkeit sind. PL werden außerdem vom Mesothelzellen sezerniert und absorbiert. Anhand fluoreszenz- und elektronenmikroskopischer Bilder zeigte Hills die oligolamelläre Anordnung der Phospholipide, dessen Schichtaufbau und abriebfeste Struktur auf peritonealen Oberflächen (Hills 2002). Die intensivste Anreicherung wurde am verletzen Mesothel beobachtet. Nach chirurgischen Eingriffen und bei Entzündungen wurden hingegen erhöhte Absorptionsraten festgestellt (Chen and Hills 2000).

Die Parallelen zwischen der Entstehung von postoperativen Verwachsungen und der Pathophysiologie der PK, wie im Kapitel 1.2.1 und 1.3.2 beschrieben, führten zu der Überlegung PL zur Tumorzelladhäsionshemmung bzw. zur Reduktion der Peritonealkarzinose einzusetzen, da gerade an defekten Stellen des Peritoneums diese abriebfeste Schutzschicht eine Adhäsionsbildung reduzieren und folglich die Invasion der Tumorzellen erschweren kann.

Hier in Aachen wurde bereits anhand verschiedener *in vitro*- und *in vivo*-Modellen dieser Ansatz verfolgt und der positive Effekt von PL auf die Tumorzelladhäsionshemmung gezeigt. In einer kombinierten Arbeit wurde das antiadhäsive Potential von PL einerseits nach intraabdomineller Applikation von Dickdarmtumorzellen (DHD K 12 TRb) an BD IX Ratten und zeitgleich in einem *in vitro*-Modell der Einfluss von PL auf die Adhäsion von humanen kolorektalen Karzinomzellen (HRT-18) und humanen Magentumorzellen (NUGC-4) auf Extrazellulärmatrixkomponenten untersucht (Jansen, Treutner et al. 2004). Für beide Versuchsreihen zeigten die Ergebnisse eine konzentrationsabhängige (150mg/kg PL vs. 75mg/kg PL vs. Kontrollgruppe), signifikante Reduktion, sowohl der peritonealen Tumorzelladhäsion, wie auch der Adhäsion auf Laminin, Fibronectin und Kollagen IV. Mit dieser Arbeit wurde eine neue Methode der Prävention intraperitonealer Tumorzelladhäsion vorgestellt. Diese adhäsionsprophylaktische Wirkung lässt sich durch höhere Konzentrationen von Phospholipiden optimieren. Weiterführende Arbeiten dieser Arbeitsgruppe untersuchten am gleichen Tier- und Bewertungsmodell, ob sich die zuvor erzielten Ergebnisse durch eine erhöhte PL-Konzentration (300mg/kg KG, 450mg/kg KG PL) verbessern lassen. Die Ergebnisse waren hierbei eindeutig. Die behandelten Tiere beider Konzentrationen zeigten in jedem der drei beobachteten Faktoren, Tumorzellvolumen, Tumorzellfläche und *Peritoneal cancer index* (PCI) signifikant weniger Tumorbefall als die Tiere der Kontrollgruppe. Auch geschädigtes Mesothel wurde bei entsprechend hoher Konzentration von Phospholipiden wirksam geschützt (Lucas 2006). Zuvor wurde von dieser Arbeitsgruppe an einem Tiermodell mit Nacktmäusen und intraperitoneal injizierten NUGC-4 Tumorzellen die antiadhäsive Wirkung von PL bestätigt (Jansen, Treutner et al. 2005). Die Ergebnisse zeigten für die 150mg/kg KG PL-Gruppe eine deutliche Verbesserung der untersuchten Parameter, für die 75mg/kg KG PL-Gruppe zwar tendenziell bessere

5 Diskussion

Ergebnisse als die der Kontrollgruppe, allerdings keine statistische Signifikanz. Daraufgehend wurde der Frage nachgegangen, ob der Einsatz und Wirkung der Phospholipide tumorzellkonzentrationsabhängig sei. Die Ergebnisse zeigten, dass PL für die verschiedenen, untersuchten Tumorzellkonzentrationen eine signifikante Adhäsionsreduktion und damit eine Reduktion der PK bewirken (Otto, Jansen et al. 2007; Mayaoglu 2008).

Eine weitere Arbeit der Aachener Gruppe beschäftigte sich mit der intraperitonealen Tumorzelladhäsion an Mesothelzellen. In diesem *in vitro* Versuch wurde der Einfluss von Phospholipiden auf das Adhäsionspotential von HRT-18 und NUGC-4 Tumorzellen auf einem Monolayer aus menschlichen Mesothelzellen untersucht (Jansen, Jansen et al. 2006). Die Ergebnisse für beide Tumorzellreihen zeigten eine konzentrationsabhängige Reduktion der Adhäsion. Zusätzlich zeigten die Ergebnisse den negativen Einfluss der PL auf die Expression tumoraler Integrine beider Zellreihen.

Neben PL kamen eine Vielzahl anderer Substanzen als präventive Maßnahme gegen intraperitoneale Tumorzell dissemination und Adhäsion zum Einsatz. Hochmolekulares Dextrane zeigte antiadhäsive Eigenschaften und dass die Überlebenszeit der behandelten Versuchstiere im Vergleich zu unbehandelten Tieren verlängert werden konnte (Hagiwara, Sawai et al. 1997). Jedoch zeigten sich bei der Verwendung von Dextranen in der Peritonealhöhle erhebliche Nebenwirkungen, wie die Entwicklung von Ödemen, Pleuraergüsse, bis hin zu lebensbedrohlichen Gerinnungsstörungen und schweren allergischen Reaktionen (Jansen 2003). Hyaluronsäure, welches zur Reduktion postoperativer Adhäsionen ihren Einsatz findet, zeigte als Tumorzelladhäsionsprophylaxe keine signifikante Reduktion und in einigen Fällen sogar eine Zunahme der Motilität und Adhäsionen, was auf die Interaktion zwischen Hyaluronsäure und CD44 zurückgeführt wurde (Haverlag, van Rossen et al. 1999; Tan, Wang et al. 2001). Ebenfalls oxygenierte Zellulose (Interceed), und Taurolidine/Heparin wurden auf Tumorzelladhäsionshemmung an einem standardisierten Rattenmodell untersucht. Die niedrigsten Werte wurden für Taurolidine/Heparin ermittelt, bei fehlender statistischer Signifikanz (Opitz, van der Veen et al. 2003). Alkhamesi und Kollegen zeigten jedoch später, dass der intraperitoneale Einsatz von Heparin eine signifikante Reduktion der Tumor-Zelle-Adhäsion herbeiführt, vergesellschaftet mit einem Abfall der ICAM-1 Expression und der vollständigen Hemmung des Tumorstwachstums *in vivo* (Alkhamesi, Ziprin et al. 2005). Außerdem hemmte Heparin die Tumor-Induzierte Produktion von Thrombin, Fibrin und Thromboplastin, die in Zusammenhang mit primärem und metastatischem Tumorstwachstum gebracht werden (Niers, Klerk et al. 2007). Antikörper und stimulierte T Lymphozyten gegen epitheliale Tumoren stellen einen eleganten Weg eines gezielten Angriffs auf Tumoren auf peritonealer Oberfläche (Strohlein and Heiss 2007) und sind Gegenstand aktueller Forschung im Rahmen intraperitonealen Immuntherapie. Nachdem in mehreren Tierstudien eine intraperitoneale Tumormassenverringerng durch Interleukin-2 (IL-2, ein anti-Tumor Zytokine) gezeigt werden konnte (Eggermont and Sugarbaker 1987; Ottow, Steller et al. 1987), zeigten Brivio und Kollegen in ihrer kleinen klinischen Studie, dass die präoperative Applikation von IL-2 bei KRK Patienten signifikant die VEGF (*vascular endothelial growth factor*) Produktion reduziert und den Abfall des anti-angiogenen Zytokin IL-12 in der

postoperativen Periode verhindert (Brivio, Lissoni et al. 2002). Direkte Hemmung von VEGF postoperativ sollte aus Gründen von Anastamosen- und Wundheilungskomplikationen vermieden werden (McCormack and Keam 2008). Die Ergebnisse einer aktuellen Arbeit zeigten jedoch, dass der kombinierte intraperitoneale Einsatz von Chemotherapie und anti-VEGF, *Bevacizumab*, einen rekombinaten, monoklonalen Antikörper gegen VEGF, welcher in Kombination zur Firstlinetherapie von metastasierten KRK zugelassen ist, eine Reduktion der Tumordurchblutung, eine Erhöhung der Tumorpenetration der Zytostatika, eine Reduktion der Tumormasse und eine Verlängerung der Lebenszeit und Heilung der Versuchstiere bewirkt (Shah, Shin et al. 2009). Die Behandlung mit Antikörpern gegen spezifische Adhäsionsmoleküle, wie z.B. gegen Integrine, resultiert ebenfalls in effektiver Prävention von Tumorzelladhäsion und Wachstum (Takatsuki, Komatsu et al. 2004; Oosterling, van der Bij et al. 2008). Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch der große Herstellungsaufwand und die damit verbundenen hohen Kosten, denn für Integrine gilt z.B., dass verschiedene Zelllinien des gleichen Tumors unterschiedliche Integrine bilden (Gui, Puddefoot et al. 1995) und somit unterschiedliche Antikörper für den therapeutischen Einsatz letztendlich notwendig wären. Studien suggerieren, dass das adhäsive Potential der Tumorzellen abhängig ist von der Differenzierung und Änderung der Integrinexpression (Wilson and Weiser 1992; Aznavoorian, Murphy et al. 1993). Dies verdeutlicht das Problem der hohen Spezifität der Immuntherapie. PL hingegen sind kostengünstig, wirken nachweisend antiadhäsiv, sind gut verträglich und es kommt zu keinen nennenswerten Nebenwirkungen oder negativen Einflüssen auf die Wundheilung (Muller, Treutner et al. 2001; Jansen 2003).

