

Aus dem der Klinik für Kieferchirurgie und Plastische Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Antitumorale in-vivo-Wirksamkeit von Epigallocatechingallat
bei topischer Applikation in Kombination mit der Elektroporation
am oralen Plattenepithelkarzinom im Nacktmausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Opri

aus Rüdersdorf

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Dr. B. Hoffmeister
 2. Priv.-Doz. Dr. Dr. B. Saka
 3. Prof. Dr. Dr. Dr. h. c. K. Wangerin

Datum der Promotion: 05.06.2011

Zusammenfassung

Die Elektrochemotherapie ist eine neue Form der Lokaltherapie solider Tumoren. Nach vorheriger intratumoraler Zytostatikainjektion erfolgt im Intervall von wenigen Minuten die lokale Applikation definierter Spannungsstöße. Durch Anpassung der Impulsparameter kommt es zu einer reversiblen Störung der Membranstruktur mit Erhöhung der Permeabilität für hydrophile Ionen, Proteine und DNS-Fragmente, die sich entsprechend dem Konzentrationsgradienten verteilen. Bleomycin ist in der Elektrochemotherapie als Zytostatikum etabliert. Der hydrophile Molekülcharakter ermöglicht eine auf das Elektroporationsareal beschränkte, intrazelluläre Anreicherung. Folge ist eine lokale Erhöhung der Toxizität bei reduzierter Dosis.

Das Grüntee catechin Epigallokatechingallat ist auf Grund seiner tumorpräventiven und zytostatischen Eigenschaften Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Das günstige Nebenwirkungsprofil macht die Substanz für den Einsatz in der Elektrochemotherapie interessant. In Vorversuchen wurde die Reduktion des Wachstums von KB-Tumorzellen durch Elektrochemotherapie mit Epigallokatechingallat im Vergleich zu Bleomycin, Epikatechin und einer Kontrollgruppe untersucht. Für Epigallokatechingallat sowie Bleomycin wurde eine signifikante Wachstumssuppression nachgewiesen. Im in-vivo-Modell mit 48 T-zelldefizienten Mäusen (Typ NMRI) wurden in zwei Versuchsreihen Plattenepithelkarzinome (human, Zunge) erzeugt und nach Erreichen einer Größe von 0,6 bzw. 1,0 cm³ in sechs Versuchsgruppen aufgeteilt. Den Versuchstieren wurde PBS (Gruppe A und B), Bleomycin (Gruppe C und E) oder Epigallokatechingallat (Gruppe D und F) intratumoral injiziert. Die Tumore der Gruppen B, C und D wurden 10 min nach Injektion zusätzlich einer Elektroporation unterzogen. Im vierwöchigen Nachbeobachtungszeitraum wurde der Wachstumsverlauf der Tumoren dokumentiert. Am Tag 28 erfolgte die Tötung der Versuchstiere und Explantation der Tumore mit histologischer Aufarbeitung.

Unabhängig von der Elektroporation zeigten die Gruppen mit PBS- und Epigallokatechingallatbehandlung (Gruppen A, B, D, F) eine Tumorprogression (181 – 232,5 % der Ursprungsgröße). Die Injektion von Bleomycin ohne anschließende Elektroporation (Gruppe E) führte zu einer Stagnation der Tumorgröße (106,5 % der Ursprungsgröße). Zu einer signifikanten Verkleinerung mit zum Teil kompletter Remission (4,5 % der Ursprungsgröße)

kam es unter der Elektrochemotherapie mit Bleomycin (Gruppe C). Der Antikörper MIB1 belegte in Gruppe E eine Restaktivität und in Gruppe C keinerlei Teilungsaktivität der Tumorzellen.

Die in-vivo-Ergebnisse bestätigen für Bleomycin eine Wirkungsverstärkung durch Elektroporation. Für Epigallokatechingallat konnte weder in der Elektrochemotherapie noch für die Reinsubstanz eine signifikante antitumorale Wirkung nachgewiesen werden. Die Elektroporation hat in Kombination mit Bleomycin zu einer deutlich Wirkungsverstärkung geführt, was für eine geeignete Auswahl der Parameter der Elektroporation spricht. Unterschiede finden sich in der Pharmakodynamik. Der Wirkmechanismus der Katechine ist nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise auf intra- und extrazelluläre Signaltransduktionswege. Würde die antitumorale Wirkung durch extrazelluläre Rezeptorbindung vermittelt (z.B. tNOX, LR1), führte eine Elektroporation zu keiner Wirkungsverstärkung. Als weitere Ursache für eine fehlende in-vivo-Wirksamkeit des Katechins sind noch ungeklärte interstitielle sowie zytosolische Interaktionen in Betracht zu ziehen.

Die Elektrochemotherapie mit Bleomycin ist eine neue tumorspezifische und nebenwirkungsarme Möglichkeit der lokalen Tumorthherapie. Inwieweit Katechine als zukünftiges antitumorales Substrat geeignet sind, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Die durchgeführten Vorversuche lassen einen positiven Effekt vermuten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Ziel dieser Arbeit	1
2	Standards in Diagnostik und Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle	2
2.1	Risikoverteilung	2
2.2	Diagnostik	2
2.3	Therapie	3
3	Grundlagen der Elektroporation	5
3.1	Entwicklung der Elektroporation	5
3.2	Die Zellmembran und ihre Eigenschaften	5
3.3	Theorie der Elektroporation	6
3.4	Parameter der Elektroporation	7
3.4.1	Elektrisches Feld und Schwellenpotential	7
3.4.2	Impulsanzahl und Impulsdauer	9
3.4.3	Spannungsmuster	10
3.4.4	Applikation	12
4	Elektrochemotherapie	15
4.1	Entwicklung	15
4.2	Tumorspezifität	16
4.3	Vascular lock	17
4.4	Beteiligung des Immunsystems	17
4.5	Elektrochemotherapie (ECT) und Multi-Drug-Resistance (MDR)	18
4.6	Therapieparameter	18
4.6.1	Zytostatikainjektion	18
4.6.2	Dosierung	19
4.6.3	Impulsstärke und Impulslänge	20
4.7	Grenzen der Elektrochemotherapie	21
4.8	Nebenwirkungen	21

5	Zytostatika	22
5.1	Anforderungen im Rahmen der Elektrochemotherapie	22
5.2	Bleomycin	23
5.2.1	Aufbau	23
5.2.2	Pharmakodynamik	23
5.2.3	Resistenzen	23
5.2.4	Pharmakokinetik	25
5.2.5	Nebenwirkungen	26
5.2.6	Anwendung	26
5.3	Epigallokatechingallat (EGCG)	26
5.3.1	Aufbau	26
5.3.2	Pharmakodynamik	27
5.3.3	Resistenzen	32
5.3.4	Pharmakokinetik	32
5.3.5	Nebenwirkungen	33
5.4	Weitere Chemotherapeutika	33
6	Material und Methoden	34
6.1	Vorversuch	34
6.1.1	Zielsetzung	34
6.1.2	Material	34
6.1.3	Methoden	35
6.1.4	Ergebnis und Diskussion	36
6.2	Hauptversuch	37
6.2.1	Zellen und Medium	38
6.2.2	Tiermodell	38
6.2.3	Implantation und Wachstum	38
6.2.4	Elektrochemotherapie	39
6.2.5	Beobachtung	40
6.2.6	Tötung und Explantation	40
6.2.7	Aufarbeitung und Färbung	40
6.2.8	Statistische Auswertung	42

7	Ergebnisse	44
7.1	Wachstumsverhalten im Beobachtungszeitraum	44
7.2	Makro- und mikroskopische Beurteilung	46
7.3	Statistische Betrachtung und Auswertung	55
8	Diskussion	58
8.1	Vergleichsdaten	58
8.2	Unterschiede in vivo versus in vitro	59
8.2.1	Feldstärke und Schwellenpotential	59
8.2.2	Wirkstoffverteilung und Permeabilität	60
8.3	Pharmakokinetik	61
8.4	Pharmakodynamik	61
8.4.1	Bleomycin	61
8.4.2	EGCG	62
8.4.3	Inaktivierung von EGCG	63
8.5	Schlussfolgerung	63
9	Literaturverzeichnis	66
10	Abkürzungsverzeichnis	74
11	Danksagung	77
12	Selbständigkeitserklärung	78
13	Curriculum vitae	79

1 Einleitung und Ziel dieser Arbeit

Jährlich erkranken in Deutschland ca. 430.000 Menschen an Krebs [1]. Davon entfallen auf den Mund- und Rachenbereich (ICD 140-149) ca. 10.400 Fälle (3,3 %) [1, 2]. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen ist zwischen 1950 und 2000 um das 6-fache angestiegen. Seit der Jahrtausendwende ist eine Stagnation zu beobachten [3]. In 95 % der Fälle handelt es sich um Plattenepithelkarzinome bei langfristigem Tabak- und Alkoholkonsum als prädisponierende Faktoren.

In der Therapie maligner Tumoren des Gesichtsbereiches werden neben dem kurativen Aspekt hohe Ansprüche an die Erhaltung der Funktionalität und Ästhetik gestellt. Das kurative Behandlungskonzept ist abhängig von verschiedenen Faktoren (u.a. Tumorgröße, Lymphknotenstatus, Differenzierungsgrad, Lokalisation), jedoch grundsätzlich multimodal. Chirurgische Resektion und postoperative Radiochemotherapie stellen zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Standardtherapie dar. Die alleinige Radiochemotherapie ist im palliativen Bereich etabliert [12]. Monoklonale Antikörper als zusätzliche Therapiemaßnahme befinden sich im Stadium der Erprobung [109].

Die Elektrochemotherapie stellt eine neue Form der Therapie solider Tumoren dar. Sie ermöglicht eine gezielte, lokale Tumorbehandlung ohne Zerstörung gesunden Gewebes. Die Zielzellen werden einem lokal begrenzten elektrischen Feld ausgesetzt. Dies führt zu einer temporären Störung der Zellmembranstruktur mit Bildung kurzlebiger Elektroporen. Die dadurch bedingte erhöhte Permeabilität ermöglicht interstitiellen Substanzen, z.B. Zytostatika, eine Anflutung und Wirkungsentfaltung im Zytosol. Auf Grund der lokalen Anwendung ist nur ein Bruchteil der systemisch zu verabreichenden Wirkstoffdosis notwendig. Die Elektrochemotherapie ist nebenwirkungsarm, unabhängig von der Histologie, kosteneffektiv und ambulant durchführbar [31]. Der aktuelle Forschungsstand umfasst klinische Studien der Phasen I, II und III mit Melanomen, Tumoren des Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereiches und Hautmetastasen von Melanomen. Der klinische Einsatz konzentriert sich momentan auf therapieresistente und metastasierte Tumoren. Das Chemotherapeutikum der Wahl ist Bleomycin [37].

Die sogenannten Katechine, Inhaltsstoffe des Grüntees, sind Gegenstand zahlreicher experimenteller und klinischer Studien. Beschrieben sind antikanzerogene und zytotoxische

Effekte auf Tumorzellen. Katechine sind nebenwirkungsarm und kostengünstig in der Gewinnung.

Ziel der vorliegenden Studie ist die Untersuchung der antitumoralen in-vivo-Wirksamkeit einer Elektrochemotherapie mit Epigallokatechingallat. Im Vergleich zur isolierten Chemotherapie wird eine signifikante Steigerung der Zytotoxizität erwartet. Nach Durchführung orientierender Vorversuche erfolgt die Therapie und Untersuchung von oralen Plattenepithelkarzinomen am Mausmodell. Zwecks Kontrolle der Versuchsanordnung und Evaluierung der Ergebnisse wird zeitgleich eine Behandlung weiterer Versuchstiere mit Bleomycin durchgeführt.

2 Standards in Diagnostik und Therapie des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle

2.1 Risikoverteilung

Unter den häufigsten Krebserkrankungen finden sich Tumore des Mund- und Rachenbereiches, bei Männern auf dem siebten Platz. Prädisponierende Faktoren sind langfristiger Tabak- und Alkoholkonsum. Tabakrauchen und der Genuss von Kautabak erhöhen das Krebsrisiko im Mund- und Rachenbereich durchschnittlich um das Sechsfache. 90 % der Patienten rauchen oder haben längere Zeit geraucht, 80 % besitzen eine positive Alkoholanamnese. Der Konsum von Alkohol und Tabak wirkt synergistisch und erhöht das Krebsrisiko auf das 15fache. Die häufigsten Manifestationsorte in der Mundhöhle sind Zunge, Zungengrund und Wangenschleimhaut [93]. Männer erkranken am Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle früher und fast dreifach so häufig wie Frauen. Der steigende Tabakkonsum unter Frauen führte in den 1990er Jahren zu einem Anstieg der Inzidenz, der langsam in eine Abnahme übergeht. Die männliche Population zeigt seit 1995 einen Rückgang der Inzidenz. Das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Frauen liegt im 63. Lebensjahr. Männer erkranken etwas früher im 61. Lebensjahr [1, 2].

2.2 Diagnostik

Entscheidend für die Prognose ist die frühzeitige Erkennung und Therapie. Eine Untersuchung von Bornstein et al. (1990 – 2002) zeigte, dass zwischen den ersten Symptomen und der Diagnosesicherung durchschnittlich 4 - 5 Wochen vergehen [28] Zwischen ersten Symptomen und Diagnosesicherung sollten nicht mehr als 3 Wochen liegen. Die Verdachtsdiagnose wird

durch Inspektion der Mundhöhle und Halsorgane gestellt und parallel zur radiologischen Umgebungsdiagnostik (Sonographie, CT, MRT) histologisch gesichert.

Die Entstehung des invasiven oralen Plattenepithelkarzinom ist vermutlich ein kontinuierlicher Prozess auf der Basis von Vorläuferläsionen und prämaligen Konditionen. Zu den Vorläuferläsionen (Präkanzerosen) gehören unter anderem die Leukoplakie und die Erythroleukoplakie. Entsprechend der WHO-Klassifikation der Kopf-Hals-Tumoren wird zur Einteilung der Vorläuferläsionen das Konzept der intraepithelialen Neoplasien (squamöse intraepitheliale Neoplasie = SIN) angewandt. Die Einteilung erfolgt über einfache Hyperplasien, geringgradige Dysplasien (SIN I), mäßiggradige Dysplasien (SIN II) hin zu hochgradigen Dysplasien (SIN III). Letztgenannte Gruppe beinhaltet bereits das Carcinoma in situ (CIS). Zu den prämaligen Konditionen, also tumorbegünstigenden Erkrankungen werden z. B. der Lichen planus, der Lichen erosivus oder auch die orale Manifestation des Lupus erythematoses gezählt [91].

Der Durchbruch der Basalmembran dient als Unterscheidungsmerkmal zwischen Carcinoma in situ und Mikrokarzinom. Als mikroinvasiv werden Tumoren mit Eindringtiefen unter 2 mm bezeichnet. Diese Differenzierung beruht auf der Beobachtung der von der Eindringtiefe abhängigen lokalen Metastasierungsrate. Tumoren bis 7 mm Eindringtiefe zeigen einen prognostisch günstigeren Therapieverlauf. Die Tumore wachsen endophytisch (99 %), in seltenen Fällen auch exophytisch (1 %). Niedrigdifferenzierte endophytische Tumore mit trabekulärem Wachstum zeigen eine schnell voranschreitende Metastasierung [91]. Verruköse Karzinome hingegen wachsen lokal destruierend und metastasieren auf Grund ihres hohen Differenzierungsgrades nur selten.

Der zervikale Lymphknotenbefall stellt einen unabhängigen Prognosefaktor dar. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose präsentieren 40 % der Patienten Lymphknotenmetastasen. Zum Ausschluss einer Metastasierung in Lunge, Leber und Skelettsystem wird präoperativ ein Staging mittels Röntgenthorax, CT oder Sonografie durchgeführt [12].

2.3 Therapie

Der kurative Ansatz erfolgt multimodal und beinhaltet immer eine chirurgische Tumorexzision. Kleine, gut erreichbare Tumore der Mundhöhle werden transoral entfernt. Tiefliegende

Karzinome erfordern einen seitlichen Zugang über die Wange oder eine Erweiterung der Mundöffnung nach kaudal mit Mandibulotomie. Eine Maxill- oder Mandibulektomie kann erforderlich sein.

Die makroskopische R0-Resektion muss histopathologisch durch einen Schnellschnitt und spätere Komplettaufarbeitung bestätigt werden. Über 40 % der als makroskopisch tumorfrei bewerteten Resektionsränder zeigen in der feingeweblichen Untersuchung Mikrometastasen [87, 29]. Im Falle einer non-in-sano-Resektion (R1, R2) sollte nachreseziert und postoperativ eine radiotherapeutische Behandlung des Tumorbettes angeschlossen werden. Bei Tumoren > pT2 erfolgt unabhängig vom Resektionsergebnis eine adjuvante Radiotherapie. Die Nebenwirkungen der Strahlentherapie umfassen akute und chronische Veränderungen im Bereich der Haut, Schleimhaut und Speicheldrüsen und werden nach den RTOG/EORTC-Kriterien klassifiziert. Ein etablierter Ansatz zur kurativen Chemotherapie existiert nicht. Inoperable Tumore werden palliativ einer kombinierten Radiochemotherapie mit Platinverbindungen, 5-Fluoruracil oder Bleomycin unterzogen [12].

Bei Befall von Halslymphknoten, zur Sicherung eines N₀-Befundes oder bei hoher Wahrscheinlichkeit einer Mikrometastasierung ist zusätzlich eine Neck Dissection notwendig [88]. Unabhängig vom Lymphknotenstatus wird in der Regel eine selektive Neck-dissection mit zielgerichteter Lymphknotenentfernung durchgeführt [94]. Lindberg beobachtete ein in Grenzen vorhersagbares Metastasierungsmusters. Ort, Größe und Invasionstiefe des Primärtumors entscheiden, welche Lymphstationen entfernt werden. Bei 90 % der N₊-Patienten wird so eine komplette Sanierung erreicht. Ein Lymphknotenstatus >pN1 benötigt eine adjuvante Strahlentherapie [88].

Die Zweitkarzinomrate liegt bei 10 %. Alkohol- und Nikotinkonsum erhöhen das Risiko zusätzlich [85]. Die Erhaltung von Zunge, Mandibula und Hals- und Schluckmuskulatur sind für die spätere Lebensqualität des Patienten essentiell. Im Bereich des Unterkiefers ist nach umfassender Resektion häufig eine plastische Rekonstruktion notwendig.

3 Grundlagen der Elektroporation

3.1 Entwicklung der Elektroporation

Die Elektropermeabilisation oder Elektroporation ist in der in-vitro-Zellforschung ein etabliertes Verfahren der Transfektion von Bakterien, Tier- und Pflanzenzellen [4]. Elektrische Impulse vorgegebener Spannung, Dauer und Form führen zu einer reversiblen Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran. Auf diesem Weg können Ionen und kleine Makromoleküle unabhängig von ihrer natürlichen Permeationsfähigkeit in das Zytosol gelangen.

In den 1970er Jahren entdeckt, fand die Elektroporation erstmals 1982 bei der Herstellung transgener Organismen Anwendung. Neumann et al. nutzten das Verfahren zur Übertragung von DNS-Plasmiden auf Tumorzellen [4]. Gegenüber retroviralen Vektoren und der Lipofektion ist das Verfahren schnell und ohne Nebenwirkungen durchführbar. Die benötigten Substratmengen sind geringer und vektorbedingte Immunantworten fehlen [5]. Gegenstand der Forschung ist die in-vivo-Transfektion von Tumorzellen mit Marker- und Funktionsgenen [6]. Ein Beispiel ist die erfolgreiche Immunmodulation nach Einschleusung von chemokinkodierenden Genen in Tumorzellen [10]. Andere Gruppen beschäftigen sich mit der elektroporationsgestützten transdermalen Applikation von Medikamenten [7,9] oder der Nutzung von elektropermeabilisierten Blutbestandteilen als Carrier für Pharmazeutika [8].

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Kombination aus Elektroporation und Chemotherapie. Karzinome oder Metastasen werden einer schwach dosierten intravenösen oder intratumoralen Chemotherapie unterzogen. Anschließend wird lokal die Wirksamkeit des Chemotherapeutikums durch die Elektroporation erhöht. In diesem Zusammenhang wird auch von einer Elektrochemotherapie gesprochen. Als Wirkstoff hat sich Bleomycin etabliert [19, 20].

3.2 Die Zellmembran und ihre Eigenschaften

Die Zellmembran ist eine Doppellipidmembran. Phosphoglyceride und Sphingolipide bilden ihre Hauptbestandteile. Charakteristisch für die Lipide sind eine hydrophile Kopfgruppe und hydrophobe Alkylderivatketten. Auf Grund dieser Eigenschaften organisieren sich die Moleküle in einer wässrigen Umgebung zu homogenen, 4 - 5 nm dicken Doppellayern. Die hydrophoben Enden lagern sich aneinander, während die hydrophilen Kopfgruppen nach außen gewandt bleiben. Glykolipide und Cholesterinmoleküle stabilisieren den Verband. Je nach

Zusammensetzung enthält die Zellmembran neben Lipiden 20 - 40 % Proteine und einen kleinen Anteil Kohlenhydrate. Die Membranproteine sind vor allem an Transportvorgängen und der Signaltransduktion beteiligt. Die Kohlenhydrate spielen u. a. eine Rolle in der Zellerkennung.

Der Membranaufbau erlaubt lipophilen Verbindungen, Gasen und kleinen polaren Stoffen wie z. B. Harnstoff eine nahezu widerstandslose Passage der Zellmembran. Ihre Verteilung und Diffusion werden durch das Ficksche Diffusionsgesetz beschrieben:

$$J = -D \cdot \frac{A}{d} \cdot \Delta c$$

J	= Diffusion $\Delta m/\Delta t$
D	= Diffusionskoeffizient
A	= Fläche
d	= Schichtdicke
Δc	= Konzentrationsgradient

Ionen und hydrophile Teilchen sind auf spezialisierte Transportwege in und aus der Zelle angewiesen. Für Ionen existieren Gap Junctions, Kanalproteine und Trägermoleküle. Die Verteilung erfolgt ligandenreguliert, spannungsreguliert oder folgt stochastischen Austauschverhältnissen. Größere Moleküle überwinden die Zellmembran mittels Transport-ATPasen sekundär aktiv. Das zuerst entdeckte Transportprotein ist das MDR-Protein (multidrug resistance). Dieses entfernt in Zellen eingedrungene Zytostatika unter Energieverbrauch aus dem Zellinnern.

3.3 Theorie der Elektroporation

Die Plasmamembran stellt für viele Makromoleküle eine Diffusionsbarriere dar. Dies mindert die Wirksamkeit von Pharmaka, Zytostatika und DNS-Bestandteilen. Relevant für die Permeationsfähigkeit einer Verbindung sind Größe, Ladungsverteilung und Vorhandensein eines entsprechenden Transportsystems. Neumann et al. haben gezeigt, dass sich bei der Elektroporation durch das Anlegen einer elektrischen Spannung die Membrandurchlässigkeit der im elektrischen Feld befindlichen Zellen signifikant steigern lässt [4]. Dieses Phänomen ist von kurzer Dauer und reversibel. Intrazelluläre Membranen, wie die der Mitochondrien, werden hiervon nicht beeinflusst.

Zu den genauen physiologischen Abläufen bei der Elektropermeation existieren verschiedene Theorien: Unter Anlage hoher Spannungen und in hypoosmolarer Umgebung angefertigte

elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen kleine Membranporen [21]. Der Theorie zufolge ermöglichen die sogenannten Elektroporen einen raschen transmembranen Stofffluss. Nicht erklärbar bleibt, weshalb das Verfahren auch bei geringer Spannung und ohne Nachweis entsprechender Poren funktioniert. Eine weitere Theorie vermutet, dass die zugeführte Energie innerhalb der Plasmamembran zu einer verstärkten Molekülbewegung führt. Kurzfristige Umstrukturierungen führen zu kleinen, reversiblen Einrissen mit hydrophobem Charakter, sogenannten „transienten Poren“ [22].

Es gibt Hinweise auf zwei ineinander übergehende Porenstrukturen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Nach einem Spannungsimpuls finden sich für wenige Millisekunden größere Lochstrukturen. Moleküle bis zu einer Größe von mehreren kDa können kurzfristig die Zellmembran überwinden. Hierbei passieren nur wenige in der unmittelbaren Umgebung befindliche Moleküle die Membran, ohne dass es zu einem Konzentrationsausgleich kommen kann. Für kleinere Moleküle und Ionen bleibt die Zellmembran noch Sekunden bis Minuten permeabel. Dabei wird ein Übergang der großen „transienten“ Poren in kleine stabilere Porenstrukturen postuliert [24].

