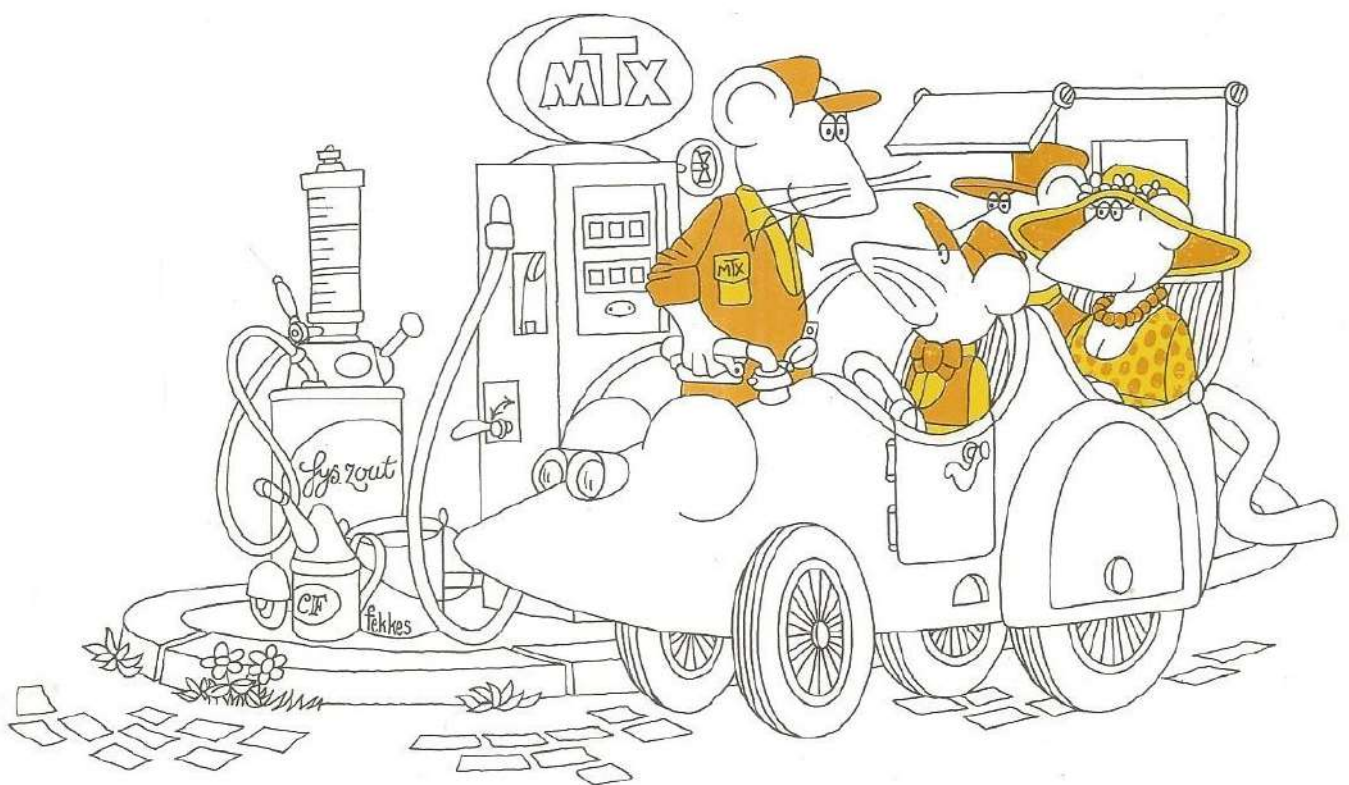




P.J. Pindram

Intra-arteriele Infusie van Methotrexaat bij de Rat

INTRA-ARTERIELE INFUSIE
VAN METHOTREXAAT BIJ DE RAT

INTRA-ARTERIELE INFUSIE VAN METHOTREXAAT BIJ DE RAT

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
GENEESKUNDE AAN DE RIJSUNIVERSITEIT TE LEIDEN,
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS Dr. A.E. COHEN,
HOOGLEAAR IN DE FACULTEIT DER LETTEREN,
VOLGENS BESLUIT VAN HET COLLEGE VAN DEKANEN
TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 14 NOVEMBER 1973 TE
KLOKKE 16.15 UUR

door

PAUL JOHAN SINDRAM

geboren te Amsterdam in 1944

1973

MONDEEL-OFFSETDRUKKERIJ
AMSTERDAM

PROMOTOR: PROF. DR. L.M. VAN PUTTEN
COPROMOTOR: PROF. DR. G. DE WIT

Het onderzoek vond plaats in het Radiobiologisch Instituut TNO te Rijswijk en het Centraal Laboratorium voor Experimentele Geneeskunde van de Vrije Universiteit te Amsterdam.

In 1971 werd financiële steun verleend door de Stichting Koningin Wilhelmina Fonds. De technische apparatuur werd vervaardigd in de werkplaats van het RI-TNO. De illustraties werden vervaardigd door de Medische Foto- Film- en Illustratiedienst van het Academisch Ziekenhuis der Vrije Universiteit en de fotografische afdelingen van het RI-TNO en het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis. Het omslagontwerp is van de heer A. Fekkes.

*Aan de nagedachtenis van Iyonne
Aan mijn ouders
Aan Sonja, David en Sander*

INHOUD

INLEIDING	9
HOOFDSTUK I	Methotrexaat (MTX) 13
HOOFDSTUK II	Toepassing van MTX bij de behandeling van hals-hoofd tumoren 17
	Inleiding 17
	Geschiedenis van intra-arteriële infusie in het hals-hoofd gebied 17
	Vroege resultaten van intra-arteriële infusie van anti-metabolieten ter behandeling van hals-hoofd tumoren 18
	Recente literatuurgegevens betreffende intra-arteriële toediening van MTX in het hals-hoofd gebied 20
	Literatuurgegevens van systemische schema's 23
HOOFDSTUK III	Ontwerp van een diemodel voor intra-arteriële infusie 27
	Algemene eisen aan een diemodel voor continue intra-arteriële infusie van cytostatica 27
	Specifieke eisen aan een model voor continue intra-arteriële infusie van cytostatica 28
	De keuze van het proefdier 28
	De keuze van de tumor 28
	Bepaling van de toxiciteit van MTX in het model 29
	De keuze van het stroomgebied 29
	De keuze der technische middelen 30
HOOFDSTUK IV	Gevolgdde methodieken bij de eigen experimenten 37
	Het proefdier 37
	De tumor 37
	Het regionale stroomgebied 38
	Transplantatie techniek 41
	Operatietechniek van de rat voor infusie 43
HOOFDSTUK V	Resultaten 55
	Gegevens betreffende onbehandelde proefdieren 56
	Eerste schema. Zeven dagen continue intra-arteriële infusie van MTX 56
	Het tweede schema. Zeven dagen continue intra-arteriële infusie van MTX in combinatie met vier maal daags CF intraperitoneaal 63

Toxiciteit van het eerste en tweede schema	64
Lokale toxiciteit	67
Derde schema. Twee maal een 24-uurs infusie van MTX intra-arterieel op dag 1 en 4. Op de overige dagen 2, 3, 5, 6 en 7 wordt de catheter opgehouden door de continue intra-arteriële infusie van fysiologisch zout	7

KONKLUSIES EN BESCHOUWING	71
SAMENVATTING	73
SUMMARY	75
LITERATUUROPGAVE	77

INLEIDING

Regionale continue intra-arteriële infusie van cytostatica wordt in het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis, de kliniek van het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam, toegepast bij een speciaal geselecteerde groep patiënten met tumoren in het gebied van hals en hoofd als eerste onderdeel van een in principe kuratief opgezette combinatiebehandeling met bestraling en/of chirurgie. Methotrexaat (MTX) is het meest gebruikte cytostaticum. De regionale infusie van MTX wordt gekombineerd met de algemene toediening van zijn antidotum leucovorine (Calcii folinas, CF) om de algemene toxiciteit tegen te gaan.

Terwijl het toevoegen van MTX aan de konventionele behandelingsmethoden bij geselecteerde patiënten met tumoren in hals en hoofd over het algemeen als een winst wordt beschouwd, bestaat geen eenstemmigheid over de wijze van toedienen en dosering ervan.

De reden waarom men in het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis heeft gekozen voor intra-arteriële infusie is dat in het stroomgebied van de tumor een hogere concentratie van het cytostaticum in de weefsels en in de tumor wordt verkregen dan daarbuiten (Anderson e.a. 1970, Fig. 1). Dit zou resulteren in een sterker antitumor effect. Deze hypothese vindt steun in de volgende klinische waarnemingen: de belangrijkste oorzaak van het uitblijven van een remissie is een zogenaamd verkeerd stroomeffect, d.w.z. die situatie waarin de catheter zo gelegen

Aan allen die op enigerlei wijze aan de totstandkoming van dit proefschrift hebben bijgedragen betuig ik mijn hartelijke dank.

In het bijzonder wil ik danken Prof. Dr. L.M. van Putten voor de vriendelijke en geduldige leiding van het onderzoek, Prof. Dr. G. de Wit voor de gelegenheid die hij mij bood het proefschrift op de Keel-, Neus- en Oorheelkundige afdeling van het Akademisch Ziekenhuis der Vrije Universiteit te bewerken, Prof. Dr. J. Oort voor zijn belangstelling en zijn waardevolle adviezen, Dr. G.B. Snow als grondlegger van het idee voor dit proefschrift voor zijn inspiratie en zijn steun op de goede momenten, de heer J.T.M. van Dort voor zijn voortreffelijke operatieve assistentie en de heer J.A. Grimbergen eveneens voor de technische assistentie en voor de vele gezellige uren.

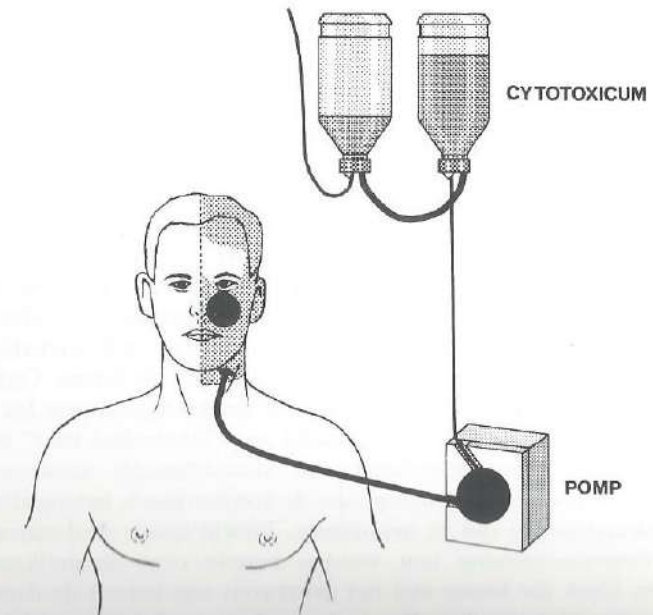


Fig. 1. Schema van de infusie van een arteria carotix externa (naar Snow 1966).

is dat de voedende arterie van de tumor niet optimaal met het infusaat doorstroomd wordt. Men kan dit nagaan door een kleurstof toe te voegen aan het infusaat (Routledge 1970, Desprez e.a. 1970, Snow 1971). Deze auteurs en anderen (Nervi e.a. 1970, Couture e.a. 1972, Sealy e.a. 1972) vermelden tevens dat in die gevallen waar een selectieve doorstroming van het tumorgebied wordt verkregen de sterkste antitumor effecten worden gezien, bijvoorbeeld wanneer in het geval van een tongcarcinoom uitsluitend de a. lingualis wordt doorstroomd.

Een nadeel van de continue intra-arteriële infusie is het feit dat er complicaties tengevolge van de techniek kunnen optreden. Bovendien zijn de laatste jaren een aantal publikaties verschenen waarin gesuggereerd wordt dat intermitterende intraveneuze toediening van MTX dezelfde resultaten geeft als continue intra-arteriële toediening, terwijl het eerste minder tijdrovend en makkelijker uitvoerbaar is. Hiertegenover staat echter dat ernstige complicaties tengevolge van de intra-arteriële toediening bij toenemende ervaring met de methode minder frequent blijken te worden.

Op grond van de literatuur alleen is het echter niet mogelijk de keuze voor een bepaalde toedieningswijze te funderen, omdat de betreffende patiëntenseries door verschillen in patiëntselectie, behandelingsschema's en beoordelingscriteria niet goed vergelijkbaar zijn.

Een zogenaamde "controlled clinical trial" zou de meest direkte methode zijn om uit deze impasse te geraken. Het opzetten ervan is echter zoals verder zal blijken vooralsnog een vrijwel onmogelijke zaak. Rekening houdend met het experimentele karakter van de combinatiebehandeling waar het hier om gaat, wordt de indicatie voor regionale infusie in het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis beperkt tot patiënten met een tumorproces van een zodanige uitbreiding, dat de kans op genezing met de gebruikelijke therapieën (radiotherapie en chirurgie) bijzonder klein wordt geacht. Voorwaarden voor deze behandeling zijn bovendien nog dat het proces niet eerder behandeld is geweest (in verband met de intacte vascularisatie) en het geheel binnen het stroomgebied van de a. carotis externa ligt. Al deze voorwaarden maken dat zelfs in een instituut met een groot aanbod van patiënten zoals het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis waarin circa 300 nieuwe patiënten met een maligniteit in het hals hoofd gebied per jaar gezien worden, het aantal patiënten dat voor deze combinatiebehandeling in aanmerking komt niet meer dan 10-12 per jaar bedraagt, terwijl dit aantal dan bovendien nog uiteenvalt in vele groepen wanneer een onderscheid wordt gemaakt naar tumorlokalisatie. (Inter-) nationale samenwerking tussen een aantal centra is dan ook vereist. Onlangs heeft de "head and neck cooperative group of the European Organisation for Research on Treatment of Cancer (E.O.R.T.C.)" getracht een "controlled trial" te organiseren naar de waarde van het toevoegen van chemotherapie (onderscheiden naar intra-arteriële en algemene toediening) aan de konventionele behandelingsmethoden bij plaveiselcelcarcinomen van de mondholte. Terwijl tussen de deelnemende centra gemakkelijk overeenstemming kon worden bereikt over de indikatiestelling tot chemotherapie, bleek dit helaas niet het geval voor wat betreft de daarop volgende therapie, chirurgie of bestraling. Het is dan ook niet gelukt deze trial te realiseren (Snow 1973).

Gezien het bovenstaande ligt het voor de hand te trachten met behulp van dierexperimenteel onderzoek een antwoord te verkrijgen op de vraag of intra-arteriële toediening van MTX superieur is aan de algemene toediening ervan. Enkele onderzoekers hebben zich hiermee reeds beziggehouden (Straub e.a. 1964, Norell e.a. 1965). Straub kon echter geen geschikte experimentele tumor vinden, terwijl Norell er niet in slaagde om de infusie langer dan 48 uur te laten duren vanwege de beperkte bewegingsvrijheid die zijn model het proefdier bood. Als uitgangspunt voor het in dit proefschrift beschreven onderzoek werden de volgende drie vraagstellingen geformuleerd:

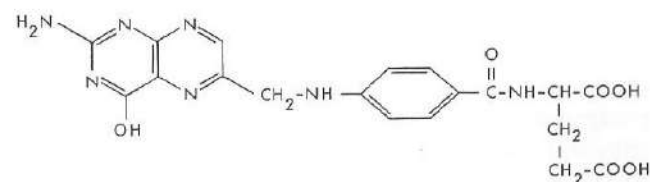
1. Kan een diermodel worden opgezet voor continue intra-arteriële infusie van MTX?
Zo ja:
2. Is in dit model het antitumor effect van continue regionale infusie van MTX superieur aan de continue algemene toediening ervan?
3. Is ook in een intermitterend schema het antitumor effect van regionale infusie van MTX superieur aan de intermitterende algemene toediening ervan?

In het eerste hoofdstuk wordt de aard en het werkingsmechanisme van MTX en CF besproken. In het volgende hoofdstuk wordt een overzicht gegeven van de klinische literatuur. In het derde hoofdstuk willen wij uitvoerig ingaan op de technische problemen die het ontwerp van een diermodel met zich meebrengt. In hoofdstuk IV wordt een eigen model bij de rat beschreven dat aan de gestelde eisen voldoet. In hoofdstuk V vermelden wij de resultaten van intra-arterieel en algemeen toegediend MTX in dit model. Hierna volgen de konklusies en beschouwing.

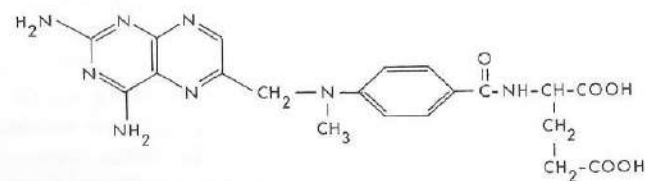
HOOFDSTUK I – METHOTREXAAT (MTX)

MTX is een voorbeeld van een stof die doelbewust ontwikkeld is. Het was al vroeger bekend dat bepaalde vormen van anaemie met gist- en leverextract bestreden konden worden (Wills 1933, Wills e.a. 1937). De chemische structuur van het werkzame bestanddeel foliumzuur werd in 1946 bekend (Angier e.a. 1946). Daarmee ontstond de mogelijkheid antagonisten van foliumzuur te ontwikkelen (Hutchings e.a. 1947, Seeger e.a. 1947). Farber had waargenomen dat foliumzuur-verbindingen acute leukemie bij kinderen activeerden (Farber 1948) en hij achtte het mogelijk met behulp van foliumzuurantagonisten de haemopoiese bij leukemie patiënten te kunnen remmen. Zo werd aminopterin en later amethopterin of methotrexaat (MTX) ontwikkeld. De internationale naam (I.N.N.) is Methotrexatum (de Ru 1972); de handelsnamen zijn o.a. Amethopterin en Ledertrexate. De structuurnaam van MTX is N-(4-[N-(2,4-diamino-6-pteridinylmethyl)methylaminol]benzoyl)glutaminezuur, of 4-desoxy-4-amino-N₁₀-methyl-foliumzuur (Fig. 1). MTX kan wel de plaats, maar niet de functie van foliumzuur en

FOLIUMZUUR



METHOTREXAAT



LEUCOVORINE

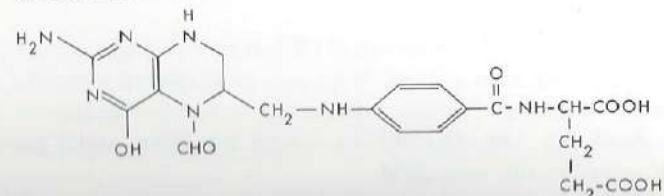


Fig. 1.1. De structuurformules van foliumzuur, methotrexaat en leucovorine laten de chemische verwantschap van deze stoffen zien.

dihydrofoliumzuur overnemen op het enzym dihydrofoliumzuurreduktase (ook genaamd foliumzuurreduktase). Hierdoor wordt de omzetting van foliumzuur en dihydrofoliumzuur in tetrahydrofoliumzuur, dat een coenzym is bij talrijke biosyntheses, geremd (Werkheiser 1961, Bertino 1963). Het gevolg is dat de opbouw van purinen en pyrimidinen in de periode van DNA-synthese (S-fase), die aan een deling voorafgaat, gestoord is. Wanneer de concentratie MTX intra-cellulair voldoende hoog is wordt de DNA-synthese geremd en gaat de zich delende cel te gronde.

Uit de recente literatuur zijn gegevens naar voren gekomen die de hierboven beschreven en vroeger algemeen geaccepteerde opvatting van het werkingsmechanisme aanvullen (Boesen en Davis 1969, Lederle Laboratories 1970, Rietberg 1972). In de eerste plaats blijkt MTX ook een ander enzym, namelijk thymidylaat synthetase, rechtstreeks te kunnen remmen (Borsa e.a. 1969). In de tweede plaats zijn met chromatografisch onderzoek van leverhomogenaten van muizen twee pieken eiwit-gebonden radioactief gelabeld MTX gevonden (Yoshino 1971). De eerste fraktie ontstaat bij zeer lage dosering van MTX (0,1 mg/kg) en is na zes maanden nog aantoonbaar. Deze fraktie waarin MTX hecht is gebonden, heeft dihydrofoliumzuurreduktase activiteit. De andere fraktie ontstaat pas na een hoge dosis van MTX (100 mg/kg) en is slechts enkele uren na toediening aantoonbaar. Deze fraktie heeft geen dihydrofoliumzuurreduktase activiteit en de binding met MTX is reversibel. In de kliniek is MTX alleen werkzaam bij een hoge dosis gedurende korte tijd (enkele uren, hooguit dagen). Dit korrespondeert met de hiervoor beschreven tweede fraktie zonder dihydrofoliumzuurreduktase activiteit, waarin de binding met MTX reversibel is. Hieruit volgt dat de werking van MTX niet uitsluitend berust op de remming van het enzym dihydrofoliumzuurreduktase.

Het feit dat MTX alleen in de S-fase van de celcyclus werkzaam is pleit voor langdurige toediening van MTX, wil men alle tumorcellen kunnen doden. Alleen dan kan men bereiken dat elke tumorcel tenminste éénmaal in S-fase is geweest en dus in zijn gevoelige fase aan MTX werd blootgesteld. MTX remt de DNA-synthese langs verschillende wegen waarvan de remming van thymidylaat en van de purine synthese in een *in vitro* model door Borsa werd bestudeerd (Borsa e.a. 1969). Het bleek dat de L-cellen in de experimenten gedood werden door de remming van de thymidylaat synthese, terwijl de gelijktijdige remming van de purine synthese verhinderde dat de cellen in S-fase kwamen en dus het doden van de cellen tegenwerkte. Deze "self-limiting property" van MTX pleit voor gefractioneerde toediening van MTX omdat de continue toediening verhindert dat alle tumorcellen tenminste éénmaal in S-fase komen.

Het juiste werkingsmechanisme van MTX is echter nog niet geheel opgehelderd. Er is wel veel onderzoek naar gedaan. Voor een gedetailleerd overzicht ervan wordt verwezen naar het nummer: "Folate Antagonists as Chemotherapeutic Agents" van de Ann. NY. Acad. Sci. 186, 363 (1971), waarin een groot aantal publikaties over foliumzuurantagonisten zijn verzameld.

