

6 Diskussion

Durch Entwicklung einer neuen Methode war erstmalig in pharmakokinetischen Studien eine genaue Bestimmung des 5-FU und seines aktiven Metaboliten FUDR im Gewebe möglich (JUNG et al., 1997). Sie garantiert im Gegensatz zur Bestimmung der Plasmalevel (BARBERI-HEYOB et al., 1995) eine genaue Aussage über die Organverteilung und Metabolisierung, da keine Korrelation zwischen der Plasmakonzentration und der Anreicherung im Gewebe besteht (PETERS et al., 1993; FINDLAY et al., 1994). FUDR entsteht nur intrazellulär und ist neben Fluorouridin und Fluorodesoxyuridinmonophosphat ein entscheidender Faktor des zytostatischen Effektes und damit ein prognostischer Parameter für die Wirksamkeit der Therapie (PINEDO et al., 1988). Die synchrone Bestimmung der Konzentration von 5-FU und seines Metaboliten FUDR verbesserte die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Applikationsformen und Behandlungsregimes und war Grundlage der Langzeitversuche dieser Studie.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde die Antitumorwirkung von 5-FU in Abhängigkeit von der Applikationsweise (intraarteriell oder systemisch) und therapeutischen Formulierung (Monosubstanz oder liposomale Form mit und ohne Embolisat) getestet. 5-FU wird seit Jahrzehnten in der Behandlung verschiedener Krebserkrankungen eingesetzt. In der Behandlung von kolorektalen Lebermetastasen ist 5-FU noch immer die Standardsubstanz gegenüber der sich neue Therapievarianten behaupten müssen (van der WILT et al., 1995). Der Wirkungsmechanismus ist komplex (MAYBAUM et al., 1980) und in tumurösen Geweben anders als im normalen Parenchym (PINEDO et al., 1988). Der initiale Metabolismus von 5-FU zu den wirksamen Nukleotiden Fluoruridintriphosphat und Fluorodesoxy-uridinmonophosphat korreliert mit der Aktivität der katalysierenden Enzyme und ist für die zytostatische Wirkung essentiell (WILKINSON et al., 1977). Wie die Wirkung im Einzelnen beeinflusst wird ist noch immer unklar (van der WILT et al., 1995). Der zytostatische Effekt hängt entscheidend von der Dosis und Einwirkungszeit des 5-FU ab (SPIEGELMANN et al., 1980; LOKICH et al., 1989). Bei regionaler Applikation kann die Dosis im Vergleich zur systemischen Therapie ohne Anstieg der Toxizitäten erhöht werden (WAGNER et al., 1986). Durch die hohe hepatische Extraktionsrate ist 5-FU besonders für eine lokoregionäre Therapie geeignet (PETERS et al., 1993).

Da primäre und sekundäre Lebertumoren im Gegensatz zum Leberparenchym ihre Blutversorgung überwiegend über die A. hepatica beziehen (RAPPAPORT, 1981; WITZLEB, 1983), führt ihr Verschluß in Kombination mit einer regionalen Zytostatikaapplikation zu einer selektiven Schädigung des Tumors (HOTTENROTT et al., 1987; MOLZAHN et al., 1988; HAKANSSON et al., 1990). Ziel der Chemoembolisation ist die Erhöhung der Zytostatikakonzentration im Zielgebiet unter Vermeidung systemischer Nebenwirkungen. Die

