

Aus dem Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Inhibition der Angiogenese
durch kationische Liposomen:
Ein neuer Zugang zur Unterdrückung des
Tumorwachstums**

INGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
BORIS BRILL

Gießen 2001

Aus dem Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. Dr. B. Groner

Eingereicht über das Institut für Veterinär- Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Diener

**Inhibition der Angiogenese
durch kationische Liposomen:
Ein neuer Zugang zur Unterdrückung des
Tumorwachstums**

INGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades beim

Fachbereich Veterinärmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

BORIS BRILL

Tierarzt aus Königstein Ts. (Hessen)

Gießen 2001

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
Der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Groner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
Abkürzungen	4
I Einleitung	6
I. 1 Tumorentstehung, Wachstumseigenschaften, Formen von Tumoren	6
I. 2 Metastasierung	7
I. 3 Angiogenese	11
I. 4 Kationische Liposomen	17
I. 5 Paclitaxel, Taxol [®]	18
I. 6 Tumormodell (Renca-Modell)	20
I. 7 Fragestellung	21
II Material und Methoden	22
II. 1 Zelllinien und Zellkultur	22
II. 2 Fixierung und X-Gal Färbung von Zellen und Geweben	22
II. 2. 1 Fixierung und X-Gal Färbung von Zellen	23
II. 2. 2 Fixierung und X-Gal Färbung von Geweben	24
II. 3 Fixierung und X-Gal Färbung der histologischen Präparate	24
II. 4 Fixierung und HE Färbung der histologischen Präparate	25
II. 5 Immunhistochemie Faktor VIII	25
II. 6. Zytotoxizitätstest	25

	Seite:
II. 7	Tierversuch 26
II. 7. 1	Induktion subcutaner Tumoren 27
II. 7. 2	Induktion von Lungenmetastasen 28
II. 7. 3	Behandlungsplan in den Tierversuchen 29
II. 7. 4	Auswertung der Lungen des Metastasen- Modelles 30
II. 8	Auswertung der histologischen Präparate 30
II. 9	Liposomen, liposomales Paclitaxel 31
II. 10	Taxol [®] 31
II. 11	Statistische Auswertung der Tierversuche 32
III	Resultate 33
III. 1	Zytotoxizität 33
III. 2	Tierversuche 34
III. 2. 1	Tumorhistologie 34
III. 2. 1. 1	Histologie des unbehandelten Tumors 35
III. 2. 2	Subcutane Tumoren, Injektion von 5×10^6 Zellen s.c., Behandlungsbeginn an Tag eins post Zellinjektion <u>Versuch I I</u> 42
III. 2. 2. 1	Statistische Auswertung des Tumolvolumens 42
III. 2. 2. 2	Histologie 45
III. 2. 3	Subcutane Tumoren, Injektion von 5×10^6 Zellen s.c., Behandlungsbeginn an Tag elf post Zellinjektion <u>Versuch II</u> 47

	Seite:	
III. 2. 3. 1	Statistische Auswertung des Tumolvolumens	48
III. 2. 3. 2	Histologie	50
III. 3.	Metastasenmodell	53
III. 3. 1	Metastasenmodell, Injektion von 1×10^5 Zellen i.v., Behandlungsbeginn ab Tag elf post Zellinjektion, <u>Versuch III</u>	53
III. 3. 1. 1	Makroskopische Beurteilung	53
III. 3. 1. 2	Histologie	56
III. 3. 2	Metastasenmodell, Injektion von 1×10^5 Zellen i.v., Behandlungsbeginn ab Tag eins post Zellinjektion, <u>Versuch IV</u>	60
III. 3. 2. 1	Makroskopische Beurteilung	60
IV	Diskussion	63
IV. 1	Zytotoxizität der Präparate	63
IV. 2	Subcutane Tumoren, Injektion von 5×10^6 Zellen s.c., Behandlungsbeginn an Tag eins post Zellinjektion (Versuch I), Behandlungsbeginn an Tag elf post Zellinjektion (Versuch II)	64
IV. 3	Metastasenmodell, Injektion von 1×10^5 Zellen i.v., Behandlungs- beginn ab Tag elf post Zellinjektion (Versuch III) Behandlungsbeginn ab Tag eins post Zellinjektion (Versuch IV)	68
IV. 4	Organtoxizität	72
V	Zusammenfassung	74
	Summary	76
VI	Literaturverzeichnis	77
VII	Danksagung	84

Abkürzungsverzeichnis

DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPC	1,2-Dioleoyl-glycero-3-phosphatidylcholin
DOTAP	1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammonium) propan
EGF	Epithelial-Growth- Factor
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
HE-Färbung	Hämatoxylin Eosin Färbung
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
IC ₅₀	50% Inhibition Concentration
ICAM- 1	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
MTT	Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid

PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
TGF	Tumor-Growth-Factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor

I. Einleitung

I. 1 Tumorentstehung, Wachstumseigenschaften, Formen von Tumoren

Im Körper eines Lebewesens herrscht eine gut organisierte Gemeinschaft von Zellen, die sich zu den einzelnen Geweben und Gewebeanteilen mit ihren spezifischen Funktionen zusammensetzen. Jede Zelle hat ihre definierten Aufgaben, die sie im Dienst für den Gesamtorganismus erfüllt. Bis auf die Zellen des hämatopoetischen Systems hat jede Zelle ihren genau festgelegten Platz im Gefüge der einzelnen Gewebe.

Bedingt durch die Kanzerisierung einzelner normaler Körperzellen zu Krebszellen entstehen im Zellgefüge der Gewebe Tumorzellen, die unter bestimmten Bedingungen zu Tumoren proliferieren. Diese pathologische Umwandlung einzelner Zellen ist vom Gesamtorganismus nicht beeinflussbar, da sie sich in der Zelle selbst abspielt. Die transformierte Zelle vermehrt sich unkontrolliert und unabhängig von den üblichen Beschränkungen des Zellwachstums, so daß das Blastom an Volumen zunimmt, bis es klinisch manifest wird. Auf dem Weg zu einem manifesten Tumor in einem Lebewesen ist die Krebszelle vielen äußeren Einflüssen ausgesetzt, die vom Wirtsorganismus aus auf sie einwirken. Eine kanzerisierte Zelle muß sich gegenüber ihren benachbarten Zellen und dem Immunsystem behaupten, so daß sie in die Lage versetzt wird sich zu teilen und sich in Folge dessen im Gewebe zu etablieren. Bereits 1908 stellte Paul Ehrlich die Hypothese auf, daß im Körper ständig abartige Zellen entstehen, diese jedoch durch das Immunsystem eliminiert werden, und es deshalb nicht zur Tumorbildung kommt (*aus Weiß E. et al. 1990*).

Die kausale Genese der Tumore (Kanzerogenese) ist bei Mensch und Tier in vielen Teilaspekten noch ungeklärt. Es kann jedoch zwischen endogenen und exogenen Faktoren unterschieden werden, die für die Kanzerogenese von ursächlicher Bedeutung sind. Wie folgt zählt man zu den endogenen Faktoren das Lebensalter, familiäre sowie Rassendispositionen, Geschlechtsdispositionen und die besondere Neigung für das Auftreten von multiplen Primärtumoren. Es zeigt sich, daß bei älteren Menschen und Tieren häufiger Tumorerkrankungen diagnostiziert werden (*Weiß E. et al.1990*).

Zu den exogenen Faktoren der Kanzerogenese zählt man chemische, physikalische und infektiöse Noxen, die auf den Organismus bzw. die einzelnen Körperzellen einwirken und so eine Entartung der Zellen verursachen können.

Das Wachstumsverhalten und die Wachstumsgeschwindigkeit der Blastome ist unterschiedlich. Auch die Gestalt und die Anzahl von Tumoren in einem Organismus variieren. Geschwulste können sich primär nur an einer Stelle oder multipel, multizentrisch und unter Umständen auch systemisch entwickeln. Tumorwachstum kann expansiv oder invasiv (infiltrativ) erfolgen. Expansives Wachstum ist dadurch gekennzeichnet, daß der Tumor das ihn umgebende Gewebe verdrängt, bzw. vor sich herschiebt. Nicht selten ist ein expansiv wachsender Tumor von einer bindegewebsartigen Kapsel umgeben und so zu dem umliegenden Gewebe abgegrenzt. Das invasive Wachstum ist durch das Eindringen von Tumorzellen in das umgebende Gewebe gekennzeichnet. Es ist meist nicht möglich eine scharfe Grenze zwischen Tumor und gesundem Gewebe zu ziehen. Die Infiltration von Geweben durch Tumorzellen ist auf deren Motilität und Lokomotion sowie auf Druckatrophien und lytische Enzyme zurückzuführen. Ein Anzeichen auf die Dignität eines Tumors ist dessen Wachstumsgeschwindigkeit. Meist ist zu beobachten, daß bei benignen Blastomen das Wachstum langsam, bei malignen Blastomen hingegen das Wachstum schnell, bis teilweise überstürzt erfolgt. Mit der Zunahme der Größe eines Tumors verlangsamt sich die Wachstumsgeschwindigkeit. Mit der Größenzunahme der Tumoren und der beginnenden Vaskularisation der Tumoren kommt es in vielen Fällen zur Metastasierung des Primärtumors.

I. 2 Metastasierung

Unter Metastasierung (gr. Methistemai = versetzen; metastasis = Wanderung, Veränderung) versteht man in der Onkologie die Verschleppung der vom Primärtumor abgelösten Krebszellen und deren An- und Weiterwachsen in entfernten Körperregionen. Meist verstirbt der Erkrankte nicht an dem Primärtumor, sondern an dessen Metastasen. Der Grad der Metastasierung eines Blastoms weist streng auf dessen Malignität hin (*Weiß E. et al. 1990*).

Die Metastasierung ist ein sehr komplexer zellbiologischer Prozeß. Hierbei spielen sowohl Interaktionen zwischen den Tumorzellen selbst und andererseits zwischen den Tumorzellen und dem umliegenden Gewebe eine Rolle. An diesen Interaktionen sind zahlreiche Proteine und Faktoren beteiligt. Im Speziellen ist der Verlauf der Metastasierung von Individuum zu Individuum selbst mit der gleichen Krebserkrankung unterschiedlich. Dennoch findet man bestimmte Regeln sowie Tendenzen, nach denen eine Metastasierung bei den einzelnen Krebserkrankungen verläuft (*Hart I.R. et al. 1989*). So ist beispielsweise von der Art und der Lage einer Geschwulst, ein Organotropismus ihrer Metastasen zu beobachten. Die Metastasierung kann lymphogen, hämatogen, kanalikulär sowie durch Implantation erfolgen (*De Vita J.R. et al. 2000*).

Der Mechanismus der Metastasierung unterteilt sich in die Dissoziation der Tumorzellen, die Migration der Zellen aus dem Tumorgewebe in Richtung der Blut- bzw. Lymphgefäße sowie der Intravasation in das Gefäß. *Liotta et al. (1974)* beschreibt die Abhängigkeit der Metastasierung von dem Anstieg der Vaskularisierung der Tumoren.

Zu Beginn der Metastasierung kommt es zum Ablösen von Tumorzellen aus dem Zellverband (Tumorzelldissoziation). Dies geschieht zunächst durch eine Reduktion der junktionalen Kontaktstellen und einer vermehrten Lokomotion (Migration) der Tumorzellen. Die für die Metastasierung notwendige Motilität von Blastomzellen ist mit Veränderungen von Zytoskelett-Elementen verbunden. Verschiedene spezifische Faktoren, z.B. der autokrine Motilitäts-Faktor (*Liotta L.A. et al. 1986; Watanabe H et al. 1993*), der Scatter-Faktor (*Kenworthy P. et al. 1992; Giordano S et al. 1993*), Thromboplastin (*Yabkowitz R. et al. 1993*) und Monozyten-abgeleitete Monokine (*Jiang W.G. et al. 1993*) haben einen Einfluß auf die Beweglichkeit von Tumorzellen. Bei einigen Krebserkrankungen, wie dem Melanom, dem Blasenkarzinom und dem Prostatakarzinom ist die Anwesenheit von Rezeptoren für Motilitätsfaktoren mit einer erhöhten Fähigkeit der Zellen zur Invasion und Metastasenbildung verbunden (*Silletti S. et al. 1995; Kenworthy P. et al. 1992; Giordano S et al. 1993; Liotta L.A. et al. 1991; Nabi I.R. et al. 1992*). Zudem ist bei malignen Krebszellen ein Fehlen des Oberflächenfibronektins zu beobachten, so daß die Verankerung der Zellen im Gewebeverband herabgesetzt ist (*Weiß E. et al. 1990*). Nach der Dissoziation der Zellen müssen diese die Komponenten der extrazellulären-Matrix (EZM) abbauen, um durch

Migration in die Nähe von Blut- oder Lymphgefäßen zu gelangen (*Nicolson G.L. et al. 1989; Sloane B.F. et al. 1990; Testa J.E. et al. 1990; Liotta L.A. et al. 1982*). Um in das Lumen von Blut- oder Lymphgefäßen einzudringen (Intravasation) wird die extrazelluläre Matrix der Basalmembranen von Gefäßen mit Hilfe von verschiedenen Substanzen, darunter Enzyme wie z.B. Hyaluronidasen, die von den Tumorzellen freigesetzt werden, aufgelöst. Im Lumen der Gefäße werden die Tumorzellen nun abgeschwemmt. Im Blutgefäßsystem sind die Zellen starken mechanischen Belastungen ausgesetzt und müssen zudem Angriffe des Immunsystems überstehen. Dies gelingt ihnen durch Bildung von Zellaggregaten, die durch ihre Oberfläche bedingt zu Fibrinablagerungen an den Zellen führen kann (Embolibildung). Durch das umgebende Fibrin sind die Zellen vor dem Immunsystem maskiert und vor mechanischen Belastungen geschützt. Dennoch wird der größte Teil der Tumorzellen im Blutgefäßsystem zerstört und eliminiert. In den kleinlumigen Kapillaren von z.B. Lunge und Leber werden die überlebenden Blastomzellen aus dem Blutstrom herausgefiltert. Sie verlassen das Gefäß um sich im umliegenden Parenchym zu implantieren (Extravasation).

Das Ablösen von Krebszellen vom Primärtumor, die Migration durch die extrazelluläre Matrix und die Invasion in Lymph- und / oder Blutgefäße erfordern Veränderungen des Zell-Zell- und des Zell-Matrixkontaktes. Der Zusammenhalt des Zellgefüges im Gewebe wird durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt. Bekannt sind in diesem Zusammenhang Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, der Integrinsuperfamilie, der Selektine und der Cadherine. Verschiedene Tumorzelllinien besitzen die Eigenschaft, die Bildung von Adhäsionsmolekülen herunter zu regulieren und so die Bindung an die anderen Zellen zu lockern (*Maurer-Gebhard et al. 1998; Mayer B. et al. 1993*). So beschreibt Shimayama et al. (1989) wie auch Umbas et al. (1992) die Fähigkeit verschiedener Tumoren die Expression von E-Cadherin ganz oder teilweise zu verhindern (*Shimayama Y. et al. 1989; Umbas R et al. 1992*). Auch Benassi et al. (1998) zeigte einen Zusammenhang zwischen der Expression von EZM-Molekülen und der Malignität von Sarkomen. Komponenten der extrazellulären Matrix, wie z.B. Laminin, Fibronectin, Vitronectin, Hyaluronsäure und die Kollagene werden von spezifischen Rezeptoren erkannt. Die Familie der Integrine bildet die größte Gruppe der EZM-Rezeptoren. Integrine stellen sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrixkontakte her.

Veränderungen oder Änderungen der Zusammensetzung der Integrine spielen eine bedeutende Rolle bei den invasiven Vorgängen der Tumorzellen (Sordat I. et al. 1998).

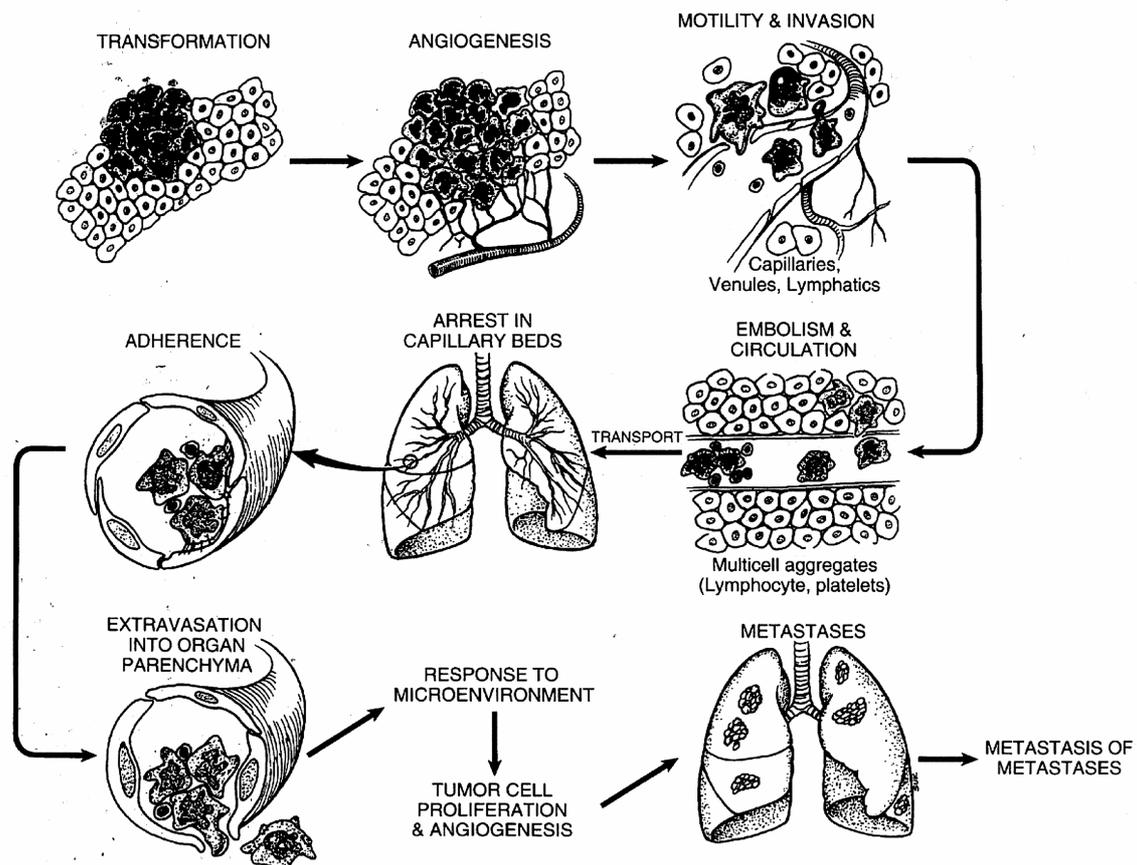


Abb. 1 Die Pathogenese von Metastasen (aus De Vita et al. 2000)

Um Metastasen zu bilden, müssen sich Tumorzellen vom Primärtumor ablösen, die extrazelluläre Matrix durchwandern, in das Gefäßsystem eindringen, dort überleben und in den Kapillaren festgehalten werden um in das Parenchym eines Organs zu gelangen. Hier müssen die Tumorzellen proliferieren, Angriffe des Immunsystems überstehen und die Angiogenese induzieren. Die gebildeten Metastasen können Ausgangspunkt für weitere Metastasen sein. Dieser Vorgang wird als Metastasierung der Metastasierung bezeichnet.

Für die Invasion aber auch für die Extravasation von Tumorzellen in das Gewebe ist der Abbau der extrazellulären Matrix eine wichtige Voraussetzung (Liotta L.A. et al. 1990). Matrixbestandteile sind die Kollagene, das Elastin, Glykoproteine und Proteoglykane.

Metastasierende Zellen sind nun in der Lage mit Hilfe von Enzymen, im wesentlichen den Metalloproteinasen (Stromalysine, Kollagenasen), Serinproteasen (Plasmin, Plasminogenaktivator), Cysteinproteasen (Cathepsine), Heparinasen, Hyaluronidasen und Proteoglykanasen, die extrazelluläre Matrix abzubauen und damit zu durchdringen. Die Enzymsekretion der metastasierenden Tumorzellen korreliert mit deren metastatischen Potential (*Johnson M.D. et al. 1992; Liotta, L.A. et al. 1990*).

Solide Tumoren wie auch sich bildende Metasen benötigen für ihre Entwicklung stets eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen. Diese Versorgung wird durch die Induktion der Angiogenese sicher gestellt.

I. 3 Angiogenese

Um ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten zu können, benötigt jede Zelle ausreichend Nährstoffe. Da in einem ortsständigen Gewebe viele Zellen nebeneinander existieren kommt es zu einer Konkurrenz um Nährstoffe unter den Zellen. Ebenso häufen sich Stoffwechselprodukte um die einzelnen Zellen herum an. Daher ist es notwendig, daß ein konstanter Stoffaustausch im Gewebe aufrecht erhalten wird. Die konstante Nährstoffversorgung und der Abtransport von Stoffwechselprodukten wird durch das Blutgefäßsystem, insbesondere durch das Kapillarsystem, welches alle Gewebe infiltriert, gewährleistet.

Das Blutgefäßsystem ist mit einer Oberfläche von ca. 900 m² beim Menschen eines der größten Organe des Körpers. Die Gefäße sind je nach Art und Größe verschieden gebaut. So findet man bei Arterien, Arteriolen, Venen und Venolen einen typischen dreischichtigen Aufbau bestehend aus:

- | | | |
|-------------------|---|------------|
| 1. Tunica intima | = | Intima |
| 2. Tunica media | = | Media |
| 3. Tunica externa | = | Adventitia |

Die einzelnen Gewebeschichten der Intima bauen sich vom Lumen nach außen hin wie folgt auf:

- a. Endothel mit Basalmenbran
- b. Lamina propria intima
- c. Membrana elastica interna.

Die Media unterteilt sich in ihren Gewebeanteilen in glatte Muskelzellen und elastische Fasernetze. Die Adventitia weist Längsfaserbündel aus kollagenen Fasern auf und stellt die Verbindung des Gefäßes zum umliegenden Parenchym dar.

Die Kapillaren bestehen aus nur einer Endothelzellschicht, basierend auf der umgebenden Basalmembran. Diese wird von einem Netz aus Retikulinfasern gestützt. Vereinzelt sind den Kapillaren Perizyten angelagert. Die Endothelzellen sind aktiv an vielen regulativen Prozessen im Körper beteiligt. Sie greifen so z.B. in die Blutgerinnung ein, durch Synthese von Gewebe-Plasminogen-Aktivator, dem von Willebrand-Faktor (Faktor VIII), der die Thrombozytenaggregation aktiviert, sowie dem Plasminogenaktivator-Inhibitor-1. Weiterhin besitzen Endothelzellen die Möglichkeit, Zellen des Immunsystems mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen (E-Selektin, intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1 = ICAM-1) zu arretieren und sie so in das veränderte Gewebe zu führen.

Risau unterscheidet zwischen der Vasculogenese und der Angiogenese:

Im Zuge der embryonalen Entwicklung differenzieren sich Endothelzellen aus Stammzellen und bilden neue Gefäße (Vasculogenese). Im Verlauf der Angiogenese proliferieren aus schon bestehenden Gefäßen neue Blutgefäße zur Versorgung minderversorgter Gewebe (*Risau W. 1997*).

Zur Induktion der Angiogenese ist jede Zelle des Körpers in der Lage. Somit kann man die Angiogenese als einen Prozeß ansehen, der einem proliferierenden Gewebe die Existenz sichert. Die Bildung neuer Blutgefäße ist jedoch nicht nur in wachsenden Geweben zu beobachten, sie setzt ebenfalls in Geweben ein, die durch Minderversorgung in einen hypoxischen Zustand geraten (*Carmeliet P. et al. 1999; Ferrara N. et al. 1999*). Die maximale Gewebedicke, die eine ausreichende Versorgung der einzelnen Zellen sichert, ist limitiert. Der Abstand zwischen Zelle und Blutgefäß

beträgt ca. 200 µm. Dies ist zugleich das Diffusionslimit von Sauerstoff. Wird diese Grenze in einem proliferierenden Gewebe überschritten, muß die Vaskulogenese bzw. die Angiogenese einsetzen, um die Versorgung der Zellen zu sichern.