In Weiterentwicklung der von den bisherigen Gruppen erarbeitenden Grundidee der Adhäsionsprophylaxe durch PL und den guten experimentellen Ergebnissen in der postoperativen Adhäsionsreduktion, sowie in der Tumorzelladhäsionshemmung untersuchten wir nun den Einfluss von Phospholipiden auf die Invasion, als weiteren wesentlichen Schritt der Pathogenese der Peritonealkarzinose, von Tumorzellen. In dieser Arbeit wurde die Tumorzelllinie HRT-18 des humanen kolorektalen Karzinoms verwendet und verschiedenen *in vitro* Invasionsversuchen zugeführt. Zunächst wurde die Migrationsbereitschaft der Tumorzellen in Anwesenheit von PL in einem Boydenkammer-System untersucht. In dieser Versuchreihe durchwanderten die Tumorzellen aktiv einen Porenfilter. Das KRK gehört zu den invasiv wachsenden, soliden Tumoren. Die Migrationsfähigkeit dieser Tumorzellreihe wurde bereits unter einer anderen Fragestellung und an einem anderen Versuchsmodell untersucht (Hauptmann, Budianto et al. 2003). Unser Versuchsaufbau war angelehnt an das Modell von Boyden (Boyden 1962). Allerdings wurden keine *Attractants* benutzt. Der nächste Versuch untersuchte die Invasion von Tumorzellen abhängig von der PL-Konzentration. Hierfür wurde ein *Invasion assay* nach der Albini et al. Methode durchgeführt, bei der die Tumorzellen auf einen mit Matrigel (ECM-Komponenten) beschichteten Porenfilter gebracht wurden. Dieses Assay erlaubt eine schnelle und quantifizierende *in vitro* Bestimmung des Invasionspotentials von Tumorzellen, sowie ihre Beeinflussbarkeit (Albini, Iwamoto et al. 1987). In der dritten Versuchsreihe untersuchten wir das Invasionsverhalten von Tumorzellen durch einen *Monolayer* aus menschlichen Mesothelzellen auf ECM. Ein komplexes *in vitro* Peritoneum ist nicht verfügbar, doch

5 Diskussion

glauben wir, dass unser Versuchsaufbau zur Klärung der Invasionsmechanismen bzw. in unserem Fall, zur Klärung des Einflusses von PL auf das Invasionspotential von Tumorzellen in das Peritoneum beitragen kann. Unser Versuchsaufbau wurde bereits in ähnlicher Form für eine andere Fragestellung beschrieben (Niedbala, Crickard et al. 1985). Bei unseren Versuchen wurden Phospholipidkonzentrationen von 0,1% und 1% verwendet.

Im Sinne der Fragestellung dieser Arbeit musste zuerst beantwortet werden, ob PL einen Einfluss auf die Migration von Tumorzellen haben. Hierzu dienten die Ergebnisse des Migrationsversuches (s. Kapitel 4.1). Der Vergleich der Resultate der Kontrollgruppe mit den Ergebnissen der 0,1% PL-Gruppe zeigte eine tendenzielle Reduktion der Zellzahl unter PL, jedoch keine statistische Signifikanz. Die 1% PL-Gruppe verzeichnete im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Senkung der Tumorzellzahl ($p < 0,05$).

Die Frage, ob PL die Invasion der Tumorzellen verringern, ließ sich Anhand der Auswertung des *Invasion assay* (s. Kapitel 4.2) beantworten. Diese zeigte, dass sowohl die 0,1% PL-Gruppe, als auch die 1% PL-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle, jeweils eine statistisch signifikante Reduktion der Tumorzellzahl aufwiesen, mit den errechneten Werten von $p = 0,0055$ für die 0,1% PL-Gruppe und $p = 0,0006$ für die 1% PL-Gruppe.

Die Versuche an unserem vereinfachten Peritoneummodell erbrachten folgende Ergebnisse (s. Kapitel 4.3), die sich neben den vorangegangenen Versuchen einordnen. Die 0,1% PL-Gruppe erzielte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Reduktion ($p = 0,0256$) der Tumorzellzahl in diesem Invasionsversuch der HRT-18 Tumorzellen durch eine HMC-Monolayerschicht auf ECM. Ebenfalls zeigte die 1% PL-Gruppe eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe, mit einem errechneten Wert von $p = 0,0005$.

Die Frage, ob der Einfluss auf die Tumorzellen von der Konzentration der PL abhängig ist, ließ sich beantworten, indem wir die Ergebnisse der 0,1% PL-Gruppe mit der 1% PL-Gruppe der einzelnen Versuchsreihen miteinander verglichen. Für alle drei Versuchsreihen konnten wir eine Dosisabhängigkeit beim Vergleich der 0,1% PL-Gruppe und der 1% PL-Gruppe erkennen, wobei einzig im HMC-Monolayer *Invasion assay* der Unterschied statistisch signifikant war ($p = 0,0002$).

In der Arbeitsgruppe wurde mit gleichem Versuchsaufbau eine Magenkarzinomzelllinie (NUGC-4) untersucht. Hier ergab sich ebenfalls eine statistisch signifikante Migrations- und Invasionshemmung für die 1% PL-Gruppe und die 0,1% PL-Gruppe sowie eine nichtsignifikante konzentrationsabhängige Invasionsreduktion.

Ruft man sich die Pathogenese der PK und die bisherigen Arbeiten und Daten in das Gedächtnis, lässt sich ein Erklärungsansatz für die Ergebnisse geben. Dem Schritt der Invasion der Tumorzellen geht, wie schon unter 1.2.1 beschrieben, die Adhäsion voraus, die Adhäsion an das Mesothel, sowie an die ECM. Beide Kompartimente geben durch diverse Adhäsionsmoleküle, verschiedene Wachstumsfaktoren und ECM Komponenten eine wichtige Grundlage für die Tumorzellinteraktion. Hauptmann *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit, dass die Adhäsion und Migration stark von der Zusammensetzung und Konzentration von ECM Komponenten abhängig ist. Ihre Daten zeigen, dass bereits kleine Veränderungen dieser Gesamtheit signifikant die Tumorzellmigration modulieren können und suggerieren

damit eine Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß der Invasivität von HRT-18 Tumorzellen (Hauptmann, Budianto et al. 2003). Kollagene waren die stärksten adhäsiven Substrate, vor allem Kollagen I und Kollagen III. Im Gegenzug haben Kollagen V und Fibronectin die Tumorzellmigration am Stärksten beeinflusst. Der Grund hierfür wird in den Adhäsionsmolekülen (z.B. CD44) und Rezeptoren (β_1 Integrinen) gesehen. Mit diesem Hintergrund und unter Berücksichtigung der verschiedenen Versuchsaufbauten (Filter, Matrigel, HOMC-Monolayerschicht) dieser Arbeit und daraus resultierenden, jeweils unterschiedlichen ECM Zusammensetzungen, sowie der damit einhergehenden Vielfalt an Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren, können wir einerseits den unterschiedlichen Grad der Invasivität zwischen den Versuchsreihen nur annehmen, was aber auch nicht Gegenstand dieser Arbeit war. Andererseits können wir dadurch, unter Einbeziehung der bisherigen Aachener Ergebnisse um die tumorzelladhäsionshemmende Wirkung von PL, im Speziellen den negativen Einfluss auf die Integrin Expression, das antimigrative bzw. antiinvasive Potential von PL auf HRT-18 Tumorzellen erklären.

Ob und inwiefern PL die vermittelnden Mechanismen der Invasion, hervorgerufen durch ECM und ECM-tragenden Zellen, wie z.B. Mesothelzellen, sowie ihre Zusammensetzung und Konzentration direkt beeinflussen, muss weitergehend untersucht werden. Ebenso der Einfluss der PL auf die diversen tumorösen und mesothelialen Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren.