Zoals hiervoor is beschreven remt MTX de omzetting van foliumzuur en dihydrofoliumzuur in tetrahydrofoliumzuur. Eén van de derivaten van tetrahydrofoliumzuur is het N_5 -formyl-tetrahydrofoliumzuur of leucovorine, dat een effectief

antidotum van MTX is gebleken (Fig. 1). De internationale naam is Calcii folinas (CF); handelsnamen zijn o.a. Ledervorin en Citrovorumfactor. Bij *in vitro* experimenten is gebleken dat CF het binnendringen van MTX in de cel competitief remt (Goldman e.a. 1968, Nahas e.a. 1969). Hoewel dit mechanisme zeker bijdraagt tot de antagonerende werking van CF is hiermee het werkingsmechanisme nog niet geheel opgehelderd. Het nut van CF is empirisch vastgesteld. In experimenten met de muizen leukemie L 1210 is de therapeutische breedte van de combinatie MTX + CF geringer dan van MTX alleen. Wanneer CF 12 tot 24 uur later wordt toegediend blijkt echter de combinatie effectiever dan MTX alleen (Goldin e.a. 1955, 1966). Reeds eerder waren gelijksoortige resultaten verkregen van de combinatie CF met aminopterin (Goldin e.a. 1953, 1954).

Men kan deze verschijnselen niet goed verklaren. De "rescue" die CF biedt verschilt blijkbaar voor de gastheer- en de tumorcellen: soms is de "rescue" van de gastheercellen, soms die van de tumorcellen sterker, al naar gelang het doseringsschema. Ook in de menselijke pathologie wordt de CF "rescue" beschreven, die al naar gelang het doseringsschema de therapeutische breedte van MTX vergroot (Bagshawe 1969, Levitt e.a. 1972).

MTX, soms toegepast in combinatie met CF, is vooral werkzaam gebleken tegen acute lymfatische leukemie, chorionepitheloom, Burkitt tumor en plaveiselcelcarcinomen in het hals-hoofd gebied. In dit proefschrift beperken wij ons tot de toepassing van MTX bij maligne tumoren in het gebied van hals en hoofd. In het volgende hoofdstuk wordt hierop nader ingegaan.

HOOFDSTUK II – TOEPASSING VAN MTX BIJ DE BEHANDELING VAN HALS-HOOFD TUMOREN

Inleiding

Reeds lang bekende cytostatica zijn door wijzigingen in de behandelings-schema's in de loop der jaren steeds nuttiger gebleken bij de bestrijding van maligne gezwellen. Men heeft betere doseringsschema's gevonden, verschillende cytostatica met elkaar gekombineerd en chirurgische en/of bestralingsbehandeling gekombineerd met chemotherapie.

Ten tijde van de introductie van de foliumzuur antagonisten bereikte men hiermee tijdelijke remissies van acute leukemie (Farber e.a. 1948) en choriontumoren (Hertz e.a. 1958). In de periode 1957-1964 was van 1770 acute leukemie patiënten de 5-jaars overleving 0,8% (Pierce e.a. 1969). In een recentere publikatie (Pinkel e.a. 1971) blijkt een 5-jaars overleving van 17% mogelijk geworden door verschillende cytostatica in een intensieve behandeling met elkaar te combineren. Deze resultaten zijn inmiddels alweer verbeterd. Het voert te ver hier dieper op in te gaan. Men zij verwezen naar de hoofdstukken over leukemie in het boek "Cancer chemotherapy", uitgegeven in de Boerhaave series door F. Elkerbout, P. Thomas en A. Zwaveling, Leiden (1971).

Speciaal ook heeft de behandeling van choriontumoren tegenwoordig na wijzigen van het therapie schema meer sukses. Men mag aannemen dat genezingen kunnen worden bereikt. Bagshawe (1969) beschrijft het resultaat van behandeling van 100 patiënten. 78 van deze 100 patiënten zijn vrij van tumor na een follow-up periode van 2 tot 10 jaar.

Aanvankelijk waren de resultaten van chemotherapie bij patiënten met hals-hoofd tumoren teleurstellend (Schoenbach e.a. 1952, Duval 1961). Ook in dit indikatiegebied hebben wijzigingen in de behandelingsschema's tot verbeterde resultaten geleid, hetgeen verder in dit hoofdstuk wordt beschreven.

Geschiedenis van intra-arteriële infusie in het hals-hoofd gebied

Een nieuwe mogelijkheid om de werkzaamheid van cytostatica te verhogen werd bij toeval ontdekt (Klopp e.a. 1950). Een patiënt kreeg een injectie met stikstofmosterd (een alkyliserend cytostaticum) per ongeluk in de a. brachialis. Het gevolg was een intensieve lokale reactie van de huid van hand en onderarm, die binnen enkele dagen volledig reversibel bleek. Dit suggereerde een nieuwe methode voor behandeling van regionale tumoren. De eerste patiënten die hiervoor in aanmerking kwamen, waren een aantal "uitbehandelde" patiënten met voor het merendeel laesies in het hals-hoofd gebied. Het resultaat van de behandeling was een sterke lokale reactie van het gezonde weefsel evenals een tijdelijk antitumoreffect, zoals weker worden van de tumor en afname van het volume. Opmerkelijk was dat de meeste patiënten een sterke verlichting van de plaatselijke pijn ondervonden.

Deze effecten konden met intraveneuze injecties van stikstofmosterd niet worden bereikt.

Veel beter nog werden de resultaten bij gebruik van MTX. Voor het eerst in de geschiedenis werden bij patiënten met hals-hoofd tumoren volledige remissies door chemotherapie gezien. Sullivan e.a. (1959) introduceerde de continue intra-arteriële infusie van antimetaboliëten in diverse stroomgebieden van het menselijk lichaam. De beste resultaten werden bij tumoren in het hals-hoofd gebied gezien. Tegenwoordig wordt deze methode vooral voor infusie van de lever en in het hals-hoofd gebied toegepast. De leverinfusies worden hier niet verder besproken omdat daarbij een ander cytostaticum, namelijk 5-fluoro-uracil, de voorkeur verdient boven MTX. In Nederland zijn de eerste publikaties over intra-arteriële infusie verschenen van Westbroek en Zwaveling (1964), Van Snow, Van Dongen en Van Slooten (1965) en van Luyendijk en van Beusekom (1965).

Vroege resultaten van intra-arteriële infusie van antimetaboliëten ter behandeling van hals-hoofd tumoren

De resultaten van Watkins en Sullivan (1964) waren als volgt: 59/68 patiënten hadden een technisch goede infusie ondergaan. Hiervan konden 53 objectief worden geëvalueerd. Een volledige remissie van de tumor werd bij 15 patiënten bereikt. Dit betekende een levensverlenging van tenminste een half jaar, soms meer dan drie jaar.

TABEL I

KOMPLIKATIES IN VROEGE GROTE SERIES TOT 1966 VAN KONTINUE INTRA-ARTERIELE INFUSIE VAN MTX IN HET HALS-HOOFD GEBIED

	Rogers (1964)	Watkins en Sullivan (1964)	Espiner (1966)	Tezamen
Aantal geëvalueerde patiënten	251 (tot) 187 (KNO)	136 (tot) 68 (KNO)	91	478 (tot) 346 (KNO)
Verkeerd gelegen of verstopte catheter	38	33	geen opgave	18 %
Hemiparese	25	5	12	8,8%
Infektie	14	19	9	8,8%
Mortaliteit t.g.v. de catheterisatie	7	9	0	3,3%
Mortaliteit t.g.v. bronchopneumonie	0	0	5	1 %
Ernstige toxiciteit van het beenmerg	25	geen opgave	geen opgave	10 %
Ernstige lokale toxiciteit	34	geen opgave	geen opgave	13,5%
Mortaliteit t.g.v. het cytotoxikum	9	6	0	3,1%
Mortaliteit tezamen	16	15	5	7,5%

Bij nog eens 27 patiënten werd het tumorvolume meer dan de helft kleiner, echter voor korte duur, namelijk gemiddeld niet langer dan drie maanden. De overige 11 patiënten toonden geen objectief anti-tumor effect. Deze resultaten werden in andere grote series bevestigd (Rogers 1964, Espiner 1966). Wanneer wij bedenken dat het uitbehandelde patiënten betrof die geen enkele kans hadden met enige andere therapie, zijn deze resultaten zeker niet te verwaarlozen. Omdat echter de remissie meestal van korte duur was en genezingen tot de hoge uitzonderingen behoorden, en omdat niet meer dan ongeveer 15% der patiënten goede palliatie ondervond, vond de infusiewerkgroep in het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis te Amsterdam evenals Desprez en Sullivan in andere behandelingscentra (Desprez e.a. 1970, Sullivan 1970) de nadelen zoals morbiditeit en technische komplikaties (zie tabel I) zwaarder wegen.

Toch was de infusiewerkgroep onder de indruk van het hoge aantal remissies dat bijvoorbeeld Watkins en Sullivan (1964) hadden bereikt: 42 van de 68 patiënten toonden, hoewel gedurende korte tijd, een remissie van meer dan 50%. Men besloot

TABEL II

KOMPLIKATIES VAN KONTINUE INTRA-ARTERIELE INFUSIE VAN MTX IN HET HALS-HOOFD GEBIED VERMELD IN DE LITERATUUR SEDERT 1970

Auteur	Bilder e.a. 1970	Nervi e.a. 1970	Snow e.a. 1973	Sealy e.a. 1972	Lawton e.a. 1972	Couture e.a. 1972	Freckman 1972	Tezamen
Aantal geëvalueerde patiënten	42	145	100	84	145	39	169	724
Verkeerd gelegen of verstopte catheter	geen opgave	11	15	12	geen opgave	2	12% (nl.73/604 infusies)	11 %
Hemiparese	0	0	1	2	3	2	1	1,2%
Infektie	2	9	0	4	geen opgave	geen opgave	2	3,2%
Mortaliteit t.g.v. cyto-toxicum	0	0	0	0	0	0	0	0 %
Mortaliteit t.g.v. de catheterisatie	0	0	1	0	0	0	1	0,3%
Mortaliteit niet gespecificeerd	1	0	2	3	0	0	0	0,8%
Mortaliteit tezamen	1	0	3	3	0	0	1	1,1%

daarom het indikatiegebied te wijzigen: na 1964 werd in het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis de regionale infusie voorbehouden voor een in principe kuratieve combinatiebehandeling met chirurgie en radiotherapie bij patiënten met geringe genezingskans van operatie en/of bestraling alleen. Deze indikatie wordt tegenwoordig ook door Sullivan gehanteerd, terwijl Desprez arteriële chemotherapie toegevoegd heeft aan de behandeling van iedere primaire lokale intra-orale tumor. Een overzicht van de resultaten tot 1966 kan men vinden in het proefschrift van Snow (1966): "Intra-arteriële infusie met cytotoxica bij maligne tumoren speciaal in het stroomgebied van de arteria carotica externa".

Recente literatuurgegevens betreffende intra-arteriële toediening van MTX in het hals-hoofd gebied

Gaat men de literatuur sedert 1970 na, dan blijken sommigen de continue intra-arteriële infusie bij uitbehandelde patiënten niet meer toe te passen, omdat zij door middel van gefractioneerde intraveneuze toediening vergelijkbare resultaten zouden verkrijgen (Hanham e.a. 1971, Healy e.a. 1971). Deze systemische toediening wordt later in dit hoofdstuk besproken. Anderen zijn overgegaan op de combinatie van de konventionele behandeling, namelijk radiotherapie en/of chirurgie, met arteriële chemotherapie (Bilder e.a. 1970, Couture e.a. 1972, Desprez e.a. 1970, Snow 1971 en Snow e.a. 1973, Sullivan 1970, Nervi e.a. 1970, Routledge 1970, Sealy e.a. 1972 en Lawton e.a. 1972). Het schema dat het merendeel (Routledge 1970, Couture e.a. 1971, Desprez e.a. 1970, Snow 1971 en Snow e.a. 1973 en Sullivan 1970) hanteert werd reeds in 1959 door Sullivan aangegeven. Dit schema van Sullivan luidt: continue intra-arteriële infusie van 50 mg MTX/24 uur gedurende 5-10 dagen, afhankelijk van de toxiciteit, en gelijktijdige toediening van het antidotum CF elke 6 uur intramusculair. Anderen (Sealy e.a. 1972, Nervi e.a. 1970, Bilder e.a. 1970) passen modificaties ervan toe, namelijk MTX zonder CF en in combinatie met andere cytostatica.

Niet elke auteur heeft de intra-arteriële infusie voor uitbehandelde patiënten verlaten (Couture e.a. 1972, Lawton e.a. 1972, Freckman 1972). In het bijzonder willen wij hier ingaan op de resultaten van Freckman. Het blijkt dat de vroege resultaten van Watkins en Sullivan 1964, Rogers 1964 en Espiner 1966) verbeterd kunnen worden. Zij bereikten een goede palliatie, gedefinieerd als meer dan 50% vermindering van het tumorvolume gedurende 6 maanden of langer, bij ongeveer 15% der patiënten. Freckman vond dat bij een groep van 169 patiënten 76 (44,9%) een remissie van het tumorvolume van meer dan 50% had gedurende 6 tot 96 maanden met een gemiddelde remissieduur van 14,5 maand. Dus bij bijna de helft der patiënten werd een goede palliatie bereikt. Het aantal ernstige complicaties bedroeg 1,4% van het aantal infusies.

De vraag rijst hoe het mogelijk was om de vroegere resultaten van Sullivan e.a. te verbeteren. Een verschil is dat Freckman de infusie, 5-14 dagen continu, in principe per 4 weken herhaalt met een gemiddelde van 3 infusies per patiënt. Een tweede verschil is dat Freckman geen CF toepast en MTX combineert met

5-fluoro-uracil, vinblastine sulfaat en andere cytostatica. Zijn indruk is namelijk dat een combinatie van cytostatica vaker een remissie induceert dan één stof afzonderlijk.

Hoewel, zoals reeds in de inleiding is vermeld, in de recente literatuur het toevoegen van MTX aan de konventionele behandelingsmethoden bij geselecteerde patiënten met tumoren in hals en hoofd over het algemeen als een verbetering wordt beschouwd (Bilder, Desprez e.a. 1970, Nervi e.a. 1970, Routledge 1970, Snow 1971, Snow e.a. 1973, Sealy e.a. 1972 en Couture e.a. 1972), bestaat geen eenstemmigheid over de wijze van toedienen en de dosering ervan. De verschillende schema's voor MTX worden later in dit hoofdstuk geëvalueerd. Nauwkeurige evaluatie van de klinische resultaten is echter niet mogelijk door het ontbreken van standaardisatie van behandelingschema's, patiëntselectie, beoordelingscriteria en statistisch verantwoorde controle series.

Het doel van de toevoeging van de chemotherapie aan de konventionele therapie is levensverlenging en grotere kans op curatie. De indruk bestaat dat dit doel vooral bereikt wordt bij patiënten met een goede remissie van het tumorvolume na chemotherapie. Ter illustratie mogen de gegevens hierover uit de publikaties van Snow, Desprez en Freckman worden genoemd:

Snow evalueert de resultaten van de combinatiebehandeling bij 100 patiënten (Snow e.a. 1973). Er zijn twee groepen. De eerste groep patiënten (60) heeft een goede remissie van meer dan 50% tumorvolume. De tweede groep, de overige 40 patiënten, hebben geen goede remissie. Na 4 jaar follow-up is het resultaat bij respectievelijk 35 en 19 patiënten te evalueren. 12 (= 34%) patiënten uit de eerste groep en 3 (= 16%) uit de tweede groep zijn na 4 jaar zonder recidief in leven.

Desprez behandelt alle primaire lokale intra-orale carcinomen met chemotherapie volgens het schema van Sullivan, gevolgd door chirurgie (Desprez e.a. 1970). Ongeveer een kwart van de patiënten reageert met volledige makroskopische remissie na chemotherapie. Van deze eerste groep zijn na drie jaar follow-up 21 patiënten te evalueren. Daarvan zijn 20 (= 95%) zonder recidief in leven. Van de overige driekwart zijn na eveneens drie jaar follow-up 64 patiënten te evalueren. Van deze groep zijn na de combinatiebehandeling 38 (= 59%) zonder recidief in leven.

Freckman tenslotte vermeldt een gemiddelde overlevingsduur van 16,9 maanden voor de patiënten die met meer dan 50% volumeregressie na chemotherapie reageerden en 4,4 maanden voor de overige patiënten.

Bij de beschouwing van de therapeutische resultaten dient ook een ander aspect nog aan de orde te komen: de betere kans op revalidatie na combinatiebehandeling. Een aantal auteurs (Desprez e.a. 1970, Routledge 1970 en Couture e.a. 1972) wijzen erop dat na chemotherapie voor een deel der patiënten minder laederende operaties mogelijk zijn geworden met daardoor betere resocialisatie.

Het remissie percentage kan worden gebruikt om het effect van verschillende chemotherapeutische schema's na te gaan (tabellen I t/m VII). Voorzover wordt aangegeven, geeft regionale infusie in de recente literatuur (Desprez e.a. 1970, Bilder e.a. 1970, Snow e.a. 1973, Couture e.a. 1972, Freckman 1972) bij gemiddeld 53% der patiënten meer dan 50% tumorvolumevermindering. In tabel III is het remissie percentage na continue intra-arteriële chemotherapie in de literatuur sedert 1970

TABEL III

REMISSIE PERCENTAGE NA KONTINUE INTRA-ARTERIELE INFUSIE VAN MTX IN HET HALS-HOOFD GEBIED IN DE LITERATUUR SEDERT 1970

Auteur	Aantal geëvalueerde patiënten	Aantal (%) patiënten met een remissie van		Behandeling
		> 50%	100%	
Bilder e.a. 1970	41	24=59%	8=20%	Kombinatie met chirurgie en/of radiotherapie
Couture e.a. 1972	35	23=66%	geen opgave	Alleen chemotherapie of combinatie-behandeling
Desprez e.a. 1970	> 100	geen opgave	28=25%	Kombinatie met chirurgie
Freckman 1972	169	76=45%	geen opgave	Alleen chemotherapie
Snow e.a. 1973	100	60=60%	geen opgave	Kombinatie met chirurgie en/of radiotherapie
Tezamen	> 445	53%	~23%	

samengevat. Hieruit blijkt dat dit remissiepercentage vergelijkbaar is met dat van vroegere grote series (zie blz. 18). In tabel II de complicaties (blz. 19).

De frekwentie van de belangrijkste complicatie, de hemiparese, is afgenomen van gemiddeld 8,8% tot 1,2% (tabel I en II). De mortaliteit tengevolge van de catheterisatie is teruggedaan van gemiddeld 3,3% naar 0,3%, terwijl de mortaliteit tengevolge van niet nader gespecificeerde complicaties (bijvoorbeeld broncho-pneumonie) ongeveer even laag is gebleven (1% en 0,8%) en tengevolge van het cytotoxikum van 3,1% naar 0% is teruggedaan.

Uit deze cijfers blijken twee dingen heel duidelijk. In de eerste plaats is met de toegenomen ervaring intra-arteriële infusie een veiligere methode geworden die slechts in ongeveer 1-3% der gevallen ernstige complicaties met zich meebrengt. In de tweede plaats is het percentage verkeerd gelegen of verstopte catheters hoog gebleven. Deze ongevaarlijke complicatie brengt met zich mee dat de hoogste concentratie van het cytostaticum naast of geheel niet in de tumor terechtkomt. Het is waarschijnlijk dat zonder deze complicatie het percentage patiënten met een goede remissie veel hoger zou zijn. Zo zijn bijvoorbeeld Lawton e.a. (1972) en Routledge (1970) ervan overtuigd dat een verkeerde ligging van de catheter de belangrijkste oorzaak is van het uitblijven van een remissie bij een plaveiselcelcarcinoom. Deze gedachte vindt steun in het materiaal van Snow. Wanneer men uit zijn

resultaten de adenocarcinoompatiënten (15) en de patiënten bij wie een verkeerde ligging van de catheter is vastgesteld (11) weglaat, blijven 37 patiënten over met een plaveiselcelcarcinoom die een adequate infusiebehandeling hebben ondergaan. 33 (89%) toonden na chemotherapie meer dan 50% tumorregressie, hetgeen aantoont dat plaveiselcelcarcinomen bij adequate doorstroming voor het merendeel gevoelig zijn voor MTX.

Literatuurgegevens van systemische schema's

De belangstelling in de laatste jaren gaat uit naar intermitterende schema's, waarin MTX wekelijks of tweemaal per week intraveneus wordt gedoseerd (Papac e.a. 1967, Lane e.a. 1968, Leone e.a. 1968, Healy e.a. 1971). Deze auteurs vermelden dat bij ongeveer de helft der patiënten een tumorregressie van meer dan 50% wordt bereikt. Opmerkelijk is het schema van Leone (Leone e.a. 1968). Hij geeft wekelijks een zeer hoge dosis MTX per intraveneuze injectie. Bij 20/35 patiënten met een recidief in het hals-hoofd gebied wordt een tumorremissie bereikt van meer dan 50%. De gemiddelde duur van deze remissie bedraagt vier maanden. Healy heeft de werkzaamheid van deze wekelijkse intraveneuze injecties nog eens bevestigd. In tabel IV zijn het remissie percentage en de toxiciteit van deze schema's samengevat. Deze resultaten zijn duidelijk beter dan die van maandelijks vijf tot tiendaagse kuren per os of intraveneus (Huseby e.a. 1962, Papac e.a. 1963, Hellman e.a. 1964,

TABEL IV

REMISSIE PERCENTAGE EN TOXICITEIT VAN GEFRAKTIONEERDE INTRAVENEUZE INJEKTIES VAN MTX IN HET HALS-HOOFD GEBIED

Auteur	Schema	Aantal geëvalueerde patiënten	Aantal (%) patiënten met een remissie van		Toxiciteit		
			> 50%	100%	van het beenmerg	lokaal	mortaliteit
Papac e.a. 1967	i.v. injectie elke 4e dag	15	8=53%	0	14	1	0
Lane e.a. 1968	i.v. injectie elke 4e dag	27	14=52%	4=15%	11	20	1
Leone e.a. 1968	i.v. injectie wekelijks	35	20=57%	11=31%	26	24	3
Healy e.a. 1971	i.v. injectie wekelijks	80 (tot 57 (KNO))	28=49%	0	24	12	2
Tezamen		134	52%	11%	48%	36%	3,8%

TABEL V

REMISSIE PERCENTAGE EN TOXICITEIT VAN MAANDELIJKE 5-10 DAAGSE KUREN VAN MTX IN HET HALS-HOOFD GEBIED

Auteur	Schema	Aantal geëvalueerde patiënten	Aantal (%) patiënten met een remissie van			Toxiciteit	
			> 50%	100%	duur in dagen	beenmerg en lokaal	mortaliteit
Huseby e.a. 1962	25 mg totaal verdeeld over de dag in 5 dagen per os	8	3=37%	0	geen opgave	ernstig	1
Papac e.a. 1963	25 mg per os per dag 5 dagen	24	4=17%	0	28	17	3
Papac e.a. 1963	25 mg i.v. per dag 5 dagen	23	4=17%	0	28	8	0
Hellman e.a. 1964	0,2 mg i.v. per dag 5 dagen	10	4=40%	0	geen opgave	niet ernstig	0
Andrews 1967	0,2 mg i.v. per dag 4 dagen	174 (tot 11 (KNO))	3=27%	0	21	38	1
Sullivan e.a. 1967	5 mg per os of i.v. per dag, verdeeld over de dag, 5-10 dagen	13	7=54%	0	132	niet ernstig	0
Tezamen		89	28%	0%			2%

Andrews 1967, Sullivan e.a. 1967). Zij tonen bij ongeveer 30% der patiënten een tumorregressie van meer dan 50% (tabel V).

De laatste jaren wordt door een groep Amerikaanse onderzoekers (Lefkowitz e.a. 1967, Mitchell e.a. 1968, Capizzi e.a. 1970, Levitt e.a. 1972, Bertino e.a. 1973) intensief gewerkt aan de klinische evaluatie van intermitterende 24-42 uren infusie van MTX, gevolgd door CF "rescue". De resultaten zijn in tabel VI samengevat; Levitt heeft ook de MTX infusie gevolgd door CF "rescue" vergeleken met MTX infusie alleen. Zonder CF is zijn schema zeker niet effectiever, maar wel toxischer.

In de recente literatuur (1970 en later) worden systemische schema's met MTX ook toegepast in combinatie met radiotherapie (Friedman e.a. 1970, Mechl e.a. 1970, Capizzi e.a. 1970 en Rietberg 1972). Deze auteurs hebben allen de indruk dat

TABEL VI

REMISSIE PERCENTAGE EN TOXICITEIT VAN GEFRAKTIONEERDE 24-42 UURS INTRAVENEUZE INFUSIE VAN MTX GEVOLGD DOOR CF "RESCUE" IN HET HALS-HOOFD GEBIED

Auteur	Schema		Aantal geëvalueerde patiënten	Aantal (%) patiënten met een remissie van			Toxiciteit		
	MTX	CF		> 50%	75-100%	duur	beenmerg	lokaal	mortaliteit
Lefkowitz e.a. 1967	24 uur 1-3 mg/kg elke 2-3 weken	6 maal 6 mg 2x daags	18	4=22%	0	geen opgave	4	4	0
Mitchell e.a. 1968	24 uur 2 mg/kg elke 5e dag	4x 6 mg 4x daags	19	6=32%	3=16%	150	6	5	2
Capizzi e.a. 1970	24 uur 240 mg/m ² elke 4e dag	75 mg i.v. 12 uur infuus gevolgd door 4x 12 mg i.m. 4x daags	21	13=62%	7=33%	120	4	3	1
Levitt e.a. 1972	36-42 uur 360-1080 mg/m ² elke 2 weken	40 mg/m ² i.v. 6 uur infuus gevolgd door 4x 25 mg p.o. 4x daags	25	13=52%	0	120	geen opgave		1
Tezamen			83	43%	8,3%		24%	21%	4,8%

de chemotherapie in de combinatiebehandeling de kans op curatie vergroot. Voor uitvoerige bespreking wordt verwezen naar het proefschrift van Rietberg: "Methotrexate en radiotherapie", Groningen (1972). Hoewel men in zoveel verschillende centra overtuigd is van het nut van de combinatiebehandeling kan men op statistische gronden nog niet tot bindende uitspraken komen. Zoals reeds eerder in dit hoofdstuk en in de inleiding ter sprake kwam ontbreekt standaardisatie van de behandelingsmethoden en is het aantal patiënten voor controle series te gering. In tabel VII zijn de "over all" resultaten van de verschillende behandelingschema's nog eens onder elkaar gezet.

De intermitterende intraveneuze toediening blijkt vergeleken met de continue arteriële infusie ongeveer een gelijk remissiepercentage te geven. Uiteraard leveren de

TABEL VII

"OVER ALL" RESULTATEN VAN INTRA-ARTERIELE EN INTRAVENEUZE TOEDIENING VAN MTX, AL DAN NIET IN KOMBINATIE MET CF, IN HET HALS-HOOFD GEBIED

Schema	Aantal geëvalueerde patiënten	Aantal (%) patiënten met een remissie van		Toxiciteit			Mortaliteit t.g.v. andere complicaties
		> 50%	75-100%	van het been-merg	lokaal	mortaliteit	
Maandelijks kuren 5-10 dagen i.v. of per os	89	28%	0 %			2 %	
Gefractioneerde i.v. injecties	134	52%	11 %	48 %	36 %	3,8%	
Gefractioneerde i.v. infusies gevolgd door CF "rescue"	83	43%	8,3%	24 %	21 %	4,8%	
Kontinu intra-arterieel vroege grote series	478 (tot 346 (KNO))	55%	22 %	10 %	13,5%	3,1%	4,3%
Kontinu intra-arterieel	724 (tot > 445 (KNO))	53%	~23 %	6,5%	4,5%	0 %	1,1%

vergelijkingen in tabel VII onvoldoende fundering voor de keuze van een therapie. In de eerste plaats zijn de cijfers van het remissiepercentage na arteriële toediening hoger wanneer men er rekening mee houdt, dat ongeveer 11% der patiënten geen technisch goede infusie ondergaat. Overigens zouden deze patiënten nog voor systemische MTX behandeling in aanmerking kunnen komen. In de tweede plaats mag men de intermitterende intraveneuze resultaten niet met de intra-arteriële vergelijken, omdat tevens gefractioneerd tegenover kontinu gesteld is. Het lijkt niet onmogelijk dat gefractioneerde intra-arteriële infusie bij geselecteerde patiënten de beste resultaten zou geven. In de derde plaats hebben de hiervoor besproken onderzoekers geen uniforme patiëntselectie en geen vergelijkbare methodieken gebruikt.

Op grond van de hierboven geschetste tekortkomingen van de klinische gegevens formuleerden wij de volgende derde vraagstelling voor onderzoek in het diemodel: is ook in een intermitterend schema het antitumor effect van regionale infusie superieur vergeleken met de intraveneuze toediening bij dezelfde mate van toxiciteit?

HOOFDSTUK III – ONTWERP VAN EEN DIERMODEL VOOR INTRA-ARTERIELE INFUSIE

De betekenis van een diemodel voor de mens is niet dat men rechtstreeks de kwantitatieve gegevens van een behandelingsschema uit het model kan overdragen, maar wel dat algemene principes vaak toepasbaar blijken in een analoge situatie bij de mens. Een voorbeeld van een algemeen principe dat bij proefdieren werd ontdekt en dat overdraagbaar bleek naar de mens is dat de poging remissies van acute leukemie te handhaven zowel bij proefdieren als bij de mens meer kans van slagen had met een tweewekelijkse dan met een dagelijkse dosering van MTX (Goldin e.a. 1954, 1956, Acute Leukemia Group B, Selawry voorzitter, 1965).

In het algemeen neemt men aan dat de gegevens uit experimenten bij apen en honden een grotere voorspellende waarde hebben voor de mens dan de bevindingen bij kleine proefdieren. Het blijkt echter dat de letale toxiciteit van cytostatica, uitgedrukt in mg/m^2 , niet alleen bij apen en honden, maar ook bij muizen en hamsters opmerkelijk nauwkeurig overeenkomt met die bij de mens, terwijl de rat over het algemeen iets gevoeliger is gebleken (Freireich e.a. 1966).

Wat het effect op tumoren betreft, wordt wel het bezwaar aangevoerd dat experimentele tumoren sneller groeien dan menselijke tumoren. Dit bezwaar geldt niet zozeer voor het in dit proefschrift beschreven onderzoek, omdat gekeken wordt naar de relatieve effecten van regionale toediening van MTX ten opzichte van algemene toediening van deze stof. Het is dan ook niet de bedoeling om uit de experimentele gegevens het beste schema ter behandeling van de experimentele tumor te verkrijgen, maar wel het beste principe om MTX toe te dienen, regionaal of algemeen. Het beste schema kan namelijk van tumor tot tumor variëren, maar het beste principe, regionale of systemische toediening, is hier veel minder afhankelijk van.

Algemene eisen aan een diemodel voor continue intra-arteriële infusie van cytostatica

De algemene eis aan elk diemodel is dat de proefopstelling en de resultaten reproduceerbaar zijn. Voor een model voor intra-arteriële infusie kan bij een konstante infusiesnelheid alleen sprake zijn van een reproduceerbaar doorstromingseffect als de anatomische verhoudingen bij elk diersoort gelijk zijn. Dit betekent dat voor het ideale model alleen homogene proefdierpopulaties in aanmerking komen.

Er bestaan verschillende mogelijkheden om het effect van cytostatica op de tumor te meten. Men bepaalt bijvoorbeeld de overlevingsduur van het proefdier of het volume van de tumor. Wil men deze meting van het antitumoreffect bij een ander diersoort kunnen reproduceren, dan vereist dit onder andere een reproduceerbare parameter van een transplantabele tumor – bijvoorbeeld de groeisnelheid – hetgeen alleen bij ingeteelde dieren te realiseren is.

Specifieke eisen aan een model voor continue intra-arteriële infusie van cytostatica

Het opzetten van een diemodel voor intra-arteriële infusie roept een aantal specifieke vragen op ten aanzien van de keuze van proefdier, tumor, stroomgebied en infusietechniek. Deze worden achtereenvolgens besproken.

De keuze van het proefdier

De grote proefdieren zoals apen en honden hebben het voordeel dat zij grote bloedvaten hebben die gemakkelijk kunnen worden gecanuleerd. Er zijn echter bij deze diersoorten geen transplantabele tumoren beschikbaar bij ingeteelde stammen. Ditzelfde bezwaar geldt voor het konijn. De veelgebruikte VX-tumor (Straub e.a. 1964) is in wisselende mate antigeen voor verschillende individuele konijnen en geeft daardoor geen reproduceerbare groei. Deze verschillen worden nog eens versterkt na chemotherapie, waarbij door cellysis grote hoeveelheden antigenen vrijkomen. Het konijn komt dus niet in aanmerking voor een proefopstelling waarin men reproduceerbare antitumor effecten wil meten.

Bij de kleine proefdieren, zoals ratten en muizen, zijn wel transplantabele tumoren beschikbaar bij ingeteelde stammen. Deze kleine dieren hebben bovendien het voordeel dat ze gemakkelijk hanteerbaar zijn. Enerzijds zijn ze economisch te huisvesten en te verzorgen, anderzijds zijn ze goed onder narkose te brengen en behoeven ze niet met strikt aseptische technieken te worden geopereerd.

Bij de keuze tussen muizen of ratten gaat de voorkeur uit naar ratten, omdat ze groter zijn en men hun arteriën derhalve gemakkelijker kan catheteriseren.

De keuze van de tumor

Een gebruikelijke methode om het effect van cytostatica of van een bestralingbehandeling op een tumor te bepalen bestaat uit uitwendige meting in drie dimensies van die tumor, waarvan het produkt (mm^3) wordt gebruikt als relatieve maat voor het volume. Niet elke tumor is hiervoor geschikt. Zo bleek een adenocarcinoom bij Wag/Rij ratten multiële bloeditstoringen te bevatten, die het volume van de tumor onregelmatig beïnvloedden. Een overigens geschikt huidcarcinoom bleek door ulceratie en cystevorming evenmin bruikbaar. Een transplantabel rhabdomyosaroom bleek voor deze meetmethode echter wel geschikt. Bovendien konden bij deze tumor geen antigenen verschillen tussen gastheer en tumor worden vastgesteld, zodat geen rekening behoeft te worden gehouden met immuunreacties die interfereren met de groeisnelheid (Reinhold 1967). De tumor is mede geschikt voor een intra-arteriële proefopzet vanwege zijn ongevoeligheid voor intraperitoneale toediening van MTX (Franchi e.a. 1970). Met opzet werd een zeer resistente tumor gekozen om een sterk regionaal effect te kunnen meten. Indien de behandeling met MTX van de gebruikte tumor in de verder te beschrijven experimenten nergens tot genezing of verdwijning van de tumor heeft geleid, dan is dit niet een pover resultaat, maar een konsekwentie van deze bewuste keuze voor een zeer resistente tumor. Het effect van de behandeling is nu altijd kwantitatief uit te drukken als een nog nauwkeurig meetbaar tumorvolume.

Bepaling van de toxiciteit van MTX in het model

Wij kunnen lokale en algemene toxiciteit verwachten. De lokale toxiciteit bestaat uit beschadiging — erytheem, ulceratie — van de slijmvliezen in het lokale stroomgebied, dus van neus en mond. De algemene toxiciteit stelt — althans bij de mens, maar zoals zal blijken ook bij de rat — de grens aan de toe te passen dosis MTX, in het bijzonder de toxiciteit voor het beenmerg en de tractus digestivus.

Er zijn in tegenstelling tot de situatie bij de mens geen geschikte parameters bekend om deze algemene toxiciteit bij de rat kwantitatief te vervolgen. Uit eigen onderzoek is bijvoorbeeld gebleken dat het aantal leukocyten bij toename van de dosis wel geleidelijk afneemt wanneer men de resultaten van de tellingen bij een aantal dieren middelt, maar met zo een grote spreiding, dat men voor de individuele rat niet zijn toxisch "end point" kan aangeven als een leukocyten getal waaronder het dier doodgaat en waarboven het blijft leven. In de literatuur wordt in het algemeen de mortaliteit als toxisch "end point" voor cytostatica gebruikt. Men noteert de sterfte bij oplopende dosis en bepaalt uit deze gegevens de vorm van de dosis-mortaliteits curve. Op deze curve is bijvoorbeeld de letale dosis 50% (LD 50) aangegeven. Dat is dan die dosis, waarbij een kans van 50% sterfte is berekend. De betrouwbaarheid van deze berekening is zoals gemakkelijk valt in te zien afhankelijk van het aantal dieren. In de praktijk kan men voor het bepalen van de vorm van de dosis-mortaliteits curve volstaan met vier groepen van vijf tot tien dieren, nadat in een oriënterende proef is nagegaan in welk gebied mortaliteit optreedt.

De keuze van het stroomgebied

Bij de keuze van het stroomgebied zou men liefst de situatie bij de mens zoveel mogelijk nabootsen. Bij de rat is het kaliber van de a. carotis externa en haar vertakkingen echter zo klein, dat zowel directe niet occlusieve catheterisatie in de hoofdstam als indirecte occlusieve catheterisatie via een zijtak zoals bijvoorbeeld de a. thyroidea superior of de a. temporalis superficialis technisch moeilijk is. Ook komen andere infusiegebieden niet direct in aanmerking, bijvoorbeeld één van de achterpoten, omdat de a. femoralis en haar vertakkingen eveneens nogal klein van afmeting zijn.

In de literatuur worden wel een aantal catheterisatietechnieken voor intra-arteriële infusie bij kleine proefdieren beschreven (Norell e.a. 1965, Brown e.a. 1970, 1971, Goffinet e.a. 1972). Norell beschrijft een methode voor regionale infusie van hersentumoren bij de rat. Hij canuleert de a. iliaca dextra en schuift een dunne polyethyleen catheter retrograad op tot in de a. carotis communis sinistra. In een proefopstelling waarin de ratten in een nauwsluitend kooitje worden vastgeklemd, wordt een getransplanteerde hersentumor gedurende 48 uur met het cytostaticum vinblastine sulfaat regionaal doorstroomd. De auteur geeft als bezwaar van deze catheterisatietechniek aan, dat de catheter dikwijls opschuift en uit de a. carotis interna of externa moet worden teruggetrokken. Het gevolg van deze verkeerde ligging is dat de catheter het betreffende vat vrijwel geheel afsluit. Schuift de catheter op tot in de a. carotis externa dan gaat bovendien de infusievloeistof de verkeerde kant op.

Brown en Goffinet richtten hun onderzoek op stoffen die bestralingseffecten

kunnen versterken (radio-sensitizers). Aangezien deze stoffen vrij snel in de lever worden afgebroken, kreeiden zij een model voor regionale infusie bij de muis waardoor de lever wordt gepasseerd. Het eerste ontwerp gold de doorstroming van een getransplanteerde tumor in één van de achterpoten. Zij beschrijven de retrograde occlusieve catheterisatie van een a. renalis. De nier wordt daartoe aan die zijde opgeofferd. Dit model voldoet aan de door hen gestelde voorwaarde de lever te passeren. Voor infusie van cytostatica geldt het bezwaar, dat zo een groot gebied, namelijk de gehele onderste lichaamshelft, wordt doorstroomd, dat slechts geringe lokale winst aan concentratie van het cytostaticum in de tumor te verkrijgen is en het model niet meer analoog is aan de situatie bij de mens.

Het tweede ontwerp dat Brown en Goffinet beschrijven is het volgende: er wordt een catheter ingebracht in de a. carotis communis van een muis (Fig. 1). Deze arterie wordt daartoe aan de zijde van het hart onderbonden. De muis verdraagt deze onderbinding zonder zichtbare (neurologische) verschijnselen. Aldus geven de auteurs aan hersentumoren te doorstromen via de a. carotis interna van de muis (zie echter stelling 3). De parameter voor het antitumoreffekt in dit model is de overleving van de muis. Een sterker antitumor effect resulteert in een langere levensduur of overleving van de muis. Dit regionale stroomgebied is in principe ook geschikt voor infusie van cytostatica. Onze voorkeur gaat uit naar het rhabdomyosaroom bij de rat, waarvan de effecten kwantitatief door uitwendige meting kunnen worden vastgesteld. Er werd daarom besloten na te gaan of het regionale stroomgebied van de a. carotis externa kon worden benut in een analoog model bij de rat. In dat geval zou het rhabdomyosaroom in dit stroomgebied, bijvoorbeeld in de oorschelpen, kunnen worden getransplanteerd.

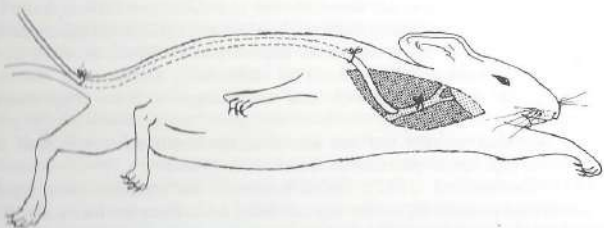


Fig. III.1. Deze figuur geeft de plaats aan van de catheter in een model voor regionale infusie met radio-sensitizers bij de muis. Brown (Brown e.a. 1970) meende dat de lokale doorstroming van een intra-cerebraal getransplanteerde hersentumor mogelijk werd door occlusieve catheterisatie van de a. carotis communis.

De keuze der technische middelen

Het spreekt vanzelf dat het proefdier, dat de infusie niet vrijwillig ondergaat, zal pogen de catheter los te trekken of stuk te knagen. Men zal voorzieningen moeten treffen om dit te voorkomen. In de literatuur zijn verschillende technieken

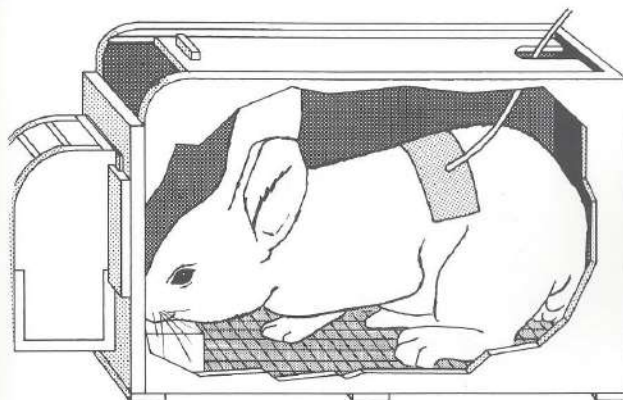


Fig. III.2. Het konijn dat in een smal hok is gehuisvest kan niet met zijn kop bij de catheter in zijn rug komen. Dit voorkomt dat de catheter wordt stukgeknagd (naar Straub e.a. 1964).

beschreven bij apen (Jennings e.a. 1968), honden (Dudrick e.a. 1970, Khazei e.a. 1968, Tagett e.a. 1968), konijnen (Straub e.a. 1964), ratten (Eve e.a. 1963, Little e.a. 1962, Flidner e.a. 1968, Vierling e.a. 1968, Norell e.a. 1965, Dalton e.a. 1969, Brown e.a. 1970) en muizen (Plager 1972, Lemmel e.a. 1971). Het gaat hierbij vrijwel steeds om ontwerpen voor intraveneuze infusie voor fysiologische proefnemingen.

In de eerste plaats kan men de dieren fixeren, zodat zij noch met voor- en achterpoten, noch met tanden en kiezen bij de catheter kunnen komen. Het bezwaar hiervan is dat de dieren in een stress-situatie geraten, zoals geïllustreerd wordt in de proefopstelling van Straub (Straub e.a. 1964). Hij plaatst konijnen in hokken die zo smal zijn, dat de dieren nog wel enige bewegingsvrijheid hebben, maar niet met hun kop bij de catheter in hun rug kunnen komen (Fig. 2). Een niet te verwaarlozen aantal van deze dieren krijgt een stressulcus of een maagperforatie.

Een andere proefopstelling is beschreven door Norell (Norell e.a. 1965). Hij plaatst ratten in een kooitje dat niet veel groter is dan het dier zelf. In deze positie eet noch drinkt het dier, waardoor de infusieduur beperkt is tot maximaal 48 uur. Weer een andere oplossing heeft Jennings, die apen in een metalen stoel zet. De stoel verhindert dat de dieren de catheter lostrekken (Fig. 3). Deze oplossing is bij apen door de mogelijkheid tot adaptatie van het proefdier goed te gebruiken; door knaagdieren wordt een dergelijke bewegingsbelemmering veel slechter verdragen.

Betere konstrukties zijn dan ook methoden die de catheter beschermen, maar waarbij de dieren hun bewegingsvrijheid houden. Zo wordt een infusiesysteem beschreven bij honden waar de catheter beschermd wordt door een flexibele metalen

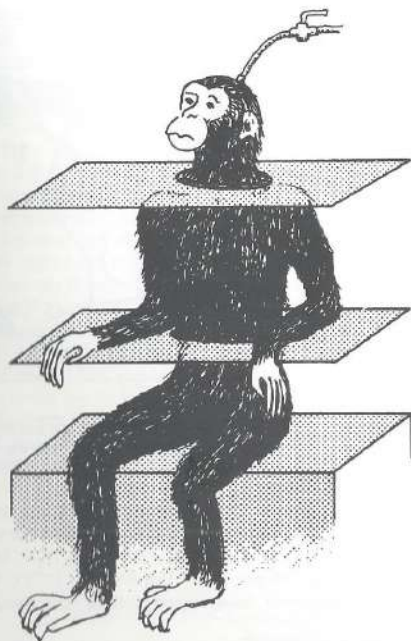


Fig. III.3. De stoel waarin de aap zit is zodanig gekonstrueerd, dat het dier de catheter bij de kop niet kan lostrekken (naar Jennings e.a. 1968).

kabel, terwijl het dier om zijn eigen as kan draaien door middel van een gewricht dat onbeperkte rotatie toestaat (swivel). Dit gewricht wordt boven de kooi in het infusiesysteem gemonteerd (Dudrick e.a. 1970) (Fig. 4). Andere auteurs bevestigen het gehele infusiesysteem op de rug van een hond (Khazei e.a. 1968, Tagett e.a. 1968). Voor kleine proefdieren is deze methode niet geschikt, omdat de infusiepomp te groot is. Bij ratten kan men de catheter door de huid bij de staart naar buiten laten komen en vervolgens tezamen met de staart in een knaagbestendig omhulsel omhoog laten lopen naar een swivel. De ratten worden ieder afzonderlijk in een glazen pot gehuisvest. Deze methode voldoet goed voor intraveneuze infusie die men wekenlang kan volhouden (Eve e.a. 1963, Little e.a. 1962, Fliedner e.a. 1968) (Fig. 5). Dalton (Dalton e.a. 1969) vindt de swivels niet betrouwbaar werken en bovendien te kostbaar voor grote groepen dieren. In plaats daarvan wordt een stuk

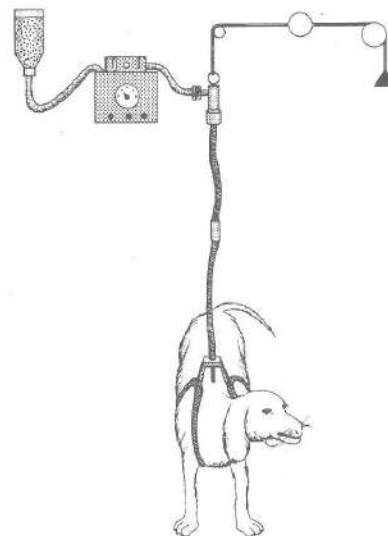


Fig. III.4. Catheter bevestiging bij een hond. De catheter loopt beschermd door een flexibele metalen kabel naar de nek van het dier. Een swivel maakt onbeperkte rotatie van het dier om zijn eigen as mogelijk (naar Dudrick e.a. 1970).

gordijnspiiraal ongeveer 30 cm boven het dier onbewegelijk vastgezet en aan de andere kant met draden en pleisters aan de rat gefixeerd (Fig. 6). De catheter loopt er doorheen en is op deze manier beschermd tegen doorknagen. Deze constructie laat de rat beperkte bewegingsvrijheid toe. Vierling (Vierling e.a. 1968) gebruikt eveneens een stuk gordijnspiiraal ter bescherming van de catheter. Aan deze spiraal is een knoop van polyethyleen gelijmd, die subcutaan in de nek van de rat wordt gehecht (Fig. 7). De dieren worden afzonderlijk in een glazen pot gehuisvest.

Uit deze literatuurgegevens volgt dat de ratten de grootst mogelijke bewegingsvrijheid houden in de constructies waarin swivels worden toegepast. Er werd derhalve besloten na te gaan of de swivels, die voor intraveneuze toepassing worden beschreven, de hogere intra-arteriële druk zouden verdragen. Omdat een infusiepomp beschikbaar was, waarmee zes infusies tegelijk kunnen worden gegeven, werd besloten een kompakte metalen behuizing te maken voor zes dieren tegelijk, mede omdat deze eenheid beter hanteerbaar is dan een aantal glazen potten. In de derde plaats leek de methode voor catheter-fixatie en bescherming die Vierling (Vierling e.a. 1968) beschrijft aantrekkelijk om over te nemen.

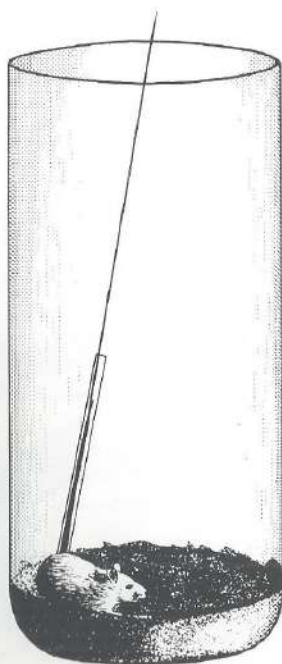


Fig. III.5. Catheter en staart van de rat lopen tezamen omhoog in een knaagbestendig omhulsel. De ratten worden ieder afzonderlijk in een glazen pot gehuisvest (naar Little e.a. 1962).

De bovenstaande konklusies luiden kort samengevat aldus: voor het ontwerp van een diervoor model voor intra-arteriële infusie van MTX is de rat het meest geschikte proefdier. Een transplantabel rhabdomyosaroom biedt de mogelijkheid het antitumor effect kwantitatief te meten. Het model dat Brown (Brown e.a. 1970) beschrijft bij de muis, namelijk regionale infusie van radio-sensitizers in het stroomgebied van de a. carotis interna door middel van occlusieve catheterisatie van de a. carotis communis, biedt mogelijkheden voor een analoog model bij de rat voor regionale infusie van cytostatica in het stroomgebied van de a. carotis externa, eveneens door middel van occlusieve catheterisatie van de a. carotis communis. Tenslotte werd om de catheter te fixeren en te beschermen gekozen voor een systeem, waarin de proefdieren zoveel mogelijk bewegingsvrijheid zouden hebben. De methode die Vierling (Vierling e.a. 1968) beschrijft, waarin hij gebruik maakt van

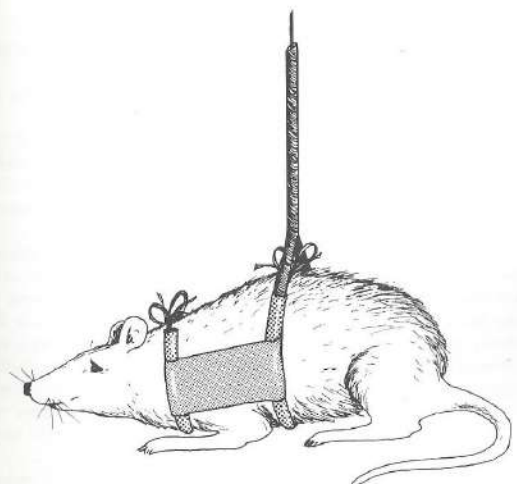


Fig. III.6. De catheter loopt beschermd door een stuk gordijnspiraal naar de flank van de rat. De spiraal is met draden, plastic en pleisters aan het dier gefixeerd (naar Dalton e.a. 1969).

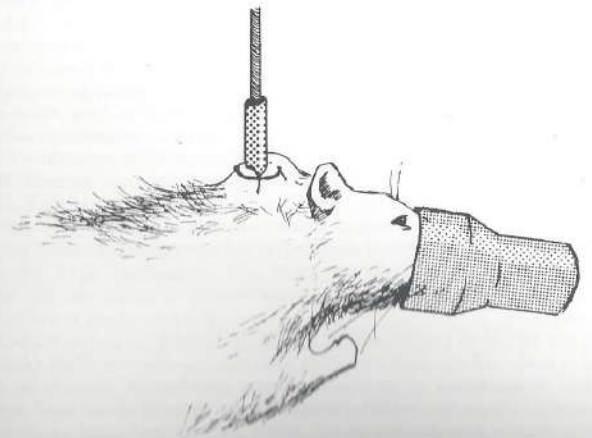


Fig. III.7. De catheter loopt eveneens als in Fig. III.6, beschermd door een stuk gordijnspiraal naar de nek van de rat. Aan deze spiraal is een knoop van polyethyleen gelijmd, die subcutaan in de nek van het dier wordt gehecht (naar Vierling e.a. 1968).

gordijnspiraal dat subcutaan aan de rat bevestigd wordt, leek, in combinatie met een swivel, hiervoor zeer bruikbaar.

De eigen techniek werd vanuit deze gegevens ontwikkeld en wordt in het volgende hoofdstuk besproken.

HOOFDSTUK IV – GEVOLGDE METHODIEKEN BIJ DE EIGEN EXPERIMENTEN

In het vorige hoofdstuk kwamen de uitgangspunten naar voren die tot de eigen proefopstelling hebben geleid. In dit hoofdstuk wordt de eigen proefopstelling besproken, onderverdeeld in gegevens over het proefdier, de tumor, het regionale stroomgebied en de technische aspecten van de proefopstelling.

Het proefdier

De ratten die voor de experimenten werden gebruikt zijn afkomstig van de eerste generatie van een kruising tussen twee ingeteelde stammen: Wag/Rij en Bn/Bi, die elk onder specifiek pathogeen-vrije condities, d.w.z. vrij van pleuropneumonia-achtige organismen en elke andere endemische ziekteverwekker worden gefokt in het Radiobiologisch Instituut van de gezondheidsorganisatie T.N.O. te Rijswijk. Voor de beschreven onderzoeken werden mannetjes gebruikt van ongeveer 250 g. De dieren werden gevoed met rattenkorrels (AM II 10 mm, Hope Farms) en leidingwater *ad libitum*.

De tumor

De gebruikte tumor ontstond in 1962 bij een Wag/Rij rat, die omstreeks acht maanden tevoren een totale lichaamsbestraling had ondergaan. Deze rat behoorde tot een groep proefdieren die voor beenmergtransplantatie was gebruikt. De oorspronkelijke tumor was in de onderkaaksmusculatuur gelokaliseerd en bleek goed transplanteerbaar binnen de stam. De primaire tumor was gemetastaseerd in enkele regionale lymfklieren en in de longen. Van de getransplanteerde tumoren werden nooit metastasen waargenomen.

Aanvankelijk werd de tumor geklassificeerd als een rhabdomyosarcoom. In de tumor konden myofibrillen en dwarse streping worden aangetoond met behulp van de phosphor-wolframszuur-haematoxyline (P.T.A.H.) kleuring volgens Mallory. Met de P.T.A.H. kleuring vertoonden latere passages echter niet meer het aspect van spierweefsel, doch van actief groeiend ongedifferentieerd sarcoom. Om de histologie met zekerheid vast te stellen is elektronenmikroskopisch onderzoek verricht in de afdeling Subcellulaire Pathologie van het Pathologisch Instituut van het Akademisch Ziekenhuis der Vrije Universiteit. Hier bleek inderdaad geen dwarse streping aantoonbaar die op myogene differentiatie wijst. Wel bleken de tumorcellen collageen fibrillen te produceren (Fig. 1).

De experimenten in dit proefschrift werden uitgevoerd met de R_1 lijn van het oorspronkelijke rhabdomyosarcoom, die sinds 1963 door Professor Barendsen in het R.I.-T.N.O. te Rijswijk diepgevroren wordt bewaard en in weefselweek wordt aangehouden. Deze lijn is uitvoerig op stralingsgevoeligheid onderzocht (Reinhold 1967, Hermens en Barendsen 1967 en 1969). Uit de weefselweek worden cellen teruggetransplanteerd in de flank van een Wag/Rij rat. De flanktumor die dan ontstaat wordt overgetransplanteerd naar de (Wag/Rij $\times$ Bn/Bi) F_1 ratten waarmee de experimenten worden verricht.

afgebonden a. carotis communis een zijtak geworden (Fig. 4A).

De plaats die bij uitstek voor transplantatie van de tumor in aanmerking komt, is de oorschelp, zoals continue infusie met 11% oplossing van "patent blue violet" illustreert (Fig. 4B, infusiesnelheid 0,11 ml per uur). Het oor wordt door de aa. auricularis anterior en posterior, beide zijtakken van de a. carotis externa, van bloed voorzien.



Fig. IV.4A. Detail opname van de carotis bifurkatie. De a. carotis communis vertakt zich in de aa. carotis interna en externa. De a. carotis externa geeft een tak af, de a. occipitalis. De a. carotis communis werd occlusief gecatheteriseerd. Voorzichtige injectie van "patent blue violet" toont aan dat de bloedstroom in de bifurkatie is omgekeerd. De a. carotis externa wordt door de interna van bloed voorzien, terwijl de communis (waarin de catheter ligt) een zijtak in dit geheel is geworden.



Fig. IV.4B. Kontinue infusie met 11% oplossing van "patent blue violet" (infusiesnelheid 0,11 ml per uur) illustreert dat bij uitstek de oorschelp een plaats is die voor transplantatie van de tumor in aanmerking komt.

Transplantatie techniek

Het transplanteren van de R_1 lijn van het rhabdomyosarcoom op het oor van de rat schept weinig problemen.

Allereerst wordt de tumor uit de flank van een donorrat vrijgeprepareerd en op een petrischaaltje met enkele ml Hanks voedingsvloeistof geplaatst. Daarna wordt hij achtereenvolgens in schijven, repen en tenslotte in blokjes van 1 mm^3 gesneden.

De receptorrat moet evenals de donorrat voor de transplantatie onder narkose gebracht worden. Hiervoor zijn verschillende stoffen beproefd. Men kan bijvoorbeeld intramusculair Nembutal (een barbituraat) geven. Bij oriënterende proeven hiermee bleek de dosis bij de door ons gebruikte ratten nogal kritiek. De open ether narkose, een eveneens veel toegepaste methode, had als nadeel dat de aandacht teveel verdeeld moest worden over operatie en narkose. Een bijkomend bezwaar vonden wij de etherdamp in de werkruimte. Bijzonder goed is ons de narkose met Hypnorm (fluanisone en phentanylcitraat, Philips-Duphar N.V.) bevallen. Het geeft in enkele minuten een diepe narkose gedurende ongeveer een half uur, waarna het dier geleidelijk, zonder excitatiestadium wakker wordt. De dosis is niet zo kritiek gebleken. 0,15 ml Hypnorm intramusculair geeft bij een rat van ca. 200 g een voldoende diepe narkose voor de transplantatie operatie.

Na deze injectie wordt na 5 tot 10 minuten de huid tussen de oren geschoren

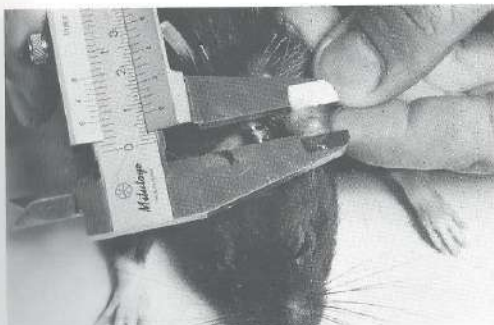


Fig. IV.5. De tumorgrootte die de parameter voor het antitumor effect is, wordt met een schuifmaat gemeten; eerst wordt de voor-achterwaartse diameter bepaald, vervolgens twee diameters loodrecht hierop. Het produkt van deze diameters (mm^3) is een betrouwbare maat voor het werkelijke tumorvolume, dat ongeveer de helft kleiner is.

en in de mediaanlijn' over een halve cm ingeknipt. Hiervanuit wordt aan beide zijden met een fijne kromme schaar een onderhuids zakje (pocket) stomp vrijgeprepareerd tot aan de voorrand van de oorschelpen. Beiderzijds wordt één blokje tumorweefsel in het diepste deel van deze pockets geplaatst, waarna uitwendig een dikte te zien is aan de voorrand van de oorschelpen ten teken dat de stukjes op de goede plaats terecht zijn gekomen. Hierna wordt de huid met één agrafe gesloten (9 mm, Clay Adams, TOTCO, Glendale Californië).

De tumor groeit in de oorschelp met een verdubbelingstijd van ongeveer 4,5 dag. De groeisnelheid kan beïnvloed worden door temperatuurschommelingen van de omgeving, zoals voor een tumortransplantaat in de staart van een muis door van Dongen (1961) is beschreven. Aangezien ook het oor een kwetsbare plaats is voor temperatuursinvloeden van buitenaf, werd de gehele proefopstelling in een klimaatkamer geplaatst met een konstante temperatuur van 20°C en een luchtvochtigheidsgehalte van 65%.

Onder deze omstandigheden is de rat na ongeveer 18 dagen geschikt voor infusie. De tumorgrootte die wij als parameter kozen voor het antitumor effect, wordt met een schuifmaat gemeten (Fig. 5); eerst in voorachterwaartse richting, vervolgens in twee richtingen loodrecht hierop. Het produkt van deze diameters (mm^3) dient als parameter van het tumorvolume. Aan het begin van een infusie bedragen deze volumes 200 tot 600 mm^3 . Bij een veronderstelde ellipsoïde vorm is het werkelijke volume ongeveer de helft kleiner. De inhoud van een ellipsoïde is namelijk $\frac{4}{3} \pi (0,5 a \cdot 0,5 b \cdot 0,5 c) = \frac{1}{6} \pi a \cdot b \cdot c$, waarin $\pi = 3,14$. Deze kan dus bij benadering gesteld worden op $0,5 a \cdot b \cdot c$. De inhoud van het bijbehorende blok is $a \cdot b \cdot c$, dus ongeveer 2 x zo groot. Uit het onderzoek van Reinhold (1967) blijkt deze meetmethode een betrouwbare maat te geven voor het tumorvolume en

ook voor het aantal cellen in de tumor. Wanneer in dit proefschrift over tumorvolume wordt gesproken, worden deze volumes bedoeld.

Operatietechniek van de rat voor infusie

Bij de operatie van de rat voor infusie wordt de a. carotis communis

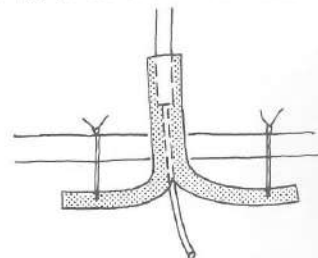


Fig. IV.6. Schema van de bevestiging van het infuussysteem aan de rat. Een stukje dikwandig siliconslang is subcutaan in de nek van de rat gehecht. Buiten het dier is hierin een roestvrij stalen buisje gestoken ($\varnothing 1 \text{ mm}$), binnen het dier de polyethyleen catheter (PP 10).

gecanuleerd met een polyethyleen catheter (PP 10, Portex, Hythe Kent Engeland), die subcutaan van de arterie naar de nek van het dier loopt. Daar gaat hij over in een stukje dikwandig siliconslang (SR 00, diameter inwendig 0,5 mm, uitwendig 3,5 mm, Talas Zwolle) dat aan de huid is bevestigd (Fig. 6). Dit siliconverbingsstukje kwam in de plaats van de plastic knoop die Vierling beschrijft; deze knoop werd in enkele oriënterende opstellingen eveneens subcutaan in de nek gehecht, maar liet na

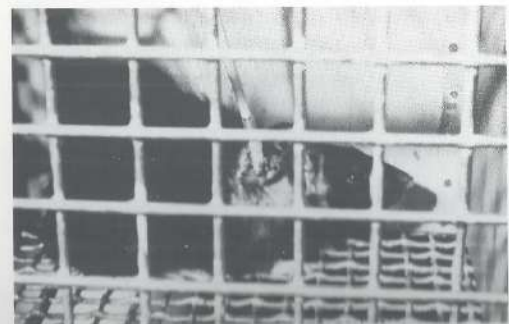


Fig. IV.7. Oriënterende proefopstelling. De knoop van polyethyleen, die subcutaan in de nek van de rat is gehecht (naar Vierling e.a. 1968), liet na ongeveer 1 week los door druknekrose op de plaats van de vrij scherpe rand.

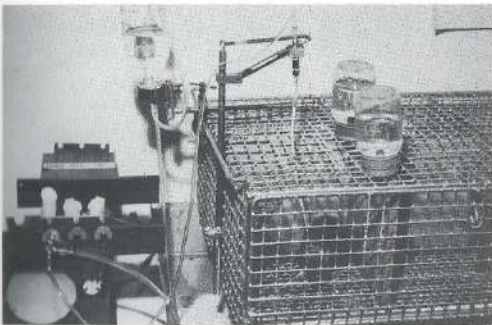


Fig. IV.8. Oriënterende proefopstelling. De catheter loopt beschermd door een stuk gordijnspiraal naar de rat. De verbinding tussen de pomp en de kooi bestaat uit polyethyleen slang nr. 300.

ongeveer 1 week los door druknekrose op de plaats van de vrij scherpe rand (Fig. 7). Het stukje silicon legt een volkomen soepele en toch stevige verbinding tussen het dier en het infusiesysteem. Buiten het dier is in de silicon slang een knaagbestendig roestvrij stalen buisje gestoken met een diameter van 1 mm en een lengte van 27 cm. Binnen het dier de polyethyleencatheter (PP 10). Dit buisje vervangt zowel het door Vierling beschreven zware stuk gordijnspiraal, als de catheter die er doorheen liep (Fig. 8).

Voor de operatie wordt de rat onder narkose gebracht met 0,2 ml Hypnorm



Fig. IV.9. Operatietechniek van de rat voor infusie. Instrumenten: a. schaar; b. fijne chirurgische pincet; c. fijne kromme pincetten; d. agrafe tang; e. agrafe verwijderder; f. agrafes; g. naaldvoeder; h. naalden; i. hechtlinnen; j. voersonde; k. naald gauge 25.

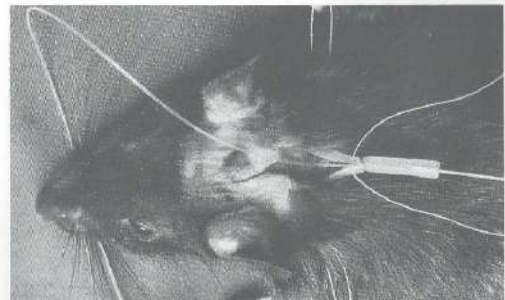
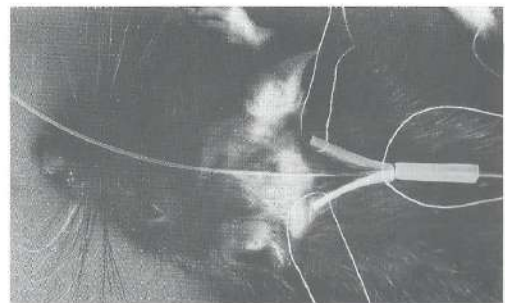


Fig. IV.10, IV.11 en IV.12. Operatietechniek van de rat voor infusie. Figuur 10, 11 en 12 laten zien hoe de catheter subcutaan in de nek van de rat wordt bevestigd.

intramusculair, een iets hogere dosis dan bij de transplantatie. Nek en hals worden geschoren, waardoor zo min mogelijk haren in de wond terecht komen. De operatie geschiedt in twee delen. Eerst wordt de catheter subcutaan in de nek bevestigd, waarbij de rat op zijn buik ligt. De huid in de nek wordt over twee centimeter in de mediaanlijn ingeknipt. Het stukje dikwandig silicon waarin aan de ene zijde PP 10 en aan de andere zijde het metalen buisje gestoken is kan nu in de nek worden bevestigd. Hiertoe wordt één uiteinde 1,5 cm ingeknipt. De zo ontstane helften worden ter weerszijde van de mediaanlijn subcutaan vastgehecht (Fig. 10, 11 en 12). In het tweede deel van de operatie wordt bij de rat in rugligging de a. carotis communis gecanuleerd. De huid wordt daartoe in de hals over 2,5 cm ingeknipt (Fig. 13). De polyethyleen catheter was tevoren reeds met behulp van een voersonde (Fig. 9) subcutaan van de nek naar voren naar de hals geleid. Men zoekt vervolgens de a. carotis communis op tussen de musculus sternohyoideus en sternomastoideus en treft haar aan onder de musculus omohyoideus, naast de trachea, prepareert haar vrij van de nervus Vagus en teugelt haar over een fijne gebogen pincet (Fig. 14). Dan wordt zij proximaal geligeerd (Fig. 15) en ingeknipt (Fig. 16) en met behulp van een naald (gauge 25) die als een soort schoenlepel fungeert, gecanuleerd met de inmiddels recht en op maat afgeknipte, met fysiologisch zoutheparine oplossing gevulde catheter (Fig. 17, 18 en 19). Na het sluiten van de huid (Fig. 20) is de rat nu voor infusie gereed.

In de experimenten met leucovorine werd dit antidotum van MTX elke 6 uur intraperitoneaal geïnjecteerd via een tweede gelijksoortige catheter, die op dezelfde wijze met een stukje siliconslang in de nek is gehecht (Fig. 21). Het polyethyleen gedeelte, eveneens PP 10, wordt dan van de nek onderhuids naar de buik gevoerd en scherp door alle buiklagen in de peritoneaal holte gelegd. Deze opening in de buikwand wordt met een tabakzaknaad in de spierlaag weer gesloten, waarmee de catheter tevens voldoende stevig aan de buikwand is gefixeerd.



Fig. 13 t/m IV.20. Operatietechniek van de rat voor infusie. Figuur 13 t/m 20 illustreren de occlusieve catheterisatie van de a. carotis communis. Fig. 13: incisie in de hals.



Fig. 14: de a. carotis communis wordt opgezocht en geteugeld over een fijne gebogen pincet. Fig. 15: de a. carotis communis wordt proximaal geligeerd. Fig. 16: de arterie wordt met een schaar geopend.

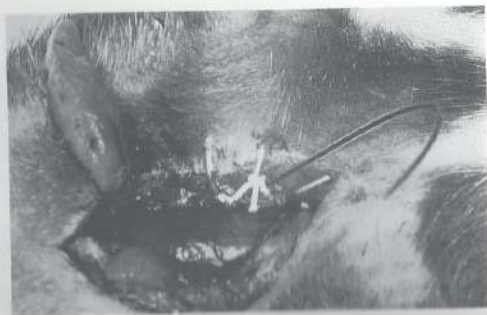
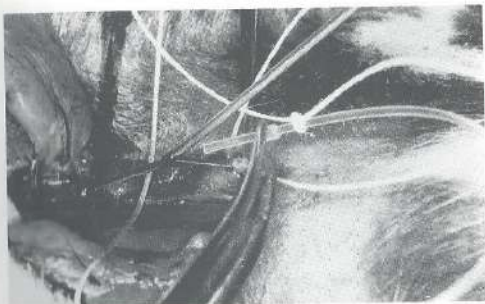


Fig. 17: de catheter wordt op geleide van een naald tot aan het polyethyleen manchetje (PP 30) in het vat geschoven. Fig. 18: fixatie van de catheter. Fig. 19: de hechtingen zijn aan elkaar geknoopt en afgeknipt. Het vat verdwijnt in de diepte tussen de spieren.



Fig. 20: de wond wordt met agrafer gesloten.

Voor de infusie wordt elke rat afzonderlijk in een compartiment van een metalen kooi geplaatst (Fig. 22 en 23). Oorspronkelijk was de kooi bedoeld voor 10-12 ratten tezamen, maar door onderverdeling in 6 compartimenten werd hij geschikt gemaakt voor de huisvesting van 6 dieren afzonderlijk. Ieder compartiment heeft een eigen voerbak en drinkflesje. Onder de gehele kooi bevindt zich een bak zaagsel die gemakkelijk kan worden verschoond. Boven elk compartiment is een swivel (waterticht swivel nr. 120, van Oortmessen Den Haag, Sage Instruments, Cambridge Massachusetts) (Fig. 24, 25 en 26) verend opgehangen, hetgeen de dieren volledige bewegingsvrijheid biedt. Hoewel deze swivels het kwetsbaarste onderdeel van de gehele proefopstelling gebleken zijn, weegt het voordeel van deze bewegings-



Fig. IV.21. In geval van intraperitoneale injecties zijn twee catheters i.p.v. één in de nek van de rat bevestigd. De voorste dient voor intra-arteriële infusie met MTX, de achterste voor intraperitoneale injecties met CF.

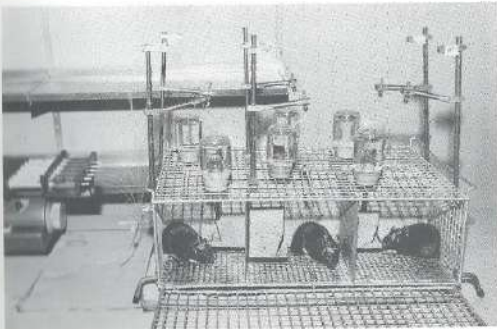


Fig. IV.22. Overzicht van de proefopstelling voor continue en intermitterende intra-arteriële infusie met MTX bij de rat.

vrijheid er ruimschoots tegenop. De swivel is met een stukje rubber en een stukje siliconslang verbonden met 1,5 m polyethyleen slang PP 30, die naar de pomp leidt. Na plaatsing van de rat in zijn eigen compartiment wordt het roestvrij stalen buisje zonder veel moeite door middel van een stukje dikwandig siliconslang verbonden met de boven zijn kooi opgehangen swivel, waardoor hij voor infusie op de pomp is aangesloten.

In geval van intra-peritoneale injectie is het tweede stalen buisje ook met een stukje siliconslang verbonden aan 1,5 m polyethyleen catheter (PP 30). Deze



Fig. IV.23. Detail van de rat in zijn compartiment.

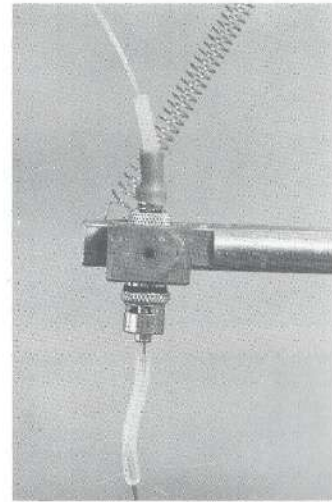


Fig. IV.24. Detail van de swivelophanging en de aansluitingen.

catheter echter wikkelt zich om de swivel wanneer de rat om zijn eigen as draait (Fig. 27). Daarom werd dan ook ongeveer één maal per dag de intraperitoneale catheter boven de kooi losgemaakt en teruggewikkeld.

In een oriënterende proefopstelling (Fig. 8) werd aanvankelijk als verbinding tussen pomp en kooi een polyethyleen catheter nr. 300 gebruikt. Geen der infusies bleef toen doorgankelijk; bij elk dier stroomde tengevolge van bloeddrukschommelingen in de loop van enkele uren wat bloed terug in de catheter en stonde, ondanks het verhogen van de hoeveelheid heparine tot zelfs zo hoge dosis dat spontane bloedinkjes in het operatiegebied gingen optreden. Na het vervangen van de PP 300 door een dunne catheter, PP 30, kwam verstopping door terugstromen nog maar zelden voor. Blijkbaar biedt de dunne toevoerleiding voldoende weerstand aan bloeddrukschommelingen.

De pomp (Braun Unita I, Melsungen Duitsland) is met een polyvinylchloride bovenstuk aangepast voor 6 disposable 20 ml spuitjes tegelijk (ONCE, A-Sik Denemarken) (Fig. 28). Deze spuitjes zijn verbonden met de zes hierbovengenoemde catheters, die weer uitkomen in de zes swivels.

De intraperitoneale injecties worden eveneens door middel van een pomp dag en nacht toegediend. Deze pomp wordt gestuurd door een tijdsklok die zo is afgesteld dat hij elke 6 uur een impuls geeft aan een relais dat de pomp gedurende een ingesteld aantal seconden in werking zet (Fig. 29).

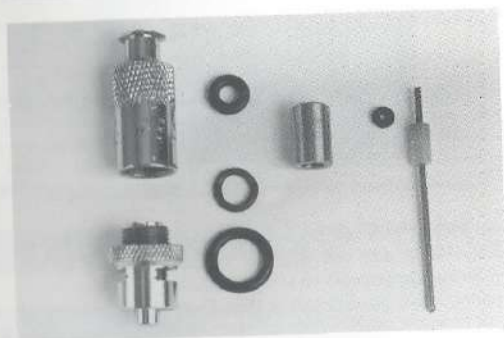
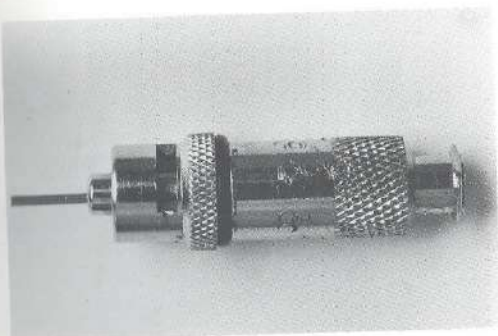


Fig. IV.25 en IV.26. Swivel in zijn geheel en gedemonteerd.

De pomp voor arteriële infusie is ingesteld op een infusiesnelheid van 2,67 ml per 24 uur, de pomp voor intraperitoneale injectie op 0,5 ml per keer, d.w.z. 2 ml per dag. Aan het arteriële infusaat wordt 10 internationale eenheden heparine per ml toegevoegd.

Tijdens de continue infusie van MTX gedurende 7 dagen en de intermitterende infusie van MTX op dag 1 en 4 in combinatie met fysiologisch zout infusie op de dagen 2, 3, 5, 6 en 7, wordt de tumor in het ene oor lokaal geïnfundeerd en tegelijkertijd de tumor in het andere oor via de algemene cirkulatie doorstroomd. Dit model heeft het voordeel dat de effecten van regionale en systemische toediening in hetzelfde dier met elkaar vergeleken kunnen worden. Dat wil zeggen dat dit dus altijd bij dezelfde mate van toxiciteit gebeurt. Voor de intermitterende infusie bleek in verband met de verwisselingen een iets hogere dosis heparine, 25 internationale

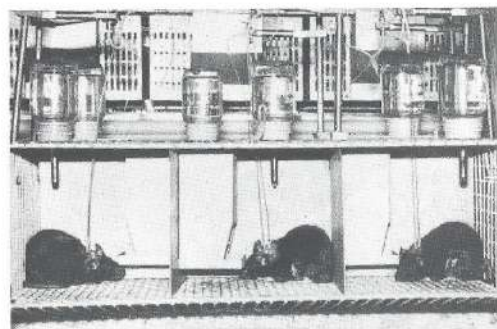


Fig. IV.27. Overzicht van de kooi in de proefopstelling voor continue intra-arteriële infusie met MTX in combinatie met CF elke 6 uur intraperitoneaal.

eenheden per ml, goed te voldoen.

Ter beëindiging van het infuus wordt een klem gezet op het stukje siliconslang dat swivel en roestvrij stalen buisje met elkaar verbindt. De pomp wordt uitgezet en het afgeklemd stukje siliconslang van de swivel losgetrokken. Vervolgens wordt het dier in de kooi onder narkose gebracht met een geringe dosis Hypnorm, 0,05 ml intramusculair. Na enkele minuten kan de rat dan zonder veel moeite uit de kooi genomen worden. Om te controleren of het infuus tot het einde toe doorgankelijk is gebleven, wordt de klem op het stukje siliconslang even losgelaten. Indien er direct bloed terugstroomt in het silicon verbindingsstukje in de nek van de rat, wordt perfecte doorgankelijkheid aangenomen. Wij hebben dit criterium gekozen na een aantal oriënterende experimenten met patent blue violet. Injecteren met deze kleurstof gaf in alle gevallen waarbij na infusie gemakkelijk bloed in de catheter terugstroomde lokale blauwkleuring, terwijl deze lokale blauwkleuring soms ontbrak bij de dieren waarbij na infusie het bloed niet direct in de catheter terugstroomde. De gegevens van deze laatste dieren werden niet verder bewerkt. Wanneer men aldus de doorgankelijkheid gecontroleerd heeft, wordt het silicon verbindingsstukje uit de nek van de rat verwijderd. De PP 10 catheter wordt dichtgeknoopt en blijft in het dier achter. Tenslotte wordt de huid met één agrafe gesloten.

Ter bepaling van de toxiciteit wordt het dier vervolgens gewogen. Het gewicht wordt vergeleken met dat vóór het infuus. Daarna wordt het dier drie weken lang in observatie gehouden en de sterfte in deze periode geregistreerd. Gegevens van de dieren die reeds tijdens de infusie zijn gestorven, werden voor wat het antitumor effect en het gewicht betreft niet verder bewerkt. Wel werd de sterfte genoteerd en verwerkt.

Andere criteria voor het elimineren van gegevens zijn de grootte en de vorm van de tumor geweest; onder de 200 mm³ wordt de bepaling van het tumervolume door

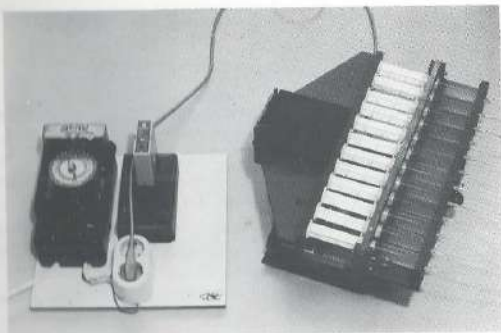


Fig. IV.28 en IV.29. De pompen voor intra-arteriële infusie en intraperitoneale injecties zijn met een polyvinylchloride bovenstuk aangepast voor respectievelijk 6 en 12 disposable 20 ml spuitjes. De pomp voor de intraperitoneale injecties wordt door een tijd klok gestuurd die elke 6 uur een impuls geeft aan een relais dat de pomp gedurende een ingesteld aantal seconden in werking stelt.

meetfouten te onnauwkeurig en boven de 1000 mm^3 gaat de tumor nogal eens ulcereren, omdat de huid van het oor blijkbaar te dun wordt. Ook dan kan het tumorvolume niet meer nauwkeurig gemeten worden en werden de gegevens geëlimineerd.

In het volgende hoofdstuk zullen de resultaten worden besproken.

HOOFDSTUK V – RESULTATEN

In het hiervoor beschreven diervorm wordt de tumor in de ene oorschelp van de rat regionaal geïnfundeed (regionale kant) en de tumor op het andere oor via de algemene cirkulatie doorstroomd (systemische kant). Dit biedt de mogelijkheid het antitumor effect van regionale en systemische toediening in hetzelfde dier met elkaar te vergelijken, wat het voordeel heeft dat dit dus altijd bij dezelfde mate van toxiciteit gebeurt.

Het effect op de tumorgroei en de toxiciteit van MTX werd in de drie volgende schema's onderzocht:

1. zeven dagen continue intra-arteriële infusie van MTX.
2. hetzelfde schema, in combinatie met vier maal daags CF intraperitoneaal.
3. twee maal een 24-uurs infusie van MTX intra-arterieel op dag 1 en 4. Op de overige dagen 2, 3, 5, 6 en 7 wordt de catheter opgehouden door de continue intra-arteriële infusie van fysiologisch zout.

De eerste twee continue schema's zijn opgesteld ter beantwoording van de eerste en tweede vraagstelling: is het mogelijk een model te ontwerpen waarin het effect van continue regionale infusie van MTX vergeleken kan worden met de algemene (systemische) toediening ervan, en zo ja, is regionale infusie superieur aan systemische toediening? Het derde schema is een intermitterend schema dat is opgesteld om de derde vraagstelling te kunnen beantwoorden: is ook in een intermitterend schema regionale infusie superieur aan systemische toediening voor wat betreft het antitumor effect, vergeleken bij dezelfde mate van toxiciteit?

Lokale toxiciteit, zoals bijvoorbeeld erytheem of ulcera van mond- en neus-slijmvlies, werd, met één uitzondering die later in dit hoofdstuk wordt besproken, nooit gezien, ook niet bij een letale dosis.

Als maatstaf voor de algemene toxiciteit is de sterfte genoteerd evenals het gewicht van de proefdieren op dag 0 en 7. Sterfte treedt 1 tot 3 dagen na afloop van de infusie op. Alleen bij de hoogste doses is sterfte tijdens infusie voorgekomen. In de observatieperiode tussen 3 dagen en 3 weken na de infusie is geen late sterfte opgetreden. De doodsoorzaak van MTX bij de mens is niet precies bekend (Bagshawe 1969). Om sepsis in onze proefopstelling als belangrijke doodsoorzaak uit te sluiten hebben wij verschillende malen zowel bij zeer zieke dieren als bij pas overleden dieren een bloedkweek afgenomen. In totaal waren slechts 2 bacteriekolonies te kweken, hetgeen erop wijst dat sepsis geen uniforme doodsoorzaak is geweest. Bij de intermitterende infusie is in verband met de verwisselingen van de infusievlocistof enige malen het infusaat op bacteriën gekweekt. Ook deze kweken bleken steriel.

Als maatstaf voor het antitumor effect geldt de mate van volumeverandering onder invloed van de infusie. Daarbij is zowel de regionaal als de via de algemene cirkulatie (systemisch) doorstroomde tumor gemeten.

Gegevens betreffende onbehandelde proefdieren

Voor de proeven werden ratten gebruikt die bij aanvang van de infusie een gewicht hadden van ongeveer 250 gram. Als vergelijkingsmateriaal voor de gewichtsverandering tijdens de proeven geven wij hier de normale gewichtstoename van een (Wag/Rij x Bn/Bi)F₁ rat van 250 g. Deze bedraagt in één week ongeveer 15 g (6%). Om de groeisnelheid van de tumor in de oorschelp van onbehandelde dieren vast te stellen is bij zeven dieren een tumor opgezet. Na 18 dagen werd het volume voor de eerste maal gemeten. Negen dagen later is het gemiddelde volume 385% van de uitgangswaarde op de 18e dag, hetgeen overeenkomt met een verdubbelingstijd van ongeveer 4,5 dag (Fig. 1).

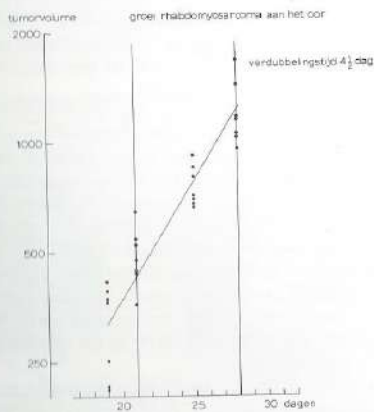


Fig. V.1. Groeisnelheid van het rhabdomyosarcoma in de oorschelpen van onbehandelde ratten. De punten geven de volumes weer van zeven tumoren gemeten op dag 18, 20, 25 en 28 na transplantatie. De verticale lijnen (bij dag 21 en 28) geven de virtuele infusieperiode van 7 dagen aan. De verdubbelingstijd bedraagt ongeveer 4,5 dag.

Eerste schema. Zeven dagen continue intra-arteriële infusie van MTX

Bij enkele oriënterende infusies bleken sterfte en antitumor effect op te treden bij 0,20 mg MTX/kg/dag, gegeven gedurende vijf dagen. Besloten werd de proeven uit te breiden tot een 7 daagse periode. De resultaten daarvan waren dat MTX aan de regionale kant een duidelijke groeiremming geeft, zowel bij de vier dieren die de dosis overleefden (Fig. 2), als bij de twee dieren die na infusie zijn doodgegaan (Fig. 3). Aan de systemische kant ontbreekt deze groeiremming, ook bij letale dosis, hetgeen wijst op het ontbreken van indirecte groeiremming ten gevolge van letale

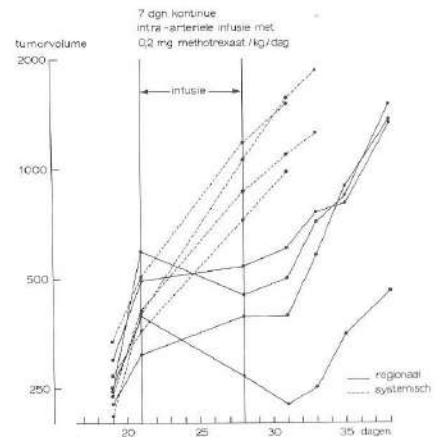


Fig. V.2. Het effect van 0,20 mg MTX/kg/dag op de tumorgroei. Elke lijn vertegenwoordigt één tumor. Weergegeven zijn de uitkomsten van vier dieren die deze dosis overleefden.

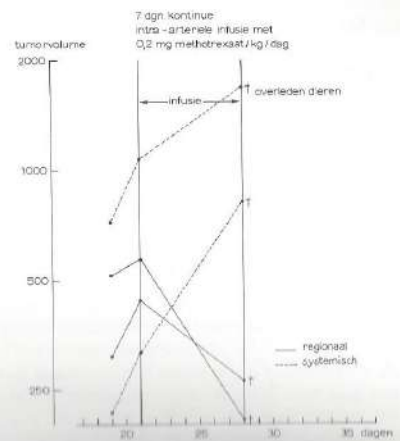


Fig. V.3. Het effect van 0,20 mg MTX/kg/dag op de tumorgroei. In deze figuur is het resultaat weergegeven van twee dieren die na afloop van de infusie zijn doodgegaan.

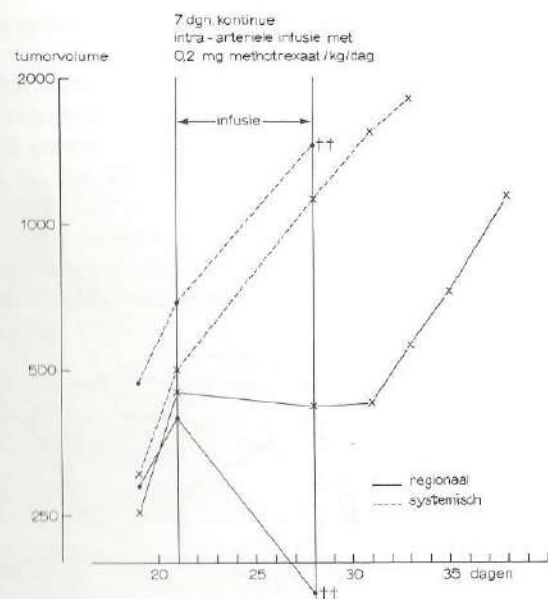


Fig. V.4. Het effect van 0,20 mg MTX/kg/dag. Gemiddelde waarden. Afzonderlijk zijn de gemiddelde uitkomsten weergegeven van de vier dieren die de dosis overleefden en de twee dieren die na afloop van de infusie zijn doodgegaan.

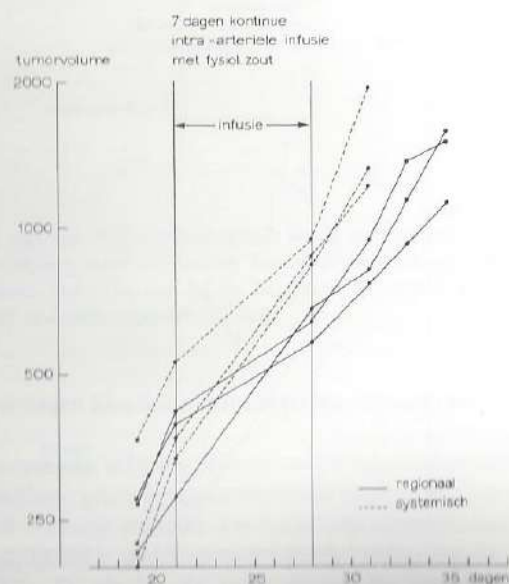


Fig. V.5. Het effect van controle infusie met fysiologisch zout op de tumorgroei. De uitkomsten bij drie dieren zijn weergegeven; elke lijn vertegenwoordigt één tumor.

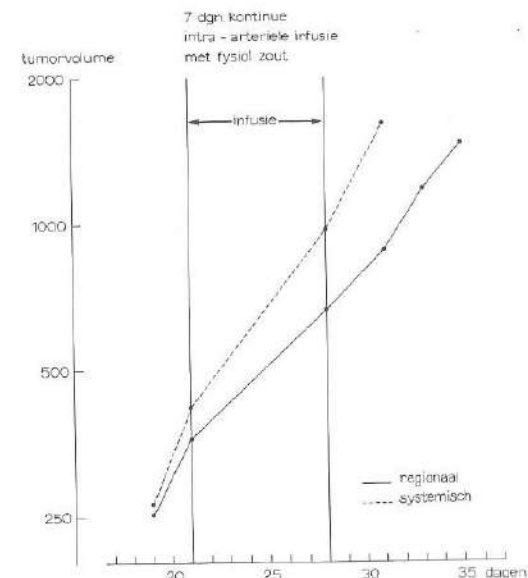


Fig. V.6. Het effect van controle infusie met fysiologisch zout op de tumorgroei. Weergegeven zijn de gemiddelde waarden.

toxiciteit. Fig. 4 geeft de gemiddelde waarden weer van de twee voorgaande figuren 2 en 3. De mortaliteit bedroeg 2/6 dieren. Het gewicht nam tijdens de infusie af met gemiddeld 8%.

Om de invloed van andere factoren dan MTX na te gaan werden tevens controle infusies met fysiologisch zout opgezet. Fig. 5 geeft de uitkomsten gemeten bij drie dieren. Er is enige groeiremming te zien aan de regionale kant vergeleken met de systemische kant. Fig. 6 geeft de gemiddelde waarden van dit experiment weer. Het gemiddelde volume na afloop van de infusies, uitgedrukt als percentage van het volume aan het begin van de infusie, is regionaal 184% en systemisch 221%. Het lichaamsgewicht nam tijdens infusie gemiddeld met 3% toe; er is geen sterfte of ziekte opgetreden bij deze controle dieren.

Uit het bovenstaande blijkt dat de dieren de infusie met fysiologisch zout goed verdragen. Tevens is er een antitumor effect van MTX meetbaar bij een dosis waarbij tenminste een deel van de dieren in leven blijft. Hieruit blijkt dat het diemodel geschikt is voor continue intra-arteriële infusie van MTX, waaruit volgt dat de eerste vraagstelling positief kan worden beantwoord.

De volgende stap was het aantal doses uit te breiden voor de bepaling van een dosis-effekt en een dosis-mortaliteit curve. Daarbij deed zich een technische complicatie voor. De tumor bleek veel sneller te zijn gaan groeien. De verdubbelingstijd bedroeg nog slechts twee dagen (Fig. 7). De oorzaak van deze verandering was een mutatie van de tumorlijn die in weefselkweek wordt aangehouden. Uit een onderzoek (Prof. Barendsen, R.I.-T.N.O. te Rijswijk) bleek het aantal chromosomen in de

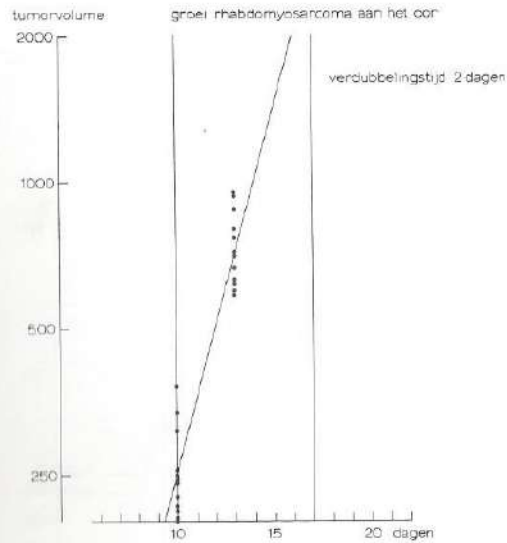


Fig. V.7. Groeisnelheid van de gemuteerde tumorlijn van het rhabdomyosarcoom in de oorschelpen van onbehandelde ratten. De punten geven de volumina weer van 12 tumoren, gemeten op dag 10 en 13 na transplantatie. De verdubbelingstijd bedraagt nu ongeveer 2 dagen (vergelijk Fig. V.1).

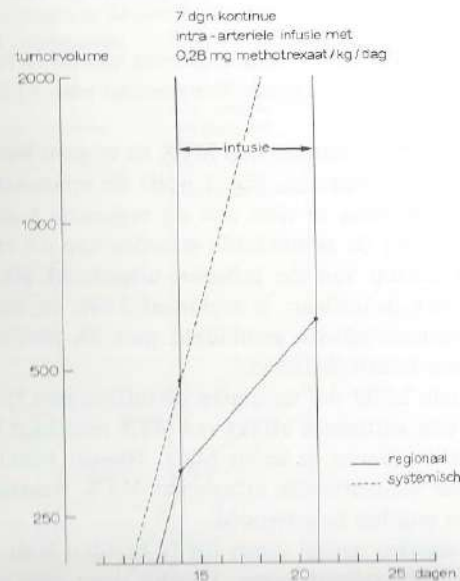


Fig. V.8. Het effect van 0,28 mg MTX/kg/dag op de groei van de gemuteerde tumor gemeten bij 6 dieren. De gemiddelde uitkomsten zijn weergegeven. Aan de systemische kant zijn alle tumoren gaan ulcereren waardoor zij niet meer nauwkeurig gemeten konden worden. Aan de regionale kant wordt de groei van de tumor wel geremd, maar deze resultaten kunnen niet gevoegd worden bij de uitkomsten van 0,20 mg MTX.

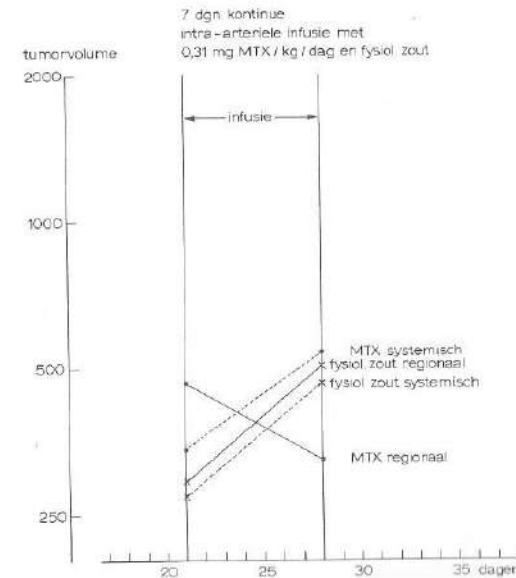


Fig. V.9. Het effect van 0,31 mg MTX/kg/dag op de (normaal groeiende) tumor. Gemiddelde waarden. De gemiddelde uitkomsten van MTX (9 dieren) en fysiologisch zout (2 dieren) zijn weergegeven. Het effect van MTX aan de infusiekant is veel sterker dan aan de systemische kant, terwijl dit verschil bij fysiologisch zout ontbreekt. Uit deze gegevens samen met de voorgaande gegevens van 0,20 mg MTX volgt dat in dit schema het antitumor effect van regionale infusie van MTX superieur is aan de systemische toediening ervan bij dezelfde mate van toxiciteit.

celkernen van de sneller groeiende lijn gemiddeld 45 te bedragen. Tevoren was dit gemiddeld 55. Het gevolg was dat alle controle tumoren na afloop van de infusie met fysiologisch zout te groot en door ulceratie niet meer betrouwbaar meetbaar waren. Hoewel regionaal wel een antitumor effect van MTX aantoonbaar was (Fig. 8), is het duidelijk dat deze gegevens verkregen bij zes dieren die infusie met 0,28 mg MTX/kg/dag hadden ondergaan niet met de eerder verkregen gegevens vergeleken kunnen worden. Wel zijn uiteraard de gegevens over lichaamsgewicht en mortaliteit bewerkt omdat de groeisnelheid van de tumor hierop geen invloed heeft.

Zodra deze complicatie ontdekt werd is het onderzoek voortgezet met tumoren van de eerder gebruikte lijn die diepgevroren bewaard wordt. Ter verdere bepaling van de dosis-mortaliteit curve werd een infusie met 0,31 mg MTX/kg/dag opgezet. De gemiddelde waarden van het effect gemeten bij negen dieren, vergeleken met twee controle dieren, is in Fig. 9 weergegeven. De dosis is zeer toxisch; 8/9 dieren zijn doodgegaan. Aan de regionale kant is het tumorvolume afgenomen met gemiddeld 31%, aan de systemische kant toegenomen met 55%. De volumina bij de controle dieren zijn toegenomen met gemiddeld 75% en 71%.

Wanneer wij deze resultaten samenvoegen met de resultaten van de infusie met 0,20 mg MTX/kg/dag, blijkt voor beide doses het antitumor effect aan de regionale

kant veel sterker dan aan de systemische kant. Dit verschil ontbreekt bij de controle infusies. Hieruit volgt dat het antitumor effect van regionale infusie, vergeleken bij dezelfde mate van toxiciteit, in dit model superieur is aan systemische toediening, waardoor de tweede vraagstelling voor het eerste schema positief kan worden beantwoord.

Op grond van de toxiciteitsgegevens uit de voorgaande experimenten werd zowel voor tumoren aan de regionale kant als voor tumoren aan de systemische kant een dosis-effekt curve bepaald met de volgende doseringen: 0,14, 0,20 en 0,28 mg MTX/kg/dag. Het resultaat is weergegeven in Fig. 10. De doses zijn volgens een logaritmische schaal op de horizontale as genoteerd. Vertikaal is de volume toename van de tumoren tijdens de zeven dagen infusie aangegeven. Genoteerd werd het tumorvolume na afloop van een infusie, uitgedrukt als percentage van het volume bij de aanvang van de infusie. De gemiddelde percentages aan de regionale kant zijn aangegeven met cirkels, die aan de systemische kant met driehoekjes. De metingen zijn verricht bij 6, 7 en 8 dieren, respectievelijk van lage naar hoge dosis. Van elk

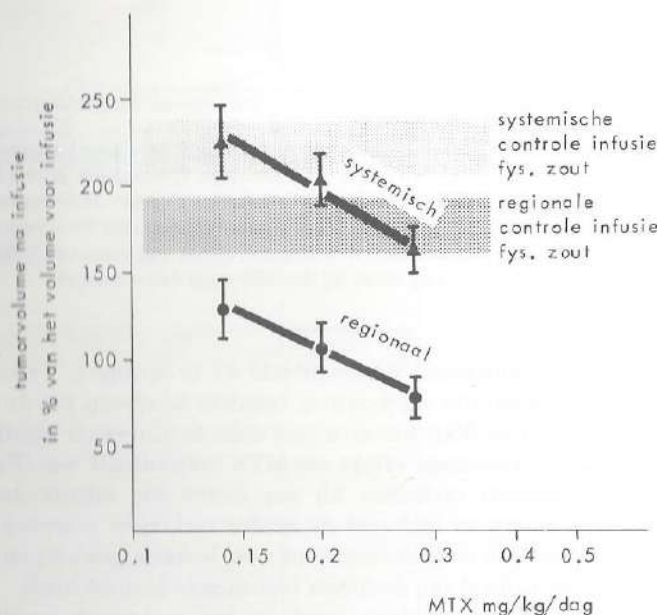


Fig. V.10. Dosis effect curven van 7 dagen continue infusie van MTX. De resultaten verkregen aan de regionale en de systemische kant gemeten bij (respectievelijk van lage naar hoge dosis) 6, 7 en 8 dieren zijn met de standaardfout van het gemiddelde weergegeven. De stroken geven het gemiddelde effect (met de 95% betrouwbaarheidsgrenzen) van controle infusies met fysiologisch zout. Aan de regionale kant is voor alle doses het groeiremmende effect van MTX sterker dan van fysiologisch zout, terwijl dit aan de systemische kant alleen voor de hoogste dosis zo is. De horizontale afstand tussen de lijnen komt overeen met een factor 2,98 op de horizontale as. Een deel van deze afstand berust echter op andere factoren dan MTX ("fysiologisch zout effect"). Wanneer een correctie wordt aangebracht voor dit fysiologisch zout effect bedraagt de werkelijke winst van regionale infusie in dit diersmodel een factor 2,0.

punt is de standaardfout van het gemiddelde aangegeven. De stroken geven de gemiddelde tumorvolumetoename aan (met de 95% betrouwbaarheidsgrenzen van dit gemiddelde) tijdens zeven dagen controle infusie van fysiologisch zout, evenals bij de infusie van MTX genoteerd als percentage van het beginvolume. De stroken zijn gebaseerd op de uitkomsten van alle verzamelde controle-infusies en niet alleen op de controle-infusies volgens schema 1. Nadat gebleken was dat de resultaten van schema 1, 2 en 3 statistisch niet significant van elkaar verschilden zijn de uitkomsten van alle controle infusies namelijk verzameld omdat daarmee de uitkomsten betrouwbaarder worden. Hierbij bleek dat de tumorgroei aan de infusiekant (gemiddeld 173% uit 22 waarnemingen (statistisch significant verschilt van de systemische kant (gemiddeld 217% uit 25 waarnemingen).

Alle drie doseringen van MTX geven aan de regionale kant significant minder toename van het tumorvolume dan fysiologisch zout. Aan de systemische kant geeft alleen de hoogste dosis significant minder volume toename dan fysiologisch zout. Wanneer men de lijn van lokale infusie terugextrapoleert, dan is hetzelfde effect dat systemisch bij de hoogste dosis wordt verkregen, regionaal bij een 2,98 x lagere dosis te zien. Een deel van dit effect is echter het gevolg van andere factoren (heparine in het infusaat, bloeddrukdaling door éézijdige afsluiting van de halsslagader, het trauma van de operatie) dan MTX, zoals blijkt uit de resultaten van de fysiologische zout controles. Wanneer wij een correctie aanbrengen voor dit fysiologisch zout effect, dan is de werkelijke winst van regionale infusie in dit model een factor 2,0.

De mortaliteit en de gewichtsveranderingen onder invloed van het eerste schema worden later besproken.

Het tweede schema. Zeven dagen continue intra-arteriële infusie van MTX in combinatie met vier maal daags CF intraperitoneaal

Naar analogie van het schema van Sullivan (1959) werd gekozen voor een vier maal daagse dosering van CF. Nadat in enkele oriënterende experimenten gebleken was dat CF, elke zes uur intraperitoneaal toegediend in de verhouding CF : MTX = 1 : 2, vrijwel geen bescherming bood, is verder uitgegaan van een uniforme dosis CF van 2 mg/kg/dag.

Het effect op de tumorgroei van vier verschillende MTX doseringen in combinatie met 4 dd 0,5 mg CF/kg, is in Fig. 11 weergegeven. Horizontaal is de dosis genoteerd volgens een logaritmische schaal, vertikaal het tumorvolume na afloop van de infusie uitgedrukt als percentage van het volume aan het begin van de infusie. De cirkels geven de gemiddelde volume toename aan van de tumoren aan de regionale kant, de driehoekjes die aan de systemische kant, op dezelfde wijze als in Fig. 10 voor een aantal doseringen tegelijk, namelijk 0,35, 0,50, 0,70 en 1,00 mg MTX/kg/dag, gemeten bij respectievelijk 5, 8, 10 en 11 dieren. Van elk punt is tevens de standaardfout van het gemiddelde aangegeven. De stroken geven de gemiddelde fysiologisch zoutwaarden aan met de 95% betrouwbaarheidsgrenzen van dit gemiddelde. De drie hoogste doses aan de regionale kant geven significante verschillen met de controlewaarden; dit doet geen enkele dosis aan de systemische kant. Het is duidelijk

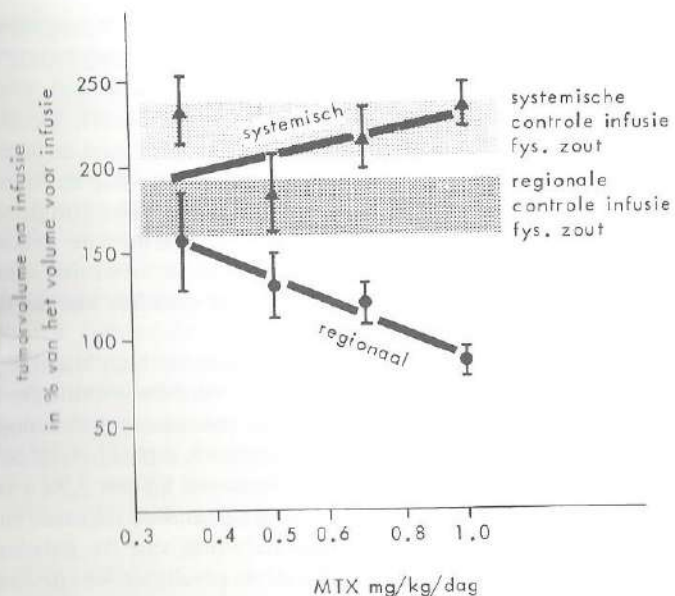


Fig. V.11. Dosis effect curven van 7 dagen continue infusie van MTX in combinatie met 4 dd CF intraperitoneaal toegediend. De resultaten verkregen aan de regionale en de systemische kant gemeten bij (respektievelijk van lage naar hoge dosis) 5, 8, 10 en 11 dieren zijn elk afzonderlijk weergegeven. Aan de regionale kant is bij de drie hoogste doses het groeiremmende effect van MTX sterker dan van fysiologisch zout, terwijl dit aan de systemische kant bij geen van de doses het geval is. Hieruit blijkt dat ook voor dit schema het antitumor effect van regionale infusie met MTX superieur is aan de systemische toediening ervan bij dezelfde mate van toxiciteit.

dat de tweede vraagstelling (is regionale infusie superieur aan algemene toediening?) ook voor de combinatie MTX en 4 dd CF intraperitoneaal positief kan worden beantwoord.

Toxiciteit van het eerste en tweede schema

Alle mortaliteitsgegevens van de experimenten volgens het eerste schema zijn volgens de probit methode bewerkt en in een tabel weergegeven (tabel I). In een volgende tabel zijn de gegevens van het tweede schema weergegeven (tabel II). De LD 50 is respektievelijk 0,21 en 0,56 mg MTX/kg/dag.

In Fig. 12 is het effect van beide schema's op het lichaamsgewicht weergegeven. Het gemiddelde gewicht blijkt voor beide schema's evenredig af te nemen met de logaritme van de dosis. Wanneer wij het gemiddelde effect op het lichaamsgewicht bekijken bij de LD 50 dan is dit voor beide schema's ongeveer gelijk.

In Fig. 13 zijn de voorgaande gegevens in een grafiek gekombineerd. Op de horizontale as is de dosis genoteerd op een logaritmische schaal. De verticale as geeft

de volume toename als percentage van de bijbehorende fysiologisch zout controle waarden. Op deze wijze is in de grafiek een correctie aangebracht voor het verschil in fysiologisch zout effect aan de infusiekant ten opzichte van de andere kant. De pijlen op de horizontale as geven de LD 50 van elk schema aan (0,21 en 0,56 mg MTX/kg/dag). Bij deze doses is het antitumoreffect als percentage van de bijbeho-

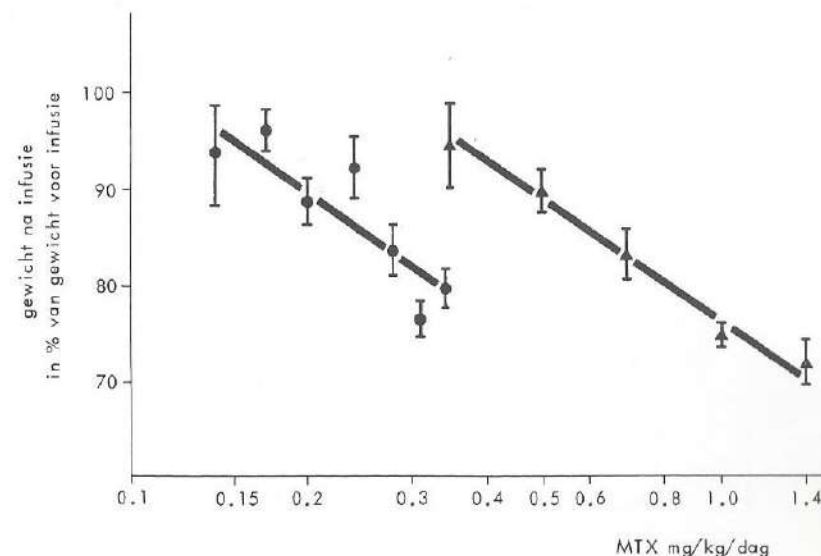


Fig. V.12. Toxiciteit van MTX. Het effect van MTX en MTX + 4 dd CF op het lichaamsgewicht van de ratten. In beide schema's neemt het effect van MTX op het lichaamsgewicht bij een hogere dosis evenredig toe. De LD 50, respektievelijk 0,21 en 0,56 mg MTX/kg/dag geeft in beide schema's eenzelfde gewichtsdaling tot ongeveer 88%.

TABEL I

TOXICITEIT VAN MTX

Eerste schema. 7 dagen continue intra-arteriële infusie van MTX.

Dosis MTX mg/kg/dag	Mortaliteit
0,14	1/14
0,17	0/ 3
0,20	13/26
0,24	2/ 5
0,28	19/23
0,31	7/ 8
0,34	6/ 6

Probitberekening LD 50 = 0,21 mg MTX/kg/dag.

TABEL II

TOXICITEIT VAN MTX

Tweede schema. 7 dagen continue intra-arteriële infusie van MTX in combinatie met 4 dd 0,5 mg CF/kg/dag intraperitoneaal toegediend.

Dosis MTX mg/kg/dag	Mortaliteit
0,35	0/ 5
0,50	3/ 9
0,70	11/12
1,00	9/10
1,40	4/ 4

Probitberekening LD 50 = 0,56 mg MTX/kg/dag.

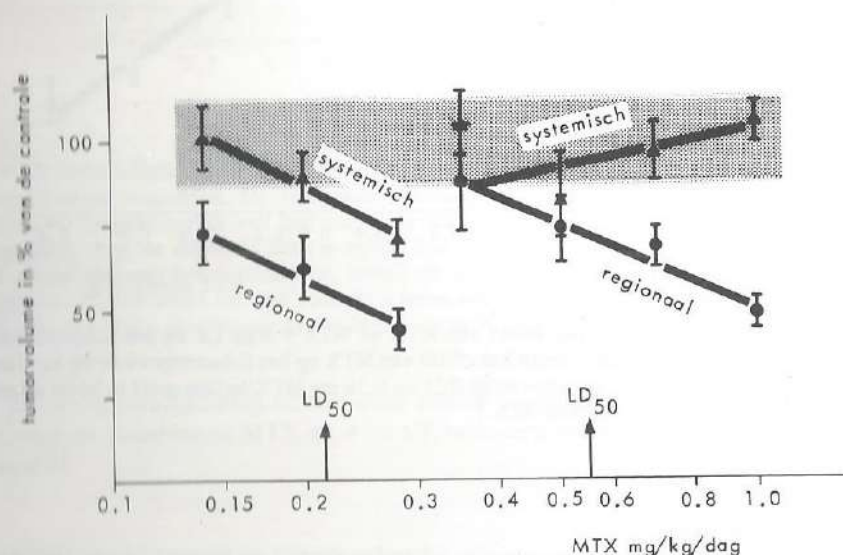


Fig. V.13. Dosis effect curven van MTX en MTX + 4 dd CF in één figuur na correctie voor het fysiologisch zout effect. Op de horizontale as zijn de doses genoteerd op een logaritmische schaal; de pijlen geven voor elk schema de LD 50 aan. Op de verticale as zijn de controle fysiologisch zout waarden (173% en 217%) ieder gesteld op 100. Het effect van MTX is weergegeven als percentage van deze controle waarden. Aldus is een correctie aangebracht voor het fysiologisch zout effect. Uit de grafieken blijkt dat MTX waarschijnlijk beter is dan MTX + 4 dd CF. In ieder geval is MTX + 4 dd CF niet beter dan MTX alleen.

rende totale fysiologisch zout controlewaarde respectievelijk 59% en 71%. Hieruit volgt dat de combinatie MTX + 4 dd CF waarschijnlijk slechter, in ieder geval niet beter is dan MTX alleen.

Lokale toxiciteit

Er is zoals hiervoor reeds werd genoemd één maal lokale toxiciteit waargenomen en wel bij het enige dier dat de hoogste dosis 1,00 mg MTX/kg/dag in combinatie met 4 dd 0,5 mg CF/kg/dag heeft overleefd. Bij de aanvang van de infusie waren de tumoren in beide oren ongeveer even groot, na de infusie was regionaal het tumorvolume met 11% verminderd tegenover een volumetoename aan de andere kant met 175%. Twee weken later is aan de regionale zijde uitgebreide nekrose van mond- en neusslijmvlies ontstaan (Fig. 14 en 15), en ook geleidelijke verschrompeling van de regionale tumor, terwijl de via de algemene cirkulatie doorstroomde tumor beduidend groter werd.

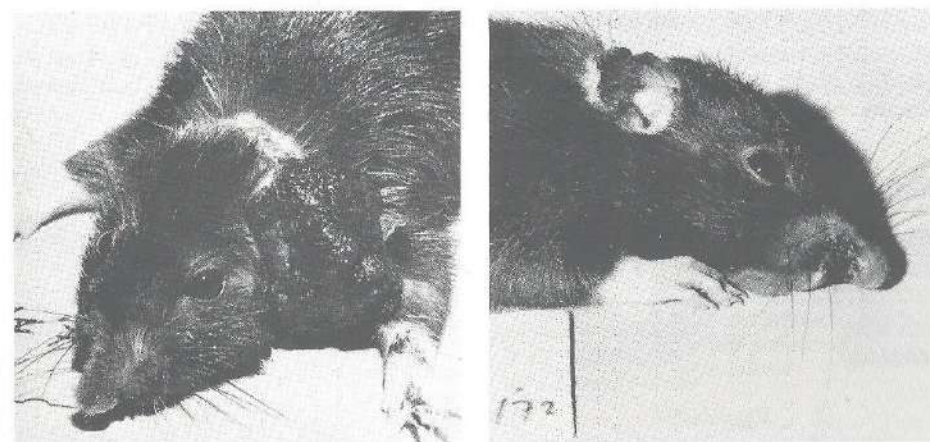


Fig. IV.14 en IV.15. Toxiciteit van MTX. Lokale toxiciteit, twee weken na afloop van 7 dagen continue intra-arteriële infusie met 1,00 mg MTX/kg/dag + 4 dd 0,5 mg CF/kg/dag intraperitoneaal, bij het enige dier dat deze hoge dosis overleefde.

Derde schema. Twee maal een 24-uurs infusie van MTX intra-arterieel op dag 1 en 4. Op de overige dagen 2, 3, 5, 6 en 7 wordt de catheter opgehouden door de continue intra-arteriële infusie van fysiologisch zout

Bij de eerste experimenten met dit schema ontstonden moeilijkheden met de doorgankelijkheid van de catheters. Tengevolge van de verwisselingen van de infusievloeistoffen raakte een groot deel van de catheters verstopt. Om stolling te voorkomen werd de concentratie heparine in het infusaat sterk verhoogd met als gevolg dat een groter deel van de infusies doorgankelijk bleef. Tevens bleek dat het fysiologisch zout effect veel groter was. Het was mogelijk dat de grotere concentratie heparine een sterker antitumor effect bij de kontroledieren teweeg bracht. Een andere mogelijkheid was dat de verwisselingen mikro-luchtembolietjes veroorzaakten. Inmiddels was de lijn, zoals eerder in dit hoofdstuk werd besproken, weer sneller gaan groeien, zodat de resultaten onbruikbaar waren. In de tijd dat een

nieuwe tumorlijn werd opgezet werd het probleem van de verstopte catheters opgelost door de verwisselingen zo uit te voeren dat de druk in geen van de infuussystemen kon wegvallen. Hiertoe werd het infuussysteem bij de swivel afgeklemd en ontkoppeld, de arteriële catheter voorzichtig doorgespoten, het infuus met nieuwe vloeistof gevuld en weer opnieuw aangesloten.

Uit oriënterende experimenten (tabel III) bleek dat de intermitterende 24-uurs infusie in het gebied van 0,28-0,80 mg MTX/kg/dag sterfte en antitumor effecten gaf. Op grond hiervan is de dosis 0,50 mg MTX/kg/dag verder onderzocht. Na één week was het tumorvolume aan de regionale kant gemiddeld tot 81% afgenomen (gemeten bij 9 dieren); de controle tumoren waren tot 160% toegenomen (gemeten bij 6 dieren, tabel IV). De andere kant toonde een toename tot respectievelijk 201% en 218%. Hieruit volgt dat ook in dit intermitterende schema het antitumor effect van regionale infusie van MTX superieur is aan de systemische toediening ervan bij dezelfde mate van toxiciteit. De derde vraagstelling kan dus positief beantwoord worden.

TABEL III

ORIENTERENDE TOXICITEIT EN ANTITUMOR EFJEKT VAN MTX IN HET INTERMITTERENDE SCHEMA

Dosis MTX mg/kg/dag	Gemiddelde volumes na 7 dagen infusie als % van het beginvolume		Gewicht na infusie als % van gewicht voor infusie	Mortaliteit
	Regionaal	Systemisch		
0,28	110%	208%	88%	0/2
0,40	96%	174%	84%	1/3
0,56	94%	259%	81%	1/2
0,80	66%	178%	71%	3/3

TABEL IV

TOXICITEIT EN ANTITUMOR EFJEKT VAN 0,50 mg MTX/kg/dag IN HET INTERMITTERENDE SCHEMA

Dosis MTX mg/kg/dag	Gemiddelde volumes na 7 dagen infusie als % van het beginvolume		Gewicht na infusie als % van gewicht voor infusie	Mortaliteit
	Regionaal	Systemisch		
Fysiologisch				
zout	160%	218%	99%	0/6
0,50	81%	201%	92%	0/9

Geen van de hiervoor genoemde 9 + 6 dieren is doodgegaan; gezien dit gegeven is het goede antitumor effect aan de infusie kant wel opmerkelijk omdat dit bij de continue schema's pas bij een dosis in de buurt van de LD 50 gezien werd. Daarom zijn de resultaten van intermitterende toediening van 0,50 mg MTX/kg/dag en van continue toediening van 0,20 mg MTX/kg/dag nog eens onder elkaar gezet (tabel V). Bij het intermitterende schema neemt het volume aan de infusiekant gemiddeld af tot 81%. De bijbehorende controle waarde is 160%. Deze percentages zijn voor het continue schema respectievelijk 97% en 173%. Voor de beide schema's is de volume afname, uitgedrukt als percentage van de bijbehorende controle waarde aan de regionale kant, respectievelijk 51% en 55%. Het antitumor effect van de hierboven genoemde behandelingen is dus ongeveer gelijk. De mortaliteit echter van intermitterend toegediend 0,50 mg MTX is significant lager dan van continu toegediend 0,20 mg MTX (respectievelijk 0/9 en 13/26 dieren). Hieruit volgt dat de intermitterende toediening waarschijnlijk beter, in ieder geval niet slechter is dan de continue

TABEL V

TOXICITEIT EN ANTITUMOR EFJEKT VAN 0,50 mg MTX/kg/dag INTERMITTEREND VERGELEKEN MET 0,20 mg MTX/kg/dag KONTINU

Dosis MTX mg/kg/dag	Gemiddelde volumes na 7 dagen infusie als % van het beginvolume		Gewicht na infusie als % van gewicht voor infusie	Mortaliteit
	Regionaal	Systemisch		
Intermitterend schema: fys. zout 0,50	160% 81%	218% 201%	99% 92%	0/6 0/9
kontinu schema: fys. zout (totaal) 0,20	173% 96%	217% 229%	100% 88%	0/25 13/26

KONKLUSIES EN BESCHOUWING

De konklusies uit het hiervoor beschreven onderzoek zijn:

1. Het model bij de rat is geschikt om de toxiciteit en het antitumor effect van regionaal en algemeen (systemisch) toegediend MTX te onderzoeken.

2. In het model is het antitumor effect van 7 dagen continue regionale infusie van MTX superieur aan de continue systemische toediening ervan.

3. Het antitumor effect aan de regionale kant wordt pas bij een 2,98 maal hogere dosis aan de systemische kant bereikt. Een deel van dit effect is echter het gevolg van andere factoren dan MTX, zoals blijkt uit de resultaten van de fysiologisch zout controle infusies. Wanneer wij een correctie aanbrengen voor dit fysiologisch zout effect, is de werkelijke winst van regionale infusie in dit model een faktor 2,0.

4. Ook is het antitumor effect van 7 dagen continue regionale infusie van MTX in combinatie met 4 x daags CF intraperitoneaal (i.p.) superieur aan de systemische toediening van MTX + 4 dd CF i.p.

5. Het schema MTX + 4 dd CF i.p. is waarschijnlijk slechter, in elk geval niet beter dan MTX alleen.

6. In het diemodel is ook het antitumor effect van intermitterende regionale toediening van MTX: 2 x 24 uur intra-arteriële infusie op dag 1 en 4, terwijl op de dagen 2, 3, 5, 6 en 7 de catheter open wordt gehouden door de continue intra-arteriële infusie van fysiologisch zout, superieur aan de intermitterende algemene toediening ervan.

7. Het intermitterende schema is waarschijnlijk beter, in elk geval niet slechter dan de continue schema's.

Voor elk der onderzochte schema's bleek het antitumor effect van regionale toediening van MTX superieur aan de algemene toediening ervan. Bovendien werd met het intermitterende schema een vergelijkbaar antitumor effect bereikt bij een geringere toxiciteit dan met de continue schema's. Gezien het feit dat in de kliniek regionaal MTX vrijwel steeds continu wordt toegediend en algemeen MTX alléén in intermitterende schema's goede resultaten geeft, suggereert het bovenstaande voor de toepassing in de kliniek dat een combinatie van de principes regionale infusie en intermitterende toediening, dus gefractioneerde intra-arteriële toediening — zo dit technisch mogelijk is — voor geselecteerde patiënten optimaal zou zijn. De gedachte dat intermitterende toediening van cytostatica beter is dan continue wordt gesteund door recente klinische publikaties waaruit blijkt dat voor de toxiciteit en in veel mindere mate voor het therapeutisch effect van MTX de toedieningsduur belang-

rijker is dan de doseringshoogte (Kenis e.a. 1970, Djerassi e.a. 1972, Goldie e.a. 1972). Ook de intrinsieke eigenschap van "self limiting" van MTX (zie hoofdstuk I) pleit meer voor intermitterende dan voor continue toediening van dit cytostaticum.

Een tweede veronderstelling die wij naar aanleiding van de resultaten van ons onderzoek voor de toepassing in de kliniek menen te mogen maken is de volgende: in ons diemodel blijkt de combinatie van MTX + 4 dd CF intraperitoneaal (analoog aan het schema bij de behandeling van hals-hoofd tumoren) zeker niet beter te werken dan MTX alleen. De reden hiervan kan zijn dat de combinatie MTX + 4 dd CF de potentie van CF niet of onvoldoende benut. Zoals reeds in hoofdstuk I werd beschreven is het nut van CF empirisch vastgesteld. In experimenten met de muizen leukemie L 1210 bleek de therapeutische breedte van de combinatie MTX + CF geringer dan van MTX alleen. Wanneer CF 12-24 uur ná MTX werd toegediend bleek echter de combinatie effectiever dan MTX alleen (Goldin e.a. 1955, 1966). Het onderzoek van Bagshawe (1969) sluit hierbij aan. Hij combineerde continue intraveneuze infusie van MTX met gelijktijdige toediening (i.m. of i.v.) van CF ter behandeling van choriontumoren. Hij vond dat de beste resultaten bereikt werden wanneer CF 2 x daags intramusculair werd gegeven. Met 3 x daags intramusculair of 2 x daags intraveneus toegediend CF namen zowel de therapeutische als de toxische effecten van MTX sterk af. Het metaboliet-antimetaboliet schema waarin CF 2 x daags intramusculair werd toegediend was tenminste even effectief als MTX alleen, maar veel minder toxisch. Het bovenstaande suggereert dat de werkzaamheid van MTX + CF bij de behandeling van hals-hoofd tumoren kan toenemen wanneer men CF 2 x daags i.p.v. 4 x daags intramusculair doseert.

SAMENVATTING

Sedert 1964 is intra-arteriële infusie met cytostatica in het Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis (Amsterdam) toegepast in combinatie met radiotherapie en/of chirurgie, ter behandeling van tumoren in het hals-hoofd gebied. Bijna altijd werd methotrexaat gebruikt. In de laatste jaren is twijfel gerezen of intra-arteriële toediening van cytostatica superieur is aan de systemische toediening ervan. Tot nu toe is de klinische evaluatie niet mogelijk door het kleine aantal patiënten dat in elk behandelingscentrum afzonderlijk wordt gepresenteerd en het ontbreken van standaardisatie van doseringsschema's. Het leek daarom belangrijk meer informatie hierover te verkrijgen uit dierexperimenteel onderzoek. De volgende vragenstellingen werden hiervoor geformuleerd:

1. Is het mogelijk een geschikt diemodel te maken voor continue intra-arteriële infusie van methotrexaat (MTX)?
2. Is in dit model het antitumor effect van regionale continue intra-arteriële infusie van MTX superieur aan dat van de continue systemische toediening ervan?
3. Is ook in een gefractioneerd doseringsschema het antitumor effect van regionale infusie van MTX superieur aan dat van de algemene toediening ervan?

De occlusieve catheterisatie van de a. carotis communis van de rat biedt een goed model voor regionale infusie van een in één van de oorschelpen getransplanteerd rhabdomyosarcoom. Een symmetrisch in de andere oorschelp getransplanteerde tumor biedt de mogelijkheid de antitumor effecten van systemisch MTX in hetzelfde dier te meten, en daarom ook altijd bij dezelfde mate van toxiciteit. De fixatie van de catheter is zodanig gekonstrueerd dat de rat de verbinding niet kan stuk trekken en toch volledige bewegingsvrijheid in zijn kooi behoudt.

De volgende schema's met MTX werden in het diemodel onderzocht:

1. 7 dagen continue intra-arteriële infusie van MTX.
2. Hetzelfde schema in combinatie met Leucovorine (Calcii folinas, CF) intraperitoneaal (i.p.) elke 6 uur.
3. Intermitterende toediening van MTX: 2 x 24 uur intra-arteriële infusie op dag 1 en 4, terwijl op de dagen 2, 3, 5, 6 en 7 de catheter open wordt gehouden door de continue intra-arteriële infusie van fysiologisch zout.

De volgende resultaten konden met de experimenten worden verkregen:

1. Voor alle onderzochte doseringsschema's is het antitumor effect van regionale intra-arteriële toediening van MTX superieur aan de systemische toediening ervan.
2. Het antitumor effect aan de infusiekant van 7 dagen continue intra-arteriële infusie van MTX kan aan de andere kant alleen worden bereikt bij een 2,98 x hogere dosis. Een deel van dit effect echter is het resultaat van andere factoren

dan MTX (lokale heparine concentratie, effecten van de operatie) zoals blijkt uit de fysiologisch zout controle infusies. Wanneer wij een correctie aanbren- gen voor dit "fysiologisch zout effect", dan is de werkelijke winst van continue regionale infusie in dit model een faktor 2,0.

3. Het antitumor effect van MTX in schema 2 was niet beter dan dat in schema 1, en zelfs waarschijnlijk slechter.
4. Schema 3 is waarschijnlijk beter, in elk geval niet slechter dan schema 1 en 2.

Deze resultaten, en wat hierover in de literatuur bekend is (hoofdstuk I en II) suggereren voor de toepassing in de kliniek:

- a. De beste resultaten zouden bij geselecteerde patiënten kunnen worden bereikt door beide principes regionale en gefractioneerde toediening te combineren, dus een schema waarin MTX gefractioneerd intra-arterieel wordt toegediend.
- b. De gelijktijdige 4 x daagse intramusculaire toediening van Leucovorin (volgens Sullivan 1959) is waarschijnlijk niet het beste schema voor deze stof.

SUMMARY

Intra-arterial infusion chemotherapy has been carried out in the Antoni van Leeuwenhoek Hospital (Amsterdam) as from 1964 as a planned adjuvant to radiotherapy and/or surgery in far advanced head and neck cancer. In the vast majority of cases methotrexate was used. In recent years the superiority of intra-arterial administration of cytotoxic drugs on their systemic use has been questioned. Clinical evaluation up until now has not been possible due to the small number of patients treated in each separate centre and the lack of standardization of drug schedules. It therefore seemed important to get further information from animal experimental work. The following questions were posed:

1. Is it possible to set up an animal model suitable for continuous intra-arterial infusion of methotrexate (MTX)?
2. In this model, is the antitumour effect of regional continuous intra-arterial infusion of MTX superior to that of the continuous systemic administration thereof?
3. Also, in an intermittent dose schedule, is the antitumour effect of regional intra-arterial infusion of MTX superior to that of the systemic administration thereof?

In the rat, occlusive catheterization of a common carotid artery provides a good model for regional infusion of a transplanted rhabdomyosarcoma in one auricle. A symmetrically transplanted tumour in the other auricle makes it possible to measure the antitumour effects of systemic MTX in the same animal, and therefore always at the same level of toxicity. The fixation of the catheter is constructed in such a way that the rat cannot break it down and still retains free mobility within his cage (chapter III and IV).

Concerning methotrexate the following schedules were investigated:

1. 7 days continuous intra-arterial infusion of MTX.
2. The same schedule combined with the 6-hourly intraperitoneal administration of Leucovorin (Calcii folinas, CF).
3. Intermittent administration of MTX: 2 x 24 hour intra-arterial infusion on day 1 and 4, while on day 2, 3, 5, 6 and 7 the catheter is kept open by the continuous intra-arterial infusion of saline.

The results gained from the experiments are:

1. For all investigated dose schedules the antitumour effect of regional intra-arterial MTX is superior to its systemic administration.
2. The antitumour effect of 7 days continuous intra-arterial infusion of MTX at the infused side can be attained at the other side only at a 2.98 times higher dose. Part of this effect, however, results from other factors than MTX (local heparine concentration, effects of surgery) as evidenced by saline control infusions. Applying a correction for this "saline effect", the real gain of regional

continuous intra-arterial infusion in this model is a factor of 2.0.

3. The antitumour effect attained with schedule no. 2 was no better than that of schedule no. 1 and even probably worse.
4. Schedule no. 3 is probably better, in any case no worse than schedule no. 1 and 2.

These results and what is known in literature (chapter I and II) suggest for clinical application that:

- a. The best results in selected patients might be obtained by combining both principles: regional intra-arterial infusion and intermittent administration.
- b. Concomitantly 6-hourly administration of Leucovorin (after Sullivan 1959) is probably not the best schedule for the antidote.

LITERATUUROPGAVE

- ACUTE LEUKEMIA GROUP B (O.S. Selawry voorzitter), New treatment schedule with improved survival in childhood leukemia. *JAMA* 194, 75 (1965).
- ANDREWS, N.C. en WILSON, W.L., Phase II study of methotrexate (nsc-740) in solid tumours. *Cancer Chemother. Rep.* 51, 471 (1967).
- ANDERSON, L., COLLINS, G., OJIMA, Y. en SULLIVAN, R.D., A study of the distribution of methotrexate in human tissues and tumors. *Cancer Res.* 30, 1344 (1970).
- ANGIER, R.B., BOOTHE, J.H., HUTCHINGS, B.L., MOWAT, J.H., SEMB, J., STOKSTAD, E.L.R., SUBBAROW, Y. en WALLER, C.W., The structure and synthesis of the liver L. casei factor. *Science* 103 (1946).
- BAGSHAWE, K.D., Choriocarcinoma. *E. Arnold, uitgever*, Londen (1969).
- BERTINO, J.R., The mechanism of action of the folate antagonists in man. *Cancer Res.* 23, 1286 (1963).
- BERTINO, J.R., MOSHER, M.B. en DECONTI, R.C., Chemotherapy of cancer of the head and neck. *Cancer* 31, 1141 (1973).
- BILDER, J. en HORNOVA, J., Analysis of the results of regional chemotherapy for carcinomas of the orofacial region. *Neoplasma (Bratisl.)* 17, 85 (1970).
- BOESEN, E. en DAVIS, W., Cytotoxic drugs in the treatment of cancer. *E. Arnold, uitgever*, Londen (1969).
- BORSA, J. en WHITMORE, G.F., Cell killing studies on the mode of action of Methotrexate, on L-cells in vitro. *Cancer Res.* 29, 737 (1969).
- BORSA, J. en WHITMORE, G.F., Studies relating to the mode of action of methotrexate III. Inhibition of thymidylate synthetase in tissue culture cells and in cell-free systems. *Molec. Pharmacol.* 5, 318 (1969).
- BROWN, J.M. en GOFFINET, D.R., A technique for intra-arterial infusion of tumor-bearing mice. *J. Lab. Clin. Med.* 76, 175 (1970).
- BROWN, J.M., GOFFINET, D.R., CLEAVER, J.E. en KALLMAN, R.F., Preferential radiosensitization of mouse sarcoma relative to normal skin by chronic intra-arterial infusion of halogenated pyrimidine analogs. *J. Nat. Cancer Inst.* 47, 75 (1971).
- CAPIZZI, R.L., DECONTI, R.C., MARCH, J.C. en BERTINO J.R., Methotrexate therapy of head and neck cancer: improvement in therapeutic index by the use of leucovorin "rescue". *Cancer Res.* 30, 1782 (1970).
- COUTURE, J. en DESCHENES, L., Intra-arterial infusion — an adjuvant to the treatment of oral carcinoma. *Cancer* 29, 1632 (1972).
- DALTON, R.G., TOURAINE, J.L. en WILSON, T.B., A simple technique for continuous infusion in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 74, 183 (1969).
- DESPREZ, J.D., KIEHN, C.L., SCIOTTO, C. en RAMIREZ-GONZALES, M., Response of oral carcinoma to preoperative Methotrexate in fusion therapy. *Amer. J. Surg.* 120, 461 (1970).
- DJERASSI, I., ROMINGER, C.J., JUNG-SUN KIM, TURCHI, J., SUVANSRI, U. en HUGHES, D., Phase I study of high doses of methotrexate with citrovorum factor in patients with lung cancer. *Cancer* 30, 22 (1972).
- DONGEN Jr., J.A. van, Haematogene metastasen. *Proefschrift*, Amsterdam (1961).
- DUDRICK, S.J., STIGER, E., WILMORE, D.W. en VARS, H.M., Continuous long-term intravenous infusion in unrestrained animals. *Lab. Anim. Care* 20, 521 (1970).
- DUVALL, R.L., The clinical effect of methotrexate on tumors other than acute leukemia and choriocarcinoma. *Cancer Chemother. Rep.* 14, 145 (1961).
- ESPINER, H.J., Methotrexate in the treatment of cancer. In: *H.J. Worrall en H.J. Espiner (eds.)*, Bristol (1966).
- EVE, C. en ROBINSON, S.H., Apparatus for continuous long-term intravenous infusions in small animals. *J. Lab. Clin. Med.* 62, 168 (1963).

- FARBER, S., DIAMOND, L.K., MERCER, R.D., SYLVESTER, R.F. en WOLFF, J.A., Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *New Eng. J. Med.* 238, 787 (1948).
- FLIEDNER, T.M., HAAS, R.J. en STEHLE, H., Die ³H-Thymidinmarkierung aller Zellkerne neugeborener Ratten. *Acta Histochem. Suppl.* 8, 231 (1968).
- FRANCHI, G., MORETTI, L. en GARATTINI, S., Experimental chemotherapy of a transplantable rhabdomyosarcoma in the rat. *Europ. J. Cancer* 6, 441 (1970).
- FRECKMAN, H.A., Results in 169 patients with cancer of the head and neck treated by intra-arterial infusion therapy. *Amer. J. Surg.* 124, 501 (1972).
- FREIREICH, E.J., GEHAN, E.A., RALL, D.P., SCHMIDT, L.H. en SKIPPER, H.E., Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother. Rep.* 50, 219 (1966).
- FRIEDMAN, M., DENARVAES, F. en DALY, J.F., Treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck with combined methotrexate and irradiation. *Cancer* 26, 711 (1970).
- GOFFINET, D.R., BROWN, J.M., BAGSHAW, M.A. en KAPLAN, H.S., Prolonged carotid arterial radiosensitizer infusion and radiation therapy of mouse gliomas. *Amer. J. Roentgen.* 114, 7 (1972).
- GOLDIE, J.H., PRICE, L.A. en HARRAP, K.R., Methotrexate toxicity: correlation with duration of administration, plasma levels, dose and excretion pattern. *Europ. J. Cancer* 8, 409 (1972).
- GOLDIN, A., MANTEL, N., GREENHOUSE, S.W., VENDITTI, J.M. en HUMPHREYS, S.R., Estimation of the antileukemic potency of the antimetabolite Aminopterin, administered alone and in combination with citrovorum factor or folic acid. *Cancer Res.* 13, 843 (1953).
- GOLDIN, A., MANTEL, N., GREENHOUSE, S.W., VENDITTI, J.M. en HUMPHREYS, S.R., Effect of delayed administration of citrovorum factor on the antileukemic effectiveness of aminopterin in mice. *Cancer Res.* 14, 43 (1954).
- GOLDIN, A., MANTEL, N., GREENHOUSE, S.W., VENDITTI, J.M. en HUMPHREYS, S.R., Antileukemic agent (aminopterin). Time of treatment and dosage schedule. *Cancer Res.* 14, 311 (1954).
- GOLDIN, A., VENDITTI, J.M., HUMPHREYS, S.R., DENNIS, D. en MANTEL, N., Studies on the management of mouse leukemia (L 1210) with antagonists of folic acid. *Cancer Res.* 15, 742 (1955).
- GOLDIN, A., VENDITTI, J.M., HUMPHREYS, S.R. en MANTEL, N., Modification of treatment schedules in the management of advanced mouse leukemia with amethopterin. *J. Nat. Cancer Inst.* 17, 203 (1956).
- GOLDIN, A., VENDITTI, J.M., KLINE, I. en MANTEL, N., Eradication of leukaemic cells (L 1210) by methotrexate and methotrexate plus citrovorum factor. *Nature* 212, 1548 (1966).
- GOLDMAN, I.D., LICHTENSTEIN, N.S. en OLIVERIO, V.T., Carrier-mediated transport of the folic acid analogue, methotrexate in the L 1210 leukemia cell. *J. Biol. Chem.* 243, 5007 (1968).
- HANHAM, I.W.F., NEWTON, K.A. en WESTBURY, G., Seventy-five cases of solid tumours treated by a modified quadruple chemotherapy regime. *Brit. J. Cancer* 25, 462 (1971).
- HEALY, J.B., MORIARTY, M.J. en MADDOCK, P.G., Treatment of advanced cancer of head and neck by large doses of methotrexate. *J. Irish Med. Ass.* 64, 376 (1971).
- HELLMAN, S., LANOTTI, A.T. en BERTINO, J.R., Determinations of the levels of serum folate in patients with carcinoma of the head and neck treated with methotrexate. *Cancer Res.* 24, 105 (1964).
- HERMENS, A.F. en BARENDSEN, G.W., Cellular proliferation patterns in an experimental rhabdomyosarcoma in the rat. *Europ. J. Cancer* 3, 361 (1967).
- HERMENS, A.F. en BARENDSEN, G.W., Changes of cell proliferation characteristics in a rat rhabdomyosarcoma before and after X-irradiation. *Europ. J. Cancer* 5, 173 (1969).
- HERTZ, R., BERGENSTAL, D.M., LIPSETT, M.B., PRINCE, E.B. en HILBISH, T.F., Chemotherapy of choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. *JAMA* 168, 845 (1968).
- HUSEBY, R.A. en DOWNING, V., The use of methotrexate orally in treatment of squamous cancers of the head and neck. *Cancer Chemother. Rep.* 16, 511 (1962).
- HUTCHINGS, B.L., MOWAT, J.H., OLESON, J.J., STOKSTAD, E.L.R., BOOTHE, J.H., WALLER, C.W., ANGIER, R.B., SEMB, J. en SUBBAROW, Y., Pteroylglutamic acid, an antagonist for pteroylglutamic acid. *J. Biol. Chem.* 170, 323 (1947).
- JENNINGS, P.B. en GAGNON, J.A., Long-term arterial catheterization for use in chaired laboratory primates. *J. Appl. Physiol.* 24, 109 (1968).
- KENIS, Y., MICHEL, J., DEBUSSCHER, L. en LACHAPELLE, F., Action pharmacologique et thérapeutique de l'administration intermittente de methotrexate dans les tumeurs solides. Uit: *Corso superiore sulla chemoterapia dei tumori*, Milaan (1970).
- KHAZEI, A.M., Hepatic artery infusion with 5-FU and 5-FUDR in dogs, in: R.D. Sullivan, *Clinical cancer chemotherapy, including ambulatory infusion*, from the Lahey Clinic Foundation, Boston, Massachusetts, Springfield, Ch. Thomas (1970).
- KLOPP, C.T., ALFORD, T.C., BATEMAN, J., BERRY, G.N. en WINSHIP, T., Fractionated intra-arterial cancer chemotherapy with methyl bis amine hydrochloride: preliminary report. *Ann. Surg.* 132, 811 (1950).
- LANE, M., MOORE, J.E., LEVIN, H. en SMITH, F.E., Methotrexate therapy for squamous cell carcinomas of the head and neck. *JAMA* 204, 561 (1968).
- LAWTON, R.L., GULESSERIAN, H.P. en SHARZER, L.A., Intra-arterial infusion. *Oncology* 26, 259 (1972).
- LEDERLE LABORATORIES, Methotrexate: antibolic agent for cancer chemotherapy. *Uitgave van de American Cyanamid Company*, New York (1970).
- LEMMEL, E.M. en GOOD, R.A., Continuous long-term intravenous infusion in unrestrained mice-method. *J. Lab. Clin. Med.* 77, 1011 (1971).
- LEONE, L.A., ALBALA, M.M. en REGE, V.B., Treatment of carcinoma of the head and neck with intravenous methotrexate. *Cancer* 21, 828 (1968).
- LEFKOWITZ, E., PAPAC, R.J. en BERTINO, J.R., Head and neck cancer. III. Toxicity of 24-hour infusions of methotrexate (NSC-740) and protection by leucovorin (NSC-3590) in patients with epidermoid carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.* 51, 305 (1967).
- LEVITT, M., MOSHER, M.B., DECONTI, R.C., FARBER, L.R., MARSH, J.C., MITCHELL, M.S., PAPAC, R.J., THOMAS, E.D. en BERTINO, J.R., High dose methotrexate (MTX) v.s. methotrexate-leucovorin (N₅-formyltetrahydrofolate) in epidermoid carcinomas of the head and neck. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 13, 20 (1972).
- LITTLE, J.R., BRECHER, G., BRADLEY, T.R. en ROSE, S., Determination of lymphocyte turnover by continuous infusion of H³ thymidine. *Blood* 19, 236 (1962).
- LUYENDIJK, W. en BEUSEKOM, G.Th. van, Chemotherapie van het glioma cerebri, *Ned. T. Geneesk.* 109, 2490 (1965).
- MECHI, Z. en KADLECOVA, D., Methotrexate in the treatment of tumours of the oto-rhinolaryngeal region. *Neoplasma (Bratisl.)* 17, 383 (1970).
- MITCHELL, M.S., WAWRO, N.W., DECONTI, R.C., KAPLAN, S.R., PAPAC, R. en BERTINO, J.R., Effectiveness of high-dose infusions of methotrexate followed by leucovorin in carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 28, 1088 (1968).
- NAHAS, A., NIXON, P.F. en BERTINO, J.R., Uptake of 5-formyl-tetrahydrofolate by L 1210 mouse leukemia cells and its effect on uptake of methotrexate. *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.* 10, 64 (1969).
- NERVI, C., ARCANGELI, G., CASALE, C., CORTESE, M., GUADAGNI, A. en Le PERA, V., A reappraisal of intra-arterial chemotherapy. *Cancer* 26, 577 (1970).
- NORRELL, H.A. en WILSON, C.B., Chemotherapy of experimental brain tumors by arterial infusion. *Surg. Forum* 16, 429 (1965).

- PAPAC, R.J., JACOBS, E.M., FOYE, L.V. en DONOHUE, D.M., Systemic therapy with amethopterin in squamous carcinoma of the head and neck. *Cancer Chemother. Rep.* 32, 47 (1963).
- PAPAC, R., LEFKOWITZ, E. en BERTINO, J.R., Methotrexate (nsc-740) in squamous cell carcinoma of the head and neck. II. Intermittent intravenous therapy. *Cancer Chemother. Rep.* 51, 69 (1967).
- PIERCE, M.I., BORGES, W.H. en HEYN, R., Epidemiological factors and survival experience in 1770 children with acute leukemia treated by members of childrens' study group A between 1957 and 1964. *Cancer* 23, 1296 (1969).
- PINKEL, D., HERNANDEZ, K., BORELLA, L., HOLTON, C., AUR, R., SAMOY, G. en PRATT, C., Drug dosage and remission duration in childhood lymphocytic leukemia. *Cancer* 27, 247 (1971).
- PLAGER, J.E., Intravenous, long-term infusion in the unrestrained mouse-method. *J. Lab. Clin. Med.* 79, 669 (1972).
- REINHOLD, H.S., Stralingsgevoeligheid van tumoren. *Proefschrift*, Rotterdam (1967).
- RIETBERG, M., Methotrexate en radiotherapie. *Proefschrift*, Groningen (1972).
- ROGERS, L.S., Cancer chemotherapy by continuous intra-arterial infusion. *Cancer* 17, 1365 (1965).
- ROUTLEDGE, R.T., Infusion therapy with methotrexate. *Arch. Chir. Neerl.* 22, 97 (1970).
- DE RU, H., Informatorium medicamentorum. *Uitgave van de Kon. Ned. Mij. ter Bevordering van de Pharmacie*, Den Haag (1972).
- SCHOENBACH, E.B., COLSKY, J. en GREENSPAN, E.A., Observations on the effect of the folic acid antagonists, aminopterin and amethopterin, in patients with advanced neoplasms. *Cancer* 5, 1201 (1952).
- SEALY, R. en HELMAN, P., Treatment of head and neck cancer with intra-arterial cytotoxic drugs and radiotherapy. *Cancer* 30, 187 (1972).
- SEEGER, D., SMITH, J.M. en HULTQUIST, M., Antagonist for pteroglutamatic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 69, 2567 (1947).
- SNOW, G.B., DONGEN Jr., J.A. van en SLOOTEN, E.A. van, Regionale continue intra-arteriële chemotherapie van maligne tumoren in het hoofd-hals gebied (met uitzondering van de schedelinhoud). *Jaarb. Kankeronderz. Kankerbestr.* 15 (1965).
- SNOW, G.B., Intra-arteriële infusie met cytotoxica bij maligne tumoren speciaal in het stroomgebied van de arteria carotis externa. *Proefschrift*, Amsterdam (1966).
- SNOW, G.B., Intra-arterial chemotherapy combined with radiotherapy or surgery in tumours of the head-neck area. In: *Cancer Chemotherapy*, Boerhaave series, Leiden, 192 (1971).
- SNOW, G.B. en SINDRAM, P.J., Intra-arterial infusion chemotherapy in head and neck cancer, a clinical and experimental study. *Arch. Chir. Neerl.*, ter perse (1973).
- SNOW, G.B., Persoonlijke mededeling (1973).
- STRAUB, P.W., NELSON, J.H., MARIK, L.R. en BURCHENAL, J.H., A technique for prolonged continuous intra-arterial infusion in rabbits. *Cancer* 17, 831 (1964).
- SULLIVAN, R.D., MILLER, E. en SIKES, M.P., Anti-metabolite-metabolite combination cancer chemotherapy (effects of intra-arterial methotrexate intramuscular citrovorum factor therapy in human cancers). *Cancer* 12, 1248 (1959).
- SULLIVAN, R.D., MILLER, E., ZUREK, W.Z., OBERFIELD, R.A. en OJIMA, Y., Re-evaluation of methotrexate as an anticancer drug. *Surg. Gynec. Obstet.* 125, 819 (1967).
- SULLIVAN, R.D., Clinical cancer chemotherapy, including ambulatory infusion, from the *Lahey Clinic Foundation*, Boston, Massachusetts. Springfield, Ch. Thomas (1970).
- TAGETT, J.P., VAITKEVICIUS, V.K. en WALT, A.J., Bronchial artery cannulation at thoracotomy for continuous chemotherapy perfusion in dogs. *Oncology* 22, 137 (1968).
- VIERLING, A.F. en STRIKE, T.A., A technique for chronic catheterization of the aorta in the rat. *Afri TN68-8* (1968).
- WATKINS, E. en SULLIVAN, R.D., Cancer chemotherapy by prolonged arterial infusion. *Surg. Gynec. Obstet.* 118, 3 (1964).
- WERKHEISER, W.C., Specific binding of 4-amino folic acid analogues by folic acid reductase. *J. Biol. Chem.* 236, 888 (1961).
- WESTBROEK, D.L. en ZWAVELING, A., Continue intra-arteriële toediening van kankerchemotherapeutica. *Ned. T. Geneesk.* 108, 401 (1964).
- WILLS, L., Nature of haemopoietic factor in marmite. *Lancet* I 1283 (1933).
- WILLS, L., CLUTTERBUCK, P.W. en EVANS, B.D.F., A new factor in the production and cure of macrocytic anaemias and its relation to other haemopoietic principles curative in pernicious anaemias. *Biochem. J.* 31, 2136 (1937).
- YOSHINO, in P.T. Condit., Discussion paper: number of binding sites and possible mechanisms of action *Ann. NY. Acad. Sci.* 186, 363 (1971).

1. Het verdient aanbeveling de intra-arteriële infusie van methotrexaat voor geselecteerde patiënten met tumoren in het hals-hoofd gebied in een gefractioneerd schema toe te passen.
2. Het is beter leucovorine, het antidotum van methotrexaat, in afwijking van het schema van Sullivan niet 4 dd maar 2 dd toe te dienen.
Sullivan e.a. *Cancer* 12, 1248 (1959).
3. In het onderzoek van Goffinet e.a. wordt, in tegenstelling tot wat is beschreven, de getransplanteerde hersentumor van de muis via de algemene cirkulatie doorstroomd.
Goffinet e.a. *Amer. J. Roentgen*, 114, 7 (1972).
4. Het bedrag dat in Nederland aan kankerresearch wordt besteed (50 cent per Nederlander per jaar van overheidswege, 40 cent door het KWF opgehaald) staat in geen enkele verhouding tot de ernst en de omvang van het kankerprobleem.
5. De overheid die jaarlijks ongeveer 1 miljard gulden aan tabakaccijns ontvangt heeft de morele plicht tevens minimum maatregelen te treffen om rokers tegen de nadelen van het roken te beschermen.
6. Indien 1 cent van de opbrengst per pakje sigaretten zou worden gereserveerd voor de preventie en behandeling van longkanker zou een bedrag beschikbaar komen dat gelijk is aan het totaal van bedragen dat thans voor de kankerresearch in zijn geheel wordt uitgegeven.
7. Tumoren, getransplanteerd in niet-ingeteelde dieren, bieden geen geschikt objekt voor de bestudering van de werking van cytostatica.
8. Evenmin als het gelukt is de intra-arteriële infusie van cytostatica in het hals-hoofd gebied klinisch te evalueren, kan men de technische complicaties goed beoordelen. Derhalve verdient het aanbeveling ook de technische complicaties in een diemodel te evalueren.
9. De resultaten van de kaakoperatie volgens Caldwell-Luc zijn des te gunstiger naarmate de indicaties minder zuiver op rhinogeen terrein liggen.
10. Een 2-jaarlijkse controle op cervixcarcinoom kan de morbiditeit en mortaliteit van deze ziekte belangrijk terugdringen.
11. Bij de behandeling van het mammacarcinoom gaat de voorkeur uit naar maximale "locoregional cure", ook bij een primair gemetastaseerd stadium van deze ziekte. Bij deze locoregionale behandeling dient ook altijd de oksel volledig te worden behandeld.
12. Recente ontwikkelingen van de fotografie hebben het zelf afdrukken van kleurennegatieven voor de amateur toegankelijk gemaakt.