Griffioen (2000) beschreibt, daß die Bildung neuer Blutgefäße aus existierenden Gefäßen ein Prozeß ist, der bei physiologischen wie auch bei pathologischen Ereignissen einsetzt. Normales Gewebewachstum wie z.B. die Entwicklung eines Embryos, die Wundheilung, der Zyklus der Frau ist charakterisiert durch Angiogenese, um Stoffwechselprodukte abzuführen sowie Sauerstoff und Nährstoffe zuzuführen. Dem gegenüber kann bei pathologischen Veränderungen die Angiogenese Bestandteil der Erkrankung sein, wie z.B. bei Krebs, Atherosklerose, chronischen Entzündungen (rheumatische Arthritis, Crohn'sche Krankheit), Diabetes mellitus (diabetische Retinopathie), Endometriosis und

Adipositas (*Folkmann J. et al. 1995; Griffioen A.W. et al. 2000; Hanahan D and Folkmann J. 1996*).

Die Pathogenese eines Blastoms besteht darin, daß es zu einer vom Organismus unkontrollierten Proliferation von Tumorzellen und damit zu einer Volumenzunahme des Gewebes kommt. Diese Volumenzunahme bedingt eine Distanzierung der Tumorzellen von Blutgefäßen, was zur Folge hat, daß die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff verschlechtert wird. Die nicht vom Gefäßsystem erfaßten Zellen geraten in den Zustand der Hypoxie.

Schon vor ungefähr 100 Jahren wurde die Beobachtung gemacht, daß das Tumorwachstum und die Angiogenese zusammen auftreten. Virchow beschrieb 1863 als Erster in seiner Publikation „Die Krankhaften Geschwülste“ die starke Vaskularisation in Tumoren. Er sah dies assoziiert mit der Desorganisation von Tumorzellen. 1968 wurde die Hypothese aufgestellt, daß Tumore eine angiogenetische Substanz produzieren müssen (*Greenblatt M. et al. 1968*). Neuere Untersuchungen zeigen eine Abhängigkeit des Tumor- und Metastasenwachstums vom Grad der Gefäßbildung (*Macchiarini P. et al. 1992; Smith-McCune K.K. et al. 1994; Takahashi Y. et al. 1995; Weidner N. et al. 1993; Weidner N. et al. 1991*), und es wird diskutiert, daß mit der Unterbindung der Angiogenese ein Therapieansatz zur Behandlung von Geschwulsten eventuell möglich ist (*Griffioen A.W. et al. 2000*).

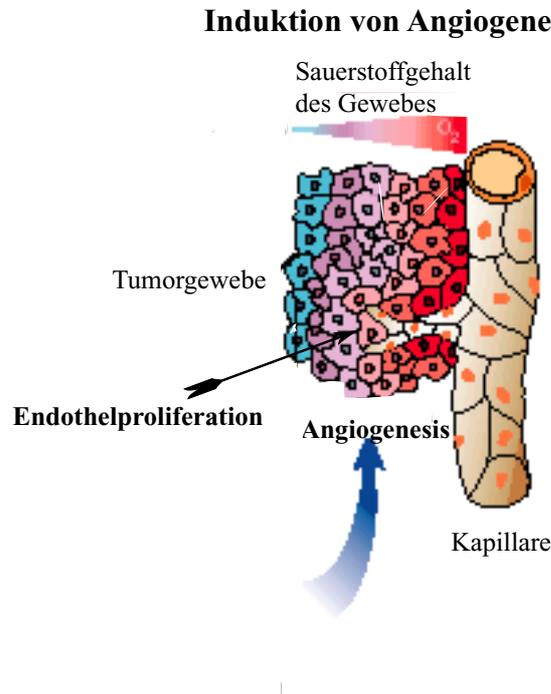


Abb. 2 Die Angiogenese wird durch Hypoxie im Gewebe während der Gewebeproliferation induziert. Es kommt zur Aussprossung von Endothelzellen in das neugebildete Gewebe.

Die Regulation der Angiogenese wird von pro- und antiangiogenetischen Faktoren gesteuert (*Bikfalvi A. 1995*). So wird die Angiogenese in Folge hypoxischer bzw. ischämischer Zustände im Gewebe induziert (*Folkmann J. et al. 1997*). Es kommt zur Ausschüttung von Mediatoren aus Wirtszellen wie auch aus Tumorzellen. Den bedeutendsten Faktor stellt der Vaskuläre Endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) dar. VEGF wird, wie von *Brown et al. (1997)* beschrieben, von hypoxischen Tumorzellen, Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems gebildet (*Brown L.F. et al 1997*). Weiterhin sind an der Induktion der Angiogenese beteiligt: Mitglieder der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF), Interleukin-8 (IL-8), Angiogenin, Angiotropin, der epidermale Wachstums-Faktor (EGF), Fibrin, Nicotinamid, der Plateled-Derived-Growth-Factor (PDGF), der transformierende Wachstumsfaktor - α und - β (TGF- α und- β) und der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) (*Carmeliet, P. et al. 2000*;

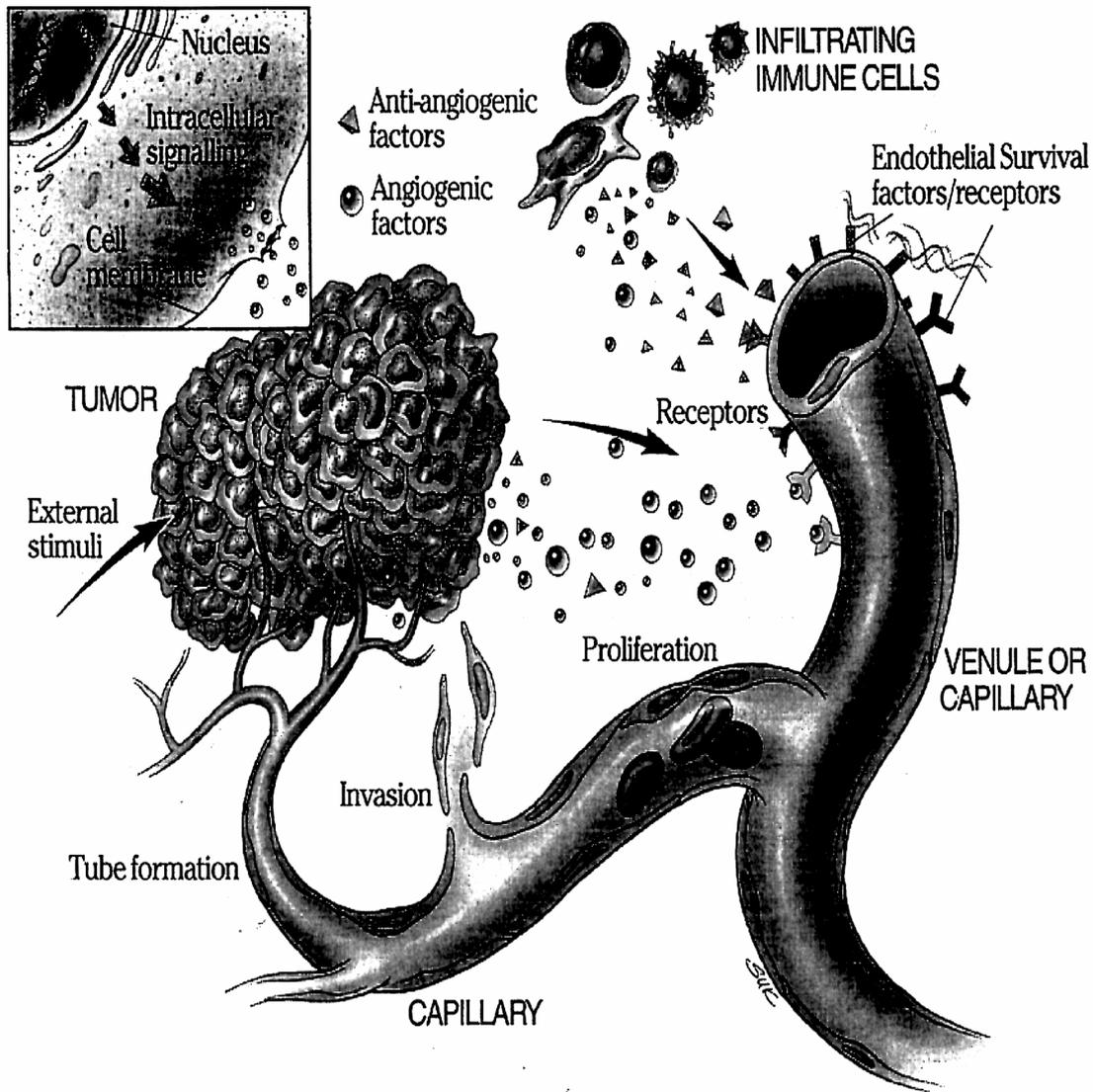


Abb. 3 Angiogenese (aus DeVita Jr. et al. 2000)

Induziert durch die Hypoxie im Tumor werden pro- und anti-angiogenetische Faktoren von den Tumorzellen selbst sowie von Zellen des Immunsystems sezerniert. Diese stimulieren die Endothelzell-proliferation, so daß es zur Aussprossung neuer Gefäße in Richtung auf den Tumor kommt.

Griffioen A.W. et al. 2000; Ferrara N. 1999). Durch die Ausschüttung der Mediatoren werden die Endothelzellen aktiviert und beginnen zu proliferieren. Dabei ist die Wachstumsrichtung auf den Stimulus hin gerichtet (siehe Abb. 4), so daß nun das

hypoxische Gewebe mit Nährstoffen versorgt werden kann. Die Endothelzellen durchlaufen drei Schritte im Verlauf der Angiogenese: Zunächst kommt es zur Migration der Zellen. Dieser folgt die eigentliche Proliferation der Zellen.

Während der Maturation der Gefäßendothelzellen, werden nun die Bestandteile der extrazellulären Matrix (Fibronektin, Laminin, Proteoglykane) sezerniert. Zudem werden

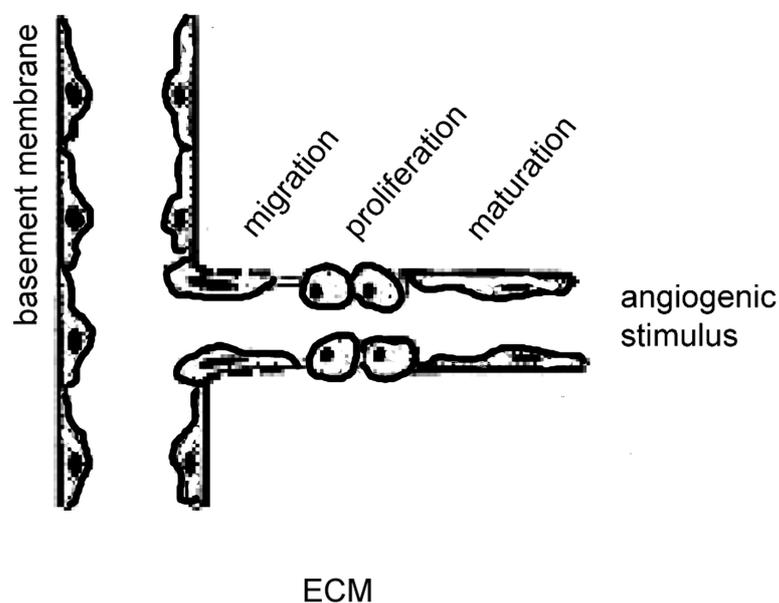


Abb. 4 Angiogenese in Richtung eines Stimulus (aus Griffioen A.W. et al. 2000) Die proliferierenden Endothelzellen durchlaufen während der Angiogenese drei Phasen: 1, die Migration, 2, die Proliferation und 3, die Maturation der Zellen. Die Wachstumsrichtung ist auf den Stimulus z.B. einen Tumor gerichtet.

im Verlauf der Maturation die Kapillaren von Perizyten umschlossen, um dem Gefäß die nötige Stabilität zu geben. An größere Gefäße lagern sich zudem glatte Muskelzellen an. Die muralen Zellen, Perizyten und glatte Muskelzellen, differenzieren sich unter dem Einfluß von dem Transforming-Growth-Faktor- β (TGF- β), der von den Endothelzellen sezerniert wird, aus mesenchymalen Zellen.

Im Gegensatz zu der physiologischen Angiogenese ist in Tumoren das Gleichgewicht zwischen angiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren gestört, so daß ein Übergewicht zu Gunsten angiogenetischer Faktoren zu finden ist. Dies hat sowohl die Bildung von strukturell, als auch funktionell abnormaler Blutgefäße im Tumor zur Folge und führt zum Fehlen protektiver Mechanismen der Gefäße, wie beispielsweise die Abwesenheit von das Endothelrohr stützenden Perizyten. Darüberhinaus bestehen Tumorgefäße nicht wie Kapillaren im gesunden Gewebe aus einer homogenen Endothelzellschicht, sondern man findet mosaikartige Einlagerungen von Blastomzellen in dem Endothel der Tumorgefäße. Der Grad der Tumorzelleinlagerung in das Gefäßendothel ist signifikant für den Grad und die Bereitschaft zur Metastasierung von Tumoren (*Carmeliet P. et al. 2000; Weidner N. et al. 1991*).

Tumorgefäße sind strukturell und funktionell abnormal. Im Vergleich zu physiologischen Gefäßen ist die Vaskularisation im Tumor unorganisiert. Es sind wechselnde Durchmesser, starke und häufige Verzweigungen sowie Shunts zu finden. Diese Strukturen haben einen ungeordneten und zugleich variablen Blutfluß im Tumor zur Folge. Daraus resultiert eine partielle Minderversorgung des Parenchyms, so daß man dennoch hypoxische Regionen im Blastom findet. Der diskontinuierliche Blutfluß im Tumor bringt so auch für eine zytostatische Therapie Probleme mit sich. Da es in manchen Regionen des Blastoms keine festgelegte Strömungsrichtung des Blutes gibt, ist die Verteilung eines Therapeutikums im Gewebe ungleichmäßig (*Griffioen A.W. et al. 2000*). Weiterhin findet in den hypoxischen Gewebeabschnitten eine Selektion der Tumorzellen statt, die ihre Fähigkeit zur Apoptose verloren haben (*Hashizume H. et al. 2000*). Sollte es möglich sein mittels eines Therapeutikums die Angiogenese zu inhibieren, indem die Blutgefäße im und um den Tumor geschädigt werden, kann dies ein weiterer Ansatz der Krebstherapie sein.

I. 4 Kationische Liposomen

Durch Zusammenlagerung von Lipiden und oder Fettsäuren entstehen kugelartige Makromoleküle, die Liposomen. Diese Liposomen zeigen einen zellwandähnlichen Aufbau. Mit der Kombination verschiedener Lipide kann man die Oberflächenladung

der Liposomen beeinflussen. So ist es möglich neutrale, kationische oder anionische Liposomen herzustellen. Diese Makromoleküle eignen sich nun für den Transport verschiedener Substanzen. Je nach Struktur der einzusetzenden Substanzen bzw. der Präparation der Liposomen ist es möglich die Stoffe in die Hülle der Liposomen zu integrieren, oder sie mit dem Lipidfilm zu umgeben. In zahlreichen Publikationen konnte gezeigt werden, daß Liposomen als Carrier für Wirkstoffe, Fluoreszenzfarbstoffe, DNA-Komplexe, Makromoleküle oder Schwermetalle eingesetzt werden können (*Drummond D.C. et al. 1999; McLean J.W. et al. 1997; Meyer O. et al. 1998; Sengupta S. et al. 2000; Osaka G. et al. 1996; Papahadjopoulos D. et al. 1991; Lee K.D. et al. 1993*). Je nach Ladung und Oberflächenbeschaffenheit der Liposomen, kommt es zu spezifischen Organverteilungen und Plasmahalbwertszeiten. Die Formulierung der hier verwendeten Liposomen erlaubt es, hydrophobe Substanzen wie z. B. Zytostatika (Taxol®) zu binden und so meist in geringeren Dosen als die nichtliposomalen Vergleichspräparate einzusetzen.

Thurston et al. konnte im Tierversuch zeigen, daß kationische Liposomen vor allem an proliferierenden Endothelzellen binden. Im Vergleich zu kationischen Liposomen gibt es keine Bindung von anionischen oder neutral geladenen Liposomen am Gefäßendothel. Die Plasmahalbwertszeit von kationischen Liposomen liegt jedoch mit weniger als fünf Minuten weit unter dem Wert von neutralen Liposomen. Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Liposomen konnte in der konfokalen Mikroskopie deren spezifische Anreicherung in den Tumorgefäßen dargestellt werden (*Thurston G. et al. 1998*).

I. 5 Paclitaxel, Taxol®

Taxol® als zugelassenes Zytostatikum beinhaltet als pharmakologisch wirksame Substanz den Mitosehemmstoff Paclitaxel.

Paclitaxel ist ein Alkaloid, das ursprünglich aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) extrahiert wurde. Der Wirkmechanismus der Taxane wie Paclitaxel und Docetaxel ist die Verhinderung der Desaggregation des Spindelapparates. Die in der G₂-

Phase zum Stofftransport gebildeten Spindeln können danach nicht mehr umgebaut werden, insbesondere entstehen in der Mitosephase keine Kernspindeln. Dies hat zur Folge, daß die Mikrotubuli des Spindelapparates in der G₂- Phase des Zellzyklus stabilisiert werden. Durch den verhinderten Abbau des Spindelapparates verharret die Zelle in der Metaphase, bis dies zur Induktion von Apoptose führt (*Schmidt M. et al. 2000*).

In der Humanmedizin werden Taxane, wie Paclitaxel und Docetaxel in der Chemotherapie von Mamakarzinomen, nicht kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Ovarialkarzinomen und Prostatakarzinomen angewendet. Die zur Therapie verwendete Dosierung von Paclitaxel liegt zwischen 135 und 175mg/m² Körperoberfläche. Verabreicht wird es in Dauerinfusionen über drei bis 24 Stunden. Diese Dosierung entspricht beim Menschen ca. 4,6mg / kg Körpergewicht.

Bedingt durch die Hydrophobie des Paclitaxels ist es nötig einen Lösungsvermittler, Cremophor EL[®] im Taxol[®] (Polyoxyl 35 Castor Oil) zur Herstellung von wässrigen Infusionslösungen einzusetzen (*Mutschler E. 1996*). Dieser Lösungsvermittler ruft oftmals im Verlauf der Behandlung der Patienten anaphylaktische Reaktionen hervor, die eine Prämedikation der Patienten mit hohen Glukokortikoidgaben nötig machen, bzw. zu einem Abbruch der Behandlung führen.

Durch die Möglichkeit das lipophile Paclitaxel in die Lipidhülle der kationischen Liposomen zu integrieren kann auf die Verwendung des Lösungsvermittlers Cremophor EL[®] verzichtet werden, was eine Verringerung der Nebenwirkungen einer Chemotherapie zur Folge hat. Zudem ist ein neuer Wirkmechanismus des Zytostatikums zu erwarten, da wie oben beschrieben, kationische Liposomen spezifisch an proliferierende Endothelzellen binden. Die Bindung macht das unspezifisch wirkende Paclitaxel durch diese Galenik zu einem Angiogeneseinhibitor.

Um die Anwendung von an Liposomen gebundenen Angiogeneseinhibitoren und Zytostatika in der Tumorthherapie zu testen wurde folgendes Tumormodell benutzt:

I. 6 Tumormodell (Renca- Modell)

Die Wirkung von Medikamenten auf den Organismus kann in invitro- Versuchen nur bis zu einem bestimmten Grad erfaßt werden. Es ist möglich z.B. Zytostatika und für die Galenik von Medikamenten nötige Formulierungen in der Zellkultur auf ihre Eigenschaften zu testen, man kann jedoch nicht die Beeinflussung komplexer Vorgänge in einem Organismus beobachten. Aus diesen Gründen ist es nötig Modellsysteme zu entwickeln, die die Möglichkeit bieten die Wirksamkeit von Pharmaka auf die Physiologie von z.B. Tumoren zu evaluieren. Tumormodelle wie das Renca- Modell bieten die Möglichkeit das Wachstum verschiedener Formen von Tumoren unter den Einflüssen einer Therapie zu beobachten. Das Renca- Modell ermöglicht es solide Tumoren durch subcutane Injektion der Tumorzellen, sowie Lungenmetastasen durch intravenöse Injektion der Zellen zu induzieren.

Das in dieser Arbeit angewendete Tumormodell in Mäusen stellt ein syngenes Tiermodell dar. Die eingesetzte Tumorzelllinie (Renca-Zellen) wurden aus einem spontan entstandenen Nierenkarzinom der BALB/c Maus isoliert. Um eine verbesserte Quantifizierung der Tumorzellen im Gewebe zu erreichen wurde die Zelllinie mit dem lac-Z Gen stabil transfiziert (*Maurer-Gebhard M. et al. 1998*). Mit Hilfe der X-gal-Reaktion ist es möglich Lungenmetastasen im umliegenden Lungenparenchym sichtbar und so leicht erfaßbar zu machen. Dies stellt gerade für die Auswertung von sich im Gewebe befindlichen Tumorzellen eine erhebliche Erleichterung dar. So können Metastasen der in toto X-gal gefärbten Lungen an Hand ihrer blau- grünen Färbung unter einem Mikroskop ausgezählt werden.

I. 7 Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit ist es die Wirksamkeit und Verträglichkeit eines zugelassenen Zytostatikums, Taxol[®], mit der Wirksamkeit von an kationische Liposomen gebundenem Paclitaxel unter zu Hilfenahme des syngenens Maustumormodells zu vergleichen. Beide Formulierungen enthalten Paclitaxel als wirksamen Bestandteil. Die verwendete Dosis des Paclitaxels ist in beiden Formulierungen gleich, jedoch ist der Wirkmechanismus der Liposomen auf die Inhibition der Angiogenese im Tumor ausgelegt.

Können nun Unterschiede in der Angiogenese der Tumoren, bzw. der Lungenmetastasen beobachtet werden und ist es möglich mittels liposomal gebundener Zytostatika einen antiangiogenetischen Effekt im Tumor zu erzielen?

Führt die Behandlung der Tumoren mit den Präparaten Taxol[®], Liposomen, an kationische Liposomen gebundenem Paclitaxel zu einer Reduktion des Tumorumfanges bzw. zu einer Reduktion der Anzahl der Lungenmetastasen auf der Lungenoberfläche im Vergleich zu den mit Glukoselösung behandelten Kontrollen?

Ein weiteres Ziel ist es, die Wirksamkeit des Zytostatikums zu steigern, so daß es zukünftig möglich sein könnte die Dosis zu reduzieren. Weiterhin soll untersucht werden, ob es möglich ist Unterschiede zwischen dem Einsetzen des Behandlungsbeginns und Unterschiede zwischen der Wirksamkeit der Präparate auf solide Tumoren und Lungenmetastasen zu erfassen.

Kann man Organveränderungen erkennen, die auf Unverträglichkeiten schließen lassen?

II Material und Methoden

II. 1 Zelllinien und Zellkultur

Die in den Versuchen verwendete Zelllinie **Renca-lac/Z** stammt aus einer stabilen Transfektion der Ausgangszelllinie Renca (murine Nierenkarzinomzellen). Die Transfektion wurde mit dem Expressionsvektor pZeoSV2/lacZ durchgeführt (*Maurer-Gebhard M. et al. 1998*). Die Zellen werden seit dem ständig mit Hilfe von Zeocin unter Selektion gehalten.

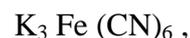
Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden drei mal wöchentlich „gesplittet“. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff in einem Medium bestehend aus FCS und 10% DMSO .

Die Zelllinie Renca-lac/Z wurde in RPMI-Medium kultiviert. Dem Medium wurden 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. FCS wurde zur Inaktivierung des Komplements vor Gebrauch 30 min. auf 56°C erhitzt. Zusätzlich wurde dem Medium 0,25 mg/ml Zeocin zugesetzt.