Ebenfalls muss an anderer Stelle der Frage nachgegangen werden, ob PL intraperitoneal (*in vivo*) die Tumorzellinvasion verringern bzw. verhindern. Eindeutig belegt ist bereits die Wirksamkeit von PL lediglich im präventiven Einsatz zur Verhinderung von peritonealer Tumorzell dissemination. Eine bestehende PK kann von PL nicht beeinflusst werden (Matsuoka, Hirakawa et al. 1998). Diese Beobachtung machten auch Müller *et al.* in ihrer Arbeit zur postoperativen Anwendung von PL zur Adhäsionsprävention, in der PL die Adhäsionsrate reduzierten, jedoch auf schon vorbestehende Adhäsionen keine Wirkung zeigten. (Muller, Treutner et al. 2001)

Zur Diskussion der Ergebnisse ist zusammenfassend zu sagen, dass PL *in vitro* die Invasion von Tumorzellen reduzieren. Die Resultate des Migrationsversuches lassen die Schlussfolgerung zu, dass PL die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen herabsetzten. Die Invasionsversuche deuten auf das antiinvasive Potential von PL hin, auf Grund der Zellzahlminderung in den *Invasion assays* der Phospholipidbehandelten Tumorzellen. Zusätzlich lässt sich den Ergebnissen die Konzentrationsabhängigkeit der Phospholipidwirkung ablesen.

Die klinische Relevanz der intraperitonealen Phospholipidapplikation ergibt sich vor allem in der Möglichkeit die perioperative Tumorzell dissemination günstig zu beeinflussen.

6 Zusammenfassung

Die sekundäre Peritonealkarzinose ist ein allgemeines Zeichen für fortgeschrittenes Tumorstadium, Krankheitsverschlechterung oder Wiederauftreten einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten gastrointestinaler und gynäkologischer Herkunft und oftmals das Resultat einer intraoperativen oder durch Invasion der Serosa bedingten Tumorzell dissemination in die Abdominalhöhle.

Bei annähernd einem von vier Patienten mit einem kolorektalen Karzinom werden freie Tumorzellen in der Peritonealflüssigkeit vor der Resektion des Tumors gefunden und in einem von fünf Patienten entwickelt sich eine *peritoneal minimal residual disease* nach dem kurativen Eingriff. Bei etwa einem von sieben Patienten mit einem kolorektalen Karzinom kommt es zur Entwicklung von Peritonealkarzinose, welche mit einer infausten Prognose einhergeht, denn die PK ist eine häufige Todesursache bei Patienten mit resezierten intraabdominellen Primärtumoren und die Tumorzellpersistenz in der Abdominalhöhle und im Becken für den Tod von 30%- 50% der Patienten verantwortlich, die an den Folgen der Primärerkrankung sterben.

Diese freien Tumorzellen stellen nachweislich einen ungünstigen prognostischen Faktor dar und aus diesem Grund sollte die Prävention der Peritonealkarzinose und damit die Vorbeugung der Adhäsion der Tumorzellen an das Mesothel und die Extrazellulärmatrix und die Invasion dieser Strukturen, die sich als wesentliche und grundlegende Schritte des Pathomechanismus verstehen, bereits mit der Therapie des Primärtumor beginnen.

Der Einsatz von Phospholipiden geht auf die adhäsionsprophylaktischen Eigenschaften bei postoperativen peritonealen Verwachsungen zurück. Sie zeigen vor allem in Bereichen des verletzten Epithels, die intensivste Anreicherung, sowie eine oligolamelläre Anordnung und eine abriebfeste Struktur auf der peritonealen Oberfläche. Die Parallelen zwischen der Entstehung von postoperativen Verwachsungen und der Pathophysiologie der Peritonealkarzinose führten zu der Überlegung Phospholipide zur Tumorzelladhäsionshemmung bzw. zur Reduktion der Peritonealkarzinose einzusetzen, da gerade an defekten Stellen des Peritoneums diese abriebfeste Schutzschicht eine Adhäsionsbildung reduzieren und folglich die Invasion der Tumorzellen erschweren kann.

Mit Erfolg wurde bereits anhand mehrerer Tierexperimenteller – und *in vitro*-Arbeiten die hemmende Wirkung von Phospholipiden auf die intraperitoneale Tumorzelladhäsion gezeigt und bestätigt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Phospholipiden auf die Invasion von Tumorzellen *in vitro* untersucht. Dabei orientierte sich die Arbeit an den folgenden Fragen:

1. Beeinflussen Phospholipide die Migration von Tumorzellen *in vitro*?
2. Reduzieren Phospholipide das Invasionspotential von Tumorzellen *in vitro*?
3. Reduzieren Phospholipide das Invasionspotential von Tumorzellen durch eine HPMC Monolayerschicht?

4. Ist der Einfluss von Phospholipiden auf die Invasivität von Tumorzellen konzentrationsabhängig?

Die Tumorzelllinie HRT-18 des humanen kolorektalen Karzinoms wurde hierfür verwendet und drei verschiedenen Invasionsversuchen zugeführt. Als Versuchskompartimente wurden Boydenkammern und modifizierte Boydenkammer-Systeme benutzt und der Versuchsaufbau der jeweiligen Versuchsreihe und Fragestellung angepasst. Verallgemeinernd: Für die Untersuchung der Invasion, durchwanderten die Tumorzellen einen Porenfilter. Das Ausmaß der Invasion bzw. der Hemmung durch Phospholipide wurde anhand einer mikroskopischen Zellauszählung der durchgewanderten Zellen bestimmt. Für sämtliche Versuche wurden die Phospholipidkonzentrationen 0,1% und 1% benutzt und mit der Kontrollgruppe verglichen. In drei Versuchsdurchläufen für jede Reihe wurden jeweils drei Filter pro Phospholipidkonzentration mit je fünf Gesichtsfeldern pro Filter ausgezählt.

Im Migrationsversuch ergab der Vergleich der Resultate der Kontrollgruppe und der 0,1% PL-Gruppe eine tendenzielle Reduktion der Zellzahl unter PL, jedoch keine statistische Signifikanz. Die 1% PL-Gruppe verzeichnete im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Senkung der Tumorzellzahl. Die Ergebnisse der Invasionsversuche zeigen für beide Versuchsreihen, dass sowohl die 0,1% PL-Gruppe, als auch die 1% PL-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle, jeweils eine statistisch signifikante Reduktion der Tumorzellzahl aufwiesen. Für alle drei Versuchsreihen konnten wir eine Dosisabhängigkeit beim Vergleich der 0,1% PL-Gruppe und der 1% PL-Gruppe erkennen, wobei einzig im HOMO-Monolayer Invasion assay der Unterschied statistisch signifikant war.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass PL *in vitro* die Invasion von Tumorzellen reduzieren. Die Resultate des Migrationsversuches lassen die Schlussfolgerung zu, dass PL die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen herabsetzten. Die Invasionsversuche deuten auf das antiinvasive Potential von PL hin, auf Grund einer Zellzahlminderung in den *Invasion assays* der phospholipidbehandelten Tumorzellen. Zusätzlich lässt sich den Ergebnissen die Konzentrationsabhängigkeit der Phospholipidwirkung ablesen.

Der Frage, ob und inwiefern Phospholipide intraperitoneal (*in vivo*) die Tumorzellinvasion verringern bzw. verhindern müssen weitere Untersuchungen nachgehen.

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Karzinogenese KRK (nach Fearon und Vogelstein 1990, aktualisiert von Toribara 1995)	7
Abbildung 2: Makroskopischer Tumortyp bei frühen und fortgeschrittenen Formen.....	8
Abbildung 3: Präparationswege der totalen mesorektalen Exzision (nach Stelzner, 2003)..	16
Abbildung 4: Pathogenese Peritonealkarzinose nach Yonemura.....	18
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Adhäsionsmolekülen der Pathogenese der PK (nach Ceelen, Peritoneal Carcinomatosis 2007)	20
Abbildung 6: HIPEC Apparatur, Schemazeichnung; 90min. HIPEC mit Mitomycin C (MMC)	25
Abbildung 7: HIPEC, Kolliseum-Technik (nach Sugarbaker, 1999).....	26
Abbildung 8: Das Boydenkammer-System, links Fotografie, rechts Schemazeichnung	38
Abbildung 9: Boydenkammer-System, links: Boydenkammer von oben, rechts: Boydenkammer seitlich	39
Abbildung 10: Zellzahl/GF nach 6 h Versuchslaufzeit; Boydenkammer Assay.....	42
Abbildung 11: Zellzahl/GF nach 24 h Invasionsassay; Matrigelbeschichteter Filter	43
Abbildung 12: Versuchsaufbau im Querschnitt, 400-fache Vergrößerung, Photo.....	44
Abbildung 13: Filter Invasionsassay, 100-fache Vergrößerung, Kontrolle	45
Abbildung 14: Filter Invasionsassay, 100-fache Vergrößerung, 1%ige PL-Emulsion	45
Abbildung 15: Zellzahl/GF nach 24 h Inkubation; Filter mit HOMC-Monolayer.....	46
Abbildung 16: Filter mit Fluoreszenzmarkierten Tumorzellen, 250-fache Vergrößerung, Kontrollegruppe.....	47
Abbildung 17: Filter mit Fluoreszenzmarkierten Tumorzellen, 250-fache Vergrößerung, 1%ige PL-Emulsion.....	47
Tabelle 1: Klinische Tumorklassifikation nach Mason (1976).....	9
Tabelle 2: Stadieneinteilung nach UICC und korrespondierende Einteilung nach Dukes.....	11
Tabelle 3: Darstellung des lokalisationsabhängigen Resektionsausmaßes.....	13
Tabelle 4: Intraperitoneale Chemotherapeutika.....	27

III Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
A. ileocolica, A. colica media	Arteria
bzw.	Beziehungsweise
CA 19-9, CA 125	Carbohydrate Antigen
CD 44, CD 43	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cm	Centimeter
cMet	<i>Mesenchymal-epithelial transition factor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
cTNM	<i>Clinical tumor, nodules, metastasis</i>
ECM	Extrazellulärmatrix
EPIC	<i>Early postoperative intraperitoneal chemotherapy</i>
et al.	<i>et alumni</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FKS	Fetales Kälber Serumprotein
FPTC	<i>Free peritoneal tumor cell</i>
FS	Folinsäure
FU	Fluorouracil
GF	Gesichtsfeld
Gy	Gray
HIPEC	<i>Heated intraoperative intraperitoneal chemotherapy</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HSP	Humanes Serum Protein
ICAM	<i>Inter-cellular adhesion molecule</i>
IL	Interleukin
IPC	Intraperitoneale Chemotherapie
JÜR	Jahresüberlebensrate
KGF	<i>Keratocyte growth factor</i>

III Abkürzungsverzeichnis

KRK	Kolorektales Karzinom
mg	Milligramm
mm	Millimeter
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
NIPS	<i>Neoadjuvant intraperitoneal and systemic</i>
PCAM	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PET	Positronenemissionstomographie
PK	Peritonealkarzinose
PL	Phospholipide
pTNM	<i>Pathological tumor, nodules, metastasis</i>
RCT	Radiochemotherapie
RT	Radiotherapie
s.	Siehe
s.g.	Sogenannt
s.o.	Siehe oben
TGF	<i>Tumor growth factor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
t-PA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
UICC	<i>Union International Contre le Cancer</i>
VCAM	<i>Vascular-endothelial cell adhesion molecule</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	Zum Beispiel
ZRP	Zytoreduktive Peritonektomie

IV Literaturverzeichnis

Krebs in Deutschland 2003 - 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Aufl., Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008.

Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe, Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken, 2004.

(1997). "Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. Swedish Rectal Cancer Trail." N Engl J Med **336**(14): 980-7.

Abu-Rustum, N. R., E. H. Rhee, et al. (2004). "Subcutaneous tumor implantation after laparoscopic procedures in women with malignant disease." Obstet Gynecol **103**(3): 480-7.

Ahmed, N., C. Riley, et al. (2005). "Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment." Clin Exp Metastasis **22**(5): 391-402.

Albini, A., Y. Iwamoto, et al. (1987). "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells." Cancer Res **47**(12): 3239-45.

Alkhamesi, N. A., P. Ziprin, et al. (2005). "ICAM-1 mediated peritoneal carcinomatosis, a target for therapeutic intervention." Clin Exp Metastasis **22**(6): 449-59.

Ar'Rajab, A., M. Snoj, et al. (1995). "Exogenous phospholipid reduces postoperative peritoneal adhesions in rats." Eur J Surg **161**(5): 341-4.

Aznavorian, S., A. N. Murphy, et al. (1993). "Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis." Cancer **71**(4): 1368-83.

Baskaranathan, S., J. Philips, et al. (2004). "Free colorectal cancer cells on the peritoneal surface: correlation with pathologic variables and survival." Dis Colon Rectum **47**(12): 2076-9.

Beavis, J., J. L. Harwood, et al. (1994). "Synthesis of phospholipids by human peritoneal mesothelial cells." Perit Dial Int **14**(4): 348-55.

Bentrem, D., A. Wilton, et al. (2005). "The value of peritoneal cytology as a preoperative predictor in patients with gastric carcinoma undergoing a curative resection." Ann Surg Oncol **12**(5): 347-53.

Bhandarkar, D. S., L. K. Nathanson, et al. (1999). "Spray of phospholipid powder reduces peritoneal adhesions in rabbits." Aust N Z J Surg **69**(5): 388-90.

Bingham, S. (2006). "The fibre-folate debate in colo-rectal cancer." Proc Nutr Soc **65**(1): 19-23.

Bingham, S. A., N. E. Day, et al. (2003). "Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study." Lancet **361**(9368): 1496-501.

Bishop, D. T. and N. R. Hall (1994). "The genetics of colorectal cancer." Eur J Cancer **30A**(13): 1946-56.

Boyden, S. (1962). "The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes." J Exp Med **115**: 453-66.

- Boyle, P. and J. Ferlay (2005). "Cancer incidence and mortality in Europe, 2004." Ann Oncol **16**(3): 481-8.
- Bracke, M. E. (2007). Role of adhesion molecules in locoregional cancer spread. Peritoneal Carcinomatosis: a multidisciplinary approach. W. P. Ceelen. New York, Springer: 35-49.
- Brigand, C., O. Monneuse, et al. (2006). "Peritoneal mesothelioma treated by cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy: results of a prospective study." Ann Surg Oncol **13**(3): 405-12.
- Brivio, F., P. Lissoni, et al. (2002). "Effects of IL-2 preoperative immunotherapy on surgery-induced changes in angiogenic regulation and its prevention of VEGF increase and IL-12 decline." Hepatogastroenterology **49**(44): 385-7.
- Brivio, F., P. Lissoni, et al. (1992). "Effects of a preoperative therapy with interleukin-2 on surgery-induced lymphocytopenia in cancer patients." Oncology **49**(3): 215-8.
- Bujko, K., M. P. Nowacki, et al. (2004). "Sphincter preservation following preoperative radiotherapy for rectal cancer: report of a randomised trial comparing short-term radiotherapy vs. conventionally fractionated radiochemotherapy." Radiother Oncol **72**(1): 15-24.
- Burleson, K. M., R. C. Casey, et al. (2004). "Ovarian carcinoma ascites spheroids adhere to extracellular matrix components and mesothelial cell monolayers." Gynecol Oncol **93**(1): 170-81.
- Burt, R. W., D. T. Bishop, et al. (1990). "Risk and surveillance of individuals with heritable factors for colorectal cancer. WHO Collaborating Centre for the Prevention of Colorectal Cancer." Bull World Health Organ **68**(5): 655-65.
- Butz, N., S. A. Muller, et al. (2007). "The influence of blood on the efficacy of intraperitoneally applied phospholipids for prevention of adhesions." BMC Surg **7**: 14.
- Canis, M., R. Botchorishvili, et al. (2000). "Cancer and laparoscopy, experimental studies: a review." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **91**(1): 1-9.
- Cannistra, S. A., G. S. Kansas, et al. (1993). "Binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro is partly mediated by CD44H." Cancer Res **53**(16): 3830-8.
- Carter, J. J., D. L. Feingold, et al. (2003). "Laparoscopic-assisted cecectomy is associated with decreased formation of postoperative pulmonary metastases compared with open cecectomy in a murine model." Surgery **134**(3): 432-6.
- Casey, R. C. and A. P. Skubitz (2000). "CD44 and beta1 integrins mediate ovarian carcinoma cell migration toward extracellular matrix proteins." Clin Exp Metastasis **18**(1): 67-75.
- Chailley-Heu, B., S. Rubio, et al. (1997). "Expression of hydrophilic surfactant proteins by mesentery cells in rat and man." Biochem J **328** (Pt 1): 251-6.
- Chen, Y. and B. A. Hills (2000). "Surgical adhesions: evidence for adsorption of surfactant to peritoneal mesothelium." Aust N Z J Surg **70**(6): 443-7.
- Cho, E., S. A. Smith-Warner, et al. (2004). "Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies." Ann Intern Med **140**(8): 603-13.
- Chu, D. Z., N. P. Lang, et al. (1989). "Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors." Cancer **63**(2): 364-7.

