

4. Material und Methoden

Die Tierexperimentellen Untersuchungen wurden im Tierversuchslabor der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums der Charité´ Berlin durchgeführt. Die Versuche wurden zuvor von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales genehmigt.

4.1 Tiermodell

4.1.1 Herkunft und Haltung

Als Versuchstiere werden männliche Wag/RIJ- Ratten verwendet, wobei es sich um einen speziellen Inzuchtstamm handelt. Gezüchtet wurde dieser ursprünglich 1924 von Bacharach in den Glaxo- Laboratorien, Großbritannien aus einem Wistar- Stamm (Wistar Albino Glaxo) und schließlich seit 1960 in Rijswijk, Niederlanden weiter entwickelt

Seit 1997 stammten die Tiere aus dem Labor Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland und gelangten bei einem Körpergewicht von 200-310 g in den Versuch.

Die Tierhaltung erfolgte unter Einhaltung der Richtlinien des Tierschutzgesetzes.

Die Ratten wurden in Gruppen zu je 5 Tieren in Makrolonkäfigen (ca.55 x 32 cm, Höhe: ca. 20cm) auf Holzgranulat bei einer Stalltemperatur von 18- 2° C, einer Luftfeuchtigkeit von 45- 55% und einem sechsfachen Luftwechsel pro Stunde mit gefilterter Frischluft und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

Sie erhielten als Futter Altromin Standard-Diät für Ratten und Mäuse sowie Wasser ad libitum.

4.1.2 Narkose

Sämtliche Eingriffe an den Tieren erfolgten unter Vollnarkose.

Die Tiere wurden gewogen und die Narkosemenge entsprechend berechnet.

Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Xylazin (12mg/kg; Rompun® 2 %, Bayer AG, Leverkusen) und Ketanest (25 mg/ml Ketamin®; Parke Dawis GmbH, Freiburg) intramuskulär (i.m.) anästhesiert und je nach Bedarf i.m. bzw. i.v.(intravenös) nachdosiert. Gegebenenfalls erfolgte eine Nachinjektion während der Operation intraperitoneal.

Die Injektion erfolgte als Bolusinjektion aus einer Mischspritze.

4.2 CC-531 Tumormodell

4.2.1 Tumormodell, Charakterisierung und Herkunft der Tumorzellen

Bei diesem Tumormodell handelt es sich um das CC531-Adenokarzinom.

Histomorphologisch handelt es sich beim CC531 um ein mit 1,2 Dimethylhydrazin- induziertes, moderat differenziertes, kaum immunogenes Adenokarzinom des Kolons [20].

Freundlicherweise wurden die Tumorzellen von der Arbeitsgruppe "Drug Targeting", Max-Delbrück-Zentrum für Molekulardiagnostische Medizin, Berlin-Buch einen Tag vor der Implantation zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie wurde in RPMI-1640-Medium ergänzt mit

hitzeinaktiviertem 10%igem fetalem Kälberserum, 2mmol Glutamin, 50µmol/ml Streptomycin, 50 U/ ml Penicillin bei 37° C und einem CO²-Gehalt von 5 % gehalten.

4.2.2 Aufarbeitung der Tumorzellsuspension

Die Aufarbeitung erfolgte an einer Cleanbench GELAIRE BSB4A (Flow Laboratories) innerhalb der klinischen Pharmakologie am Universitätsklinikum "Benjamin Franklin", FU Berlin.

Um eventuelle Vitalitätsschäden der Tumorzellen zu minimieren, ruhte das Zellmaterial nach dem Transport nochmals über Nacht im Brutschrank bei 37° C und einer CO²- Spannung von 5.0 %.

Das Medium wurde vorsichtig mit Hilfe einer Vakuumpumpe aus den Kulturflaschen abgesaugt und verworfen. Pro Flasche wurden 2 ml (0.05 % Trypsin/ 0.5 mM EDTA in PBS) einpipettiert, die Flasche vorsichtig geschwenkt und der Überstand abgesaugt. Nach Wiederholung der Pipettierung wurden die Zellen anschließend bei 37° C und einer CO²-Spannung von 5.0 % über 25 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Kulturflaschen mit der Handfläche gegen den Flaschenboden geschlagen, um den Zellrasen zu lösen. Mit der Zugabe von 10ml Kulturmedium(GIBCO, RPMI 1640 with Hepes Buffer, with L-Glutamine; L-Glutamin: 1ml/100ml Medium einer Stammlösung von 29 mg/ml; Penicillin:100 U/ ml PBS; Streptomycin: 100µg/ml PBS) pro Flasche wurde der Trypsinierungsvorgang abgeschlossen. Der gesamte Flascheninhalt kam in ein Falcon-Röhrchen und wurde kräftig geschüttelt. 50 µl des Röhrcheninhaltes wurden für die Zellzählung abgenommen.

Die übrige Suspension wurde bei 2500 U/ min. über 10 min. zentrifugiert (Varifuge 3.0R, Hereus Instruments, Hanau, Deutschland), der Überstand abpipettiert und 20ml PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4) zum Zellpellet hinzugefügt. Die Röhrchen wurden bis zur Klumpenfreiheit geschüttelt und anschließend wurden das Zentrifugieren und Abpipettieren wiederholt. Nach dem Auffüllen mit RPMI- Medium auf das gewünschte Applikationsvolumen erfolgte eine sofortige Implantation der Zellen.

Für die Zellzählung wurde die 50µl Zellsuspension mit der gleichen Menge Trypanblau in einem Eppendorfgefäß gemischt und mit 50µl dieser Mischung eine Neugebauer-Zählkammer mit Hilfe einer Pipette befüllt. Die Berechnung der Zellzahl wurde mit der Formel

$$N = 2 \times Z \times P \times 10\,000$$

Mit N= absolute Zellzahl, Z= gezählte Zellen und P= Probenumfang in ml angestellt.

4.2.3 Tumorimplantation

Das OP-Feld wurde rasiert und desinfiziert, das Abdomen wurde kaudal des Xyphoids in der Linea alba über ca. 1,5 cm eröffnet, der Lobus hepatis sinister hervorgeklappt und kurzfristig mit einem in NaCl -Lösung getränktem Tupfer vor der Austrocknung geschützt.

Zügig wurde die frisch aufgearbeitete Tumorzellsuspension (7.5×10^5 Zellen pro Tier) mit einer Kanüle 0.45x 15mm streng subkapsulär in kranialer Richtung appliziert und der Einstich mit einem Gewebekleber (Histoacryl®, B.Braun® Surgical GmbH, Melsungen, Deutschland) versiegelt.

Die Infektionsprophylaxe erfolgte während der OP intraperitoneal mit einer Mischung aus je 0.03ml Penicillin-G (Penicillin® "Grünethal", 1 Mega; Grünethal GmbH, Stolberg, Deutschland) und Streptomycin (Streptomycin- Heyl® 1g; Heyl, Chem. -pharm. Fabrik, Berlin, Deutschland); die Laparatomiewunde wurde anschließend schichtweise verschlossen.

Nach etwa 12-16 Tagen bildeten die Tiere Lebertumoren von 1 bis 1,5 cm im Durchmesser aus. Die Erfassung der Tumorgöße erfolgte palpatorisch.

4.3 Auswahl und Randomisierung der Versuchstiere

4.3.1 Versuchsgruppen

Pro Gruppe und Zeitpunkt wurden 6 Tiere untersucht.

| Gruppe | Appl.art | SUV-Taxol Lipos.(1mg) | Spherex® (6mg) | Taxol (1mg) | Zeiten min. |
|--------|----------|--------------------------|-------------------|----------------|----------------------------------|
| 1 | i.v. | | | x | 5,15,30,60 |
| 2 | i.v. | | x | x | 5,15,30,60 |
| 3 | i.v. | x | | x | 30,60,90,120,240, 24 h |
| 4 | i.a. | | | x | 5,15,30,60 |
| 5 | i.a. | | x | x | 5,15,30,60 |
| 6 | i.a. | x | | x | 30,60,90,120,240, 24h |
| 7 | i.a. | x | x | x | 30,60,90,120,240, 24h, 3 Tage |

4.3.2 Intravenöse Applikation, Gewinnung von Blut

Das venöse Blut wurde mit Hilfe einer 22G Venenverweilkanüle (Vasofix Braunüle®, Braun® Melsungen AG, Melsungen) über die Schwanzvene gewonnen.

Eine Vollnarkose wurde nicht durchgeführt, da der Blutdruck narkosebedingt erheblich gesenkt wird und somit die Gewinnung ausreichender Mengen für die Blutuntersuchung unmöglich war. Daher wurden die Tiere mit Ether nur leicht betäubt und die Verweilkanüle unter Anstauen der Schwanzvenen geschoben. Zur Kontrolle der Position wurde die Kanüle mit einer NaCl - Lösung gespült und mit einem Klebestreifen fixiert.

Anschließend wurde intravenös mit 50-100 µl einer Narkosemischung aus 20 µl Ketanest, 10 µl Rompun® 2 % und 70 µl NaCl- Lösung die Narkose eingeleitet und mit intramuskulärer Applikation fortgeführt.

4.3.3 Intraarterielle Applikation

Die intraarterielle Applikation der therapeutischen Präparationen wurde unter mikrochirurgischen Bedingungen mit Hilfe eines Operationsmikroskops (20fache Vergrößerung, Zeiss Oberkochen, Deutschland) unter Vollnarkose durchgeführt.

Zur Vorbereitung der regionalen Zytostatikaapplikation über die A. hepatica wurde ein Katheter in die A. gastroduodenalis implantiert..

Nach Rasur und Desinfektion wurde das Abdomen durch einen 2-3cm breiten Oberbauchschnitt distal des Proc. xiphoideus eröffnet, die Leber kranial, das Darmkonvolut kaudal verlagert und mit einem sterilen Gazetupfer in der Bauchhöhle fixiert.

Unter mikrochirurgischer Sicht wurde bei 10-25facher Vergrößerung die A. hepatica communis im Bereich der Aufzweigung in die A. hepatica propria und die A. gastroduodenalis freipräpariert und mit Seidenfaden angezügelt, um einen retrograden Abfluss, insbesondere bei der Embolisation zu verhindern.

Danach wurde die A. gastroduodenalis distal legiert, proximal der Ligatur arteriotomiert und die Blutung durch Spannen der Zügel an der A. hepatica communis gestoppt. Nach Einführen des Katheters (Polyethylenschlauch) in die A. gastroduodenalis wurde die korrekte Katheterposition mit 2 Seidenligaturen gesichert und der Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung über eine aufgesetzte 1ml Insulinspritze gespült. Durch Öffnen der Zügelung an der A. hepatica communis wurde geprüft, ob das Kathetersystem dicht ist und die Leberperfusion gewährleistet ist. Um eine gleichmäßige Verteilung des Therapeutikums über den Blutstrom zu garantieren, wurde intermittierend der Zügel gelöst.

Nach der intraarterieller Applikation der Gesamtdosis und Spülung mit Kochsalzlösung wurde der Katheter entfernt, die Arteriotomiewunde legiert und der Zügel und der Tupfer entfernt.

Als Infektionsprophylaxe wurde den Tieren intraperitoneal 50 µl einer Antibiotikallösung (Mischung im Verhältnis 1:1 von: Benzylpenicillin, Penicillin 1 Mega, Grünthal GmbH, Stollberg und Streptomycin, Heyl ® Chemisch-pharmakologische Fabrik, Berlin) verabreicht.

4.3.4 Entnahme und Aufbereitung der Gewebeproben

Nach 5, 15, 30, 60 min. u.s.w. entsprechend der festgelegten Analysezeitpunkten wurden nach Euthanasie in tiefer Narkose den Tieren folgende Organe, zwecks Gewinnung von Gewebeproben, zur weiteren Aufarbeitung entnommen:

Pancreas, Magenwand, Milz , Niere, Lymphknoten, Peritoneum, Leber, Tumor, Tumorrand, Herz und Lunge, sowie 100 µl Plasma

Die einzelnen Gewebeproben (pro Organ jeweils 2 Proben; Gewicht < 1g) wurden mit 1ml Gewebelöser (NCS® - 2 Tissue Solubilizer, Amersham Corporation, Illinois) versetzt und anschließend bei 49,9° C 8 h bebrütet. Nach Beendigung der Bebrütungszeit und einer etwa 12 stündigen Abkühlzeit wurden jeweils 11 ml Scintillator sowie 50µl Essigsäure zugesetzt und die Suspensionen wiederholt geschüttelt.

4.3.5 Analytik

Radioaktiv markiertes Paclitaxel wurde sowohl als Monosubstanz als auch verkapselt in SUV-Liposomen (SUV- Taxol) mit und ohne Embolisat Spherex® entweder über die Schwanzvene oder die Leberarterie appliziert. Nach etwa 10-12 Tagen wuchsen die Tumore zur gewünschten Größe, 1cm. Um das Anreicherungsverhalten der verabreichten Substanz und somit die Therapiereaktion der einzelnen Gruppen auszuwerten, wurden die Tiere nach Erreichen der gewünschten Tumorgöße in Vollnarkose euthanisiert. Die entnommenen Organe wurden so bearbeitet, dass schließlich die mit Scintillator aufgearbeiteten Gewebelösungen nun Energie in Form von Lichtblitzen abgaben, die mittels einer Photozelle registriert werden konnten und mittels des TRI- Carb (elektrisches Gerät, das in der Lage ist, Radioaktivität quantitativ zu erfassen) als sogenannte Impulse pro Minute registriert werden. Im Vergleich mit einem sogenannten Standardpräparat, von welchem die genaue Menge an 3H- Paclitaxel je festgelegter Volumeneinheit bekannt ist, kann damit direkt die Substanzmenge des wiedergefundenen Paclitaxel in den einzelnen Gewebeproben nachgewiesen werden.