II. 2 Fixierung und X- Gal Färbung von Zellen und Geweben

X-Gal Färbelösung

5 mM Eisenhexacyanoferrat



5 mM Eisenhexacyanoferrat Trihydrat



1 mM Magnesiumchlorid



gelöst in PBS

X-Gal Lösung

Stammlösg. 100 mg/ml in DMF

Fixierungslösung für Organe0,2 % Glutaraldehyd,
2 % Formaldehyd
gelöst in PBS**II. 2. 1 Fixierung und X-Gal Färbung von Zellen**

Nach Absaugen des Mediums aus der Zellkulturschale wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 0,05 % Glutaraldehyd in PBS bei Raumtemperatur für 3-5 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um die restliche Fixierlösung zu entfernen. Darauffolgend wurden die Zellen mit X-Gal Färbelösung versetzt, zu der in einer Endkonzentration von 1 mg/ml das farblose X-Gal Substrat (Stammlösung 100 mg/ml in DMF) vorsichtig am Rand der Zellkulturschale hinzupipettiert wurde. Anschließend wurden die Zellkulturschalen zum Mischen leicht geschwenkt um eine gleichmäßige Verteilung der Lösungen zu gewährleisten. Nach Inkubation des Ansatzes für ca. 4 h bei 37°C im Brutschrank konnte die Blaufärbung der Zellen unter dem Mikroskop betrachtet werden.

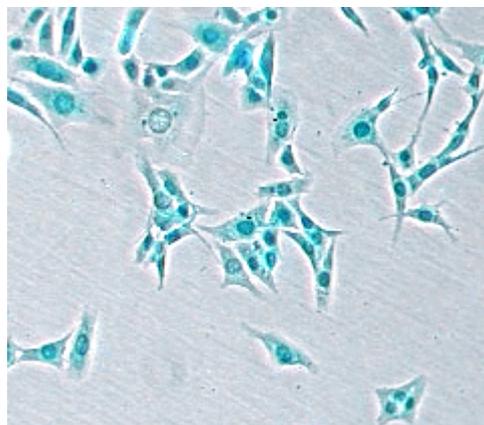


Abb. 5 Renca-lac/Z Zellkultur X-Gal gefärbt

II. 2. 2 Fixierung und X-Gal Färbung von Geweben

Die Gewebe (subcutane Tumoren, metastasierte Lungen) wurden nach dem Töten der Versuchstiere entnommen, mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank in der Fixierungslösung für Organe fixiert. Nach Wässern in PBS für 1 bis 2 h bei 4°C, wurden die Organe mit X-Gal Färbelösung versetzt, die zudem 0,02 % NP40 (Nonidet, aqueous solution, Boeringer Mannheim) und 0,01 % SDS enthielt. Zu diesem Ansatz wurde X-Gal- Substrat in einer Endkonzentration von 1 mg/ml gegeben. Nach einer Inkubation von 8 h bei 37°C im Brutschrank waren die Gewebe an ihrer Oberfläche gefärbt. Für die histologische Weiterverarbeitung wurden die Gewebe 48 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe in PBS gewaschen und zur Lagerung in 4 % gepufferten Zinkformalin aufbewahrt.

II. 3 Fixierung und X-Gal Färbung der histologischen Präparate

Die Gewebe für die Anfertigung von X-Gal gefärbten histologischen Präparaten wurden im Anschluß an die Präparation in flüssigem Stickstoff gefroren. Es wurden Gefrierschnitte mit einer Dicke von 5 bis 7 µm angefertigt, die mit der Fixierlösung für Organe für wenige Minuten fixiert wurden und anschließend in PBS gewaschen wurden. Die Schnitte wurden mit X-Gal- Färbelösung und X-Gal-Substrat in einer Konzentration von 1 mg/ml für ca. zwei Stunden bei 37° im Wasserbad gefärbt. Die Färbung wurde mikroskopisch überprüft. Anschließend wurden die Präparate mit Kernechtrot gegengefärbt.

II. 4 Fixierung und HE-Färbung der histologischen Präparate

Das Gewebematerial für die Hämatoxylin / Eosin- Färbungen (HE-Färbung) wurde für 24 h in 4 % igem gepuffertem Zinkformalin fixiert und danach in 70 % igem Alkohol gelagert. Die Gewebe wurden in Paraffin eingebettet.

Es wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt.

Die fertigen Schnitte wurden nach einem Standardprotokoll HE gefärbt.

II. 5. Immunhistochemie Faktor VIII

Für die Immunhistochemie wurden Paraffinschnitte von 4 µm Dicke verwendet. Die Schnitte wurden entparaffiniert. Die Antigendemaskierung wurde mit 0,1 % Protease in PBS pH 7,8 durchgeführt.

Als polyklonaler Antikörper wurde der Anti- Faktor VIII Antikörper (Rabbit Anti-Human, Von Willebrand Factor, Code No. A 0082; Fa. DAKO Hamburg) in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt.

Als Sekundärantikörper I wurde ein Ziege Anti- Kaninchen Antikörper verwendet, als Sekundärantikörper II ein Streptavidin- konjugierter Maus Anti- Ziege Antikörper .

Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte mit Hämatoxylin.

II. 6 Zytotoxizitätstests

Entwicklungspuffer: 10 mg/ml MTT (Sigma)

gelöst in PBS

Lysispuffer: 0,04 N HCl in Isopropanol

Die zytotoxische Wirkung der im Tierversuch eingesetzten Präparate Taxol[®], an kationischen Liposomen gebundenes Paclitaxel, Liposomen und Glukose 5 %ig wurden gegenüber den Renca- lac/Z Zellen in 96-Loch Flachbodenplatten in einem

Volumen von 100 µl analysiert. Es wurden Konzentrationen zwischen 10 µg/ml und 0,0005 ng/ml Paclitaxel und den entsprechenden Liposomen- und Cremophor EL[®]-Konzentrationen bei einer Zelldichte von 1×10^4 pro Loch getestet.

Die zu prüfenden Substanzen wurden zunächst auf die doppelte Konzentration der im Test jeweils eingesetzten Konzentration in Vollmedium verdünnt und darauffolgend in die 96- Loch Platten in einem Volumen von je 50 µl vorgelegt. Die zu testenden Zellen wurden abtrypsiniert, mit PBS gewaschen und auf eine Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml in Vollmedium eingestellt. Je 50 µl der Zellsuspension wurden zu den Proben dazupipettiert.

Die Ansätze wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für 40 h in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Anschließend wurde in jede Vertiefung des Ansatzes 10 µl Entwicklungspuffer, der MTT enthielt, hinzugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Die Mitochondrien noch lebensfähiger Zellen reduzieren in dieser Zeit das hinzugefügte gelbe Tetrazoliumsalz MTT in ein braunes wasserunlösliches Formazanprodukt.

Nach Absaugen des Überstandes und Hinzufügen von 200 µl Lysispuffer wurden die Zellen 20 min bis 45 min im Inkubator bei 37°C lysiert und das Formazanprodukt in Lösung gebracht. Die Überlebensrate wurde entsprechend der Absorption bei 590 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Die Absorption unbehandelter Zellen wurde als 100 %, die des Lysispuffers als 0 % gesetzt. Sämtliche Werte wurden dreifach bestimmt.

II. 7 Tierversuch

In allen Tierversuchen wurden immunkompetente, weibliche BALB/c Mäuse (BALB/c AnN Crl; gezüchtet bei Charles River Laboratories, Sulzfeld) mit einem Gewicht zwischen 18 und 20 g eingesetzt. Die Versuchstiere erhielten Wasser und Futter ad libidum. Gehalten wurden die Mäuse in Gruppen von je vier Tieren unter Standardbedingungen.

II. 7. 1 Induktion subcutaner Tumoren

Zur Induktion subcutaner Tumoren wurden weiblichen BALB/c Mäusen beiderseits in die seitliche Rückenflanke je 5×10^6 Renca- lac/Z Zellen in 100 μ l PBS injiziert. Die Tumorgroße wurde alle drei Tage gemessen. Das Tumolvolumen wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{L \times \pi \times B^2}{6} = V$$

L = größte Länge des Tumors (mm)

B = Breite des Tumors (mm)

V = Tumolvolumen (mm^3)

bestimmt.

Modell der soliden Tumoren

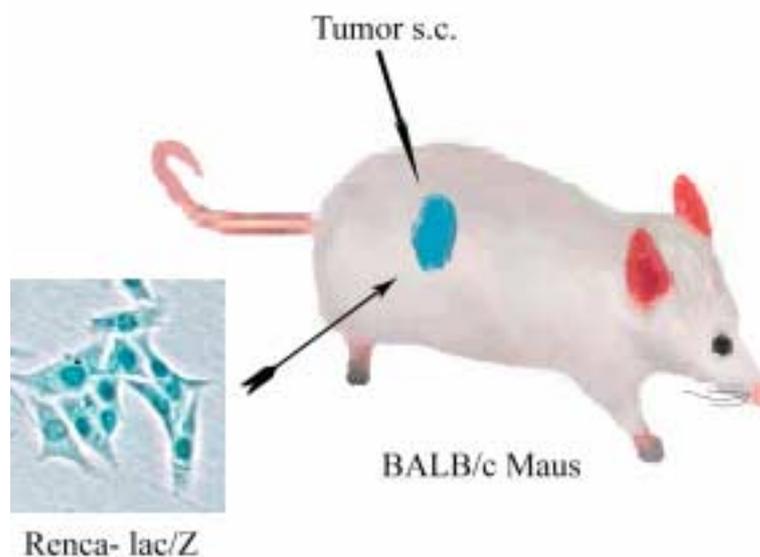


Abb. 6; Die lac/Z-transfizierte Tumorzellen wurden subcutan in die seitliche Rückenflanke der Mäuse injiziert

Die Versuchstiere wurden nach 25 Tagen betäubt und durch anschließendes Entbluten nach Genickbruch getötet. Die Tumoren und Organe wurden zur histologischen Untersuchung entnommen.

II. 7. 2 Induktion von Lungenmetastasen

Weiblichen BALB/c Mäusen wurden 1×10^5 Renca-lac/Z Zellen in die seitliche Schwanzvene in 100 μ l PBS injiziert. Die Versuchstiere wurden nach 25 Tagen betäubt und durch anschließendes Entbluten nach Genickbruch getötet. Die Lunge und die benötigten Organe wurden zur histologischen Untersuchung entnommen.

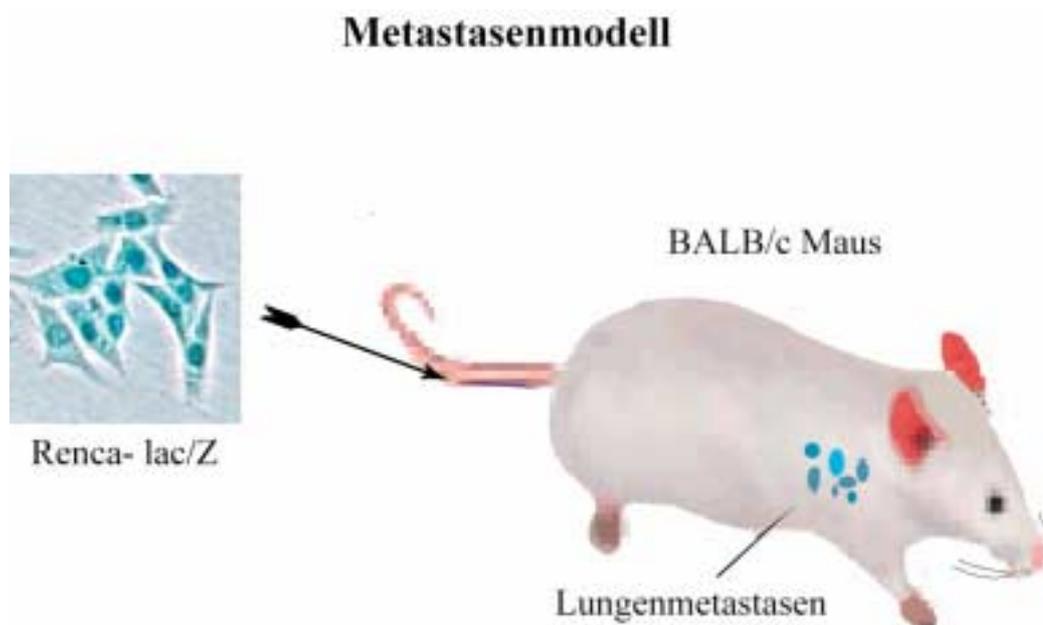


Abb. 7; Die lac/Z-transfizierten Renca-Zellen wurden in die laterale Schwanzvene (V. caudata lat.) weiblicher BALB/c Mäuse injiziert.

II. 7. 3 Behandlungsplan in den Tierversuchen

Die Behandlung der Versuchstiere wurde wie folgt durchgeführt:

Im Modell der soliden subcutan gesetzten Tumoren wurde in einem Versuch mit der Behandlung ein Tag post Tumorzellinjektion begonnen (**Versuch I**). Die Behandlungsdauer erstreckte sich über 10 aufeinanderfolgende Tage. In einem weiteren Versuch wurde mit der Behandlung der Versuchstiere am Tag 11 post Tumorzellinjektion begonnen (**Versuch II**). Die Behandlungsdauer der Versuchstiere erstreckte sich ebenfalls über 10 aufeinanderfolgende Tage.

Im Metastasenmodell wurde ebenfalls an Tag eins post Zellinjektion (**Versuch IV**) sowie am Tag 11 post Zellinjektion (**Versuch III**) mit der Behandlung wie oben begonnen.

Für die Behandlung der Versuchstiere wurden die nachstehenden Formulierungen eingesetzt:

- Kontrollgruppe: Glukoselösung 5 %
- Vergleichspräparat: Taxol[®] 12,5 mg/kg Körpergewicht in
Glukoselösung 5 %
- Kontrollliposomen: Liposomen in Glukoselösung 5 %
- Liposomen mit
Wirkstoff: liposomales Paclitaxel in Glukoselösung 5 %
Paclitaxeldosierung 12,5 mg/kg Körpergewicht

Das Injektionsvolumen für die einzelnen Tierversuche richtete sich nach der an die Liposomen gebundenen Paclitaxelkonzentration und lag zwischen 225 und 280 µl / Injektion. Für die Injektionen wurden Insulinspritzen mit einem Fassungsvermögen von 300 µl und einer Nadelgröße von 0,33 x 12,7 mm verwendet. Injiziert wurden die Präparate in die seitlichen Schwanzvenen (V. caudalis lat.) der Versuchstiere.

II. 7. 4 Auswertung der Lungen des Metastasenmodelles

Die X-Gal gefärbten Lungenmetastasen wurden unter einem Dissektionsmikroskop ausgezählt. Es wurde die Anzahl der Lungenmetastasen an der Lungenoberfläche bestimmt. Die Zählungen erfolgten in dreifacher Bestimmung.

II. 8 Auswertung der histologischen Präparate

Die histologischen Präparate wurden als Blindstudie ohne Kenntnis der statistischen Daten in den einzelnen Versuchsgruppen semiquantitativ ausgewertet. Das histologische Material wurde von je drei zufällig ausgewählten Tieren pro Versuchstiergruppe entnommen. Die Bewertung der Kriterien Angiogenese im Tumor, Nekrosen im Tumor und histopathologische Veränderungen in Leber, Niere und Milz wurden statistisch ausgewertet. Hierzu wurden die histologischen Befunde in einem Punktesystem von 0 bis 3 wie folgt bewertet.

Angiogenese im Tumor: 0: keine Vaskularisation im Tumor (Faktor VIII Färbung)

1: einzelne Gefäße im Tumor

2: deutliche Vaskularisation bis in Nekrosen

3: starke Vaskularisation des Tumors

Nekrose im Tumor: 0: keine nekrotischen Veränderungen sichtbar

1: einzelne nekrotische Zellen

2: größere nekrotische Areale, beginnende Verkalkung

3: starke Nekrosen mit Verkalkungen im Zentrum

Leberveränderungen: 0: keine Veränderungen sichtbar

1: einzelne atrophische Hepatozyten, reversibel

2: atrophische Hepatozyten, erweiterte Sinusoide,
reversibel

3: starke Leberzellatrophie

In den Grafiken wurden die Mittelwerte der Befunde und deren Standardabweichungen dargestellt.

II. 9 Liposomen, liposomales Paclitaxel

Liposomen wurden nach der Filmmethode (*Szoka F. et al.1980*) hergestellt. Lipide, 1,2-Dioleoyl-glycero-3-phosphatidylcholin (DOPC) und 1,2-Dioleoyloxy-3-(trimethylammonium) propan (DOTAP), und Paclitaxel wurden eingewogen, in Chloroform gelöst und in einen Glasrundkolben überführt. Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel unter Vakuum und unter ständigem Rotieren abgedampft, um einen gleichmäßig dünnen Lipidfilm zu erhalten. Der Lipidfilm wurde in 5 % Glucoselösung unter vorsichtigem Schwenken rehydriert. Durch eine anschließende Extrusion (Druckfiltration) durch Membranen mit einer Porengröße von 200 nm wurden unilamellare Liposomen hergestellt. Die Liposomenpräparationen wurden bei 4°C gelagert. Der Gehalt an Lipiden und Paclitaxel wurde mittels einer HPLC-Methode analysiert; die Liposomengröße (135 – 145 nm) wurde mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie bestimmt (*Szoka F. et al.1980*).

II. 10 Taxol®

Taxol® (Bristol- Myers Squibb Company; USA)

Wirkstoff:	Paclitaxel
Zusammensetzung:	1 ml Infusionslösungskonzentrat: 6 mg Paclitaxel / ml
	in: Cremophor® EL (Poly(oxyethylen)-35-Rizinusöl
	und 50.17 Vol% Ethanol

Für die täglichen Injektionen wurde die Injektionslösung stets frisch angesetzt. Taxol® wurde mit 5 %iger Glucoselösung auf die Konzentration des in den Liposomen befindlichen Paclitaxels eingestellt (12,5 mg Paclitaxel / kg Körpergewicht). Das Injektionsvolumen der Taxollösung entsprach dem der jeweils im Tierversuch verwendeten Liposomenformulierungen (250- 280 µl / Maus).

II. 11 Statistische Auswertung der Tierversuche

Die erfaßten Daten (Tumorzellen in mm^3) aus den Versuchen 1 und 2 wurden in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse auf die Wirksamkeit der eingesetzten Präparate überprüft. Zum Erhalt einer Gauß'schen Verteilung wurden alle Daten logarithmiert. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte in entlogarithmiertem Zustand.

Die Überprüfung der Signifikanz der Gruppen erfolgte mit dem WALD-Test (asymptotische Maximum-Likelihood-Methode angewendet bei fehlenden Werten).

Die Anzahlen der Lungenmetastasen aus den Versuchen 3 und 4 wurden ebenfalls in logarithmierter Form bearbeitet und entlogarithmiert grafisch dargestellt. Da es sich bei den Daten um einen Endpunkt handelte (einmalige Zählung am Ende des Versuches) wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt.

Die Berechnungen erfolgten mit BMDP Statistical Software mit freundlicher Unterstützung der AG-Biomathematik der Veterinär- Physiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

III. Resultate

Zur Evaluierung der Beeinflussung des Tumorwachstums und der Ausbildung von Lungenmetastasen der Versuchstiere wurde ein syngenes Maus-Tumormodell eingesetzt. Hierbei wurden den Tieren lac-Z transfizierte Renca- Zellen zur Induktion subcutaner Tumoren in die seitliche Rückenflanke sowie zur Induktion von Lungenmetastasen in die seitliche Schwanzvene injiziert. Die Versuchstiere wurden nach der beschriebenen Zellinjektion in Behandlungsgruppen unterteilt und mit an kationischen Liposomen gebundenem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] und Glukoselösung behandelt. Im Modell der subcutanen Tumoren wie auch im Metastasenmodell wurde mit der Behandlung ein Tag post Tumorzellinjektion bzw. an Tag elf post Tumorzellinjektion für jeweils zehn Tage begonnen.

Zur Überprüfung der Sensibilität der Tumorzelllinie Renca- lac/Z gegenüber an kationische Liposomen gebundenem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®], sowie dem Lösungsvermittler des Taxol[®] Cremophor EL[®] wurde ein Zytotoxizitätstest durchgeführt.

III. 1 Zytotoxizität

Zur Überprüfung der Zytotoxizität der im Tierversuch eingesetzten Präparate Taxol[®], liposomales Paclitaxel, Liposomen sowie Cremophor EL[®] als Lösungsvermittler des Taxol[®] auf die verwendete Tumorzelllinie wurde der MTT-Test eingesetzt. Bei diesem Test reduzieren die Mitochondrien lebender Zellen das MTT zu einem wasserunlöslichen Formazanprodukt, welches nach Lösen in Isopropanol photometrisch bestimmt werden kann.

Mittels MTT-Test wurde für die in den Tierversuchen eingesetzten Präparate folgende IC_{50} – Werte gefunden:

Taxol: IC_{50} : 6,3 ng/ml

lipos. Paclitaxel: IC_{50} : 5,5 ng/ml

Taxol[®] sowie das an kationischen Liposomen gebundene Paclitaxel zeigten in der Zellkultur deutliche zytotoxische Effekte. Im Gegensatz zu den genannten Präparaten wurden bei den Liposomen (IC_{50} : 5,5 μ g/ml) deutlich höhere Konzentrationen benötigt, um einen zytotoxischen Effekt zu erzielen. Mit den eingesetzten Konzentrationen von Cremophor EL[®] konnten keine bzw. nur sehr geringe zytotoxische Effekte erzielt werden.

III. 2 Tierversuche

Die Beeinflussung des Tumorwachstums der eingesetzten Präparate wie an kationische Liposomen gebundenes Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] und Glukoselösung wurde in einem syngenem Maus- Tumormodell getestet. Verwendet wurde eine Nierenkarzinomzelllinie (Renca-Zellen), die mit dem lac-Z/ Gen stabil transfiziert waren. Diese Zelllinie ermöglicht die Induktion subcutaner Tumoren wie auch die Induktion von Lungenmetastasen.

III. 2. 1 Tumorhistologie

Für die histopathologische Untersuchung der Tumoren wurden paraffineingebettete HE- bzw. immunhistochemisch gefärbte Schnitte herangezogen. Die X-Gal-Färbung wurde an Gefrierschnitten ausgeführt.

III. 2. 1. 1 Histologie des unbehandelten Tumors

In der histopathologischen Beurteilung der subcutanen Tumoren, hervorgerufen durch Injektion der Renca-lac/Z Zellen (5×10^6 Zellen / Tumor), zeigten sich nach 25 Tagen Wachstum der Tumoren und deren Präparation nach Tötung der Versuchstiere folgende Befunde:

Es handelte sich in allen Fällen um knotenförmig wachsende Tumoren mit nur geringer oder auch fehlender Tendenz zur Kapselbildung und dadurch bedingt, vor allem in der Unterhaut, einer Neigung zu infiltrativem Wachstum. Die Tumorzellen wiesen Pleomorphie, Anisozytose und Makrozytose auf, ihre Kerne hatten Anisokaryose, Makrokaryose und ein erhöhtes Kern / Plasma-Verhältnis erkennen lassen. Darüberhinaus lag eine mittlere bis hohe Mitoserate vor, wobei auch atypische Mitosefiguren auftraten. Das Wachstum der Tumorknoten erfolgte überwiegend solide, einige Knötchen wiesen jedoch auch eine spongiöse Struktur auf. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein Anzeichen von Regression. Häufig wiesen die Primärtumoren multiple Nekrosen auf.