- Cruz-Correa, M. and F. M. Giardiello (2002). "Diagnosis and management of hereditary colon cancer." Gastroenterol Clin North Am **31**(2): 537-49, x.
- Dahlberg, M., B. Glimelius, et al. (1999). "Changing strategy for rectal cancer is associated with improved outcome." Br J Surg **86**(3): 379-84.
- Dedrick, R. L., C. E. Myers, et al. (1978). "Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer." Cancer Treat Rep **62**(1): 1-11.
- Dube, P., P. Lasser, et al. (1997). "[Treatment of peritoneal carcinosis of colorectal origin]." J Chir (Paris) **134**(5-6): 233-6.
- Eggermont, A. M. and P. H. Sugarbaker (1987). "Lymphokine-activated killer cell and interleukin-2 inhibitors: their role in adoptive immunotherapy." Cell Immunol **107**(2): 384-94.
- Ekbom, A., C. Helmick, et al. (1990). "Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study." N Engl J Med **323**(18): 1228-33.
- Elias, D., E. Benizri, et al. (2007). "Comparison of two kinds of intraperitoneal chemotherapy following complete cytoreductive surgery of colorectal peritoneal carcinomatosis." Ann Surg Oncol **14**(2): 509-14.
- Elias, D., F. Blot, et al. (2001). "Curative treatment of peritoneal carcinomatosis arising from colorectal cancer by complete resection and intraperitoneal chemotherapy." Cancer **92**(1): 71-6.
- Elias, D., P. Dube, et al. (1999). "Treatment of liver metastases with moderate peritoneal carcinomatosis by hepatectomy and cytoreductive surgery followed by immediate post-operative intraperitoneal chemotherapy: feasibility and preliminary results." Hepatogastroenterology **46**(25): 360-3.
- Elias, D., B. Raynard, et al. (2006). "Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin." Gastroenterol Clin Biol **30**(10): 1200-4.
- Elias, D. M. and L. Sideris (2003). "Pharmacokinetics of heated intraoperative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis." Surg Oncol Clin N Am **12**(3): 755-69, xiv.
- Esquivel, J., J. Vidal-Jove, et al. (1993). "Morbidity and mortality of cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy." Surgery **113**(6): 631-6.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." Cell **61**(5): 759-67.
- Ferlay, J., P. Autier, et al. (2007). "Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006." Ann Oncol **18**(3): 581-92.
- Fermor, B., H. C. Umpleby, et al. (1986). "Proliferative and metastatic potential of exfoliated colorectal cancer cells." J Natl Cancer Inst **76**(2): 347-9.
- Flood, D. M., N. S. Weiss, et al. (2000). "Colorectal cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants." Cancer Causes Control **11**(5): 403-11.
- Fu, Q. G., F. D. Meng, et al. (2002). "Efficacy of intraperitoneal thermochemotherapy and immunotherapy in intraperitoneal recurrence after gastrointestinal cancer resection." World J Gastroenterol **8**(6): 1019-22.

- Gertsch, P. (2003). "A historical perspective on colorectal liver metastases and peritoneal carcinomatosis: similar results, different treatments." Surg Oncol Clin N Am **12**(3): 531-41.
- Glehen, O., F. Kwiatkowski, et al. (2004). "Cytoreductive surgery combined with perioperative intraperitoneal chemotherapy for the management of peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer: a multi-institutional study." J Clin Oncol **22**(16): 3284-92.
- Gozalan, U., A. C. Yasti, et al. (2007). "Peritoneal cytology in colorectal cancer: incidence and prognostic value." Am J Surg **193**(6): 672-5.
- Greene, F. L., A. K. Stewart, et al. (2004). "New tumor-node-metastasis staging strategy for node-positive (stage III) rectal cancer: an analysis." J Clin Oncol **22**(10): 1778-84.
- Griffiths, C. T. (1975). "Surgical resection of tumor bulk in the primary treatment of ovarian carcinoma." Natl Cancer Inst Monogr **42**: 101-4.
- Griffiths, C. T., L. M. Parker, et al. (1979). "Role of cytoreductive surgical treatment in the management of advanced ovarian cancer." Cancer Treat Rep **63**(2): 235-40.
- Gui, G. P., J. R. Puddefoot, et al. (1995). "In vitro regulation of human breast cancer cell adhesion and invasion via integrin receptors to the extracellular matrix." Br J Surg **82**(9): 1192-6.
- Guller, U., P. Zajac, et al. (2002). "Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer." Ann Surg **236**(6): 768-75; discussion 775-6.
- Hagiwara, A., K. Sawai, et al. (1997). "Prevention of peritoneal metastasis of cancer with dextran sulfate--an experimental study in mice." Anticancer Drugs **8**(9): 894-7.
- Hansen, E., N. Wolff, et al. (1995). "Tumor cells in blood shed from the surgical field." Arch Surg **130**(4): 387-93.
- Hara, M., H. Nakanishi, et al. (2007). "Comparative analysis of intraperitoneal minimal free cancer cells between colorectal and gastric cancer patients using quantitative RT-PCR: possible reason for rare peritoneal recurrence in colorectal cancer." Clin Exp Metastasis **24**(3): 179-89.
- Harada, N., T. Mizoi, et al. (2001). "Introduction of antisense CD44S CDNA down-regulates expression of overall CD44 isoforms and inhibits tumor growth and metastasis in highly metastatic colon carcinoma cells." Int J Cancer **91**(1): 67-75.
- Hase, K., H. Ueno, et al. (1998). "Intraperitoneal exfoliated cancer cells in patients with colorectal cancer." Dis Colon Rectum **41**(9): 1134-40.
- Hauptmann, S., D. Budianto, et al. (2003). "Adhesion and migration of HRT-18 colorectal carcinoma cells on extracellular matrix components typical for the desmoplastic stroma of colorectal adenocarcinomas." Oncology **65**(2): 174-81.
- Hauser, H. (2006). Kolorektales Karzinom, ACO-ASSO Österreichische Gesellschaft für Chirurgische Onkologie. <http://www.aco-asso.at/manual/aktuell/kolorekt/index.html>.
- Haverlag, R., M. E. van Rossen, et al. (1999). "Hyaluronate-based coating solution for prevention of surgical adhesions has no major effect on adhesion and growth of intraperitoneal tumour cells." Eur J Surg **165**(8): 791-5.

- Hayashi, K., P. Jiang, et al. (2007). "Real-time imaging of tumor-cell shedding and trafficking in lymphatic channels." Cancer Res **67**(17): 8223-8.
- Heath, R. M., D. G. Jayne, et al. (2004). "Tumour-induced apoptosis in human mesothelial cells: a mechanism of peritoneal invasion by Fas Ligand/Fas interaction." Br J Cancer **90**(7): 1437-42.
- Hermanek, P., Jr., H. Wiebelt, et al. (1994). "[Long-term results of surgical therapy of colon cancer. Results of the Colorectal Cancer Study Group]." Chirurg **65**(4): 287-97.
- Herrera, L., S. Kakati, et al. (1986). "Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q." Am J Med Genet **25**(3): 473-6.
- Hills, B. A. (2002). "Surface-active phospholipid: a Pandora's box of clinical applications. Part II. Barrier and lubricating properties." Intern Med J **32**(5-6): 242-51.
- Hunter, J. A., J. A. Ryan, Jr., et al. (1987). "En bloc resection of colon cancer adherent to other organs." Am J Surg **154**(1): 67-71.
- Jacquet, P., J. S. Jelinek, et al. (1993). "Evaluation of computed tomography in patients with peritoneal carcinomatosis." Cancer **72**(5): 1631-6.
- Jansen, M. (2003). "Hemmung der intraperitonealen Tumorzelladhäsion durch Phospholipide zur Prävention einer Peritonealkarzinose." Habilitationsschrift aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik der RWTHAachen.
- Jansen, M., P. L. Jansen, et al. (2006). "The inhibition of tumor cell adhesion on human mesothelial cells (HOMC) by phospholipids in vitro." Langenbecks Arch Surg **391**(2): 96-101.
- Jansen, M., K. H. Treutner, et al. (2004). "Phospholipids reduce the intraperitoneal adhesion of colonic tumor cells in rats and adhesion on extracellular matrix in vitro." Int J Colorectal Dis **19**(6): 525-32.
- Jansen, M., K. H. Treutner, et al. (2005). "Inhibition of gastric cancer cell adhesion in nude mice by intraperitoneal phospholipids." World J Surg **29**(6): 708-14.
- Jass, J. R. (1989). "Do all colorectal carcinomas arise in preexisting adenomas?" World J Surg **13**(1): 45-51.
- Jayne, D. G., S. Fook, et al. (2002). "Peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer." Br J Surg **89**(12): 1545-50.
- Jayne, D. G., P. J. Guillou, et al. (2007). "Randomized trial of laparoscopic-assisted resection of colorectal carcinoma: 3-year results of the UK MRC CLASICC Trial Group." J Clin Oncol **25**(21): 3061-8.
- Jemal, A., T. Murray, et al. (2005). "Cancer statistics, 2005." CA Cancer J Clin **55**(1): 10-30.
- Kanellos, I., H. Demetriades, et al. (2003). "Incidence and prognostic value of positive peritoneal cytology in colorectal cancer." Dis Colon Rectum **46**(4): 535-9.
- Kanellos, I., E. Zacharakis, et al. (2006). "Prognostic significance of CEA levels and positive cytology in peritoneal washings in patients with colorectal cancer." Colorectal Dis **8**(5): 436-40.
- Kapiteijn, E., C. A. Marijnen, et al. (2001). "Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer." N Engl J Med **345**(9): 638-46.