mittels Embolisat erzeugte passagere Flußverzögerung trägt durch Verlängerung der Kontaktzeit zwischen Therapeutikum und Gewebe zu einer vermehrten Anreicherung bei (HEIM et al., 1984; SCHULTHEIS, 1985; BERGER et al., 1993). Um einen anhaltenden Behandlungsvorteil für die Patienten zu sichern, muß die Behandlung wiederholbar sein. Daher sollten in der Chemoembolisation keine permanenten Embolisate verwendet werden (CIVALLERI, 1992; EDMAN, 1992). Eine dauerhafte Embolisation führt bereits nach wenigen Tagen zur Ausbildung von Kollateralgefäßen, wodurch der regionale Ansatz zerstört wird (SCHULTHEIS, 1985). In der Chemoembolisation werden daher bevorzugt kurz wirksame, passagere Embolisate angewendet (PERSSON et al., 1987). Die Partikelgröße bestimmt die Lokalisation der Flußverlangsamung im Gefäßbett und ist ein entscheidendes Kriterium für die Auswahl des geeigneten Embolisates (CHOI et al., 1993). MAEDE et al. (1987) fanden bei Partikeln über 50 µm gleich große Embolisationsbezirke im Tumor und der gesunden Leber, während bei einer Teilchengröße unter 50 µm eine dreimal höhere Embolisationsrate im Tumor verglichen mit dem gesunden Leberparenchym nachgewiesen werden konnte. Stärkemikrosphären (Spherex®) erfüllen mit einem Durchmesser von 20 - 45 µm die daraus abgeleitete Forderung nach kleineren Partikeln und gewährleisten eine periphere Embolisation von ca. 30 min Dauer unter Vermeidung arteriovenöser Shunts (ANDERSON et al., 1991). Sie werden durch die α -Amylase abgebaut und sind sehr gut verträglich (TESCH, 1999).

Obwohl die Langzeitergebnisse der Chemoembolisation mit 5-FU eindeutig besser als die Monotherapie sind (HILGENFELD et al., 1996), ist bis jetzt kein entscheidender Durchbruch in Bezug auf die Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten gelungen. Darum werden neue Applikationsformen gesucht, um das Targeting der Medikamente zu verbessern. Getestet werden verschiedene Transportsysteme (Drug Carrier), die entsprechend der individuellen Anforderungen in der Lage sind, das Therapeutikum selektiv in das Zielgebiet zu transportieren. Dazu muß das Medikament an das Transportvehikel gebunden werden können und diese Bindung darf das Targeting nicht beeinträchtigen. Ein idealer Carrier sollte möglichst stabil, biologisch abbaubar und gut in der Extrazellulärflüssigkeit löslich sein. Von ihm darf keine toxische Belastung des Organismus ausgehen und wenn möglich, sollte er nicht immunogen sein (WU, 1988). Insbesondere Liposomen sind Gegenstand intensiver Forschungen, da sie viele der geforderten Eigenschaften von Drug Carriern erfüllen (WU et al., 1993). Im Vergleich zu konventionellen Liposomen zeigen Stealth®-Liposomen eine deutlich verbesserte, dosisunabhängige Pharmakokinetik (ALLEN et al., 1991). Sie können durch Umgehung oder Verzögerung der Phagozytose (DOI et al., 1994) aufgrund ihrer Glyko-lipid-, Polysaccharid- oder Polyethylenglykol-modifizierten Oberfläche länger als konventionelle Liposomen im Körper zirkulieren (ALLEN et al., 1989). Die Verlängerung der Plasma- und Zirkulationshalbwertszeit beruht wahrscheinlich auf der Verhinderung des Ankoppelns von Oponinen, wodurch die Aufnahme in die Zellen des RES erschwert wird (LASIC et al.,

1991). Damit erhöht sich für die liposomal verkapselten Substanzen die Chance, sich in Abhängigkeit von der Gefäßcharakteristik im Tumor anzureichern (MAZUMDER, 1981; PAPAHAJDOPOULOS et al., 1991; HUANG et al., 1992).

Bei den in dieser Studie verwendeten 5-FU-SUV-PEG-Liposomen betrug der Anteil des eingeschlossenen Medikamentes 10 %. Bei liposomaler Verkapselung bindet 5-FU nicht an den Lipidbilayer (SAZAKI et al., 1987), sondern verteilt sich im wässrigen Kompartiment der Liposomen (TSUKADA et al., 1984). 5-FU ist ein polarer Arzneistoff mit begrenzter Wasserlöslichkeit (Löslichkeitskoeffizient $6,9 \times 10^4$). Polare hydrophile Stoffe lassen sich nur schwer in Liposomen verkapseln, da Abstoßungsvorgänge eine hohe Verkapselungsrate im Innenraum verhindern (HASHIDA et al., 1988). Die Verkapselung von 5-FU in unterschiedlichen Liposomen mit variablen Verkapselungsraten ist von verschiedenen Autoren beschrieben worden (TSUKADA et al., 1984; SAZAKI et al., 1987; HASHIDA et al., 1988; SIMMONS et al., 1988; OYZER et al., 1989). Auf die Abtrennung des unverkapselten 5-FU wurde verzichtet, da sie technisch sehr aufwendig (OYZER et al., 1989) und der therapeutische Effekt der unabgetrennten Fraktion bis heute unklar ist.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein Tumormodell benötigt, das sich problemlos in der Leber der gewählten Versuchstiere implantieren läßt und die Eigenschaften humaner Metastasen aufweist. Das CC-531 ist ein etabliertes Tumormodell für Lebermetastasen kolorektaler Karzinome (NORDLINGER et al., 1991; van HILLEGERSBERG et al., 1993; THOMAS et al., 1993). Für das CC-531 spricht die einfache Handhabung und die gute Reproduzierbarkeit. Die Haltung der Zelllinie, Aufarbeitung der Tumorsuspension und Implantation waren mit Standardmethoden durchführbar und die Tumoranwachsrate betrug 98 %. Im Gegensatz zur Inokulation kleiner Tumorstücke (van HILLEGERSBERG et al., 1993) sind Tumore, die durch subkapsuläre Implantation einer definierten Zellzahl induziert werden, besser reproduzierbar. Durch subkapsuläre Injektion kann die Lage und Zahl der Tumormanifestationen genau bestimmt werden (van der WILT et al., 1995). Bei intraportaler Applikation der Tumorzellsuspension entstehen innerhalb von 25 Tagen multiple Herde unterschiedlicher Größe, die sich diffus in der ganzen Leber verteilen (THOMAS et al., 1993). Ein Monitoring der einzelnen Manifestationen in Therapieversuchen wird dadurch erheblich schwieriger und Tumorwachstum als auch Angehrate schwanken beträchtlich.

Nach der Implantation von $5 - 8 \times 10^5$ Zellen wuchsen innerhalb von 12 bis 16 Tagen Tumore mit einem Durchmesser von ca. 1 cm. Insgesamt wurde das Allgemeinbefinden der Tiere durch den implantierten Tumor während der Versuchsdauer nicht erkennbar beeinflusst. Obwohl bei allen Tieren die gleiche Suspension mit einer weitgehend identischen Zellzahl implantiert wurde, zeigten sich Unterschiede im Wachstumsverhalten zwischen den Einzeltieren. Von unvermeidbaren Schwankungen der Wachstumskinetik der implantierten Tumore trotz standardisierter Methodik haben auch van der WILT et al. (1995) berichtet. Durch randomisierte Zuordnung der Versuchstiere konnten die unterschiedlichen

Tumorausgangsvolumina gleichmäßig auf alle Therapiegruppen verteilt werden. Dies konnte durch KRUSKAL-WALLIS-Test bestätigt werden.

Die Wachstumsrate der experimentell erzeugten Tumore wurde durch volumetrische Bestimmung MR-tomographischer Untersuchungen jeweils vor und dann alle sieben Tage nach einmaliger Therapie bestimmt. Die Tumorummetrie ist im Vergleich zur Messung der Tumordurchmesser ausgewählter Schichten wesentlich aussagekräftiger und genauer (CHOI et al., 1993). Die Methode ist im klinischen Alltag zur Verlaufskontrolle einer Tumorthherapie gebräuchlich und korreliert sehr gut mit den histologisch ermittelten tatsächlichen Tumorgößen (MAHFOUZ et al., 1993; YAMASHITA et al., 1993; HAMM et al., 1994).

Um die Reaktion auf die verschiedenen Behandlungsmethoden der einzelnen Therapiegruppen vergleichen zu können, wurde zunächst die Tumorgößenveränderung in der ersten Woche betrachtet. Bei den intraarteriell mit 5-FU-SUV-PEG-Liposomen mit bzw. ohne Embolisat (Gruppe 4 bzw. 3) behandelten Tieren wurde eine 30 %ige Tumorreduktion in der ersten Woche nach der Behandlung festgestellt. In allen anderen Therapiegruppen wuchs der Tumor unbeeinflusst weiter. Im Gegensatz zur Tumorreduktion bei liposomaler Verkapselung mit Embolisierung (Gruppe 4), die über 14 Tage andauerte, bevor ein erneutes Tumorwachstum einsetzte, zeigte sich die Reaktion der liposomalen 5-FU-Gruppe ohne Embolisat (Gruppe 3) sehr viel inhomogener bezüglich der Dauer der Tumorreduktion. Beim Vergleich des Anhaltens der Response, gemessen am Zeitraum bis zum Überschreiten der Tumorausgangsgröße, ergibt sich aber kein wesentlicher Unterschied zwischen Gruppe 3 und Gruppe 4. Während das wiedereinsetzende Tumorwachstum nach einmaliger intraarterieller Applikation von 5-FU-SUV-PEG (Gruppe 3) dem der Kontrollgruppen entspricht, ist die Wachstumskinetik der Gruppe 4 (5-FU-SUV-PEG + Spherex® i.a.) insgesamt deutlich verzögert. Der Anstieg der Tumorwachstumskurve ist bei diesen Tieren wesentlich flacher.

Die in Vorversuchen ermittelten pharmakokinetischen Daten zeigten, daß die lokoregionäre Applikation der intravenösen weit überlegen ist. Die Ergebnisse der Langzeitversuche sind durch die in den pharmakokinetischen Vorversuchen festgestellte hohe Anreicherung von 5-FU bei liposomaler Applikation nur teilweise erklärbar. Beim Vergleich der 5-FU-Gehalte im Tumor zwischen den intraarteriell therapierten Gruppen zeigte sich bei liposomaler Applikation in Kombination mit Embolisat (5-FU-SUV-PEG + Spherex®) mit einer 416fachen Konzentration die größte Steigerung gegenüber der lokoregionären Monotherapie gefolgt von der Kombination 5-FU + Spherex® und der reinen liposomalen Gabe (5-FU-SUV-PEG). Berücksichtigt man nur die 5-FU-Anreicherung so ist unverständlich, daß die Chemoembolisierung mit 5-FU + Spherex® (Gruppe 2) keinen therapeutischen Effekt hat, während die regionäre Behandlung mit liposomal verkapseltem 5-FU (Gruppe 3) zu einer Tumorreduktion führte. Der Vergleich der FUDR-Gehalte erklärt den in dieser Studie ermittelten Therapieausgang und ist ein Beweis für das auch von anderen Autoren bestätigte Targeting der liposomal verkapselten Therapeutika in die Tumorzelle (GABIZON et al., 1990)

und den prognostischen Wert der Bestimmung von FUDR. Die höchsten FUDR-Gehalte wurden bei liposomaler lokoregionärer Therapie festgestellt, wobei der Spitzenwert durch zusätzliche Embolisation erreicht wurde. Die dritthöchste FUDR-Konzentration trat bei systemischer liposomaler Therapie auf (5-FU-SUV-PEG i.v.). Bei allen anderen Gruppen war der gemessene FUDR-Gehalt im Tumor vergleichsweise gering. Bemerkenswert sind deshalb die Ergebnisse der intravenösen Therapiegruppen mit Zytostatikum. Trotz liposomal verkapseltem Zytostatikum in Gruppe 9 zeigten die Tiere ein ungehemmtes Tumorwachstum. Offensichtlich ist die verfügbare Dosis zu gering, um eine erkennbare Therapieantwort zu induzieren.

Das Nichtansprechen der intraarteriell mit 5-FU und Embolisat behandelten Gruppe 2 begründet sich durch die Gabe der unverkapselten Substanz. Eine Steigerung des intrazellulären Transportes wird durch Spherex® allein nicht vermittelt. Damit unterliegt das Zytostatikum kaum der Metabolisierung zu den wirksamen Metaboliten, was man an den geringen FUDR-Gehalten im Tumor sehen kann. Das liposomal verkapselte Medikament wird besser als die Monosubstanz in die Zelle transportiert und metabolisiert und kann somit seine Wirkung voll entfalten. Die reine passagere Embolisation in Gruppe 7 (Spherex® intraarteriell) und Gruppe 5 (Kombination aus leeren SUV-PEG-Liposomen und Spherex®) führte in Übereinstimmung mit den klinischen Ergebnissen reiner ischämieinduzierender Behandlung (PERSSON et al., 1990; COLDWELL et al., 1991; KAWASAKI et al., 1994; BERGER et al., 1995) erwartungsgemäß zu keinen wesentlichen Unterschieden der Tumorwachstumsrate in Relation zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Um den Therapieeffekt umfassend beurteilen zu können, wurden außer den Tumorwachstumsraten die Vitalitätsunterschiede im Tumorgewebe anhand dynamischer MRT-Untersuchungen jeweils vor Therapie und dann alle 7 Tage bestimmt. Dabei wurden die relativen Signalintensitäten repräsentativer Tumorschichten nach intravenöser Gabe standardisierter Dosen von Gd-DTPA bestimmt. Bei den in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wurden die unterschiedlichen T_1 -Relaxationszeiten der als region of interest (ROI) markierten Tumorschicht gemessen.

Bei den mit 5-FU-SUV-PEG-Liposomen mit und ohne Spherex® (Gruppe 4 und 3) behandelten Tieren wurde in der ersten Woche eine deutliche Signalreduktion festgestellt. Im weiteren Verlauf stieg die relative Signalintensität wieder an und erreichte in der dritten Woche nach der Behandlung in etwa die Ausgangswerte.

Gd-DTPA verteilt sich über die Blutbahn und reichert sich in extrazellulären Flüssigkeitsräumen an (WEINMANN et al., 1984). Weil Tumoren mehr Extrazellulärflüssigkeit haben, induziert Gd-DTPA einen stärkeren Signalanstieg im Tumor als in der Leber. Infolgedessen wird die Signalintensität des vor der Kontrastmittelaufnahme hypointensen Tumors nach Gabe von Gd-DTPA so stark gesteigert, daß er sich isointens zum umgebenden Leberparenchym zeigt (CLEMENT et al., 1993).

Diskussion

Das Signal von Metastasen schwankt je nach Entwicklungszustand und Charakteristik. Frühe Stadien, fortgeschrittene Metastasen mit unterschiedlicher Wachstumskinetik und Tumore mit verschiedenen Nekroseanteilen führen zu einer differenzierten Kontrastmittelanreicherung und sind für die starke Signalvarianz humaner Metastasen verantwortlich (ROFSKY et al., 1993). Das Signalverhalten von Gruppe 3 und 4 in der ersten Woche zeigte charakteristische Ringphänomene, die sich auf den T₁-gewichteten Bildern gegenüber dem Leberparenchym als hyperintenser Rand mit dunklem Zentrum darstellen. Dieses Muster findet man bei Abszessen (WEISSLEDER et al., 1988) und bei nekrotischen Arealen in Tumorgeweben (MURAKAMI et al., 1993; ROFSKY et al., 1993). Die wiederansteigende Signalintensität in der zweiten Woche nach der Therapie schließt eine Nekrose aus, da sich Nekrosen nicht wieder vaskularisieren. Solche Ringphänomene treten auch bei hypovaskularen Tumoren auf, die ein fibröses Stroma oder eine dichte monoklonale Zellstruktur ohne zentrale Vaskularisierung aufweisen (SEMELKA et al., 1994). Die ringförmige Kontrastmittelanreicherung entsteht durch maligne Infiltration des Tumors ins umliegende Lebergewebe mit Kompression des Leberparenchyms und Gallengangsproliferation bei hypovaskularem Zentrum (NI et al., 1993). Das beobachtete Signalverhalten bei den Tumoren der Gruppe 3 und 4 scheint auf einer vorübergehenden Beeinträchtigung der Gefäßarchitektur zu basieren, da die verringerte Signalintensität in der ersten Woche mit einer Tumorreduktion einhergeht. Das ansteigende Signal in der zweiten Woche kann als prognostischer Parameter gelten. Der Tumor zeigt wieder eine gleichmäßige Kontrastmittelanreicherung, was für eine vollständige Perfusion spricht. Mit dem Signalanstieg geht auch wiedereinsetzendes Tumorwachstum ab der dritten Woche einher.

Da die Entnahme des Tumors für die histologische Aufarbeitung je nach Überlebenszeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Behandlung erfolgte, und sich die gemessenen Signalintensitäten der erfolgreich behandelten Gruppen 3 und 4 nach wiedereinsetzendem Tumorwachstum wie die der Kontrollgruppen verhielten, waren Differenzen in der Tumorausprägung unwahrscheinlich. Eine Ausnahme bildeten die beiden Tiere mit vollständiger Tumorregression im MR-Bild, die histologisch bestätigt werden konnte. Kennzeichnend war eine reaktionslos im Lebergewebe liegende bindegewebige Narbe mit Kollagenfasern, Fibrozyten und vereinzelt Fobroblasten. Bei allen anderen Tieren zeigte sich unabhängig von der Behandlung ein moderat differenziertes Adenokarzinom mit bindegewebigem Stroma und gelegentlichen zentralen Nekrosebereichen. Das entspricht dem typischen Erscheinungsbild des CC-531 Adenokarzinoms (THOMAS et al., 1993).

Gesteigerte Responseraten werden bei vielen Behandlungsregimes angegeben, entscheidend für den Patienten ist jedoch eine Verlängerung der Überlebenszeit. Da kein vorzeitiger Abbruch der Versuche aufgrund dramatischen Gewichtsverlustes oder einer unverträglich hohen toxischen Belastung der Therapie notwendig war, wurden die Tiere zur Bestimmung der

Überlebenszeit bei einer Tumorausdehnung auf 9 Schichten und einer Tumorgröße von mehr als 3500 µl euthanasiert. Die zum Teil bereits präoperativ erhöhten Blutwerte waren, außer bei der unbehandelten Kontrollgruppe, rückläufig und die meisten Tiere nahmen trotz zum Teil erheblichen Tumorwachstums zu. Die präoperativ erhöhten Werte von ALAT, ASAT und LDH sind Ausdruck einer bereits bestehenden akuten Leberzellschädigung durch das Tumorwachstum (SCHMIDT et al., 1985). Lebermetastasierung führt häufig zu Leberschäden mit fettiger Degeneration bis hin zur Leberzirrhose (PEPPERCORN et al., 1998). Die ermittelten Blutwerte zeigen, daß keine toxische Belastung von der Therapie ausgeht. Die dramatisch erhöhten Glucosewerte sind nur als eine Stressreaktion infolge der Manipulation bei der Blutentnahme erklärbar. Die erniedrigten Albuminwerte sind Folge der proteinarmen Standarddiät. Die außer bei der Kontrollgruppe rückläufigen Transaminasen zeigen, daß durch die Behandlung keine therapiebedingte Toxizität induziert wird. Bei den lokoregionär mit Liposomen behandelten Gruppen 3 und 4 war die Überlebensrate signifikant gegenüber allen anderen Gruppen verlängert. Die längste mittlere Überlebenszeit von 8 Wochen wurde in Gruppe 4 (5-FU-SUV-PEG + Spherex® i.a.) erreicht. Die alleinige liposomale Therapie in Gruppe 3 (5-FU-SUV-PEG i.a.) war mit durchschnittlich 6 Wochen Überleben deutlich schlechter. Der prognostische Wert der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AIGNER, 1987) der verschiedenen Therapievarianten in den vorangegangenen Anreicherungsversuchen wird durch die Ergebnisse dieser Studie bestätigt. Bei der besten Therapiegruppe, die mit 5-FU-SUV-PEG + Spherex® behandelt wurde, war noch nach 72 Stunden Medikament nachweisbar.

Die unterschiedlichen Therapieeffekte der verschiedenen Gruppen dieser tierexperimentellen Studie sind nicht einfach durch die Verknüpfung von liposomal verkapselter lokoregionärer Therapie und Embolisation erklärbar. Die Verkapselungsrate des 5-FU von 10 % erscheint in Relation zum Ausmaß der Response in der erfolgreichsten Therapiegruppe sehr gering. Die Wirksamkeit der Behandlung hängt entscheidend von der Konzentration des verfügbaren Therapeutikums ab. Freies 5-FU wird sehr schnell ausgeschieden (PINEDO et al., 1988) und so sind die gefundenen anhaltend hohen Anreicherungen erstaunlich. Parallel zu den tierexperimentellen Untersuchungen wurde deshalb innerhalb der Arbeitsgruppe versucht, die vermuteten synergistischen Effekte zwischen 5-FU, Liposomen und Spherex® nachzuweisen. Von besonderem Interesse war hierbei die Lokalisation und Bedeutung des unverkapselten 5-FU für den Therapieeffekt und mögliche Interaktionen zwischen den Therapiekomponenten. Am wahrscheinlichsten sind Interaktionen zwischen 5-FU und den Polyethylenglykolketten auf der Oberfläche der Liposomen. Zur Bestimmung möglicher Wechselwirkungen wurde eine zweidimensionale Nuclear OVERHAUSER Enhancement Spectroscopy (2D NOESY) durchgeführt. Sie basiert auf dem nach seinem Entdecker benannten OVERHAUSER-Effekt. Dieser bezeichnet die Änderung der Intensität des Kernsignals bei Sättigung der zugehörigen Elektronenspinresonanz. Die Übertragung des Experiments auf ein System von dipolar

gekoppelten Kernspins bildet die wichtigste Grundlage für die Bestimmung der räumlichen Struktur mit Hilfe der MRT (HAUSSER et al., 1989). Der Kern-OVERHAUSER-Effekt beruht auf Polarisationsänderungen, die als Signalveränderungen nach Sättigung der Resonanz eines der beiden gekoppelten heterologen Kernspins bestimmbar sind. Da die dipolare Kopplung abstandsabhängig ist, ist auch die Größe des Kern-OVERHAUSER-Effektes abstandsabhängig, wodurch die interatomaren Abstände quantifizierbar sind. Anhand der Ausbildung von Crosspeaks, die nur bei sehr geringen Abständen zwischen gekoppelten Kernen nachweisbar sind, lassen sich Kopplungen unterschiedlicher Kerne nachweisen (CAVIOSO et al., 1987).

In den 2D NOESY-Untersuchungen konnten eindeutig Interaktionen zwischen den Kopfgruppen der PEG-Ketten und den Protonen des freien 5-FU nachgewiesen werden, die auch von anderen Autoren bestätigt wurden (NEEDHAM et al., 1992). Die extreme Steigerung der Konzentrations-Zeit-Kurve bei der effektivsten Gruppe erklärt sich durch die ebenfalls mit der 2D NOESY nachgewiesene Kopplung zwischen den Spherex®-Partikeln und den PEG-Schwänzen, die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar gemacht werden konnte. Die SUV-PEG-Liposomen sind wie ein Geflecht auf den viel größeren Stärkemikrosphären angeordnet (RESZKA et al., 1999). Als mögliche Ursache für die starke Therapiereaktion der Gruppen 3 und 4 wird der Mechanismus eines sequentiellen Releasesystems aufgrund der nachgewiesenen Interaktion zwischen 5-FU und den PEG-Ketten sowie zwischen den PEG-Ketten und den Spherex®-Partikeln diskutiert. Die spezifische, extreme Anreicherung des 5-FU ist durch die beschriebenen Kopplungsphänomene unter Berücksichtigung von Erkenntnissen der Biologie und Struktur von Tumoren und den bereits bekannten Daten über Chemoembolisationen erklärbar. Bei der Kombination mit Spherex® kommt es durch die passagere, periphere Embolisation zu einer gesteigerten Akkumulation des Therapiekonstruktes im gut durchbluteten Tumoranteil (JAIN, 1997). Die selektive Embolisation entsteht bei der intraarteriellen Applikation, bei der die 20 - 45 µm großen Spherex®-Teilchen mechanisch aufgrund ihrer Größe bevorzugt in den kleinen angiogenetischen Gefäßen der Leber hängenbleiben (ZETTER, 1998). Da die Tumore nach der Invasion sehr schnell eine eigene Blutversorgung aufbauen müssen (JAIN, 1997), kommt es zu einer gesteigerten Angiogenese (FOLKMAN, 1997). Die neu gebildeten Gefäße sind häufig defekt (ZETTER, 1998) und haben eine erhöhte Anzahl an Fenestrationsen, die sogar Makromoleküle passieren können (DVORAK et al., 1988). Die vaskuläre Permeabilität wird durch die Größe eines Stoffes und die Interaktion mit den Endothelzellen bestimmt, die, einschließlich der Zwischenzellverbindungen, von einer Glycocalix überzogen sind. Das Ausmaß der Absorption an diese Glycocalix bestimmt die Extravasationsfähigkeit (CURRY, 1986). Die räumliche Anordnung der Polyethylenglykolketten auf der Oberfläche der 5-FU-SUV-PEG-Liposomen verursacht Abstoßungsreaktionen (NEEDHAM et al., 1992), die eine Bindung an die Glycocalix verhindern und für die gesteigerte Permeation im Vergleich zu konventionellen Liposomen verantwortlich sind (WU et al., 1993).

Hinzu kommen die spezifischen Druckverhältnisse im Tumor. BOUCHER et al., (1990) stellten bei intratumoralen Druckmessungen verschiedener Tumore fest, daß der Druck im Zentrum sehr hoch ist und zur Peripherie hin abnimmt. Im vitalen Randsaum geht der Druck gegen Null. Die in den angiogenetischen Gefäßen festsitzenden Partikel werden durch den arteriellen Blutdruck, der, bedingt durch die Okklusion, lokal erhöht ist, in ihrer Lage fixiert. Durch die Bindung der Liposomen auf den Spherex®-Teilchen werden sie im Embolisationsbereich festgehalten und können durch die Endothellücken der Gefäße extravasieren (ROMERO et al., 1999) und sich aufgrund des geringen Druckes im Randbereich des Tumors anreichern.

CAY et al., (1997) fanden nach intraarterieller Behandlung von Lebertumoren an Mäusen eine bevorzugte Anreicherung von Liposomen in kleinen Tumoren und am Rand hypovaskulärer größerer Tumore. Anhand elektronenmikroskopischer Bilder konnten sie die perinukleäre, zytoplasmatische Aufnahme der Liposomen in die Tumorzellen nachweisen. Die Inkorporation intakter Liposomen wurde von DAEMEN et al., (1997) bestätigt. Die Aufnahme der Liposomen geschieht wahrscheinlich über Endozytose und ist entscheidend von der Lipidkomposition abhängig (DINI et al., 1998).

Die anhaltend hohe Konzentration des 5-FU im Tumor erklärt sich durch die unterschiedliche Position von verkapselter und unverkapselter Substanz. Zuerst wird das unter den PEG-Schirmen gebundene Medikament freigesetzt, dann erfolgt die Abgabe des verkapselten Anteils. Die verzögerte Freisetzung des 5-FU von den Liposomen verhindert die vorzeitige Ausscheidung (JOSHI et al., 1993) und garantiert eine protrahierte Anreicherung im Gewebe (SEGAL et al., 1975).

Die bei einmaliger liposomaler Applikation erreichten hohen Wirkstoffkonzentrationen gewährleisteten einen entscheidenden antiangiogenetischen Effekt und führen zur festgestellten Signalreduktion im Tumorgewebe und einer Tumorreduktion über 14 Tage. Die angestrebte Sequenztherapie zur weiteren Steigerung der Effektivität der lokoregionären Behandlung war bei diesem experimentellen Tiermodell nicht durchführbar. Diese Therapieoption ist in der Humanmedizin bereits etabliert (HILGENFELD et al., 1996).

Basierend auf den in dieser Studie ermittelten Daten wird eine klinische Phase I/II - Prüfung vorgeschlagen.