Die folgenden Abbildungen zeigen Ausschnitte aus den histologischen Präparaten:

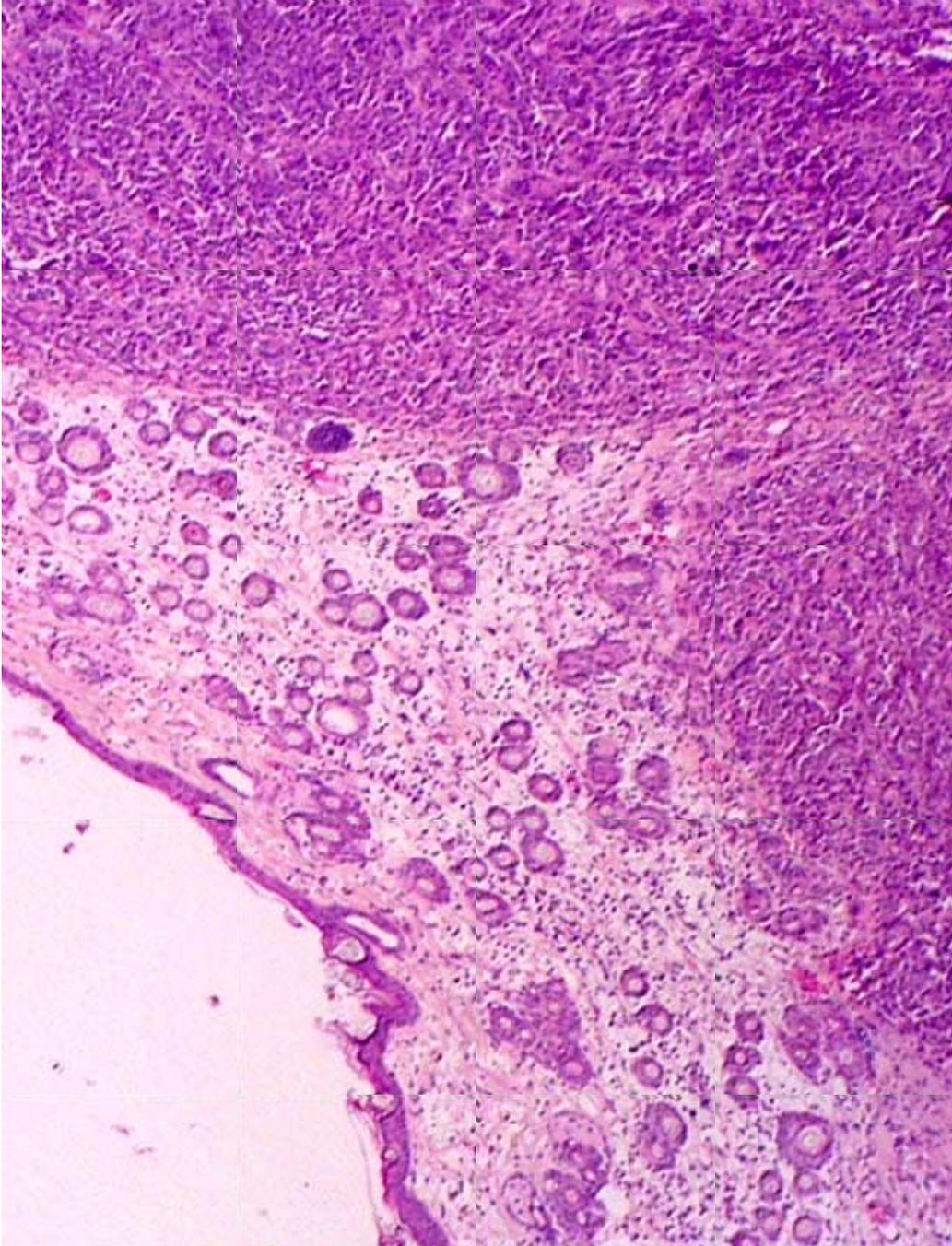
Die Abbildung 8 zeigt einen Ausschnitt eines subcutan gesetzten Tumors (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum. Das Tumorparenchym setzt sich deutlich von der Subcutis ab. Der Tumor ist nur teilweise von einer bindegewebigen Kapsel umgeben.

Die Abbildung 9 zeigt einen Ausschnitt eines subcutan gesetzten Tumors (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum. Der Übergang von Tumorparenchym zur Subcutis ist hier bindegewebig abgekapselt. Die Tumorzellen weisen eine polymorphe Gestalt auf.

Die Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt aus einem Tumor (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum der Kontrollgruppe behandelt mit 5 %iger Glukoselösung. Die Zellkerne weisen eine teilweise stark aufgelockerte Chromatinstruktur auf. Dies läßt auf die Malignität der Tumorzelllinie schließen. Ebenfalls weisen die Zellen unterschiedliche Größen auf.

Die Abbildung 11 zeigt einen subkutanen Tumor (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum aus einer Versuchstiergruppe, die mit liposomalem Paclitaxel von Tag 11 für 10 Tage behandelt wurde. In der Immunhistochemie wurden die entparaffinierten Schnitte mit einem Anti-Faktor VIII (von Willebrand-Faktor) Antikörper inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Deutlich zu sehen sind die dunkel angefärbten Gefäße in verschiedenen Anschnitten. Ebenfalls sichtbar sind Anzeichen beginnender Nekrose sowie die aufgelockerten Kernstrukturen.

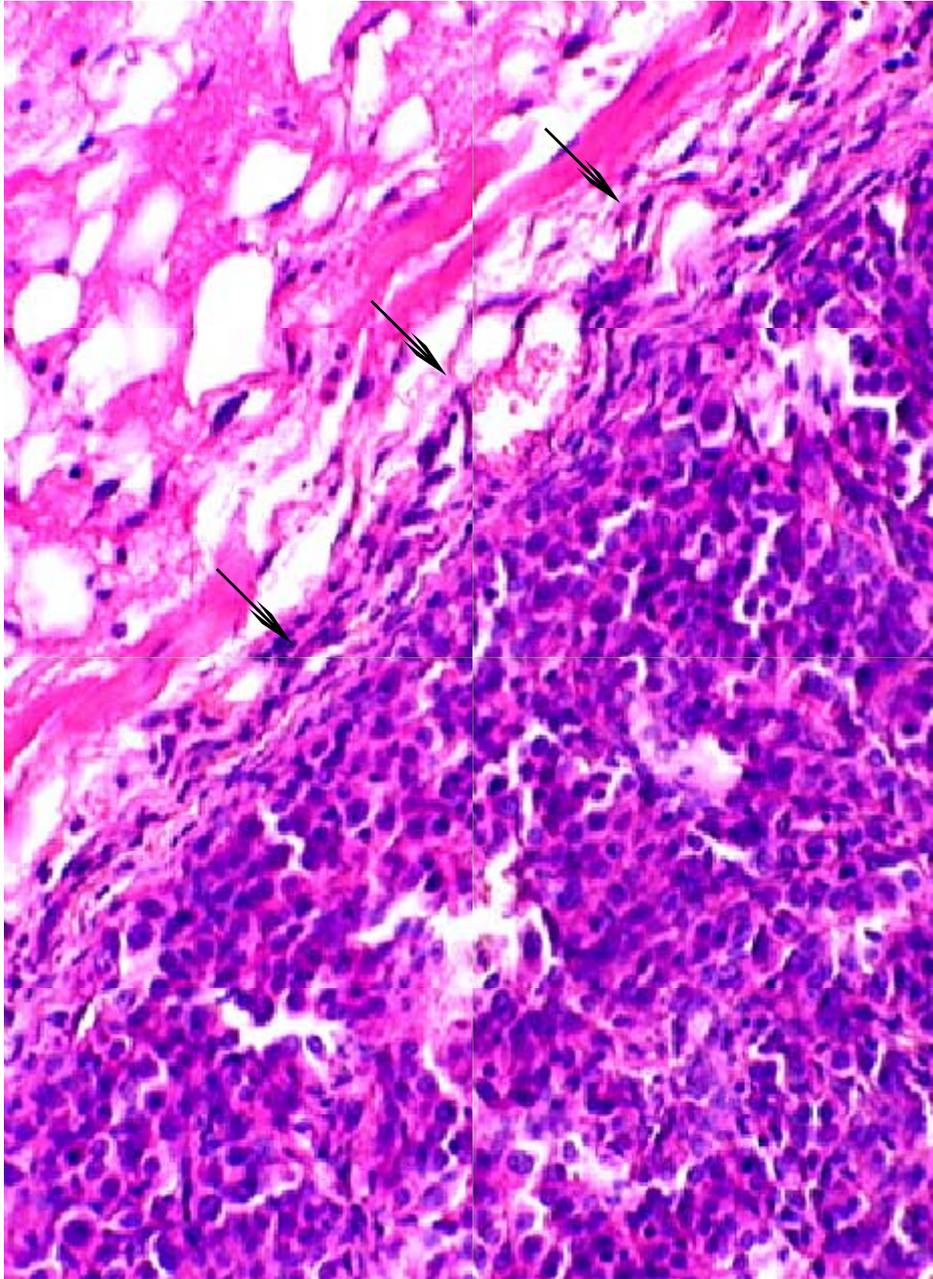
Die Abbildung 12 zeigt einen X-Gal gefärbten subkutanen Tumor (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum. β -Galactosidase positive Zellen sind an den blauen Einlagerungen zu erkennen. Die Tumorzellen in dem mit Kernechtrot gegengefärbten Präparat weisen die oben aufgeführten Befunde auf.

Abbildung 8

Die Abbildung 8 zeigt einen Ausschnitt eines subcutan gesetzten Tumors (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum. Das Tumorparenchym setzt sich deutlich von der Subcutis ab. Der Tumor ist nur teilweise von einer bindegewebigen Kapsel umgeben.

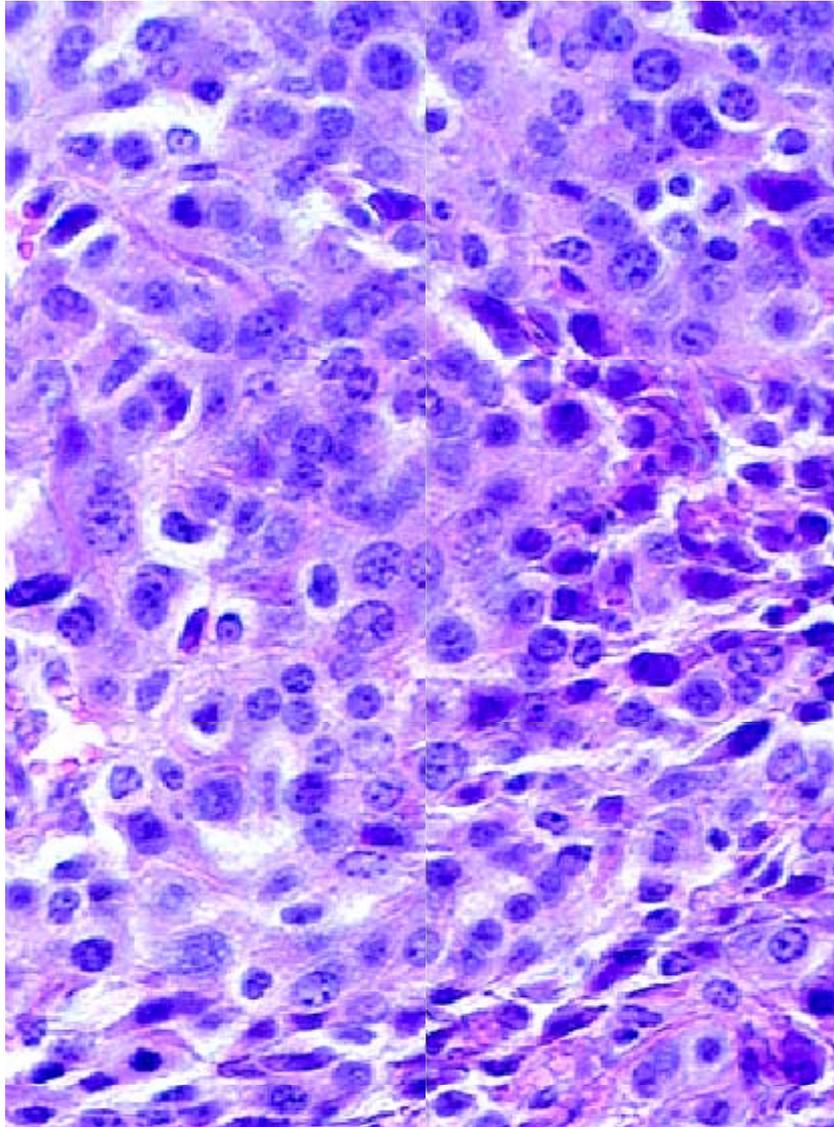
Färbung: Hämatoxylin Eosin

Abbildung 9



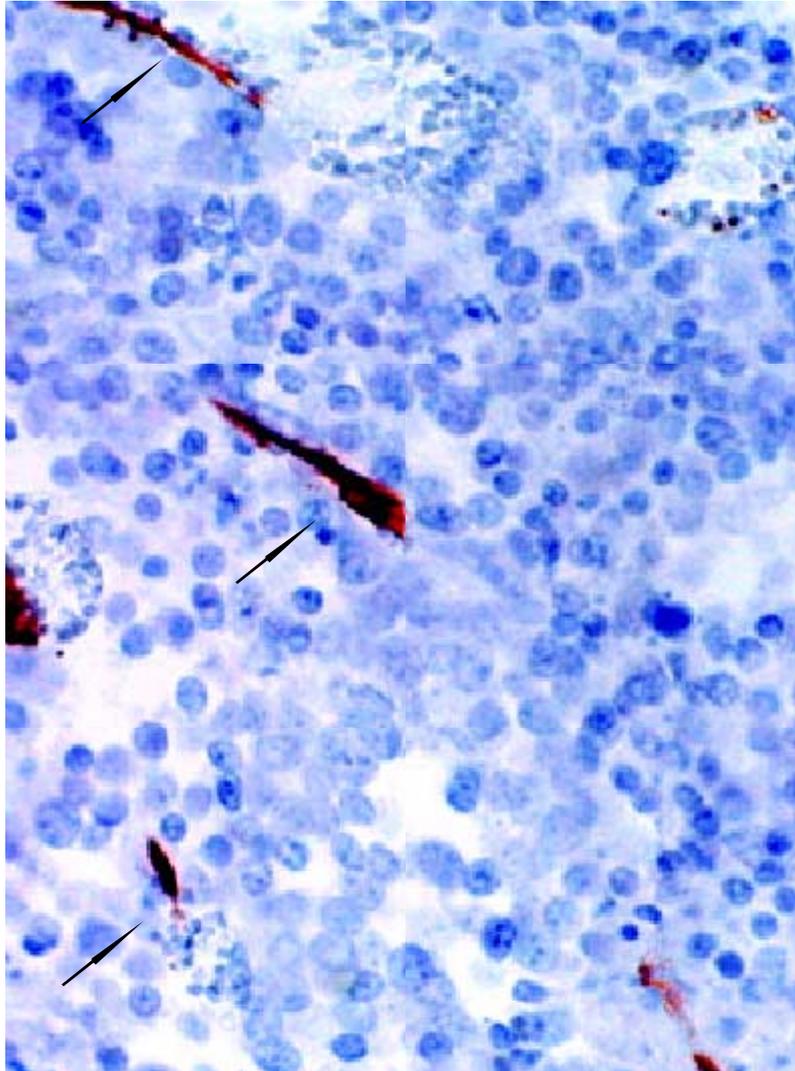
Solider Tumor: Übergang neoplastischer Zellen zur Subkutis ist teilweisebindegewebig gut abgekapselt (Pfeile). Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines subcutan gesetzten Tumors (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum. Die Tumorzellen weisen eine polymorphe Gestalt auf.

Färbung: Hämatoxylin Eosin

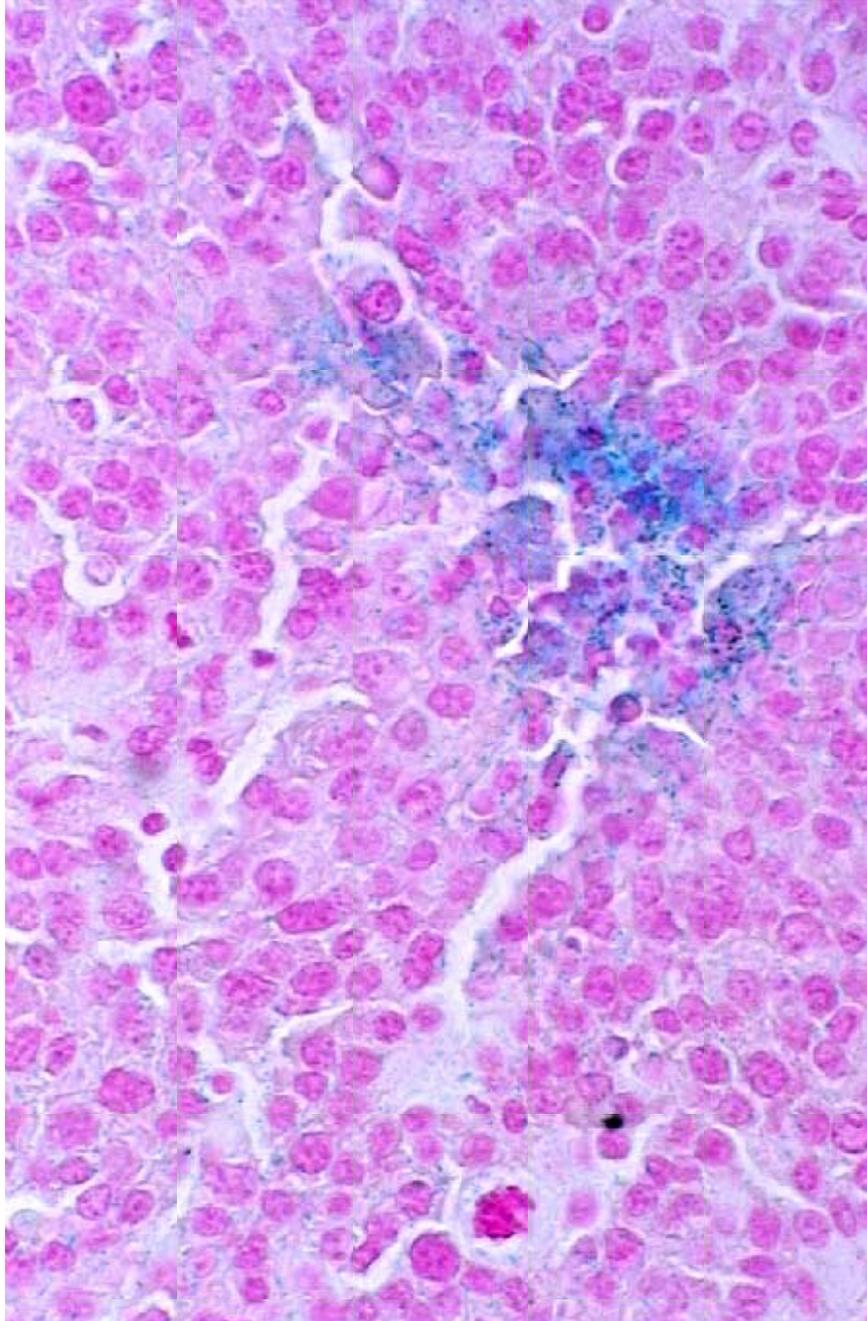
Abbildung 10

Die Abbildung 10 zeigt einen Ausschnitt aus einem Tumor (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum der Kontrollgruppe behandelt mit 5%iger Glukoselösung. Die Zellkerne weisen eine teilweise stark aufgelockerte Chromatinstruktur auf. Dies läßt auf die Malignität der Tumorzelllinie schließen. Ebenfalls weisen die Zellen unterschiedliche Größen auf.

Färbung: Hämatoxylin Eosin

Abbildung 11

Die Abbildung 11 zeigt einen subkutanen Tumor (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum aus einer Versuchstiergruppe, die mit liposomalem Paclitaxel von Tag 11 für 10 Tage behandelt wurde. In der Immunhistochemie wurden die entparaffinierten Schnitte mit einem Anti-Faktor VIII (von Willebrand-Faktor) Antikörper inkubiert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Deutlich zu sehen sind die dunkel angefärbten Gefäße in verschiedenen Anschnitten (Pfeile). Ebenfalls sichtbar sind Anzeichen beginnender Nekrose, sowie die aufgelockerten Kernstrukturen.

Abbildung 12

Die Abbildung 12 zeigt einen X-Gal gefärbten subkutanen Tumor (Renca-lac/Z) nach 25 Tagen Wachstum. β -Galactosidase positive Zellen sind an den blauen Einlagerungen zu erkennen. Die Tumorzellen in dem mit Kernechtrot gegengefärbten Präparat weisen polymorphe Chromatinstrukturen auf.
Färbung: lac-Z; Gegenfärbung: Kernechtrot

III. 2. 2 Subcutane Tumoren, Injektion von 5×10^6 Zellen s.c.,

Behandlungsbeginn am Tag eins post Zellinjektion

Versuch I

Zur Induktion subcutaner Tumoren wurden den Versuchstieren 5×10^6 Renca-lac/Z-Zellen in die seitliche Rückenflanke injiziert. Die Versuchstiere wurden in Gruppen zu je sechs Mäusen geteilt und mit liposomalem Paclitaxel, Liposomen, Taxol® und Glukoselösung behandelt. Mit der Behandlung wurde einen Tag post Tumorzellinjektion für eine Dauer von zehn Tagen begonnen. Nach 25 Tagen Versuchsdauer wurden die Tiere getötet und die Tumoren entnommen.

III. 2. 2. 1 Statistische Auswertung des Tumorummens

Wie aus der folgenden grafischen Darstellung ersichtlich, zeigte das Tumorummwachstum in den einzelnen Behandlungsgruppen folgende Tendenz:

Eine erkennbare Wachstumseinschränkung gegenüber der mit Glukoselösung behandelten Kontrollgruppe zeigte sich bei der mit liposomalem Paclitaxel behandelten Versuchsgruppe zwischen Tag sechs und neun. Ebenfalls konnten Differenzen in der Tumorummwachstumzunahme in der mit Liposomen behandelten Gruppe (Tag sechs bis Tag neun) und der mit Taxol behandelten Gruppe (Tag sechs bis Tag zwölf) im Vergleich zu der mit Glukose behandelten Kontrollgruppe beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Beobachtungszeit der Tiere blieb der Volumenunterschied erhalten, sodaß die besten Behandlungserfolge mit liposomalem Paclitaxel erreicht werden konnten.

Ein weitgehend gleiches Tumorummwachstum wurde mit dem Einsatz von Taxol und Liposomen erreicht.

Kriterium zum Abbruch des Tierversuches war das Auftreten von Ulzerationen an den Tumoren der Versuchstiere. Diese traten in den letzten Tagen der Versuche vereinzelt auf.