- Katz, M. H. and R. M. Barone (2003). "The rationale of perioperative intraperitoneal chemotherapy in the treatment of peritoneal surface malignancies." Surg Oncol Clin N Am **12**(3): 673-88.
- Kawamura, T., Y. Endo, et al. (2001). "Significance of integrin alpha2/beta1 in peritoneal dissemination of a human gastric cancer xenograft model." Int J Oncol **18**(4): 809-15.
- Keshava, A., P. H. Chapuis, et al. (2007). "The significance of involvement of a free serosal surface for recurrence and survival following resection of clinicopathological stage B and C rectal cancer." Colorectal Dis **9**(7): 609-18.
- Kienle, P. and M. Koch (2001). "Minimal residual disease in gastrointestinal cancer." Semin Surg Oncol **20**(4): 282-93.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1996). "Lessons from hereditary colorectal cancer." Cell **87**(2): 159-70.
- Kiyasu, Y., S. Kaneshima, et al. (1981). "Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer." Cancer Res **41**(3): 1236-9.
- Klein, C. L., F. Bittinger, et al. (1995). "Effects of cytokines on the expression of cell adhesion molecules by cultured human omental mesothelial cells." Pathobiology **63**(4): 204-12.
- Klimpfinger, M., H. Hauser, et al. (1992). "Pathologie kolorektaler Präkanzerosen." Chirurgische Gastroenterologie **8**: 16-19.
- Kokenyesi, R., K. P. Murray, et al. (2003). "Invasion of interstitial matrix by a novel cell line from primary peritoneal carcinosarcoma, and by established ovarian carcinoma cell lines: role of cell-matrix adhesion molecules, proteinases, and E-cadherin expression." Gynecol Oncol **89**(1): 60-72.
- Kolonel, L. N., M. W. Hinds, et al. (1980). Cancer Patterns among Migrant and Native-born Japanese in Hawaii in Relation to Smoking, Drinking and Dietary Habits. Genetic and Environmental factors in Experimental and Human Cancer. H. V. Gelboin, M. B. and M. T. e. al. Tokyo, Japan, Japan Scientific Societies Press: 327–340.
- Koppe, M. J., O. C. Boerman, et al. (2006). "Peritoneal carcinomatosis of colorectal origin: incidence and current treatment strategies." Ann Surg **243**(2): 212-22.
- Koyama, T., M. Yashiro, et al. (2000). "TGF-beta1 secreted by gastric fibroblasts up-regulates CD44H expression and stimulates the peritoneal metastatic ability of scirrhous gastric cancer cells." Int J Oncol **16**(2): 355-62.
- Krones, C. J., M. Stumpf, et al. (2009). "[Surgery for rectal cancer.]." Chirurg **80**(4): 303-10.
- Lacy, A. M., J. C. Garcia-Valdecasas, et al. (2002). "Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial." Lancet **359**(9325): 2224-9.
- Le Voyer, T. E., E. R. Sigurdson, et al. (2003). "Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089." J Clin Oncol **21**(15): 2912-9.
- Lee, I. K., H. Kim do, et al. (2009). "Prognostic value of CEA and CA 19-9 tumor markers combined with cytology from peritoneal fluid in colorectal cancer." Ann Surg Oncol **16**(4): 861-70.

- Lessan, K., D. J. Aguiar, et al. (1999). "CD44 and beta1 integrin mediate ovarian carcinoma cell adhesion to peritoneal mesothelial cells." Am J Pathol **154**(5): 1525-37.
- Link, K. H., H. Hauser, et al. (2008). Kolonkarzinom. Chirurgische Onkologie. M. Gnant and P. M. Schlag. Wien, New York, Springer: 315-329.
- Link, K. H., T. A. Sagban, et al. (2005). "Colon cancer: survival after curative surgery." Langenbecks Arch Surg **390**(2): 83-93.
- Lloyd, J. M., C. M. McIver, et al. (2006). "Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells." Clin Cancer Res **12**(2): 417-23.
- Lucas, S. (2006). "Optimierung der prophylaktischen Wirkung von Phospholipiden auf Adhäsion von freien Kolonkarzinomzellen." Dissertationsschrift aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik der RWTH-Aachen.
- Lynch, H. T., M. W. Shaw, et al. (1966). "Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds." Arch Intern Med **117**(2): 206-12.
- Lynch, H. T., T. Smyrk, et al. (1996). "Overview of natural history, pathology, molecular genetics and management of HNPCC (Lynch Syndrome)." Int J Cancer **69**(1): 38-43.
- Lynch, H. T., T. C. Smyrk, et al. (1993). "Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review." Gastroenterology **104**(5): 1535-49.
- MacFarlane, J. K., R. D. Ryall, et al. (1993). "Mesorectal excision for rectal cancer." Lancet **341**(8843): 457-60.
- Marques-Vidal, P., P. Ravasco, et al. (2006). "Foodstuffs and colorectal cancer risk: a review." Clin Nutr **25**(1): 14-36.
- Mason, A. Y. (1976). "President's address. Rectal cancer: the spectrum of selective surgery." Proc R Soc Med **69**(4): 237-44.
- Matsuoka, T., K. Hirakawa, et al. (1998). "Adhesion polypeptides are useful for the prevention of peritoneal dissemination of gastric cancer." Clin Exp Metastasis **16**(4): 381-8.
- Mayaoglu, B. (2008). "Inhibition der peritonealen tumorzelladhäsion durch Phospholipide bei Ratten." Dissertationsschrift aus der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik der RWTH-Aachen.
- McCormack, P. L. and S. J. Keam (2008). "Bevacizumab: a review of its use in metastatic colorectal cancer." Drugs **68**(4): 487-506.
- McMichael, A. J., M. G. McCall, et al. (1980). "Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change." Int J Cancer **25**(4): 431-7.
- Meigs, J. V. (1934). Tumors of the female pelvic organs. New York, The MacMillan Company.
- Merkel, S., T. Meyer, et al. (2002). "Late locoregional recurrence in rectal carcinoma." Eur J Surg Oncol **28**(7): 716-22.

- Miner, T. J., J. Shia, et al. (2005). "Long-term survival following treatment of pseudomyxoma peritonei: an analysis of surgical therapy." Ann Surg **241**(2): 300-8.
- Mizutani, K., K. Kofuji, et al. (2000). "The significance of MMP-1 and MMP-2 in peritoneal disseminated metastasis of gastric cancer." Surg Today **30**(7): 614-21.
- Muller, S. A., K. H. Treutner, et al. (2003). "Experimental evaluation of phospholipids and icodextrin in re-formation of peritoneal adhesions." Br J Surg **90**(12): 1604-7.
- Muller, S. A., K. H. Treutner, et al. (2003). "Effect of intraperitoneal antiadhesive fluids in a rat peritonitis model." Arch Surg **138**(3): 286-90.
- Muller, S. A., K. H. Treutner, et al. (2002). "Phospholipids reduce adhesion formation in the rabbit uterine horn model." Fertil Steril **77**(6): 1269-73.
- Muller, S. A., K. H. Treutner, et al. (2001). "Influence of intraperitoneal phospholipid dosage on adhesion formation and wound healing at different intervals after surgery." Langenbecks Arch Surg **386**(4): 278-84.
- Munnell, E. W. (1968). "The changing prognosis and treatment in cancer of the ovary. A report of 235 patients with primary ovarian carcinoma 1952-1961." Am J Obstet Gynecol **100**(6): 790-805.
- Mutsaers, S. E. and S. Wilkosz (2007). Structure and Function of Mesothelial Cells. Peritoneal Carcinomatosis: a multidisiplinary approach. W. P. Ceelen. New York, Springer: 1-19.
- Nagtegaal, I. D. and P. Quirke (2008). "What is the role for the circumferential margin in the modern treatment of rectal cancer?" J Clin Oncol **26**(2): 303-12.
- Nelson, H., N. Petrelli, et al. (2001). "Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery." J Natl Cancer Inst **93**(8): 583-96.
- Nelson, H., D. Sargent, et al. (2004). "Laparoscopically assisted colectomy is as safe and effective as open colectomy in people with colon cancer Abstracted from: Nelson H, Sargent D, Wieand HS, et al; for the Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. N Engl J Med 2004; 350: 2050-2059." Cancer Treat Rev **30**(8): 707-9.
- Nichols, P. H., C. W. Ramsden, et al. (1992). "Perioperative immunotherapy with recombinant interleukin 2 in patients undergoing surgery for colorectal cancer." Cancer Res **52**(20): 5765-9.
- Niedbala, M. J., K. Crickard, et al. (1985). "Interactions of human ovarian tumor cells with human mesothelial cells grown on extracellular matrix. An in vitro model system for studying tumor cell adhesion and invasion." Exp Cell Res **160**(2): 499-513.
- Niers, T. M., C. P. Klerk, et al. (2007). "Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models." Crit Rev Oncol Hematol **61**(3): 195-207.
- Norat, T., S. Bingham, et al. (2005). "Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition." J Natl Cancer Inst **97**(12): 906-16.
- Offner, F. A., H. Feichtinger, et al. (1996). "Transforming growth factor-beta synthesis by human peritoneal mesothelial cells. Induction by interleukin-1." Am J Pathol **148**(5): 1679-88.