Der Wiederverschluss, das sogenannte Resealing, unterliegt verschiedenen Einflussgrößen: Die Temperatur beeinflusst über die Brownsche Molekularbewegung die Zeitspanne der Membranreorganisation in Abhängigkeit von der Porengröße, dem osmotische Druck, der Ladungsverteilung und der Elektroporationsparameter (Feldstärke, Dauer, Frequenz). Der jeweilige Anteil dieser Faktoren ist Gegenstand der aktuellen Forschung [24, 23].

3.4 Parameter der Elektroporation

Die Aufnahme von Molekülen in die Zielzelle ist bei der Elektroporation von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören das spezifische Schwellenpotential, Impulscharakteristika wie Länge und Dauer, das Spannungsmuster und die Applikationsform.

3.4.1 Elektrisches Feld und Schwellenpotential

Während der Elektroporation wird zwischen zwei Elektroden eine Spannung (U) angelegt. Aus dem Quotienten der Spannung (U) und dem Abstand der Elektroden (d) ergibt sich die elektrische Feldstärke (E):

$$E = \frac{U}{d} \quad [E] = 1 \frac{V}{m}$$

Zwischen den Elektroden befinden sich in einem entsprechenden Medium die zu permeabilisierenden Zellen. In Abhängigkeit vom spezifischen elektrischen Widerstand (φ) des Mediums kommt es zu einem Stromfluss. φ ist abhängig von der Ionenkonzentration und beträgt zwischen 100 Ωcm für physiologische Salzlösungen und mehreren $\text{k}\Omega\text{cm}$ für nichtionische Lösungen. Die sich daraus ergebende Stromdichte j errechnet sich wie folgt:

$$j = \frac{E}{\varphi} \quad [j] = 1 \frac{A}{\text{cm}^2}$$

Zellmembranen besitzen in vitro eine im Gegensatz zum Medium geringe Leitfähigkeit. Dadurch kommt es beim Aufbau des elektrischen Feldes zur Entstehung eines transmembranen Potentials (ΔV_m). Dieses ist abhängig von der elektrische Feldstärke und dem Zellradius (r):

$$\Delta V_m = \frac{3}{2} E \cdot r \cdot \cos \Theta$$

r	= Zellradius
E	= elektrische Feldstärke
ΔV_m	= transmembranen Potential
Θ	= magnetische Durchflutung

Es kann gezeigt werden, dass zur erfolgreichen Elektroporation in Abhängigkeit von der Zellgröße das Überschreiten eines spezifischen Schwellenpotentials ΔV_s notwendig ist [25].

$$\Delta V_s = \frac{3}{2} E_s \cdot r$$

r	= Zellradius
E_s	= elektrische Feldstärke
ΔV_s	= Schwellenpotential

ΔV_s liegt je nach Zellart zwischen 0,6 und 1,1 V. Die Formel zeigt die Abhängigkeit von der Feldstärke E und dem Zellradius r . Bakterien benötigen eine Feldstärke von mehreren kV/cm , während für größere Pflanzenzellen einige hundert V/cm ausreichen. Die für die Elektroporation von humanoiden Zellen erforderlichen Feldstärken betragen 300 - 500 V/cm für Tumoren, 450 V/cm für Muskulatur, 380 V/cm für Leberzellen [26] und 3kV/cm für Erythrozyten [24]. Diese Werte gelten unter Normalbedingungen und homogener elektrischer Feldverteilung. Um die

Feldstärke und Impulsdauer müssen bei der Elektroporierung dem jeweiligen Substrat angepasst werden. DNS-Plasmide benötigen längere Impulse (10 ms) kombiniert mit schwächeren Feldstärken (105 V/cm). Chemotherapeutika wie Bleomycin benötigen kurze Spannungsstöße (100 µs) mit hohen Feldstärken (> 600 V/cm) [28]. Eine ursächliche Klärung dieser Spezifität steht noch aus.

Die Anzahl der Spannungsstöße n hat ebenfalls Einfluss auf die Permeabilisation und verhält sich mit der Dauer t gleichsinnig. Die Effektivität der Elektroporation ist direkt abhängig vom Produkt nt , so dass oberhalb der Schwellenwerte beide Parameter gegeneinander verschoben werden können [51]. Feldstärke, Impulsdauer und Impulszahl verhalten sich gleichsinnig und ermöglichen eine multifaktorielle Beeinflussung der Elektroporation.

3.4.3 Spannungsmuster

Für die in-vitro-Elektroporation werden Generatoren mit einer exponentiell abfallenden Spannung verwendet (Abb.2). Ihre Funktionsweise beruht auf der Entladung großer Kondensatoren. Nach einer langsamen Aufladephase erreichen sie ihre Maximalspannung, welche bei Entladung exponentiell abfällt. Die theoretische Pulslänge, definiert als die Zeit zwischen Maximalspannung und Erreichen eines Wertes von $1/e$ der Ladespannung ($e = 2,718$), ist abhängig vom Widerstand des Mediums. Veränderungen in der Zusammensetzung des Mediums und des Abstandes der Elektroden haben Einfluss auf den Widerstand (R) und damit die Entladungszeit.

$$U_c = U_0 e^{-\frac{\Delta t}{RC}}$$

U_c	= Kondensatorspannung
U_0	= Leerlaufspannung
R	= Widerstand
C	= Kapazität
Δt	= Zeit seit Beginn der Entladung

Generatoren auf Kondensatorbasis besitzen mehrere Nachteile. Auf Grund der Heterogenität einer Zellsuspension ist eine exakte Berechnung der Entladung nicht möglich. Ebenfalls problematisch ist die im Vergleich zur mittleren Spannung hohe Anfangsspannung. Ein Impuls von 780 - 1500 V/cm benötigt eine deutlich höhere Maximalspannung. Dies führt zu einer vermehrten Anzahl an Zelllysen und birgt die Gefahr eines Lichtbogens mit hohem Stromfluss

und Hitzeentwicklung. Mikroben tolerieren kurzzeitige Temperaturanstiege besser als eukaryote Zellen, weshalb kondensatorgestützte Spannungsquellen für die Elektroporation von Bakterien eingesetzt werden können. Dabei finden Feldstärken bis 2500 V/cm und Impulslängen von bis zu 5 ms Verwendung [28]. Kondensatorgestützte Generatoren sind sehr kostengünstig.

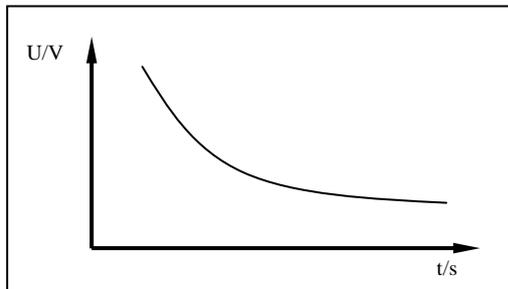


Abb. 2 Exponentieller Abfall der Spannung bei Kondensatorgeneratoren

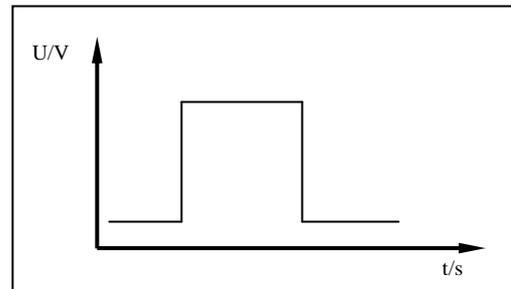


Abb. 3 Generator mit Rechteckspannung

In vivo werden Generatoren mit Rechteckspannung verwendet (Abb.2). Diese sind teuer, erlauben auf Grund ihres gradlinigen Spannungsverlaufes jedoch eine optimale Steuerung der Elektroporation. Gewünschte Amplitude und Dauer können im Vorfeld eingestellt werden. Diese Generatoren basieren ebenfalls auf einer kapazitiven Entladung, verwenden jedoch mehrere Kondensatoren und begradigen Spannungsspitzen. Rechteckspannungen eignen sich v. a. für Pflanzen-, Tier- und humanoide Zellen [30].

Eine weitere Applikationsmöglichkeit sind Radiofrequenzgeneratoren. Hiermit können sinusförmige, rechteckige oder exponentielle Impulse mit Frequenzen von bis zu 50.000 Hz erzeugt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, zwischen monopolaren oder bipolaren Mustern zu wählen. Bisher sind in der Elektrochemotherapie noch keine in-vivo-Versuche durchgeführt worden. Es gibt Hinweise, dass Radiofrequenzimpulse für die Zellintegrität verträglicher sind [30].

Der für die in-vivo-Therapie eingesetzte Impulsgenerator ist der MedPulser® der Firma Genetronics, ein auf Rechteckspannung basierender Generator mit der Möglichkeit der Programmierung von Spannungen, Dauer und Polarität (Abb.4).



(Abb. 4) MedPulser® Inovio (Genetronics)

3.4.4 Applikation

Die Applikation der Spannungsimpulse muss den jeweiligen Anforderungen angepasst werden. Für die in-vitro-Elektroporation kommen Glas- oder Kunststoffküvetten mit Aluminium-, Stahl- oder Edelmetallelektroden zur Anwendung (Abb.5). Elektrodengröße und Plattenabstand sind abhängig vom Volumen der Probe. Zu beachten ist, dass mit Vergrößerung des Elektrodenabstandes die Homogenität des elektrischen Feldes abnimmt. Größere Flächen senken den Widerstand, was durch weniger leitfähige Medien ausgeglichen werden muss. Aus diesem Grund werden vorzugsweise Küvetten mit 2 - 4 mm Abstand verwendet.



Abb. 5 Standard in-vitro-Küvette der Firma BTX

„Flowthrough Chambers“ ermöglichen die Elektroporation von Zellsuspensionen mit größeren Volumina (> 50 ml). Die Zellen werden nicht statisch behandelt, sondern im Fluss kontinuierlich durch ein elektrisches Feld geleitet und dabei elektroporiert. Um die Zahl der Zelllysen gering zu halten, können schwächere Felder mit mehreren Zyklen kombiniert werden [30].

Die in-vivo-Elektroporation wird in erster Linie bei kompakten Zellverbänden (z. B. Tumoren) durchgeführt. Zelladhäsion und spezielle elektrostatische Eigenschaften benötigen ein angepasstes Vorgehen. Des Weiteren müssen die Applikatoren für eine klinische Anwendung geeignet sein und ein ausreichendes Maß an Sicherheit gewährleisten. Subkutan liegende Tumoren können transdermal klammerartig mit Plattenelektroden fixiert und elektroporiert werden (Abb.6). Durch Veränderung des Plattenabstandes, der Größe und der Spannung lässt sich das elektrische Feld dem Zielvolumen anpassen.

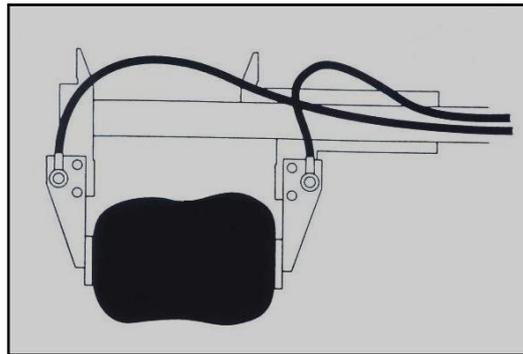


Abb. 6 Plattenelektroden

Auf Grund des geringen Wassergehaltes besitzt das Stratum corneum ($15\ \mu\text{m}$) im Vergleich zum darunterliegenden Gewebe einen vielfach höheren Widerstand. Die dadurch entstehende Spannungskonzentration führt zu einer Erwärmung der Haut, was Zellysen und Verbrennungen zur Folge haben kann. Durch ungleichmäßigen Hautkontakt und in den Randbereichen der Elektroden kommt es ebenfalls zu einer Konzentration des elektrischen Feldes mit entsprechenden thermischen Läsionen. Abgerundete Elektrodenecken und Kontaktgel reduzieren dieses auch als „edge effect“ bezeichnete Phänomen [32, 34]. Große, tieferliegende Tumore werden vom elektrischen Feld der Plattenelektroden nicht voll erfasst oder benötigen eine höhere Spannungen, die zu beschriebenen Läsionen führt [33].

Alternativ werden nadelförmige Elektroden transdermal in den Tumor eingeführt. Das stratum corneum wird dadurch überbrückt, thermische Hautschäden reduziert und umliegende Strukturen geschont. Erstmals wurden solche Nadelelektroden bei der experimentellen Behandlung von Hirntumoren bei Fischer-Ratten verwendet [35]. Der nahezu punktförmige Elektrodenquerschnitt führt zu einem spindelförmigen Feldverlauf zwischen den Polen. Im Gegensatz zu den Plattenelektroden entsteht dadurch ein inhomogenes Feld mit Konzentrationsspitzen im Bereich

der Nadeln (Abb.7). Die beschriebenen thermischen Effekte treten nur punktuell im zu therapierenden Zielgebiet auf.

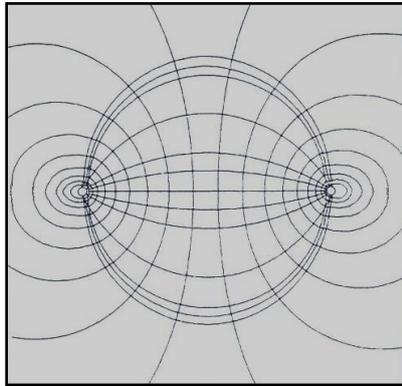


Abb. 7 2-Nadelmuster Feldverteilung

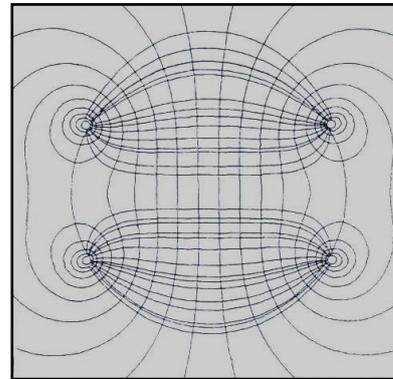


Abb. 8 4-Nadelmuster Feldverteilung

Um die Homogenität zu verbessern, wurden Mehrnadelelektroden entwickelt, wobei sich das Sechs-Nadel-Muster etabliert hat (Abb.9). Sechs im Kreis angeordnete Nadelelektroden werden in einer vorgegebenen Reihenfolge durchgeschaltet, so dass wie oben abgebildet jeweils vier aktiv sind. Zwei nebeneinander liegende Nadeln bilden die Kathode und ihr gegenüberliegendes Paar die Anode (Abb.8). Nach jedem Spannungsstoß rotiert das Muster im Uhrzeigersinn um eine Elektrode bzw. 60° weiter. In Summe werden sechs Impulse verabreicht. Ein Computerprogramm stützt die Errechnung der für eine vollständige Elektroporation benötigten Spannung [36]. Unter Applikation mehrerer rotierender Impulse entsteht im Zentrum durch Addition ein homogenes Elektroporationsfeld. Die jeweilige Einzelspannung kann reduziert und somit thermische Schäden minimiert werden. Da die benötigte Spannung von der Elektrodendistanz abhängig ist, sind Nadelapplikatoren zur Vermeidung von Feldkonzentrationen auf einen Durchmesser von 10 bis 15 mm begrenzt. Außerhalb der Elektrodenanordnung fällt die Feldstärke exponentiell ab, so dass das umliegende Gewebe unbeeinträchtigt bleibt.



Abb.9 6-Nadel Applikator GF 3101 (Firma Inovio)

Um alle Tumoranteile zu erfassen, sollten die distalen Elektrodenenden über das Zielgewebe hinausragen. Die Länge der Nadeln unterliegt keiner Begrenzung. Proximale Anteil können isoliert oder Abstandhalter eingesetzt werden [37]. Größere Bereiche werden durch mehrfache Applikation elektropermeabilisiert.

Der Einsatz von Multi-Nadel-Gittern ist weitestgehend verlassen. Die in einer Lochplatte entsprechend dem Zielgebiet verteilten Nadeln werden in quadratische Vierergruppen zusammengefasst und nach dem oben beschriebenen Prinzip durchgeschaltet. Auf diese Art wird das zu behandelnde Gebiet in Würfel unterteilt und in Sequenzen elektroporiert. Die Anwendung ist für einen klinischen Einsatz zu aufwendig [33].

4 Elektrochemotherapie

4.1 Entwicklung

Okino und Mohri nutzten 1987 als Erste erfolgreich eine Kombination aus Elektroporation und Bleomycin zur Behandlung des hepatozellulären Karzinoms (AH-109A) am Donryu-Ratten-Modell [11]. 30 Min. nach einer intramuskulären Injektion von 5 mg Bleomycin erhielten die Tumore einen einmaligen Spannungsstoß. Der Impuls dauerte 2 ms bei einer Stärke von 5 kV/cm und wurde über zwei externe Plattenelektroden vermittelt. Nach vier Tagen zeigten die Tumore eine durchschnittliche Remission auf 17 % der Initialgröße. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass sich das Überleben der Testtiere um über 200 % verlängerte. Das verwendete hepatozelluläre Malignom vom Typ AH-109A ist in vivo, ausgenommen Mitomycin-C, konventionell nicht chemosensibel [32]. Bleomycin reichert sich auf Grund seines hydrophilen Molekülcharakters nur zu einem geringen Teil (0,1 %) im Zytosol an. Die Durchführung einer Elektroporation führt zu einem intrazellulären Konzentrationsanstieg auf das 300 - 700fache mit einem zytotoxischen Wirkungsanstieg um das bis zu 10.000fache [33, 70].

Andere Tumor-Maus-Modelle, z. B. beim Pankreaskarzinom, malignen Melanom, kolorektalen Karzinom oder Mammakarzinom, zeigten ähnliche Ergebnisse [13, 14, 15,16].

Die ersten klinischen Studien veröffentlichten Mir et al. 1991 mit acht an Plattenepithelkarzinom des Mundraumes erkrankten Patienten [19, 20]. Die Tumore waren zuvor erfolglos einer konventionellen, palliativen Chemotherapie unterzogen worden. Einer intravenösen Injektion

von 10 mg/m^2 folgte 3,5 Min. später die Tumorelektroporation mittels Plattenelektroden. Die dabei eingesetzte Menge an Bleomycin entsprach einem Sechstel der in der konventionellen Chemotherapie gewichtsadaptierten Dosis. Im Vergleich zu den in-vivo-Versuchen von Okino et al. erfolgte die mehrfache Applikation von bis zu acht Spannungstößen bei einer Feldstärke von $1,3 \text{ kV/cm}$. Von 40 behandelten Tumorknoten zeigten 23 (57 %) eine Komplet- und 6 (15 %) eine Teilremission. Die ersten Veränderungen in Form von Nekrosen und Inkrustierung traten 3 Tage nach Behandlung auf. Die Kompletremissionen heilten nach Wochen zum Teil narbenfrei ab. Tumorknoten ohne entsprechende Kombination aus Elektroporation und Bleomycin zeigten im Wachstum keine Veränderung. Mir et al. verwendeten erstmals den Begriff der Elektrochemotherapie (ECT) [19, 20].

In den letzten Jahren erfolgte mehrere Phase-II- und -III-Studien mit verschiedenen Tumoren. Bei der ESOPE- (European Standard Operating Procedure on Electrochemotherapy) Studie wurden multizentrisch 41 Patienten mit 171 Hautmetastasen unterschiedlicher Primärtumore einer Elektrochemotherapie mit Bleomycin oder Cisplatin unterzogen. Alle Patienten hatten zuvor die entsprechenden Standardtherapien erfolglos durchlaufen. Die Histologie der Tumoren wurde bei der Auswahl nicht berücksichtigt. 73,7 % der Metastasen zeigten eine Kompletremission, definiert als eine Tumorreduktion von mehr als 50 %. 11,1 % entwickelten eine partielle Remission mit einer Verkleinerung von weniger als 50 %. 10,5 % der Tumoren zeigten keine Veränderung und 4,7 % ein progressives Wachstum. Toxische Nebenwirkungen wurden nicht festgestellt. 96 % der Patienten hätten bei Bedarf einer erneuten Behandlung zugestimmt [71]. John et al. zeigten in einer vergleichbaren Arbeit eine Ansprechrate (komplette oder partielle Remission) von 82 % [72]. Weitere klinische Phase-II- und -III-Studien sind aktuell in Vorbereitung oder laufen.

4.2 Tumorspezifität

Die in einer systemischen Chemotherapie verwendeten Bleomycinkonzentrationen schädigen neben den Malignomzellen auch gesundes, proliferierendes Gewebe. In den bisher durchgeführten klinischen Studien wurden für die Elektrochemotherapie durchschnittlich 10% der konventionellen Dosen benötigt. Dies bedeutet eine wesentlich geringere Belastung des Gesamtorganismus. Weiterhin konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass sich gesundes Gewebe unter Elektrochemotherapie deutlich stabiler verhält und weniger Schäden aufweist als Tumorgewebe. Dieser Unterschied ist dosisabhängig [56]. Ursächlich für die erhöhte

Empfindlichkeit der Malignomzellen ist zum einen die stoffwechselbedingt gesteigerte Chemosensibilität und zum anderen die größere Dichte an transienten Elektroporen. Dies steht vermutlich mit dem unkontrolliert beschleunigten Zellstoffwechsel des Tumorgewebes in Zusammenhang [56, 51].

Die Effizienz der Elektrochemotherapie ist unabhängig von der Tumorhistologie. Die klinischen Studien umfassen mehrere Tumorentitäten und verwenden für alle die gleichen Therapiestandards. Dabei lassen sich in der Wirkung keine entitätsabhängigen Unterschiede erkennen [71, 72].

4.3 Vascular lock

Untersuchungen ergaben, dass es zeitgleich mit der Elektroporation zu einer Widerstandszunahme im Gefäßsystem kommt [55]. Ursächlich ist eine, durch das elektrische Feld ausgelöste Aktivierung lokaler sympathischer Nervenfasern mit anschließender Vasokonstriktion. Fünf Minuten nach Ende der Elektropermeation liegt die Sauerstoffsättigung als Ausdruck der Vasokonstriktion und Minderperfusion 75 % unter der Norm, nach sechs Stunden noch 30 % darunter. Eine erniedrigte Sauerstoffsättigung war noch nach über 24 Stunden nachweisbar [55]. Der als „vascular lock“ bezeichnete Effekt könnte ein längeres Verbleiben des Chemotherapeutikums im häufig hypervaskularisierten Tumorgewebe bewirken und so den Effekt der Elektrochemotherapie verstärken [45].

4.4 Beteiligung des Immunsystems

Es ist nicht anzunehmen, dass bei der Elektrochemotherapie alle Tumorzellen in ausreichendem Maße elektroporiert und mit Bleomycin geimpft werden. Dennoch kommt es reproduzierbar zu Komplettremissionen ohne Nachweis vitaler Tumorzellen. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Ansprechrate in immunkompetenten Mäusen höher ist als in immundefizienten Versuchstieren [53]. Diese Beobachtungen weisen auf eine Aktivierung des Immunsystems hin. Sersa et al. beobachteten nach Behandlung eine erhöhte Aktivität der T-Lymphozyten und Monozyten. Durch Applikation des monoklonalen Antikörpers OKT₃ gegen T-Lymphozyten ließ sich die Effektivität der Elektroporation signifikant senken. Dementsprechend konnte der Einsatz des Immunmodulators IL-2 zu einer erhöhten Remissionsrate beitragen [53, 54].

4.5 Elektrochemotherapie (ECT) und Multi-Drug-Resistance (MDR)

Ein in der Chemotherapie bedeutsames Problem ist die Multi-Drug-Resistance (MDR). Die für Bleomycin in Frage kommenden Mechanismen werden im Folgenden behandelt (siehe 5.2.3 Resistenzen). Durch die Entstehung von Elektroporen strömt ein Vielfaches der sonst passiv diffundierenden Moleküle nach Intrazellulär. Veränderte Bindungsproteine im Bereich der Zellmembran oder langsame Exozytosevorgänge zeigen nach der Elektrochemotherapie keinen, oder nur noch einen geringen Einfluss auf die intrazelluläre Konzentration [33].

4.6 Therapieparameter

4.6.1 Zytostatikainjektion

Bei der intravenösen Verabreichung sind die Verteilungszeit und das Verteilungsvolumen zu berücksichtigen. Während am Mausmodell der optimale Zeitpunkt für eine intravenöse Gabe 3 - 7 Min. vor Elektroporation beträgt, zeigten Domenge et al. für den Menschen ein Zeitfenster von 8 - 28 Min. [34]. Die Dosierung wird dabei anhand der Körperoberfläche ermittelt und liegt in der Regel unter der konventionellen Gesamtdosis. Problematisch ist die zentral verminderte Tumordurchblutung sowie der intratumoral erhöhte Turgor. Die Aufnahme peripher zirkulierender Zytostatika ist dadurch messbar eingeschränkt.

Verglichen mit der intravenösen Verabreichung bietet die intratumorale Injektion eine gezieltere Distribution ohne Abhängigkeit von der Durchblutungssituation. Durch den Einsatz einer geringeren Substanzmenge können Nebenwirkungen reduziert werden. Die Dosisberechnung richtet sich dabei nach der Tumormasse. Die Injektion muss langsam und fächerförmig erfolgen, um eine möglichst hohe Substanzkonzentration im Tumorgewebe zu erreichen. Bei der Behandlung mehrerer Knoten kann durch die intratumorale Injektion jeder Tumor einzeln infiltriert und elektroporiert werden. Heller et al. konnten in einer klinischen Studie zeigen, dass sich bei einem Wechsel der Applikationsart von intravenös auf intratumoral die Ansprechrate von 72 % auf 99 % steigern lässt. Die Rate der Komplettremissionen stieg von 33 % auf 91 % [37].

Das optimale Zeitfenster für die intratumorale Injektion ist kürzer als bei der intravenösen Gabe und liegt bei 0 - 15 Min. vor Elektroporation. Bisher gibt es keine exakten Daten über den Konzentrationsverlauf. Abhängig von den physiologischen Verhältnissen geht man bei einem.

Injektion-Elektroporations-Abstand von unter drei Minuten von 70 % und bei weniger als 10 Min. von 30 - 50 % der Ausgangskonzentration der Zytostatika aus [27]. Die Zugabe von vasokonstriktiven Substanzen wie Adrenalin kann einen zu schnellen venösen Abfluss verhindern und so das Zeitfenster für die Elektroporation vergrößern. Eine standardmäßige Anwendung konnte sich jedoch nicht etablieren [37].

Eine weitere Alternative stellt die intraarterielle Gabe dar. Bei apparativ und medizinisch größerem Aufwand minimiert dieses Vorgehen die direkte Manipulation am Tumor. Hierfür müssen die versorgenden Gefäße z. B. mit Hilfe eines Farbstoffes oder einer Angiografie selektiv identifiziert und punktiert werden. Vorteil im Vergleich zur intratumoralen Injektion ist die gezieltere Zufuhr des Zytostatikums. Bisher gibt es keine Daten zum Vergleich zwischen intratumoraler und intraarterieller Injektion. Die intratumorale Gabe ist die klinisch etablierte Applikationsform.

4.6.2 Dosierung

Bleomycin ist Bestandteil vieler etablierter Chemotherapieregime (BEACOPP, ABVD). Die Dosierung pro Zyklus beträgt 10 - 30 mg/m² und muss je nach Schema mehrfach wiederholt werden. Auf Grund unterschiedlicher biologischer Aktivitäten wird die Dosis heute nicht mehr in Milligramm sondern in Unit angegeben. Ein Milligramm enthält je nach Potenz 1,5 - 2,0 Units Bleomycin. Im Mausmodell werden bei der Elektrochemotherapie intravenös minimal 10 µg oder 0,025 U pro Tier verabreicht [49]. Die intravenöse Infusion beim Menschen erfolgt mit 15 mg/m² oder 18 - 27 U/m². Diese Dosierung ist vergleichbar mit der einer konventionellen Chemotherapie, erfolgt jedoch nur einmalig [34, 45].

Die intratumorale Gabe ist nicht von der Körperoberfläche, sondern von der Tumorgröße abhängig (Tab.1). Dabei wird kein Unterschied zwischen Tiermodell und Patient gemacht. In den meisten Studien verhält sich die Dosierung wie folgt:

Tumorvolumen/ mm ³	Dosis/ Units
<100	0,5
100 - 150	0,75
150 - 500	1,0
500 - 1000	1,5

1000 - 2000	2,0
2000 - 3000	2,5
3000 - 4000	3,0
4000 - 5000	3,5
>5000	4,0

Tab. 1 Bleomycinmenge in Abhängigkeit vom Tumolvolumen

Bei der Behandlung multipler Knoten sollte kontrolliert werden, ob die Summe der einzelnen Tumordosen die einer normalen intravenösen Dosis erreicht. Liegt sie darüber, sollten 15 mg/m² Chemotherapeutikum zentral appliziert werden, um eine Akkumulation zu vermeiden.

4.6.3 Impulsstärke und Impulslänge

Bei Bleomycin handelt es sich im Vergleich zu anderen Elektroporations-Substraten um ein kleines Molekül. Dementsprechend ist ein Impuls von hoher Spannung und kurzer Dauer nötig. Die ersten in-vitro-Versuche der Elektrochemotherapie ergaben für Bleomycin einen logarithmischen Verlauf der Feldstärke-Überlebenskurve. Ab 800 V/cm (bei 100 µs Pulslänge) kam es zu einer steilen Zunahme apoptotischer Zellen. Eine vollständige Eradikation der Tumorzellen zeigte sich ab 1300 V/cm [50]. Die Parameter wurden zuerst für in-vivo-Versuche, später in klinischen Studien erfolgreich übernommen. Mit der Einführung der (invasiven) Nadelelektroden wurde eine Anpassung der Parameter notwendig. Das Wegfallen der Hautbarriere sowie der geringere Abstand zwischen den Elektroden verringern das Schwellenpotentials ΔV_s . Im Bereich von 600 - 780 V/cm kommt es je nach Zellart zu einer 70 %igen Ansprechrate [51]. Die Pulsgeneratoren der Firma Genetronics geben automatisch je nach Applikator und Elektrodenabstand eine Feldstärke von bis zu 1500 V/cm vor. Entscheidend bei der Auswahl der Feldstärke ist nicht das Applikatorzentrum, sondern der periphere elektrodennahe Bereich. Die Feldstärke nimmt außerhalb des Elektrodenkreises in Abhängigkeit von der Entfernung logarithmisch ab. Um im Randbereich noch eine ausreichende Elektroporation zu gewährleisten, muss dies durch eine höhere Spannung kompensiert werden.

Neuere Daten zeigen, dass je nach Tumorentität eine individuelle Anpassung der Parameter eine Effektivitätssteigerung bewirken kann. Lewis-Lungentumore z. B. profitieren von einer längeren

Pulsdauer bei gleichbleibender Feldstärke [52]. Demnach bedarf es weiterer Untersuchungen zur Optimierung der Pulsstärke und -länge für verschiedene Tumorarten.

4.7 Grenzen der Elektrochemotherapie

Die Mehrzahl der bisherigen Daten über die Elektrochemotherapie wurden *in vitro* oder *in vivo* an kleinen oberflächlichen Tumoren gewonnen. Durch Weiterentwicklung des Elektrodendesigns können mittlerweile auch größere Tumoren behandelt werden. Dabei ist zu beachten, dass mit dem Durchmesser auch die Heterogenität der Tumorzellen zunimmt. Zellen im Tumorrinnern sind auf Grund schlechterer Wachstums Voraussetzungen und begrenzter nutritiver Versorgung bis zu 30 % kleiner als periphere Zellen. Da die notwendige Feldstärke direkt vom Zellradius abhängt, besteht hier die Gefahr der nicht ausreichenden Elektroporation. Zudem ist die Diffusionsstrecke länger und das Bleomycinreservoir kleiner. Bei unzureichender Anpassung der Parameter kann die Effektivität der Elektrochemotherapie abgeschwächt werden [57].

Applikatoren der neueren Generation ermöglichen die Elektroporation tief liegender Tumore. Lange, nach proximal isolierte Elektroden können bis in das Zielgewebe vordringen, ohne das oberflächliche Gewebe dem elektrischen Feld auszusetzen. Die Kombination aus endoskopischem Zugang und flexiblen Elektroden ermöglicht einen endoluminalen Einsatz.

4.8 Nebenwirkungen

Die Elektrochemotherapie wird in der Regel unter Sedation oder Allgemeinanästhesie durchgeführt. Nicht analgosedierte Patienten beschreiben die durch die Impulse verursachten Muskelkontraktionen als schmerzhaft. Neue Untersuchungen weisen darauf hin, dass eine Erhöhung der Pulsfrequenz von 1 Hz auf 200 Hz die Refraktärzeit der Muskelfasern unterschreitet. Eine Repolarisation zwischen den Impulsen ist nicht möglich und der Patient nimmt anstatt von z. B. acht Impulsen nur eine Muskelkontraktion wahr. Die Effektivität der Elektroporation bleibt in diesem Frequenzbereich unverändert [58].

Ebenfalls unerwünscht ist die lokale Überwärmung des Gewebes. Durch die hohe Feldkonzentration im elektrodennahen Bereich kommt es zur Erwärmung mit thermischen Läsionen, die Rötung, Ödeme und Nekrosen umfassen. In den bisherigen klinischen Studien

zeigten sich die Läsionen lokal begrenzt und wenig schmerzhaft. Die Abheilung des therapierten Areals erfolgte nach Abbau der Nekrose in der Regel problemlos. Wundheilungsstörungen sind selten [51].

Patienten mit einem Herzschrittmacher werden vorsichtshalber von der Elektrochemotherapie ausgeschlossen. Die Impulse der Elektroporation bilden sich im EKG ab, haben jedoch keinerlei Einfluss auf Blutdruck, Erregungsleitung und Herzfrequenz.

Durch Zytostatika verursachte Nebenwirkungen hängen von der jeweiligen Substanz und Dosierung ab. Die im Vergleich zur konventionellen intravenösen Bleomycintherapie verwendete Substanzmenge ist geringer. Extratumorale Effekte sind damit selten und schwach ausgeprägt.

5 Zytostatika

5.1 Anforderungen im Rahmen der Elektrochemotherapie

In der klassischen Chemotherapie ist die zytostatische Wirksamkeit eines Substrates bei intrazellulärem Wirkmechanismus direkt abhängig von der zellulären Aufnahme. Diese kann passiv oder durch aktive Transportmechanismen erfolgen. Da die zelluläre Doppellipidmembran das Eindringen hydrophiler Substanzen verhindert, ist für die passive Membranpassage Lipophilität eine Voraussetzung.

Im Rahmen der Elektrochemotherapie ermöglicht die Elektroporation die Membranpassage unabhängig von der Polarität und begrenzt den Effekt auf das induzierte elektrische Feld. Demnach besitzt das für die Elektrochemotherapie optimale Zytostatikum einen intrazellulären Wirkmechanismus bei hydrophilem Molekülcharakter. Zellen außerhalb des elektrischen Feldes reichern auf Grund der schlechten passiven Diffusion nur geringe intrazelluläre Wirkstoffmengen an. Innerhalb des elektrischen Feldes erfolgt ein gezielter zytoplasmatischer Einstrom.

Lipophile Substanzen wie Daunorubicin, Etoposid und Paclitaxel sind für die Elektrochemotherapie nicht geeignet, da sie sich durch passive Diffusion entsprechend dem Konzentrationsgradienten unspezifisch verteilen. Erwartungsgemäß brachte die Verwendung in der Elektrochemotherapie im Vergleich zur systemischen Chemotherapie keinen Vorteil [17].

5.2 Bleomycin

5.2.1 Aufbau

Bleomycin basiert auf einem von *Streptomyces verticillus* produzierten, hydrophilen Molekülgemisch. Das Glykopeptid-Antibiotikum besitzt ein Molekulargewicht von ca. 1500 Dalton und wurde erstmals 1966 von Umezawa et al. beschrieben [45, 51]. In Abhängigkeit von der Besetzung der terminalen Aminogruppe werden mehrere Moleküle unterschieden, wobei BLM-A2 (60 %) und BLM-B2 (30 %) den größten Anteil ausmachen (Abb. 10).

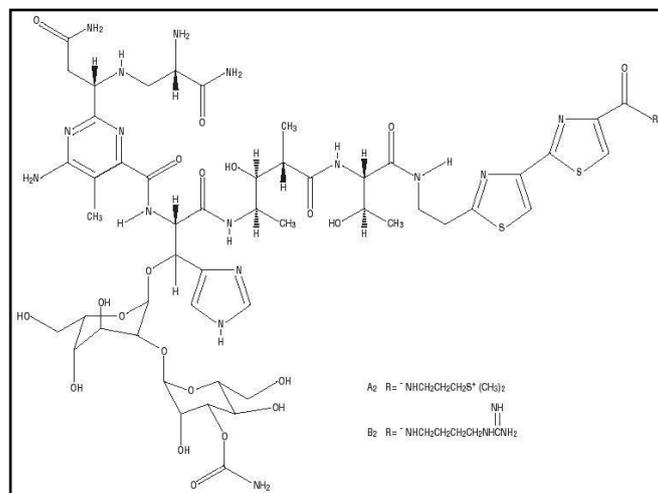


Abb. 10 Bleomycin mit terminalen Aminogruppen A₂ und B₂

Das Grundgerüst besitzt vier Regionen: Die terminale Aminogruppe ist verantwortlich für die Bindung an Nukleinsäuren. Der Bithiazolabschnitt dockt im Bereich der kleinen DNS-Kurvatur an. Diese beiden Bindungsstellen sind für den Bruch der DNS verantwortlich. Der dritte Teil bindet Metallionen und erkennt spezifische DNS-Abschnitte. Die Bindungsstelle des vierten, aus Disaccharidketten bestehenden Abschnittes ist noch Gegenstand der Forschung [41].

5.2.2 Pharmakodynamik

In-vitro-Tests mit radioaktiv markiertem Bleomycin zeigen eine intrazelluläre Anreicherung von maximal 0,1 % des in Lösung enthaltenen Bleomycins. Für den zytosolischen Nachweis ist eine Inkubation von mehreren Stunden notwendig. Untersuchungen von Poddevin et al. zeigen, dass intrazellulär angereichertes Bleomycin auch nach Wechsel des Mediums aus dem Zytosol nicht mehr freigesetzt wird [44]. Dies schließt eine passive Membrandiffusion als Eintrittsweg aus, da

ansonsten eine Rückdiffusion nachweisbar sein müsste. In der Zellmembran konnten eine 250 kDa große Bleomycin-Bindungsstruktur und ein in seiner Wirkungsweise noch unbekannter Transportmechanismus identifiziert werden. Es gibt Hinweise darauf, dass es sich dabei um ein Bindungsprotein handelt, das die Endozytose von Bleomycin einleitet. Weitere Ergebnisse stehen noch aus [92].

Intrazellulär zeichnet sich Bleomycin durch eine hohe intrinsische Zytotoxizität aus. Das Metallion des Kupfer-(II)-Komplexes wird im Zytosol zu einwertigem Kupfer reduziert, oder in mehreren Schritten durch ein dreiwertiges Eisenion ersetzt. Die aktivste Form stellt Bleomycin-Fe(III)-OOH dar. Zielstruktur ist die DNS-Desoxyribose. Unter Elektronenaufnahme und Abgabe der Carboxylgruppe erfolgt zunächst die Durchtrennung eines DNS-Stanges. Hierbei geht eine der beteiligten Basen verloren. Dieser Vorgang erfolgt katalytisch, wodurch ein einziges Bleomycinmolekül bis zu 10 Strangbrüche initiieren kann [42]. Durch Aufnahme eines Elektrons und Protons wird der Bleomycinkomplex reaktiviert. Bleibt die Bindung an die Desoxyribose bestehen, so kann es bei jedem 6. - 20. Strangbruch zu einer Durchtrennung der zweiten Helix und damit zu einer kompletten Unterbrechung der DNS kommen. Brückenabschnitte in viel transkribierten Abschnitten der DNS, sogenannte internukleosomale Linkerregionen, sind die häufigsten Bindungsstellen für Bleomycin. In-vitro-Tests zeigen, dass die ersten Strangbrüche 30 s nach Aufnahme in die Zelle nachweisbar sind [92]. Durch einen noch unbekanntem Mechanismus wird in der S-Phase ATM- (Ataxie-Telangiektasie Mutation) abhängig eine Signaltransduktionskette in Gang gesetzt. Folge ist ein Zellzyklusstopp. Kann ein Strangbruch durch Ligasen nicht repariert werden, können genetische Aberrationen wie Deletionen, Basenaustausch und Ringbildung entstehen oder Chromosomenanteile verloren gehen. In der Mehrzahl der Fälle kommt es im Folgenden zu einer Aktivierung von p53 und Induktion der Apoptose. Auf Grund der katalytischen Wirkung reichen einige hundert Moleküle aus, um die Reparaturmechanismen zu überfordern und den Zelltod auszulösen. Dafür bedarf es etwa der dreifachen Verdopplungszeit. Nimmt die Zelle eine deutlich größere Substanzmenge ($> 10^6$) auf, kommt es zu einer schnelleren Fragmentation der DNS. Die Apoptose erfolgt binnen Minuten bis Tagen [92].

Neben Strangbrüchen führt Bleomycin zu Basenverlusten, Oxidation der RNA und Inaktivierung intrazellulärer Moleküle wie der Lipidperoxidase [92]. Mutagene Wirkungen sind selten und beruhen vermutlich auf einer fehlerhaften DNS-Reparatur [43].

5.2.3 Resistenzen

Bisher sind vier verschiedene Resistenzmechanismen beschrieben [41].

(1) Die Bleomycin-Hydrolase ist ein desaminierendes und deaktivierendes Enzym, welches erstmals bei Bleomycin-produzierenden Organismen nachgewiesen wurde. Die Bleomycinresistenz beim Burkitt-Lymphom, Lungen- und Kolonkarzinom ist wahrscheinlich auf dieses Enzym zurückzuführen.

(2) Des Weiteren wurden in den beschriebenen Mikroben Bleomycin-bindende Proteine gefunden. Hochspezifisch formen sie stabile Komplexe mit dem Chemotherapeutikum und verhindern so eine Bindung an die DNS.

(3) Für die intrazelluläre Aufnahme spielen Bindungsproteine eine Rolle. In Plattenepithelkarzinomzellen (A253) konnte nachgewiesen werden, dass eine Reduktion entsprechender Membranproteine die Aufnahme von Bleomycin verringern kann.

(4) Der vierte Resistenzmechanismus besteht in einer gesteigerten DNS-Reparatur und ist unspezifisch. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Endonuklease APE1.

Das Multi-Drug-Resistance-Gen, welches eine erhöhte Aktivität des P-Glykoproteins kodiert, hat auf Bleomycin keinen Einfluss [92].

5.2.4 Pharmakokinetik

Die Elimination des nicht gebundenen Bleomycins erfolgt größtenteils renal. Bei normaler Nierenfunktion unterliegt die Elimination zwei Phasen. Die Verteilungs-Halbwertszeit beträgt ca. 24 - 30 Min., die daran anschließende Eliminations-Halbwertszeit 2 - 4 Stunden. Innerhalb der ersten 24 Stunden werden über 70 % ausgeschieden. Ob die Elektroporation durch intrazelluläre Anreicherung die biologische Halbwertszeit lokal beeinflusst, ist noch ungeklärt [92].

5.2.5 Nebenwirkungen

Im Vergleich zu anderen klassischen Zytostatika zeigt Bleomycin in therapeutischer Dosis nur wenige unerwünschte Nebenwirkungen. Die Knochenmark- und immunsuppressive Wirkung ist gering. Wichtigste Nebenwirkung ist die dosisabhängige Lungenfibrose, die ab einer kumulativen Dosis von 300 mg/m² auftritt. Es erkrankten 46 % aller behandelten Patienten, 3 % verstarben an den Folgen [92]. Selten sind Erytheme, Hyperpigmentationen, Fieber, Übelkeit und Erbrechen.

5.2.6 Anwendung

Bleomycin wird heute in der Therapie von Lymphomen, Plattenepithelkarzinomen und malignen Hodentumoren angewandt. Die Gabe erfolgt intravenös, subkutan, intramuskulär oder intratumoral. Auf Grund seiner geringen intrazellulären Aufnahme wird es grundsätzlich mit weiteren Chemotherapeutika kombiniert.

Bleomycin erfüllt mit seiner Hydrophilie, der hohen intrinsischen Zytotoxizität und dem geringen Nebenwirkungsspektrum drei Grundvoraussetzungen für einen Einsatz in der Elektrochemotherapie. Bisher ist für die Elektrochemotherapie kein vergleichbar geeignetes Zytostatikum beschrieben.

5.3 Epigallokatechingallat (EGCG)

Katechine gelten in geringer Konzentration als unbedenklich und frei von Nebenwirkungen. Ihr antikanzerogenes Potential auf maligne Zellen konnte in mehreren Studien, u. a. Bettuzzi et al., belegt werden [76, 77]. Der Gebrauch in der Elektrochemotherapie soll zeigen, ob die intrazelluläre EGCG-Konzentration gesteigert werden kann und dies zu einer entsprechend stärkeren antitumoralen Wirkung führt. Vergleichbare Versuche mit EGCG und Elektroporation liegen zu diesem Zeitpunkt nicht vor.

5.3.1 Aufbau

Grüner Tee wird aus den Blättern von *Camellia sinensis* hergestellt. Medizinisch wirksame Hauptbestandteile sind Polyphenole. Dazu gehören die Katechine, die bis zu 30 % des

Feststoffanteils des gebrühten Tees ausmachen. Die vier wichtigsten Katechine sind: Epigallokatechingallat (ca. 50 - 80 %) (Abb.11), Epigallokatechin (ca. 20 - 30 %), Epikatechingallat (ca. 10 - 20 %) und Epikatechin (ca. 10 %).

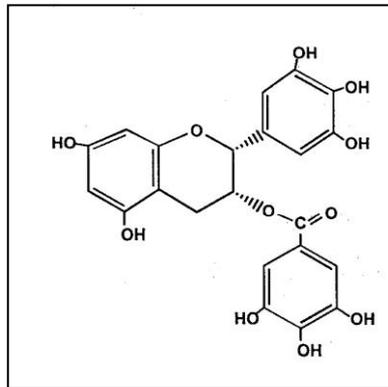


Abb. 11 Epigallokatechingallat

Neben positiven Effekten auf Diabetes mellitus, koronare Herzerkrankungen und Neurodermitis ist vor allem die antikanzerogene Wirkung Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. In Tierexperimenten konnte unter anderem eine inhibitorische Wirkung auf Karzinome der Lunge, Haut, Brust, Ösophagus, Leber, Magen, Lymphozyten und der Mundhöhle nachgewiesen werden [46]. Epidemiologische Erhebungen haben gezeigt, dass regelmäßiger Konsum grünen Tees das Karzinomrisiko in Lunge, Kolon, Magen, Blase und Prostata reduziert. Auf Grund des uneinheitlichen Studiendesigns weisen die Daten jedoch noch eine erhebliche Varianz auf. Bettuzzi et al. veröffentlichten 2006 eine Doppel-Blind-Studie mit Patienten, bei denen hochgradige dysplastische Veränderungen der Prostata diagnostiziert worden waren. Unter oraler Zufuhr von grünem Tee kam es zu einer signifikanten Reduktion des Karzinomrisikos [76].

5.3.2 Pharmakodynamik

Epigallokatechingallat (EGCG, 458 Dalton) ist das häufigste und wirksamste Katechin. Das Antioxidans besitzt antikanzerogene, antitumorale und antiinvasive Effekte. Es gibt Hinweise auf multiple zelluläre Zielstrukturen, deren Wirkungsmechanismen interagieren. Eine Trennung zwischen chemopräventiven und chemotherapeutischen Effekten ist nicht möglich. Die wichtigsten Mechanismen sind hier in Kürze dargestellt:

MAPK (mitogen activated protein kinases) sind Proteinkinasen (ERK, JNK, p38), welche direkt oder indirekt aktivierenden Einfluss auf Transkriptionsfaktoren (ELK, c-Jun) und damit

auf die Zellproliferation, -migration und -apoptose nehmen. Anhand verschiedener Tumorzellmodelle konnte die inhibitorische Wirkung von EGCG auf multiple Stationen der Signalkaskade nachgewiesen werden. Ein durch energetische Strahlung oder oxidativen Stress aktiviertes MAPK-System kann durch Katechine deaktiviert werden [104].

An Magenkarzinomzellen konnte eine durch MAPK- und AP-1-Hemmung vermittelte Reduktion der Matrix-Metalloproteinasen-Expression beobachtet werden. **Matrix-Metalloproteinasen (MMP)** sind durch ihre kollagenspaltenden Eigenschaften von Bedeutung für die Tumordinvasion und Metastasierung. Des Weiteren sind sie an Tumorwachstum, Angiogenese und antiapoptotischen Prozessen beteiligt [104]. Bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle konnte unter EGCG ebenfalls eine reduzierte Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-13 mit Reduktion der Metastasierungsrate nachgewiesen werden [95, 101].

NF-κB ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor mit Andockstellen in der Promoterregion verschiedener Gene. Hierzu gehören Gene der proapoptotischen Proteine der **bcl-2**-Familie (bax, bcl-2). Tumore unterschiedlicher Entitäten zeigen Dysregulationen des entsprechenden Signaltransduktionsweges. Der Aktivierung von NF-κB sind ebenfalls MAP-Kinasen (JNK) sowie TPA-vermittelte (tissue polypeptide antigen) Stoffwechselschritte vorgeschaltet. EGCG verhindert die TPA-induzierte Phosphorylierung, sowie die Anbindung von NF-κB an die DNS [104]. Die Wirkung des Katechins auf MAPK ist oben beschrieben. Zusätzlich werden die Proteine der bcl-2-Familie durch eine direkte spezifische Bindung von EGCG inhibiert [104]. Die Folge ist eine Verschiebung der bcl-2-Balance mit Anstieg der proapoptotischen Expression von bax und Inhibition von bcl-2. Am hepatozellulären Karzinom konnte infolge dessen eine Freisetzung von Cytochrom-C mit Aktivierung der Caspasen 9 und 3 und Freisetzung des **Apoptose-induzierenden-Faktors (AIF)** aus den Mitochondrien nachgewiesen werden [100]. Beides sind direkte Induktoren der Apoptose [78, 90, 96]. Als Schlüsselprotein der intrinsischen Mitochondrien-induzierten Apoptose wird **p53** durch EGCG ebenfalls beeinflusst und hat Einfluss auf die bcl-2-Familie. Entsprechende Beobachtungen wurden an Prostatakarzinom- und CML-Zellen gemacht [104].

EGCG induziert in Myelomzellen durch die vermehrte Expression des **Tumornekrosefaktor-Liganden (FASL)** und des Rezeptors (FAS) den extrinsischen Apoptoseweg. Die Interaktion beider führt zu einer Aktivierung des Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (**DISC**). Der

weitere Transduktionsweg läuft über Caspase-8. Diese wiederum aktiviert die Caspase-3-induzierte und die intrinsische Mitochondrien-abhängige Apoptose [96].

EGFR (epidermal growth factor receptor) ist ein Rezeptor, der überexprimiert in einer Vielzahl von Tumoren die Proliferation stimuliert, die Apoptose hemmt und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [75]. Die Phosphorylierung des Rezeptors setzt unter anderem Signaltransduktionswege über die MAP-Kinasen und stat3 in Gang. EGCG führt über eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung zu einer Suppression der Rezeptorwirkung. Dieser Effekt wurde beim Mamma-, Kolon- und Plattenepithelkarzinom beobachtet [75, 104]. Des Weiteren konnte am Adenokarzinom eine temporäre EGCG-vermittelte Endozytose des Membranrezeptors beschrieben werden [102].

Die Produktion von **VEGF** (vascular endothelial growth factor), einer Einflussgröße der Tumorangio-genese, wird ebenfalls über EGFR vermittelt. EGCG hemmt den entsprechenden Signalweg über stat3 und führt zu einer geringeren Expression [86, 99].

IGF (insulin-like growth factor) ist ein transmembranöses Signalsystem aus mehreren Rezeptoren und Liganden, das Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und Apoptose nimmt. Eine Überexpression des IGF-1-Rezeptors wird z. B. beim Mamma- und Zervixkarzinom mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht. Katechine senken die Serumkonzentration an IGF-1 und hemmen die Aktivierung des IGF-1-Rezeptors [104].

Katechine blockieren die wichtigsten **DNS-Methyltransferasen** (DNMT, DNMT1) und reaktivieren durch Methylierung ausgeschaltete Gene (TFPI-2) in Tumorzellen. Die vermehrte Transkription von zellregulatorischen Onkogenen (c-myc, c-fos, c-H-ras) wird für die antitumorale und präventive Wirkung verantwortlich gemacht [77, 89].

Proteasomen sind ubiquitäre Proteinkomplexe, deren Aufgabe die Deaktivierung und Degradierung von nicht benötigten oder defekten Proteinen ist. Während der Mitose ist die Lysierung verschiedener Cycline durch die Proteasomen notwendig. EGCG inhibiert die Funktion der 20s Proteasomen und führt zu einem Anstieg des proapoptotischen p27 mit anschließendem Zellzyklusstopp in der G1-Phase [74, 104]. Katechine können durch direkte p53-unabhängige Modulation der **Cyclin-abhängigen Kinasen** (cdk) ebenfalls einen

irreversiblen Zellzyklusstopp auslösen [79, 104]. Dieser Mechanismus ist ebenfalls auf eine Beeinflussung der Proteasomen zurückzuführen.

Der **67kDa Laminin-Rezeptor** (LR1) fungiert in Myelomzellen als Basalmembrananker und ermöglicht die Tumorinvasion. EGCG bindet und inaktiviert diesen Rezeptor. Bei gesunden Zellen ist die entsprechende Genexpression stark gebremst, so dass EGCG hier keinen Einfluss zeigt. Ähnliche Ergebnisse gibt es für die **Focal Adhesion Kinase** (FAK) und **uPA** (urokinase-plasminogen activator), einer prometastatischen Protease, die eine Lyse der extrazellulären Matrix ermöglicht [65, 104].

Untersuchungen an Mammakarzinomzellen zeigten unter EGCG eine reduzierte mRNA Expression der Telomeraseuntereinheit hTERT und eine Abnahme der **Telomerase**-Aktivität von 40 - 55 % [63].

Das tumorzellspezifische Oberflächenprotein **tNOX** ist eine NADH-Oxidase, deren Aktivität mit dem Tumorwachstum korreliert. Eine Blockade führt nach der Tumorzellteilung über einen Stopp in der G-Phase zum Zelltod. Katechine besitzen bereits bei geringer Dosis eine hohe Affinität zu diesem Oberflächenprotein [64].

Neben den rezeptorvermittelten Wirkungen besitzt EGCG auch einen chemischen **Redox-Effekt**, indem es als Reduktionsmittel und Radikalfänger wirkt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS – reactive oxygen species) und oxidativer Stress spielen eine Rolle in der Tumorgenese. Freie Sauerstoffradikale, wie sie bei mitochondrialen Reaktionen entstehen (MAO), können zu einer oxidativen Modifikation von DNS-Basen führen und Mutationen generieren. Exogener oxidativer Stress (z. B. Zigarettenrauch) besitzt eine vergleichbare Wirkung. Unter Verbrauch von EGCG können unspezifisch Elektronen und Wasserstoffatome bereitgestellt werden, die durch Weitergabe an die DNS zu einer Neutralisation der Radikale führen. Da die Wirkung vieler Kanzerogene auf einer ROS-Induktion beruht, wird diesem Effekt unter anderem die antikanzerogene Wirkung von EGCG zugeschrieben [48]. Des Weiteren kann durch Elimination von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in gesunden Zellen der Cytochrom-C-Austritt aus den Mitochondrien und damit die Mitochondrien-abhängige Apoptose reduziert werden [103].

Die Reaktivität von EGCG kann auch zu einer Anreicherung von Radikalen (H_2O_2) mit entsprechender Zytotoxizität führen. Tumorzellen sind hierfür sensitiver als gesunde Zellen und

zeigen eine zytoplasmatische Vakuolenbildung mit anschließender Apoptose [98]. Einige Studien lassen vermuten, dass die antitumorale Wirkung von EGCG in erster Linie durch die H_2O_2 -Bildung und den damit verbundenen oxidativen Stress vermittelt wird. Diese Hypothese basiert auf der Beobachtung, dass es unter Anwesenheit von neutralisierenden Antioxidantien wie Katalase oder N-Acetyl-Cystein zu einer deutlichen Reduktion der zytotoxischen Wirkung kommt [98].

Neuere Untersuchungen an modifizierten Katechinen stellen eine relevante durch H_2O_2 vermittelte Wirkung in Frage. Durch Oligomerisation oder Bindung an einen Fettsäureester stabilisiertes EGCG zeigt bei geringerer oder fehlender H_2O_2 -Bildung eine zunehmende antitumorale Wirkung [105, 106]. Ebenfalls zu einer Wirkungsverstärkung bei rückläufiger H_2O_2 -Freisetzung führt die Stabilisierung mittels Peracetat [107]. Das verwendete Katechin Epikatechingallat (ECG) besitzt bei geringer H_2O_2 -Produktion ebenfalls eine antitumorale Wirkung und widerspricht der These einer H_2O_2 -induzierten Apoptose [97, 74].

Die Mehrzahl der genannten Wirkmechanismen sind tumorspezifisch. Entsprechende Untersuchungen konnten zeigen, dass therapeutische Katechinkonzentrationen auf gesundes Gewebe keinen inhibierenden Einfluss ausüben. [47, 104].

Die aufgeführten Studien geben Hinweise auf die Beeinflussung von Signaltransduktionsketten und Veränderungen von Stoffwechselproduktkonzentrationen. Der Nachweis einer direkten Bindung von EGCG an Effektorstrukturen fehlt zumeist. Für eine gezielte Anwendung von EGCG sind weitere Untersuchungen zur Identifikation der Schlüsselmechanismen und ihrer antitumoralen Wirkungen notwendig.

Katechine besitzen neben der antitumoralen Wirkung auch einen durch die Beeinflussung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen vermittelten antiinflammatorischen Effekt. Folge ist die Hemmung der Chemotaxis, der Granulozytenmigration, der durch Neutrophile induzierten Angiogenese und des zelleigenen ROS-Systems. Des Weiteren sind für EGCG positive Wirkungen auf Hypertonus, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, koronare Herzerkrankungen, Übergewicht und UV-Exposition beschrieben.

5.3.3 Resistenzen

In-vitro-Versuche konnten zeigen, dass eine Blockierung des Multidrug-Resistance-assoziierten Proteins (MRP) zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von EGCG führt. MRP2 befindet sich im apikalen Bereich der gastrointestinalen Mukosa und nimmt theoretisch Einfluss auf die Resorption und Bioverfügbarkeit. Das geringer konzentrierte MRP1 führt basolateral zu einem interstitiellen Efflux. Beide Mechanismen scheinen bei einer parenteralen Gabe eine untergeordnete Rolle zu spielen [74].

Die Untersuchung des ebenfalls Multiresistenz-assoziierten Transportproteins P-170-Glykoprotein (Pgp) ergab keinen Einfluss auf die EGCG-Konzentration [74].

5.3.4 Pharmakokinetik

Oral aufgenommene Katechine werden intestinal resorbiert und reichern sich im Serum an. Die Bioverfügbarkeit bei oraler Zufuhr beträgt für EGCG 0,1 %. Die Plasmaspiegelspitze (T_{max}) ist bei EGCG nach 80 Minuten erreicht [104]. Katechine werden im Kolon zum Teil durch die Darmflora verstoffwechselt und ihre Metaboliten von der Mukosa aufgenommen. Die Vielzahl an Stoffwechselprodukten erschwert eine genaue Untersuchung der Wirkungsweise von oral aufgenommenen Katechinen. Die Metabolite weisen eine zum Teil abgeschwächte antitumorale bei unveränderter antiinflammatorischer Wirkung auf [74].

Nach oraler Aufnahme reichern sich die Katechinmetabolite vorwiegend in Darm, Leber und Niere an. 23 % des Plasma-EGCG liegt in konjugierter und 77% in freier Form vor. In der Leber finden Glukoronidierung, Sulfatierung, Methylierung und Ringspaltung statt. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt bei EGCG ca. $T_{1/2} = 165 - 200$ Minuten, wobei im Vergleich zu anderen Katechinen der Großteil biliär ausgeschieden wird [104].

In der pharmakokinetischen Halbwertszeit unberücksichtigt ist die aktive Halbwertszeit. In-vitro-Versuche zeigten eine schnelle, durch Autooxidation und Bildung von Dimeren verursachte Abnahme der Wirksamkeit. Die Halbwertszeit des aktiven Katechins betrug dabei 30 Minuten. Unter Anwesenheit einer Wasserstoffperoxid-neutralisierenden Superoxid-Dismutase kam es zu einer Stabilisierung von EGCG mit entsprechender Erhöhung der aktiven Halbwertszeit [75].

In vitro ist molekularer Sauerstoff ein quasi-unbegrenzt verfügbarer Redoxpartner und für die schnelle Inaktivierung verantwortlich. Auf Grund des interstitiell geringeren Sauerstoffpartialdruckes (160 mmHg atmosphärisch vs. ~ 40 mmHg interstitiell) wäre in vivo eine Verlängerung der Halbwertszeit zu vermuten. Daten über die Inaktivierung und aktive Halbwertszeit in vivo liegen nicht vor.

Der intrazelluläre Aufnahmemechanismus ist noch ungeklärt. Die Mehrzahl der Studien geht von einer langsamen, bisher nicht bewiesenen, passiven Anreicherung durch transmembranöse Diffusion aus. An Epikatechin-3-gallat (ECG) konnte gezeigt werden, dass Katechine Substrat des Monocarboxylase-Transporters (MCT) sein können. Durch Blockade dieses sonst für den Transport von Laktaten und Pyruvaten wichtigen Membranproteins konnte die intrazelluläre Aufnahme von ECG signifikant reduziert werden [74]. Untersuchungen über ein EGCG-Transportsystem liegen nicht vor.

5.3.5 Nebenwirkungen

In vitro lassen sich bei unphysiologisch hohen EGCG-Konzentrationen Schäden durch entstehendes Wasserstoffperoxid nachweisen. Die bei oraler Teeaufnahme beobachteten Nebenwirkungen sind durch den Koffeinanteil bedingt und spielen in der klinischen Anwendung keine Rolle. In vitro konnte eine Hemmung der Plättchenaggregation beobachtet werden, weshalb eine relative Kontraindikation für Patienten mit erhöhtem Blutungsrisiko ausgesprochen wurde. Entsprechende Kasuistiken sind nicht beschrieben [108].

5.4 Weitere Chemotherapeutika

Die Gruppen um Kanesada und Gehl untersuchten eine Reihe von Zytostatika auf ihre Einsatzmöglichkeit in der Elektrochemotherapie. Darunter Cyclophosphamid, Mitomycin C, Methotrexat und Cisplatin [84]. Diese zeigten zum Teil gute klinische Ergebnisse, erreichten jedoch nicht die Effizienz von Bleomycin [17, 18].

6. Material und Methoden

6.1 Vorversuch

6.1.1 Zielsetzung

Ziel des Vorversuches war die Klärung einer grundsätzlichen Eignung von Epigallokatechingallat für die Elektrochemotherapie. Untersucht wurde die Reduktion des Tumorzellwachstums durch die Kombination von Elektroporation und EGCG. Die Kontrollgruppe bestand aus unbehandelten Tumorzellen. Zusätzlich wurden Zellen Elektrochemotherapien mit Bleomycin und Epikatechin unterzogen. Epikatechin (EC) ist ebenfalls ein Grüntee catechin, besitzt im Vergleich zu EGCG jedoch keine relevante antikanzerogene Wirkung.

6.1.2 Material

Bei den verwendeten Tumorzellen handelte es sich um die Zelllinie KB (DSMZ ACC 136), adherente, epithelähnliche Zellen eines humanen Zervixkarzinoms. In der mediumgefüllten Kulturflasche wuchsen die Zellen im Monolayer mit 5 - 10 Mio. Zellen pro 80 cm² Flaschenboden [80].

Das Medium für die Anzucht der KB-Zellen bestand aus:

500 ml	MEM (minimal essential medium, Earle's Salzen) (Biochrom, Berlin/D)
50 ml	FBS (fötale Kälberserum) (Biochrom, Berlin/D)
10 ml	L-Glutamin (~ 200 µmol) (Biochrom, Berlin/D)
5 ml	Antibiotic-Antimycotic (Penicillin G, Streptomycin, Amphotercin) (Biocult, Glasgow/GB)

Zum Ablösen der Tumorzellen wurden die Zellen fünf Minuten mit 0,25%iger Trypsinlösung versetzt. Die Suspension wurde anschließend mit 1000 U/min abzentrifugiert, mit Medium gewaschen und für die Elektroporation bereitgestellt.

6.1.3 Methoden

Für die Elektroporation wurde die Zell-Medium-Suspension auf ca. 20.000 Zellen/ml eingestellt, auf sterile Kunststoffküvetten (BTX, Genetronics/USA) verteilt und entsprechend der Versuchsgruppe EC, EGCG oder Bleomycin (2 Units/mg) hinzugegeben. Jede Gruppe bestand aus mindestens vier unabhängigen Durchgängen mit jeweils drei Ansätzen.

- Gruppen:
1. Kontrolle
 2. 795 V/cm
 3. EC 20 µg/ml, 795 V/cm
 4. EGCG 20 µg/ml, 795 V/cm
 5. EGCG 40 µg/ml, 795V/cm
 6. Bleomycin 1,8 µg/ml
 7. Bleomycin 1,8 µg/ml, 795 V/cm

Die Seiten der Küvette (1 ml Volumen) bestehen aus zwei Edelstahlelektroden, deren Abstand 2 mm bzw. 4 mm beträgt (Abb.12). Die Behälter wurden in einen BTX Safety Stand 630B (Genetronics/USA) gespannt (Abb.13).



Abb. 12 BTX Küvette

Als regelbare Rechteck-Spannungsquelle diente ein Electro Square Porator ECM 830 (Genetronics/USA) (Abb. 14). Die Dauer der jeweils applizierten Impulse betrug 99 µs und die Spannung 162,5 V bzw. 325 V. Entsprechend der Formel $E = \frac{U}{d}$ ergab sich eine Feldstärke von 812,5 V/cm. Aufbaubedingte Störungen schwächten die effektive Feldstärke auf ~ 795 V/cm ab. Vor dem Platieren wurde die Suspension 5 Min. in der Küvette belassen.



Abb.13 BTX Safety Stand 630B (Genetronics)



Abb. 14 Electro Square Stand ECM 830 (Genetronics)

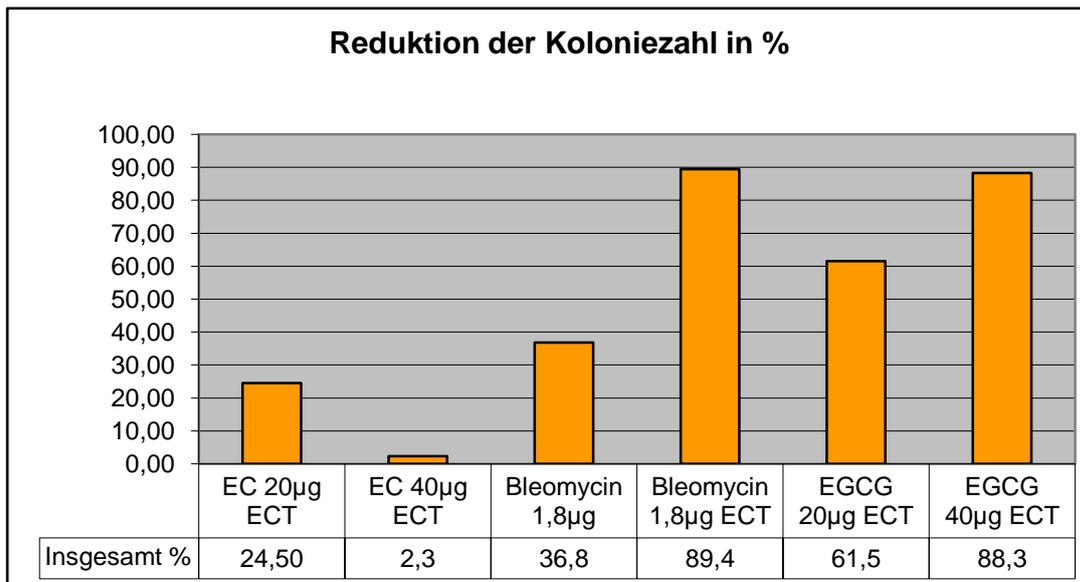
Das Antionkogramm ermöglichte die Beobachtung der Klonbildung der therapierten Einzelzellen und gab Rückschluss auf die Effizienz der Behandlung. Falcon-Petrischalen (35 mm x 10 mm) wurden mit einer Lage aus 0,8 ml Medium (s. oben) und 0,2 ml Agar 0,25 % beschichtet. Die Zellsuspension wurde ebenfalls mit 0,8 ml Medium und 0,2 ml Agar vermischt und auf die Grundschrift platiert. Es folgte eine sechstägige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und Wasserdampfsättigung.

An Tag Sieben wurden die aus den Einzelzellen entstandenen Zellkolonien unter einem Invertmikroskop bei 25facher Vergrößerung ausgezählt. Ein 2 mm x 2 mm-Raster half bei der Quantifizierung [81].

6.1.4 Ergebnis und Diskussion

Alle Gruppen wiesen im Vergleich zur Kontrolle ein reduziertes Wachstum auf (Tab.2). Entsprechend der antitumoralen Wirkung verursachte Bleomycin mit und ohne Elektroporation eine Tumorsuppression. Der zytotoxische Effekt wurde durch die Elektroporation jedoch verstärkt (36,8 % versus 89,4 % Tumorreduktion).

Die beiden Epigallokatechingallat-Gruppen zeigten ebenfalls eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung. Mit 61,5 % und 88,3 % war der Effekt vergleichbar mit Bleomycin. Epikatchin zeigte eine nur geringe Beeinträchtigung des Tumorwachstums (24,5 % und 2,3 %).



Tab. 2 Vorversuch – Reduktion der Koloniezahl in Prozent

Trotz der eingeschränkten statistischen Erhebungsmöglichkeit weist der Vorversuch für EGCG und Bleomycin auf eine Wirkungssteigerung durch Elektroporation hin. Die Überprüfung der in-vivo-Wirksamkeit von Epigallocatechingallat als Substrat der Elektrochemotherapie war indiziert.

6.2 Hauptversuch

Versuchsgrundlage war eine Population von 48 Mäusen, denen ein humanoides Plattenepithelkarzinom subkutan implantiert wurde. Nach ausreichendem Größenwachstum der Tumore erfolgte eine Unterteilung in sechs Gruppen (A - F). Je nach Gruppenzugehörigkeit wurden die Versuchstiere einmalig verschiedenen Therapieregimen unterzogen (Tab.3). Es folgte ein Beobachtungszeitraum von 28 Tage, bevor die Tiere getötet und die Tumoren makro- sowie mikroskopisch beurteilt wurden.

Gruppe	Therapie
A	PBS (Kontrolle)
B	PBS + Elektroporation
C	Bleomycin + Elektroporation
D	EGCG + Elektroporation
E	Bleomycin

F	EGCG
---	------

6.2.1 Zellen und Medium

Tab. 3 Gruppen und Therapieregime

Die verwendeten Tumorzellen entstammen der Linie CRL-1624, einem humanoiden, keratinproduzierenden Plattenepithelkarzinom der Zunge (♂, 55 Jahre) [82]. Die Zucht und Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Falcon-Kulturflaschen mit einer 1:1-Mischung aus DME-Medium (Dulbecco's modified Eagle's) und Ham's F12-Medium (Vitacell-ATCC/USA). Zusätzlich enthielt das Gemisch auf 500 ml:

50 ml	FBS
2,5 mMol	L-Glutamin
0,5 mMol	Sodiumpyrivat
1200 mg/l	Natriumhydrogencarbonat
5 ml	Antimykotika

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ im wasserdampfgesättigten Brutschrank aufbewahrt. Die Ablösung der Zellen für die Implantation erfolgte mit einer 0,25-%igen Trypsin- und 0,03-%igen EDTA-Lösung.

6.2.2 Tiermodell

Bei den Versuchstieren handelte es sich um T-zelldefiziente Mäuse vom Typ NMRI (nu/nu). Alle Tiere waren ausgewachsen und weiblichen Geschlechts. Die Haltung, Behandlung und Tötung fand im Tierversuchstrakt des Max-Delbrück-Zentrums für molekulare Medizin (Berlin-Buch) statt. Um auf systematische Fehler reagieren zu können, wurden die 48 Tiere auf zwei zeitlich versetzte Versuchsreihen (Reihe 1 und 2) à 24 Mäuse aufgeteilt.

6.2.3 Implantation und Wachstum

Für die Implantation der Tumorzellen wurden die Tiere mit Radenarcon (Etomidate, AWD Pharma Dresden) narkotisiert. Die Injektion der Zellsuspension erfolgte in das Subkutangewebe der linken Flanke. Im Anschluss wurde das Tumorwachstum beobachtet. Für die anschließende Therapie war eine Tumormindestgröße von 1 cm³ geplant. Die Tiere der Reihe 1 erreichten die erforderliche Größe 42 Tage nach Implantation der Zellsuspension. Das Tumorwachstum der Reihe 2 war langsamer. Bei identischem Vorgehen musste von einer häufig auftretenden Wachstumsheterogenität der Zellklone ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurden die Tumore der Reihe 2 an Tag 71 bei einer durchschnittlichen Größe von 0,6 cm³ behandelt. Dies machte in der späteren Analyse der Daten eine Betrachtung der prozentualen Größenveränderung notwendig.

6.2.4 Elektrochemotherapie

Die Behandlung der Tumoren fand an Tag 42 bzw. 71 nach Implantation statt. Die Tiere wurden unter Berücksichtigung der divergierenden Tumorgrößen auf sechs Gruppen zu je acht Mäusen aufgeteilt (Tab.3). Anschließend wurden die Tumore entsprechend der Gruppenzugehörigkeit mit PBS, (-)-Epigallokatechingallate-Lösung (1 mg/ml, Calbiochem) oder Bleomycin (4 mg/ml [4 Units]) infiltriert (Tab.4). Die Wirkstoffmengen richteten sich nach der jeweiligen Tumorgröße (Tab.4). Um eine möglichst homogene Verteilung der Substanzen zu gewährleisten, erfolgte die intratumorale Injektion in Fanning-Technik.

Gruppe/Reihe	Wirkstoff	ml	mg	Gruppe/Reihe	Wirkstoff	ml	mg
A/1	PBS	0,5		D/1	EGCG 1mg/ml	0,55	0,55
		0,5				0,6	0,6
		0,5				0,6	0,6
		0,5				0,4	0,4
A/2	PBS	0,5		D/2	EGCG 1mg/ml	0,4	0,4
		0,5				0,3	0,3
		0,5				0,6	0,6
		0,5				0,5	0,5
B/1	PBS	0,5		E/1	Bleomycin 4mg/ml	0,55	2,2
		0,5				0,65	2,6
		0,5				0,65	2,6
		0,5				0,65	2,6
B/2	PBS	0,5		E/2	Bleomycin 4mg/ml	0,4	1,6
		0,5				0,4	1,6

		0,5				0,25	1,0
		0,5				0,35	1,4
		0,5				0,55	2,2
C/1	Bleomycin 4mg/ml	0,55	2,2	F/1	EGCG 1mg/ml	0,6	0,6
		0,45	1,8			0,8	0,8
		0,4	1,6			0,8	0,8
		0,5	2,0			0,4	0,4
C/2		0,25	1,0	F/2		0,5	0,5
		0,35	1,4			0,4	0,4
		0,4	1,6			0,9	0,9
		0,5	2,0			0,6	0,6

Zehn Minuten nach der intratumoralen Injektion erfolgte in den Gruppen B, C und D die Elektroporation der weiterhin narkotisierten Versuchstiere. Der Elektroporationsgenerator MedPulserTM der Firma Inovio (Genetronics) erzeugte die benötigte Rechteckspannung (Abb.4). Der verwendete Applikator besaß sechs, in einem Radius von 5 mm kreisförmig angeordnete Nadelelektroden mit einer Länge von 10 mm und einem Durchmesser von 0,71 mm (Abb.9). Der MedPulserTM applizierte automatisch 6 Pulse à 100 µs mit einer Frequenz von 1 Hz und einer Feldstärke von 850 V/cm. Erfasste das 10 mm messende Applikatorfeld nicht den gesamten Tumor, so wurde der Applikator neu gesetzt und wiederholt elektroporiert. Je nach Tumorgöße wurden ein bis vier Applikationen benötigt. Dies Vorgehen entspricht dem in der klinischen Behandlung. Während der Impulsgabe zeigten die Versuchstiere deutliche, komplett reversible Muskelkontraktionen. Durch die Nadelelektroden verursachte Punktblutungen kamen ohne Volumenverluste zum Stillstand. Nach Behandlung und Narkoseende zeigten die Tiere keinerlei Auffälligkeiten.

6.2.5 Beobachtung

Es folgte ein vierwöchiger Beobachtungszeitraum, in dem die Mäuse entsprechend den normalen Vorgaben versorgt wurden. Zusätzlich wurden sie täglich gewogen und alle vier Tage mit Hilfe einer Schieblehre das durchschnittliche Tumolvolumen dokumentiert.

6.2.6 Tötung und Explantation

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte vier Wochen nach Behandlung durch eine Überdosierung von Radenarcon (AWD Pharma, Dresden). Im Anschluss an die Fotodokumentation wurde die Kutis im Bereich des Tumors eröffnet und das Karzinom in toto entnommen. Nach

abschließender Volumenmessung und erneuter Fotodokumentation wurden die exzidierten Tumore in gepufferter 10-%iger Formalinlösung fixiert.

6.2.7 Aufarbeitung und Färbung

Die fixierten Tumore wurde binnen 48 Stunden nach Explantation in den Räumen der Pathologie des Campus Benjamin Franklin (Charité Universitätsmedizin Berlin) zugeschnitten und in einer PBS-Ethanol-Xylol-Reihe entwässert. 24 Stunden später erfolgte die Einbettung in Paraffin. Den gewonnenen Gewebsblöcken wurde nach vorhergehender Kühlung an einem „Microm“ Mikrotom 1,5 µm messende Schnitte entnommen und auf Objektträger übertragen. Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden unbeschichtete Glasobjektträger verwendet. Der MIB-1 (KI67) Nachweis erforderte kapilläre Objektträger (ChemMate™, 75 µm, DakoCytomation). Vor der Färbung wurden die Träger mit Schnitt für 24 Stunden in einem Wärmeschrank getrocknet.

Für die HE-Färbung mussten die Präparate zunächst mit Hilfe einer Xylol-Lösung entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe hydriert werden. Anschließend erfolgte die Färbung mit saurem Hämatoxylin nach Ehrlich (5 Min.), Bläuung in Leitungswasser (10 Min.) und Färbung mit 0,1 %-ig angesäuerter Eosin-Lösung (5 Min.). Die Dehydrierung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit abschließender Entalkoholisierung in einer Xylol-Lösung.

MIB-1 ist ein monoklonaler Antikörper gegen das Ki67-Antigen. Dieses Protein ist in allen Zellkernen der G₁-, S-, G₂-Phase oder der Mitose nachweisbar und somit ein Proliferationsindikator. Nicht proliferierende Zellen (Stadium G₀) exprimieren kein Ki67. Der MIB-1-Klon besitzt zwei Vorteile gegenüber der klassischen Färbung mit Ki67-Antikörpern. MIB-1 lässt sich, wie in unserem Versuch, nicht nur bei Gefrierschnitten, sondern auch bei Paraffineinbettungen anwenden. Außerdem ist der Antikörper humanspezifisch und reagiert in unseren Präparaten ausschließlich mit dem Ki67-Antigen des implantierten Tumors [59]. Eine positive Reaktion zeigt sich durch eine Rotfärbung des Zellkerns oder des Zytoplasmas.

Die MIB-1-Färbung wurde wie folgt durchgeführt [83]:

- Spülung der Objektträger mit destilliertem Wasser

- Wasserdampfbad mit Citrat-Puffer (pH 6,0) auf 90 - 100 °C erhitzen
- 20 Min. inkubieren und anschließend 20 Min. bei Zimmertemperatur abkühlen
- 2 x 2 Min. in PBS waschen
- 30 Min. in einer Pferdeserum-Lösung inkubieren, um unspezifische Immunglobuline abzubinden
- 60 Min. mit primärem Maus-Anti-Human-Ki67-Antikörper (Clone MIB-1) (DakoCytomation, Cat# M7240) in 1:100-Verdünnung inkubieren
- 2 x 2 Min. in PBS waschen
- 10 Min. in Peroxidase-neutralisierender Lösung (3 % H₂O₂ in PBS) inkubieren
- 3 x 2 Min. in PBS waschen
- 30 Min. mit sekundärem Pferd-Anti-Maus-IgG (H+L), biotinyliert (Vector Laboratories, Cat# BA-2000) in 1:500-Verdünnung inkubieren
- 3 x 2 Min. in PBS waschen
- 30 Min. mit HRP-Streptavidin-Lösung bei Zimmertemperatur inkubieren
- 3 x 2 Min. in PBS waschen
- 5 - 10 Min. mit DAB Peroxidase-Substrat-Lösung inkubieren
- mit destilliertem Wasser abspülen
- Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin-Lösung
- 5 Min. unter Leitungswasser abspülen
- Dehydrierung mit 95%-igem Ethanol für 2 Min. und mit 100%-igem Ethanol 2 x 3 Min.
- 2 x 3 Min. Entalkoholisierung mit Xylol-Lösung
- Objektträger abdecken

Die histologische Untersuchung und Beurteilung erfolgte am Durchlichtmikroskop (Firma Zeiss) in aufsteigender Vergrößerung (100-, 286-, 400fach) mit zusätzlicher Dokumentation durch eine AxioCam Digitalkamera.

6.2.8 Statistische Auswertung

Definitionen:

Betrachtungseinheit:	Tumorvolumen
Grundgesamtheit:	P unendlich groß
Stichproben:	6 x Σ 8 Tiere (in zwei Gruppen) (n = 8)

Merkmal:

Volumenverhältnis (kontinuierlich) $V_{\text{neu}}/V_{\text{anfang}}$

Ungepaarter modifizierter t-Test (einseitig)

Betrachtet wurde die Volumenveränderung in einer jeden Gruppe. Durch $V_{\text{neu}}/V_{\text{anfang}}$ ließ sich errechnen, wie sich die Tumorgöße prozentual zwischen dem Tag der Behandlung und dem Zeitpunkt der Tötung verändert hat. Die prozentualen Verschiebungen der Gruppen B bis F wurden anschließend mit der Kontrollgruppe verglichen und bewertet. Die verschiedenen Versuchsgruppen sind unabhängig voneinander. Die Werte sind normalverteilt und kontinuierlich beschrieben. Aus diesen Gründen kam der ungepaarte modifizierte t-Test zur Anwendung:

$$t_{\text{prüf}} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d}$$

mit
$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

$$f = \frac{1}{\frac{c^2}{n_1 - 1} + \frac{(1 - c)^2}{n_2 - 1}}$$

mit
$$c = \frac{\frac{s_1^2}{n_1}}{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} = \frac{s_1^2}{n_1 s_d^2}$$

$t_{\text{prüf}}$ = Variable
 x = arithmetisches Mittel
 s = Standardabweichung
 n = Stichprobenumfang

f = Freiheitsgrade
 c = Annahmezahl für
Stichprobenprüfung

Unter der Voraussetzung, dass der Erwartungswert den Mittelwert der Volumenentwicklung widerspiegelt, wurden folgende Hypothesen formuliert:

Nullhypothese: Der Erwartungswert $\mu_{\text{behandelt}}$ in den einzelnen Gruppen ist größer oder gleich dem Erwartungswert $\mu_{\text{kontrolle}}$ in der Kontrollgruppe.
Das Tumolvolumen der entsprechenden Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe gleich oder größer.

$$\mu_{\text{behandelt}} \geq \mu_{\text{kontrolle}}$$

Alternativhypothese: Der Erwartungswert $\mu_{\text{behandelt}}$ in den einzelnen Gruppen ist kleiner als der Erwartungswert $\mu_{\text{kontrolle}}$ in der Kontrollgruppe.

Das Tumolvolumen der entsprechenden Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe kleiner.

$$\mu_{\text{behandelt}} < \mu_{\text{kontrolle}}$$

Signifikanzniveau: $\alpha = 0,05$ ($\alpha = 0,01$)

Verwerfbedingung: $t_{\text{prüf}} > -t_{f,1-\alpha}$

$t_{f,1-\alpha}$ wurde der Tabelle 13.1 (Quantile der t-Verteilung) DGQ e. V. entsprechend dem Freiheitsgrad f und dem Signifikanzniveau α entnommen. Sofern der Freiheitsgrad f nicht ganzzahlig ist, wurde für t_f linear interpoliert.

Demnach musste, um eine im Vergleich zur Kontrollgruppe A signifikante Tumorreduktion nachzuweisen, für die entsprechende Gruppe die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese erfüllt werden.

7 Ergebnisse

7.1 Wachstumsverhalten im Beobachtungszeitraum

Um sowohl einen Volumenzuwachs, als auch eine –Reduktion darstellen zu können, wurde das Tumolvolumen vor der Therapie mit 100% als Ausgangswert festgelegt. Die Versuchsreihen werden im folgenden gemeinsam betrachtet (Tab.5,6).

Gruppe A: In der Kontrollgruppe stagnierte das Tumorwachstum bei vier Mäusen (93 - 102 %). Jeweils zwei Tiere zeigten ein Wachstum (110 %, 196 %), bzw. eine Verkleinerung (50 %, 64 %) der Tumormasse. Von Tag 8 post ECT bis zur Tötung nach vier Wochen nahm die Größe aller implantierten Tumore gleichmäßig zu und erreichte durchschnittlich 199 % des Ausgangsvolumens. Versuchsreihe 1 zeigte einen Ausreißer mit 303 % Volumenzuwachs.

Gruppe B: Vier Tiere zeigten initial eine Zu- (106 - 140 %) und vier Tiere eine Abnahme (87 – 70 %) der Tumorgrößen. Ab Tag 8 wiesen alle Tiere ein rasches Wachstum auf, wobei es in der Versuchsreihe 2 zu einem verzögerten und etwas geringeren Größenzuwachs kam. Zum

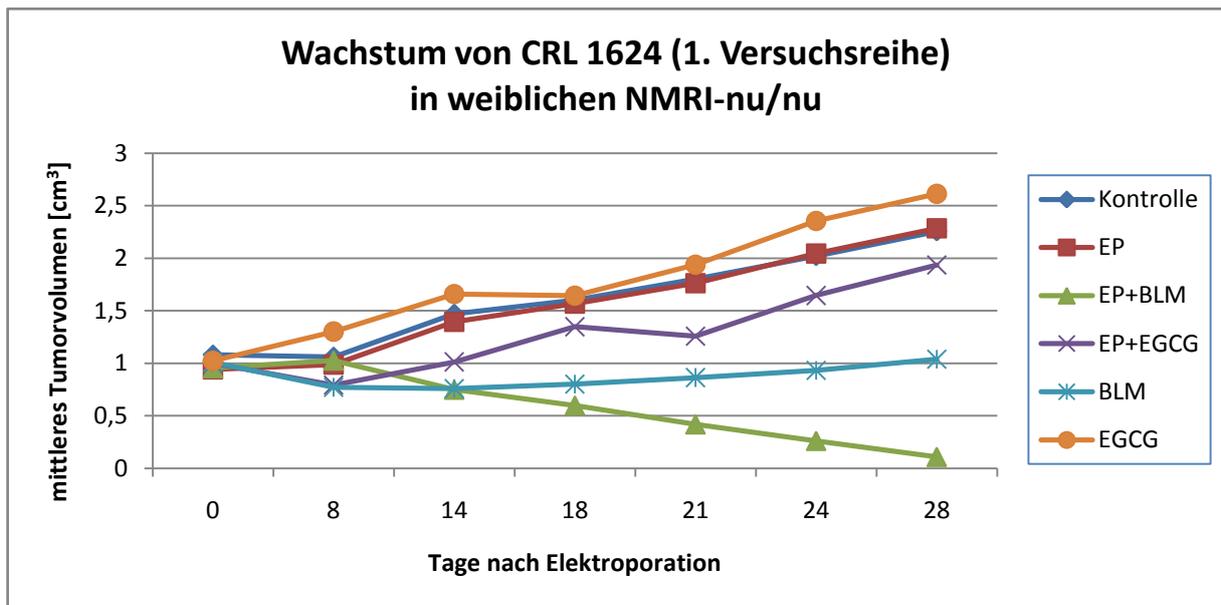
Zeitpunkt der Tötung lag die Tumorgröße in der ohne Chemotherapeutikum elektroporierten Gruppe im Durchschnitt bei 217 %, was einer Zunahme von 117 % entsprach.

Gruppe C: Die Tumore der zweiten Versuchsreihe zeigten bis Tag 4 eine Volumenzunahme auf 174 % der Ausgangsgröße. Ab dem 4. Tag nach Elektrochemotherapie und Bleomycingabe stagnierte das Wachstum beider Reihen und ging anschließend in eine Größenabnahme über. Die Karzinome der ersten Versuchsreihe hatten sich nach vier Wochen auf 3 - 19 % ihres Ursprungsvolumens verkleinert. Die Karzinome der zweiten Gruppe waren zum Zeitpunkt der Tötung makroskopisch nicht mehr nachweisbar. Die durchschnittliche Reduktion lag bei 95,5 %.

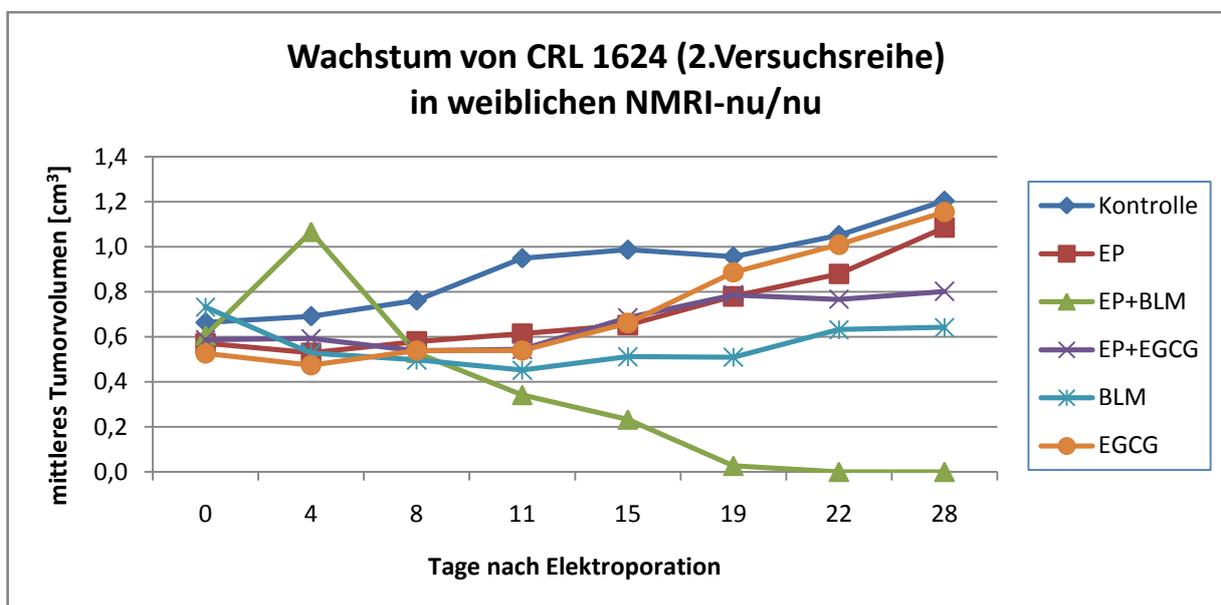
Gruppe D: In der mit Epigallokatechingallat elektroporierten Gruppe stagnierte das Wachstum nach der Behandlung für sieben bis vierzehn Tage. Die Tumore verloren in diesem Zeitraum 10 - 28 % ihres Volumens. Danach kam es zur erneuten Größenprogredienz. Nach 28 Tagen zeigten alle Tumore mit durchschnittlich 181 % ein signifikantes Wachstum.

Gruppe E: Die Versuchsreihen der nur mit einer intratumoralen Bleomycin-Injektion behandelten Mäuse zeigten ebenfalls einen zunächst regredienten, dann erneut progredienten Verlauf. Die Volumenzunahme lag nach vier Wochen bei durchschnittlich 106 %. Die Endpunkte beider Reihen wichen um 31 % voneinander ab (122 %, 91 %), was auf einen Ausreißer mit 125 % Volumenzuwachs zurückzuführen war.

Gruppe F: Das Wachstumsverhalten der beiden, nur mit Epigallokatechingallat behandelten, Populationen differierte in der Anfangsphase. Die erste Versuchsreihe zeigte ein kontinuierliches Wachstum mit 254 % nach 28 Tagen. Die Tumorgrößen der zweiten Reihe stagnierten für 10 - 12 Tage. Danach kam es zu einer sprunghaften Vergrößerung auf durchschnittlich 211 %.



Tab. 5 Wachstumsverlauf Versuchsreihe 1



Tab.6 Wachstumsverlauf Versuchsreihe 2

7.2 Makro- und mikroskopische Beurteilung

Gruppe A:

Zum Zeitpunkt der Tötung zeigten alle acht Tiere einen klar abgrenzbaren, subkutanen Tumor mit deutlicher Angioneogenese. Die Größe variierte von 10 – 20 mm im Durchmesser und 0,94 -

4,43 cm³ im Volumen. Die Haut war intakt ohne Anzeichen einer Infektion oder Ulzeration (Abb.15,16).

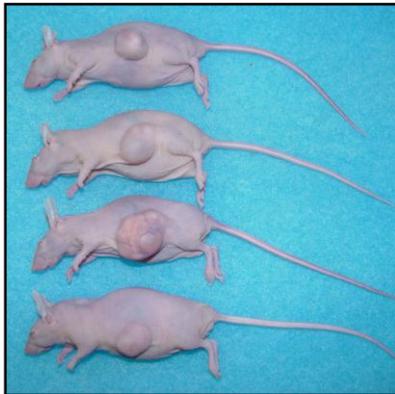


Abb. 15 Kontrolle, Reihe 1, Tag 68



Abb.16 Kontrolle, Reihe 2, Tag 100

Die Exzisate der ersten Versuchsreihe waren größer und enthielten multiple Pseudozysten. Die serös- oder blutgefüllten Kammern machten bei einigen Tumoren über 50 % des Gesamtvolumens aus (Abb.17). Die Tumoren der zweiten Reihe maßen im Durchmesser maximal 15 mm, waren von festerer Konsistenz und enthielten nur wenige kleine, zystische Formationen (Abb.18). Bei Eröffnung der Gewebeknoten stellt sich ein buntes Bild aus flüssigkeitsgefüllten Pseudozysten, Hämatomen, kalzifiziertem und weicherem Tumorgewebe dar. Die Bauchwand ist geringgradig infiltriert.



Abb. 17 Kontrolle, Reihe 1, Tag 68

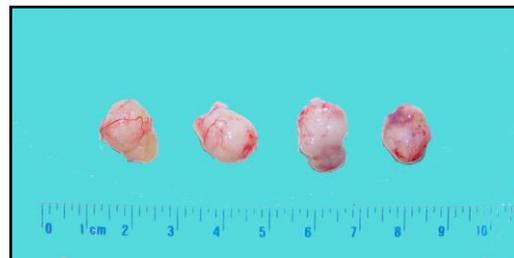


Abb. 18 Kontrolle, Reihe 2, Tag 100

Histologisch zeigte sich in der HE-Färbung ein hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom mit Hyper- und Parakeratosen. In der Peripherie waren zahlreiche dicht gepackte Zellnester mit chromophilem Zytoplasma und Kernen zu finden (Abb.20). Die Tumorzellen schilferten sich als eosinophiles Keratin ab, das sich als Lamellen oder zentrale zwiebelschalenartige Struktur anreicherte. Diese Zellmorphologie war Ausdruck der hohen Tumordifferenzierung (Abb.19). Eine zweite Zellpopulation war weniger dicht und fiel durch ein chromophobes und glykogenreiches Plasma in Kombination mit kleineren Zellkernen auf.

Beide Zellkonfigurationen zeigten atypische Mitosen. Das Tumorzentrum zeichnete sich durch große nekrotische Bezirke mit fortgeschrittenem Architekturverlust und Entzündungszellen aus. Das Keratin innerhalb dieser Bereiche war nicht klar abgrenzbar und zeigte Zerfallsprozesse. Den Tumoren anhaftend fanden sich multiple mukoid- oder blutgefüllte Pseudozysten, die zum Teil über 50 % der Tumormasse ausmachten. Im Randbereich wiesen einige Präparate Anteile der Epidermis, des Subkutangewebes oder der Bauchwandmuskulatur auf.

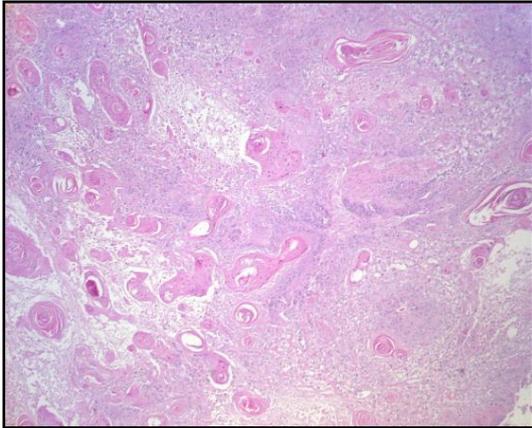


Abb. 19 Kontrolle, HE 1:100

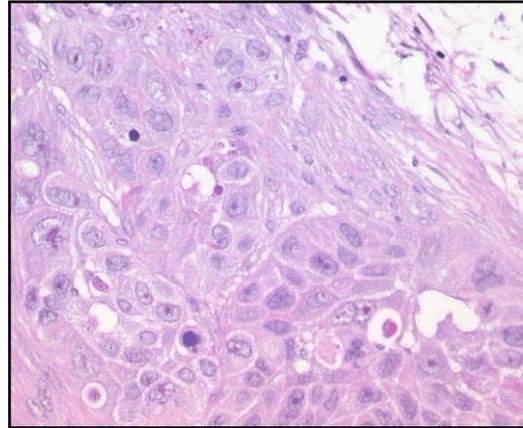


Abb. 20 Kontrolle, HE 1:400

In der immunhistochemischen Färbung zeigten die oben beschriebenen peripheren Zellnester eine intensive Färbung mit überwiegend vitalen und zum Zeitpunkt der Fixation im Stadium der Mitose befindlichen Tumorzellen (Abb.21). Dies bestätigte die in der HE-Färbung vermutete Aktivität der Karzinomzellen. Die oben beschriebenen zentralen, nekrotischen Zellnester sowie die Keratinansammlungen präsentierten keine MIB-1-Anreicherung.

Zusammengefasst zeigte sich ein solides, hochdifferenziertes Plattenepithelkarzinom mit zentraler Nekrose und proliferierendem Randsaum. Die ausgeprägte KI-67-Markierung der peripheren Bindegewebsstrassen war als Artefakt zu werten.

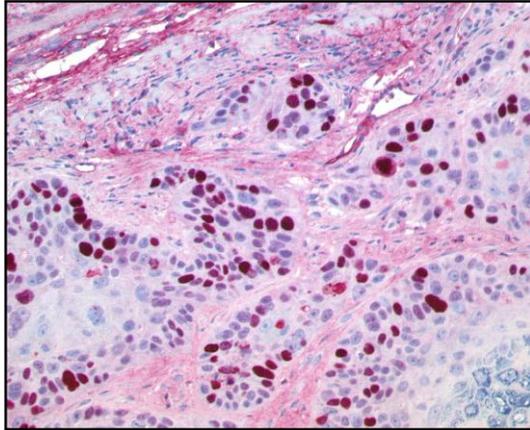


Abb. 21 Kontrolle, MIB-1 1:286

Gruppe B:

Die Gruppe der ohne Substrat elektroporierten Tumore stellte sich vergleichbar der Kontrollgruppe dar. Einige der Tiere zeigten große blutgefüllte Pseudozysten. Ulzerationen oder anders geartete Hautbeteiligungen fehlten. Durch das elektrische Feld bedingte Schäden waren nicht nachweisbar (Abb.22,23).

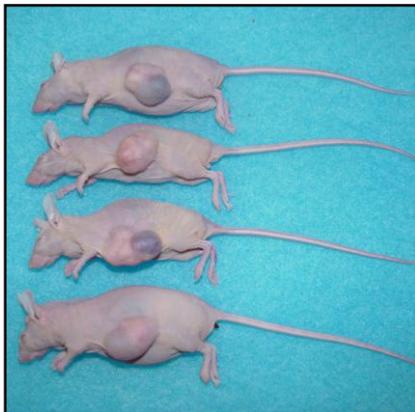


Abb. 22 EP, Reihe 1, Tag 68



Abb. 23 EP, Reihe 2, Tag 100

Der Tumordurchmesser schwankte zwischen 5 und 25 mm, das Volumen zwischen 0,56 und 3 cm³. Im Vergleich zur Kontrolle wiesen in dieser Gruppe beide Versuchsreihen ähnlich viele Pseudozysten auf (Abb.24,25).

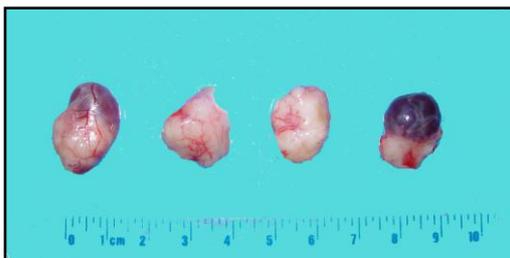


Abb. 24 EP, Reihe 1, Tag 68

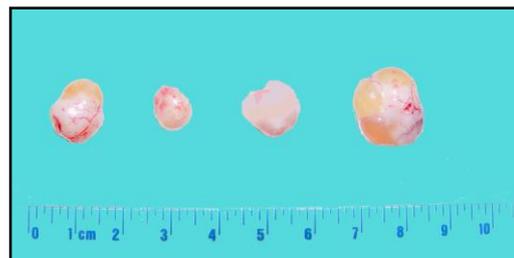


Abb. 25 EP, Reihe 2, Tag 100

Histologisch zeigte sich das gemischte Bild eines schnell wachsenden, invasiven Plattenepithelkarzinoms mit zentralen nekrotischen Bereichen (Abb.26). In der HE-Färbung fanden sich zahlreiche, in der Mitose befindliche, Tumorzellen (Abb.27). Eine immunhistologische Färbung wurde auf Grund des eindeutigen Befundes in dieser Gruppe nicht vorgenommen.

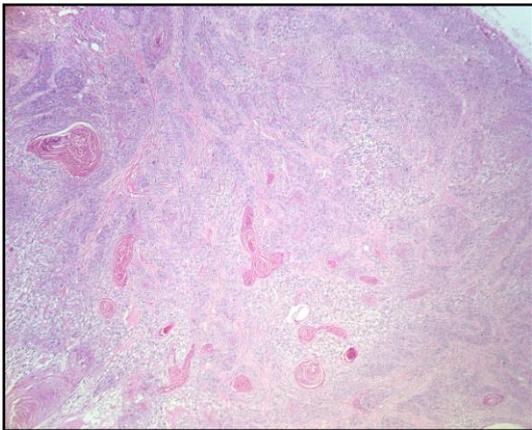


Abb. 26 EP, HE 1:100

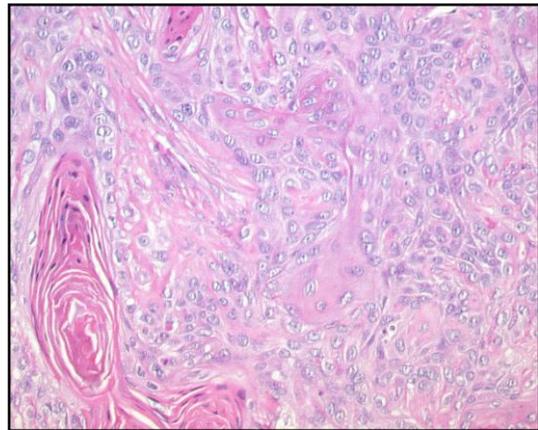


Abb. 27 EP, HE 1:286

Gruppe C:

In der mit Bleomycin elektroporierten Gruppe kam es zu einer Reduktion der Tumormasse. Das Implantationsareal der ersten Versuchsgruppe war gekennzeichnet durch Ulzerationen und Krustenbildung im Epidermisniveau (Abb.28). Die Tumornekrose führte zu keiner funktionellen Beeinträchtigung der Versuchstiere.

In der zweiten Versuchsreihe befanden sich die Ulzerationen im Stadium der Abheilung (Abb.29). Die ehemalige Implantationsstelle zeichnete sich durch hyperpigmentiertes Narbengewebe aus. Tumoranteile oder -rückstände ließen sich nicht nachweisen.



Abb. 28 EP+BLM, Reihe 1, Tag 68



Abb. 29 EP+BLM, Reihe 2, Tag 100

Das Volumen der vier entnommenen Tumore lag zwischen 0,03 und 0,16 cm³, der Durchmesser bei maximal 6 mm. Das Gewebe war fest und narbig. Pseudozysten fehlten (Abb.30). Eine vermehrte Angioneogenese war weder makro- noch mikroskopisch nachweisbar.

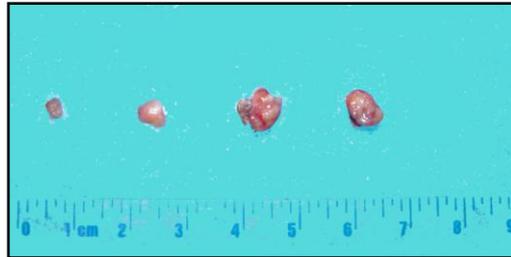


Abb. 30 EP+BLM, Reihe 1, Tag 68

Histologisch zeigte das Gewebe zahlreiche Nekrosen und bindegewebige Umbauvorgänge (Abb.31). Vereinzelt ließen sich Zellen nachweisen, die in der Plasma-Kern-Relation an Tumorzellen erinnerten (Abb.32). Eine nest- oder palisadenartige Anordnung der Zellen wie bei den Gruppen A und B fehlte. Es fanden sich vermehrt Entzündungszellen und Makrophagen.

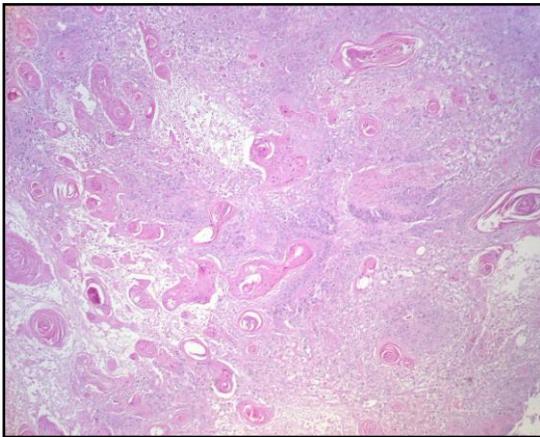


Abb. 31 EP+BLM, HE 1:100

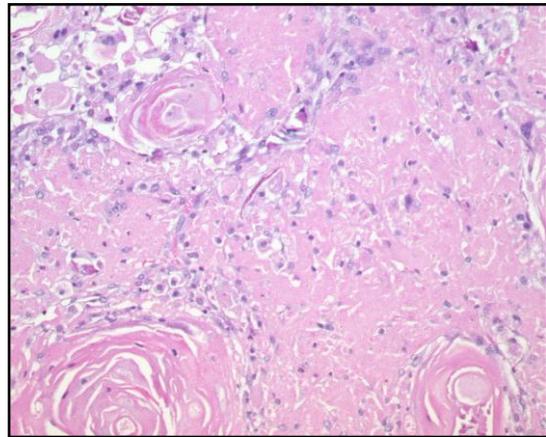


Abb. 32 EP+BLM, HE 1:286

Drei Präparate aus Gruppe C besaßen keinerlei KI-67-Aktivität. Die peripheren Epithelinseln der angeschnittenen Epidermis zeigten keine Anreicherung des Antikörpers (Abb.33). Im zentralen Bereich eines Tumors ließen sich vereinzelt chromophile Zellen in Nachbarschaft zu Entzündungszellen und Makrophagen nachweisen (Abb.34).



Abb. 33 EP+BLM, KI-67 1:286

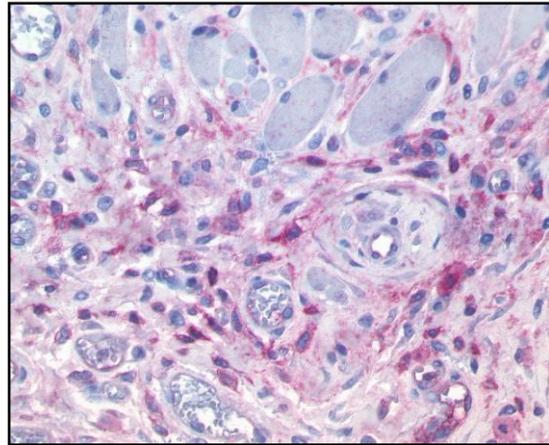


Abb. 34 EP+BLM, KI-67 1:400

Gruppe D:

Die mit Epigallokatechingallat elektroporierten Tumore zeigten vor Entnahme große, teils zystisch veränderte Tumore bei intakter Epidermis (Abb.35,36). Ulzerationen und Narben als Zeichen einer Tumornekrose waren nicht nachweisbar.



Abb. 35 EP+EGCG, Reihe 1, Tag 68

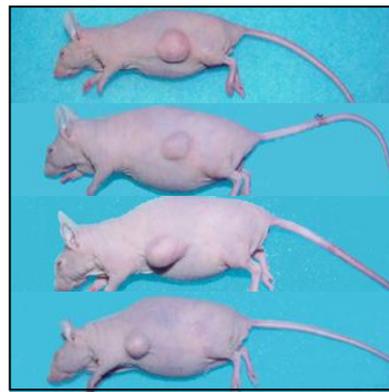


Abb. 36 EP+EGCG, Reihe 2, Tag 100

Die Karzinome der ersten Versuchsreihe waren mit $1,29 - 2,62 \text{ cm}^3$ (Abb.37) größer als die der zweiten ($0,42 - 1,44 \text{ cm}^3$) (Abb.38). Die größeren Tumore zeigten zum Teil ausgeprägte Pseudozysten. Im Vergleich zur Kontrolle war das Volumen geringer.



Abb. 37 EP+EGCG, Reihe 1, Tag 68



Abb. 38 EP+EGCG, Reihe 2, Tag 100

Histologisch präsentierte sich das Bild eines hochdifferenzierten Karzinoms mit zentralen Nekrosen und peripherem vitalen Tumorgewebe (Abb.39). Zwischen den nekrotischen Bereichen fand sich als Ausdruck des Plattenepithelcharakters reichlich Keratin (Abb.40).

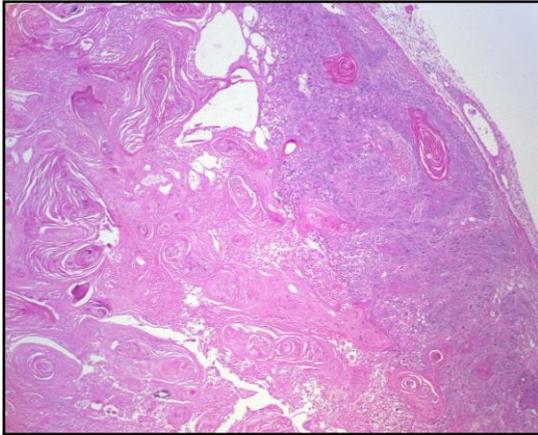


Abb. 39 EP+EGCG, HE 1:100

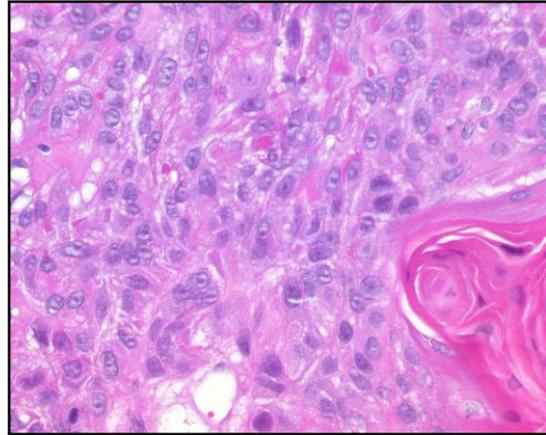


Abb. 40 EP+EGCG, HE 1:400

In der mit EGCG elektroporierten Gruppe ließ sich mittels der immunhistochemischen Färbung reichlich teilungsaktives Tumorgewebe nachweisen (Abb.41). Der zentrale MIB-1-negative Nekrosebereich erschien ausgeprägter als in den Kontrollgruppen. Die Peripherie zeigte vitale Tumorzellen mit der, in den Gruppen A und B beschriebenen, palisadenförmigen Anordnung (Abb.42). Es fielen vereinzelte Karzinominseln auf, die fingerförmig in das Tumorzentrum reichten.

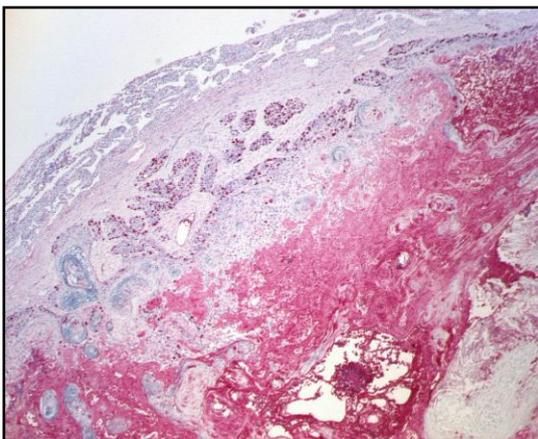


Abb. 41 EP+EGCG, KI-67 1:100

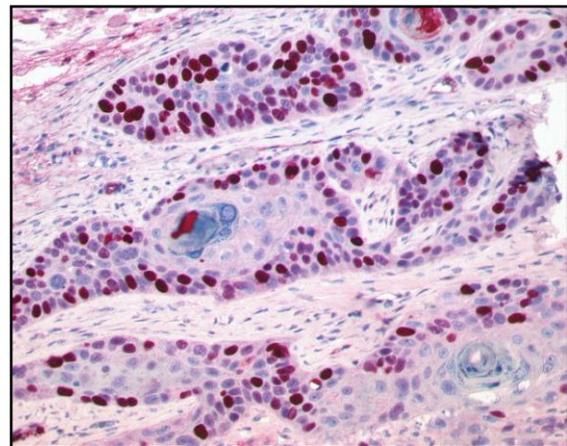


Abb. 42 EP+EGCG, KI-67 1:286

Gruppe E:

Die nur mit Bleomycin behandelte Population zeigte ein durchschnittlich leicht progressives Wachstum bei gut abgrenzbarem subkutanem Tumor. Wie in den makroskopischen Aufnahmen erkennbar, war der Größenunterschied erheblich (Abb.43,44).

Vier der Karzinome verhielten sich regredient, die anderen vier zeigten ein progredientes Wachstum.

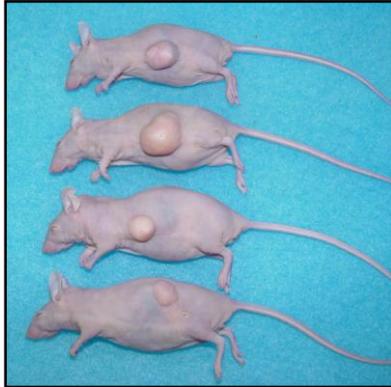


Abb. 43 BLM, Reihe 1, Tag 68



Abb. 44 BLM, Reihe 2, Tag 100

Die Konsistenz der weißlichen Tumore war fester als in der Kontrollgruppe (Abb.45). Das Volumen betrug 0,43 bis 2,12 cm³. Der größte Knoten zeigte eine ausgeprägte Pseudozyste (Abb.46).

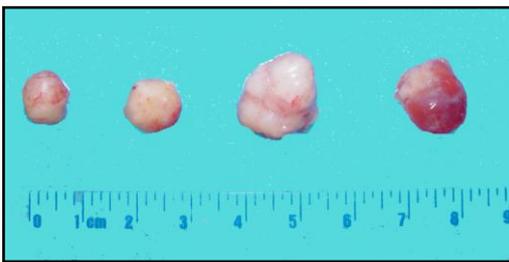


Abb. 45 BLM, Reihe 1, Tag 68



Abb. 46 BLM, Reihe 2, Tag 100

Histologisch war ein hochdifferenziertes verhornendes Plattenepithelkarzinom feststellbar (Abb.48). Große Bezirke der Randbereiche waren nekrotisch oder wiesen nur noch wenige vitale Zellen mit pyknotischen Kernen auf, was zum makroskopisch narbigen Erscheinungsbild passte. Im Vergleich zur PBS-Kontrolle fanden sich die proliferierenden Tumorzellnester nur vereinzelt (Abb.47) und auf die Peripherie beschränkt. Bei sicherem histologischen Tumornachweis erfolgte keine immunhistochemische Überprüfung.

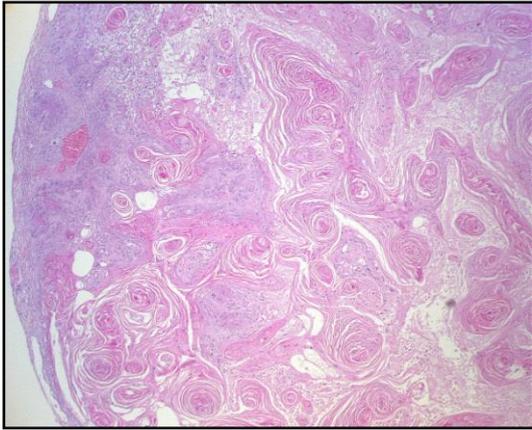


Abb. 47 BLM, HE 1:100

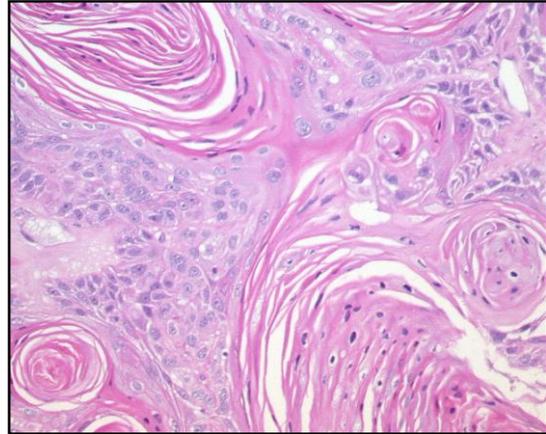


Abb. 48 BLM, HE 1:286

Gruppe F:

Alle acht Tumore zeigten nach alleiniger Behandlung mit Epigallocatechingallat einen Massezuwachs (Abb.49,50). Die Größe der exziierten Knoten variierte zwischen 0,37 und 4,41 cm³ (Abb.51,52). Dermale Reaktionen waren nicht feststellbar.



Abb. 49 EGCG, Reihe 1, Tag 68



Abb. 50 EGCG, Reihe 2, Tag 100

Die Knoten zeigten zum Teil weiche, zystenreiche, zum Teil narbig Anteile bei geringgradiger Angioneogenese.

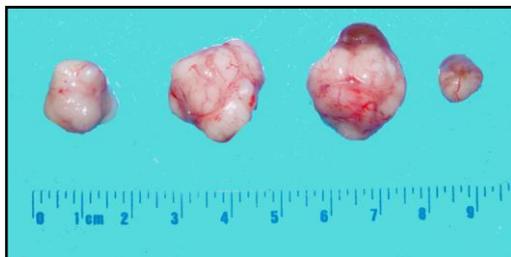


Abb. 51 EGCG, Reihe 1, Tag 68



Abb. 52 EGCG, Reihe 2, Tag 100

Die Tumore entsprachen makro- sowie mikroskopisch einem schnell proliferierenden Plattenepithelkarzinom. In der HE-Färbung ließen sich zahlreiche Mitosen identifizieren (Abb.53,54). Die immunhistochemische Untersuchung mit MIB-1 bestätigte diesen Befund und zeigte vitales Tumorgewebe in nest- und palisadenförmiger Anordnung (Abb.56). Zentral zeigten sich große, durch das schnelle Wachstum bedingte Nekrosen (Abb.55).

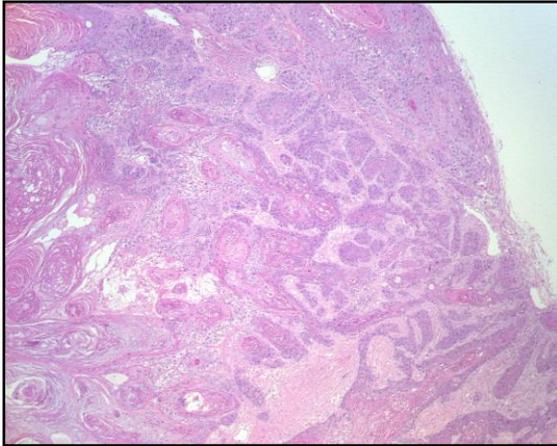


Abb. 53 EGCG, HE 1:100

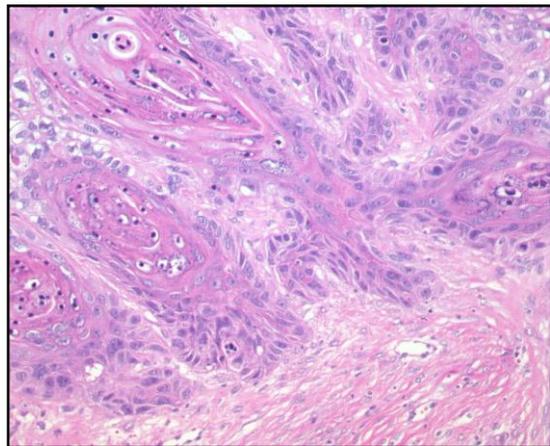


Abb. 54 EGCG, HE 1:286

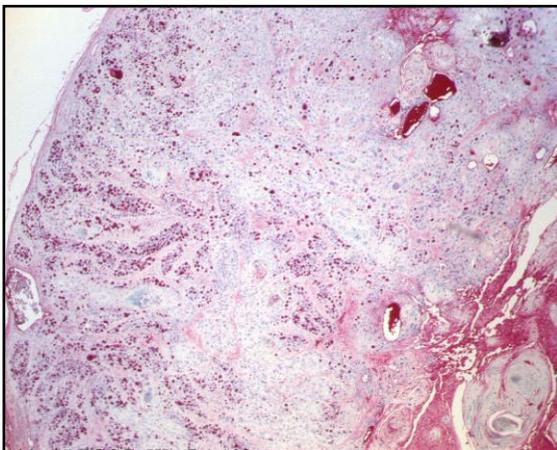


Abb. 55 EGCG, KI-67 1:100

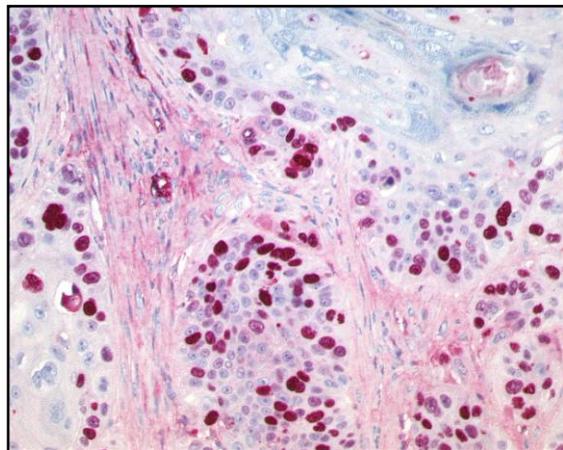


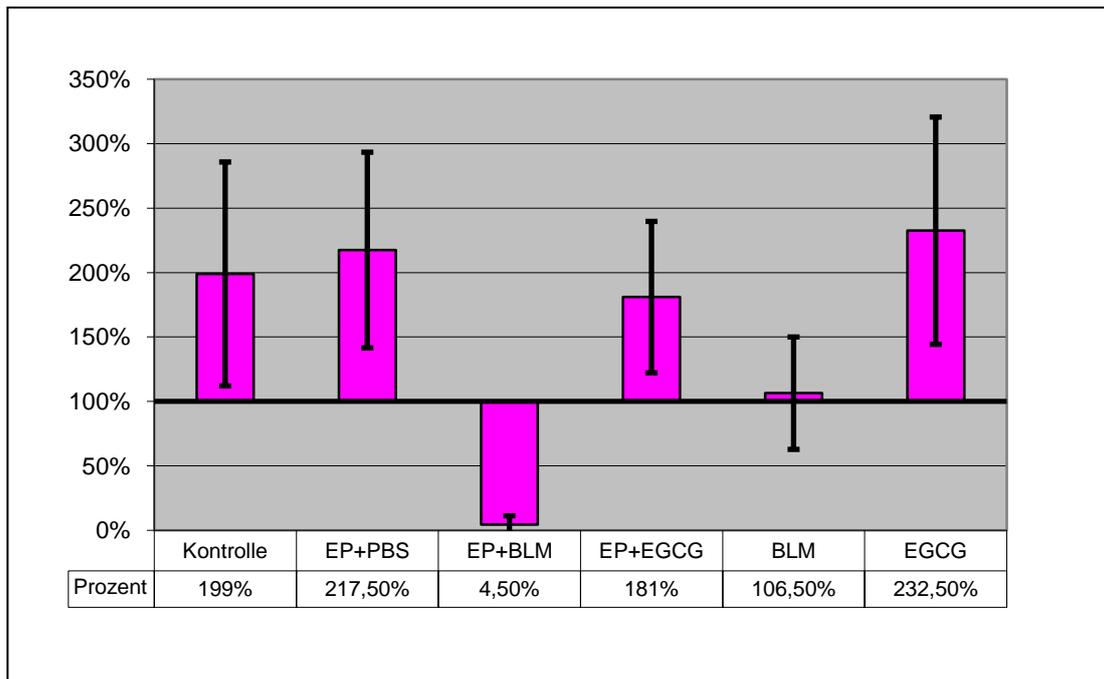
Abb. 56 EGCG, KI-67 1:286

7.3 Statistische Betrachtung und Auswertung

Im folgenden Diagramm wurde das Volumen an Tag 28 nach Tumorbehandlung relativ zur Ausgangsgröße dargestellt (Tab.7). Tabelle 8 zeigt eine zusätzliche Aufschlüsselung nach Versuchsreihen. In den Gruppen A, B und F kam es binnen vier Wochen nach Behandlung zu einer Verdopplung des Ausgangsvolumens. Die mit Epigallokatechingallat elektroporierte

Gruppe zeigte ebenfalls einen Größenzuwachs, erreichte jedoch nicht das Volumen der Kontrollgruppe.

Bleomycin ohne zusätzliche Elektroporation führte zu einer Stagnation des Wachstums mit einer Endgröße von durchschnittlich 106,5 % (Gruppe E). Eine Reduktion der Ausgangsgröße erfolgte nur unter der Kombination von Elektroporation und intratumoraler Gabe von Bleomycin (Gruppe C).



Tab. 7 Volumenveränderung in Prozent (mit 100% definiert als Ausgangsvolumen)

	Therapie	1.Reihe	2.Reihe	Gesamt x
Gruppe A	PBS (Kontrolle)	212 %	185,50 %	199 %
Gruppe B	PBS + Elektroporation	254 %	181 %	217,50 %
Gruppe C	Bleomycin + Elektroporation	9 %	0 %	4,50 %
Gruppe D	EGCG + Elektroporation	204 %	158 %	181 %
Gruppe E	Bleomycin	122 %	91 %	106,50 %
Gruppe F	EGCG	254 %	211 %	232,50 %

Tab. 8 Volumen der Gruppen und Versuchsreihen (mit 100 % definiert als Ausgangsvolumen)

Der ungepaarte modifizierte t-Test ergab für $t_{\text{prüf}}$ folgende Werte (Tab.9):

	s	sd	t _{prüf}	C	f
Gruppe A	86,80 %	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
Gruppe B	75,86 %	40,76	0,45	0,43	13,73
Gruppe C	6,93 %	30,79	-6,32	0,0063	7,09
Gruppe D	58,73 %	37,05	-0,49	0,31	12,23
Gruppe E	43,60 %	34,34	-2,69	0,2	10,29
Gruppe F	88,13 %	43,73	0,77	0,51	13,99

Tab. 9

Für $-t_{f;1-\alpha}$ ergab sich bei $\alpha = 0,05$ ($\alpha = 0,01$) (Tab.10):

	$-t_{f;1-0,01}$	$-t_{f;1-0,05}$	t _{prüf}
Gruppe A	Kontrolle	Kontrolle	Kontrolle
Gruppe B	-2,63	-1,76	0,45
Gruppe C	-2,99	-1,89	-6,32
Gruppe D	-2,67	-1,78	-0,49
Gruppe E	-2,75	-1,81	-2,69
Gruppe F	-2,63	-1,76	0,77

Tab. 10

Für das gewählte Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ wurde die Nullhypothese für die Gruppen B und F angenommen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe A war das Tumorzellenwachstum gleich bzw. hatte zugenommen. Die mit Epigallocatechingallat elektroporierte Gruppe zeigte eine nicht-signifikante Wachstumsverlangsamung und erfüllte demnach ebenfalls die Nullhypothese. Für die mit Bleomycin behandelten Gruppen wurde die Nullhypothese verworfen. Der Erwartungswert war kleiner als in der Kontrollgruppe, womit die Alternativhypothese erfüllt wurde. Die mit Bleomycin therapierten Tumore der Gruppen C und E zeigten eine signifikante Reduktion des Tumorzellenwachstums.

Bei einer Erhöhung des Signifikanzniveaus auf $\alpha = 0,01$ wurde die Nullhypothese auch für die nicht elektroporierte Bleomycingruppe E erfüllt. Eine signifikante Tumorzellenreduktion mit $\alpha = 0,01$ konnte nur für die mit Bleomycin elektrochemotherapierte Gruppe C festgestellt werden.

Diese Ergebnisse deckten sich mit den histologischen Untersuchungen. Sieben der acht Tumore der Gruppe C zeigten eine komplette Remission der vitalen Tumorzellen. In der Gruppe E zeigte

ein Tumor eine Komplettremission (< 50 %) und drei eine Teilremission mit Verkleinerung im Vergleich zur Ausgangsgröße. Immunhistochemisch ließ sich bei Gruppe E eine Reduktion der proliferierenden Tumoranteile nachweisen.

Die mit EGCG elektroporierte Gruppe zeigte ein im Vergleich zur Kontrolle verlangsamtes Wachstum. Statistisch und histologisch ließ sich nach vier Wochen jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisen.

8 Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche untersuchten die in-vivo-Wirksamkeit des Grüntee catechins Epigallocatechingallat in der Elektrochemotherapie. Es gelang nicht, die in den Vorversuchen beschriebene Wirkung von EGCG in vivo zu reproduzieren. In Hinblick auf die positiven Ergebnisse der in-vitro-Voruntersuchung sollten folgende Punkte diskutiert werden.

8.1 Vergleichsdaten

Studien am Tiermodell, die Vergleichsmöglichkeiten bieten, liegen zu diesem Zeitpunkt kaum vor. Eine Kombination von EGCG und Elektrochemotherapie ist nicht beschrieben. Zwei Publikationen von Liu und Caltagirone et al. befassen sich mit der antitumoralen Wirkung von parenteral verabreichtem EGCG am Tiermodell. Beide Gruppen untersuchten an Mäusen die Wirkung von Flavonoiden auf Melanomzellen [65, 66]. Liu et al. zeigte, dass sich durch parenterale Verabreichung die Zahl der Lungenmetastasen signifikant senken läßt [65]. Caltagirone et al. konnten den antimetastatischen Effekt nicht bestätigen, wiesen aber eine Wachstumssuppression des Primärtumors nach [66].

Die vorliegende Arbeit unterscheidet sich von den genannten Studien in mehreren zu berücksichtigenden Punkten:

In beiden Publikationen wurden Melanomzellen verwendet. Die Elektrochemotherapie mit Bleomycin zeigte in mehreren Studien bei Melanomzellen eine signifikante antitumorale Wirkung [70].

Die Injektion von Epigallokatechingallat erfolgte intraperitoneal und begann zwischen ein und 72 Stunden nach Tumorzellimplantation. Caltagirone et al. wiederholten die Injektion täglich über vier Wochen. Bei Liu et al. erhielten die Mäuse das EGCG dreimal wöchentlich über elf Wochen hinweg. Die Tötung erfolgte im direkten Anschluss nach drei (Caltagirone) bzw. elf Wochen (Liu). In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine einmalige intratumorale Verabreichung mit einem vierwöchigen Intervall zwischen Therapie und Tötung.

Ebenfalls zu berücksichtigen sind die Serumwirkstoffkonzentrationen. Liu et al. postulierten für ihre Experimente eine Mindestkonzentration an freiem EGCG von 0,6 - 8 $\mu\text{M/l}$. Diese erreichten sie experimentell nach einer Einmalinjektion von 2 mg Katechin intraperitoneal. Die Versuchstiere der hier behandelten Arbeit erhielten bei einer Tumormasse von 0,6 – 1 cm^3 intratumoral 0,3 - 0,9 mg des Katechins. Auf Grund der unterschiedlichen Distribution und Therapie ist ein Vergleich kaum möglich.

8.2 Unterschiede in vivo versus in vitro

In den Vorversuchen wurden Zellsuspensionen bzw. Monolayer verwendet. Die Zellen waren stabilen Umwelteinflüssen ausgesetzt, in ihren Eigenschaften identisch und besaßen gleiche Wachstumsvoraussetzungen. Die Elektroporation in der BTX-Küvette erfolgt durch ein homogenes Feld. Alle Zellen wurden der annähernd gleichen Feldstärke und gleichen Konzentration des Chemotherapeutikums ausgesetzt.

In-vivo-Tumore stellen ein heterogenes Zellkollektiv dar. 2004 beschrieben Canatella et al. erstmalig den Unterschied zwischen in-vivo- und in-vitro-Zellmodellen und die Bedeutung für die Elektrochemotherapie: "...a multicellular environment decreases the effects of electroporation..." (Eine mehrzellige Umgebung verringert den Effekt der Elektroporation) [57]. Ursächlich hierfür sind Veränderungen der Feldstärke sowie die intratumorale Wirkstoffverteilung.

8.2.1 Feldstärke und Schwellenpotential

Intratumoral gelegene Zellen werden beim Plattenepithelkarzinom primär über Diffusion versorgt. Mit zunehmender Tumortiefe ist die Effizienz und damit die Nährstoffversorgung limitiert. In der Folge des eingeschränkten Stoffwechsels finden sich intratumoral bis zu 50 %

kleinere Zellen. Das Schwellenpotential ΔV_s ist direkt abhängig von der Zellgröße [25]. Kleinere Zellen und damit kleinere Radien benötigen für eine Überschreitung des Schwellenpotentials höhere Feldstärken.

Canatella et al. zeigten, dass ein enger Zellverband zusätzlich eine messbare Abschwächung der intratumoralen Feldstärke zur Folge hat [57]. Niedrig gewählte Feldstärken können dazu führen, dass das Schwellenpotential zentral gelegener Zellen nicht erreicht wird. Der zytotoxische Effekt ist in diesem Fall auf die Peripherie beschränkt. Zentrale Tumorzellen bleiben von der Elektroporation unbeeinträchtigt und führen zu einem lokalen Frührezidiv.

Die Elektrochemotherapie mit Bleomycin ist in den Vergleichsgruppen hochsignifikant wirksam. Daher ist davon auszugehen, dass die Feldstärke ausreichend hoch gewählt ist, um Spannungsverluste an der Zellmembran und im Tumorzentrum zu kompensieren.

8.2.2 Wirkstoffverteilung und Permeabilität

Die Ergebnisse der Vor- und Hauptversuche mit Bleomycin zeigten gleichartige Resultate. Bloom et al. verwendeten bei ihren klinischen Versuchen an Plattenepithelkarzinomen vergleichbare Parameter und erreichten ebenfalls eine signifikante Volumenreduktion [69]. Es muss davon ausgegangen werden, dass eine ausreichende Zahl an Bleomycinmolekülen das Zytosol erreichte. Es bleibt zu berücksichtigen, dass Bleomycin eine katalytische Wirkung besitzt und auch bei geringer Konzentration apoptotisch wirksam ist. Die Diskrepanz zwischen Vor- und Hauptversuchen bei der Verwendung von Epigallokatechingallat könnte neben den oben erwähnten Spannungsverlusten auch auf einen intrazellulären Wirkstoffmangel zurückzuführen sein.

Im Vorversuch wurden die Zellen separiert und in der EGCG-Lösung inkubiert. Liu et al. zeigten, dass eine mehrtägige Inkubation mit EGCG ohne Elektroporation zu einer bis zu 61-%igen Inhibition der Koloniebildung führen kann [65].

Das Interstitium der implantierten Plattenepithelkarzinome ist nur gering ausgeprägt und bietet kaum Kapazität für ein Wirkstoffeservoir. Die durch das kompakte in-vivo-Zellwachstum limitierte Diffusion führt zusätzlich zu einer geringeren Verfügbarkeit des Chemotherapeutikums. Nach Unterbrechung der Feldspannung bleibt die erhöhte Permeabilität

der Tumorzellmembran für einige Minuten bestehen [24]. Auch bei sorgfältiger Durchführung der Fanning-Technik ist davon auszugehen, dass nicht alle Tumoranteile in gleichem Maße mit Katechinen beimpft werden. Diese Tumorzellen besitzen auf Grund des kleinen Zeitfensters und der eingeschränkten Diffusion schlechte Ausgangsbedingungen für die Elektrochemotherapie.

Canatella et al. führen neben der limitierten Feldstärke und Wirkstoffmenge noch die Permeabilität als Ursache der Effektivitätsminderung an. Die Selektion und anschließende Untersuchung intratumoraler Zellen konnte zeigen, dass diese eine geringere Permeabilität als periphere Zellklone besitzen [57]. Unklar ist, inwiefern dieser Effekt auch Auswirkungen auf die Bildung von Elektroporen hat.

8.3 Pharmakokinetik

Die intrakorporalen Verteilungseigenschaften von Bleomycin und Epigallokatechingallat sind annähernd gleich und können bei einer intratumoralen Injektion vernachlässigt werden.

Die Literaturangaben zur terminalen Halbwertszeit am Menschen schwanken für beide Verbindungen. Die biphasig verlaufende Elimination beträgt für Bleomycin $t_{1/2}$: 1 - 9 Stunden und EGCG $t_{1/2}$: 1 - 7 Stunden [67, 68, 104]. Ohne genaue Daten zur terminalen Elimination am Mausmodell lassen sich hierzu keine exakten Aussagen treffen. Eine frühzeitige Elimination von EGCG bei einem Injektions-Elektroporations-Abstand von 10 Minuten ist unwahrscheinlich.

8.4 Pharmakodynamik

8.4.1 Bleomycin

Bleomycin wird intrazellulär durch Bildung eines Eisenkomplexes aktiviert und bindet an die DNS. Folge ist die Produktion hochreaktiver Sauerstoffradikale, die zu DNS-Strangbrüchen führen. Bei katalytischer Wirkungsweise reichen für eine Apoptoseinduktion wenige hundert Moleküle aus. In Kombination mit einer geringen Membranpassage bietet Bleomycin ideale Eigenschaften für die Elektrochemotherapie. Eine kurzfristige, durch die Elektrotherapie ausgelöste Steigerung des Bleomycineinstroms führt zum Überschreiten einer kritischen Molekülzahl. Durch die beschriebene hohe intrazelluläre Potenz kommt es zur Apoptose.

Resistenzmechanismen werden durch den schnellen Einstrom überfordert und scheinen in der Elektrochemotherapie keine Rolle zu spielen.

8.4.2 EGCG

Die antitumorale Wirkung von EGCG basiert auf der Beeinflussung von Signaltransduktionswegen und Stoffwechselprodukten. Eine Identifikation der initialen Bindungsstellen gelingt nur in Einzelfällen. Für eine Verwendung in der Elektrochemotherapie ist eine intrazelluläre Zielstruktur Voraussetzung.

Katechine binden an die tumorzellspezifische Oberflächenoxidase tNOX [64]. EGCG besitzt gegenüber dem Protein eine hohe Affinität und führt zur Blockade des Enzyms. Folge ist ein Wachstumsstopp mit anschließender Apoptose. Yagiz et al. konnten zeigen, dass bereits eine geringe Katechinkonzentration zu einer Beeinflussung der tNOX und damit zur Apoptose von Tumorzellen führen kann. Gesunde Zellen mit der Wild-Typ-Variante der NADH-Oxidase zeigen auch bei einer hundertfach erhöhten EGCG-Konzentration keine Beeinflussung [73]. Hierbei handelt es sich um eine extrazelluläre Zielstruktur. Demnach kann eine Elektroporation über diesen Signaltransduktionsweg zu keiner Wirkungsverstärkung führen.

Eine weitere extrazelluläre Zielstruktur ist der 67kDa-Laminin-Rezeptor (LR1). Es wurde eine direkte Bindung und Inaktivierung durch EGCG beschrieben [65, 96]. Der Rezeptor ist als Basalmembrananker an der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt. In unseren Untersuchungen spielte die Tumorausbreitung nur eine untergeordnete Rolle und wurde im Antionkogramm des Vorversuches nicht berücksichtigt.

Wird die antitumorale Wirkung von EGCG ausschließlich über transmembranöse Rezeptoren (tNOX, LR1) vermittelt, so führt eine Elektroporation zu keiner Wirkungssteigerung. Die Kontrollgruppe (F) mit alleiniger EGCG-Gabe hätte somit die gleichen Ausgangsbedingungen wie die Gruppe mit EGCG und Elektroporation. Die in-vivo-Versuche mit 232 % Volumenzuwachs unter EGCG versus 181 % unter EGCG plus Elektroporation konnten dies bei fehlender Signifikanz nicht widerlegen.

Unklar bleibt die im Vergleich zum Hauptversuch ausgeprägte Tumorsuppression in den Vorversuchen. Ursächlich hierfür könnte die mehrtägige Inkubation in der EGCG-haltigen Nährlösung gewesen sein. Yagiz et al. inkubierten tNOX-überexprimierende Zellen für 48 Stunden in einer Katechinelösung und wiesen eine apoptotische Wirkung nach [73]. Dies deckt

sich mit den in-vivo-Beobachtungen von Liu und Caltagirone et al., die EGCG über mehrere Tage hinweg verabreichten und damit einen konstanten Plasmaspiegel aufrecht erhielten. Im Gegensatz zu den Vorversuchen und genannten Arbeiten waren die in-vivo-Zellen dieser Untersuchung nur einem einmaligen EGCG-Bolus ausgesetzt.

8.4.3 Inaktivierung von EGCG

Unabhängig von rezeptorvermittelten Effekten besitzen Katechine eine chemische, redoxabhängige Wirkung. Durch unspezifische Reaktionen mit anderen Redoxpartnern (z. B. Sauerstoff, Proteine) kommt es zur Autooxidation, Epimerisation oder Methylierung mit Bildung deutlich schwächer wirksamer Metabolite. Dementsprechend ist die aktive Halbwertszeit als Ausdruck der abnehmenden Reaktivität mit 30 Min. deutlich kürzer als die biologische Halbwertszeit [75]. Die inaktivierenden Oxidationsvorgänge lassen sich indirekt durch die Bestimmung der Wasserstoffperoxidbildung nachweisen. Das in dieser Arbeit in vitro verwendete DME-Medium führte in einer Studie von Babich et al. zu einer ausgeprägten H₂O₂-Bildung, was eine schnelle Inaktivierung von EGCG vermuten ließ [97].

Studien, die durch Oligomerisation, Bindung an Fettsäureester oder Pro-drugs stabilere EGCG-Derivate generierten, konnten eine entsprechende Verlängerung der Aktivität und Effektivität nachweisen [105, 106, 107].

In-vivo-Untersuchungen zur aktiven Halbwertszeit liegen nicht vor. In Anbetracht des in vivo niedrigeren Partialdrucks (160 mmHg vs. ~ 40 mmHg) ist von einer geringeren Inaktivierung durch Sauerstoff auszugehen. Nicht einschätzbar sind Reaktionen mit anderen intrakorporalen Verbindungen und Proteinen. Ohne entsprechende Bestimmung der aktiven in-vivo-Halbwertszeit sind Aussagen zum zeitlichen Ablauf der Inaktivierung nicht möglich.

8.5 Schlussfolgerung

In den Vorversuchen zeigte die Elektrochemotherapie mit EGCG eine deutliche antitumorale Wirkung. Eine Übertragung der Ergebnisse auf das in-vivo-Modell gelang nicht. Die Wirkung von Epigallocatechingallat ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Nach Auswertung der Daten fanden sich für die ausgebliebene Wachstumssuppression drei möglich Ursachen.

1) Das Prinzip der Elektrochemotherapie ist die einmalige Gabe des Therapeutikums vor der Feldapplikation. Entsprechend wurden die Tumoren des in-vivo-Versuches einem intratumoralen Wirkstoffbolus ausgesetzt. Die mit Bleomycin elektroporierte Gruppe bestätigte diesen Ansatz erwartungsgemäß. Es ist denkbar, dass für die Übertragung des in-vitro-Verfahrens auf den Gesamtorganismus im Falle der Katechine zusätzliche Parameter zu beachten sind. Noch ungeklärt sind die interstitielle Metabolisierung sowie der Konzentrationsverlauf des aktiven Katechins. Vergleichbare Studien am Mausmodell verwendeten wiederholte Wirkstoffgaben und erzeugten eine langfristig konstante Wirkstoffkonzentration.

Die Untersuchung der interstitiellen Pharmakokinetik, insbesondere des Konzentrationsverlaufes ist für eine weitere Bewertung essentiell.

2) Erste Forschungsergebnisse zur Wirkungsweise der Katechine weisen auf einen intrazellulären Mechanismus hin. Nach Identifikation weiterer Schlüsselemente zeigte sich eine zunehmende Komplexität ohne singulär verantwortliches Effektorsystem.

Es gibt Hinweise auf mehrere membranständige Signaltransduktionswege (tNOX, LR1). Entsprechende Versuche mit tNOX-überexprimierenden Fibroblasten unterstützen die These einer auch transmembranös vermittelten Wachstumshemmung. Ein durch Elektroporation gesteigerter antitumoraler Effekt ist abhängig von einer intrazellulären Wirkungsvermittlung. Es wäre demnach denkbar, dass bei Annahme einer relevanten membranständigen Apoptoseinduktion die Elektrochemotherapie keinen signifikanten Vorteil zeigt. Als Ursache der antitumoralen Wirkung der in-vitro-Versuche wäre die längerfristige Inkubation mit dem Katechin denkbar.

Die Zielstrukturen der Katechine sind im Hinblick auf die antitumorale Wirkung zum größten Teil unbekannt. Die Anwendung in der Elektrochemotherapie ist abhängig von der Identifikation dieser Strukturen.

3) Das starke Redoxpotential von EGCG führt sowohl in vivo als auch in vitro durch unspezifische Reaktionen zu einem kontinuierlichen Verbrauch des aktiven Katechins. Im Vergleich zur in-vitro-Konstellation war EGCG im Mausmodell unbekanntem Oxidationsvorgängen des Interstitiums ausgesetzt. Es ist denkbar, dass schnelle interstitielle Reaktionen, selbst bei kurzem Injektions-Elektroporations-Abstand zu einem relevanten Abfall der perizellulären Katechinkonzentration geführt haben.

Zusammenfassend ist eine endgültige Aussage über die antitumorale Wirkungssteigerung von Epigallokatchingallat in Verbindung mit der Elektroporation nicht möglich. Die chemotherapeutischen Eigenschaften des Katechins sind in zahlreichen Studien belegt worden.

9 Literaturverzeichnis

- 1 Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut (Hrsg), Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg), Berlin (2008) 6. überarbeitete Auflage
- 2 Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland - Häufigkeit und Trends, (2005) Saarbrücken, 4.Ausgabe
- 3 Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Charité - Berlin, (Zugang am 10.04.2006 www.mkg-berlin.de/ger/klinik/tumor/)
- 4 Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, et al. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields, *EMBO J.* (1982); 1: 7: 841-845
- 5 Muramatsu T, Nakamura A, Park HM. In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals, *Int J Mol Med* (1998); 1: 55-62
- 6 Nishi T, Dev SB, Yoshizato K, et al. Treatment of cancer using electric field in combination with chemotherapeutic agents or genes, *Hum Cell* (1997); 1: 81-86
- 7 Prausnitz MR, Bose VG, Langer R, et al. Electroporation of mammalian skin: a mechanism to enhance transdermal drug delivery, *Proc Natl Acad Sci USA* (1993); 90: 22: 10504-10508
- 8 Mangal PC, Kaur A. Electroporation of red blood cell membrane and its use as a drug carrier system, *Indian J Biochem Biophys* (1991); 3: 219-221
- 9 Vanbever R, Langers G, Montmayeur S, et al. Transdermal delivery of fentanyl: rapid onset of analgesia using skin electroporation, *J Control Release* (1998); 50: 1-3: 225-235
- 10 Nishi T, Yoshizato K, Yamashiro S, et al. High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid dna injection following in vivo electroporation, *Cancer Res* (1996); 56: 5: 1050-1055
- 11 Okino M, Mohri H. Effects of a high voltage electrical impulse and an anti-cancer drug on in vivo growing tumors, *Jpn J Cancer Res* (1987); 78: 12: 1319-21
- 12 Deutsche Krebsgesellschaft e. V. Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts, in *Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien 2008*, Zuckschwerdt-Verlag 2008
- 13 Nanda GS, Sun FX, Hofmann GA, Electroporation enhances therapeutic efficiency of anticancer drugs – treatment of human pancreatic tumor in animal model, *Anticancer Res* (1998); 18: 3A: 1361-6
- 14 Heller R, Jaroszeski M, Gilbert RA, et al., Effective treatment of B16 melanoma by direct delivery of bleomycin using electrochemotherapy, *Melanoma Res* (1997); 7: 1:

- 15 Kuriyama S, Kikukawa M, Mitoro A, et al. Antitumor effect of electrochemotherapy on colorectal carcinoma in an orthotopic mouse model, *Int J Oncol* (1999): 14: 2: 321-6
- 16 Yamaguchi O, Irisawa C, Baba K, et al. Potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses in mouse bladder tumor, *Tohoku J Exp Med* (1994): 172: 3: 291-3
- 17 Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM, Enhancement of cytotoxicity by electroporation: an improved method for screening drugs, *Anticancer Drugs* (1998): 4: 319-325
- 18 Kanesada H. Anticancer effect of high voltage pulses combined with concentration dependent anticancer drugs on lewis lung carcinoma, in vivo, *Nippon Gan Chiryo Gakkai Shi* (1990): 11: 2640-2648
- 19 Mir LM, Belehradec M, Domerge C, et al. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial, *C R Acad Sci III* (1991): 313: 13: 613-618
- 20 Belehradec M, Domerge C, Luboinski B, et al. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment, *Cancer* (1993): 72: 12: 3694-3700
- 21 Chang DC, Reese TS. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy, *Biophys J* (1990): 58: 1: 1-12
- 22 Lopez A, Rols MP, Teissie J. ³¹P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporated Chinese hamster ovary cells, *Biochemistry* (1988): 27: 4: 1222-1228
- 23 Mir LM, Orłowski S, Belehradec Jr, et al. Biomedical application of electric pulses with special emphasis on antitumor electrochemotherapy, *Bioelectrochem. Bioenerg* (1995): 38: 203-207
- 24 Orłowski S, Mir LM. Cell electroporation – a new tool for biomedical and pharmacological studies, *Biochim Biophys Acta* (1993): 1154: 51-63
- 25 O'Neill RJ, Tung L. Cell-attached patch clamp study of the electroporation of amphibian cardiac cells, *Biophys J* (1991): 59: 5: 1028-1039
- 26 Mir LM. Therapeutic perspectives of in vivo cell electroporation, *Bioelectrochemistry* (2001): 53: 1: 1-10
- 27 Kornhauser, Rabussay. Frequently asked questions about electroporation therapy - interview, *Med Electronics*. (1998): 4
- 28 Bornstein MM, Lys O, Altermatt HJ, et al. Primary diagnosis of oral squamous cell carcinoma. A retrospective study of patient data from 1990 to 2002 *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* (2005): 115: 6: 542-548

- 29 Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, *Oral Oncol* (2006): 42: 3: 229-39
- 30 Hofmann GA. Instrumentation, *Methods Mol Biol* (1995): 47: 27-45
- 31 Colombo GL, Matteo SD, Mir LM. Cost-effectiveness analysis of electrochemotherapy with the Cliniporator trade mark vs other methods for the control and treatment of cutaneous and subcutaneous tumors, *Ther Clin Risk Manag* (2008): 4: 2: 541-548
- 32 Dev SB, Hofmann GA. Electrochemotherapy – a novel method of cancer treatment, *Cancer Treat Rev* (1994): 20: 1: 105-115
- 33 Hofmann GA, Dev SB, Nanda GS. Electrochemotherapy: Transition from laboratory to the clinic, *EMB Magazine* (1996): 15: 6: 124- 132
- 34 Domenge C, Orłowski S, Luboński B, et al. Antitumor Electrotherapy – new advances in the clinical protocol, *Cancer* (1996): 77: 5: 956-963
- 35 Salford LG, Persson BR, Brun A, et al. A new brain tumor therapy combining bleomycin with in vivo electroporation, *Biochem Biophys Res Commun* (1993): 194: 2: 938-943
- 36 Gilbert RA, Jaroszeski MJ, Heller R. Novel electrode design for electrochemotherapy, *Biochim Biophys Acta* (1997): 1334: 1: 9-14
- 37 Heller R, Jaroszeski MJ, Reintgen DS, et al. Treatment of cutaneous and subcutaneous tumors with electrochemotherapy using intralesional bleomycin, *Cancer* (1998): 83: 1: 148-157
- 38 Beebe SJ, White J, Blackmore PF, et al. Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues, *DNA Cell Biol* (2003): 12: 785-796
- 39 Gopal R, Narkar AA, Mishra KP, et al. Electroporation: a novel approach to enhance the radioiodine uptake in a human thyroid cancer cell line, *Appl Radiat Isot* (2003): 59: 5-6: 305-10
- 40 Lambreva M, Glück B, Radeva M, et al. Electroporation of cell membranes supporting penetration of photodynamic active macromolecular chromophore dextrans, *Bioelectrochemistry* (2004): 62: 1: 95-98
- 41 Mir LM, Tounekti O, Orłowski S, Bleomycin: Revival of an old drug, *Gen Pharmacol* (1996): 5: 745-748
- 42 Stubbe J, Kozarich JW, Mechanisms of bleomycin-induced dna degradation, *Chem Rev* (1987): 87: 1107-1136
- 43 Povirk LF, Austin MJF. Genotoxicity of bleomycin, *Mutat Res* (1991): 257: 2: 127-143
- 44 Poddevin B, Orłowski S, Belehradec JJr, et al. Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture, *Biochem Pharmacol* (1991): 42: 67-75

- 45 Gothelf A, Mir LM., Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation, *Cancer Treat. Rev.* (2003): 29: 371-387
- 46 Lambert JD, Yang CS. Mechanisms of cancer prevention by tea constituents, *J Nutr* (2003): 133: 10: 3262-3267
- 47 Vergote D, Cren-Olive C, Chopin V, et al. (-)-Epigallocatechin (EGC) of green tea induces apoptosis of human breast cancer cells but not of their normal counterparts, *Breast Cancer Res Treat* (2002): 76: 3: 195-201
- 48 Andersen RF, Fisher LJ, Hara Y, et al. Green tea catechins partially protect DNA from OH radical-induced strand breaks and base damage through fast chemical repair of DNA radicals, *Carcinogenesis* (2001): 8: 1189-1193.
- 49 Heller R, Jaroszeski M, Perrott R, et al. Effective treatment of B-16 melanoma by direct delivery of bleomycin using electrochemotherapy, *Melanoma Research* (1997): 7 : 10-18
- 50 Belehradec JJr, Orłowski S, Ramirez LH, et al. Electroporation of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin, *Biochim Biophys Acta* (1994): 1190: 1: 155-163
- 51 Hofmann GA, Dev SB, Nanda GS, et al. Electroporation therapy of solid tumors, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* (1999): 16: 6: 523-69
- 52 Satkauskas S, Batiuskaite D, Salomskaite-Davaliene S, et al. Effectiveness of tumor electrochemotherapy as a function of electric pulse strength and duration, *Bioelectrochemistry* (2005): 65: 2: 105-111
- 53 Sersa G, Kotnik V, Cemazar M, et al. Electrochemotherapy with bleomycin in SA-1 tumor-bearing mice – natural resistance and immune responsiveness, *Anticancer Drugs* (1996): 7: 7: 785-91
- 54 Mir LM, Roth C, Orłowski S, et al. Systemic antitumor effects of electrochemotherapy combined with histoincompatible cells secreting interleukin-2, *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* (1995): 17: 1: 30-38
- 55 Kranjc S, Cemazar M, Grosel A, et al. Radiosensitising effect of electrochemotherapy with bleomycin in LPB sarcoma cells and tumors in mice, *BMC Cancer* (2005): 5: 115
- 56 Okino M, Tomie H, Kanesada H, et al. Guidance of the unique toxicity of tumors via electrical impulse chemotherapy, *Oncologica* (1991): 24: 4: 71-79
- 57 Canatella PJ, Black MM, Bonnicksen DM, et al. Tissue electroporation: Quantification and analysis of heterogeneous transport in multicellular environments, *Biophys J* (2004): 86: 5: 3260-3268

- 58 Miklavcic D, Pucihar G, Pavlovec M, et al. The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy, *Bioelectrochemistry* (2005): 65: 2: 121-128
- 59 Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. *Am J Pathol* (2001): 158: 6: 1991-1996
- 60 Nanda GS, Sun FX, Hofmann GA, et al. Electroporation therapy of human larynx tumors in Hep-2 implanted in nude mice. *Anticancer Res* (1998):18 :3A: 999-1004
- 61 Maxim PG, Carson JLL, Ning S, et al. Enhanced effectiveness of radiochemotherapy with tirapazamine by local application of electric pulses to tumors. *Radiat Res* (2004) :162 :2 :185-193
- 62 Morré DJ, Morré DM, Sun H, et al. Tea catechin synergies in inhibition of cancer cell proliferation and of a cancer specific cell surface oxidase (ECTO-NOX). *Pharmacol Toxicol.* (2003): 92: 5: 234-241
- 63 Mittal A, Pate MS, Wylie RC, et al. EGCG down-regulates telomerase in human breast carcinoma MCF-7 cells, leading to suppression of cell viability and induction of apoptosis. *Int J Oncol* (2004): 24: 3: 703-710
- 64 Morre DM, Morre DJ, Catechin-vanilloid synergies with potential clinical applications in cancer. *Rejuvenation Res.* (2006): 9: 1: 45-55
- 65 Liu JD, Chen SH, Lin CL, et al. Inhibition of melanoma growth and metastasis by combination with (-)-epigallocatechin-3-gallate and dacarbazine in mice. *J Cell Biochem* (2001): 83: 4: 631-642
- 66 Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, et al. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer.* (2000): 15: 87: 4: 595-600
- 67 Bleomycin Baxter (Zugang am 17.10.2007 <http://int.ws.e-mediat.net/PRODUCT>)
- 68 Lin LC, Wang MN, Tseng TY, et al. Pharmacokinetics of (-)-epigallocatechin-3-gallate in conscious and freely moving rats and its brain regional distribution. *J Agric Food Chem* (2007) 02-21: 55: 4:1517-1524
- 69 Bloom DC, Goldfarb PM, The role of intratumour therapy with electroporation and bleomycin in the management of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Surg Oncol* (2005) Nov : 31 : 9 :1029-1035
- 70 Giardino R, Fini M, Bonazzi V, et al. Electrochemotherapy a novel approach to the treatment of metastatic nodules on the skin and subcutaneous tissues. *Biomed Pharmacother.* (2006) Sep: 60: 8: 458-462

- 71 Gehl J, Sersa G, Garbay J, et al. Results of the ESOPE (European Standard Operating Procedures on Electrochemotherapy) study: Efficient, highly tolerable and simple palliative treatment of cutaneous and subcutaneous metastases from cancers of any histology. *J Clin Oncol* (2006) 24: 18S: 8047
- 72 Larkin JO, Collins CG, Aarons S, et al. Electrochemotherapy: aspects of preclinical development and early clinical experience. *Ann Surg.* (2007) 245: 3: 469-479
- 73 Yagiz K, Wu LY, Kuntz CP, et al. Mouse embryonic fibroblast cells from transgenic mice overexpressing tNOX exhibit an altered growth and drug response phenotype. *J Cell Biochem* (2007) 101: 2: 295-306
- 74 Lambert JD, Sang S, Yang CS. Biotransformation of green tea polyphenols and the biological activities of those metabolites. *Mol Pharm.* (2007) 4(6): 819-825
- 75 Hou Z, Sang S, You H et al. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. *Cancer Res.* (2005) 65(17): 8049-8056
- 76 Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, et al. Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-year proof-of-principle study. *Cancer Res.* (2006) 66(2):1234-1240
- 77 Lee WJ, Shim JY, Zhu BT. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. *Mol Pharmacol.* (2005) 68(4):1018-1030
- 78 Hastak K, Agarwal MK, Mukhtar H, et al. Ablation of either p21 or Bax prevents p53-dependent apoptosis induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. *FASEB J.* (2005) 19(7): 789-791
- 79 Gupta S, Hussain T, Mukhtar H. Molecular pathway for (-)-epigallocatechin-3-gallate-induced cell cycle arrest and apoptosis of human prostate carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys.* (2003) 410(1): 177-185
- 80 DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen Zellkulturen. Cell Line KB, (Zugang am 10.04.2006 http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines)
- 81 Bier J, Metelmann HR. Das Antionkogramm – Tumorspezifische Zytostatikatestung in vitro, *Dtsch Zschr Mund-Kiefer-Gesichts-Chir* (1982): 6: 111-119
- 82 LGC-Promochem. CRL-1624, (Zugang am 10.04.2006 <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog>)
- 83 Ki67 Immunohistochemical staining protocol, aus (Zugang am 10.04.2006 http://www.ihcworld.com/_protocols/antibody_protocols/ki67_dakocytomation.htm)
- 84 Rebersek M, Cufer T, Cemazar M, et al. Electrochemotherapy with cisplatin of cutaneous tumor lesions in breast cancer, *Anticancer Drugs* (2004): 15: 6: 593-597

- 85 Lin K, Patel SG, Chu PY, et al. Second primary malignancy of the aerodigestive tract in patients treated for cancer of the oral cavity and larynx. *Head Neck*. (2005); 27: 12: 1042-1048
- 86 Sen T, Moulik S, Dutta A, et al. Multifunctional effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in downregulation of gelatinase-A (MMP-2) in human breast cancer cell line MCF-7. *Life Sci* (2009) Feb 13: 84 (7-8): 194-204
- 87 Zieske LA, Johnson JT, Myers EN, et al. Squamous cell carcinoma with positive margins, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (1986): 112: 863-866
- 88 Andersen PE: Cervical Metastases, in Close LG, Larson DL, Shah JP (Hrsg.): *Essentials of Head and Neck Oncology*, New York 1998, 256-265
- 89 Gu B, Ding Q, Xia G et al. EGCG inhibits growth and induces apoptosis in renal cell carcinoma through TFPI-2 overexpression, *Oncol Rep* (2009): 21; 3; 635-640
- 90 Iwasaki R, Ito K, Ishida T, et al. Catechin, green tea component, causes caspase-independent necrosis-like cell death in chronic myelogenous leukemia, *Cancer Sci* (2009): 100: 2: 349-356
- 91 AWMF Leitlinienregister Nr. 007/092, Diagnostik und Management von Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (Zugang 15.04.2010) <http://www.uni-dueseldorf.de/AWMF/II/007-092.htm>
- 92 Chen J, Stubbe J. Bleomycin: towards better therapeutics, *Nat Rev Cancer* (2005): 2: 102-112
- 93 Rothman K, Keller A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx, *J Chronic Dis* (1972): 12: 711-716
- 94 Ferlito A, Rinaldo A, Robbins KT, et al. Neck dissection: past, present and future?, *J Laryngol Otol* (2006):120: 2: 87-92
- 95 Ho YC, Ynag SF, Peng CY, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the invasion of human oral cancer cells and decreases the productions of matrix metalloproteinases and urokinase-plasminogen activator. *J Oral Pathol Med* (2007) 36(10): 588-593
- 96 Shamma AM, Neri P, Koley H, et al. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications. *Blood* (2006) 108(8): 2804-2810
- 97 Babich H, Krupka ME, Nissim HA, et al. Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. *Toxicol In Vitro* (2005) 19: 2: 231-342

- 98 Nakagawa H, Hasumi K, Woo JT, et al. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis* (2004) 25: 9: 1567-1574
- 99 Zhu BH, Zhan WH, He YL, Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth and angiogenesis of gastric cancer and its molecular mechanism. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* (2009) 12: 1: 82-85
- 100 Chen XL, Wang Q, Cao LQ, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (2008) 88: 36: 2524-2528
- 101 Kato L, Long NK, Makita H, et al. Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. *Br J Cancer* (2008) 99: 4: 647-654
- 102 Adachi S, Nagao T, To S, et al. (-)-Epigallocatechin gallate causes internalization of the epidermal growth factor receptor in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* (2008) 29: 10: 1986-1993
- 103 Yao K, Ye P, Zhang L, et al. Epigallocatechin gallate protects against oxidative stress-induced mitochondria-dependent apoptosis in human lens epithelial cells. *Mol Vis* (2008) 14: 217.223
- 104 Khan N, Mukhtar H, Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. *Cancer Lett* (2008) 269: 2: 269-280
- 105 Nagarajan S, Nagarajan R, Braunhut SJ, et al. Biocatalytically oligomerized epicatechin with potent and specific anti-proliferative activity for human breast cancer cells. *Molecules* (2008) 13: 11: 2704-2716
- 106 Matsumura, K, Kaihatsu K, Mori S, et al. Enhanced antitumor activities of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate fatty acid monoester derivatives in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) 377: 4: 1118-1122
- 107 Dou QP, Landis-Piwowar KR, Chen D, et al. Green tea polyphenols as a natural tumour cell proteasome inhibitor. *Inflammopharmacology* (2008) 16: 5: 208-212
- 108 UpToDate online 17.2, Green tea (*camellia sinensis*): Natural drug information (Zugang am 22.11.2009 <http://www.uptodate.com>)
- 109 Rivera F, Garcia-Castano A, Vega N, et al. Cetuximab in metastatic or recurrent head and neck cancer, The EXTREME trial. *Expert Rev Anticancer Ther* (2009) 9: 10 1421-8

10 Abkürzungsverzeichnis

A253	Zelllinie Plattenepithelkarzinom
ABVD	Chemotherapieregime (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin)
AH-109A	Zelllinie hepatozelluläres Karzinom
AIF	Apoptose-induzierender-Faktor
AP-1	Aktivator-Protein-1
APE1	Endonuklease
ATM	Ataxie-Telangiektasie Mutation
bax	p53 assoziiertes proapoptotisches Protein
bcl-2	B-cell lymphoma 2, apoptoseassoziiertes Protein
BEACOPP	Chemotherapieregime (Cyclophosphamid, Etoposid, Adriamycin, Procarbazin, Vincristin, Bleomycin, Prednisolon)
BLM	Bleomycin
cdk	Cyclin-abhängige Kinasen
c-fos	FOS-kodierendes Onkogen
c-H-ras	Protoonkogen
CIS	Carcinoma in situ
c-Jun	Transkriptionsfaktor
c-myc	Protoonkogen
DAB	Peroxidase-Substrat-Lösung
DGQ e. V.	Deutsch Gesellschaft für Qualität e. V.
DISC	Zelltod-induzierender Signalkomplexes
DME	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNMT	DNS-Methyltransferase
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EC	Epikatechin
ECG	Epikatechingallat
ECT	Elektrochemotherapie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	Epigallokatechingallat
EGFR	epidermal growth factor Rezeptor
ELK	Transkriptionsfaktor
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer

EP	Elektroporation
ERK	Proteinkinase
ESOPE	European Standard Operating Procedure on Electrochemotherapy
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAS	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
FASL	Tumornekrosefaktor-Liganden
FBS	fötales Kälberserum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin Eosin
hTERT	Telomeraseuntereinheit
ICD	international classification of diseases
IGF	insulin-like Wachstumsfaktor
JNK	c-Jun N-terminale Proteinkinasen
KB	Zelllinie humanes Zervixkarzinom
LR1	67kDa Laminin-Rezeptor
MAO	Monoaminoxidasen
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCT	Monocarboxylase-Transporter
MDR	Multi-Drug-Resistance
MEM	minimal essential medium Eagle
MIB-1	monoklonaler Ki67-Antigen-Antikörper
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MRP	Multidrug-Resistance-assoziierten Proteins
NF-κB	sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor
NMRI	Maus Inzuchtstamm „Naval Medical Research Institute“
OKT ₃	monoklonalen Antikörpers
p38	mitogenaktivierende Proteinkinase
p53	proapoptotisches Tumorsupressor Protein
PBS	phosphate buffered saline
Pgp	P-170-Glykoprotein
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxigen species
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SIN	squamöse intraepitheliale Neoplasie

stat3	Signal transducer and activator of transcription 3
TFPI-2	Tissue Factor Pathway Inhibitor 2
tNOX	tumor-associated NADH oxidase
TPA	tissue polypeptide antigen
uPA	urokinase-plasminogen activator
ΔV_s	Schwellenpotential
ΔV_m	transmembranes Potential
VEGF	vascular endothelial growth factor

11 Danksagung

Ich danke Professor Dr. Dr. med. B. Hoffmeister und Dr. Dr. med. T. Plath für die intensive und fachliche Betreuung.

Frau Wartenberg und dem Max-Delbrück-Zentrum danke ich für die technische und wissenschaftliche Unterstützung bei der Versuchsausführung.

Für die moralische Unterstützung möchte ich mich bei meinen Eltern Firu und Christine, sowie meiner zukünftigen Ehefrau Meike Wienhold bedanken.

Außerdem danke ich allen die diese Arbeit unterstützt und hier keine Erwähnung gefunden haben.

12 Erklärung

Ich, Alexander Opri, geb. 18.06.1978, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Antitumorale in-vivo-Wirksamkeit von Epigallokatechingallat bei topischer Applikation in Kombination mit der Elektroporation am oralen Plattenepithelkarzinom im Nacktmausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 23.01.2011

Alexander Opri

13 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.