Versuch 1

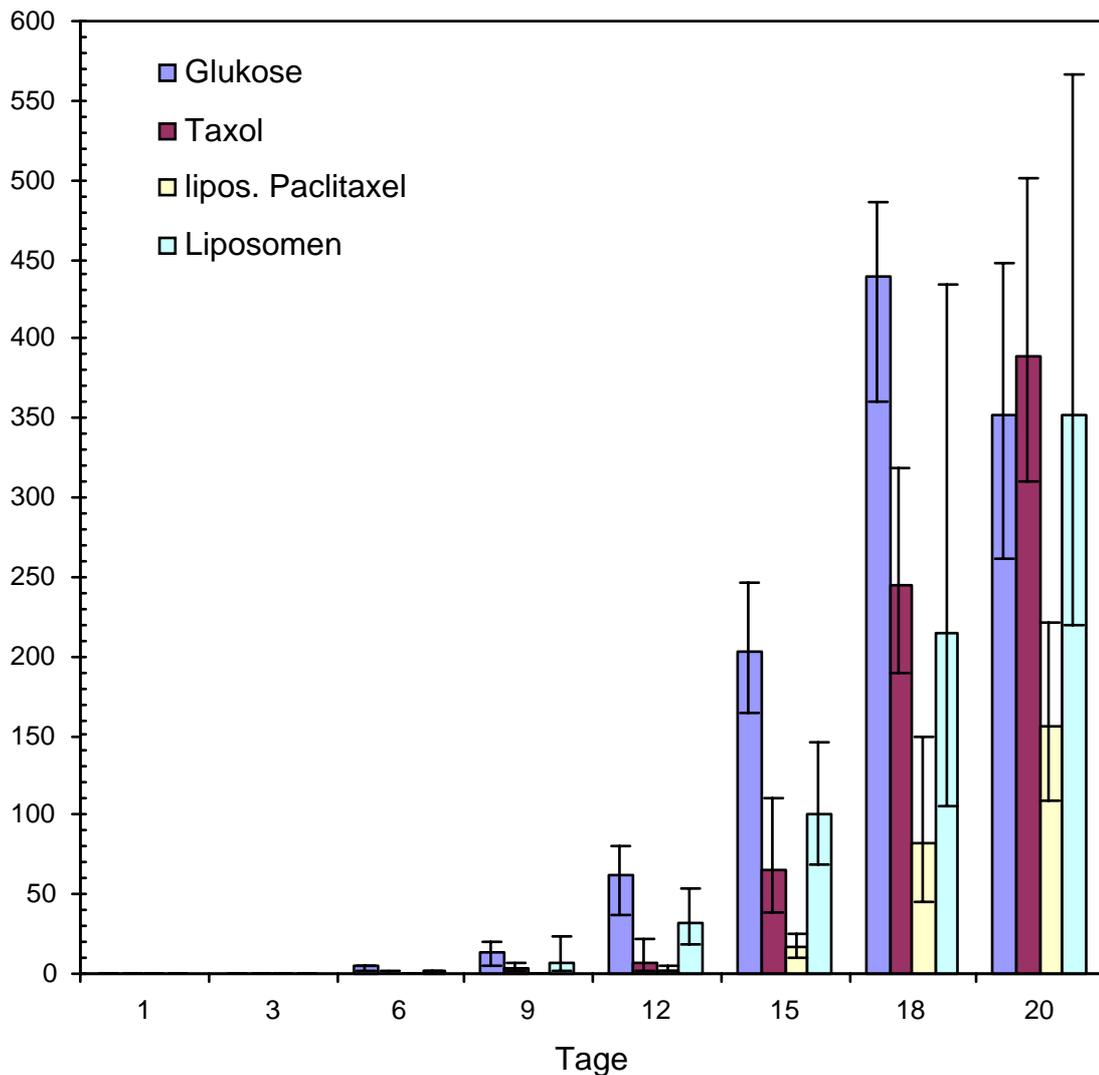
Tumor-
volumen
in mm³

Abb. 13; Auswertung der Tumorzumina. Ausgewertet wurde das Tumorzumina (mm³) nach Injektion von 5×10^6 Renca-lac/Z Zellen s.c. und Behandlung der Gruppen mit liposomalem Paclitaxel, Taxol[®], Liposomen und Glukoselösung im Verlauf des Tierversuches durch Messung alle drei Tage. Behandlungsbeginn der Tiere war Tag 1 post Zelinjektion, die Konzentration des Paclitacels lag bei 12,5 mg/kg. Die erfassten Daten wurden logarithmisch transformiert zur Errechnung der Mittelwerte und des Standardfehlers. Darstellung der Daten entlogarithmiert.

Die Signifikanz der Gruppenunterschiede zwischen Taxol[®], liposomalem Paclitaxel und Liposomen beträgt: $p < 0,001$ (WALD- Test).

Versuch 1

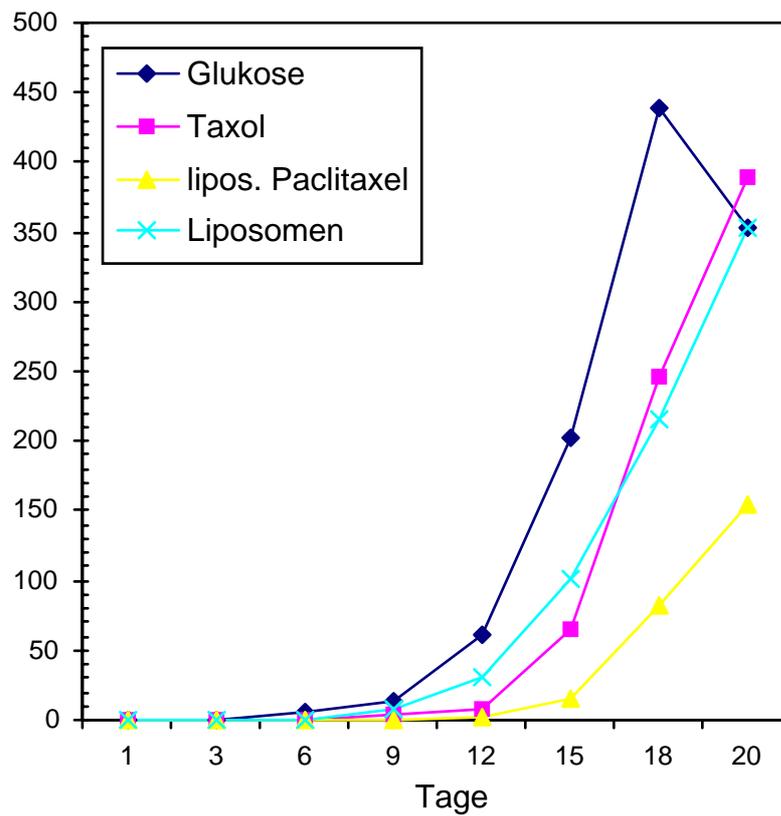
Tumor-
volumen
in mm³

Abb. 14; Darstellung des Tumolvolumens (mm³) im zeitlichen Verlauf: Auf Grund der Überlappungen wurde auf eine Darstellung des Standardfehlers in dieser Grafik verzichtet. Der Abfall der Kontrollgruppe (Glukose) ist bedingt durch entstandene Nekrosen und Aufbrechen einzelner Tumoren mit Volumenverlust. Versuchsaufbau siehe Legende Abb. 13.

Tumorzellenreduktion der eingesetzten Präparate in Bezug auf Taxol®

Tage	LIPOS. PACLITAXEL	LIPOSOMEN
1	0 %	0 %
3	0 %	0 %
6	50 %	keine Reduktion
9	84 %	keine Reduktion
12	69 %	keine Reduktion
15	75 %	keine Reduktion
18	67 %	12 %
20	60 %	10 %

Tab. 1; Reduktion der Tumorzellen unter Behandlung, bezogen auf die mit Taxol® behandelte Versuchstiergruppe aus Versuch 1:

Ausgewertet wurde das Tumorzellen (mm³) nach Injektion von 5x10⁶ Renca- lac/Zellen s.c. und Behandlung der Gruppen mit liposomalem Paclitaxel, Taxol®, Liposomen und Glukoselösung im Verlauf des Tierversuches durch Messung alle drei Tage. Behandlungsbeginn der Tiere war Tag 1 post Zelleninjektion, die Konzentration des Paclitaxels lag bei 12,5 mg/kg.

III. 2. 2 Histologie

In dem Versuch I (Behandlungsbeginn der Versuchstiere an Tag eins post Tumorzelleninjektion für die folgenden zehn Tage mit Glukoselösung 5%ig (Kontrolle), liposomalem Paclitaxel, Liposomen und Taxol®) zeigte sich die ausgeprägteste Nekroseneigung in den Gruppen der mit Liposomen sowie an kationischen Liposomen gebundenem Paclitaxel behandelten Tieren. Es bestand in der Nekrosebildung jedoch nur ein geringer Unterschied zu den mit Taxol behandelten Tieren. Die mit Glukoselösung behandelten Versuchstiere zeigten im histologischen Bild die geringste Neigung zu Nekrosen.

Mittelwert der
Veränderungen

Histopathologische Auswertung Versuch I

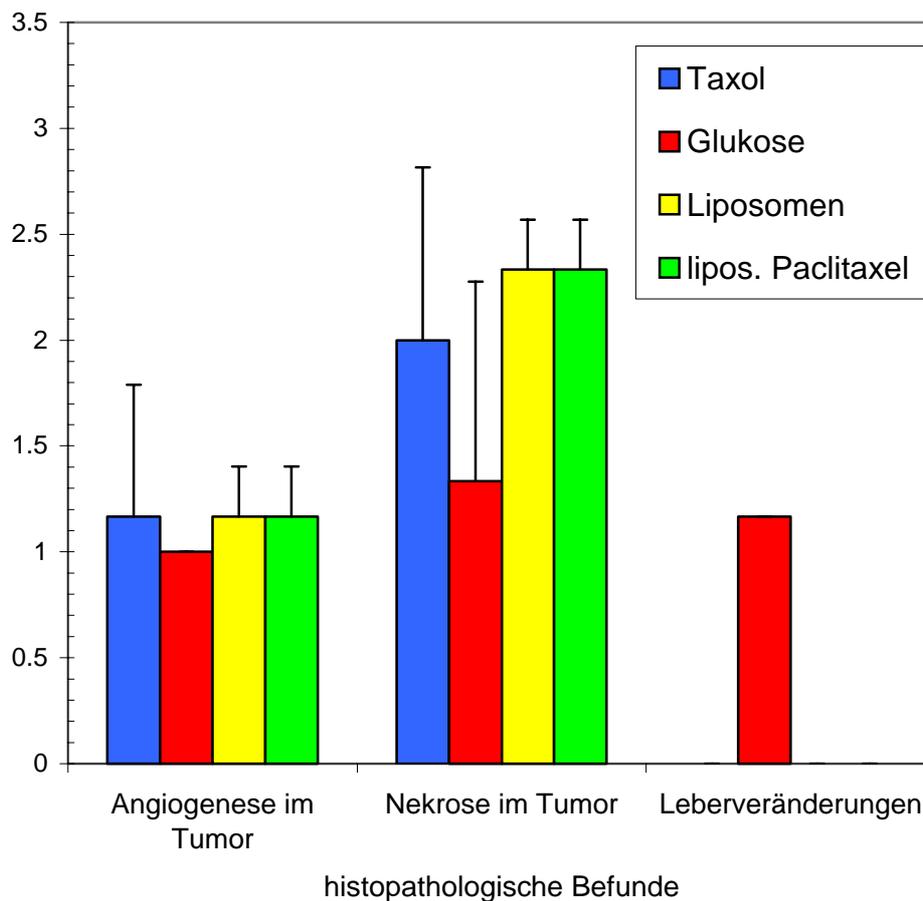


Abb. 15 Statistische Erfassung der histopathologischen Kriterien Angiogenese in den Tumoren, Nekrose in den Tumoren sowie Leberveränderungen. Die histologischen Präparate wurden quantitativ mikroskopisch ausgewertet und die gefundenen Veränderungen auf einer Skala von 0 bis 3 festgehalten. Aus jeder Behandlungsgruppe wurden von drei zufällig ausgewählten Tieren die Präparate angefertigt.

Die Angiogenese erschien in der mikroskopischen Beurteilung am ausgeprägtesten in den mit den beiden Liposomenformulierungen behandelten Gruppen. Die Unterschiede zwischen allen vier Gruppen waren jedoch nur minimal.

Die histologisch untersuchten Ausscheidungsorgane wie Niere sowie die Milz wiesen keine histopathologischen Veränderungen auf. In den Lebern der mit Glukose behandelten Versuchstiergruppe wurden geringgradig erhöhte Lymphozytenansammlungen gefunden.

III. 2. 3 Subcutane Tumoren, Injektion von 5×10^6 Zellen s.c., Behandlungsbeginn an Tag elf post Zellinjektion

Versuch II

Zur Induktion subcutaner Tumoren wurden den Versuchstieren 5×10^6 Renca-lac/Z-Zellen in die seitliche Rückenflanke injiziert. Die Versuchstiere wurden in Gruppen zu je sechs Mäusen geteilt und mit liposomalem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] und Glukoselösung behandelt. Mit der Behandlung wurde zehn Tage post Tumorzellinjektion für eine Dauer von zehn Tagen begonnen. Nach 25 Tagen Versuchsdauer wurden die Tiere getötet und die Tumoren entnommen.

III. 2. 3. 1 Statistische Auswertung des Tumorummens

Versuch 2

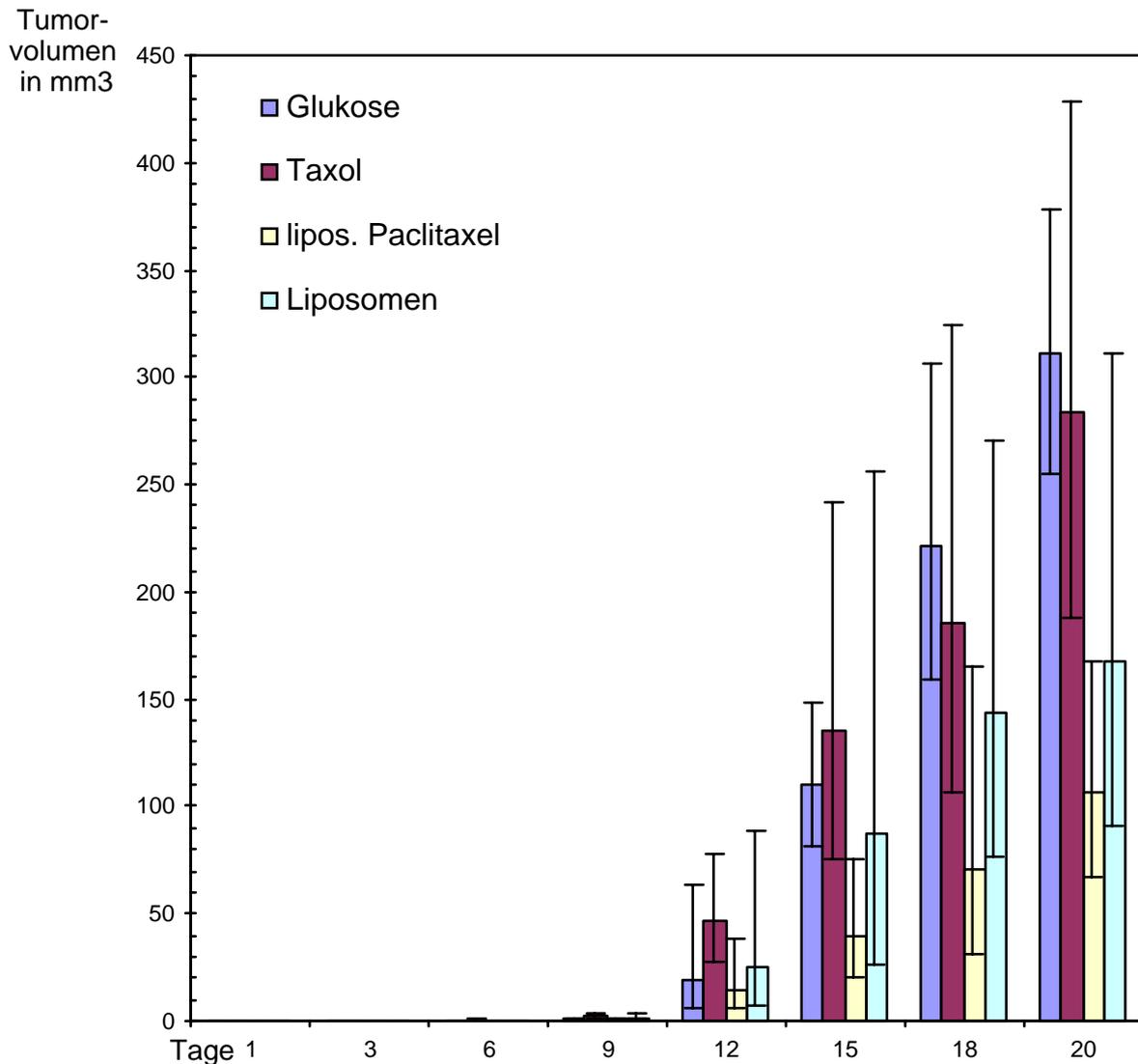


Abb. 16; Auswertung der Tumorummina. Ausgewertet wurde das Tumorummen (mm³) nach Injektion von 5×10^6 Renca-lac/Z Zellen s.c. und Behandlung der Gruppen mit liposomalem Paclitaxel, Taxol[®], Liposomen und Glukoselösung im Verlauf des Tierversuches durch Messung alle drei Tage. Behandlungsbeginn der Tiere war Tag 11 post Zelinjektion, die Konzentration des Paclitacels lag bei 12,5 mg/kg. Die erfaßten Daten wurden logarithmisch transformiert zur Errechnung der Mittelwerte und des Standardfehlers. Darstellung der Daten entlogarithmiert.

Die Signifikanz der Gruppenunterschiede zwischen Taxol[®], liposomalem Paclitaxel und Liposomen beträgt: $p < 0,001$ (STUDENT T-Test).

Wie aus der grafischen Darstellung ersichtlich, zeigte das Tumorwachstum in den einzelnen Behandlungsgruppen folgende Tendenz:

Die Differenzierung der Tumolvolumenzunahme trat zwischen Behandlungsbeginn (Tag 11) und Tag 15 in allen vier Gruppen auf.

Das Tumorwachstum blieb am geringsten in der Versuchsgruppe, die mit liposomalem Paclitaxel behandelt wurde. Wiederum wurde eine Wachstumsreduktion in der mit Liposomen behandelten Versuchstiergruppe beobachtet.

Bedingt durch ein Auftreten von Ulzerationen an den Tumoren der Versuchstiere mußte der Tierversuch bereits nach 20 Tagen abgebrochen werden, um die Tiere nicht zu stark zu belasten.

Tumolvolumenreduktion der eingesetzten Präparate in Bezug auf Taxol[®]

Tage	LIPOS. PACLITAXEL	LIPOSOMEN
1	0 %	0 %
3	0 %	0 %
6	40 %	40 %
9	52 %	18 %
12	69 %	47 %
15	70 %	34 %
18	62 %	23 %
20	62 %	41 %

Tab. 2; Reduktion der Tumolvolumen unter Behandlung, bezogen auf die mit Taxol[®] behandelte Versuchstiergruppe aus Versuch 2:

Ausgewertet wurde das Tumolvolumen (mm³) nach Injektion von 5x10⁶ Renca-lac/Z Zellen s.c. und Behandlung der Gruppen mit liposomalem Paclitaxel, Taxol[®], Liposomen und Glukoselösung im Verlauf des Tierversuches durch Messung alle drei Tage. Behandlungsbeginn der Tiere war Tag 11 post Zellinjektion, die Konzentration des Paclitacels lag bei 12,5 mg/kg.

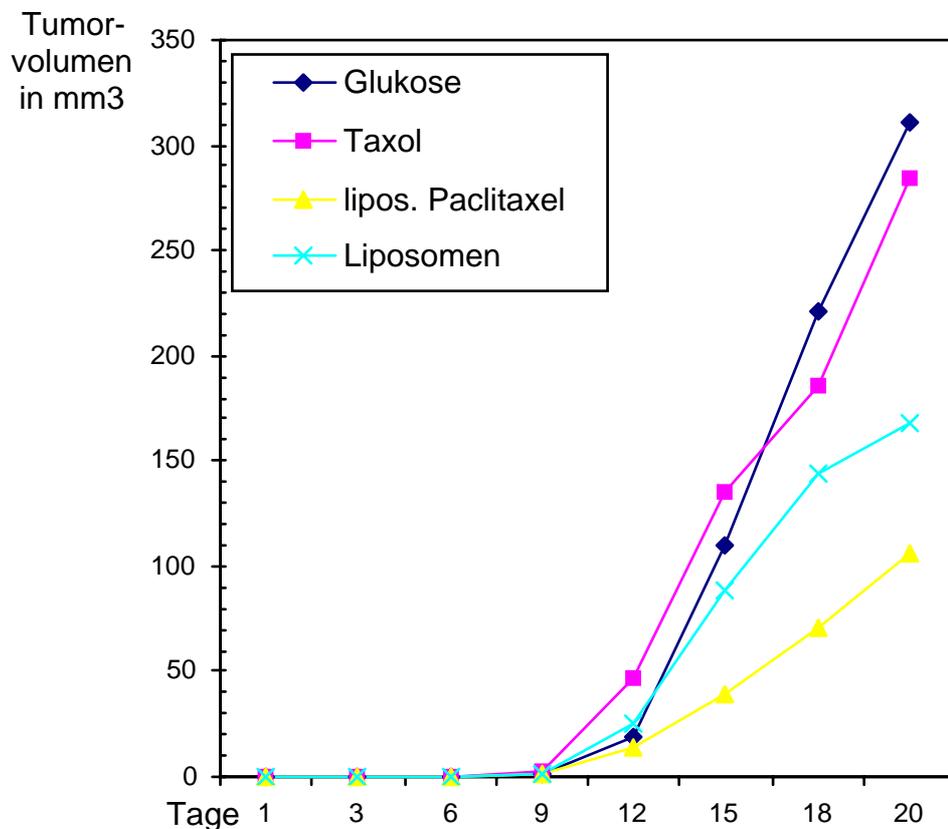


Abb 17; Tumorzellen im zeitlichen Verlauf. Bedingt durch die Überlappung der Standardfehler wurde bei dieser Grafik auf eine Darstellung verzichtet. Die Werte entsprechen der Abb. 16.

III. 2. 3. 2 Histologie

In dem Versuch II (Behandlungsbeginn der Versuchstiere an Tag elf post Tumorzellinjektion) zeigte sich eine leicht erhöhte Nekroseneigung bei der Behandlung der Versuchstiere mit liposomalem Paclitaxel. Der Unterschied zu den übrigen Gruppen war jedoch nur sehr gering.

Im Hinblick auf die Angiogenese waren keine deutlichen Unterschiede bei der Auswertung der immunhistologischen Präparate in den mit an kationischen Liposomen

gebundenem Paclitaxel, Liposomen und Taxol behandelten Versuchstiergruppen zu finden.

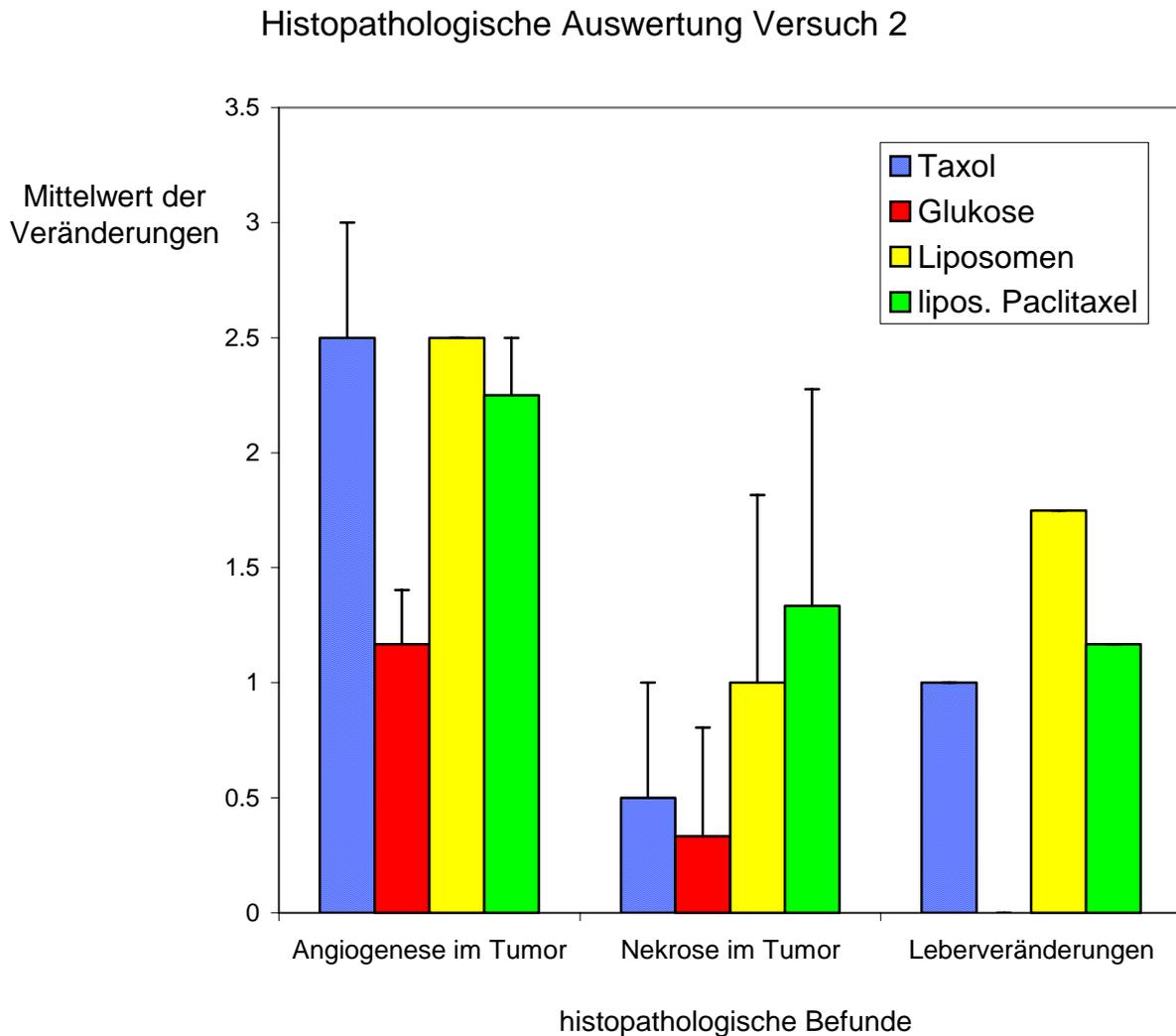


Abb. 18 Statistische Erfassung der histopathologischen Kriterien Angiogenese in den Tumoren, Nekrose in den Tumoren sowie Leberveränderungen. Die histologischen Präparate wurden quantitativ mikroskopisch ausgewertet und die gefundenen Veränderungen auf einer Skala von 0 bis 3 festgehalten. Aus jeder Behandlungsgruppe wurden von drei zufällig ausgewählten Tieren die Präparate angefertigt.

In den mit Liposomen sowie mit liposomalem Paclitaxel behandelten Tiergruppen zeigten sich in der Leber der Tiere häufiger Leberzellatrophien als sie in den mit Taxol oder Glukose behandelten Gruppen gefunden wurden. Jedoch ist der Grad der Atrophien noch als reversibel zu erachten.

Die sonstigen untersuchten Organe wie Niere und Milz wiesen keine histopathologischen Veränderungen auf.

III. 3. Metastasenmodell

III. 3. 1 Metastasenmodell, Injektion von 1×10^5 Zellen i.v., Behandlungsbeginn ab Tag elf post Zellinjektion

Versuch III

In den Versuchstieren wurden durch intravenöse Injektion von 1×10^5 Renca- lac/Z Zellen Lungenmetastasen induziert. In diesem Versuch wurden die Tiere in Gruppen zu je sechs Tieren geteilt. Mit der Behandlung der Tiere wurde am Tag elf nach der Zellinjektion begonnen. Je eine Gruppe wurde mit liposomalem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] und Glukoselösung für zehn Tage behandelt. Nach insgesamt 25 Tagen Versuchsdauer wurden die Mäuse getötet und ihre Lungen isoliert.

III. 3. 1. 1 Makroskopische Beurteilung

Nach der Färbung der Lungen der Versuchstiere wurden folgende Ergebnisse gefunden: An der dorsalen und ventralen sowie an den interlobularen Lungenflächen wurden in der Kontrollgruppe multiple, teils stecknadelkopfgröße, teils solide, teils konfluierende dunkelgrün gefärbte, über die Lungenoberfläche erhabene Metastasen gesehen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe wurden in allen anderen Behandlungsgruppen disseminierte, teils stecknadelspitz bis stecknadelkopfgröße, runde, über die Lungenoberfläche erhabene grüingefärbte Metastasen gefunden, die sich ebenfalls an der ventralen, dorsalen und an den interlobulären Flächen befanden.

Die Anzahl der gezählten Metastasen betrug in der mit 5%iger Glukoselösung behandelten Kontrollgruppe 305, in der mit liposomalem Paclitaxel (12,5 mg/kg) behandelten Gruppe 62, in der mit Liposomen behandelten Gruppe 83 und in der mit Taxol[®] (12,5 mg/kg Paclitaxel) behandelten Gruppe 37 und ist aus der Grafik (Abb. 19) ersichtlich. Die Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen waren ausgenommen

der Kontrollgruppe nicht signifikant. Es ist jedoch zu bemerken, daß in der mit Taxol behandelten Versuchstiergruppe die geringste Anzahl an Metastasen gezählt wurde. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde keine Beeinträchtigung des Wohlbefindens und der Vitalfunktionen der Versuchstiere beobachtet.

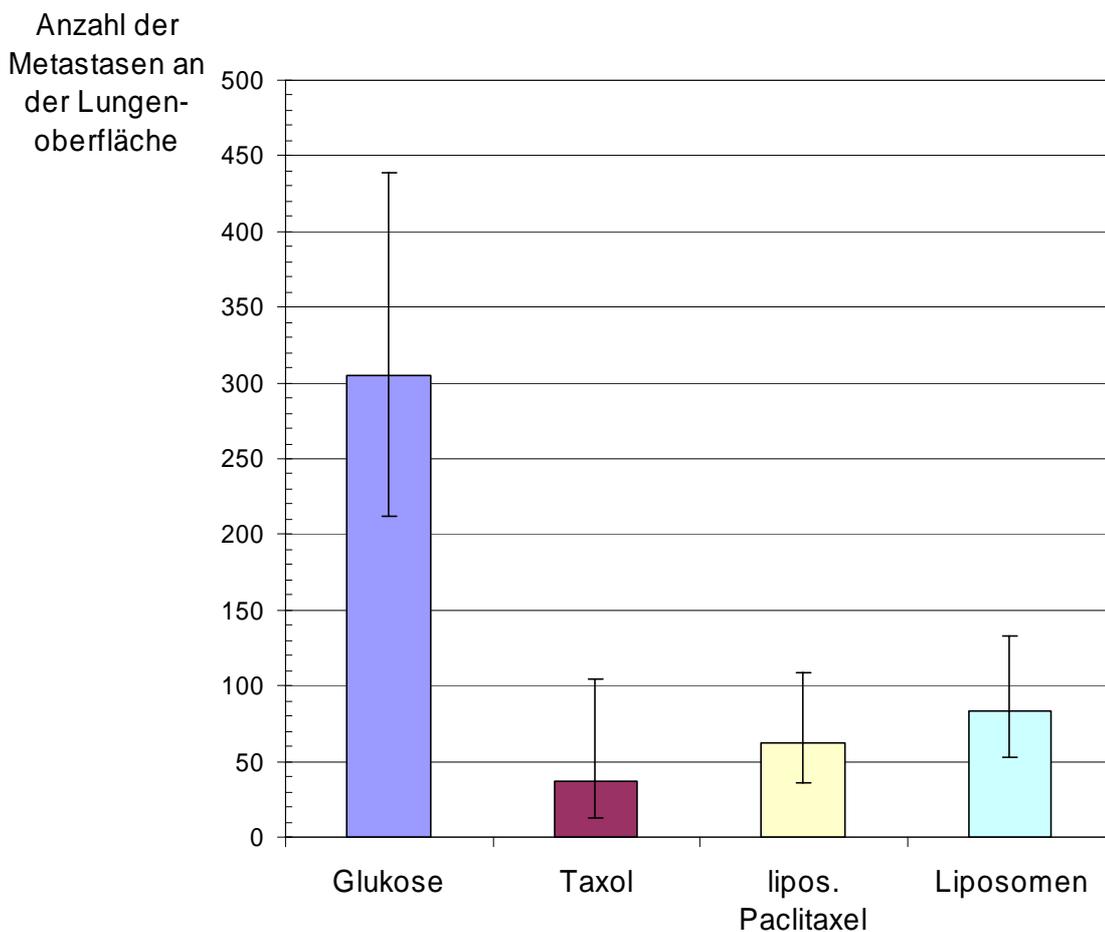
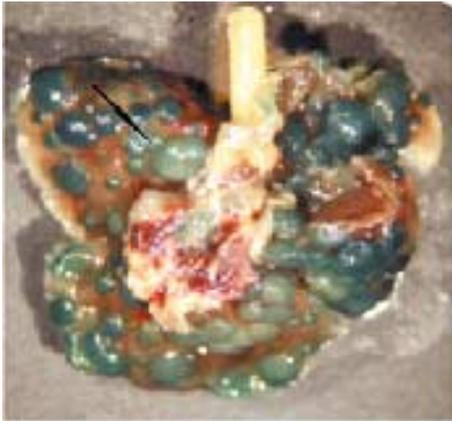


Abb. 19; Anzahl der Lungenmetastasen an der Lungenoberfläche. Zählung der Lungenmetastasen an der Lungenoberfläche nach X-Gal-Färbung. Behandlung der Versuchstiergruppen mit liposomalem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] und Glukopselösung. Gefundene Metastasen: Glukose 305, Taxol[®] 37, liposomales Paclitaxel 62 und Liposomen 83. Konzentration des Paclitaxels in Taxol[®] und liposomalem Paclitaxel 12,5 mg/kg. Behandlungsbeginn an Tag 11 post Tumorzellinjektion für 10 aufeinanderfolgende Tage. Die Anzahl der Metastasen wurde für die statistische Auswertung logarithmiert. Darstellung der Werte entlogarithmiert. Die Unterschiede der Behandlungsgruppen: Taxol[®], liposomales Paclitaxel und Liposomen waren nicht signifikant ($p < 0,45$).

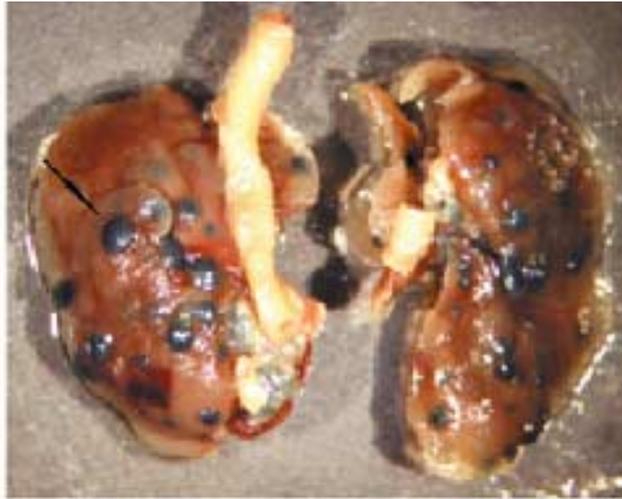
Abbildung 20

Metastasenmodell

Glukose



Liposomen



liposomales Paclitaxel



Taxol®

Lungen aus Versuch 3 (Induktion von Lungenmetastasen durch Injektion von 1×10^5 Renca-lac/Z Zellen i.v. in die seitliche Schwanzvene der Mäuse) Pfeile: X-Gal gefärbte Metastasen, deutlich von dem Lungenparenchym zu unterscheiden.

III. 3. 1. 2 Histologie

In den histologischen Präparaten der Lungen waren vereinzelte Nekrosen in den Metastasen zu sehen. Ein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen war nicht feststellbar. Auch im Hinblick auf die Angiogenese waren keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen erkennbar.

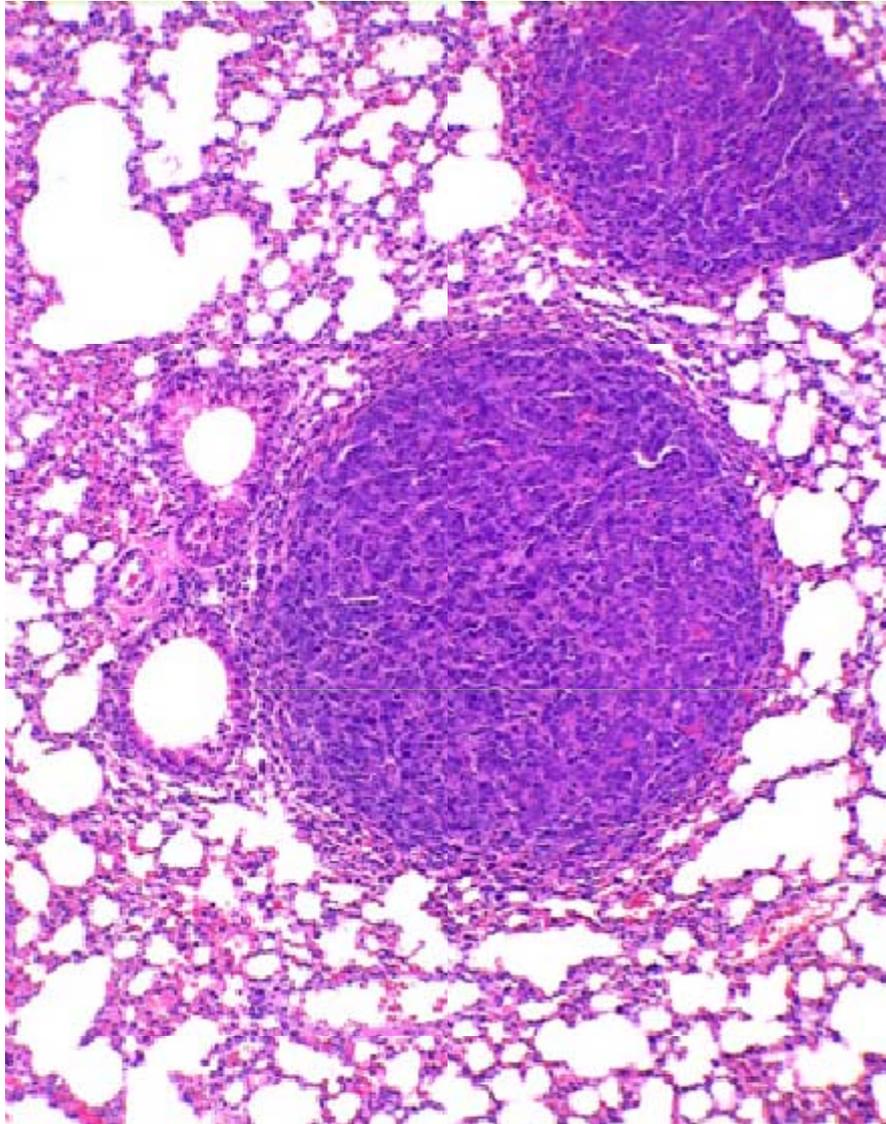
In der mit liposomalem Paclitaxel behandelten Versuchsgruppe wiesen die Lebern häufiger Leberzellatrophien auf. Das Ausmaß der Atrophie der Leberzellen ist als reversibel zu erachten.

In Niere und Milz aller Versuchstiere dieser Gruppe waren keine histopathologischen Veränderungen sichtbar.

Die folgenden Abbildungen 21 bis 23 zeigen die Lage der Lungenmetastasen im Parenchym (Abb. 21 u. 22), sowie die Anfärbung der Tumorzellen nach X-Gal-Färbung.

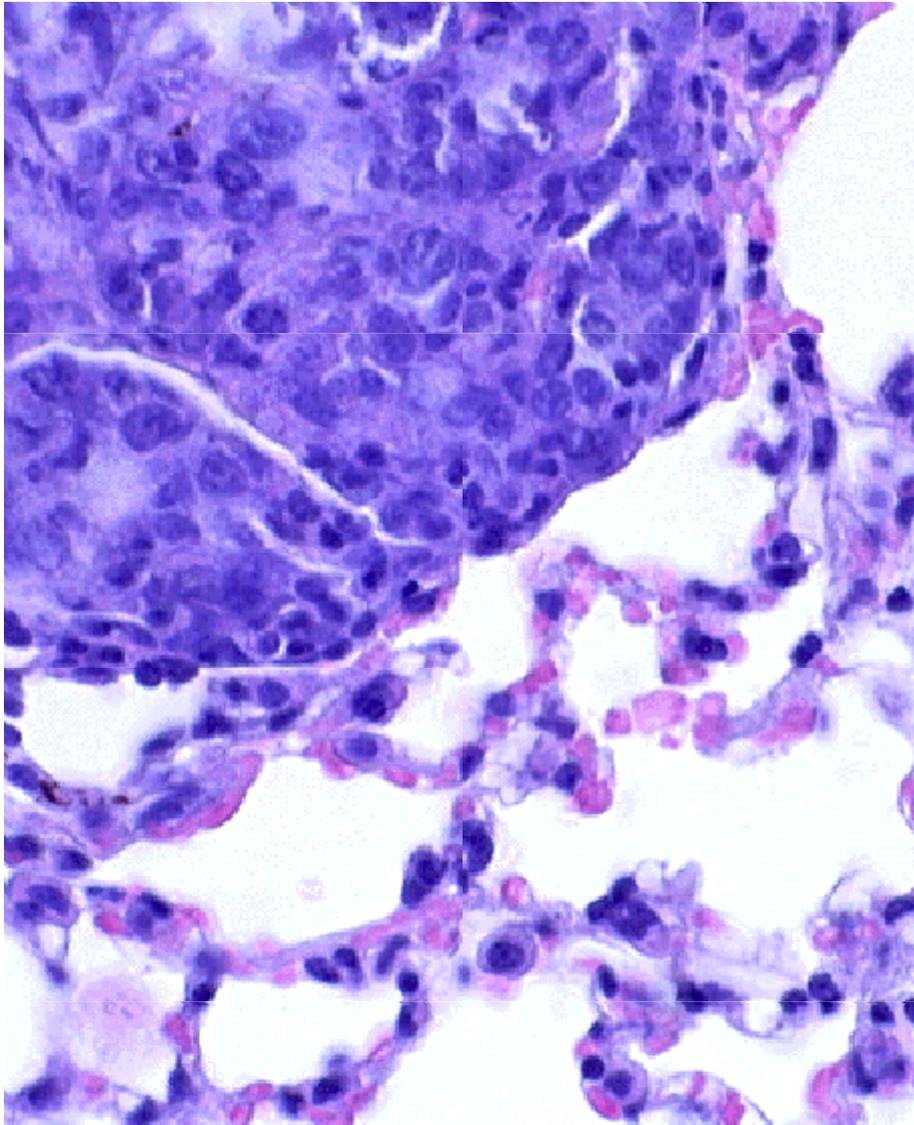
Die histologischen Präparate der Abbildungen 21 und 22 wurden von paraffineingebetteten Hämatoxylin / Eosin gefärbten Schnitten gemacht. Abbildung 23 stellt einen Gefrierschnitt, der anschließend X-Gal gefärbt wurde, dar. Das Tumorstadium wurde durch die intravenöse Injektion von 1×10^5 Renca-lac/Z- Zellen induziert.

Abbildung 21

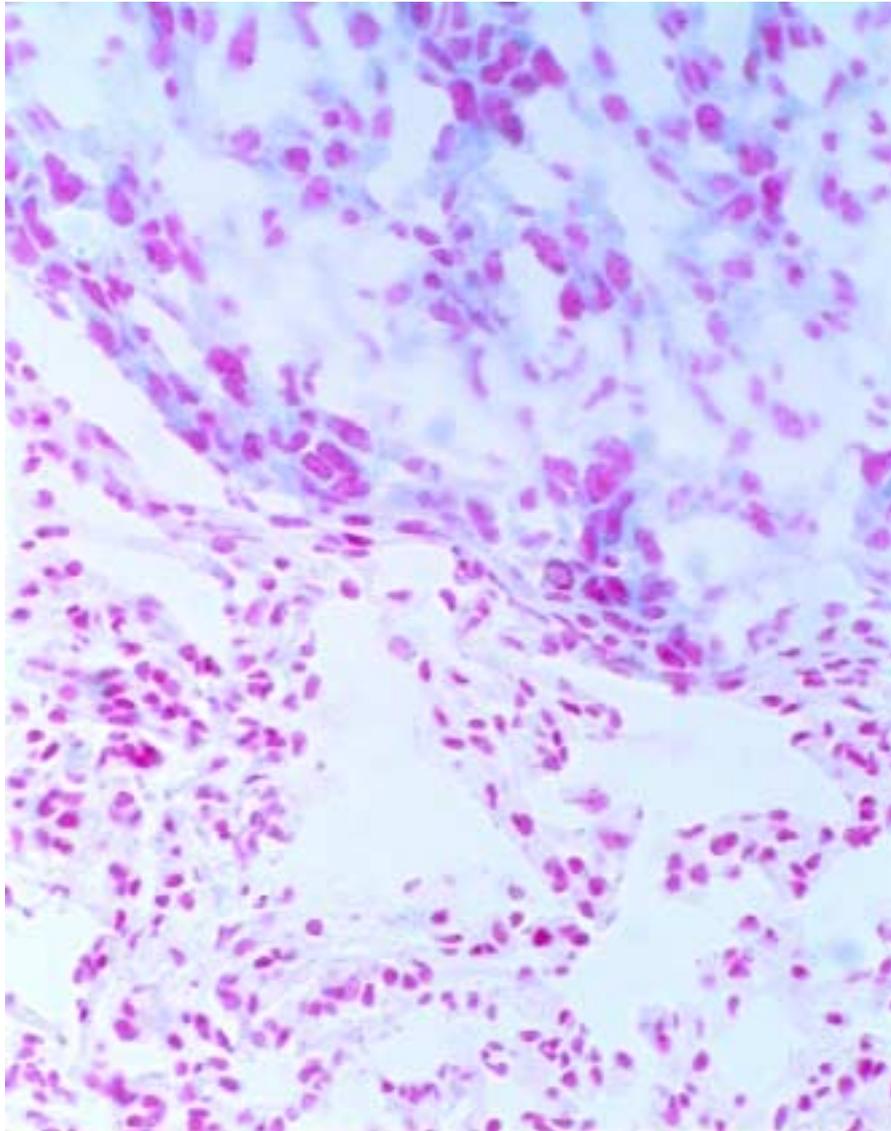


Die Abbildung 21 zeigt eine Übersicht der Lage der Metastasen im Lungengewebe. Die Metastasen liegen abgegrenzt im Lungenparenchym und zeigen in ihrem Zentrum das Bild einer beginnenden Nekrose. Die Lunge stammt aus einem Versuchstier der mit Glukoselösung behandelten Kontrollgruppe.

Färbung: Hämatoxylin Eosin

Abbildung 22

Die Lungenmetastase in dieser Abbildung stammt aus einer Maus der mit Glukoselösung behandelten Kontrollgruppe. Die Tumorzellen sind zu dem umgebenden Lungenparenchym deutlich abgrenzbar. Zudem sind neoplastische pleomorphe Epithelien mit deutlichen Zellgrenzen und pleomorphen Nuklei zu finden.
Färbung: Hämatoxylin Eosin

Abbildung 23

Die Abbildung 23 zeigt in der Vergrößerung eine Lungenmetastase nach X-Gal Färbung. Einzelne Tumorzellen weisen blaue Einlagerungen im Zytoplasma auf (β -Galaktosidase positiv). Es ist eine beginnende Nekrose des Tumorgewebes zu finden.
Färbung: lac-Z; Gegenfärbung: Kernechtrot

III. 3. 2 Metastasenmodell, Injektion von 1×10^5 Zellen i.v.,

Behandlungsbeginn ab Tag eins post Zellinjektion

Versuch IV

In den Versuchstieren wurden durch intravenöse Injektion von 1×10^5 Renca-lac/Z Zellen Lungenmetastasen induziert. In diesem Versuch wurden die Tiere in Gruppen zu je sechs Tieren geteilt. Mit der Behandlung der Tiere wurde am Tag eins nach der Zellinjektion begonnen. Je eine Gruppe wurde mit liposomalem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] und Glukoselösung für zehn Tage behandelt. Nach insgesamt 25 Tagen Versuchsdauer wurden die Mäuse getötet und ihre Lungen isoliert.

III. 3. 2. 1 Makroskopische Beurteilung

Nach der Färbung der Lungen der Versuchstiere wurden folgende Ergebnisse gefunden: An der dorsalen und ventralen, sowie an den interlobulären Lungenflächen wurden in der Kontrollgruppe multiple, teils disseminierte stecknadelkopfgröße, teils solide, teils konfluierende dunkelgrün gefärbte über die Lungenoberfläche erhabene Metastasen gefunden.

Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe wurden in allen anderen Behandlungsgruppen disseminierte, teils stecknadelspitz bis stecknadelkopf große, runde, über die Lungenoberfläche erhabene grüngefärbte Metastasen gefunden, die sich ebenfalls an der ventralen, dorsalen und an den interlobulären Flächen befanden.

Die Anzahl der an den Lungenoberflächen gezählten Metastasen in diesem Versuch beträgt 358 Lungenmetastasen in der mit 5% iger Glukoselösung behandelten Kontrollgruppe, 138 in der mit Taxol[®] (12,5 mg/kg Paclitaxel) behandelten Versuchstiergruppe, 66 in der mit liposomalem Paclitaxel (12,5 mg/kg Paclitaxel) behandelten Gruppe und 101 Metastasen in der mit Liposomen behandelten Tiergruppe, und ist in der Abbildung 24 dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen Taxol[®], liposomalem Paclitaxel und Liposomen sowie zu der mit Glukose behandelten Kontrollgruppe.

In der Abbildung 25 sind die Versuche 3 + 4 vergleichend nebeneinander dargestellt. Bis auf die Unterschiede in den mit Taxol[®] behandelten Gruppen lagen die Häufigkeiten der Metastasen in den gleichen Bereichen.

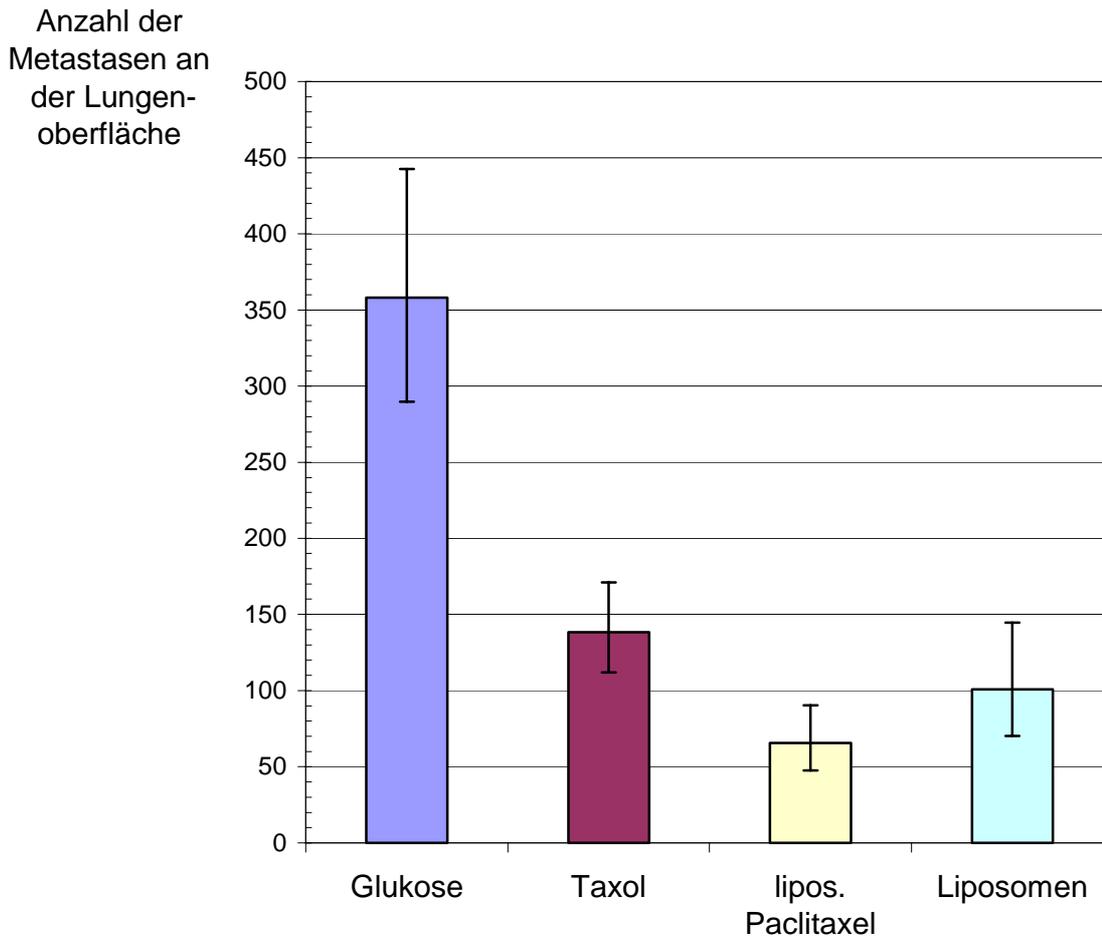


Abb. 24; Anzahl der Metastasen an der Lungenoberfläche. Zählung der Lungenmetastasen an der Lungenoberfläche nach X-Gal-Färbung. Behandlung der Versuchstiergruppen mit liposomalem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] und Glukoselösung. Konzentration des Paclitaxels 12,5mg/kg. Behandlungsbeginn an Tag 1 post Tumorzellinjektion für 10 aufeinanderfolgende Tage. In den Gruppen wurden folgende Anzahl an Metastasen an der Lungenoberfläche gezählt: Glukose 358, Taxol[®] 138, liposomales Paclitaxel 66 und Liposomen 101. Für die statistische Bearbeitung wurden die erfassten Werte logarithmiert. Die Grafik entspricht den entlogarithmierten Werten. Die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen Glukose, Taxol[®], liposomalem Paclitaxel und Liposomen sind signifikant ($p < 0.001$).

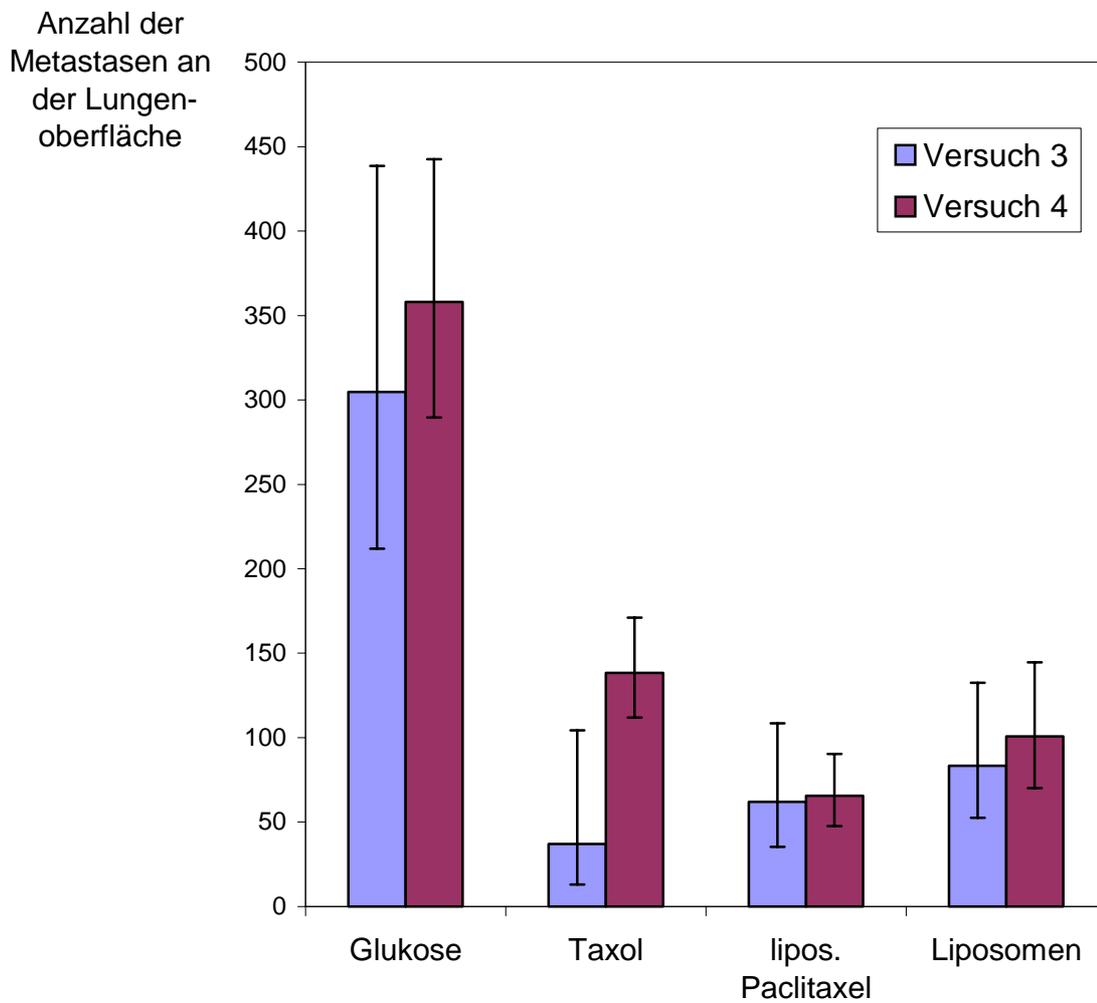


Abb. 25; Vergleichende Darstellung der Anzahl der Lungenmetastasen an der Lungenoberfläche aus den Versuchen 3 + 4. Es liegen die selben Daten wie in den Abbildungen 19 und 24 zugrunde.

IV Diskussion:

Ziel dieser Arbeit war es die Wirksamkeit auf das Tumorwachstum eines in der Krebstherapie eingesetzten Zytostatikums im Vergleich zu einer neuen Formulierung des gleichen Wirkstoffes in einem Maus-Tumormodell zu testen. Der Wirkstoff des Zytostatikums Taxol[®], Paclitaxel, wurde an kationische Liposomen gebunden. Diese neue Formulierung macht es zudem möglich auf den Lösungsvermittler Cremophor EL[®] im Taxol[®] zu verzichten. Dieser Lösungsvermittler löst in der zytostatischen Therapie oftmals Nebenwirkungen aus, die eine Prämedikation der Patienten mit Kortikoiden nötig machen zur Vermeidung eines anaphylaktischen Schocks. Das in dieser Arbeit eingesetzte Tumormodell basierte auf der Verwendung von stabil mit dem lac/Z-Gen transfizierten Nierenkarzinomzellen (Renca-Zellen) der BALB/c-Maus. Der Einsatz dieser Zelllinie ermöglichte das Setzen solider Tumore bei subcutaner Injektion wie auch die Induktion von Lungenmetastasen bei intravenöser Injektion in die Schwanzvene der Versuchstiere.

VI. 1 Zytotoxizität der Präparate

Voraussetzung für einen Vergleich zweier Präparate sollte eine annähernd gleiche Zytotoxizität auf die im Modell eingesetzten Zelllinien sein. Mit dem durchgeführten MTT-Test ist eine Aussage über die Sensibilität der Zellen machbar. Hierbei wurden die IC₅₀-Werte der eingesetzten Präparate für die Renca-lac/Z- Zellen bestimmt.

Wäre eine zu hohe Sensibilität der Zellen gegenüber den Präparaten oder eine sehr große Differenz zwischen dem Taxol[®] und dem an kationische Liposomen gebundenem Paclitaxel aufgetreten, wäre eine Beurteilung der Ergebnisse im Tierversuch kaum oder gar nicht möglich gewesen.

In den durchgeführten Zytotoxizitätstests (MTT-Test) zeigte sich, daß das Zellwachstum von Taxol[®] sowie von liposomal gebundenem Paclitaxel in geringen Konzentrationen gehemmt wurde (IC₅₀ Taxol: 6.32 ng/ml; IC₅₀ liposomales Paclitaxel: 5,5 ng/ml). Liposomen alleine (IC₅₀: 5,5 µg/ml) und Cremophor EL[®]

zeigten nur in sehr hohen Konzentrationen einen das Zellwachstum hemmenden Effekt. Diese Ergebnisse bildeten die Grundlage für einen Einsatz der Präparate in dem Renca-Tumormodellen.

IV. 2 Subcutane Tumoren, Injektion von 5×10^6 Zellen s.c., Behandlungsbeginn an Tag eins post Zellinjektion (Versuch I), Behandlungsbeginn an Tag elf post Zellinjektion (Versuch II)

Die Evaluierung des Tumorwachstums erfolgte in zwei Behandlungsansätzen der Versuchstiergruppen:

Bei einer geplanten Versuchsdauer von 25 Tagen wurde eine Gruppe ab Tag 1 nach der Tumorzellinjektion (5×10^6 Renca-lac/Z-Zellen s.c. in die seitliche Rückenflanke der Mäuse) für die darauffolgenden zehn Tage mit an kationischen Liposomen gebundenem Paclitaxel, Liposomen, Taxol[®] sowie Glukoselösung i.v. behandelt. In dem verbleibenden Zeitraum wurde die Volumenzunahme der Tumoren gemessen. Am Ende des Versuches wurden die Tiere getötet und ihnen die Tumoren wie auch Leber, Nieren und Milz entnommen und für die histologische Untersuchung vorbereitet.

Da die Tumore erst nach ca. sechs Tagen als stecknadelkopfgroßes Gebilde fühlbar waren und ab dem neunten Tag sicher meßbar waren, zeichneten sich deutliche Wachstumsunterschiede der Tumore erst ab Tag neun ab. Diese Differenzen wurden von dem Tumorwachstum über die gesamte Versuchsdauer beibehalten. Übertragen auf einen medizinischen Einsatz kann dieser Versuchsansatz auf eine Therapie im Anschluß an eine operative Entfernung von Tumorgewebe angesehen werden, da bei nahezu jeder Operation in der Nähe bzw. am Tumor selbst die Gefahr besteht, daß sich Tumorzellen lösen und sich im umliegenden Gewebe erneut ansiedeln oder in weiter entfernte Körperteile metastasieren. Zudem wurde eine weitgehende Vereinheitlichung im Vergleich zu dem Metasasenmodell im Hinblick auf Behandlungsdauer und Versuchsdauer angestrebt, da gerade in diesem Modell die

postoperative Metastasierung und der Einfluß einer sofortigen Behandlung der Patienten untersucht werden kann.

Im zweiten Versuchsansatz wurde zehn Tage nach der Tumorzellinjektion zu einem Zeitpunkt, an dem die Tumoren bereits im Gewebe der Maus etabliert waren (fühl- und meßbar), mit der Behandlung der Versuchstiere wie oben beschrieben begonnen. Eine Reduktion der Volumenzunahme der Tumore gegenüber der Kontrollgruppe (Glukose) konnte auch in diesem Versuchsansatz erzielt werden. Nach der zehntägigen Behandlung mittels intravenöser Injektion der Präparate mußte der Tierversuch bedingt durch das Auftreten von Ulzerationen an den subcutanen Tumoren zur Verhinderung von Schmerzen, Schäden und Leiden der sich im Versuch befindlichen Versuchstiere beendet werden.

In den Versuchen I und II (Behandlungsbeginn an Tag 1 post Zellinjektion, Versuch I; Behandlungsbeginn an Tag 11 post Zellinjektion, Versuch II) zeigte sich eine Wachstumsreduktion bei allen eingesetzten Präparaten (Taxol[®] 25 %, kationischen Liposomen 40 %, an kationische Liposomen gebundenes Paclitaxel 69 %) im Vergleich zu den mit Glukose behandelten Kontrollgruppen. Wie Thurston G. (1998) zeigte, ist bedingt durch die Größe der kationischen Liposomen (35 – 50 µm) und deren positiver Ladung zu erwarten, daß diese Liposomen das Gefäßsystem nicht verlassen können. Dies wurde auch von Thurston, G. et al. (1998) in seiner Arbeit gezeigt. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, daß das verminderte Wachstum der mit liposomal gebundenem Paclitaxel behandelten Tumoren von der zytotoxischen Wirkung des Paclitaxels auf die Endothelzellen der Gefäße bedingt ist. In der histologischen und der immunhistochemischen Untersuchung des Tumorgewebes wurde eine vermehrte Angiogenese bei den mit liposomal gebundenem Paclitaxel behandelten Tieren festgestellt. Besonders in den tumornahen Bereichen der Subcutis und unter der bindegewebigen Kapsel des Tumors trat eine im Vergleich zu den anderen Gruppen vermehrte Angiogenese auf. Auch konnte bei einer teilweise vorliegenden Septierung des Blastoms eine verstärkte Gefäßbildung gefunden werden. Es ist anzunehmen, daß durch die ständige Schädigung des Gefäßendothels das umliegende Parenchym im Zustand der Hypoxie verbleibt und so die angiogenetischen Induktoren wie z.B. VEGF, Interleukin, EGF vermehrt

ausgeschüttet werden und dadurch bedingt eine erhöhte Angiogenese gefunden wurde. Das VEGF eine wichtige Rolle in der Angiogenese von Tumoren spielt wurde in verschiedenen Arbeiten dargestellt (*Ferrara N. et al. 1997, Ferrara N et al. 2000*)

Die durch kationische Liposomen ohne Wirkstoff Paclitaxel bedingte Wachstumsreduktion ist ein Effekt der in allen Versuchen aufgetreten ist. Ebenfalls wurde dieser Effekt in Vergleichsstudien mit anderen Tumormodellen beobachtet (Dr. M. Teifel, mündliche Mitteilung), kann jedoch noch nicht sicher interpretiert werden. Es ist darauf zu schließen, daß kationische Liposomen, wie von Thurston et al. (1998) beschrieben, an Endothelzellen binden und so einen inhibierenden Effekt auf die Tumorgefäße ausüben. Die genauen Mechanismen der Wachstumsinhibition von kationischen Liposomen auf Endothelzellen sind jedoch noch zu klären. Die Aufnahme der kationischen Liposomen in die Endothelzelle geschieht durch Endozytose. Auch hier ist die Menge der bindenden Liposomen sowie die Aufnahme von der Ladung der Liposomen abhängig (*Miller C.R. et al. 1998*). Die Wirkstoffe, wie z. B. Paclitaxel, werden in der Zelle freigesetzt und sind so spezifisch für die proliferierende Endothelzelle, da gerade bei diesen Zellen eine Affinität für die Bindung kationischer Liposomen festgestellt wurde (*Thurston G. et al. 1998*). Im Gegensatz zu der Paclitaxelformulierung im Taxol[®] kann man annehmen, daß liposomal gebundenes Paclitaxel bedingt durch die Größe der Liposomen nicht zu den Tumorzellen diffundieren kann.

In der histologischen Untersuchung der Tumoren zeigte sich ein großer Anteil an nekrotischen Bereichen in den Geschwulsten. Dies kann als eine Folge des schnellen Wachstums der Tumoren angesehen werden. Die Zellmorphologie mit vielen mitotischen Tumorzellen und unregelmäßigen Chromatinstrukturen im Zellkern wie auch das schnelle Wachstum der Tumoren lassen auf eine hohe Malignität der Tumorzelllinie schließen. Bedingt durch stark nekrotische Areale im Tumorparenchym konnte mit der X-Gal- Färbung nur ein geringer Teil des Gewebes angefärbt werden. So zeigte sich eine gute Anfärbbarkeit der Tumoroberflächen im Gegensatz zu dem intratumoralen Gewebe.

Zweifelsohne ist jedoch auf einen antiangiogenetischen Effekt, hervorgerufen durch die Verabreichung der kationischen Liposomen, zu schließen. Der inhibitorische Effekt von reinen Liposomen und Taxol[®] ist gemessen am Tumorzellenvergleichbar. Ist nun von einer Wachstumsinhibition der Liposomen auf die Endothelzelle auszugehen, so wird diese durch das Einschleusen von dem Mitosehemmstoff Paclitaxel in die Zelle verstärkt. Bedingt durch die geringe Plasmahalbwertszeit der kationischen Liposomen ist die Verfügbarkeit des Paclitaxels an der Zelle bzw. der Tumorzelle geringer als die des konventionell genutzten Taxol[®]. Die Wirkung des konventionellen Zytostatikums zielt auf die Tumorzelle selbst. In Folge der längeren Plasmahalbwertszeit ist die Verfügbarkeit an der Tumorzelle weit höher als die der Liposomen, die auf Grund ihrer Größe das Gefäßsystem nur schlecht verlassen können und so kaum die Tumorzellen erreichen werden. Da wie aus den histologischen Untersuchungen ersichtlich, die Tumoren größtenteils von einer bindegewebigen Kapsel umgeben sind, stellt dies jedoch eine gewisse Diffusionsbarriere auch für das Taxol[®] dar.

Innerhalb des kurzen Behandlungszeitraumes und bedingt durch das schnelle Tumorzellenwachstum ist eine Volumenreduktion in diesem Modell nicht zu erwarten. Es ist jedoch zu beachten, daß der deutliche inhibitorische Effekt des an kationische Liposomen gebundenen Paclitaxels auf die Tumorentwicklung eine spezifische Wirkung entfaltet, die sich im Versuch als effektiver als die Wirkung des Zytostatikums Taxol[®] erwies. In einem Tumormodell mit langsamen Tumorzellenwachstum könnte eventuell eine Volumenreduktion erreicht werden.

Das verminderte Tumorzellenwachstum war in beiden Versuchsansätzen des subcutanen Modells zu sehen. Die Gruppenunterschiede erwiesen sich als signifikant. So gehen wir davon aus, daß kationische Liposomen in einem frühen Wachstumsstadium eines sich entwickelnden Tumors sowie an schon manifestierten Blastomen ihre Wirkung entfalten können. An kationische Liposomen gebundenes Paclitaxel zeigte in beiden Versuchen die potenteste Wirkung.

IV. 3 Metastasenmodell, Injektion von 1×10^5 Zellen i.v.,

Behandlungsbeginn ab Tag elf post Zellinjektion (Versuch III)

Behandlungsbeginn ab Tag eins post Zellinjektion (Versuch IV)

Zur Induktion von Lungenmetastasen wurden den BALB/c-Mäusen 1×10^5 Rencalac/Z- Zellen i.v. in die seitliche Schwanzvene injiziert. Die Versuchstiere wurden in Gruppen von je sechs Tieren geteilt und mit an kationischen Liposomen gebundenem Paclitaxel, Liposomen , Taxol[®] sowie Glukoselösung durch intravenöse Injektion behandelt. In einem Tierversuch wurde mit der Behandlung zehn Tage nach der Zellinjektion begonnen (Versuch III), in einem weiteren begann die Verabreichung der Präparate ein Tag post Tumorzellinjektion (Versuch IV). Die Behandlungsdauer erstreckte sich jeweils über zehn Tage. Die Versuchsdauer betrug jeweils 25 Tage. Am Ende der Versuche wurden die Mäuse getötet und die Lungen aller Mäuse zur X-Gal- Färbung, sowie die Leber, Milz und die Nieren von je drei Tieren pro Gruppe zur histopathologischen Untersuchung entnommen.

Auch in diesem Tumormodell wurden die an dem subcutan induzierten Tumoren durchgeführten Behandlungsschemata beibehalten. Diese spiegeln wiederum die Situation einer operationsbegleitenden Therapie sowie eine später einsetzende Therapie wider (siehe: solide Tumoren).

Bei einer Versuchsdauer von 25 Tagen konnte keine gesundheitliche Beeinträchtigung bedingt durch Störung der Atmung in Folge starker Volumenzunahme der Metastasen oder Obstruktionen der Atemwege der Versuchstiere beobachtet werden, und der Grad der Metastasierung der Lungen ließ eine Auswertung der Metastasen an der Lungenoberfläche der Mäuse zu. Auch in vorangegangenen Experimenten mit diesem Tumormodell wurde erst bei längerer Versuchsdauer über 30 Tage eine Beeinträchtigung des Gesundheitsstatus der Versuchstiere beobachtet (*Maurer-Gebhardt, M. et al.* 1999; eigene Kontrollversuche mit der Zelllinie). Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Lungen der Versuchstiere einen sehr hohen Grad von

Metastasierung auf, die eine Zählung der Metastasen durch das gegenseitige Überwachsen unmöglich machten.

Nach der Zählung der oberflächlichen X-Gal- gefärbten Lungenmetastasen konnte eine deutliche Differenz zwischen der Kontrollgruppe und den mit den zu testenden Präparaten behandelten Versuchstieren festgestellt werden. Innerhalb der Gruppen, welche mit Liposomen, liposomal gebundenem Paclitaxel und Taxol[®] behandelt wurden, konnten signifikante Unterschiede in Versuch 3 (Behandlungsbeginn der Versuchstiere an Tag 11 post Tumorzellinjektion) nicht festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch die Tendenz, daß nach Behandlungsbeginn zehn Tage post Tumorzellinjektion in der mit Taxol behandelten Tiergruppe die niedrigste Anzahl an Lungenmetastasen gefunden wurde (Kontrollgruppe: 305, Taxol[®]: 37, liposomales Paclitaxel: 62, Liposomen: 83 gezählte Metastasen an der Lungenoberfläche). Dies entsprach einer Reduktion der Metastasen an der Lungenoberfläche von 88 % für Taxol[®], 80 % für liposomales Paclitaxel und 73 % für Liposomen im Vergleich zu der mit Glukoselösung behandelten Kontrollgruppe.

Bei einem Behandlungsbeginn ein Tag post Tumorzellinjektion zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Behandlungsgruppen. Die höchste Effizienz zeigte sich in der Versuchstiergruppe, die mit den an kationische Liposomen gebundenem Paclitaxel behandelt wurde (Kontrollgruppe: 358, Taxol[®]: 138, liposomales Paclitaxel: 66, Liposomen: 101 gezählte Metastasen an der Lungenoberfläche). Diese Anzahl entsprach einer Reduktion der Metastasen an der Lungenoberfläche von 61 % für Taxol[®], 82 % für liposomales Paclitaxel und 72 % für Liposomen im Vergleich zu der mit Glukoselösung behandelten Kontrollgruppe. Dabei entsprach die Anzahl von Metastasen an der Lungenoberfläche in etwa deren der Vergleichsgruppe aus den nach elf Tagen post Tumorzellinjektion behandelten Tieren. Es ist davon auszugehen, daß das Metastasenmodell eine hohe Sensitivität aufweist. Zudem bilden sich die Lungenmetastasen nach der intravenösen Injektion aus Tumorzellen, die vereinzelt verabreicht wurden. Dies hat eine niedrige Zellzahl zu Beginn der Proliferation der Metastasen in der Lunge zur Folge. Alle durch die Behandlung hervorgerufenen Einflüsse treffen so weniger Tumorzellen pro Tumor (Metastase).

Eine signifikante Differenz zwischen Versuch III (Behandlungsbeginn an Tag 11 post Tumorzellinjektion) und Versuch IV (Behandlungsbeginn an Tag 1 post Tumorzellinjektion) ist nur in den mit Taxol[®] behandelten Versuchstiergruppen zu finden (37 Metastasen; Behandlungsbeginn Tag 11 post Zellinjektion zu 138 Metastasen; Behandlungsbeginn 1 Tag post Zellinjektion). Bedingt durch die organspezifische starke Durchblutung des Lungenparenchyms ist die nutritive Versorgung der Tumorzellen bzw. der angesiedelten Metastasen um ein vielfaches besser als im peripheren Gewebe. Die Tumorzellen gelangen auf dem Blutweg in das Organ und liegen so nach ihrer Extravasation in direkter Nähe zu Blutgefäßen. Im Vergleich zu den Metastasen liegen bei den subcutan gesetzten Tumoren hingegen bedingt durch die Gewebestruktur anfänglich weniger zugängliche Gefäße vor. Zudem erfolgt die Tumorumplantation von Extern, so daß keine genau im Gewebe definierte Position (Gefäßnähe) erreicht werden kann.

Man kann davon ausgehen, daß in der Lunge sich implantierende Metastasen längere Zeit durch Diffusion versorgt werden können. So ist, geht man davon aus, daß Taxol[®] in das Gewebe diffundiert, die einzelne Tumorzelle früher zu erreichen als die kationischen Liposomen eine inhibitorische Wirkung auf das proliferierende Gefäßendothel ausüben können. Dennoch sollten die geringen Unterschiede der Versuchstiergruppen beachtet werden.

Die Wirkung von Taxol[®] zielt auf die Zellteilung. So kann man vermuten, daß sich am Anfang des Tumorwachstums die Tumorzellen in einer Anpassungsphase befinden bevor sie in die logarithmische Wachstumsphase eintreten, so daß die Zellen für den Mitosehemmstoff unempfindlich sind (*DeVita Jr. et al. 2000*). Werden die Tumorzellen während ihrer exponentiellen Wachstumsphase behandelt sind sie durch Inhibition der Mitose in der G₂- Phase in Apoptose zu überführen.

Thurston et al. (1998) sowie McLean et al. (1997) konnten zeigen, daß Liposomen nicht oder nur in einem sehr geringen Umfang aus dem Gefäßsystem austreten. Thurston (1998) beschreibt eine spezifische Bindung an das Endothel proliferierender Zellen in tumorassoziierten Gefäßen sowie in chronisch entzündeten Geweben. Geht man davon aus, daß die in dem hier durchgeführten Versuchen angewendeten kationischen Liposomen dieselben Eigenschaften besitzen, ist auf eine Inhibition der

Angiogenese zu schließen. Das als Vergleichspräparat angewendete Taxol[®] zielt mit seiner galenischen Formulierung auf alle sich in Mitose befindlichen Körperzellen. Da sich in Bezug auf die Körperzellen, die Zellen in einem stark proliferierenden Tumor häufiger in Mitose befinden, ist hier eine vermehrte Wirkung des Zytostatikums gegeben. Mittels der liposomalen Formulierung wird das unspezifisch wirkende Paclitaxel also selektiv für angiogene Endothelzellen.

Ein weiteres Ziel ist es durch die liposomale Bindung von Zytostatika ihre Verträglichkeit zu verbessern (*Papahadjopoulos D., et al. 1991; Sengupta S. et al. 2000*). Bedingt durch die neue Spezifität der Formulierung von Paclitaxel werden nicht mehr alle sich in Mitose befindlichen Körperzellen erreicht, sondern nur solche Zellen, die die Liposomen spezifisch aufnehmen. Dies ermöglicht eine denkbare Dauertherapie mit liposomal gebundenem Paclitaxel oder anderen Wirkstoffen zur Inhibition des Tumorwachstums.

In drei der vier durchgeführten Versuchsansätzen konnte die selbe Tendenz der Resultate (deutlichste Wirkung auf das Tumorwachstum bei Einsatz von liposomalem Paclitaxel) beobachtet werden. Abweichend davon zeigte sich bei der Behandlung der in den Lungen der Versuchstiere induzierten Metastasen bei Behandlung elf Tage post Tumorzellinjektion eine deutlichere Wirkung des Zytostatikums Taxol[®]. Zudem konnte im Metastasenmodell eine noch deutlichere Wirkung der kationischen Liposomen ohne Paclitaxel auf das Zellwachstum, im Vergleich zu den Versuchen der subcutan gesetzten Tumoren registriert werden. Diese Wirkung kann nach Aramaki Y. et al. (1999 und 2000) auf die hohe Lipidaufnahme der Endothelzellen zurückgeführt werden, die ebenfalls zur Induktion von Apoptose der einzelnen Zellen führen kann (*Aramaki Y. et al. 1999; Aramaki Y. et al. 2000*). Sollte dies zutreffen ist der begleitende Effekt für die Therapie von Tumoren wünschenswert, für etwaige diagnostische Einsätze jedoch, wie z.B. Tumordiagnostik mittels fluoreszenzmarkierter Liposomen oder als Carrier von kurativen Substanzen zur z.B. Wundheilung wäre dieser Effekt jedoch kontraindiziert. Wie von Ellis LM. Und Fidler IJ. (1996) beschrieben hängt der Grad der Metastasierung von der Vaskularisation des Tumors ab. Mit der Reduktion der Angiogenese im Tumor sinkt demnach auch das Metastasierungspotential eines Tumors.

In dieser Arbeit konnte eine statistisch signifikante Verbesserung der Wirksamkeit des Paclitaxels im Vergleich zu der herkömmlichen Formulierung in Taxol[®] durch eine Änderung der Galenik und so auch des Wirkmechanismus erzielt werden. Diese Wirksamkeit zeigte sich in einer Reduktion des Tumolvolumens der mit liposomalem Paclitaxel behandelten Versuchstiergruppen im Vergleich zu denen mit Liposomen bzw. Taxol[®] behandelten Tiere. Ebenfalls konnte eine signifikante Reduktion der Lungenmetastasen mit liposomalem Paclitaxel im Vergleich zu den anderen Präparaten erzielt werden.

IV. 4 Organtoxizität

Ein Ziel der Anwendung von neuen Formulierungen der Zytostatika ist es eine bessere Verträglichkeit, unter Umständen bei einer herabgesetzten Konzentration und einer Minimierung von Adjuvanzen, zu erzielen. Dies ist auch das Ziel der hier durchgeführten Studie. Um eventuelle toxische Effekte zu evaluieren wurde in Begleitung zu der Auswertung der Tumoren und Lungenmetastasen der Versuchstiere eine Übersicht erstellt, die mögliche Organbeeinträchtigungen histologisch sichtbar machen sollte. Hierzu wurden histologische Präparate von Leber, Nieren und Milz angefertigt, die Hämatoxylin / Eosin gefärbt wurden. Es ist vorerst auf umfangreiche toxikologische Auswertungen verzichtet worden, um den Umfang der Studie in einem überschaubaren Rahmen zu halten.

In der histologischen Untersuchung der Leber, der Nieren sowie der Milz wurden in den Lebern der mit liposomalem Paclitaxel behandelten Versuchstiere leichte Leberzellnekrosen und Atrophien gefunden. Es ist jedoch davon auszugehen, daß diese Veränderungen reversibel sind. In den Nieren und den Milzen sowie in den Lebern der anderen Versuchsgruppen wurden keine auffälligen Veränderungen gefunden. Diese Ergebnisse machen es möglich in Zukunft eine Krebstherapie mit liposomalen Zytostatika in weiteren Versuchen zu erproben. Hierbei kann auch an eine den Patienten weitaus weniger belastende Dauertherapie gedacht werden, da die

gute Verträglichkeit und die Reduktion der eingesetzten Dosen dies ermöglichen können.

V Zusammenfassung

Die Tumorthherapie durch die Inhibition der Angiogenese stellt einen Therapieansatz dar, der eine Möglichkeit bietet die Tumorproliferation tumorzelllinienunspezifisch zu beeinflussen.

Im Umfeld aller sich etablierender Tumoren tritt, ausgelöst durch die von Hypoxie induzierten Angiogeneseaktivatoren wie z.B. VEGF, TNF- α , EGF die Angiogenese ein. Typisches Bild der neugebildeten, in den Tumor miteinbezogenen Gefäße ist eine starke ungeordnete Proliferation von Endothelzellen. Dies bringt eine mosaikartige Gefäßstruktur aus Tumor- und Endothelzellen mit sich.

Proliferierende Endothelzellen erwiesen sich als Ziel für die spezifische Aufnahme kationischer Liposomen. Um eine Inhibition der Angiogenese zu erreichen wurde das Zytostatikum Paclitaxel an die kationischen Liposomen gebunden.

Zur Evaluierung der Effizienz der kationischen Liposomen mit Paclitaxel gegenüber eines konventionellen Zytostatikums, hier Taxol[®], wurde ein Tumormodell in BALB/c Mäusen verwendet. Hierbei wurden den Versuchstieren stabil mit dem lac/ Z-Gen transfizierte Renca- Zellen (renale Nierenkarzinomzelllinie aus der BALB/c Maus) zur Induktion subcutaner Tumoren in die seitliche Rückenflanke injiziert. Zur Induktion von Lungenmetastasen wurden den Versuchstieren dieselbe Zelllinie in die seitliche Schwanzvene injiziert.

In allen Tierversuchen zeigten sich deutliche Effekte in der Reduktion des Tumolvolumens bzw. der Anzahl der Metastasen an der Lungenoberfläche der mit an kationischen Liposomen gebundenem Paclitaxel behandelten Versuchstiere.

Es wurde ebenfalls eine das Tumolvolumen, bzw. die Metastasenanzahl vermindernde Wirkung der kationischen Liposomen beobachtet, die in etwa der Effizienz des zum Vergleich gebrauchten Taxol[®] entsprach.

In der histologischen Auswertung der Versuche zeigten sich in den Lebern der mit an kationische Liposomen gebundenem Paclitaxel behandelten Versuchstiere leichte Leberzellatrophien.

In den durchgeführten Tierversuchen konnte so mit liposomalem Paclitaxel eine im Vergleich zu dem verwendeten Taxol[®] potentere Wirkung auf das Tumorwachstum und die Metastasierung beobachtet werden.

V. Summary

Therapy of tumors by inhibition of angiogenesis is a means of tumor treatment. This possibility is a cell line unspecific influence.

The angiogenesis in tumors starts through the influence of hypoxia. The consequence is the excretion of the angiogenic factors VEGF, TNF- α , and EGF. A typical feature of newly generated blood vessels is a strongly subordinate proliferation of endothelial cells. This leads to a mosaic structure of blood vessels containing endothelial and tumor cells.

Proliferating endothelial cells in tumor vessels turned out to be the target for specific uptake of cationic liposomes. To reach an inhibition of angiogenesis the cytostatic drug paclitaxel was bound to cationic liposomes. The outcome of the research relating to the proliferated endothelial cells in tumor vessels ends in the comparison of a conventional cytostatic drug (Taxol™) with paclitaxel bound to cationic liposomes. In this study a tumor model was established with BALB/c mice. In this model stably with the lac-Z gen transfected Renca- cells (renal carcinoma cells isolated from BALB/c mice) were injected s.c. into the back flank of the mice. For induction of metastases in the lungs of research animals the same cell line was injected into the tail vein.

In all animal experiments one could see distinct effects in reduction of the growth of tumors or the amount of metastases on the surface of the lungs from animals treated with liposomal paclitaxel.

Furthermore a reduction of tumors growth respectively reduction of the amount of metastases could be seen in the treatment with cationic liposomes. This result of the test is comparable with the conservative treatment of Taxol™.

The histopathologic evaluation of this experiment shows a low amount of atrophy in the liver cells in mice which were treated with liposomal paclitaxel.

In the animal research carried out a higher efficiency on reduction of tumor growth and metastasis of liposomal paclitaxel than with Taxol™ was shown.

Literaturverzeichnis

Aramaki Y, Takano S, Arima H, Tsuchiya S; Induction of apoptosis in WEHI 231 cells by cationic liposomes; *Pharm Res.* (2000) May; 17(5): 515-20.

Aramaki Y, Takano S, Tsuchiya S; Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes; *FEBS Lett.* (1999) Nov 5; 460(3): 472-6.

Benassi MS, Ragazzini P, Gamberi G, Sollazzo MR, Molendini L, Ferrari C, Merli M, Bohling T, Picci P; Adhesion molecules in high-grade soft tissue sarcomas: correlation to clinical outcome; *Eur J Cancer.* (1998) Mar; 34(4):496-502.

Carmeliet P ; Jain, R.K; Angiogenesis in cancer and other diseases; *Nature* 407, 14 Sep. (2000)

DeVita Jr; Vincent T; Samuel Hellman; Steven A. Rosenberg; J. B; *Cancer; Principles and Practice of Oncologie*; 6rd. Edition. Lippincott Comp. Philadelphia (2000)

Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D; Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors; *Pharmacol Rev.* (1999) Dec; 51(4):691-743.

Ellis LM, Fidler IJ; Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer.* (1996) Dec; 32A(14):2451-60.

Ferrara N; Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res.* (2000); 55:15-35; discussion 35-6

Ferrara N; Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor; *J Mol Med.* (1999) Jul;77(7):527-43.

Ferrara N, Davis-Smyth T; The biology of vascular endothelial growth factor.

Endocr Rev. (1997) Feb;18(1):4-25.

Giordano S, Zhen Z, Medico E, Gaudino G, Galimi F, Comoglio PM; Transfer of motogenic and invasive response to scatter factor/hepatocyte growth factor by transfection of human MET protooncogene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jan 15;90(2):649-53.

Greenblatt, M.;Shubik,P; Tumor angiogenesis:transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique; f.Natl.Cancer Inst.41, 111-124 (1968)

Griffioen A.W; Molema G; Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardio vascular Diseases, and Chronic Inflammation; (2000) Pharmacol. Rev; Vol.52, No.2

Hart IR, Goode NT, Wilson RE; Molecular aspects of the metastatic cascade; Biochim Biophys Acta. (1989) Jul 28;989(1):65-84.

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM; Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness; Am J Pathol. (2000) Apr;156(4):1363-80.

Jiang WG, Puntis MC, Hallett MB; Monocyte-conditioned media possess a novel factor which increases motility of cancer cells; Int J Cancer. (1993) Feb 1;53(3):426-31.

Johnson M.D.;Torri,J.A.;Lippman M.E.;Dickson.R.B; The rol of cathepsin D in the invasiveness of human brest cancer cells; Cancer Res. (1992). 53:873-877.)

Kenworthy P, Dowrick P, Baillie-Johnson H, McCann B, Tsubouchi H, Arakaki N, Daikuhara Y, Warn RM; The presence of scatter factor in patients with metastatic spread to the pleura; *Br J Cancer*. (1992) Aug;66(2):243-7.

Lee KD, Nir S, Papahadjopoulos D; Quantitative analysis of liposome-cell interactions in vitro: rate constants of binding and endocytosis with suspension and adherent J774 cells and human monocytes; *Biochemistry*. (1993) Jan 26;32(3):889-99.

Liotta L. A.; Stetler-Stevenson,W.G; Metalloproteinasen and cancer invasion; *Semin.Cancer Biol*. (1990) 1:99-106.

Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM; Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation; *Cancer Res*. (1974) May; 34(5):997-1004.

Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Schiffmann E; Tumor cell autocrine motility factor; *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1986) May;83(10):3302-6.

Liotta LA, Stracke ML, Aznavoorian SA, Beckner ME, Schiffmann E; Tumor cell motility; *Semin Cancer Biol*. (1991) Apr;2(2):111-4.

Liotta LA, Thorgeirsson UP, Garbisa S; Role of collagenases in tumor cell invasion; *Cancer Metastasis Rev*. (1982); 1(4):277-88.

Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA; Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet*. (1992) Jul 18;340(8812):145-6.

Maurer-Gebhard M, Schmidt M, Azemar M, Altenschmidt U, Stocklin E, Wels W, Groner B; Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin

efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells; *Cancer Res.* (1998) Jun 15;58(12):2661-6.

Maurer-Gebhard M, Schmidt M, Azemar M, Stöcklin E, Wels W, Groner B; A novel animal model for the evaluation of the efficacy of drugs directed against the ErbB2 receptor on metastasis formation; *Hybridoma.* (1999) Feb;18(1):69-75

Mayer B, Johnson JP, Leitl F, Jauch KW, Heiss MM, Schildberg FW, Birchmeier W, Funke I; E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: down-regulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration; *Cancer Res.* (1993) Apr 1;53(7):1690-5.

McLean JW, Fox EA, Baluk P, Bolton PB, Haskell A, Pearlman R, Thurston G, Umemoto EY, McDonald DM; Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice; *Am J Physiol.* (1997) Jul;273(1 Pt 2):H387-404.

Meyer O, Kirpotin D, Hong K, Sternberg B, Park JW, Woodle MC, Papahadjopoulos D; Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides; *J Biol Chem.* (1998) Jun 19;273(25):15621-7.

Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF; Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes.; *Biochemistry*; (1998) Sep 15;37(37):12875-83.

Mutschler E; *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, (1996)

Nabi IR, Watanabe H, Raz A; Autocrine motility factor and its receptor: role in cell locomotion and Cancer Metastasis; *Rev.* (1992) Mar;11(1):5-20.

Nicolson GL; Metastatic tumor cell interactions with endothelium, basement membrane and tissue; *Curr Opin Cell Biol.* (1989) Oct;1(5):1009-19.

Osaka G, Carey K, Cuthbertson A, Godowski P, Patapoff T, Ryan A, Gadek T, Mordenti J; Pharmacokinetics, tissue distribution, and expression efficiency of plasmid [33P]DNA following intravenous administration of DNA/cationic lipid complexes in mice: use of a novel radionuclide approach; *J Pharm Sci.* (1996) Jun;85(6):612-8.

Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, et al.; Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy; *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1991) Dec 15;88(24):11460-4.

Risau W; Mechanisms of angiogenesis.; *Nature.* (1997) Apr 17;386(6626):671-4.

Schmidt M, Lu Y, Liu B, Fang M, Mendelsohn J, Fan Z; Differential modulation of paclitaxel-mediated apoptosis by p21Waf1 and p27Kip1.; *Oncogene.* (2000) May 11;19(20):2423-9.

Sengupta S, Tyagi P, Velpandian T, Gupta YK, Gupta SK; Etoposide encapsulated in positively charged liposomes: pharmacokinetic studies in mice and formulation stability studies.; *Pharmacol Res.* (2000) Nov;42(5):459-64.

Silletti S, Yao JP, Pienta KJ, Raz A; Loss of cell-contact regulation and altered responses to autocrine motility factor correlate with increased malignancy in prostate ,cancer cells; *Int J Cancer.* (1995) Sep 27;63(1):100-5.

Sloane BF; Cathepsin B and cystatins: evidence for a role in cancer progression. *Semin Cancer Biol*; (1990) Apr;1(2):137-52.

Smith-McCune KK. Weidner N; Demonstration and characterisation of the angiogenic properties of cervical dysplasia. *Cancer Res* (1994) 54, 800-804

Sordat I, Bosman FT, Dorta G, Rousselle P, Aberdam D, Blum AL, Sordat B; Differential expression of laminin-5 subunits and integrin receptors in human colorectal neoplasia; *J Pathol.* 1998 May;185(1):44-52.

Szoka F, Papahadjopoulos D; Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes).; *Annu Rev Biophys Bioeng.* (1980);9:467-508.

Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM; Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* (1995) Sep 15;55(18):3964-8.

Testa JE, Quigley JP; The role of urokinase-type plasminogen activator in aggressive tumor cell behavior *Cancer Metastasis; Rev.* (1990) Dec;9(4):353-67.

Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM; Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice; *J Clin Invest.* (1998) Apr 1;101(7):1401-13.

Vincent T. DeVita, Jr; Samuel Hellman; Steven A. Rosenberg; *Cancer; Principles and Practice of Oncologie*; 6rd. Edition; J. B. Lippincott Comp. Philadelphia (2000)

Watanabe H, Shinozaki T, Raz A, Chigira M; Expression of autocrine motility factor receptor in serum- and protein-independent fibrosarcoma cells: implications for autonomy in tumor-cell motility and metastasis; *Int J Cancer.* (1993) Feb 20;53(4):689-95.

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J; Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol.* 1993 Aug;143(2):401-9.

Weidner N.; Semple J,P; Welch, W.R; Folkman J; Tumor angiogenesis and metastasis - Correlation in invasive breast carcinoma (1991) the New Engl.J.Med.Jan 1. Vol 324 1 – 7

Weiß E.; Karbe E., in H.Stünzi, E.Weiß; Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin; Paul Parey Verlag (1990)

Yabkowitz R., Mansfield PJ, Dixit VM, Suchard SJ; Motility of human carcinoma cells in response to thrombospondin: relationship to metastatic potential and thrombospondin structural domains; Cancer Res. (1993) Jan 15;53(2):378-87.

Danksagung

Es sei allen herzlich gedankt, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

An erster Stelle sei Herrn Prof. Dr. Bernd Groner gedankt, der zu dieser Arbeit anregte und mich in ihrer Durchführung unterstützte. Ich danke Ihm für die unermüdliche Betreuung und für seine Hilfeleistung bei der Beantwortung von Fragen.

Ein Weiterer dank gebührt Herrn Prof. Dr. Martin Diener, ohne seine Hilfe die Arbeit nicht zur Einreichung gekommen wäre. Vielen dank für die Geduld bei der Anhörung von Problemen und der gegebenen Hilfeleistung.

Vielen Dank an Frau Dr. habil. Anja Sterner- Kock für die große Hilfe bei der histopathologischen Begutachtung der histologischen Präparate, sowie Frau Renate Hanagarth für die Anfertigung der Präparate.

Dank an Dr. Martin Kock, Alf Theisen und alle Mitarbeiter der Zentralen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Frankfurt am Main für die Unterbringung der Versuchstiere und für die vielen Hilfeleistungen.

Vielen Dank auch an meine Kolleginnen und meinen Kollegen der Arbeitsgruppe Groner für die Duldung eines Exoten in den Reihen. Sicherlich trafen Welten aufeinander, aber wir haben das wohl gut gemeistert, oder?

Kerstin Nagel- Wolfrum sei für die Unterstützung bei einigen Sektionen gedankt.

Ebenfalls möchte ich allen Anderen um mich herum für ihre Geduld und ihr Verständnis danken, auch wenn ich ihnen das Leben manchmal ein bißchen schwer gemacht habe.

Meinen Eltern möchte ich danken, daß sie es ermöglicht haben, daß es bis zu dieser Arbeit kam.

Zu guter Letzt ein großer Dank an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter, vor allem Herrn Dr. Michael Teifel, der Munich Biotechnology GmbH, für die Inspiration und die Ermöglichung dieser Arbeit.