- Oosterling, S. J., G. J. van der Bij, et al. (2008). "Anti-beta1 integrin antibody reduces surgery-induced adhesion of colon carcinoma cells to traumatized peritoneal surfaces." Ann Surg **247**(1): 85-94.
- Opitz, I., H. C. van der Veen, et al. (2003). "The influence of adhesion prophylactic substances and taurolidine/heparin on local recurrence and intraperitoneal tumor growth after laparoscopic-assisted bowel resection of colon carcinoma in a rat model." Surg Endosc **17**(7): 1098-104.
- Orkin, B. A., R. R. Dozois, et al. (1989). "Extended resection for locally advanced primary adenocarcinoma of the rectum." Dis Colon Rectum **32**(4): 286-92.
- Otto, J., P. L. Jansen, et al. (2007). "Reduction of peritoneal carcinomatosis by intraperitoneal administration of phospholipids in rats." BMC Cancer **7**: 104.
- Ottow, R. T., E. P. Steller, et al. (1987). "Immunotherapy of intraperitoneal cancer with interleukin 2 and lymphokine-activated killer cells reduces tumor load and prolongs survival in murine models." Cell Immunol **104**(2): 366-76.
- Parkin, D. M., F. Bray, et al. (2005). "Global cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **55**(2): 74-108.
- Pestieau, S. R. and P. H. Sugarbaker (2000). "Treatment of primary colon cancer with peritoneal carcinomatosis: comparison of concomitant vs. delayed management." Dis Colon Rectum **43**(10): 1341-6; discussion 1347-8.
- Pilati, P., S. Mocellin, et al. (2003). "Cytoreductive surgery combined with hyperthermic intraperitoneal intraoperative chemotherapy for peritoneal carcinomatosis arising from colon adenocarcinoma." Ann Surg Oncol **10**(5): 508-13.
- Pilati, P., C. R. Rossi, et al. (2001). "Multimodal treatment of peritoneal carcinomatosis and sarcomatosis." Eur J Surg Oncol **27**(2): 125-34.
- Pittam, M. R., H. Thornton, et al. (1984). "Survival after extended resection for locally advanced carcinomas of the colon and rectum." Ann R Coll Surg Engl **66**(2): 81-4.
- Prentice, R. L. and L. Sheppard (1990). "Dietary fat and cancer: consistency of the epidemiologic data, and disease prevention that may follow from a practical reduction in fat consumption." Cancer Causes Control **1**(1): 81-97; discussion 99-109.
- Ribeiro, U., Jr., A. V. Safatle-Ribeiro, et al. (2006). "Does the intraoperative peritoneal lavage cytology add prognostic information in patients with potentially curative gastric resection?" J Gastrointest Surg **10**(2): 170-6, discussion 176-7.
- Ries LAG, M. D., Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Altekruse SF, Lewis DR, Clegg L, Eisner MP, Reichman M, Edwards BK (eds) (2007). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute. Bethesda, MD. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/.
- Rosenberg, R., H. Nekarda, et al. (2006). "Free peritoneal tumour cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma." Br J Surg **93**(3): 325-31.
- Sadeghi, B., C. Arvieux, et al. (2000). "Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study." Cancer **88**(2): 358-63.
- Sano, T. (2001). "Is peritoneal carcinomatosis an incurable disease or controllable locoregional condition?--Challenge of surgeons with intraperitoneal hyperthermic chemotherapy." Jpn J Clin Oncol **31**(12): 571-2.

- Sauer, R., H. Becker, et al. (2004). "Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer." N Engl J Med **351**(17): 1731-40.
- Sawada, K., A. R. Radjabi, et al. (2007). "c-Met overexpression is a prognostic factor in ovarian cancer and an effective target for inhibition of peritoneal dissemination and invasion." Cancer Res **67**(4): 1670-9.
- Schiedeck, T. H., O. Schwandner, et al. (2000). "Laparoscopic surgery for the cure of colorectal cancer: results of a German five-center study." Dis Colon Rectum **43**(1): 1-8.
- Schmiegel, W., A. Reinacher-Schick, et al. (2008). "[Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008]." Z Gastroenterol **46**(8): 799-840.
- Schott, A., I. Vogel, et al. (1998). "Isolated tumor cells are frequently detectable in the peritoneal cavity of gastric and colorectal cancer patients and serve as a new prognostic marker." Ann Surg **227**(3): 372-9.
- Schrag, D., L. D. Cramer, et al. (2000). "Influence of hospital procedure volume on outcomes following surgery for colon cancer." Jama **284**(23): 3028-35.
- Schrag, D., K. S. Panageas, et al. (2003). "Surgeon volume compared to hospital volume as a predictor of outcome following primary colon cancer resection." J Surg Oncol **83**(2): 68-78; discussion 78-9.
- Schumpelick, V., N. Bleese, et al., Eds. (2006). Kurzlehrbuch Chirurgie. Stuttgart, Thieme.
- Shah, D. K., B. S. Shin, et al. (2009). "Use of an anti-vascular endothelial growth factor antibody in a pharmacokinetic strategy to increase the efficacy of intraperitoneal chemotherapy." J Pharmacol Exp Ther **329**(2): 580-91.
- Shen, P., J. Hawksworth, et al. (2004). "Cytoreductive surgery and intraperitoneal hyperthermic chemotherapy with mitomycin C for peritoneal carcinomatosis from nonappendiceal colorectal carcinoma." Ann Surg Oncol **11**(2): 178-86.
- Skipper, D., A. J. Cooper, et al. (1987). "Exfoliated cells and in vitro growth in colorectal cancer." Br J Surg **74**(11): 1049-52.
- Slanetz, C. A., Jr. (1998). "Effect of no touch isolation on survival and recurrence in curative resections for colorectal cancer." Ann Surg Oncol **5**(5): 390-8.
- Soreide, O., J. Norstein, et al. (1997). International standardization and documentation of the treatment of rectal cancer. Rectal cancer surgery. Optimisation - standardisation - documentation. O. Soreide and J. Norstein. Berlin Heidelberg New York, Springer: 405-445.
- Staib, L., K. H. Link, et al. (2002). "Surgery of colorectal cancer: surgical morbidity and five- and ten-year results in 2400 patients--monoinstitutional experience." World J Surg **26**(1): 59-66.
- Stelzner, F. (1962). "[The current status of rectal resection with sphincter retention and rectal amputation in cancer of the rectum.]." Bruns Beitr Klin Chir **204**: 41-63.
- Stephens, A. D., R. Alderman, et al. (1999). "Morbidity and mortality analysis of 200 treatments with cytoreductive surgery and hyperthermic intraoperative intraperitoneal chemotherapy using the coliseum technique." Ann Surg Oncol **6**(8): 790-6.

- Stewart, C. J., M. Morris, et al. (2007). "Identification of serosal invasion and extramural venous invasion on review of Dukes' stage B colonic carcinomas and correlation with survival." Histopathology **51**(3): 372-8.
- Sticca, R. P. and B. W. Dach (2003). "Rationale for hyperthermia with intraoperative intraperitoneal chemotherapy agents." Surg Oncol Clin N Am **12**(3): 689-701.
- Strohlein, M. A. and M. M. Heiss (2007). "Immunotherapy of peritoneal carcinomatosis." Cancer Treat Res **134**: 483-91.
- Sugarbaker, P. H. (1988). "Surgical management of peritoneal carcinosis: diagnosis, prevention and treatment." Langenbecks Arch Chir **373**(3): 189-96.
- Sugarbaker, P. H. (1991). "Cytoreductive surgery and intraperitoneal chemotherapy with peritoneal spread of cystadenocarcinoma." Eur J Surg Suppl(561): 75-82.
- Sugarbaker, P. H. (1995). "Peritonectomy procedures." Ann Surg **221**(1): 29-42.
- Sugarbaker, P. H. (1996). "Peritoneal carcinomatosis: natural history and rational therapeutic interventions using intraperitoneal chemotherapy." Cancer Treat Res **81**: 149-68.
- Sugarbaker, P. H. (1996). "Treatment of peritoneal carcinomatosis from colon or appendiceal cancer with induction intraperitoneal chemotherapy." Cancer Treat Res **82**: 317-25.
- Sugarbaker, P. H. (1999). "Management of peritoneal-surface malignancy: the surgeon's role." Langenbecks Arch Surg **384**(6): 576-87.
- Sugarbaker, P. H. (1999). "Successful management of microscopic residual disease in large bowel cancer." Cancer Chemother Pharmacol **43 Suppl**: S15-25.
- Sugarbaker, P. H. (2003). "Peritonectomy procedures." Surg Oncol Clin N Am **12**(3): 703-27, xiii.
- Sugarbaker, P. H. (2005). "A curative approach to peritoneal carcinomatosis from colorectal cancer." Semin Oncol **32**(6 Suppl 9): S68-73.
- Sugarbaker, P. H. (2006). "New standard of care for appendiceal epithelial neoplasms and pseudomyxoma peritonei syndrome?" Lancet Oncol **7**(1): 69-76.
- Sugarbaker, P. H., K. Kern, et al. (1987). "Malignant pseudomyxoma peritonei of colonic origin. Natural history and presentation of a curative approach to treatment." Dis Colon Rectum **30**(10): 772-9.
- Sugarbaker, P. H., O. A. Stuart, et al. (2006). "Pharmacokinetic changes induced by the volume of chemotherapy solution in patients treated with hyperthermic intraperitoneal mitomycin C." Cancer Chemother Pharmacol **57**(5): 703-8.
- Sugarbaker, P. H., T. D. Yan, et al. (2006). "Comprehensive management of diffuse malignant peritoneal mesothelioma." Eur J Surg Oncol **32**(6): 686-91.
- Takatsuki, H., S. Komatsu, et al. (2004). "Adhesion of gastric carcinoma cells to peritoneum mediated by alpha3beta1 integrin (VLA-3)." Cancer Res **64**(17): 6065-70.
- Tan, B., J. H. Wang, et al. (2001). "Sodium hyaluronate enhances colorectal tumour cell metastatic potential in vitro and in vivo." Br J Surg **88**(2): 246-50.
- Tanaka, S., K. Haruma, et al. (1995). "Endoscopic treatment of submucosal invasive colorectal carcinoma with special reference to risk factors for lymph node metastasis." J Gastroenterol **30**(6): 710-7.

- Targarona, E. M., J. Martinez, et al. (1998). "Cancer dissemination during laparoscopic surgery: tubes, gas, and cells." World J Surg **22**(1): 55-60; discussion 60-1.
- Thomas, D. B. and M. R. Karagas (1987). "Cancer in first and second generation Americans." Cancer Res **47**(21): 5771-6.
- Thompson, J. (1998). "Pathogenesis and prevention of adhesion formation." Dig Surg **15**(2): 153-7.
- Tietze, L., J. Borntraeger, et al. (1999). "Expression and function of beta(1) and beta(3) integrins of human mesothelial cells in vitro." Exp Mol Pathol **66**(2): 131-9.
- Tsujimoto, H., A. Hagiwara, et al. (1996). "Role of milky spots as selective implantation sites for malignant cells in peritoneal dissemination in mice." J Cancer Res Clin Oncol **122**(10): 590-5.
- Turnbull, R. B., Jr., K. Kyle, et al. (1967). "Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates." Ann Surg **166**(3): 420-7.
- UICC (2003). TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6.Aufl. C. Wittekind, H.-J. Meyer and F. Bootz. Berlin Heidelberg New York, Springer.
- Umar, A., C. R. Boland, et al. (2004). "Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability." J Natl Cancer Inst **96**(4): 261-8.
- Umpleby, H. C., B. Fermor, et al. (1984). "Viability of exfoliated colorectal carcinoma cells." Br J Surg **71**(9): 659-63.
- Vasen, H. F., J. P. Mecklin, et al. (1991). "The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)." Dis Colon Rectum **34**(5): 424-5.
- Verwaal, V. J., S. Bruin, et al. (2008). "8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer." Ann Surg Oncol **15**(9): 2426-32.
- Verwaal, V. J., S. van Ruth, et al. (2003). "Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer." J Clin Oncol **21**(20): 3737-43.
- Verwaal, V. J., S. van Ruth, et al. (2005). "Long-term survival of peritoneal carcinomatosis of colorectal origin." Ann Surg Oncol **12**(1): 65-71.
- Warn, R., P. Harvey, et al. (2001). "HGF/SF induces mesothelial cell migration and proliferation by autocrine and paracrine pathways." Exp Cell Res **267**(2): 258-66.
- Weitz, J., M. Koch, et al. (2005). "Colorectal cancer." Lancet **365**(9454): 153-65.
- Welch, D. R., A. Fabra, et al. (1990). "Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7678-82.
- Wiggers, T., J. Jeekel, et al. (1988). "No-touch isolation technique in colon cancer: a controlled prospective trial." Br J Surg **75**(5): 409-15.

- Wilson, J. R. and M. M. Weiser (1992). "Colonic cancer cell (HT29) adhesion to laminin is altered by differentiation: adhesion may involve galactosyltransferase." Exp Cell Res **201**(2): 330-4.
- Wind, P., B. Norklinger, et al. (1999). "Long-term prognostic value of positive peritoneal washing in colon cancer." Scand J Gastroenterol **34**(6): 606-10.
- Wright, C. L. and I. D. Stewart (2003). "Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas." Am J Surg Pathol **27**(11): 1393-406.
- Yamamoto, S., T. Akasu, et al. (2003). "Long-term prognostic value of conventional peritoneal cytology after curative resection for colorectal carcinoma." Jpn J Clin Oncol **33**(1): 33-7.
- Yan, T. D., D. L. Morris, et al. (2008). "Preoperative investigations in the management of peritoneal surface malignancy with cytoreductive surgery and perioperative intraperitoneal chemotherapy: Expert consensus statement." J Surg Oncol **98**(4): 224-7.
- Yan, T. D., O. A. Stuart, et al. (2006). "Perioperative intraperitoneal chemotherapy for peritoneal surface malignancy." J Transl Med **4**: 17.
- Yashiro, M., Y. S. Chung, et al. (1996). "Hepatocyte growth factor (HGF) produced by peritoneal fibroblasts may affect mesothelial cell morphology and promote peritoneal dissemination." Int J Cancer **67**(2): 289-93.
- Yonemura, Y., E. Bandou, et al. (2006). "Neoadjuvant treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination." Eur J Surg Oncol **32**(6): 661-5.
- Yonemura, Y., Y. Endou, et al. (2000). "Role of MMP-7 in the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer." Gastric Cancer **3**(2): 63-70.
- Young, R. C. and C. M. Wilson (2002). "Cancer prevention: past, present, and future." Clin Cancer Res **8**(1): 11-6.
- Ziprin, P., N. A. Alkhamesi, et al. (2004). "Tumour-expressed CD43 (sialophorin) mediates tumour-mesothelial cell adhesion." Biol Chem **385**(8): 755-61.
- Zivanovic, O., Y. Sonoda, et al. (2008). "The rate of port-site metastases after 2251 laparoscopic procedures in women with underlying malignant disease." Gynecol Oncol **111**(3): 431-7.

V Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. Volker Schumpelick möchte ich mich dafür bedanken, dass er die Durchführung dieser Promotionsarbeit an der Chirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen ermöglicht hat.

Besonders bei Herrn Professor Dr. med. Marc Jansen bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die engagierte, kompetente und stets freundliche Betreuung.

Meinem Freund und Laborpartner Andreas Alexander Heck danke ich ganz besonders für die außergewöhnlich gute und ausgelassene Zusammenarbeit an diesem Thema, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Zellkulturlabors des Instituts für Pathologie für die freundliche Unterstützung und die unzähligen Hilfestellungen, ohne die der erfolgreiche Abschluss der Experimente nicht möglich gewesen wäre. Dies gilt vor allem für Frau Dr. rer. nat. Sabine Neuß-Stein und Frau Stephanie Rosewick, die immer mit Rat zur Seite standen.

VI Erklärung zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei mir, Marcin Suchocki, Furthstr. 10, 47877 Willich hinterlegt sind.

VII Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsname	Marcin Suchocki
Geburtsdatum	21.02.1981
Geburtsort	Goldap/Polen
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	ledig

Schulbildung

1988 – 1990 Mikołaj Kopernik Grundschule Goldap/Polen
1990 – 1992 Gottfried-Kricker-Grundschule Anrath
1992 – 2001 Robert-Schuman-Gesamtschule Willich

Wehrdienst

2001 – 2002 Wehrpflicht in der 1. Kompanie des 154. Panzerbataillon in Westerborg

Universitäre Laufbahn

10/2002 Medizinisches Studium an der RWTH Aachen
08/2004 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11/2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Seit 12/2009 Assistenzarzt am St. Joseph-Stift in Bremen
Fachabteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie