

Aus dem Berlin-Brandenburg Center für Regenerative Therapien (BCRT) in
Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin der Medizinischen
Fakultät Charité-Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Erythrozyten als Drug-Carrier für eine Krebstherapie –
in vitro Untersuchungen am Kolonkarzinom-Modell**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Saphira Göppert

aus Leipzig

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. H. Bäuml
 2. Priv.-Doz. Dr. med. U. Pohlen
 3. Prof. Dr. B. Neu

Datum der Promotion: 30.11.2012

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. H. Bäumler sowohl für die Bereitstellung des interessanten Themas als auch für die vielen Hilfestellungen und das große persönliche Engagement bei der Erstellung meiner Arbeit. Frau Dr. rer. nat. R. Georgieva danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei den Experimenten und der schriftlichen Ausarbeitung.

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Herrn Dr. rer. nat. B.-R. Paulke aus dem Fraunhofer Institut Angewandte Polymerforschung aus Potsdam-Golm für die überaus freundliche Zusammenarbeit, die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, die Bereitstellung der verwendeten Nanopartikel sowie die unendlich vielen fachlichen Hilfestellungen bei kleinen und großen Fragen.

Herrn Dr. C. Cadicamo der Arbeitsgruppe Prof. Dr. B. Kokschi aus dem Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin danke ich für die Herstellung der FUAC-Dextrankonjugate sowie die NMR-spektroskopischen Analysen des Wirkstoffes und der Wirkstoffkonjugate. Meinen lieben Kollegen der Arbeitsgruppe Bäumler danke ich für die stete Unterstützung beim Erlernen neuer Methoden, dem Verarbeiten von Daten und die herzliche Zusammenarbeit.

Der Abteilung für experimentelle Chirurgie der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin danke ich für das Bereitstellen der für die Zellkulturversuche verwendeten Kolonkarzinom-Zellen.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich für das Vertrauen in meine Fähigkeiten und die liebevolle moralische Unterstützung danken. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle meiner Freundin Inka Gotthardt und meiner Mama Saskia John für das unermüdliche Korrekturlesen und die stete Motivation.

Abschließend danke ich meinem Ehemann Oliver, meiner Tochter Lahja und meinem Sohn Noel für ihr Verständnis, den emotionalen Beistand und die zahlreichen schönen Momente.

Herzlichen Dank,
Saphira

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1. Krebs und Therapiekonzepte	1
1.1.1. Zytostatika	2
1.1.2. Drug-Targeting	8
1.1.3. Erythrozyten als Drug-Carrier	9
1.2. Aufgabenstellung	15
2 Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Puffer, Lösungen und Medien	16
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien	16
2.1.3. Verwendete Zellen	18
2.1.4. Zellkulturbedingungen	18
2.1.5. Zellkulturauswertung	19
2.1.6. Verwendete Nanopartikel	20
2.1.7. Geräte und Verbrauchsmaterialien	21
2.2. Methoden	23
2.2.1. Herstellung von white Ghosts	23
2.2.2. Erythrozytenbeladung	24
2.2.3. Wirkstoff-Kopplung an Makromoleküle	27
2.2.4. Photometrie, UV/VIS-Spektrum	29
2.2.5. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)	30
2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS)	31
2.2.7. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	33
2.2.8. NMR-Spektroskopie	34
2.2.9. Partikelelektrophorese	35
2.2.10. Statistische Auswertung	35
3 Ergebnisse	36
3.1. Vorversuche zur Beladung mit 5-FU	36
3.1.1. Erythrozytenbeladung mit freiem 5-FU und Wirkstoffkonzentrationsbestimmung in Erythrozyten, white Ghosts und den Überständen	36
3.2. Kopplung an Makromoleküle	39
3.2.1. UV/VIS-Spektren von 5-FU und FUAC	39
3.2.2. NMR-Spektroskopie	40
3.2.3. Elektrophorese	42
3.3. Untersuchung der Wirkstoff-Makromolekülkomplexe auf ihre wachstumshemmende Wirkung in der Zellkultur	43

Inhaltsverzeichnis

3.3.1. Wirkung von freiem 5-FU	44
3.3.2. Wirkung von FUAC-Dextran	44
3.3.3. Wirkung von FUAC-Nanopartikeln	46
3.4. Osmotische Fragilität von Erythrozyten	48
3.5. Beladung von Erythrozyten und white Ghosts mit den Modellsubstanzen	48
3.5.1. Beladung mit FITC-Albumin	49
3.5.2. Beladung mit FITC-Dextran	51
4 Diskussion	53
4.1. Vorversuche zur Beladung mit 5-FU als Monosubstanz	53
4.1.1. Intrazelluläre Verweildauer	54
4.1.2. Gegenüberstellung der verschiedenen Carrier	54
4.1.3. Beladungserfolg	55
4.2. Modifikation von 5-FU und Kopplung an Makromoleküle	55
4.2.1. Umsetzung von 5-FU zu FUAC	56
4.2.2. Bildung von FUAC-Makromolekülkonjugaten und deren Eigenschaften	57
4.3. Antiproliferative Wirksamkeit der Wirkstoff-Makromolekülkomplexe	61
4.4. Erythrozytenbeladung mit Modellsubstanzen	63
4.5. Spezifisches Lebertargeting	64
4.6. Weg des Wirkstoffes von der Injektion zum Tumor	66
4.7. Fazit und Ausblick	70
5 Zusammenfassung	73
6 Literaturverzeichnis	75
Lebenslauf	83
Erklärung	84

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metastasierungskaskade.	2
Abbildung 2: Darstellung der Strukturen von Uracil, 5-FU, FURd und FdUTP.	4
Abbildung 3: Erythrozytenmorphologie.	9
Abbildung 4: Aufbau der Erythrozytenmembran.	10
Abbildung 5: Neubauer-Improved Zählkammer.	20
Abbildung 6: Schema der Beladung von Erythrozyten.	24
Abbildung 7: Reaktionsgleichung der Umwandlung von 5-FU zu FUAC.	27
Abbildung 8: Eichkurve für die photometrische 5-FU-Konzentrationsbestimmung.	30
Abbildung 9: Schematische Darstellung vom Aufbau eines Durchflusszytometers.	33
Abbildung 10: Strahlenverlauf eines CLSM.	33
Abbildung 11: V1. Darstellung der chromatographisch bestimmten 5-FU-Konzentration.	38
Abbildung 12: V2, V3 und V4. Darstellung der chromatographisch bestimmten 5-FU-Konzentration.	38
Abbildung 13: UV/VIS-Spektren von 5-FU und FUAC.	40
Abbildung 14: NMR-Spektren von 5-FU und FUAC.	41
Abbildung 15: ¹⁹ F-NMR-Spektren von FUAC und FUAC-Dextran.	41
Abbildung 16: ¹ H-NMR-Spektrum von FUAC-Dextran.	42
Abbildung 17: Partikelelektrophorese von EPS 4-PP und FUAC-PP.	43
Abbildung 18: Effekte von 5-FU auf das Zellwachstum.	44
Abbildung 19: Effekte von FUAC-Dextran auf das Zellwachstum.	45
Abbildung 20: Effekte von FUAC und FUAC-Nanopartikeln auf das Zellwachstum.	47
Abbildung 21: Darstellung der Hämolyseraten.	48
Abbildung 22: CLSM-Bild: FITC-Albumin beladene Erythrozyten.	51
Abbildung 23: CLSM-Bild: FITC-Dextran beladene Erythrozyten.	52
Abbildung 24: ¹³ C NMR-Spektrum von FUAC.	57
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Umwandlung von 5-FU zu FUAC-Dextran.	58
Abbildung 26: EPR-Effekt.	60
Abbildung 27: Histologischer Aufbau der Leber.	67
Abbildung 28: Schematische Darstellung des Wirkstoff-Weges zu den Krebszellen.	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der Zytostatika und deren Wirkungsweisen.	3
Tabelle 2: Geeignete Carrier für den Transport von Zytostatika.	9
Tabelle 3: Verwendete Substanzen.	17
Tabelle 4: Zusammensetzung der verschiedenen Zellkulturmedien.	19
Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.	22
Tabelle 7: Beladungserfolg FITC-HSA beladener Erythrozyten in Abhängigkeit der Osmolarität der Inkubationslösung.	50
Tabelle 8: Beladungserfolg FITC-HSA beladener white Ghosts in Abhängigkeit der Osmolarität der Inkubationslösung.	50
Tabelle 9: Beladungserfolg FITC-Dextran beladener Erythrozyten ohne und mit Vorlyse bei 160mOsm.	51

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius		carbodiimide hydrochloride
5-FU	5-Fluorouracil	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Å	Ångström	engl.	Englisch
µM	mikromolar	EPMA	2,3-Epoxypropylmethacrylate
		EPR	enhanced permeability and retention
A			
Abb.	Abbildung	et al.	et alii
AK	Antikörper		
Aqua	Aqua bidestillata	F	
bidest.		FA	Formamid
ASGP-R	Asialoglykoprotein-Rezeptor	FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflußzytometrie
ATP	Adenosintriphosphat	FAK	Fokale Adhäsionskinase
		FdUTP	Fluorodesoxyuridintriphosphat
B		FITC	Fluorescein Isothiocyanat
BK	Beladungskonzentration	FKS	Fetales Kälberserum
bp	Basenpaare	F _{Median}	Median der Fluoreszenzintensität
BSA	Bovines Serum Albumin	FSC	Forward Scattered Channel, Forwärtsstreulicht
bzw.	beziehungsweise	FUAC	Fluorouracilessigsäure
		FUTP	Fluorouridintriphosphat
C			
Ca	Calcium	G	
ca.	circa	GLT ₅₀	Glyzerin-Lyse-Zeit
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	H	
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	h	Stunde
CRC	kolorektales Karzinom	Hb	Hämoglobin
		HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
D		HPLC	Hochdruckflüssig-chromatographie
Da	Dalton	HSA	Humanes Serum Albumin
DCM	Dichlormethan		
DIC	N,N-Diisopropylcarbodiimid	I	
DMAP	N,N-Dimethylformamid	IC ₅₀	inhibitorische Konzentration
DMF	N,N-Dimethylaminopyridin	Ig	Immunglobulin
DMSO	Dimethylsulfoxid	IK	Inkubationskonzentration
DNA	Desoxyribonukleinsäure	i.a.	intraarteriell
DPD	Dihydropyrimidindehydrogenase	i.v.	intravenös
E			
EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]		

Abkürzungsverzeichnis

K		P	
KCl	Kaliumchlorid	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
kDa	Kilodalton	PEG	Polyethylenglykol
M		PLGA	Polylactid-co-Glycolid
M	molar	ppm	parts per million
MAA	Methacrylsäure	R	
MCH	mittleres korpuskuläres Hämoglobin	Rel.E.	relative Einheiten
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration	RES	Retikuloendotheliales System
MCV	mittleres Erythrozyteneinzelvolumen	RHS	Retikulohistiozytäres System
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	RNA	Ribonukleinsäure
MG	Molekulargewicht	RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Mg	Magnesium	S	
MM	Molmenge	SD	Standardabweichung
mM	millimolar	SSC	Side Scattered Channel, Seitwärtsstreulicht
MOF	mittlere osmotische Fragilität	s.c.	subkutan
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	T	
MTX	Methotrexat	t	Zeit
MW	Mittelwert	Tab.	Tabelle
N		TS	Thymidilat-Synthase
NaCl	Natriumchlorid	V	
NHS	N-Hydroxysuccinimid	VEGF	Vascular endothelial growth factor
NK	Negativkontrolle	v/v	Volumen/Volumen
NMR-Spektroskopie	Kernspinresonanz-Spektroskopie	Z	
NP	Nanopartikel	z.B.	zum Beispiel
NS	Nucleinsäure		
O			
o.	Oder		
OF	osmotische Fragilität		

1 Einleitung

1.1. Krebs und Therapiekonzepte

In der deutschen Todesursachenstatistik befinden sich die bösartigen Neubildungen nach den Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems an zweiter Stelle [1]. Das mittlere Lebensalter betreffend sind sie sogar die bedeutendste Todesursache [2]. Im Hinblick auf den demographischen Wandel, beeinflusst durch die steigende Lebenserwartung, wird die Therapie von Krebserkrankungen in Zukunft weiter an Bedeutung zunehmen.

Die herkömmlichen Behandlungskonzepte umfassen die operative, Strahlen- und Chemotherapie. Trotz stetiger Verbesserungen und großer technischer Fortschritte in der chirurgischen und radiologischen Therapie bleiben diese Behandlungskonzepte in der Regel Patienten mit lokal begrenztem Tumorleiden vorbehalten. Das Schicksal von Patienten mit Tumorleiden hängt jedoch in den meisten Fällen nicht vom Wachstum des Primärtumors ab, sondern von dessen Ausbreitung durch Metastasierung. Für die Verschleppung von Tumorzellen in entfernte Körperregionen und folgender Ausbildung einer Tochtergeschwulst dringen die zur Invasion und Metastasierung fähigen malignen Zellen in die Metastasierungswege, hierzu zählen das Blutgefäßsystem aber auch Lymphgefäße und Flüssigkeiten in Körperhöhlen, ein. Im Intravasalraum sind sie Interaktionen mit Blutkomponenten und dem Immunsystem ausgesetzt. Trotz der genannten Abwehrprozesse kann es den Zellen gelingen sich am Metastasierungsort an Endothelzellen anzuhaften und auf diese Weise die Metastasierungswege zu verlassen um einen neuen Tumor zu bilden (Abb. 1) [1].

Für die Behandlung von Metastasen ist eine systemische Therapie mit Zytostatika erforderlich. Da von jeder verbleibenden Tumorzelle ein Rezidiv ausgehen kann, sind häufig hohe Dosierungen und mehrere Therapiezyklen vonnöten, um eine komplette Remission zu erzielen [3]. Das Hauptproblem einer systemischen Chemotherapie ist die Verteilung der Medikamente im gesamten Körper. Um therapeutische Konzentrationen am Ort des Tumors oder der Metastase zu erreichen, müssen große Mengen der Substanzen verabreicht werden, jedoch wird hauptsächlich gesundes Gewebe mit den entsprechenden Zytostatika belastet.

Aus diesem Grund sollte ein optimales Medikament seine pharmakologische Aktivität ausschließlich im Zielgewebe entfalten. Gezielter Arzneimitteltransport, sogenanntes Drug-Targeting, mittels geeigneter Transporter, den Drug-Carriern, zu ausschließlich erkranktem Gewebe bzw. entarteten Zellen stellt einen vielversprechenden Lösungsansatz für eine optimierte systemische Therapie dar.

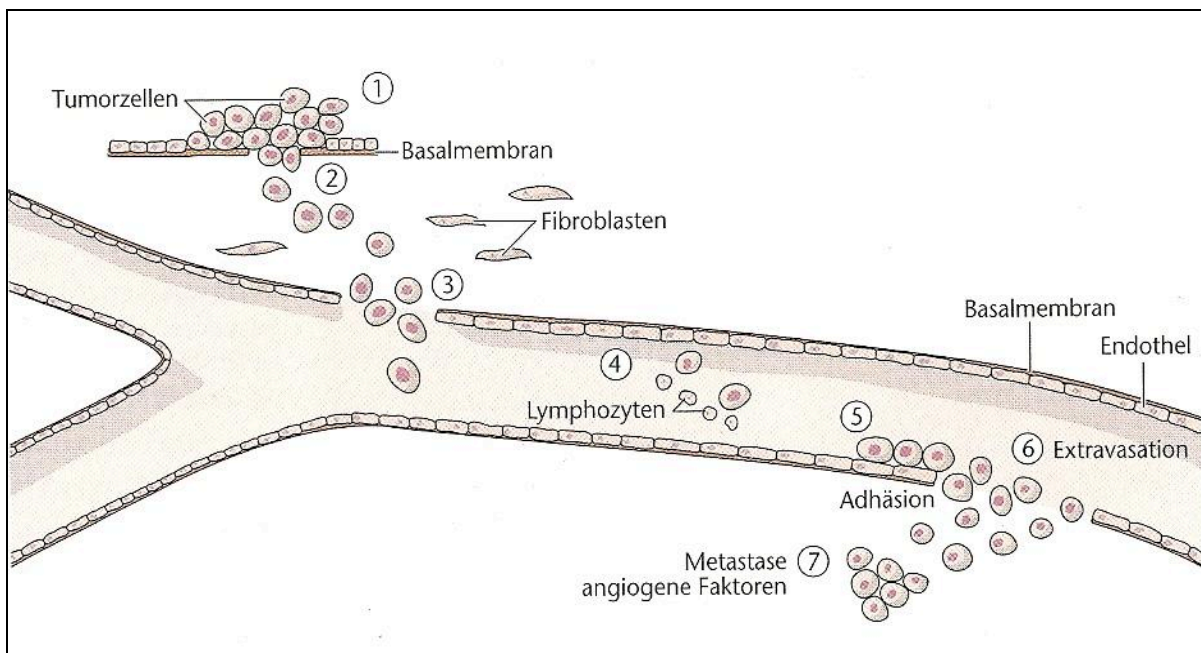


Abbildung 1: Metastasierungskaskade. 1: Tumorzellen erlangen Fähigkeit zu invasivem Wachstum. 2: Infiltration der Basalmembran und des angrenzenden Gewebes. 3: Eindringen in die Metastasierungswege (Intravasation). 4: Immunologische Überwachung. 5: Endothelzelladhäsion am Metastasierungsort. 6: Austritt aus den Metastasierungswegen (Extravasation). 7: Metastasenbildung und Angiogenese. [4]

1.1.1. Zytostatika

Die herkömmliche Chemotherapie basiert auf der Tatsache, dass Tumorzellen im Vergleich zu Normalgewebe eine höhere Teilungsrate aufweisen. Das Zellwachstum wird durch die Medikamentengruppe der Zytostatika unselektiv gehemmt. Erst die hohen Zellteilungsraten ermöglichen eine beschränkte Selektivität, wobei jedoch auch gesundes Gewebe mit hohem Zellumsatz geschädigt wird [3].

1.1.1.1. Einteilung und Wirkung

Betrachtet man die unterschiedlichen Wirkmechanismen, lassen sich phasenspezifische von zyklusspezifischen Zytostatika unterscheiden. Die phasenspezifischen Substanzen wirken nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus. Ausschlaggebend für den Therapieerfolg ist die Dauer der Therapie. Daher werden diese Wirkstoffe niedrigdosiert über einen längeren Zeitraum verabreicht. Dem gegenüber wirken die zyklusspezifischen, phasenunspezifischen Zytostatika in jeder Phase des Zellzyklus. Bei diesen ist die Konzentration entscheidend, so dass sie intermittierend höher dosiert appliziert werden.

Einleitung

Tabelle 1 fasst die wichtigsten Untergruppen der Zytostatika und ihre Wirkmechanismen zusammen.

Tabelle 1: Einteilung der Zytostatika und deren Wirkungsweisen [3].

Zytostatikagruppe	Wirkung
Alkylantien	Alkylierung von Nukleinsäuren (NS): abnorme Basenpaarung, Vernetzung von DNA- bzw. RNA-Strängen
Antimetabolite	Durch Strukturähnlichkeit Einbau in NS, die nicht funktionsfähig ist; Hemmung von Enzymen der Nukleotidbiosynthese
Mitosehemmstoffe	Durch Hemmung der Spindelapparausbildung irreversible Hemmung der Zellteilung in der Metaphase
Topoisomerase-Inhibitoren	Hemmung von Topoisomerase I & II: DNA-Strangbrüche; durch Interkalierung in die DNA: Blockade von DNA- & RNA-Synthese
Signaltransduktion-Inhibitoren	Spezifische Hemmung von Proteinkinasen, anderer Enzyme o. Effektormolekülen der Angiogeneseregulation, Proliferationsregulation und Tyrosinkinasen, dadurch Apoptose entsprechender Zellreihen
Monoklonale Antikörper	Blockade spezifischer Mediatoren (z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine) und Zytotoxizität gegen spezifische Zellpopulationen

1.1.1.2. 5-Fluorouracil

Das 1957 entwickelte 5-Fluorouracil (5-FU) ist ein Pyrimidinantagonist und gehört zu den Antimetaboliten [5]. Es unterscheidet sich von der Pyrimidinbase Uracil allein durch die Substitution eines Wasserstoffatoms durch ein Fluoratom [5].

Durch eine sehr komplexe Hemmung der Thymidylatsynthase und Pyrimidinsynthese behindert es sowohl DNA- als auch RNA-Synthese auf verschiedenen Ebenen [3]. Weiterhin wird es nach Umwandlung zu dem entsprechenden Ribonukleotid Fluorouridintriphosphat (FUTP) in die RNA und nach Umwandlung und das entsprechende Desoxyribonukleotid Fluorodesoxyuridintriphosphat (FdUTP) in die DNA eingebaut (Abb. 2). Durch diese Mechanismen kommt es zu einer Störung der RNA-Funktion, welche zur Induktion der Apoptose führt, wie auch zu einer Beeinträchtigung der Stabilität der DNA [6].

Einleitung

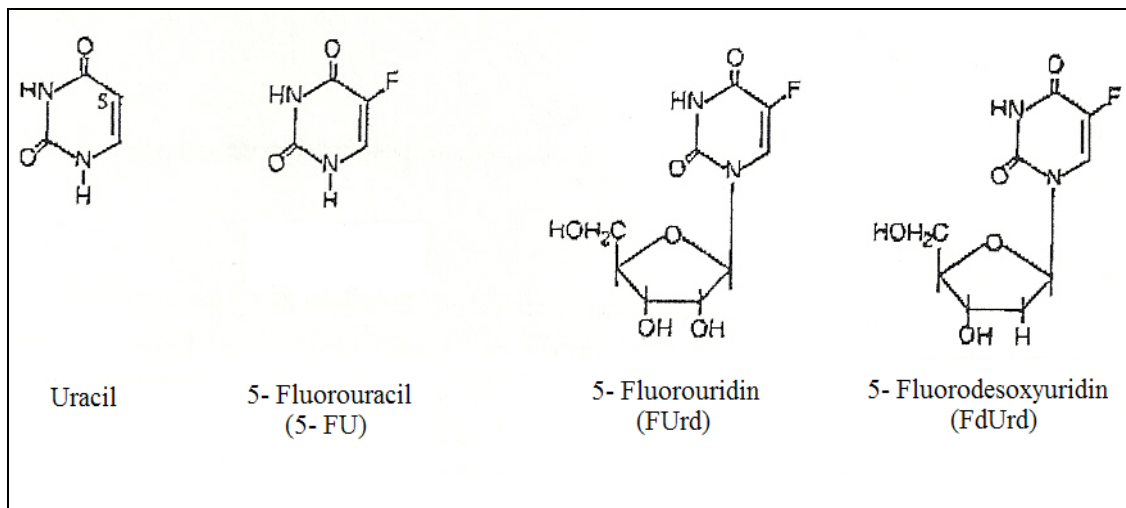


Abbildung 2: Darstellung der Strukturen von Uracil, 5-FU sowie den entsprechenden Nucleosiden FUrd und FdUTP [5].

5-FU findet hauptsächlich Anwendung in der Standardtherapie von gastrointestinalen sowie Mamma-Karzinomen und zeichnet sich durch die beste Wirkung bei metastasiertem Kolonkarzinom (engl. colorectal cancer, CRC) aus. Es besitzt ebenso eine Zulassung für die Therapie primärer Leberkarzinome [7, 8]. Das CRC ist das zweithäufigste Karzinom des Mannes und das dritthäufigste Karzinom der Frau. In etwa 6% der Bevölkerung entwickeln im Laufe ihres Lebens ein CRC, mit zunehmender Inzidenz in den westlichen Industrienationen [9].

Die zytostatische Wirkung von 5-FU wird durch die kombinierende Gabe von Folinsäure, aus welcher der Kofaktor für die Thymidylatsynthesereaktion entsteht, Tetrahydrofolsäure, Tumornekrosefaktor- α oder Interferon- α verstärkt [10]. Die Gabe von Irinotecan (CPT-11, Topoisomerase-Hemmer) und Oxaliplatin führt ebenfalls zu einer Wirkungsverbesserung [11]. Letzt genannte Wirkungssynergismen werden in den aktuellen FOLFOX- und FIRE-Therapieschemata zur chemotherapeutischen Behandlung des kolorektalen Karzinoms angewandt. Die Kombination mit dem VEGF-Antikörper Bevacizumab (Roswell-Park-Regime) verlängert die Überlebenszeit signifikant.

Der vollständige hepatische Abbau erfolgt über die Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD), die Metaboliten werden renal ausgeschieden. Bei der nächtlichen Anwendung von 5-FU kommt es aufgrund einer höheren nächtlichen DPD-Aktivität zu einer reduzierten Toxizität bei gleichbleibender Tumoraktivität [8]. Bei einer homozygoten DPD-Variante mit eingeschränkter Aktivität kann es zu einer signifikanten Akkumulation toxischer Metabolite

Einleitung

in der Leber kommen, weshalb vor Therapiebeginn ein Test für diese DPD-Mutation empfohlen wird [12]. Dosislimitierend sind die unerwünschten Arzneimittelwirkungen Knochenmarktoxizität und Mukositis, aber auch ein schmerzhaftes Erythrodysästhesiesyndrom der Handflächen und Fußsohlen (Hand-Fuß-Syndrom, besonders bei Dauerinfusion) sowie eine Enzephalopathie [3, 8].

Mit einer Häufigkeit von 1,2-18% ist die Kardiotoxizität, welche schlimmstenfalls zum Myokardinfarkt oder plötzlichem Herztod führen kann, eine Nebenwirkung von besonderer Bedeutung [13-15]. Diese wird durch die zusätzliche Gabe von Cisplatin weiter verstärkt. Ursächlich dafür ist vermutlich eine aus den Auswirkungen von 5-FU auf die Erythrozytenfunktion resultierende ausgeprägte Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Blut [16].

5-FU überwindet die Erythrozytenmembran und hat gravierende Auswirkungen auf das intrazelluläre Milieu der Erythrozyten, was von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist [17]. Es führt zu einem drastischen Konzentrationsabfall des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) innerhalb der Erythrozyten, was zu verschiedenen und zum Teil irreversiblen Veränderungen der Erythrozytenstruktur und -funktion führen kann. Mögliche Folgen sind Echinozytose, eine erhöhte Membran-Fluidität oder Funktionsverlust von Membranpumpen [18]. Diese negativen Effekte auf die roten Blutkörperchen sind sowohl von der Inkubationszeit als auch von der Dosierung abhängig [15].

1.1.1.3. Drug-Targeting mit 5-FU

Als eines der bedeutendsten Zytostatika in der Chemotherapie verschiedener maligner Neoplasien wurden schon viele Versuche unternommen 5-FU im Rahmen des Drug-Targeting effizienter und nebenwirkungsärmer einzusetzen. Die pharmakologischen Eigenschaften von freiem, intravenös injiziertem 5-FU sind wenig geeignet für eine höchst effektive und dennoch gut verträgliche Chemotherapie. Der plötzliche Anstieg der Wirkstoffkonzentrationen im Serum nach einer systemischen Bolusinjektion kann schwerwiegende Nebenwirkungen zur Folge haben. Die Halbwertszeit im Blutkreislauf ist relativ kurz, jedoch steigen die Antitumoreffekte mit der Expositionsdauer statt mit der Plasmakonzentration [19]. Aus diesem Grund ist nicht allein das Targeting zum Zielort, sondern auch die dauerhafte Freisetzung bei konstanten Wirkstoffkonzentrationen über einen langen Zeitraum Ziel aktueller Bemühungen.

Einleitung

Die von Yi et al. hergestellten ¹²⁵Iod-markierten 5-FU-Natriumalginat-BSA-Nanopartikel wurden im Mausmodell nach oraler Applikation zu einem großen Teil gastrointestinal resorbiert und reichert sich hauptsächlich in phagozytenreichen Geweben wie Leber, Milz und Lunge an [20].

Mit dem Ziel ein verbessertes Leber-Targeting zu erreichen wurden von Cai et al. ¹³¹Iod-markierte galactosylierte HSA-5-FU-Komplexe eingesetzt. Über den leberspezifischen, transmembranären Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGP-R) wird die Aufnahme und der lysosomale Abbau Galaktosylgruppen-haltiger Makromoleküle vermittelt. Durch diese Methode konnte im Tiermodell eine deutliche Steigerung der 5-FU-Konzentration in der Leber verglichen mit anderen Organen gezeigt werden [21].

Sowohl die systemische als auch die lokoregionale Chemotherapie inoperabler Lebertumoren und Lebermetastasen mit Liposomen-verkapselten 5-FU steigert die intratumoralen Zytostatikakonzentrationen im Vergleich zur systemischen Therapie mit der Monosubstanz [22, 23]. Pohlen et al. zeigten, dass die Kombination mit einer temporären Embolisation mittels abbaubarer Stärke-Mikrosphären diese Ergebnisse weiter optimiert.

Verschiedene Autoren zeigten in ihrer Arbeit, dass die Verwendung unterschiedlichster 5-FU-beladener Nanopartikel (z.B. bioabbaubare Polylactid-co-Glycolid-(PLGA) Nanopartikel, N-Succinyl-Chitosan Nanopartikel, Pektin-Nanosphären) zu einer deutlichen Verbesserung der Pharmakokinetik führt. Gegenüber der Applikation der Monosubstanz zeigten sich eine gesteigerte orale Bioverfügbarkeit, längeres Verweilen der Nanopartikel im Blutkreislauf und weniger Konzentrationsschwankungen durch langsamere und kontinuierliche Freisetzung, wodurch unerwünschte Arzneimittelwirkungen verringert werden könnten [24-26].

Wang et al. stellten zu Beginn des Jahres 2010 neuartige 5-FU-Carrier-Erythrozyten vor, mit deren Einsatz es gelang, die intraabdominale Konzentration des Wirkstoffs nach intraperitonealer Applikation bei malignem Aszites von Mäusen im Vergleich zu freiem Zytostatikum zu erhöhen und diese höheren Werte über einen längeren Zeitraum beizubehalten. Diese Ergebnisse gingen mit einer signifikanten Rückbildung des Aszites und einem längeren Überleben in der 5-FU-Carrier-Erythrozyten-Gruppe einher [27].

Für dauerhafte und gleich bleibende 5-FU-Medikamentenspiegel wurden von Yi et al. Polyethylenglykol (PEG)-Hydrogele als injizierbare Dauerreservoirs entwickelt. Diese werden ohne die Notwendigkeit einer chirurgischen Implantation im Bolus subkutan (s.c.) appliziert und vermeiden langzeitige stationäre Aufenthalte. Im Tierversuch an Mäusen mit Lungenkarzinom wurde 5-FU über einen Zeitraum von mehr als vier Tagen aus dem PEG-

Hydrogel freigesetzt und führte zu einer deutlich gesteigerten Wachstumshemmung verglichen mit der s.c. Applikation von freiem 5-Fluorouracil [28].

1.1.1.4. Chemotherapie-Resistenz

Ein bedeutendes Problem in der Therapie maligner Erkrankungen ist die Entwicklung von Resistenzen gegen Zytostatika. Seit annähernd 50 Jahren ist 5-FU das Mittel der Wahl bei kolorektalem Karzinom und vielen anderen Tumoren [29]. Es wird angenommen, dass eine 5-FU-Resistenz zu den Hauptgründen für das Therapieversagen in der Behandlung von CRC auch bei Kombinationschemotherapien zählt [30].

Gegenstand der aktuellen Forschung ist der Versuch, den Beginn der 5-FU-Resistenz hinauszuzögern oder eine bereits entstandene Resistenz umzukehren. Hierbei konnten schon viel versprechende Ergebnisse erzielt werden. Da Chemotherapie-Resistenz weit verbreitet ist und viele verschiedene Zytostatikagruppen betrifft, ist anzunehmen, dass verschiedene Mechanismen in der Resistenzentwicklung eine wichtige Rolle spielen.

Ein Lösungsansatz beinhaltet, die in resistenten Krebszellen erhöhten Konzentrationen an Thymidilat-Synthase (TS) zu senken. TS ist ein Schlüsselenzym in der Verdopplung (Replikation) der DNA sowie der Zellteilung und wird durch 5-Fluorouracil gehemmt. Durch einen Wiederholungspolymorphismus in der Promotorregion des TS-Gens mit dreifacher statt physiologisch zweifacher Wiederholung eines 28 Basenpaaren (bp) langen DNA-Abschnittes kommt es zu erhöhten TS-Spiegeln im Gewebe und damit zu einer größeren Widerstandsfähigkeit gegen die Wirkung von 5-FU, da die gleiche Menge Wirkstoff entsprechend weniger Moleküle TS blockiert [12].

Eine Senkung unphysiologisch hoher TS-Level könnte die Tumorzellen erneut für die Wirkung von 5-FU sensibilisieren und das Therapieansprechen deutlich verbessern [30].

Die fokale Adhäsionskinase (FAK) spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Zellen und ihrer extrazellulären Matrix, der Zellbeweglichkeit und -fortbewegung sowie dem Zelltod. Es konnte eine erhöhte Expression von FAK in Krebszellen nachgewiesen werden und es wird eine tragende Rolle der FAK in der Chemotherapie-Resistenzentwicklung vermutet. Die experimentelle Hemmung der FAK-Expression führt zu einer signifikanten Senkung der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 5-FU im Zellkultur-Kolonkarzinom-Modell und unterstützt diese These [25].

Das Tumorsuppressorgen p53 kodiert ein Protein, welches den Zellzyklus kontrolliert und nach zellulärem Stress die DNA-Reparatur oder Apoptose induziert und auf diese Weise Zellen vor unkontrolliertem Wachstum und weiterer Schädigung schützt [31]. Das Protein p53 ist in vielen Tumorzellen erhöht. Neueste Untersuchungen zeigen, dass vor allem eine Mutation (Arginin/Arginin-Genotyp) des p53 Gens, die mit inaktivem p53 Protein assoziiert ist, ein schlechtes Ansprechen auf 5-FU-Chemotherapie zur Folge hat. Das Fehlen dieser Mutation hingegen ist ein Marker, der eine gute Chemotherapiesensitivität vorhersagt [32].

1.1.2. Drug-Targeting

In den letzten Jahren hat das Interesse am Drug-Targeting, dem gezielten Transport von Medikamenten in ihre Zielgewebe, immer weiter zugenommen. Grund dafür ist der steigende Bedarf an sicheren Medikamenten, die ihren Wirkungsort in notwendigen Konzentrationen erreichen und dabei das geringste Maß an Nebenwirkungen besitzen. Die Forschung konnte in den letzten Jahren große Fortschritte auf diesem Gebiet erzielen und eine Vielzahl zellulärer, molekularer und synthetischer Carrier charakterisieren (Tab. 2). Durch die Verwendung von Drug-Carriern für den Wirkstofftransport sollen die Bioverfügbarkeit erhöht, die Pharmakokinetik verbessert und die Toxizität minimiert werden [33]. Der ideale Carrier zum Drug-Targeting sollte folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. hohe pharmakologische Wirksamkeit am Zielort bei niedrigen Dosierungen,
2. keine systemischen Nebenwirkungen,
3. keine Immunreaktion gegen das transportierte Medikament oder den Carrier,
4. vollständige biologische Abbaubarkeit ohne Entstehung toxischer Abbauprodukte,
5. einfache und kostengünstige Herstellung sowie unkomplizierte Lagerung.

Die Herstellung eines idealen Drug-Carriers ist bislang nicht gelungen. Zu den gegenwärtig verfügbaren Carriern gehören neben Nanopartikeln, Liposomen und Antikörpern die zellulären Carrier wie zum Beispiel Erythrozyten oder Leukozyten. Die im Folgenden aufgeführte Tabelle 2 stellt exemplarisch eine Auswahl an Carriern dar, welche bereits erfolgreich für den Transport zytostatisch wirksamer Medikamente eingesetzt wurden.

Tabelle 2: Geeignete Carrier für den Transport von Zytostatika.

Carrier	Transportiertes Medikament
<u>Synthetische Systeme</u>	
Nanopartikel	Paclitaxel, Doxorubicin, 5-Fluorouracil [34]
<u>Zelluläre Systeme</u>	
Neutrophile Granulozyten	Doxirubicin [35]
Erythrozyten	Adriamycin, Bleomycin, Carboplatin, Etoposid, Methotrexat [36, 37]
<u>Makromoleküle</u>	
Immunglobuline	Adriamycin, Auristatin, Chlorambucil, Doxorubicin, Methotrexat [38]

1.1.3. Erythrozyten als Drug-Carrier

1.1.3.1. Morphologie und Physiologie

Erythrozyten stellen mit 99% den größten Anteil zellulärer Bestandteile des menschlichen Blutes dar. Sie sind kernlose Zellen ohne Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum mit flacher, runder, bikonkaver Form (Abb. 3) und einem mittleren Durchmesser von $7,5\mu\text{m}$ sowie einer Randdicke von $2\mu\text{m}$ [39, 40].



Abbildung 3: Erythrozytenmorphologie [41].

Die Erythrozytenmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die aus Phospholipiden, Cholesterin, Glykolipiden und einem inneren Membranskelett aufgebaut ist. Die Membran beinhaltet sowohl periphere als auch transmembranäre Proteine (siehe Abb. 4) [42]. Der besondere Aufbau wie auch ihre Scheibenform verleihen den Erythrozyten eine große Verformbarkeit, welche für ihre Flexibilität in engen Kapillaren und die Blutviskosität von größter Bedeutung sind [43]. Ein weiterer Vorteil ihres Aufbaus ist ein sehr großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis.

Einleitung

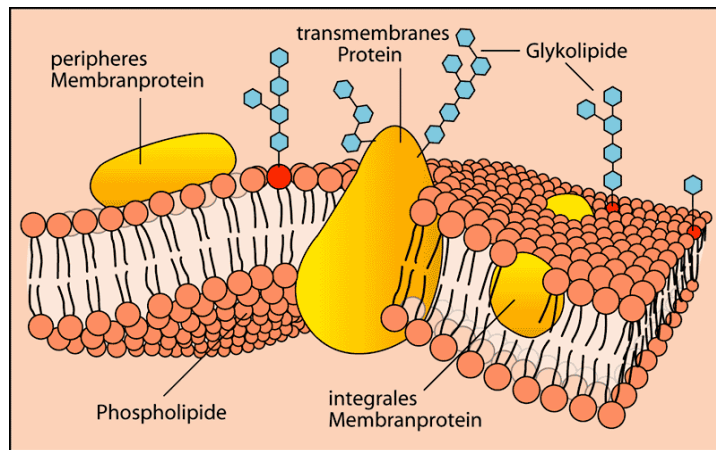


Abbildung 4: Aufbau der Erythrozytenmembran [44].

Zu den Hauptaufgaben der Erythrozyten zählt sowohl der Sauerstofftransport von der Lunge in das Gewebe mit Hilfe des im Inneren der Zellen lokalisierten Hämoglobins als auch der Transport von Kohlenstoffdioxid zu den Lungen. Hämoglobin ist ein eisenhaltiges Molekül, welches vier Sauerstoffatome binden kann. Durch dessen hohe Konzentration innerhalb der Erythrozyten lassen sich diese sehr einfach über Zentrifugation von den übrigen Blutbestandteilen trennen.

Die Bildung der roten Blutkörperchen findet im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen statt und wird durch das renale Hormon Erythropoetin gesteuert. Gesunde Zellen haben eine mittlere Lebensdauer von 120 Tagen. Der Abbau alter, beschädigter oder abnormaler Erythrozyten vollzieht sich in der Milz, deren enge Trabekel ein Passagehindernis für diese Zellen darstellen, sowie im Retikuloendothelialen System (RES) [45]. Das RES stellt den zur Phagozytose und Partikelspeicherung befähigten Teil des Retikuloendothelialen Systems (RES), welches die Gesamtheit aller Zellen des retikulären Bindegewebes umfaßt, dar. Zum RES gehören periphere Monozyten des Blutes, peritoneale und alveoläre Makrophagen sowie die Kupffer-Sternzellen der Leber. Dort werden die Erythrozyten lysosomalen Enzymen ausgesetzt und ihre Zellmembran zerstört. Bei den Kupffer-Sternzellen handelt es sich um leberspezifische Makrophagen in den Lebersinusoiden (in Abbildung 26 dargestellt). Dort haften sie mit ihren Pseudopodien an den Endothelzellen und nehmen antigenes Material auf, verarbeiten und präsentieren dieses [46].

1.1.3.2. Herstellung von Carrier-Erythrozyten

Für die Anfertigung von Carrier-Erythrozyten wird dem entsprechenden Zielorganismus oder -individuum eine Blutprobe entnommen. Nach Trennung von Erythrozyten und Plasma folgt

das Eröffnen der Erythrozytenmembran unter Verwendung verschiedener chemischer oder physikalischer Methoden.

Zu den am häufigsten verwendeten Methoden zählen verschiedene hypotone Lysemethoden, z.B. hypotone Hämolyse oder hypotone Dialyse. Diese Verfahren machen sich eine erhöhte Permeabilität der Erythrozyten bei ihrer osmotischen Schwellung zunutze. Nach Wiederherstellung der Isotonizität normalisiert sich die Membranpermeabilität [47, 48].

Elektroporation, welche mit Hilfe elektrischer Pulse die Zellen veranlasst sich vorübergehend an einigen Stellen zu öffnen, ist ein weiteres Verfahren zur Beladung von Erythrozyten als Drug-Carrier.

Endozytose und Membranperturbation mittels Amphotericin B sind ebenfalls geeignete Prozeduren. Unabhängig von der verwendeten Methode müssen die Zielsubstanzen bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Die Medikamente sollten polar oder hydrophil sein, nicht mit der Erythrozytenmembran interagieren und diese weder schädigen noch die Glykolyse oder das Membrantransportsystem stören.

1.1.3.3. Vorteile von Erythrozyten als Drug-Carrier

Unter den derzeit verfügbaren Drug-Carriern erfüllen die Erythrozyten sehr viele der notwendigen Voraussetzungen für ein gezieltes Drug-Targeting. Die Vielzahl ihrer Vorzüge erhalten sie durch ihre biochemischen und morphologischen Besonderheiten.

1. Carrier-Erythrozyten besitzen eine sehr hohe Biokompatibilität, im Besonderen bei der Verwendung autologer Zellen zum Drug-Targeting [36, 48]. Bei der Nutzung nicht autologer Zellen kann die Biokompatibilität durch Biotinylierung verbessert werden [47].
2. Erythrozyten können, ohne toxische Abbauprodukte zu hinterlassen, vollständig biologisch abgebaut werden [36, 49].
3. Die Verwendung von Erythrozyten als Drug-Carrier verhindert immunologische Reaktionen gegen das eingekapselte Medikament oder Inaktivierung durch endogene Faktoren [50, 51].
4. Die systemischen toxischen Auswirkungen der verwendeten Substanz auf den Organismus können beachtlich verringert werden [48]. Hierdurch können die Medikamenten-spezifischen Nebenwirkungen reduziert werden.

Einleitung

5. Unter optimalen Voraussetzungen während der Beladungsprozedur können Carrier-Erythrozyten ihre normale Überlebenszeit behalten und somit eine bedeutend längere Lebensdauer als synthetische Carrier besitzen [52, 53]. Dies ermöglicht ihren Einsatz als Medikamentenreservoir, wobei das entsprechende Medikament über einen langen Zeitraum in den Blutkreislauf freigesetzt wird [51].
6. Durch den Abbau abnormaler Erythrozyten über das RES eröffnet sich die Möglichkeit des RES-Targeting von Medikamenten und der Behandlung spezieller, das RES betreffender Erkrankungen. Allen voran sind hier lysosomale Speicherkrankheiten wie zum Beispiel der Morbus Gaucher [54], Lebertumoren und Lebermetastasen [54], das RES involvierende parasitäre Krankheiten wie Malaria oder Leishmaniose [51] und die Thalassämie [55], die zu einer Eisenakkumulation im RES führt, zu nennen.

Das RES-Targeting kann durch Membranstabilisierung, z.B. mit Glutaraldehyd und daraus resultierender verminderter Verformbarkeit, noch verbessert werden [48]. Ein noch spezifischeres RES-Targeting kann durch die Oberflächenbeladung der Erythrozyten mit Antikörpern (AK) erzielt werden. Dadurch werden die Carrier für das RES leichter erkennbar. Bei der Verwendung von Klasse G-Immunglobulinen (IgG) findet bevorzugt Milz-Targeting statt, bei der Oberflächenbeladung mit IgM-AK kommt es vermehrt zum Leber-Targeting [51].

Die durch die Kopplung von AK an die Erythrozytenoberfläche entstehenden Immunoerythrozyten eröffnen die Möglichkeit, abhängig von den ausgewählten Antikörpern, Medikamente zu intravaskulären Zielen zu transportieren. Beispielhaft sind hier die glatten Muskelzellen der Gefäßwand bei Gefäßschäden [56], Thromben [57, 58] und Endothelzellen [59, 60] zu nennen. Weiterhin ist es denkbar Immunoerythrozyten zu verwenden, um schädliche Substanzen oder gar zirkulierende Krebszellen aus dem Blutgefäßsystem zu eliminieren bzw. diese zu zerstören [61].

7. Langjährige Erfahrungen in den Techniken und geringe notwendige Ausstattung für die Arbeit mit und Transfusion von Erythrozyten ermöglichen eine leichte Handhabung.
8. Da es sich bei Carrier-Erythrozyten um lebende Zellen handelt, die sich ständig neu entwickeln, ist ihre Gewinnung problemlos. Weiterhin können sie als Bioreaktoren verwendet werden, die nach enzymatischer Umwandlung von Prodrugs deren wirksame Form abhängig von der Umsatzgeschwindigkeit über einen bestimmten Zeitraum freisetzen [37].

9. Das große Oberflächen-Volumen-Verhältnis verschafft den Carrier-Erythrozyten den besonderen Vorteil einer hohen Beladungskapazität. Bereits kleine Mengen an Zellen sind in der Lage eine vergleichsweise große Menge an Wirkstoff aufzunehmen. So kann mit einem begrenzten Erythrozytenvolumen die notwendige Wirkstoffkonzentration am Zielort erreicht werden [49].
Hierbei hängt die Beladungseffizienz von der gewählten Beladungsprozedur und der zu verkapselnden Substanz ab. Für die Medikamentenbeladung von Carrier-Erythrozyten mittels hypotoner Hämolyse wurde eine Beladungseffizienz von lediglich 1-8% erreicht, bei der hypotonen Dialyse können bis zu 50% der Substanz in der Inkubationslösung in den Erythrozyten eingeschlossen werden [47].
10. Durch die Verwendung von Carrier-Erythrozyten im Medikamententransport können die Konzentrationsschwankungen im Plasmaspiegel deutlich reduziert werden [36, 62]. Gleichmaßen können die Intervalle zwischen der Medikamentenapplikation verlängert werden und dabei sichere und effektive Plasmaspiegel über relativ lange Zeiträume gehalten werden [36, 62].

1.1.3.4. Nachteile von Erythrozyten als Drug-Carrier

Trotz der vielen Vorteile, die das Drug-Targeting mit Carrier-Erythrozyten mit sich bringt, birgt es auch einige Nachteile. Nicht alle Medikamente sind gleich gut zur Verkapselung in Erythrozyten geeignet.

Abhängig von Größe und Polarität der Substanz diffundieren einige umgehend wieder aus den intakten Zellen heraus oder verändern deren Physiologie und Morphologie [37, 48].

So sehr die Erkennung durch das RES ein Vorteil für das RES-Targeting ist, so sehr ist sie Nachteil für Drug-Targeting mit einem anderen Bestimmungsort. Sobald die Oberfläche oder Morphologie von Erythrozyten verändert wurde, werden diese durch das RES zerstört, wodurch die Anwendung als Drug-Carrier eingeschränkt wird [63].

Aus dem biologischen Ursprung der Erythrozyten ergibt sich sowohl der Nachteil einer begrenzten Haltbarkeit als auch deren begrenzter Lagerung. Das Fehlen von bewährten und geeigneten Aufbewahrungsmöglichkeiten ist ein limitierender Faktor für den weit verbreiteten Einsatz von Carrier-Erythrozyten [64]. Bisher können beladene Erythrozyten zwischen zwei Wochen und einem Monat ohne Veränderung ihrer physiologischen Eigenschaften bei 4°C in isotonischen Nährstofflösungen aufbewahrt werden. Die Zugabe von Purinnukleosiden oder Calciumchelaten zum Medium verbessert die Überlebenszeit zirkulierender Carrier-Erythrozyten [64]. Membranstabilisatoren wie zum Beispiel Glutaraldehyd oder DMSO

Einleitung

verbessern zwar die Haltbarkeit und Aufbewahrungsdauer, verkürzen jedoch die Überlebenszeit im Blutkreislauf.

Die Notwendigkeit Carrier-Erythrozyten bei 4°C zu lagern kann man sich zu nutze machen indem man Prodrugs zum Targeting verwendet, die nur bei 37°C enzymatisch in ihre aktive Form umgewandelt werden.

Wichtig ist zu beachten, dass es sich bei Blut immer um potentiell infektiöses Material handelt, bei dessen Handhabung größte Vorsicht geboten ist.

1.1.3.5. Änderung biologischer Eigenschaften durch die Beladungsprozedur

Da sich die biologischen Eigenschaften von Erythrozyten stark auf ihre Effektivität im Drug-Targeting auswirken, ist es von größter Bedeutung, die Auswirkungen der Beladungsprozeduren auf diese Carrier zu kennen.

Die Überlebenszeit zirkulierender Erythrozyten im Blutkreislauf ist in großem Maße abhängig von ihrer Morphologie und der daraus resultierenden Flexibilität. Lichtmikroskopische Untersuchungen von beladenen Carrier-Erythrozyten zeigen bis auf einige wenige Sphärozyten keine sichtbaren Veränderungen [65]. Elektronenmikroskopische Untersuchungen hingegen zeigen neben vielen unveränderten Erythrozyten einige Sphärozyten, Stomatozyten sowie mikrozytäre Erythrozyten [66].

Die osmotische Fragilität von Carrier-Erythrozyten ist im Vergleich zu unbeladenen Zellen erhöht. Es kann eine Veränderung der sigmoidal verlaufenden Fragilitätskurve hin zu einer linearen Kurve beobachtet werden [66, 67].

Die Turbulenz-Fragilität ist ein Parameter, der direkt mit der Überlebenszeit von Erythrozyten korreliert. Diese ist im Gegensatz zu nativen Erythrozyten signifikant erhöht [67].

Die Deformierbarkeit von Erythrozyten ist abhängig von der Viskoelastizität der Zellmembran, der Viskosität der Zellinhalte und dem Zellvolumen-Oberflächen-Verhältnis. Durch die Beladung von Erythrozyten erfolgt eine deutliche Minderung ihrer Deformierbarkeit, was sich negativ auf ihr Überleben auswirkt [48].

In Carrier-Erythrozyten ist sowohl das mittlere Erythrozyteneinzelvolumen (engl. mean corpuscular/cell volume, MCV), das mittlere Korpuskuläre Hämoglobin (engl. mean corpuscular/cellular hemoglobin, MCH) als auch die mittlere Korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (engl. mean corpuscular/cellular hemoglobin concentration, MCHC) im Vergleich zu normalen Erythrozyten vermindert. Als wichtige Parameter in der Routine-Blutuntersuchung vermögen die Erythrozytenindizes eine Aussage über die biologische Integrität der Zellen zu treffen.

1.2. Aufgabenstellung

5-Fluorouracil ist das bevorzugte Therapeutikum eines kolorektalen Karzinoms. Bei 25% der betroffenen Patienten finden sich bereits zum Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen und mehr als 50% aller Patienten entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung Metastasen in der Leber [68]. Erythrozyten sind exzellente Drug-Carrier, mit deren Einsatz bereits verschiedene antineoplastisch wirksame Medikamente erfolgreich an experimentellen Tumoren im Tiermodell getestet wurden [54].

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Möglichkeit zu finden, das membrangängige Zytostatikum 5-FU so zu modifizieren, dass damit Erythrozyten beladen werden können. Insbesondere soll die Eignung von Makromolekülen wie Dextran und EPS 4-Polymerpartikel geprüft werden, das modifizierte 5-FU daran zu koppeln, um die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Beladung von Carrier-Erythrozyten mit dem substituierten, modifizierten 5-FU und damit für eine optimierte chemotherapeutische Behandlung von Lebermetastasen des CRC mittels gezieltem Leber-Targeting zu schaffen.

Diesbezüglich soll *in vitro* an Kolonkarzinomzellen überprüft werden, inwieweit die zytostatische Wirkung von 5-FU innerhalb dieser Wirkstoff-Makromolekülkonjugate erhalten bleibt und welches dieser Konjugate die größeren proliferationshemmenden Effekte aufweist. Da später Erythrozyten als Drug-Carrier Verwendung finden sollen, sind diese mit Modellsubstanzen, in diesem Fall FITC-Albumin sowie FITC-Dextran, zu beladen. Hierbei findet die Charakterisierung der optimalen Beladungsbedingungen für eine höchst mögliche Beladungseffizienz besondere Beachtung.

Der Nachweis und die Quantifizierung der gelungenen Beladung mit FITC-Albumin und -Dextran sollen abschließend mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Puffer, Lösungen und Medien

Lysepuffer zur Herstellung von white Ghosts

Die 50mM Stammlösungen Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) und Natriumdi-hydrogenphosphat (NaH_2PO_4) wurden 1:10 mit Aqua bidest. zu 5mM Lösungen verdünnt. Anschließend wurde NaH_2PO_4 vorgelegt und unter Kontrolle am pH-Meter mit Na_2HPO_4 aufgesättigt, bis sich ein pH-Wert von 8 einstellte.

Lysepuffer für den MTT-Test

Der MTT-Lysepuffer zum Lösen der Kolonkarzinomzellen von der Oberfläche der Kulturplatten und Freisetzen der MTT-Formazane bestand zu 81% aus 2-Propanol, 4% 1M Salzsäure und 15% Sodiumdodecylsulfat (SDS, 20%ig in Aqua bidest. gelöst).

Natriumtetraborat Decahydrat (Borax-Lösung)

0,18g Borax von Fluka BioChemika wurden in 100ml entionisiertem Wasser gelöst.

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

Als isotonische Pufferlösung wurde Dulbecco's phosphate buffered saline 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 12mM Phosphat, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} , pH 7,4 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) verwendet.

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640 Medium)

RPMI 1640 ist ein Flüssignährmedium für Zellkulturen und wurde von der BioChrom AG bezogen.

2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

Für die Durchführung der Versuche wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Substanzen verwendet.

Tabelle 3: Verwendete Substanzen mit Angabe der Molekulargewichte (MW in g/mol) und Bezugsquellen.

Substanz	MW (g/mol)	Bezugsquelle
Natriumtetraborat Decahydrat (Borax, $B_4Na_2O_7$)	381,37	Fluka BioChemika
Bovines Serumalbumin (BSA)	66248	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Chloressigsäure ($C_2H_3ClO_2$)	94,5	J.T. Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO, C_2H_6OS)	78,13	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	141,96	Fluka BioChemika
EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride)	191,70	Pierce Biotechnology
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	60,05	J.T. Baker
Ethanol (70%, C_2H_6O)	46,07	Merck KGaA
FITC-BSA (Fluorescein isothioncyanate bovines Serumalbumin, 66kDa)	66432,3	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
FITC-Dextran (Fluorescein isothioncyanate Dextran, 77kDa)	4,400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Formaldehyd (37%, CH_2O)	30,03	J.T. Baker
5-Fluorouracil (50mg/ml, $C_4H_3FN_2O_2$)	130,08	Teva Pharma AG
Kaliumchlorid (KCL)	74,56	VEB Jenapharm
Kobalt(II)-chlorid-Hexahydrat ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	237,93	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol (CH_4O)	32,04	Baker
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES, $C_6H_{13}NO_4S$)	195,2	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, $C_{18}H_{16}BrN_5S$)	414,32	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumazid (NaN_3)	65,01	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumborhydrid ($NaBH_4$)	37,83	Fluka Chemie AG
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	137,99	Merck KGaA

Material und Methoden

PBS (pH 7,4)		Invitrogen GmbH
Penicillin/ Streptomycin (10.000U/min/10mg/ml)	334,39/ 581,57	BioChrom AG
2-Propanol (C ₃ H ₈ O)	60,10	J.T. Baker
Salzsäure (HCL)	36,46	J.T. Baker
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	288,38	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sodium meta-Periodat	213,91	Pierce
Sulfo-N-Hydroxysuccinimid (Sulfo-NHS, C ₄ H ₅ NO ₃)	115,09	Pierce Biotechnology
Triton X100 (Octoxinol 9, C ₁₄ H ₂₂ O[C ₂ H ₄ O] _n)	~625	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypanblau (0.5%[w/v], C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄)	872,88	BioChrom AG
Trypsin (0,5% mit EDTA, ohne Phenolrot)	~23000	Invitrogen GmbH

2.1.3. Verwendete Zellen

Für die Zellkulturversuche wurden Kolonkarzinom-Zellen der Zelllinie CC531 verwendet. Diese wurden von der Abteilung für experimentelle Chirurgie, Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt.

2.1.4. Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Kolonkarzinomzelllinie CC531 erfolgte bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5% CO₂ und bei 95% Luftfeuchtigkeit in RPMI 1640 Flüssignährmedium ohne Phenolrot mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) und einem Volumenprozent Antibiotikallösung (Penicillin 100 µg/ml und Streptomycin 3µg/ml).

Bei allen Versuchen wurden die Zellen in 6-well-Kulturplatten kultiviert und alle 48 Stunden mit frischem Medium versorgt. Unter sterilen Bedingungen wurde das alte Medium vorsichtig abpipettiert und durch 2ml frisches Medium ersetzt.

Bei der Herstellung der Zellkulturmedien, die je nach Probe entweder freien Wirkstoff 5-FU, Zytostatika-Makromolekülkonjugate oder die Makromoleküle (Dextran und EPS 4-Polymerpartikel) in ungebundener Form beinhalteten, wurde besonders auf gleiche Konzentrationen des 5-FU in den Proben geachtet.

Da die zytostatischen Effekte von 5-FU sowohl von der Dosierung als auch von der Dauer der Einwirkung abhängen, wurde für die Versuche eine Wirkstoffkonzentration (100µM) gewählt, die nachgewiesen einen starken wachstumshemmenden Effekt aufweist [69, 70]. Die

Konzentration von FUAC-Dextran wurde so gewählt, dass die Konzentration von daran gebundenem Wirkstoff wieder $100\mu\text{M}$ betrug. Anhand der diesem Medium zugesetzten Menge an gebundenen Dextran ergab sich die Menge an ungebunden Dextran, das vergleichsweise auf seine proliferative Wirkung getestet wurde. Für die verbleibenden Proben wurden die Konzentrationen nach dem gleichen Prinzip errechnet. Tabelle 4 stellt die genaue Zusammensetzung der unterschiedlichen Zellmedien dar.

Zum Analysezeitpunkt wurden die entsprechenden Proben vollständig aus den wells herausgelöst. Dazu wurden die jeweiligen Zellen nach zweimaligem Waschen mit 2ml PBS durch Inkubation für 5min bei 37°C mit 0,5ml Dissoziationsmedium (2,5g/l Trypsin und 0,38g/l EDTA) von der Oberfläche der wells gelöst. Durch Zugabe von 1,5ml frischen Mediums wurde die proteolytische Wirkung von Trypsin inaktiviert und das restliche EDTA durch zweiwertige Ionen im Medium komplexiert. Die Zellsuspensionen wurden anschließend in 2ml-Eppendorfgefäße überführt und untersucht.

Tabelle 4: Zusammensetzung der verschiedenen Zellkulturmedien.

Medium	Zusammensetzung
Negativkontrolle	RPMI ohne Zusätze
5-FU-Medium	RPMI + 5-FU, $0,26\mu\text{l/ml}$ ($100\mu\text{M}$)
Dextran-Medium	RPMI + Dextran, $94,87\mu\text{g/ml}$
FUAC-Medium	RPMI + FUAC, $0,78\mu\text{l/ml}$ ($100\mu\text{M}$)
FUAC-Dextran-Medium	RPMI + FUAC-Dextran, $113,77\mu\text{g/ml}$
NP-EPS 4-Medium	RPMI + NP EPS 4, $0,72\mu\text{l/ml}$
FUAC-NP-Medium	RPMI + FUAC-NP, $3,6\mu\text{l/ml}$

2.1.5. Zellkulturauswertung

In der Auswertung der Zellkulturversuche wurden für alle Proben die Zellzahlen bestimmt. Weiterhin wurden für die letzten zwei Versuche Nachweise der Zellvitalität mittels 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test durchgeführt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden nach kurzem Vortexen $100\mu\text{l}$ der Zellsuspension für 4min in $100\mu\text{l}$ Trypanblau inkubiert. Während der Inkubation wurde die Probe im Wechsel 30s gevortext und 30s im Ultraschallbad gebadet, um Zelladhäsionen zu vereinzeln. Anschließend wurden $10\mu\text{l}$ in eine Neubauer-Improved Zählkammer pipettiert, viermal fünf Gruppenquadrate (siehe Abb. 5) ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Für jede Probe wurde die Kolonkarzinomzellzahl im Triplikat bestimmt.

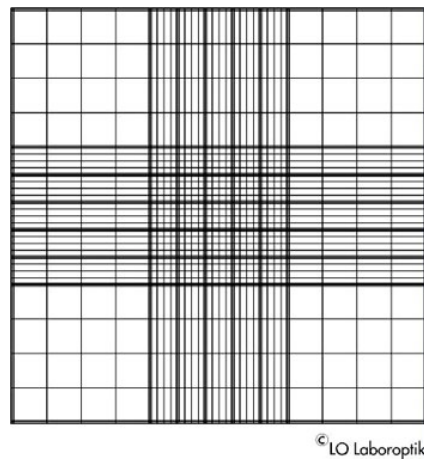


Abbildung 5: Neubauer-Improved Zählkammer. Das Zählgitter besteht aus 3 x 3 Großquadraten. Das zentrale Großquadrat ist in 5 x 5 kleinere Gruppenquadrate und diese wiederum in jeweils 16 Kleinstquadrate unterteilt. Die Kammer weist allseitig dreifache Grenzlinien auf [71].

Als weitere Methode der Zellwachstumsbestimmung wurde ein MTT-Test durchgeführt. Dieser bestimmt die Aktivität lebendiger Zellen über die mitochondriale Dehydrogenase und beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes MTT zu einem blau-violetten Formazan [72]. Ein Großteil der zellulären Reduktion ist abhängig von den pyridinhaltigen Nukleotiden NADH und NADPH und damit von Enzymen des Endoplasmatischen Retikulums, zu einem kleineren Teil wird MTT durch Succinat in den Mitochondrien reduziert [73, 74]. Die Umsetzung von MTT entspricht damit der zellulären Glykolyserate. Für die Durchführung wurde das MTT-Kit von Sigma nach Herstellerangaben verwendet. Die entstehende violette Lösung wurde spektrophotometrisch im Elisa Reader untersucht. Dazu wurden die Proben in 96-well Microtest Platten überführt und die Absorption bei 570nm gegen das Zellkulturmedium als Negativkontrolle gemessen.

2.1.6. Verwendete Nanopartikel

Die zur Wirkstoffkopplung verwendeten biokompatiblen, nicht toxischen Nanopartikel waren EPS 4-Latexteilchen mit einem mittleren Durchmesser von 127nm. Hergestellt wurden die Nanopartikel als Modellpartikel von Dr. rer. nat. B.-R. Paulke aus den Matrix-formenden Monomeren 2,3-Epoxypropylmethacrylate (EPMA) und Methacrylsäure (MAA) in einem molaren Verhältnis von 7:1. Sie bestehen aus einem kompakten, intern vernetzten Latexkern mit einer chemisch fest verknüpften Corona aus wasserlöslichen Polymerketten, die in das sie umgebende Medium abstehen, wodurch eine „haarige“ Partikelstruktur entsteht. Auf diesen wasserlöslichen Ketten sitzt eine Vielzahl an hydrophilen funktionellen Gruppen. Hier sind es

konkret Carboxyl- und Hydroxyl-Funktionen in einem definierten Verhältnis. Die Hydroxyl-Gruppen entstehen durch Hydrolyse des eingesetzten EPMA, entweder bereits während der Emulsionskopolymerisation oder danach. Aus einer Epoxy-Gruppe entstehen dabei 2 Hydroxylfunktionen. Zu Beginn von Teilchenbildung und -wachstum ist die Polymerphase deutlich hydrophober als der Standard Poly-HEMA (Poly-hydroxyethylmethacrylat). Hierdurch werden kompakte, kugelförmige Teilchenkerne ermöglicht. Durch oben beschriebene Hydrolyse des EPMA wird die Polymerphase aber später deutlich hydrophiler als Poly-HEMA. Das vermeidet unspezifische, hydrophobe Wechselwirkungen an der Träger-Oberfläche [75].

Die ausgewählten Nanopartikel weisen viele für den Medikamententransport wichtige und vorteilhafte Eigenschaften auf. Aufgrund eines günstigen Oberflächen-Volumen-Verhältnisses und einer sehr dichten Oberflächenabdeckung mit den funktionellen Gruppen werden hohe lokale Konzentrationen der zu transportierenden Substanz erreicht. EPS 4-Partikel verhalten sich stabil unter physiologischen Konditionen, adsorbieren nicht an Serumalbumin und erfüllen die biochemischen Voraussetzungen für den intravenösen Arzneimitteltransport. Nach kurzer Kreislaufzirkulation akkumulieren sie vor allem in der Leber, in geringen Mengen auch in Herz und Milz. Nach einer Stunde akkumulieren bereits ca. 50% der applizierten Nanopartikel in der Leber [75].

Vermutlich interagieren die Nanoartikel sowohl mit Makrophagen und Monozyten als auch mit Thrombozyten und werden durch Endozytose in diese aufgenommen. Es ist denkbar, dass es dadurch zu einer Thrombozytenaktivierung und infolgedessen zu einer Beeinflussung des Gerinnungssystems kommen kann. Des weiteren bietet sich durch diese Tatsache die Möglichkeit des Thrombozytentargetings [75].

Durch die Modifikation der Teilchen mit isotonischen Anhydriden eröffnet sich die Möglichkeit des spezifischen Lebertargetings [75]. Dabei werden 80-90% der applizierten Polymerpartikel vor einem gewünschten Tumorkontakt durch das RES filtriert [76, 77].

2.1.7. Geräte und Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 5 werden die verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und deren Herstellerangaben benannt.

Tabelle 5: Geräte und Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.

Geräte und Verbrauchsmaterialien	Hersteller
BD FACSCanto™ flow cytometer	BD BioSciences
Biofuge primo R	Heraeus Holding GmbH
CO ₂ -Inkubator CB 210 APT. Line	Binder GmbH
Elisa Reader Power Wave 340	Biotek
Eppendorfgefäße 2ml, verschließbar	Eppendorf AG
Explorer Feinwaage	Ohaus
Gefrierpunktsmometer Osmomat 030	Gonotec GmbH
HPLC Computer Hp 1050 Series	Hewlett Packard GmbH
HPLC Degaser DEGASYS DG-2410	Uniflows
HPLC Säule ODS Hypersil 5µm	VDS OptiLab
HPLC Säulenwechsler LabPRO	Rheodyne
HPLC Vials, 1,5ml Gewindeflaschen	VWR International
Kolloidosmometer Osmomat 050	Gonotec
Konfokales Lasermikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss AG
Labofuge 400	Heraeus Holding GmbH
Microtest Platte, 96 well, flat bottom	Sarstedt AG & Co.
Magnetrührer HA 56.1	Carl Roth GmbH & Co.KG
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektron. Messgeräte GmbH & Co. KG
Probenbehälter Röhre 15ml, verschließbar	Sarstedt AG & Co.
Probenbehälter Röhre 50ml, verschließbar	Sarstedt AG & Co.
Rollator RM 5 Assistant 348	Hecht-Assistant GmbH & Co.KG
Spektrophotometer K 2800	Hitachi GmbH
Sterilwerkbank Thermo HERAsafe	Heraeus Holding GmbH
Ultraschallbad TRANSSONIC 420	Elma
Vacutainer EDTA Tubes	BD BioSciences
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad MS	Lauda
Wasserfilteranlage EASYpure RoDi	Werner Reinstwassersysteme
Zählkammer Neubauer-Improved	LO Laboroptik
Zellkulturplatten Tissue Culture Plate 6 well	Sarstedt AG & Co.
Zentrifugen-Filtereinheit Amicon Ultra-15	Millipore
Zytostatikabank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH

2.2. Methoden

2.2.1. Herstellung von white Ghosts

Sowohl zur Herstellung von white bzw. red Ghosts, als auch zur Beladung der Erythrozyten mit 5-FU und Makromolekülen, wurde ein auf der hypotonen Hämolyse beruhendes Verfahren, die sogenannte Verdünnungsmethode (engl. dilutional method), hierbei in modifizierter Form nach Brähler et al. [78], angewandt. Das Prinzip der hypotonen Hämolyse basiert auf der Tatsache, dass Erythrozyten, wenn sie in eine hypotone Lösung gegeben werden, um etwa 25% ihrer Originalgröße anschwellen. Infolgedessen steigt ihre Membranpermeabilität durch die Ausbildung großer Poren (Durchmesser: 200-500 Å) erheblich an. Die hierfür optimale Osmolarität beträgt ungefähr 150mOsm, kurz bevor die Zellen lysieren [48]. Wird die Tonizität des umgebenden Puffers weiter verringert, entstehen irreversible Öffnungen der Zellmembran gefolgt von der kompletten Zellyse mit Verlust jeglicher Zellinhalte. Die verbleibende Zellhülle wird „white Ghost“ genannt. Durch Erhöhung der Salzkonzentration der umgebenden Lösung ist es möglich diese Poren wieder zu schließen. Die Erythrozyten nehmen so ihre physiologische bikonkave Form wieder ein [48, 79].

Zur Herstellung der white Ghosts wurden humane Erythrozyten (Gewinnung unter 2.2.3.1. beschrieben) zur vollständigen Hämolyse gebracht. Dazu wurde je 1ml Zellsediment mit 25ml Lysepuffer (5mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 8) in einem Becherglas für 5min im Kühlschrank bei 4°C auf einem Magnetrührer inkubiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine der Gesamtmenge an Inkubationslösung entsprechende Anzahl an 50ml-Probenbehälter aufgeteilt und bei 4°C und 10000g ohne Bremse für 15min in einer vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert, um im Folgenden auch das restliche Hämoglobin durch dreimaliges Waschen mit demselben Lysepuffer zu entfernen. Dazu wurde der Lysepuffer aus dem vorherigen Schritt vom Zellsediment abgenommen und das Probenröhrchen erneut mit kaltem Puffer aufgefüllt. Das Sediment wurde durch Schwenken wieder in Lösung gebracht und erneut 15min lang bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Diese Prozedur wurde weitere zweimal durchgeführt. Die fertigen white Ghosts wurden in der Regel sofort mit den Modellsubstanzen Albumin oder Dextran bzw. dem Wirkstoff 5-FU beladen, spätestens jedoch innerhalb von 24 h; in dem Fall wurden sie bis zur Durchführung des Experimentes bei 4° C in isotoner ($\pi = 300\text{mOsm}$) phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufbewahrt.

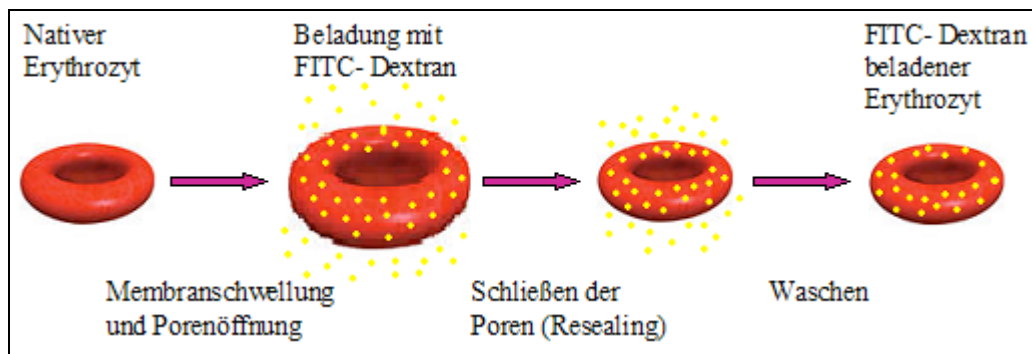


Abbildung 6: Schema der Beladung von Erythrozyten über das Verfahren der hypotonen Hämolyse am Beispiel der FITC-Dextran-Beladung.

2.2.2. Erythrozytenbeladung

2.2.2.1. Erythrozytengewinnung

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Erythrozyten wurden aus Erythrozytenkonzentraten isoliert. Diese wurden aus dem Vollblut freiwilliger Spender hergestellt, deren schriftliche Zustimmung vorliegt. Als Antikoagulans wurde EDTA (1,8mg/ml) verwendet. Die Zellen wurden anschließend bei 3500g und 20°C für 10min abzentrifugiert, das Plasma und die Buffy-coats wurden abgesaugt. Anschließend folgte dreimaliges Waschen mit PBS.

2.2.2.2. Bestimmung der osmotischen Fragilität von Erythrozyten

Die osmotische Fragilität (OF) der Erythrozyten ist eine Kenngröße für die Integrität der Erythrozytenmembran. Bringt man Erythrozyten in eine verglichen mit dem Plasma hypotonere Lösung, dringt aufgrund osmotischer Vorgänge Wasser in die Zellen ein; die Erythrozyten beginnen zu schwellen (Sphärozyten). Ist ein kritisches intrazelluläres Volumen erreicht wird die Zellmembran undicht. Bei weiterer Zunahme des osmotischen Druckes platzen die Zellen [40]. Die mittlere OF (MOF) gibt dabei die Osmolarität an, bei der 50% der Zellen hämolysiert vorliegen.

In dieser Arbeit wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen die OF von insgesamt drei unterschiedlichen Blutproben bestimmt, die bis zu diesem Zeitpunkt bei 4°C gelagert wurden. Mit verschiedenen Gemischen aus Aqua bidest. und PBS wurden insgesamt elf unterschiedliche Puffer zwischen 0mOsm (100% Aqua bidest.) und 290mOsm (100% PBS) hergestellt, wobei die Osmolarität zwischen 70mOsm und 170mOsm in zehner-Schritten gesteigert wurde. Um die OF für die jeweiligen Osmolaritäten zu bestimmen, wurden für jede Probe in dreifacher Ausführung 100µl Erythrozyten in 2ml der entsprechenden Pufferlösung gegeben. Anschließend konnte der osmotische Druck der Proben mit dem Kolloidometer

bestimmt und der Mittelwert für die Osmolarität errechnet werden. Der Prozentsatz der Hämolyse errechnete sich aus dem Verhältnis der osmotischen Drücke bei 70mOsm bis 290mOsm und dem osmotischen Druck bei 0mOsm mit 100% Hämolyse. Anschließend wurde der Prozentsatz an Hämolyse (y-Achse) gegen die Osmolarität (x-Achse) graphisch aufgetragen. Mit Hilfe der Kurve (Abb. 20) wurde die MOF ermittelt.

2.2.2.3. Erythrozytenbeladung mit FITC-BSA

Die Beladung der Erythrozyten mit der Modellsubstanz FITC-Albumin erfolgte wie unter 2.2.1. beschrieben nach dem Prinzip der hypotonen Hämolyse.

White Ghosts und native Erythrozyten wurden jeweils in vier Gruppen unterteilt. In jeder Gruppe wurden 100µl Ghosts bzw. Erythrozyten mit 1ml Inkubationslösung behandelt, deren Osmolarität 40, 70, 140 oder 270mOsm betrug (unterschiedliche Volumenverhältnisse von Aqua bidest. und PBS) und jeweils 10mg FITC-BSA (66kDa) enthielt. Nach Zugabe der FITC-BSA-Inkubationslösung wurde im weiteren Versuchszeitraum auf einen Lichtschutz mit handelsüblicher Aluminiumfolie geachtet, da unter Beleuchtung die Fluoreszenz schnell zurückgeht. Danach wurden die Proben gemischt und für eine Stunde unter mäßigem Rühren bei 4°C inkubiert. Zur Wiederherstellung einer isotonen Osmolarität wurden anschließend die für jede Osmolarität einzeln berechneten Mengen Kaliumchlorid (KCL) zu den Proben gegeben. Im Anschluss wurden alle Probengefäße zum Wiederherstellen der physiologischen Form und zum Verschließen der Membranporen (Resealing) für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach Abschluss des Resealing wurden alle Proben dreimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen (2500g, 10min). Die Beladung der Ghosts und Erythrozyten wurde mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Lasermikroskopie kontrolliert.

2.2.2.4. Erythrozytenbeladung mit FITC-Dextran

Die Beladung von Erythrozyten mit der Modellsubstanz FITC-Dextran erfolgte nach dem unter 2.2.1. ausführlich beschriebenen Prinzip der hypotonen Hämolyse.

Die in diesem Experiment verwendeten Erythrozyten wurden in zwei Gruppen eingeteilt. Für die erste Gruppe wurde vor der eigentlichen Inkubation mit FITC-Dextran eine hypotone Vorlyse durchgeführt, welche die Zellen durch einen vorangestellten Zwischenschritt langsam auf die niedrige Osmolarität von 70mOsm bei der Inkubation vorbereiten sollte. 10ml des hierfür verwendeten Schwellpuffers, bestehend aus einem Gemisch aus PBS und Aqua bidest. (6:5, v/v, 160mOsm), wurden zu 2ml Erythrozytensediment gegeben und diese für 10min bei 4°C unter mäßigem Rühren zum vorsichtigen Anschwellen gebracht. Anschließend wurde die

Material und Methoden

Probe abzentrifugiert (2500g, 10min, 4°C) und der Schwellpuffer abgenommen. Nachfolgend wurden beide Gruppen mit einer 4%igen FITC-Dextran-Lösung (1,5ml PBS, 4,75ml Aqua bidest., 250mg FITC-Dextran) inkubiert, wobei FITC-Dextran ein Molekulargewicht von 77000Da (70mOsm) aufweist. Für beide Versuchsansätze wurden pro 0,3ml Erythrozytensediment 3,125ml der Inkubationslösung in ein kleines Becherglas gegeben, anschließend wurden die Proben für eine Stunde unter mäßigem Rühren bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Zum Schutz der Fluoreszenz wurde von diesem Zeitpunkt an für den Verlauf des gesamten Experimentes auf einen Lichtschutz der Proben geachtet. Im Folgenden wurde den Proben die vorher berechnete Menge KCL zum Wiedereinstellen einer physiologischen Osmolarität beigefügt und das Resealing, wie unter 2.2.3.2. beschrieben, durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Proben dreimal mit PBS, pH 7,4 gewaschen (2500g, 10min) und abschließend am Durchflusszytometer und konfokalen Lasermikroskop überprüft. Als Negativkontrolle dienten Erythrozyten, die nach demselben Protokoll wie die zweite Gruppe behandelt wurden, wobei die Inkubationslösung kein FITC-Dextran enthielt.

2.2.2.5. Ghost- und Erythrozytenbeladung mit 5-FU

Die Beladung der Blutzellen mit dem Wirkstoff 5-FU erfolgte nach dem Prinzip der hypotonen Hämolyse (siehe 2.2.1.). Alle Arbeiten mit 5-FU erfolgten stets unter einer Zytostatikabank und mit verschließbaren Gefäßen.

Die zu beladenden Zellen (Herstellung unter 2.2.3.1. und 2.2.1. beschrieben) wurden mit einer Inkubationslösung behandelt, deren Osmolarität zwischen 70 und 150mOsm liegen sollte, da diese am besten zur effizienten Beladung der roten Blutkörperchen geeignet ist. Das 5-FU wurde für die Beladung 1:5 bzw. 1:10 mit der Inkubationslösung verdünnt, so dass die Konzentration des Wirkstoffes bei 10 bzw. 5mg/ml lag. Zur Inkubation wurden die Zellsedimente in einem Verhältnis 1:2 mit der Inkubationslösung in einem mit Parafilm verschlossenen Becherglas für eine Stunde bei 4°C im Kühlschrank unter mäßigem Rühren belassen. Anschließend wurde allen Proben die vorher berechnete Menge KCL zur Wiederherstellung einer isotonen Osmolarität beigefügt und damit die Voraussetzungen für ein erfolgreiches Resealing geschaffen, das nachfolgend zum Verschluß der Membranporen in einem Wasserbad bei 37°C für eine Stunde durchgeführt wurde. Zuletzt wurden alle Proben mindestens dreimal mit PBS (pH 7,4) gewaschen, wobei die Überstände eines jeden Waschschrattes in verschließbaren Probenbehältnissen aufbewahrt wurden. Die Proben der 5-FU beladenen Ghosts oder Erythrozyten wurden ebenfalls für die im jeweiligen Versuch vorgesehene Dauer im Kühlschrank bei 4°C gelagert und zum Analysezeitpunkt in einer

vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (Erythrozyten 2500g, 10min; Ghosts 10000g, 15min). Danach wurden die Überstände der Proben bzw. nach Behandlung mit Triton X100 (10µl je 1ml Probe) die Probenlysate im Photometer oder mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie untersucht.

2.2.3. Wirkstoff-Kopplung an Makromoleküle

2.2.3.1. Umsetzung von 5-FU zu FUAC

Umwandlung nach Volkert¹

Der Umwandlung von 5-FU zu Fluorouracilelessigsäure (FUAC) zur nachfolgenden Kopplung an Nanopartikel lag eine Methode zur Herstellung von Carboxymethyl-Stärke nach Volkert et al. zugrunde [80]. Diese wurde von Bernd-R. Paulke für eine Umsetzung in wässrigem Medium modifiziert [81].

Zur Umsetzung des Wirkstoffs wurden 1g 5-FU und 1,45g Chloressigsäure in jeweils 20ml 1M Natriumhydroxid (NaOH) gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen vorsichtig zusammengegeben und für 2 Stunden bei 35°C im verschlossenen Erlenmeyerkolben (50ml) langsam gerührt. Nach Abkühlung der Lösung auf Raumtemperatur wurde sie mit 20ml 1M Salzsäure (HCL) neutralisiert und mittels pH-Indikatorstreifen überprüft. Die Umsetzung lieferte FUAC in 60ml neutraler 0,5mol NaCl-Lösung. Bei vollständigem Umsatz (100% Ausbeute) entstanden 1,49g FUAC. Die Konzentration der hergestellten FUAC-Lösung betrug 24,22mg/ml.

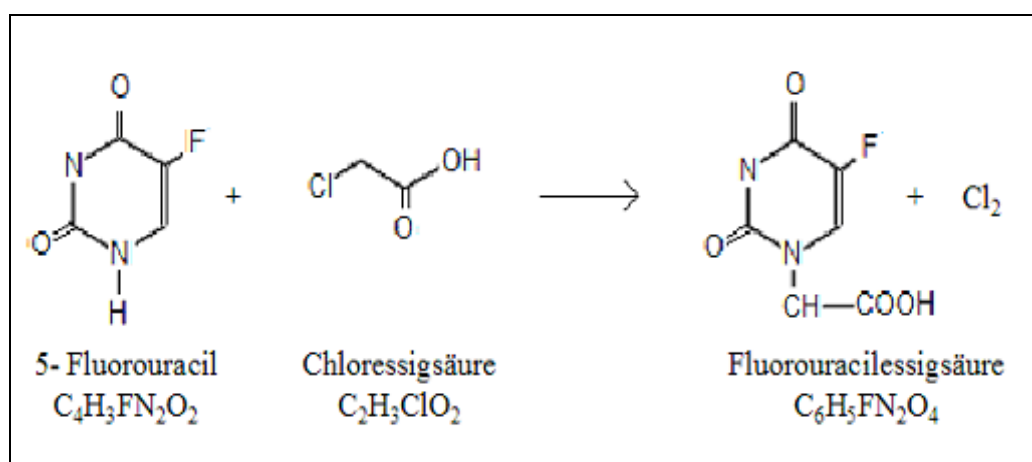


Abbildung 7: Reaktionsgleichung der Umwandlung von 5-FU zu FUAC nach Volkert [80].

¹ In Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Paulke, Fraunhofer Institut Angewandte Polymerforschung, Potsdam-Golm

Umwandlung nach Hao²

Zur Umsetzung des Wirkstoffs wurde für die anschließende Kopplung an Dextran eine von Hao et al. beschriebene Vorschrift verwendet [82]. Hierzu wurden 950mg Chloressigsäure (10mmol) in 4ml Aqua bidest. und 1,3g 5-FU (10mmol) mit 1,12g Kaliumhydroxid (KOH, 20mmol) in 7,5ml Aqua bidest. gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen zusammengegeben und bei Raumtemperatur für zwei Stunden langsam gerührt. Vor der Inkubation wurde dem Reaktionsgemisch tropfenweise eine KOH-Lösung zugegeben und so der pH-Wert 10 eingestellt und aufrechterhalten. Nachfolgend wurde das Gemisch mit konzentrierter HCL auf pH 2 angesäuert. Die durch Präzipitation entstandenen Festkörper wurden durch Dekantieren und Verwerfen des Lösungsmittels mittels Pipette isoliert und anschließend mit einer kleinen Menge kaltem Wasser gewaschen. Das Reaktionsprodukt wurde danach in gesättigter Kaliumbikarbonatlösung aufgelöst und mit konzentrierter HCL wiederausgefällt, um farblose Kristallnadeln zu erhalten (560mg, 29,8%).

2.2.3.2. Carbdiiimidkopplung von FUAC an Dextran²

Die Kopplung von FUAC an Dextran wurde nach einer geringfügig modifizierten Prozedur nach Tada durchgeführt [83]. Hierzu wurden 500mg Dextran (64-76kDa) in einem Lösungsmittel, bestehend aus 5ml Formamid (FA), 4,5ml N,N-Dimethylformamid (DMF) und 0,5ml Dichlormethan (DCM), bei 30°C auf dem Magnetrührer gelöst. Nach Zugabe von 290mg FUAC (1,55mmol) wurden 20mg N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP) der Lösung beigelegt. Nach dem vollständigen Lösen aller Reagenzien wurde N,N-Diisopropylcarbodiimid (DIC) hinzugegeben und die Lösung für 24 Stunden bei 30°C mäßig gerührt. Im Anschluss wurde das Reaktionsprodukt filtriert, um den Diisopropylharnstoff zu entfernen, welcher durch das DIC gebildet wurde. Das Filtrat wurde in ein 100ml Methanol-Diethylether-Gemisch (3:1, v/v) gegeben, um den FUAC-Dextran-Komplex auszufällen, der dann durch Filtration gesammelt und mehrere Male mit Methanol (dreimal mit 15ml) und Aceton (zweimal mit 10ml) gewaschen wurde, um ungebundenes 5-FU aus dem Reaktionsprodukt auszuwaschen. Abschließend wurde das Endprodukt mittels ¹H-NMR-, ¹⁹F-NMR-, UV- und IR-Spektroskopie analysiert und charakterisiert. Die Konzentration des im FUAC-Dextran-Komplex befindlichen FUAC betrug nach UV-spektroskopischer Messung 15,7% des Komplexes. Die Umwandlung von 5-FU zu FUAC und die anschließende Kopplung an Dextran sind schematisch in Abbildung 25 dargestellt.

² Durch AG Prof. Dr. Koks, Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin

2.2.3.3. Carbodiimidkopplung von FUAC an EPS 4-Polymerpartikel³

Zur Kopplung von 50mg FUAC an 1,9g Polymerpartikel (Durchmesser 127nm) wurden 2ml der hergestellten FUAC-Lösung und die erforderliche Latexmenge bereitgestellt (19ml Latex EPS 4 W, ultrafiltriert). Die Esterbindung des modifizierten Wirkstoffes an die Hydroxylgruppen der Nanopartikel erfolgte mittels Carbodiimid. Die Latexmenge wurde mit 57ml Borax-Lösung auf 2,5% vorverdünnt. Anschließend wurden 55mg EDC (wasserlösliches Carbodiimid [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl-)carbodiimid]), gelöst in 10ml dieser Borax-Lösung, tropfenweise über einen Zeitraum von 3-5min zum vorverdünnten Latex hinzugegeben. Danach wurden die 2ml FUAC-Lösung innerhalb von 2min dazugetroffen und das Gemisch für 4 Stunden bei Raumtemperatur, verschlossen im Erlenmeyerkolben, mäßig gerührt. Zuletzt wurde das Produkt 3 Tage gegen 3-5l entionisiertes Wasser dialysiert, wobei das Wasser zweimal täglich gewechselt wurde. Nach der Dialyse befanden sich die so hergestellten FUAC-Polymerpartikel in 96ml wässriger Lösung. Die Konzentration des darin befindlichen, gebundenen FUAC betrug 2,76µmol/ml.

2.2.4. Photometrie, UV/VIS-Spektrum

Die Photometrie ist ein physikalisches Analyseverfahren, bei dem Konzentrationen fein verteilter oder gelöster Stoffe durch Lichtabsorptionsmessung ermittelt werden. Für die Konzentrationsbestimmung von 5-FU in wässrigen Lösungen wurde eine leicht abgewandelte Methode nach Amer et al. verwendet [84]. Hierbei reagieren Cobalt(II)-Ionen in Anwesenheit organischer Amine mit den zwei Imidgruppen des 5-FU-Ringes zu einem Fluorouracil-Cobalt(II)-Komplex, welcher spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 545nm bestimmt werden kann [84].

Die Analyse der Wirkstoffkonzentrationen erfolgte durch Vermessen der Überstände, welche durch Zugabe von Triton X100 (10µl pro 1ml Probe) hergestellt wurden. Die Lysate eines bestimmten Meßzeitpunktes wurden genau in dem Moment hergestellt, als die entsprechende Überstand-Probe mit demselben Meßzeitpunkt der chromatographischen Messung unterzogen wurde. Zur Herstellung einer Eichkurve am Photometer für die Konzentrationsbereiche 0,1-50mg/ml wurden Messreihen beginnend mit der niedrigsten Konzentration durchgeführt. Die Herstellung der Konzentrationsreihen erfolgte im Triplikate, während einzelne Proben im Duplikate gemessen wurden. Anschließend wurden die Mittelwerte bestimmt und eine Eichgerade erstellt, die nachfolgend auf ihre Linearität hin

³ In Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Paulke

geprüft wurde (Regressionsgerade). Zum Erstellen der Eichkurve und bei der Durchführung aller Experimente wurden dieselben Plastikkuvetten (Sarstedt Deutschland, Acrylic No.67.740) mit entsprechenden Verschlusskappen verwendet. Zur Durchführung der photometrischen Messungen fand das Spektrophotometer K2800 der Firma Hitachi (Tokio, Japan) Verwendung. Mit diesem Gerät können Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich von 190-1100nm aufgenommen werden [85].

Die UV/VIS-Spektren von FUAC und 5-FU wurden an einem Varian UV-Spektralphotometer CARY 1 ermittelt.

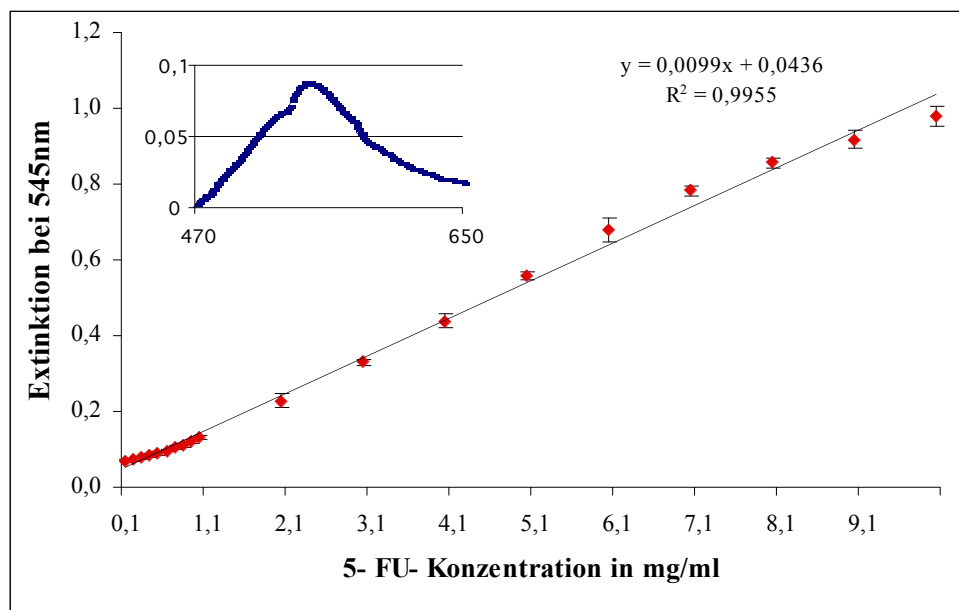


Abbildung 8: Eichkurve für die photometrische 5-FU-Konzentrationsbestimmung. Darstellung der MW und SD (n=6) der experimentell, mittels Photometrie bestimmten, Extinktionswerte bei 545nm in Abhängigkeit der 5-FU-Konzentration in mg/ml. Links oben ist das photometrisch bestimmte Spektrum von 5-FU mit einem Absorptionsmaximum bei 545nm im Wellenlängenbereich von 470 -650nm abgebildet. Die Beziehung zwischen 5-FU-Konzentration und Extinktion bei 545nm ist als Regressionsgerade (y) dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) zeigt den linearen Zusammenhang zwischen den Wirkstoffkonzentrationen und der Extinktion.

2.2.5. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Die Hochdruckflüssigchromatographie (engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) ist eine Analysemethode, die es ermöglicht, Substanzen anhand ihrer chemischen Eigenschaften zu trennen und diese mit Hilfe von Standards zu identifizieren und quantifizieren. Die Konzentrationen werden photometrisch im UV-Spektralbereich bestimmt [86]. Das chromatographische Trennungsverfahren erfolgte unter Verwendung der HPLC hp 1050 Series in Kombination mit einer 5µm ODS Hypersil Säule (VDS Optilab). Die HPLC ist eine der am weitesten verbreiteten und praktischsten Analysemethoden für 5-FU und seine

Metabolite [87]. Der quantitativen Bestimmung von 5-FU im Probenmaterial mit PBS als Lösemittel diente eine leicht modifizierte Detektionsmethode nach Jung et al. [87]. Hierbei wurde der Wirkstoff bei einer Wellenlänge von 265nm detektiert. Die mobile Phase war ein Methanol-Essigsäure-Wasser-Gemisch (3:0.05:96.95, v/v/v), welches mit Helium über einen Degaser entgast wurde. Die Laufzeit für jede Messung betrug 10min bei einem Fluss von 1ml pro min. Die Retentionszeit des Lösemittels war 2,6min, die des 5-FU 6,3min. Alle Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (20-22°C).

In dieser Arbeit wurde die HPLC verwendet, um das Gelingen der Beladung von Erythrozyten und white Ghosts mit dem Zytostatikum 5-FU zu analysieren. Die Wirkstoffkonzentrationen wurden in den Überständen wie auch in den Lysaten entsprechend der unter 2.2.5. beschriebenen Vorgehensweise ermittelt. Zum Kalibrieren (Spiking) wurden vor jeder Messreihe mindestens fünf bekannte Konzentrationen an 5-FU in PBS gelöst und zur anschließenden Berechnung der Probenkonzentrationen verwendet.

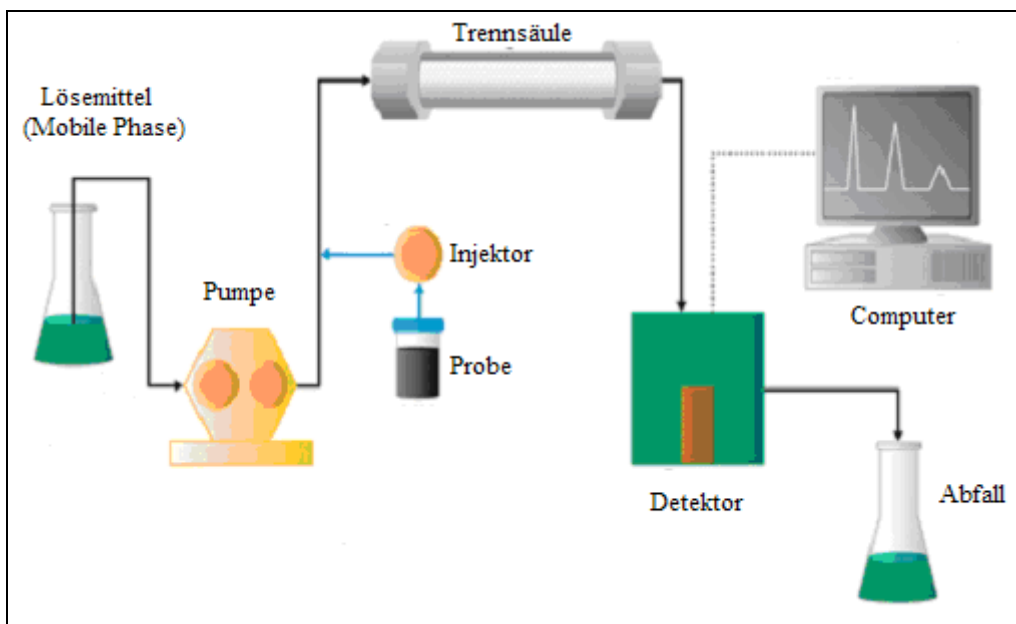


Abbildung 3: Schematische Darstellung vom Aufbau eines Hochdruckflüssigchromatographen (verändert nach: [88]).

2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) ist ein optisches Messverfahren zur Analyse von Einzelzellen in Suspensionen. Sie ermöglicht eine simultane Messung von relativer Zellgröße, deren Granularität sowie verschiedener Fluoreszenzsignale. Abb. 8 zeigt die schematische Darstellung des Aufbaus eines Durchflusszytometers.

Das Messprinzip des Durchflusszytometers besteht darin, dass die zu messenden Zellen, umgeben von einem schnell fließenden Transportstrom, durch eine Küvette gedrückt werden. Der Transportstrom dient einerseits der Beschleunigung der Zellen, andererseits der Auflösung von Aggregaten. Dieser Vorgang wird hydro-dynamische Fokussierung genannt. Der daraus resultierende Strom aus einzeln hintereinander fließenden Zellen passiert in der Küvette einen gebündelten Laserstrahl, der jede Zelle einzeln erfasst. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht. Je größer eine Zelle ist und je mehr Strukturen in ihrem Inneren bestehen, desto größer ist das entstehende Streulicht. Abhängig davon, in welchem Winkel man das Streulicht misst, erhält man unterschiedliche Informationen.

Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scattered Channel) hängt vor allem von der Größe einer Zelle ab; kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Side Scattered Channel) ist sensitiv für die Zelloberfläche und die Granularität. Das Durchflusszytometer misst in Kanälen unterschiedlicher Empfindlichkeit und kann dadurch das Fluoreszenzsignal quantifizieren. Da es keine mitgeführten Standardeinheiten für die Fluoreszenzintensität gibt, werden relative Einheiten [rel. E.] angegeben. Es wurde stets unter Verwendung der gleichen Einstellungen gemessen.

In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer zum Nachweis einer gelungenen Erythrozytenbeladung mit FITC-Albumin und FITC-Dextran verwendet.

Gemessen wurde am BD FACSCanto™ flow cytometer (BD BioSciences, San Jose, USA). Die Auswertung der detektierten Signale erfolgte mit Hilfe der Software FCS Express Version 3 Research Edition. Die Messprozedur beginnt, indem die gemessenen Signale der Zellen in einem doppelt logarithmischen Diagramm (SSC gegen FSC) dargestellt werden. In diesem Diagramm können bestimmte Bereiche definiert werden (gaten). Dadurch ist verhinderbar, dass Verunreinigungen oder Zelltrümmer in die Analyse eingehen [89].

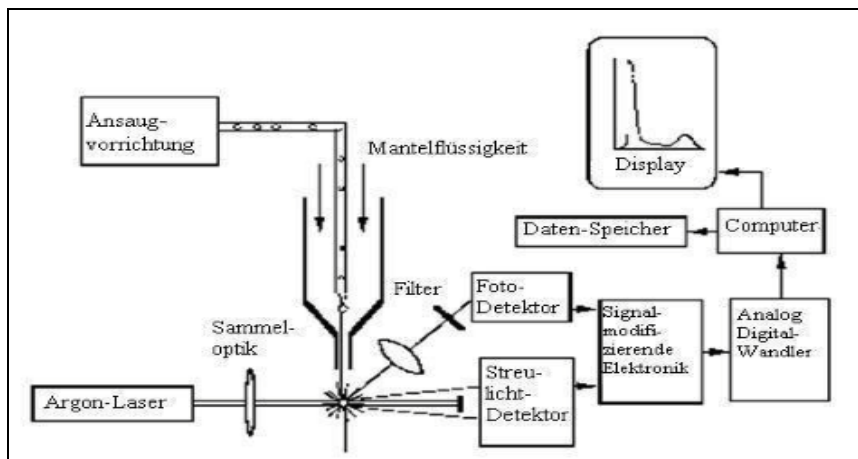


Abbildung 9: Schematische Darstellung vom Aufbau eines Durchflusszytometers (verändert nach: [90]).

2.2.7. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zeichnet sich gegenüber der Durchlicht- und der klassischen Fluoreszenzmikroskopie durch eine höhere optische Auflösung aus. Das für diese Arbeit verwendete Mikroskop CLSM 510 META (Carl Zeiss AG) macht es möglich, Strukturen bis zu einer Größe von $0,2\mu\text{m}$ zu visualisieren und anhand zweidimensionaler Daten dreidimensional als optische Serienschnitte (Z-Stacks, Bildstapel) darzustellen. Dem CLSM stehen sichtbare Laser sowie UV-Laser zur Verfügung, die einen Wellenlängenbereich von 351-633nm abdecken [91]. Es wurden Aufnahmen sowohl von nativen Erythrozyten als auch nach Beladung mit FITC-Albumin und FITC-Dextran im Durchlichtverfahren bzw. bei Fluoreszenzanregung durch die 488nm Emissionslinie des Argonlasers angefertigt.

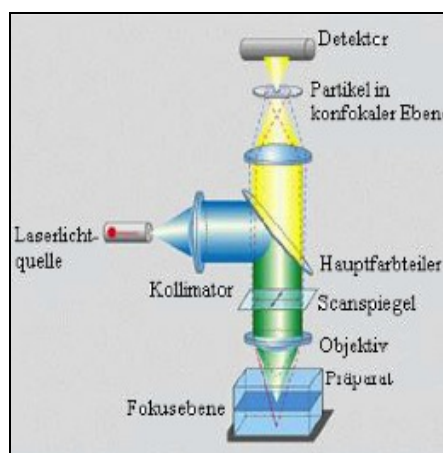


Abbildung 10: Strahlenverlauf eines CLSM [91].

2.2.8. NMR-Spektroskopie

Die spektroskopische Methode der Kernspinresonanzspektroskopie (engl. nuclear magnetic resonance, NMR-Spektroskopie) dient der Identifizierung und Strukturaufklärung organischer Verbindungen und Naturstoffe. Mit ihrer Hilfe können Atomen nachgewiesen werden, deren Kerne einen Spin besitzen, indem diese in einem statischen Magnetfeld platziert werden und mit einem äußeren Magnetfeld in Wechselwirkung treten [92, 93]. Ein ungepaartes Proton in einem solchen Magnetfeld kann in zwei energetischen Zuständen vorliegen, einem energiearmen mit parallel zum äußeren Feld verlaufenden Spin und einem energiereichen Zustand mit antiparalleler Ausrichtung des Spins. Wird dem System die erforderliche Energie zugeführt, kann der Übergang in den höherenergetischen Zustand erfolgen. Hierzu muss eine die zu untersuchende Substanz umgebende Induktionspule ein zum homogenen Magnetfeld senkrecht hochfrequentes elektromagnetisches Wechselfeld erzeugen. Anschließend wird bis zum Eintritt des Resonanzfalls die Stärke des Magnetfeldes (Continuous-Wave-Verfahren) oder die Frequenz des Wechselfeldes (Continuous-Field-Verfahren) variiert. Tritt der Resonanzfall ein (Probe nimmt Energie aus dem Wechselfeld auf) ändert sich die Stromstärke, die zum Aufbau des Wechselfeldes vonnöten ist. Dieser Vorgang ist messbar. Ebenfalls kann nach Abschalten des Wechselfeldes die während der Relaxation (Zurückfallen auf das energieärmere Niveau) abgegebene Strahlung registriert werden. Die Resonanzfrequenzen der Atome hängen von der elektronischen Umgebung der Kerne ab. Weiterhin gibt es über Bindungen zu anderen magnetischen Kernen Resonanz-Wechselwirkungen (chemische Kopplung). Diese Eigenschaften ermöglichen die Strukturaufklärung von Molekülen.

Ein NMR-Spektrum wird hauptsächlich durch zwei Größen charakterisiert: die chemische Verschiebung (chemical shift) als Maß für die Abschirmung des Kerns in einer definierten chemischen Umgebung und die Spin-Spin-Kopplung, welche die Wechselwirkung benachbarter Kernspins beschreibt. [93]

Die NMR-Spektren zum Nachweis einer gelungenen Kopplung von FUAC an Dextran wurden an einem JOEL ECX 400⁴ durchgeführt. Als Lösungsmittel diente d₆-DMSO. Alle chemischen Verschiebungen (δ) wurden in parts per million (ppm) dokumentiert und im Verhältnis zum verbleibenden Protonenpeak von d₆-DMSO angegeben.

⁴ durch die AG Prof. Dr. Beate Koks, Institut für Chemie und Biochemie, Freie Universität Berlin

2.2.9. Partikelelektrophorese⁵

Die Methode der Partikelelektrophorese dient der Bestimmung der Oberflächenladung eines Teilchens anhand seiner Mobilität in einem definierten äußeren elektrischen Feld. Die Eigenschaften der umgebenden Lösung (pH-Wert, Ionenstärke und Viskosität) wirken sich auf die Beweglichkeit aus, wobei diese von der Oberflächenladung der Partikel abhängig ist [94, 95].

Nach dem Prinzip der Partikelelektrophorese wandern geladene Kolloidteilchen im elektrischen Feld auf die entgegengesetzt geladene Elektrode zu. In der Oberflächenschicht der Teilchen befindliche saure und basische Gruppen gehen in die Ladungsbilanz der Teilchen ein. Was in dieser Ladungsbilanz an Überschussladungen verbleibt, bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit. Die Messungen der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit erfolgten an einem Zetamster S (Malvern Instruments, GB).

2.2.10. Statistische Auswertung

Die im Ergebnisteil aufgeführten Werte im Text und in den Graphiken repräsentieren Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD). Mit Hilfe des D'Agostino-Pearson-Tests wurde zunächst überprüft, ob eine Normalverteilung und eine Homogenität der Varianzen vorliegt. Die Zahl der Wiederholungsexperimente wurde auf drei begrenzt, da in der Arbeit die Machbarkeit des Prinzips untersucht werden sollte. Die statistische Analyse der Mittelwerte und Standardabweichungen in den Zellkulturversuchen erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse 2way ANOVA. Die Signifikanz der Werte wurde im Bonferroni posttest ermittelt. Hierbei wurden Signifikanzwerte (p-Wert) unter 0,05 als statistisch signifikant, unter 0,01 als hoch signifikant bewertet.

In der Auswertung der FACS-Versuche wurde zur Charakterisierung des Fluoreszenzsignals der Median der Fluoreszenzintensität (F_{Median}) in relativen Einheiten [rel. E.] und der Variationskoeffizient (CV) als Maß für die Streuung der Werte benutzt.

⁵ durchgeführt von Dr. rer. nat. Bernd Paulke, IAP Golm

3 Ergebnisse

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche und deren Ergebnisse umfassen Untersuchungen zur Effizienz der Beladung von Erythrozyten mit dem Zytostatikum 5-FU. Die Wirkstofffreisetzung wurde in Vorversuchen mittels HPLC und Spektralphotometrie bestimmt.

Das Zytostatikum 5-FU ist mit einer geringen molaren Masse von 130,08g/mol ein sehr kleines Molekül, welches nahezu ungehindert die Erythrozytenmembran passieren kann. Aus diesem Grund musste ein Trägermolekül gefunden werden, an welches der Wirkstoff gekoppelt werden konnte, um den unbehinderten Durchtritt durch die Membran der Erythrozyten zu verhindern.

Dazu wurde 5-FU durch die Umwandlung zu FUAC mit einer kopplungsfähigen funktionellen Gruppe ausgestattet, die eine Kopplung an EPS 4-Polymerpartikel und Dextran ermöglichte. Sowohl die Umsetzung zu FUAC als auch die Kopplung an Nanopartikel und Dextran wurden mittels UV/VIS-Spektroskopie, NMR-Spektroskopie sowie Partikelelektrophorese untersucht.

Anhand von Zellkulturversuchen wurde gezeigt, inwieweit die proliferationshemmenden Eigenschaften von 5-FU in umgewandelter und gekoppelter Form erhalten geblieben sind.

Zuletzt erfolgte die experimentelle Untersuchung der Beladung von Erythrozyten mit den verschiedenen fluoreszenzmarkierten Modellschubstanzen FITC-BSA und FITC-Dextran mit dem Ziel, die Erythrozyten als Carrier für das Zytostatikum 5-FU einzusetzen. Dazu wurde das Verfahren der osmotischen Schwellung unter Berücksichtigung des Optimums der osmotischen Fragilität von Erythrozyten angewandt.

3.1. Vorversuche zur Beladung mit 5-FU

3.1.1. Erythrozytenbeladung mit freiem 5-FU und Wirkstoffkonzentrationsbestimmung in Erythrozyten, white Ghosts und den Überständen

Erythrozyten und white Ghosts wurden entsprechend der unter 2.2.2.5. beschriebenen Vorgehensweise mit dem Wirkstoff 5-FU beladen. Die photometrische und chromatographische Untersuchung der Wirkstoffspiegel in den Überständen und Lysaten diente dabei zur näheren Charakterisierung der Effizienz hinsichtlich einer Beladung von Carrier-Erythrozyten mit 5-FU, der intrazellulären Verweildauer und der Beladungskonzentration.

Ergebnisse

Aufgrund der ähnlichen Absorptionsmaxima von 5-FU und Hämoglobin in einem Wellenlängenbereich von 550nm erwies sich eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der mit 5-FU-beladenen hämoglobinhaltigen Zellen als nicht geeignet [84, 96]. In Anbetracht dieser Tatsache beschränken sich die im Folgenden präsentierten Ergebnisse auf die Darstellung der Wirkstoffkonzentrationen nach chromatographischer Trennung von 5-FU und Hämoglobin mittels HPLC.

Zur experimentellen Untersuchung der Wirkstofffreisetzung aus white Ghosts und Erythrozyten wurden vier Freisetzungsversuche (V1-V4) durchgeführt. Dabei wurden in einem ersten Versuch (V1) die 5-FU-Konzentrationen beladener white Ghosts nach ein- bis sechsmaligen Waschen bestimmt, während in den weiteren Versuchen (V2-V4) die Wirkstoffspiegel beladener white Ghosts und Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit nach Beladung quantitativ analysiert wurden. Als erster Analysezeitpunkt und erstes Waschen (t_0 bzw. W1) galt bei allen Versuchen der Augenblick nach Beladung, Resealen und dreimaligem Waschen in einem Volumenverhältnis der Zellen zu PBS von 1:9. Die Dauer der drei Waschgänge betrug durchschnittlich 45min. Die Volumenverhältnisse zwischen den Zellen und PBS waren sowohl beim Waschen als auch bei der Aufbewahrung in den Probenbehältern für die verschiedenen Messzeitpunkte in allen Versuchen identisch. Jedoch unterschieden sich die Inkubationskonzentrationen von 5-FU ($5\text{-FU}_{V1, V4} = 5\text{mg/ml}$, $5\text{-FU}_{V2, V3} = 10\text{mg/ml}$) bei Beladung der Zellen, was in der graphischen Darstellung der Ergebnisse berücksichtigt wurde um eine Interpretation unabhängig von den Inkubationskonzentrationen zu ermöglichen. Hierfür wurden die Ergebnisse entsprechend der unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen normiert.

Im ersten Versuch (V1) konnte gezeigt werden, dass bei einer Startkonzentration von 0,4% der Beladungskonzentration die Werte sowohl im Überstand als auch im Lysat nach bereits einem weiteren Waschschrift weniger als halb so hoch (40%) waren. Nach insgesamt vier Waschschriften fiel die Konzentration nicht weiter ab und blieb bei Werten um 0,02% konstant (Abb. 10). Die Konzentrationen wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Überständen und Lysaten auf.

Ergebnisse

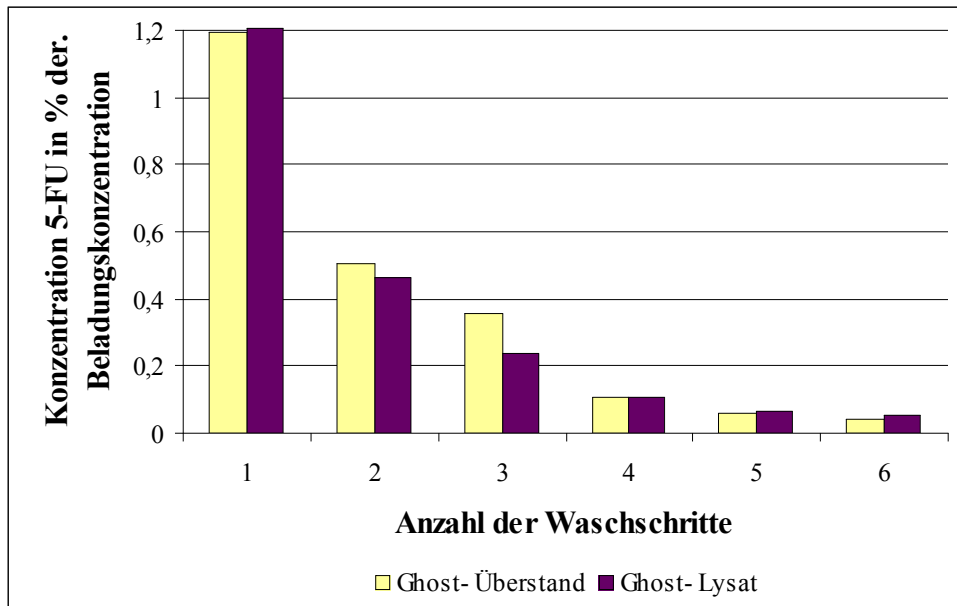


Abbildung 11: V1. Darstellung der chromatographisch bestimmten 5-FU-Konzentration (% der Beladungskonzentration) in den Überständen und Lysaten beladener white Ghosts bezogen auf die Anzahl der Waschschrirte. Waschschrirte 1 ist der erste nach den üblichen 3 Waschschrirten nach der Beladung. Die Inkubationskonzentration von 5-FU lag bei 5mg/ml.

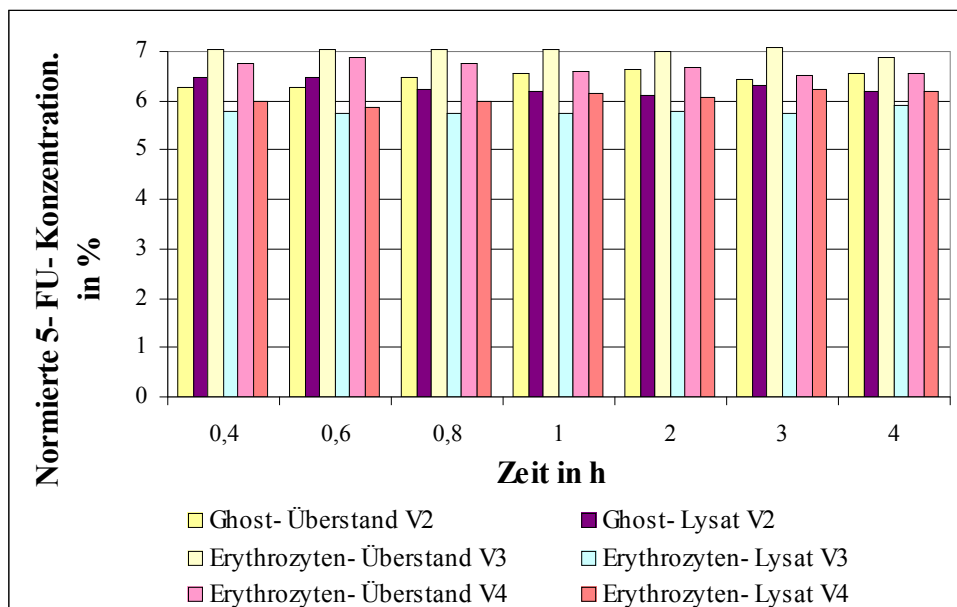


Abbildung 12: V2, V3 und V4. Darstellung der chromatographisch bestimmten 5-FU-Konzentration (in % der Inkubationskonzentration, normiert auf 10mg/ml Inkubationskonzentration) in den Überständen und Lysaten beladener Erythrozyten und white Ghosts in Abhängigkeit von der Zeit (in h) nach Beladung, Resealing und den üblichen 3 Waschschrirten (= t_0 , die Zeit für die 3 Waschschrirte betrug durchschnittlich 45min). In V2 wurden white Ghosts beladen, in V3 und V4 Erythrozyten.

Die Auswertung der Freisetzungsversuche V2 bis V4 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchen. Die 5-FU-Konzentrationen in den Überständen und Lysaten der white Ghosts und Erythrozyten wiesen zu jedem Untersuchungszeitpunkt ähnliche Werte auf. Die Ergebnisse der Versuche, in denen die Beladung mit der geringeren Inkubationskonzentration von 5mg/ml durchgeführt worden war, wurden so normiert, dass sie mit den Ergebnissen mit der höheren Inkubationskonzentration bei der Beladung (10mg/ml) verglichen werden können. Abbildung 12 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse des zweiten bis vierten Freisetzungsversuches.

3.2. Kopplung an Makromoleküle

Nach der Beladung von white Ghosts und Erythrozyten mit dem Zytostatikum 5-FU in den Vorversuchen wurde der Ausgangswirkstoff nach der Umwandlung in das kopplungsfähigere FUAC an die Makromoleküle Dextran und EPS 4-Polymerpartikel gekoppelt. Diesbezüglich dienten die UV/VIS-Spektren von 5-FU und FUAC dem Nachweis einer gelungenen Umsetzung des Ausgangswirkstoffes zu FUAC. Die NMR-spektroskopischen Analysen von 5-FU, FUAC sowie FUAC-Dextran fungierten ebenfalls als Beweis einer erfolgreichen Umsetzung von 5-FU zu FUAC sowie einer gelungenen Kopplung von FUAC an Dextran. Die Kopplung von FUAC an Polymerpartikel vom Typ EPS 4 wurde anhand einer Partikelelektrophorese auf ihr Gelingen hin analysiert.

3.2.1. UV/VIS-Spektren von 5-FU und FUAC

Die UV/VIS-Spektren der Substanzen 5-FU und FUAC wurden im Wellenlängenbereich zwischen 350nm und 190nm zum Vergleich übereinander gelegt. Als Referenz wurde eine 0,5 molare NaCl-Lösung gemessen.

Die Spektren wirken recht ähnlich, sind aber um etwa 60nm gegeneinander verschoben, da beide Substanzen eine ähnliche Absorptionscharakteristik aufweisen, jedoch absorbiert FUAC energiereicheres Licht als 5-FU. Bei 5-FU beginnt die Lichtabsorption bereits bei energieärmeren Wellenlängen in einem Bereich von 330nm. Beide Spektren sind zum Vergleich in Abbildung 13 graphisch dargestellt.

Ergebnisse

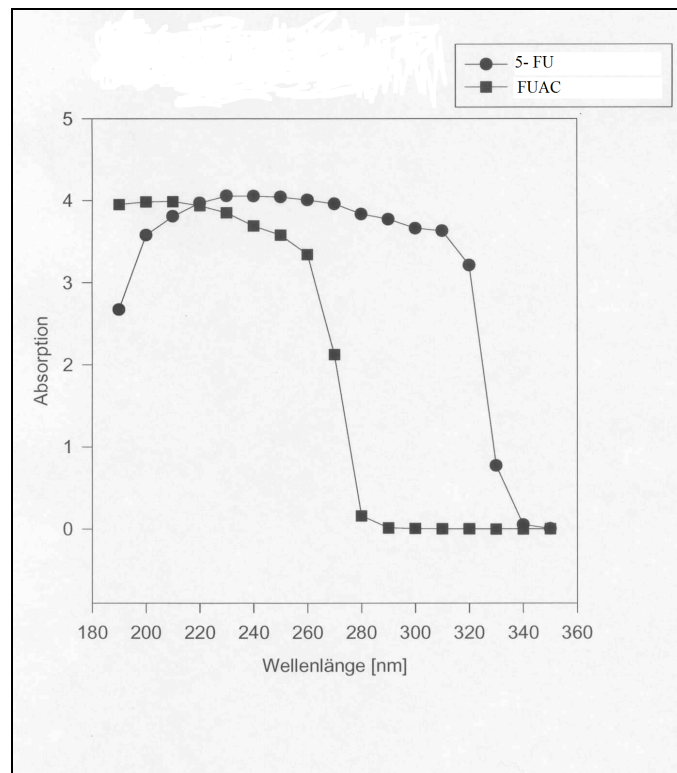


Abbildung 13: UV/VIS-Spektren von 5-FU und FUAC in einem Wellenlängenbereich von 190-350nm. Darstellung der Absorption in Abhängigkeit von der Wellenlänge (nm).

3.2.2. NMR-Spektroskopie⁶

Exemplarisch für die Untersuchungen zur erfolgreichen Umsetzung von 5-FU zu FUAC sowie der Kopplung von FUAC an Dextran mittels Kernspinresonanzspektroskopie wurden die NMR-Spektren von 5-FU und FUAC sowie von FUAC und FUAC-Dextran im Folgenden aufgeführt.

Die NMR-spektroskopische Analyse der Substanzen 5-FU und FUAC lässt anhand des Unterschieds in der chemischen Verschiebung von 1,3ppm (Abb. 14) eine gelungene Umsetzung von 5-FU zu FUAC erkennen.

⁶ Durch Dr. Cadicamo der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Koxsch des Instituts für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Ergebnisse

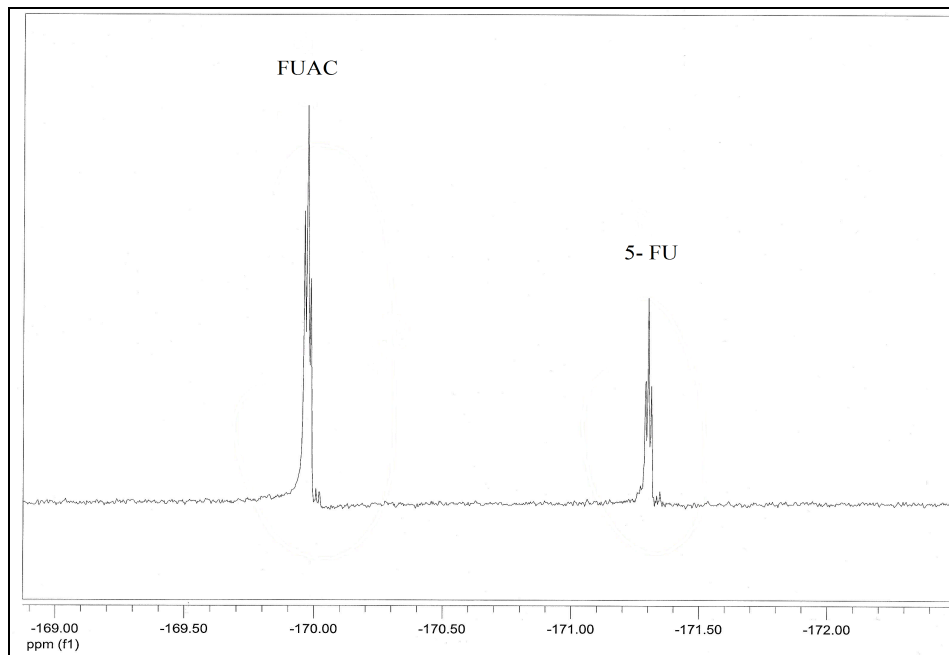


Abbildung 14: NMR-Spektren von 5-FU und FUAC. Dargestellt ist die chemische Verschiebung (δ in ppm).

Die erfolgreiche Kopplung von FUAC an Dextran stellt sich in der chemischen Verschiebung (0,8ppm) im NMR-Spektrum der beiden Substanzen dar (Abb. 15).

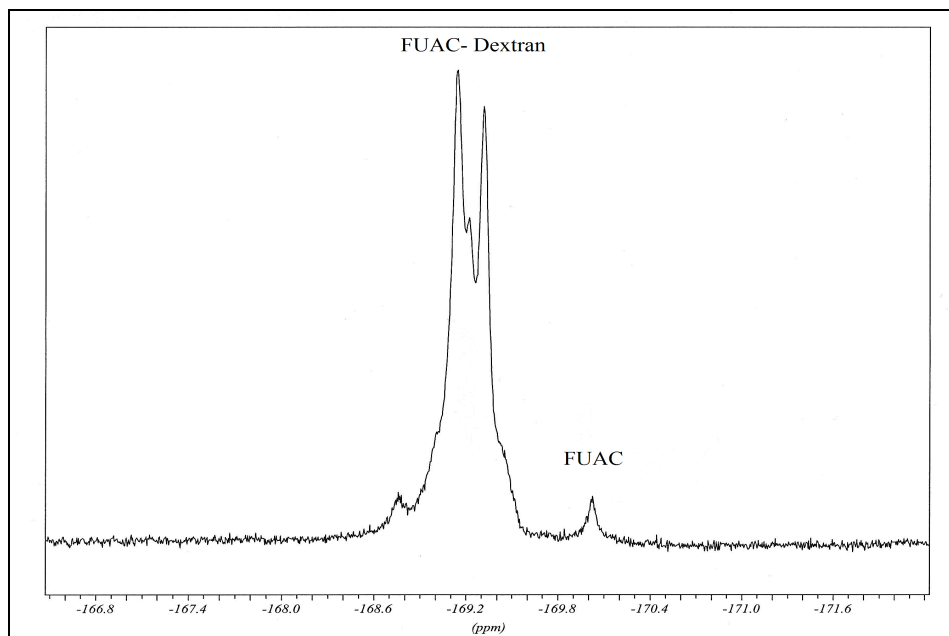


Abbildung 15: ¹⁹F-NMR-Spektren von FUAC und FUAC-Dextran. Dargestellt ist die chemische Verschiebung (δ in ppm).

Ergebnisse

Das ^1H NMR-Spektrum (Abb. 16) von FUAC-Dextran zeigt die chemische Konjugation des Carboxylgruppen-haltigen Wirkstoffes mit Dextran durch eine Esterbindung.

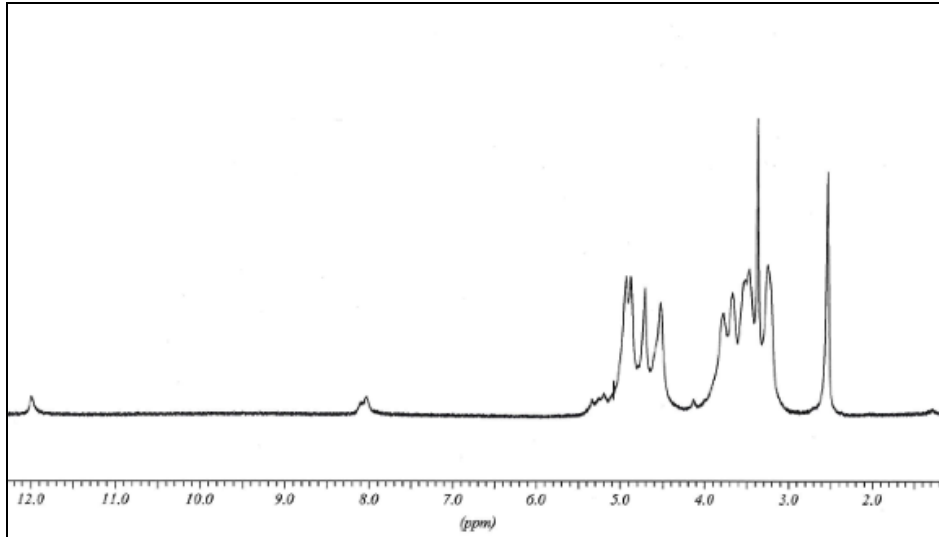


Abbildung 16: ^1H -NMR-Spektrum von FUAC-Dextran. Dargestellt ist die chemische Verschiebung (δ in ppm).

3.2.3. Elektrophorese

Die Partikelelektrophorese wurde mit dem Ziel durchgeführt, eine erfolgreiche Kopplung von FUAC an die carboxylierten, biokompatiblen Polymerpartikel vom Typ EPS 4 nachzuweisen. In der Elektrophorese wurde die Wanderungsgeschwindigkeit der ungekoppelten EPS 4-Polymerpartikel im Vergleich zu gekoppelten EPS 4-FUAC-Latexteilchen im elektrischen Feld bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen (Abb. 17). Die Bedingungen wurden zuvor optimiert, so dass sowohl der Start-pH als auch die Ionenstärke zu Beginn der Messung übereinstimmten. Die Leitfähigkeit lag beim Start der Messungen in beiden Proben bei 90 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Die elektrophoretischen Mobilitäten (Wanderungsgeschwindigkeiten) zwischen den EPS 4-Polymerpartikeln und den EPS 4-FUAC-Latexteilchen unterschieden sich im sauren Bereich stark voneinander. Bei den unbeladenen Partikeln blieb die Mobilität im pH-Intervall zwischen 9,5 und 5,5 trotz starker pH-Änderung nahezu konstant. Im sauren Milieu nahm die Wanderungsgeschwindigkeit ab, sank jedoch nicht auf den Nullwert ab.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der FUAC-gekoppelten Partikel war bei jedem betrachteten pH-Wert kleiner. Unterhalb von pH 3,4 wanderten sie in die entgegengesetzte Richtung, was in der Grafik am Überschreiten der Nulllinie und damit einem Wechsel des Vorzeichens der Mobilität, dargestellt in Abbildung 17, erkennbar ist.

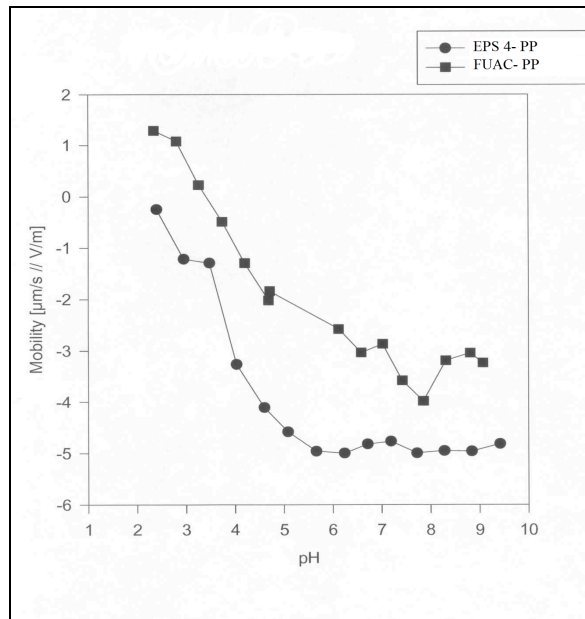


Abbildung 17: Elektrophoretische Mobilität ($\mu\text{m/s}$) von EPS 4-Polymerpartikeln (EPS 4-PP) und FUAC-gekoppelten EPS 4-Polymerpartikeln (FUAC-PP) in Abhängigkeit vom pH-Wert.

3.3. Untersuchung der Wirkstoff-Makromolekülkomplexe auf ihre wachstumshemmende Wirkung in der Zellkultur

Im Anschluss an die Kopplung von FUAC an die Makromoleküle wurden die freien Wirkstoffe und die Wirkstoff-Makromolekülkomplexe in drei Zellkulturversuchen mit Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CC531 (siehe 2.1.3.) auf ihre weiterhin bestehende antiproliferative Wirkung untersucht. Dazu wurden die verwendeten Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen in Gegenwart des Wirkstoffes und der oben beschriebenen Makromolekül-Wirkstoffkomplexe kultiviert. Als Kontrolle wurden die CC531-Zellen in RPMI ohne Zusätze kultiviert. Die Versuche wurden entsprechend der unter 2.1.4. beschriebenen Zellkulturbedingungen durchgeführt.

Von besonderem Interesse war hierbei, welcher Wirkstoffkomplex im Vergleich zu freiem 5-FU die größte proliferationshemmende Wirkung erzielte.

Für die Auswertung der unter 2.1.5. erörterten Versuche wurde zu den einzelnen Analysezeitpunkten für jede Probe die Zellzahl im Triplikat bestimmt. Darüber hinaus wurde für den zweiten und dritten Versuch ein zusätzlicher Proliferationstest (MTT-Test) durchgeführt. Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt. Da in den Versuchen nicht mit der gleichen Ausgangszellzahl begonnen wurde, wurde zum

besseren Vergleich der Versuche untereinander die Zellzahl im Verhältnis zur Ausgangszahl ($x=1$) dargestellt.

3.3.1. Wirkung von freiem 5-FU im Vergleich zur Negativkontrolle

Im ersten Versuch wurde freies 5-FU im Vergleich zur Negativkontrolle in der Zellkultur untersucht. Die Negativkontrolle wurde in einem reinen RPMI-Medium kultiviert, für die 5-FU-Probe wurde dem RPMI-Medium 5-FU beigefügt ($100\mu\text{M}$).

Die Bestimmung der Zellzahl zeigte bereits nach 48 Stunden einen deutlichen Unterschied in der Zahl der Kolonkarzinomzellen (Abb. 18). Die Zellzahl der Negativkontrolle stieg über die Dauer des Experiments konstant an, die Zellzahlbestimmung der 5-FU-Probe zeigte keinen signifikanten Anstieg der Zellzahl.

Aufgrund des geringen Unterschiedes bezüglich der Zellzahlen nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden wurde in den folgenden Versuchen auf die Darstellung dieser Werte verzichtet.

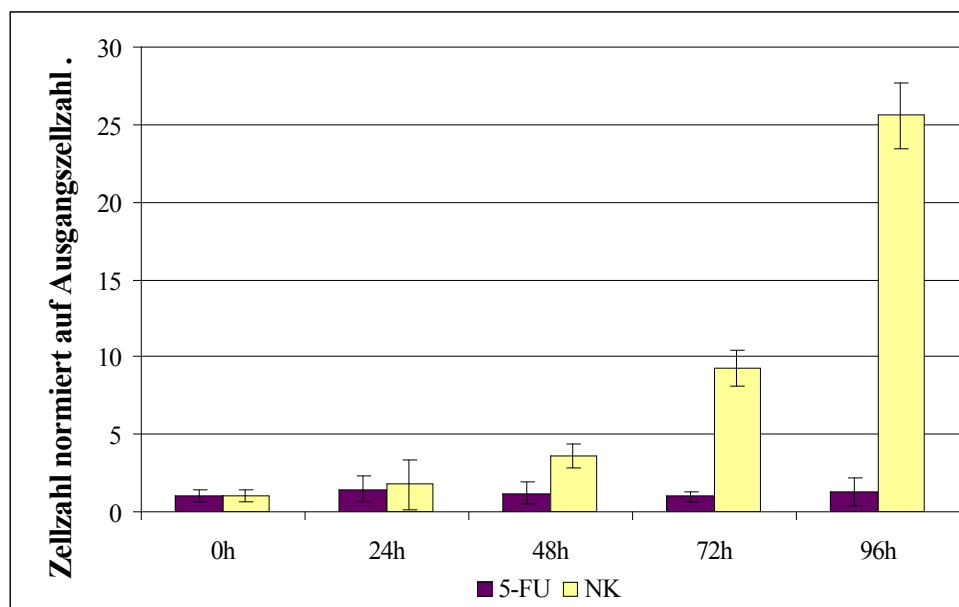


Abbildung 18: Effekte von 5-FU auf das Zellwachstum.

Darstellung der Mittelwerte ($n=3$) und Standardabweichungen der Zellzahlen (normiert auf die Ausgangszellzahl) von Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CC531, welche in 5-FU-haltigem RPMI 1640 Medium ($100\mu\text{M}$) kultiviert wurden, im Vergleich zu einer Negativkontrolle (NK), deren Medium keinen Wirkstoff enthielt, in Abhängigkeit von der Zeit (h).

3.3.2. Wirkung von FUAC-Dextran

In einem zweiten Zellversuch wurden die Auswirkungen auf die Zellzahl von ungebundenem Dextran und FUAC gekoppeltem Dextran im Vergleich zur Negativkontrolle und freiem Wirkstoff 5-FU auf die Zelllinie CC531 untersucht (Abb. 19).

Ergebnisse

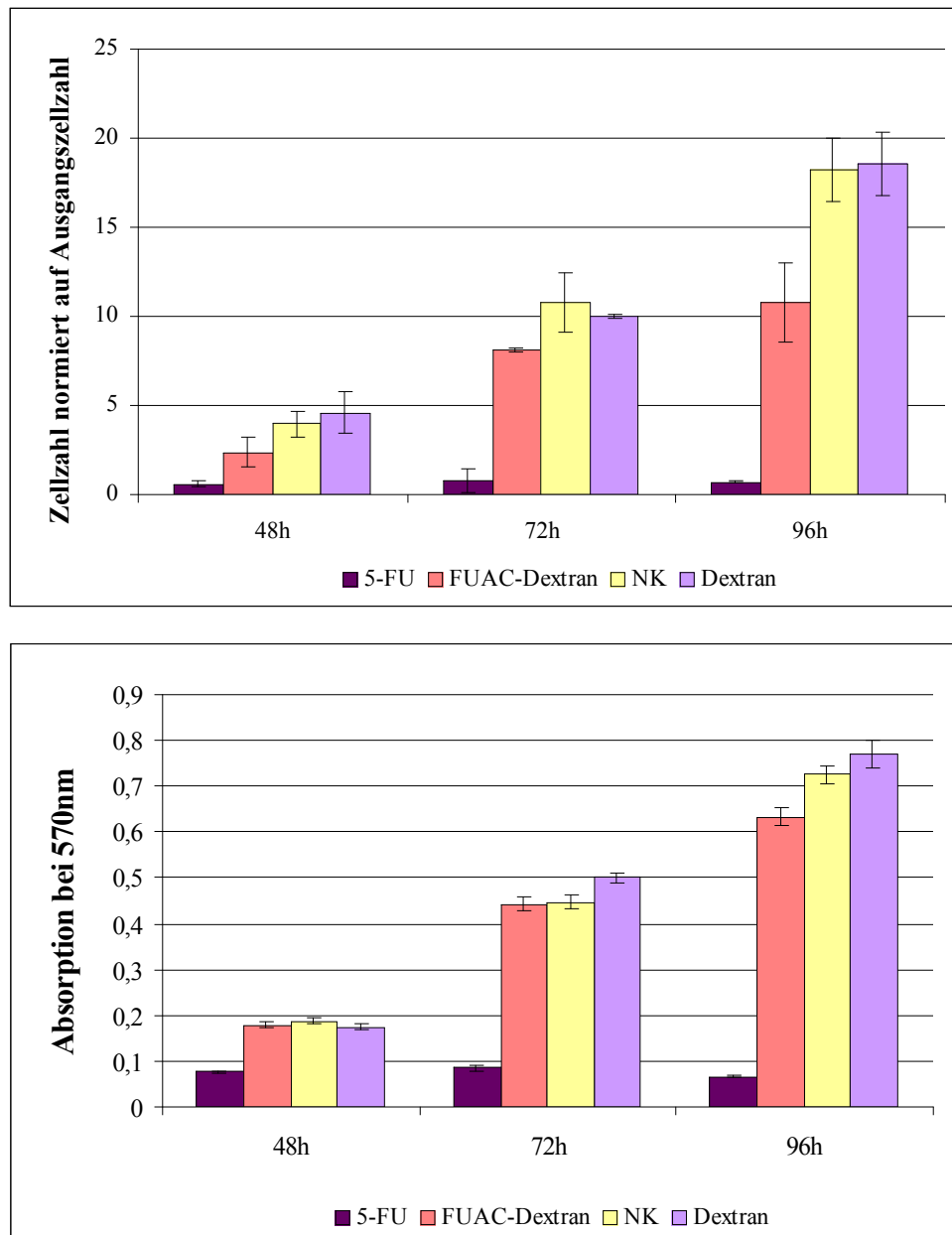


Abbildung 19: Effekte von FUAC-Dextran auf das Zellwachstum.

Oben: Zellzählung. Darstellung der MW (n=3) und SD der Zellzahlen (normiert auf die Ausgangszellzahl=1) von Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CC531, welche in FUAC-Dextran-haltigem RPMI 1640 Medium kultiviert wurden, im Vergleich zu einer Negativkontrolle (NK), deren Medium keinen Wirkstoff enthielt, einer Positivkontrolle, deren Medium freies 5-FU enthielt und einer Dextran-Probe in Abhängigkeit von der Zeit (h).

Unten: MTT-Test. Darstellung der MW (n=3) und SD der Absorptionswerte bei 570nm. Gemessen wurden dieselben Proben, die zur Zellzählung verwendet wurden. Die Absorption ist direkt proportional zur Zellzahl.

Ergebnisse

Die quantitative Bestimmung der proliferationshemmenden Wirkung erfolgte sowohl über die Ermittlung der Zellzahl als auch über einen MTT-Zellwachstumstest. Zur besseren Übersicht wurde auf die graphische Darstellung der Zellzahlen zum Zeitpunkt Null verzichtet.

Die Auswertung der Zellzählung zeigte, dass die 5-FU-Probe wie in den vorherigen Versuchen keinen Zuwachs in der Zellzahl verzeichnete. Die Zellen, die mit FUAC-Dextran, als Negativkontrolle ohne Zusätze und mit freiem Dextran kultiviert worden waren, zeigten einen Anstieg der Zellzahl proportional zur Dauer des Experiments. Die wachstumshemmende Wirkung des FUAC-Dextran-Komplexes zeigte sich deutlich geringer als die des freien Wirkstoffes. Dies korrelierte mit einer geringfügig niedrigeren Zellzahl als in der Negativkontrolle und der Dextran-Probe nach einer Inkubationsdauer von 48 und 72 Stunden. Nach 72 Stunden war die Zellzahl der FUAC-Dextran-Probe signifikant niedriger als in dem Negativ- und Dextran-Ansatz, nach 96 Stunden war der Unterschied hoch signifikant.

Die Auswertung des MTT-Zellwachstumstests bestätigte die Beobachtungen der Zellzählung. Deutlich erkennbare Unterschiede zwischen den Zellzahlen der FUAC-Dextran-, Negativ- und Dextran-Probe zeigten sich hier erst nach 96 Stunden, wobei FUAC-Dextran im Vergleich zum ungekoppelten Wirkstoff eine deutlich geminderte antiproliferative Wirkung zeigte.

3.3.3. Wirkung von FUAC-Nanopartikeln

In einem dritten Zellversuch wurden die wachstumshemmenden Effekte von freiem FUAC und FUAC-gekoppelten Nanopartikeln im Gegensatz zu unverändertem 5-FU, einer Negativkontrolle und ungebundenen Polymerpartikeln untersucht. Dazu wurden sowohl die Zellzahlen als auch die MTT-Zellwachstumsraten bestimmt (Abb. 20).

Die Bestimmung der Zellzahlen ergab für die 5-FU- und FUAC-Proben keinen Zellzahlzuwachs. Es war kein deutlicher Unterschied in der zytostatischen Wirkung der beiden freien Wirkstoffe zu erkennen. Die FUAC-Nanopartikel-Probe, Negativkontrolle und Polymerpartikel-Probe hingegen zeigten einen stetigen Zuwachs der Zellzahl. Die antiproliferative Wirkung der FUAC-Nanopartikel erwies sich als deutlich geringer verglichen mit jener freier Wirkstoffe. Bereits nach 48 Stunden war das Zellwachstum signifikant niedriger verglichen mit der Negativkontrolle, nach 72 und 96 Stunden war der Unterschied der Zellzahl hoch signifikant.

Bei der Betrachtung der MTT-Test-Auswertung wurde ersichtlich, dass die Ergebnisse der Zellzählung bestätigt werden konnten. Hier ließ sich ein Trend des freien FUAC erkennen, eine noch effizientere Wachstumshemmung, verglichen mit 5-FU, zu bewirken.

Ergebnisse

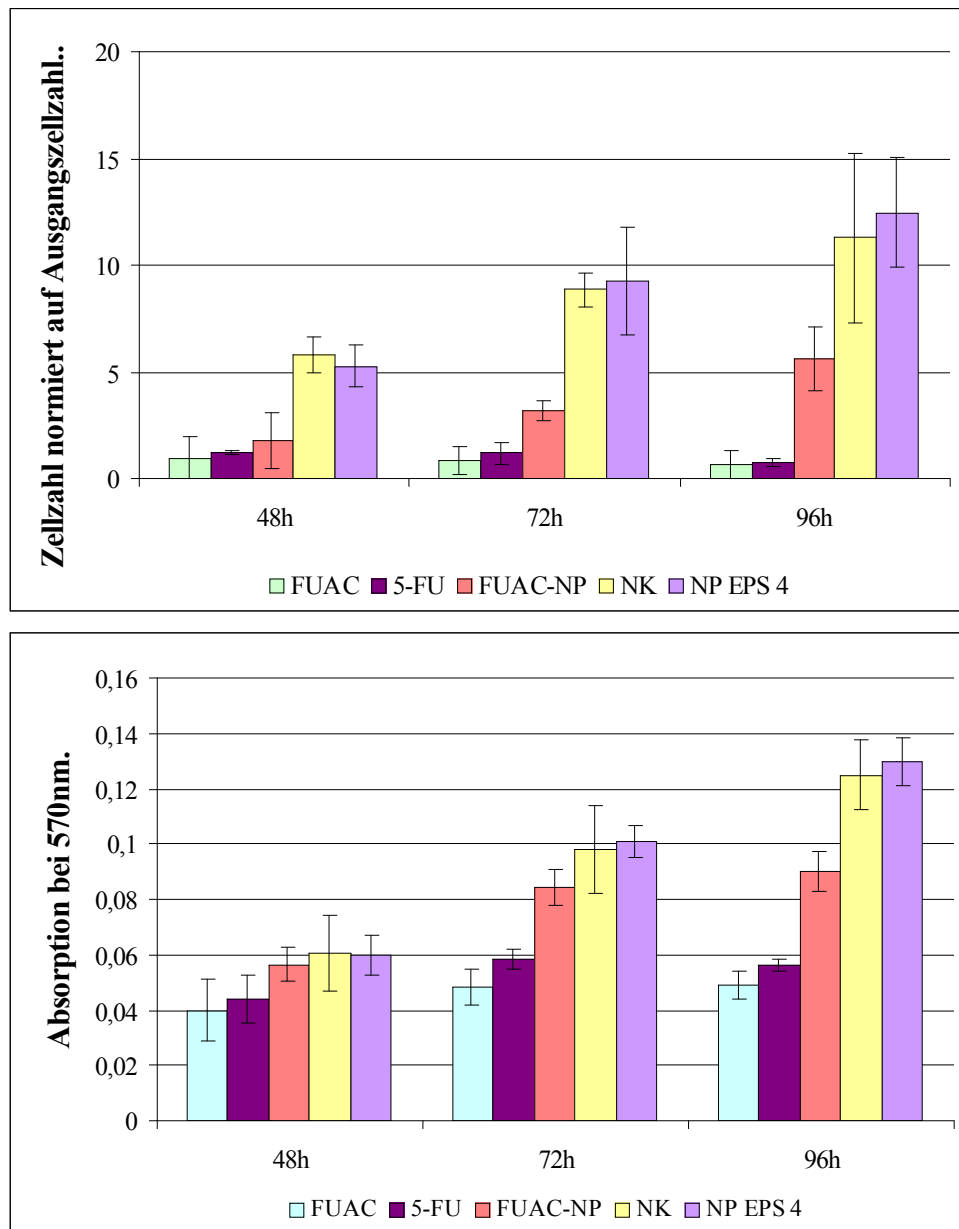


Abbildung 20: Effekte von FUAC und FUAC-Nanopartikeln auf das Zellwachstum. Oben: Darstellung der MW (n=3) und SD der Zellzahlen (normiert auf Ausgangszellzahl) von Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CC531, welche in FUAC-haltigem und FUAC-EPS 4-haltigem RPMI 1640 Medium kultiviert wurden, im Vergleich zu einer Negativkontrolle (NK), deren Medium keinen Wirkstoff enthielt, einer Positivkontrolle, deren Medium freies 5-FU enthielt und einer Nanopartikel-Probe, in Abhängigkeit von der Zeit (h).

Unten: MTT-Test. Darstellung der MW (n=3) und SD der Absorptionswerte bei 570nm. Gemessen wurden dieselben Proben, die zur Zellzählung verwendet wurden. Die Absorption ist direkt proportional zur Zellzahl.

Die Auswertung der drei Zellkulturversuche ließ eine gleichwertige wachstumshemmende Wirkung des freien Wirkstoffs 5-FU und seiner modifizierten Form FUAC erkennen.

Die Wirkung der ebenfalls untersuchten Konjugate FUAC-Dextran und FUAC-Nanopartikel war um ein Vielfaches abgeschwächt, aber dennoch signifikant, verglichen mit der Negativkontrolle. Die gekoppelten Wirkstoffverbindungen unterschieden sich nicht signifikant untereinander.

3.4. Osmotische Fragilität von Erythrozyten

Die osmotische Fragilität der Erythrozyten wurde im Triplikat bestimmt, wobei für jede Osmolarität drei Messungen durchgeführt wurden. Abbildung 20 zeigt die graphische Darstellung aller Mittelwerte und Standardabweichungen der Hämolyseraten entsprechend den Osmolaritäten. Anhand der Kurve (Abb. 21) wurde die Osmolarität ermittelt, bei der 50% der Zellen hämolysiert vorlagen (MOF). Der Mittelwert für die MOF lag bei 131mOsm.

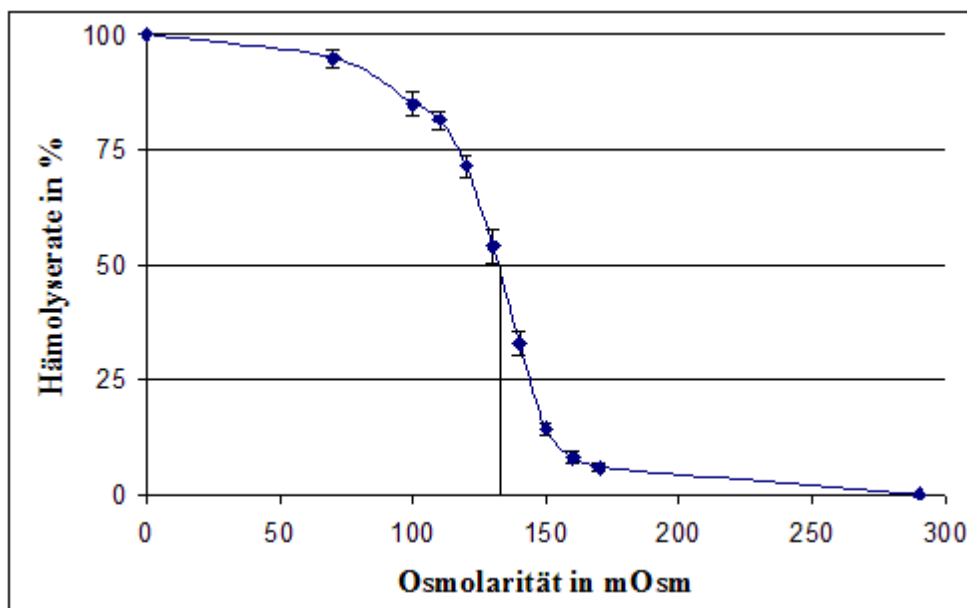


Abbildung 21: Darstellung der MW und SD der Hämolyseraten (%) von Erythrozyten in Abhängigkeit von der Osmolarität (mOsm) der Lösung, in der sich die Erythrozyten befinden.

3.5. Beladung von Erythrozyten und white Ghosts mit den Modellsustanzen

Bei der Beladung des Zellinneren der Erythrozyten mit den Modellsustanzen fanden FITC-BSA (66kDa) und FITC-Dextran (77kDa) Verwendung. Diese eignen sich als Modellsustanzen, da sie zum einen keine toxischen Effekte auf die Zellen aufweisen und zum anderen aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage sind, die Zellmembran durch einfache Diffusion zu überwinden [40]. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von FITC-Albumin und

FITC-Dextran als Modellsubstanzen liegt in den einfach durchzuführenden Untersuchungsmöglichkeiten mittels CLSM und Durchflusszytometrie.

Die Beladung der Blutzellen, wie unter 2.2.2.3. und 2.2.2.4. beschrieben, mit diesen Modellsubstanzen erfolgte mit dem Ziel, die Beladungsprozedur zu optimieren und die Eignung von BSA und Dextran als Makromoleküle zur Kopplung an das Zytostatikum 5-FU zu bestätigen. Dabei wurde untersucht, welche Osmolarität der Inkubationslösung zum größten Beladungserfolg führte. Weiterhin wurde im FITC-BSA-Experiment ermittelt, ob native Erythrozyten oder white Ghosts effizienter mit den Makromolekülen beladen werden können. Zudem wurde in einem Versuch mit FITC-Dextran untersucht, ob eine hypotone Vorlyse das Beladungsergebnis steigert.

3.5.1. Beladung mit FITC-Albumin

Die durchflusszytometrische Untersuchung der fluoreszierenden Zellen zeigte sowohl bei den Erythrozyten als auch bei den verwendeten white Ghosts deutliche Unterschiede im Beladungserfolg der vier unterschiedlich osmolaren Gruppen (270mOsm, 140mOsm, 70mOsm und 40mOsm).

Die höchste Beladungseffizienz erreichte bei den Erythrozyten die Gruppe, deren Beladungsmolarität bei 70mOsm lag. Hier wurde bei 99,6% der Zellen eine Fluoreszenzintensität mit einem F_{Median} von mehr als 3200rel.E. erreicht. Obwohl die Versuchsgruppe mit einer Beladungsmolarität von 140mOsm noch deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten erreichte, wurden dort insgesamt weniger Zellen beladen und die Beladung war inhomogener.

Bei der Beladung der white Ghosts erreichte die Gruppe mit einer Osmolarität von 140mOsm den größten Beladungserfolg. Dabei wurden 25% der Zellen mit einer Fluoreszenzintensität beladen, deren F_{Median} bei 762rel.E. lag. Native, unbeladene Erythrozyten dienten als Negativkontrolle und zeigten eine geringe Autofluoreszenz mit einer Fluoreszenzintensität bei einem F_{Median} von 122rel.E. bei 0,2% der Zellen. Alle Werte der Fluoreszenzintensitäten und Variationskoeffizienzen wurden sowohl für die Erythrozyten als auch für die white Ghosts im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tab. 6 und 7).

Ergebnisse

Tabelle 6: Mittelwerte \pm Standardabweichung der Menge an beladenen Zellen (Events [%]), des Median der Fluoreszenzintensität (F_{Median} [rel.E.]) und des Variationskoeffizienten der Fluoreszenz (CV) FITC-HSA beladener Erythrozyten in Abhängigkeit von der Osmolarität der Inkubationslösung.

Probe	Events [%]	F_{Median}[rel.E.]	CV
NK	0,2	122	15,7
270 mOsm	25,1	170	297,7
140 mOsm	56,8	5670	92,6
70 mOsm	99,6	3254	39
40 mOsm	97,3	3642	52,4

Tabelle 7: Mittelwerte \pm Standardabweichung der Menge an beladenen Zellen (Events [%]), des Median der Fluoreszenzintensität (F_{Median} [rel.E.]) und des Variationskoeffizienten der Fluoreszenz (CV) FITC-HSA beladener white Ghosts in Abhängigkeit von der Osmolarität der Inkubationslösung.

Probe	Events [%]	F_{Median}[rel.E.]	CV
NK	0,2	181	264,9
270 mOsm	21,3	472	223,8
140 mOsm	25,1	762	220,8
70 mOsm	24,7	580	201,1
40 mOsm	26,1	590	185,1

Die homogene und effiziente Beladung wird auch in der im Folgenden exemplarisch dargestellten CLSM-Aufnahme deutlich (Abb. 22).

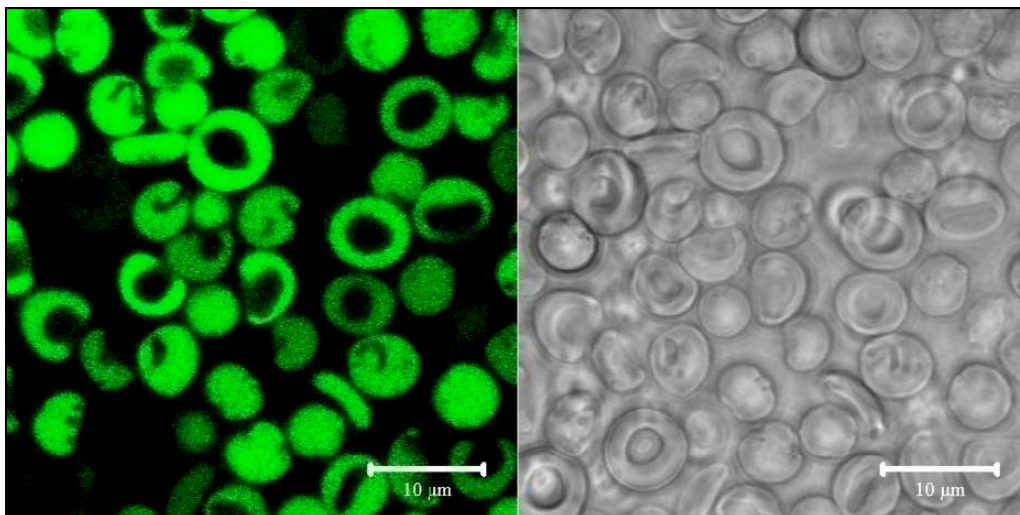


Abbildung 22: CLSM-Bild: FITC-Albumin beladene Erythrozyten. Inkubation mit FITC-Albumin erfolgte bei 70mOsm. Links: FITC-Kanal, Rechts: Durchlicht-Kanal. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsobjektiv nach Anregung mit einem Argonlaser (488nm).

3.5.2. Beladung mit FITC-Dextran

Das Betrachten der durchflusszytometrisch ermittelten Ergebnisse der FITC-Dextran beladenen Erythrozyten zeigte signifikante Unterschiede in Bezug auf das Durchführen einer Vorlyse bei 160mOsm vor der eigentlichen Beladung mit der Modellsubstanz bei 70mOsm.

Die Anwendung der Inkubationsmethode, welche das vorangestellte hypotone Vorschwellen beinhaltet, führte zur Beladung der Mehrheit der eingesetzten Zellen. Hierbei wurde nicht nur ein doppelt so hoher Beladungserfolg erzielt, es wurden auch zweimal so viele Zellen, verglichen mit der Gruppe ohne Vorlyse, beladen. Die folgende Tabelle 8 führt alle Werte der Beladungsmenge, Fluoreszenzintensität und Streuung der Werte (CV) auf und verdeutlicht die vorliegenden Ergebnisse. Als Negativkontrolle dienten native, unbeladene Erythrozyten. Diese zeigten lediglich eine geringe Autofluoreszenz.

Tabelle 8: Mittelwerte \pm Standardabweichung der Menge an beladenen Zellen (Events [%]), des Median der Fluoreszenzintensität (F_{Median} [rel.E.]) und des Variationskoeffizienten der Fluoreszenz (CV) FITC-Dextran beladener Erythrozyten ohne und mit Vorlyse bei 160mOsm und folgender Inkubation bei 70mOsm.

Probe	Events [%]	F_{Median} [rel.E.]	CV
NK	0,2	19,2	162
Ohne Vorlyse	42,12 \pm 21,92	1336,87 \pm 73,97	62,58 \pm 11,5
Mit Vorlyse	85,01 \pm 9,85	2178,2 \pm 169,63	63,39 \pm 4,08

Ergebnisse

Die nachfolgend aufgeführten CLSM-Bilder veranschaulichen die Auswirkungen auf die morphologischen Eigenschaften der Carrier-Erythrozyten durch die Beladungsprozedur in Abhängigkeit von der Durchführung des Vorschwellens. Hierbei ist zu erkennen, dass die Vorlyse zwar zu einer deutlich höheren Beladungseffizienz und einer größeren Menge an beladenen Zellen führt (vergleiche Tab. 8), dabei allerdings zugleich deutlich mehr Echinozyten und mikrozytäre Carrier entstehen.

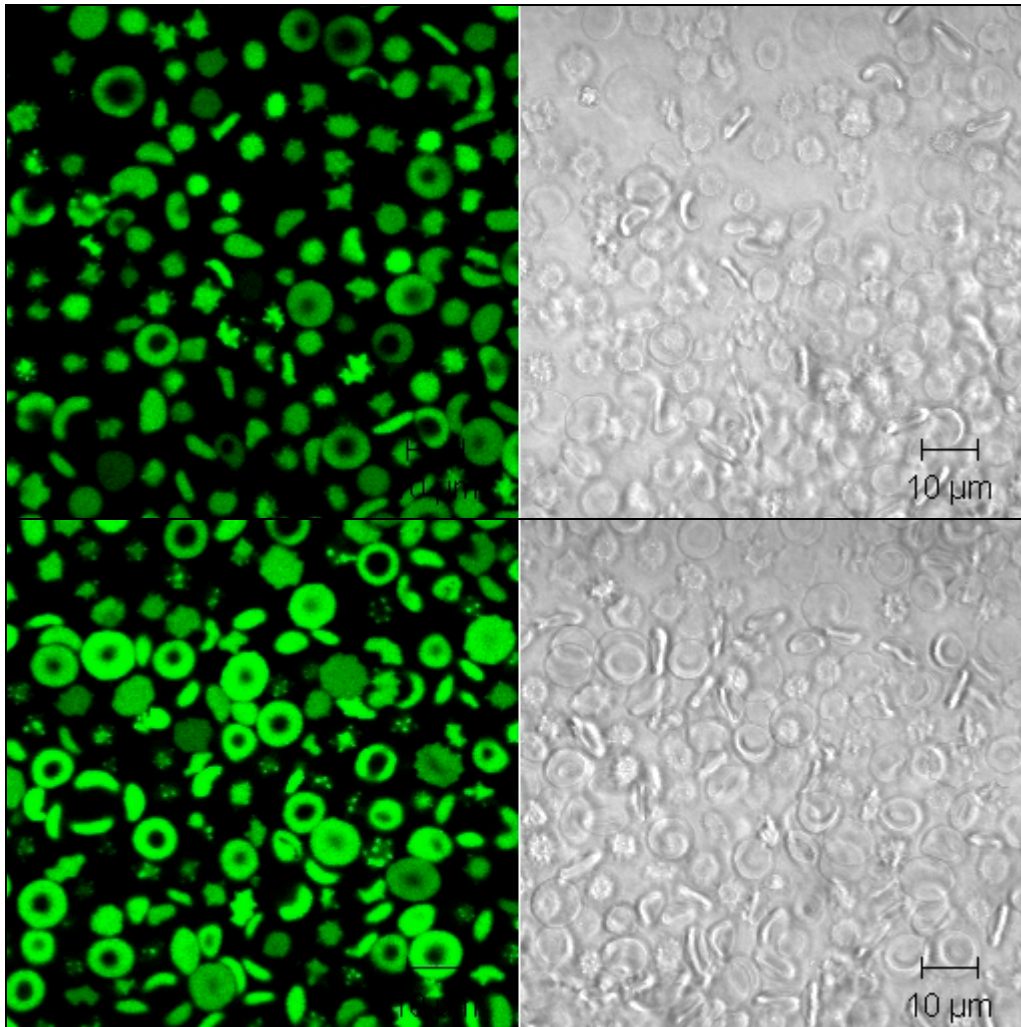


Abbildung 23: CLSM-Bild: FITC-Dextran beladene Erythrozyten. Die Inkubation bei 70mOsm. Links: FITC-Kanal. Rechts: Durchlicht-Kanal. Oben: Zusätzliche vorangestellte Vorlyse mit 160mOsm Schweltpuffer. Unten: Ohne Vorlyse. Aufgenommen mit einem 100 x Ölimmersionsoobjektiv nach Anregung mit einem Argonlaser (488nm).

4 Diskussion

Mit dem Ziel, Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms effizienter und nebenwirkungsärmer zu therapieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Grundlagen geschaffen, Carrier-Erythrozyten für den Transport des Chemotherapeutikums 5-FU zur Leber einzusetzen. Voruntersuchungen bezüglich einer Beladung der Carrier mit dem freien Wirkstoff bestätigten, dass 5-FU ein membrangängiges Molekül und in seiner freien Form nicht geeignet zur Beladung von Erythrozyten ist [15].

Daher wurde die Substanz an die nicht membrangängigen und gesundheitlich unbedenklichen Makromoleküle Dextran und Latex-Nanopartikel gekoppelt. Anschließend wurden die hergestellten Zytostatika-Makromolekülkonjugate im Hinblick auf ihre proliferationshemmende Wirkung in der Zellkultur an Kolonkarzinomzellen untersucht.

Ziel ist es, eine gelungene Kopplung von 5-FU an die genannten Makromoleküle unter Einbeziehung aller Ergebnisse nachzuweisen. Des Weiteren wird die antiproliferative Wirksamkeit der Zytostatikakonjugate beurteilt sowie die effizienteste Beladungsprozedur diskutiert. Darüber hinaus soll betrachtet werden, wie das Makromolekül-gekoppelte, in Carrier-Erythrozyten verkapselte 5-FU zu den malignen Zellen in der Leber gelangt. Abschließend werden die bedeutendsten Ergebnisse zusammengetragen, welche ein erfolgreiches Drug-Targeting mittels 5-FU-beladener Carrier-Erythrozyten ermöglichen sollen.

4.1. Vorversuche zur Beladung mit 5-FU als Monosubstanz

Die chromatographische Untersuchung der Wirkstoffspiegel in den Überständen und Lysaten beladener Erythrozyten entsprechend der unter 2.2.2.5. beschriebenen Beladungsprozedur diente der näheren Einschätzung der Effizienz hinsichtlich einer Beladung von Carrier-Erythrozyten mit 5-FU, der intrazellulären Verweildauer des Wirkstoffes sowie der maximal erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen in den Erythrozyten.

Zu diesem Zweck wurden vier Freisetzungsversuche (V1-V4) durchgeführt. Dabei wurden in einem ersten Versuch (V1) die 5-FU-Konzentrationen beladener white Ghosts nach ein- bis sechsmaligem Waschen bestimmt. In den weiteren Versuchen (V2-V4) wurden die Wirkstoffspiegel beladener white Ghosts und Erythrozyten in Abhängigkeit von der Zeit nach Beladung quantitativ analysiert.

Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde berücksichtigt, dass sich die Inkubationskonzentrationen von 5-FU in den Versuchen unterschieden ($5\text{-FU}_{V1, V4} = 5\text{mg/ml}$;

5-FU_{v2, v3} = 10mg/ml) und für die graphische Darstellung auf eine gemeinsame Inkubationskonzentration von 10mg/ml normiert.

4.1.1. Intrazelluläre Verweildauer

Die Analyse der zeitabhängigen Konzentrationsverläufe des Wirkstoffes zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Überständen und Lysaten der beladenen Zellcarrier. Daraus lässt sich ein unverzügliches Passieren von 5-FU über die Carrier-Membran in Richtung des niedrigeren chemischen Potentials schlussfolgern. Die Ursache für das schnelle Überwinden der Zellmembran ist multifaktoriell begründet. Zum einen ist Fluorouracil mit einer molaren Masse von 130,08g/mol ein sehr kleines und außerdem hydrophobes Molekül, was ihm eine problemlose Passage von Lipidmembranen ermöglicht [97]. Darüber hinaus führt die Inkubation mit den verwendeten 5-FU-Konzentrationen von 5-10mg/ml bereits nach einer fünfminütigen Expositionsdauer zu Störungen in der Membranstruktur und Echinozytose. Ursächlich dafür sind eine Alkalisierung des intrazellulären pH-Wertes sowie Kalium-Depletion [15, 98]. Des Weiteren führt die zur Erythrozytenbeladung angewandte Prozedur der hypotonen Hämolyse zu irreversiblen Schädigungen und Öffnungen in der Erythrozytenmembran [48]. Aufgrund der Membrangängigkeit des Wirkstoffes ist die Beladung von Erythrozyten mit 5-FU als freiem Wirkstoff zum Lebertargeting nicht geeignet. Diese Erkenntnis führte zu der Schlussfolgerung, dass Fluorouracil in einem der Erythrozytenbeladung vorangestellten Schritt an geeignete Makromoleküle gekoppelt werden muss, um ein Überwinden der Carrier-Membran zu verhindern.

4.1.2. Gegenüberstellung der verschiedenen Carrier

Erythrozyten können durch Zentrifugation aus Vollblut separiert werden. Im Gegensatz dazu ist die Herstellung von white Ghosts, wie unter 2.2.1. beschrieben, sehr viel zeitaufwendiger. Während Erythrozyten, in Abhängigkeit von der Beladungsprozedur, ihre natürliche bikonkave Form nach der Beladung zu einem Großteil wieder einnehmen, sind white Ghosts nur noch Erythrozytenmembranen, die jegliches Hämoglobin und alle übrigen Zellbestandteile verloren haben. Sie weisen eine gestörte Membranstruktur auf und werden daher überdurchschnittlich schnell durch das Retikulo-Endotheliale-System phagozytiert. Dementsprechend weisen sie eine deutlich verkürzte Überlebenszeit auf [47, 48]. Diese Eigenschaft ist für ein Drug-Targeting mit dem Bestimmungsort RES durchaus vorteilhaft, ermöglicht jedoch kein differenziertes Targeting zu den leberspezifischen Makrophagen des RES.

4.1.3. Beladungserfolg

Die maximale Wirkstoffkonzentration in den Carriern von höchstens 7% der Inkubationskonzentration lag nur wenig unter jener, die durch andere erreicht wurde (10%) [15, 17]. Grundsätzlich ist die Methode der hypotonen Hämolyse die schnellste und einfachste Methode, um Carrier mit niedermolekularen Substanzen zu beladen. Ein großer Nachteil ist die niedrige Beladungseffizienz von nur 1-10% der eingesetzten Substanz.

Nach erfolgreicher Kopplung an die ausgewählten Makromoleküle sollte eine effizientere Beladungsprozedur in Betracht gezogen werden, da weniger 5-FU in der Verbindung mit den Makromolekülen vorliegt, als dies bei einer Beladung mit der Monosubstanz der Fall wäre.

Für die Erythrozytenbeladung mittels hypotoner Dialyse sind Beladungserfolge von bis zu 50% bei einer Beladung mit wasserlöslichen Enzymen oder Glykolipiden beschrieben worden [47, 65]. Darüber hinaus kann bei dieser Methode aufgrund der geringen Belastung eine physiologische Lebensdauer der reinjizierten Carrier-Erythrozyten erreicht werden [48]. Eine lange Überlebenszeit der Erythrozyten und ein dadurch ermöglichter langer Freisetzungszeitraum des Wirkstoffes in das gewünschte Gewebe sind von außerordentlicher Bedeutung für die optimalen Bedingungen in der Behandlung von Lebermetastasen des Kolonkarzinoms. Für eine hohe therapeutische Effizienz mit möglichst geringen Nebenwirkungen sind niedrige 5-FU-Konzentrationen über einen langen Zeitraum die wichtigste Voraussetzung [82].

4.2. Modifikation von 5-FU und Kopplung an Makromoleküle

Die sehr kurze intrazelluläre Verweildauer von 5-FU nach Erythrozytenbeladung mittels hypotoner Hämolyse führte zu dem Schluss, den Wirkstoff vor einer Carrier-Beladung an geeignete Makromoleküle zu koppeln. Hierfür wurden Dextran und EPS 4-Polymerpartikel ausgewählt. Beide Substanzen sind wegen ihrer Größe nicht in der Lage, die Erythrozytenmembran zu passieren. Sie zeigen keinerlei toxische Auswirkungen auf Zellen und sind vollständig biologisch abbaubar. Darüber hinaus eignen sich die genannten Substanzen sowohl zur Kopplung an den modifizierten Wirkstoff als auch zur Erythrozytenbeladung [82, 99, 100].

Für die Bindung von 5-FU an Dextran sowie Nanopartikel wurde der Wirkstoff zuvor mit einer kopplungsfähigen funktionellen Gruppe ausgestattet. Diese Umwandlung zu Fluorouracil-Essigsäure wurde anhand der UV/VIS-Spektren beider Wirkstoffe sowie NMR-spektroskopisch analysiert. Die Ergebnisse der genannten Untersuchungen werden im

Folgenden erörtert. Im Weiteren wird die Kopplung von FUAC an Dextran und Nanopartikel anhand von NMR-spektroskopischen und elektrophoretischen Untersuchungen diskutiert.

4.2.1. Umsetzung von 5-FU zu FUAC

Der Wirkstoff 5-FU wurde mit dem Ziel zu FUAC umgesetzt, ihn mit einer kopplungsfähigen funktionellen Carboxyl-Gruppe für eine feste, chemische Verknüpfung mit Polymerpartikeln und Dextran auszustatten. Diesbezüglich wurde von vornherein die Carbodiimid-Methode in Betracht gezogen [82].

Die UV/VIS-Spektren von 5-FU und FUAC zeigen in einem Wellenlängenbereich von 190-350nm, wie in Abbildung 13 dargestellt, eine Verschiebung um etwa 60nm. Das lässt auf die vollständige Umsetzung von 5-FU zu FUAC schließen, da die Lichtabsorption in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen erfolgt. Es handelt sich augenscheinlich um zwei unterschiedliche Substanzen, die auseinander hervorgegangen sind.

Eine zur Strukturaufklärung des FUAC durchgeführte ^{13}C -NMR-Spektroskopie untermauert das Gelingen der Umsetzung von 5-FU zu FUAC (Abb. 24). Das NMR-Spektrum eines 5-FU-Chloressigsäure-Gemisches sähe genauso aus wie die FUAC-Lösung. Jedoch ist 5-FU in deuteriertem Wasser kaum löslich, wodurch nicht die 1:1-Verhältnisse zwischen der Ringstruktur und dem aliphatischen Substituenten vorlägen, die sich in diesem Spektrum deutlich zeigen.

Ebenso sprechen für das Vorliegen von FUAC als einheitliche Substanz die gute Löslichkeit in warmen Wasser oder schwacher Lauge und das reproduzierbare Ausfallen beim Abkühlen der Lösung auf Raumtemperatur bzw. ein Auflösen des Niederschlags beim Erwärmen auf 30-33°C. Darüber hinaus zeigt der direkte NMR-spektroskopische Vergleich beider Substanzen (Abb. 14) anhand der chemischen Verschiebung der Spektren eine vollständige Umsetzung. Alle betrachteten Ergebnisse belegen das Gelingen der angestrebten Umsetzung von 5-Fluorouracil zu FUAC.

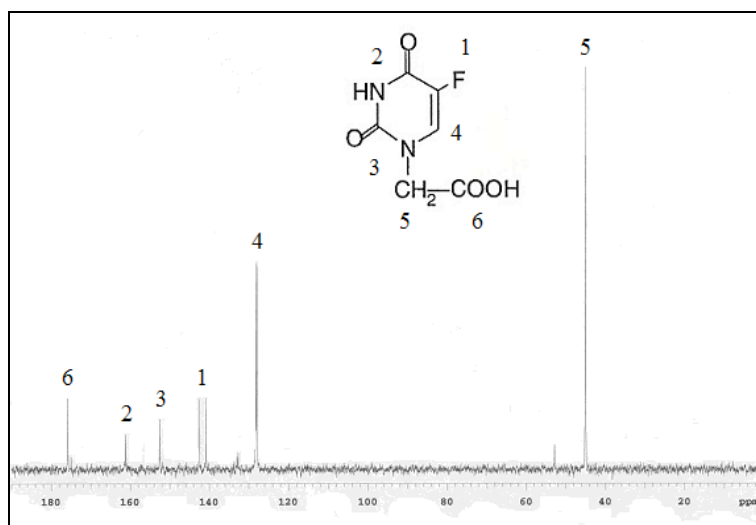


Abbildung 24: ¹³C NMR-Spektrum von FUAC. Dargestellt ist die chemische Verschiebung (δ in ppm) der einzelnen Strukturelemente des FUAC entsprechend seiner Strukturformel, oben im Bild dargestellt.

4.2.2. Bildung von FUAC-Makromolekülkonjugaten und deren Eigenschaften

4.2.2.1. FUAC-Dextran – Nachweis der Kopplung und Eigenschaften

Zum Nachweis einer gelungenen Kopplung von FUAC an Dextran wurden sowohl der Wirkstoff als auch das FUAC-Dextran-Konjugat mittels NMR analysiert. Der Nachweis einer erfolgreichen Kopplung von FUAC an die Nanopartikel wurde mittels Partikelelektrophorese erbracht. Die Ergebnisse sind unter 3.2.2. und 3.2.3. sowie in den Abbildungen 15-17 dargestellt.

Der Unterschied in der chemischen Verschiebung zwischen FUAC und FUAC-Dextran von 0,8ppm (Abb. 15) in den ¹⁹F-NMR-Spektren beweist die gelungene Konjugation mit Dextran. Das ¹H-NMR-Spektrum des FUAC-Dextran-Komplexes (Abb. 16) zeigt eine Esterbindung zwischen Wirkstoff und Makromolekül und entspricht den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen [82].

Zum besseren Verständnis der einzelnen Syntheseschritte vom freien Wirkstoff 5-FU über FUAC zum Wirkstoffkonjugat mit Dextran ist die durch Dr. C. Cadicamo⁷ modifizierte Methode nach Hao et al. [82] in Abbildung 25 dargestellt.

⁷ AG Prof. Dr. Koksche, Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin

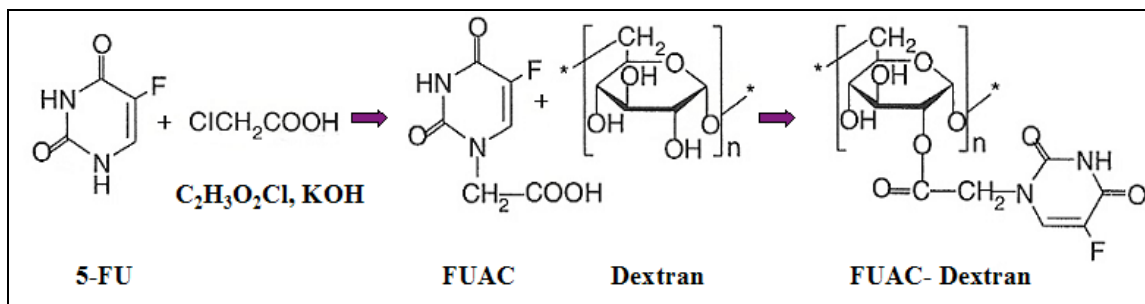


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Umwandlung von 5-Fluorouracil mit Chloressigsäure (C₂H₃O₂Cl) in Anwesenheit von Kaliumhydroxid (KOH) zu Fluorouracil-Essigsäure (FUAC) und anschließende Kopplung an Dextran zum Wirkstoff-Makromolekülkomplex FUAC-Dextran [82].

Dextran besitzt viele Hydroxylgruppen und kann theoretisch direkt mit Carboxylgruppenhaltigen Substanzen verestert werden. Die meisten dieser Dextrankonjugate reagieren als polymere Prodrugs und zeichnen sich durch eine verlangsamte Freisetzung des entsprechenden Wirkstoffes aus. Darüber hinaus werden Pharmakodynamik, Nebenwirkungsprofil und Immunogenität positiv beeinflusst [101]. Verbunden mit einer zusätzlichen Verkapselung der FUAC-Dextrankomplexe in Carrier-Erythrozyten als Zytostatika-Langzeitreservoir ist eine wirkungsvolle zytostatische Tumorthherapie mit deutlich weniger systemischen Nebenwirkungen denkbar.

In der Vergangenheit wurden Dextranlösungen als Plasmaexpander verwendet, wobei verschiedene Gerinnungsstörungen auftraten [102]. Ursache dafür ist die Adsorption von Dextran an Thrombozyten. Eine auftretende Hemmung der Gerinnung wäre eine denkbare Kontraindikation für einen Therapieansatz mit freiem FUAC-Dextran und könnte durch die Beladung in Carrier-Erythrozyten vermieden werden.

In einem Review von Mehvar über die Verwendung von Dextranen zum Transport therapeutischer sowie bildgebender Substanzen ist beschrieben, dass die Kopplung von Chemotherapeutika an Dextrane zu einer verlängerten Halbwertszeit im Blutkreislauf führt, was vor allem von Vorteil für die phasenspezifischen Substanzen, zu denen auch 5-Fluorouracil gehört, ist [101]. Weiterhin wurde eine Akkumulation im Tumorgewebe für an Dextran gebundene Substanzen beschrieben. Pharmakodynamisch führt die Kopplung eines Zytostatikums an Dextran zu einer Steigerung der therapeutischen Effektivität sowie einer Reduktion der Toxizität. Auch kommt es zu einer verzögerten Freisetzung des entsprechenden Wirkstoffes und zu einer Minderung der Immunogenität der verwendeten Medikamente. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ist Dextran ein geeignetes und vielversprechendes

Makromolekül für die Kopplung an ein bedeutendes Zytostatikum in der Therapie gastrointestinaler Tumoren und ihrer Metastasen.

4.2.2.2. FUAC-Nanopartikel – Nachweis der Kopplung und Eigenschaften

Aus der Titrationskurve (Abb. 17) der ungekoppelten EPS 4-Polymerpartikel ließ sich ableiten, dass die große Anzahl an Carboxylgruppen die Säure-Base-Reaktion zwischen pH 5,5 und pH 9,5 abpufferten. Dies zeigte sich in der konstanten Mobilität bei Änderung des pH-Wertes.

In der Kurve der EPS 4-FUAC-Partikel ist zu sehen, dass bei geringerer Überschussladung die Mobilität entsprechend kleiner ist. Im sauren Bereich, unterhalb von pH 3,4, ermöglicht die basische FUAC-Ringstruktur die Änderung der Oberflächenladung der Partikel von minus nach plus, wodurch die gekoppelten Partikel die Wanderungsrichtung wechseln. Dagegen zeigen die ungekoppelten Partikel nur eine Bewegungsrichtung im elektrischen Feld. Diese Ergebnisse lassen sich als Nachweis für eine gelungene Kopplung interpretieren.

Bei der Verwendung von Nanopartikeln im Krebszelltargeting können sowohl über aktives als auch passives Targeting höhere Konzentrationen antineoplastisch wirksamer Medikamente am Tumorort und geringere Toxizität in gesundem Gewebe erreicht werden.

Für das aktive Krebszelltargeting werden die Nanopartikel an Tumorrezeptoren gekoppelt. Diese führen zu einer Rezeptor-vermittelten Endozytose und anschließender intrazellulärer Freisetzung des Wirkstoffes in der Tumorzelle. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Kopplung von Antikörpern gegen spezielle Tumorepitope an die Nanopartikel. Als Beispiele können die Kopplung von Folat oder Folatrezeptor-Antikörpern genannt werden, wie sie in der Therapie des Ovarialkarzinoms Verwendung finden. Dabei kommt es aufgrund einer Überexpression des Folatrezeptors zu einer gesteigerten Aufnahme der Medikamenten-gekoppelten bzw. beladenen Nanopartikel im Vergleich zu ungeschädigtem Gewebe [103].

Das passive Targeting erfolgt über undichte Tumorgefäße und anschließende Diffusion. Hierfür ist das grundlegende Verständnis der Tumorangiogenese Voraussetzung. Ab einer Tumorgöße von 1-2mm³ reicht die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung über Diffusion aus dem angrenzenden Gewebe nicht mehr aus. Durch die Produktion angiogener Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF, folgt eine tumorgerichtete Neubildung von Gefäßen. Dabei kommt es durch die schnelle Endothelzellproliferation zu dünnen und großporigen Tumorgefäßen mit abnormalen Verzweigungen. Diese sind aufgrund von Basalmembranabnormalitäten undichter als normale Gefäße. Die transzellulären

Diskussion

Fenestrierungen besitzen statt 5-10nm bei physiologischen Tight Junctions eine Größe von 100-780nm [103]. Aufgrund dieser undichten Gefäße kommt es durch den sogenannten EPR-Effekt (EPR = enhanced permeability and retention) über die gesteigerte Permeabilität zu einer Akkumulation des Wirkstoffes im Tumorinterstitium. Aus einem schlecht organisierten lymphatischen Abfluss resultieren erhöhte Retentionszeiten der Substanzen vor Ort, wodurch eine Diffusion in die Krebszellen begünstigt wird [103].

Nach intravenöser Applikation von Carrier-Nanopartikeln kommt es zu einer schnellen Ansammlung in der Leber und in geringem Maße auch in anderen RES-haltigen Organen. Daher ist eine Immun-escape-Modifikation, zum Beispiel durch Pegylierung oder Beladung von Carriern, notwendig, sofern kein Leber- bzw. RES-Targeting erwünscht ist [75].

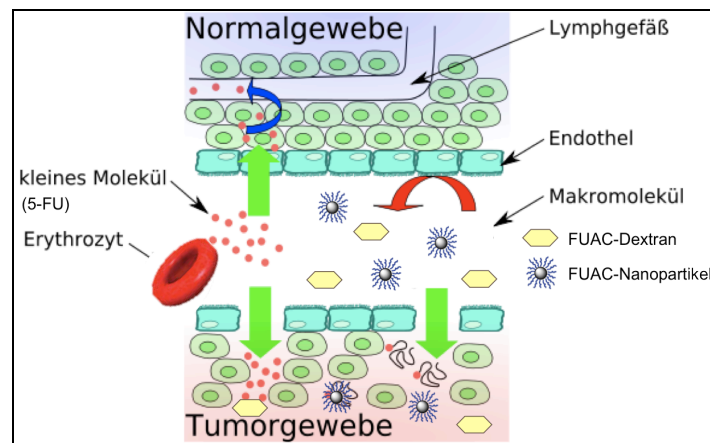


Abbildung 26: EPR-Effekt. Dargestellt ist die Akkumulation der FUAC-Konjugate im Tumorgewebe.

In einer Arbeit von Hamidi aus dem Jahr 2010 wurde mittels Valproat-beladener Nanopartikel, welche in Erythrozyten als Drug-Carrier beladen wurden, eine verzögerte Wirkstofffreisetzung über einen Zeitraum von drei Wochen erreicht [99]. Es wurde die neuartige Strategie der Erythrozytenbeladung mit Makromolekül-gekoppelten Wirkstoffen statt freien Wirkstoffen beschrieben, die auch in der vorliegenden Arbeit diskutiert wird. Hierdurch gelang es, den schnellen Ausstrom lipophiler und kleiner Substanzen aus den Carriern, eine der größten Einschränkungen der Carrier-Erythrozyten im Medikamententransport, zu überwinden. Dies gelang durch die Verwendung natürlich vorkommender Chitosan-Polymerpartikel. Ihr größter Vorteil liegt in der Fähigkeit, Kapillarendothel zu überwinden, in Gewebe zu gelangen und durch Zellen aufgenommen werden zu können. Die von Hamidi durch inotrope Gelbildung hergestellten Nanopartikel besitzen eine Größe von 60-75nm. Das verwendete Antiepileptikum Valproat diente als Modellsubstanz für Moleküle, die aufgrund ihrer geringen Größe sowie Lipophilität

Erythrozytenmembranen sehr schnell überwinden. Der Wirkstoff wurde mit einer Beladungseffizienz von ca. 7% in den Nanopartikeln verpackt. Die Pharmakokinetik des hergestellten Valproat-Nanopartikelkonjugates kann nur anhand präklinischer Studien beschrieben werden und unterscheidet sich sehr von jener der freien Substanz. Die Erythrozytenbeladung mit den Valproat-Nanopartikeln erfolgte mittels hypotoner Dialyse mit einem Beladungserfolg von ca. 45%. Die beladenen Carrier-Erythrozyten ließen durch die schonende Beladungsprozedur keine strukturellen Unterschiede zu normalen Erythrozyten erkennen [99].

4.3. Antiproliferative Wirksamkeit der Wirkstoff-Makromolekülkomplexe

Nach erfolgreicher Umsetzung des Wirkstoffes 5-Fluorouracil zu FUAC und gelungener Kopplung an die Makromoleküle Dextran und EPS 4-Polymerpartikel wurden die Wirkstoffkomplexe auf ihre zytostatische Wirkung hin untersucht. Dazu wurden drei Zellkulturversuche an Kolonkarzinomzellen der Zelllinie CC531 über eine Dauer von vier Tagen durchgeführt. Hierbei wurden die Krebszellen in RPMI 1640-Medium kultiviert, welchem je nach untersuchtem Wirkstoff bzw. Wirkstoffkonjugat die untereinander entsprechende Menge der Substanzen beigefügt worden war.

Es zeigte sich in der Zellzählung sowie im MTT-Zellwachstumstest eine deutliche, jedoch im Vergleich zu den freien Wirkstoffen reduzierte proliferationshemmende Wirksamkeit der FUAC-Makromolekülverbindungen. Eine signifikante Hemmung des Zellwachstums wurde bei FUAC-Dextran nach drei Tagen, bei FUAC-Nanopartikeln bereits nach zwei Tagen erreicht (vergleiche Abb. 19 und 20). Der weniger ausgeprägte Unterschied in der MTT-Messung lässt sich, verglichen mit der Zellzählung, auf eine niedrigere Sensibilität des Proliferationstestes zurückführen (unter 2.1.5. beschrieben).

Grund für die niedrigere antiproliferative Wirkung, gemessen an den wachstumshemmenden Eigenschaften des freien 5-FU, ist die angestrebte verzögerte Freisetzung des Wirkstoffes aus der Verbindung mit den Makromolekülen. Es ist zu erwarten, dass bei einem länger gewählten Versuchszeitraum die Wirksamkeit weiter ansteigen und sich im Laufe der Zeit jener des freien Wirkstoffes annähern würde. Eine zu langsame Freisetzung und damit verbundene unzureichende Konzentration von 5-FU im Lebergewebe ist nicht zu befürchten, da die FUAC-Dextran- und Nanopartikelkonjugate zwar in saurem Milieu sehr stabil sind, in neutraler Umgebung den Wirkstoff aber eher wieder freisetzen [101]. Aufgrund des gleichen zeitlichen Verlaufes der Wirksamkeitssteigerung bei den Dextran- und Nanopartikelkonjugaten kann

Diskussion

eine verzögerte Freisetzung von ähnlicher Dauer bei den FUAC-Polymerpartikeln erwartet werden. Für ein konkreteres Benennen des Zeitraumes, über welchen das Chemotherapeutikum aus der Verbindung mit den Makromolekülen abgegeben wird, sind weiterführende Wirkstoff-Freisetzungsanalysen Gegenstand aktueller Untersuchungen der AG Bäumler. Die HPLC ist eine diesbezüglich etablierte und geeignete Methode.

Insgesamt ist die Medikamentenkonzentration am Wirkungsort nicht nur von der Stabilität der Makromolekülverbindungen abhängig, sondern auch von der Geschwindigkeit, mit der die Komplexe aus den Carrier-Erythrozyten freigesetzt werden. Die Geschwindigkeit selbst wird durch die Zirkulationsdauer der beladenen Zellen im Körperkreislauf bis zur Phagozytose durch die Makrophagen der Leber beeinflusst. Eine physiologische Form und Flexibilität sind für ein erfolgreiches Lebertargeting notwendig, da morphologisch veränderte Zellen mit eingeschränkter Verformbarkeit in den engen Milztrabekeln hängen bleiben und von den Zellen des RES zerstört werden. Dabei käme es zu einem Austritt des Zytostatikums und zur Schädigung gesunden lienalen Gewebes.

Es ist zu vermuten, dass es sich bei dem langsam freigesetzten Wirkstoff um 5-FU statt FUAC handelt, welches ursprünglich über seine Carboxylgruppe an die Makromoleküle gekoppelt wurde. Dafür sprechen Beobachtungen, die Chung et al. an FUAC-Albumin-Verbindungen gesammelt hat [104].

Bei weiterführenden Zellkulturversuchen sollte ein längerer Versuchszeitraum von mindestens drei Wochen gewählt werden [99]. Darüber hinaus würde die Verwendung von dreidimensionalen Zellaggregaten, sogenannter Sphäroide, die Voraussetzungen eines soliden Tumors bzw. einer Metastase realistischer widerspiegeln und somit genauere Aussagen über die Proliferationshemmung durch die Wirkstoffkonjugate zulassen [102].

Von großem Interesse wären neben Untersuchungen zur Freisetzungskinetik des Wirkstoffes aus den Makromolekülkonjugaten und Carrier-Erythrozyten die maximal erreichbaren intrahepatischen 5-FU-Konzentrationen und Konzentrationsschwankungen im Tierversuch. Dabei sollte besonderes Augenmerk darauf gelegt werden, inwieweit die Verwendung von FUAC-Konjugat-beladenen Carrier-Erythrozyten bei Lebermetastasen des CRC durch verzögerte Freisetzung des Wirkstoffes über einen längeren Zeitraum zur Schädigung des gesunden Lebergewebes führt. Aufgrund einer Dosisabhängigkeit der hepatobiliären Toxizität von 5-FU sind relevante Schäden bei der längerfristigen Verwendung niedriger Dosen nicht zu erwarten [12].

4.4. Erythrozytenbeladung mit Modellsustanzen

Nachdem eine antiproliferative Wirksamkeit der Fluorouracil-Makromolekülkonjugate in der Zellkultur belegt werden konnte, wurde mit Hilfe der Modellsustanzen Albumin und Dextran die Eignung dieser Makromoleküle für eine Beladung in Carrier-Erythrozyten sowie die optimalen Beladungsbedingungen untersucht. Dabei wurde analysiert, welche Osmolarität der Inkubationslösung zum größten Beladungserfolg führt, ob native Erythrozyten oder white Ghosts effizienter mit Makromolekülen zu beladen sind und ob eine vorangestellte hypotone Vorlyse zu einer Steigerung des Beladungsergebnisses führt. Hierfür wurden an den fluoreszierenden Xanthenfarbstoff FITC gekoppeltes Albumin und Dextran verwendet und quantitativ mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Vorteile dieser Sustanzen wurden bereits unter 3.5. erörtert.

In den Ergebnissen (siehe Tab. 6-8 sowie Abb. 21 und 22) zeigte sich ein größtmöglicher Beladungserfolg bei der Verwendung einer Inkubationsosmolarität von 70mOsm. Die Beladung von Erythrozyten statt Ghosts sowie die Durchführung einer vorangestellten Vorlyse bei 160 mOsm führten zu einer höheren Beladungseffizienz.

Diese Ergebnisse müssen kritisch evaluiert werden. Es sollte bedacht werden, dass der Aufenthalt im Medium mit einer Osmolarität von 70mOsm zu irreversiblen Schäden in der Membranstruktur der Zellen führt und somit eine reduzierte Überlebenszeit zur Folge hat [48]. Dabei gestaltet es sich schwierig abzuwägen, ob ein größerer Wirkstoffgehalt mit kürzerer Lebensdauer der ihn beinhaltenden Carrier oder aber länger intakte Erythrozyten mit niedrigeren 5-FU-Konzentrationen den größeren Therapieerfolg hätten. Aufgrund der mit steigender Expositionsdauer (statt mit Höhe der Plasmakonzentration) zunehmenden Antitumoreffekte ist anzunehmen, dass eine Osmolarität der Inkubationslösung um 140 bis 150mOsm, bei welcher die Membranintegrität der Erythrozyten nicht zerstört wird, insgesamt betrachtet das größere Benefit mit sich brächte [48]. Dem gegenüber steht die Kenntnis eines größeren Leber- statt Milztargetings mit Zunahme des Zellschadens (siehe 4.5.) [105, 106].

Da die FUAC-Konjugate zu einer Akkumulation vorzugsweise im Lebergewebe führen, sollten die Erythrozyten bei der Beladung mit den Konjugaten ausschließlich als Langzeit-Zytostatikareservoir genutzt und eine möglichst lange Überlebens- und Zirkulationszeit angestrebt werden. Dementsprechend ist eine Osmolarität der Inkubationslösung um 150mOsm zu wählen.

Darüber hinaus sollte eine kürzere Inkubationsdauer als eine Stunde in Erwägung gezogen werden. In der Literatur ist ein bedeutend schnellerer Transport über die Zellmembran beschrieben [15]. Es ist anzunehmen, dass eine Dauer von 30min zur Beladung der Carrier ausreichend ist. Dieses Vorgehen würde aufgrund des kürzeren osmotischen Stresses die Erythrozyten schonen, der Erhaltung ihrer physiologischen Morphologie beitragen und somit eine möglichst lange Überlebenszeit fördern.

Neben dem höheren Beladungserfolg weisen Erythrozyten weitere überzeugende Vorteile gegenüber den white Ghosts auf, welche bereits unter 4.1.2. diskutiert wurden. Sie stellen zweifelsohne die geeigneteren Zellcarrier für das Drug-Targeting von Zytostatika zur Leber dar.

Die schrittweise Reduktion der Osmolarität durch ein Vorschwellen bei 160mOsm führte zu einer höheren Beladungseffizienz und einer größeren Menge an beladenen Zellen (vergleiche Tab. 8). Darüber hinaus zeigten sich nach einem zusätzlichen osmotischen Schwellungsschritt deutlich mehr Echinozyten und mikrozytäre Carrier. Formveränderte Erythrozyten werden durch das RES erkannt und zerstört, weswegen sie eine reduzierte Lebenserwartung haben. Hier müssen dieselben Abwägungen wie schon bei der Wahl der am besten geeigneten Osmolarität des Inkubationspuffers getroffen werden.

Ist eine weitere Modifikation der Zellen für ein spezifisches Lebertargeting geplant, spielt die Morphologie eine eher untergeordnete Rolle, da das Targeting mittels Modifikation und nicht durch Ausprägung des Zellschadens erreicht wird.

4.5. Spezifisches Lebertargeting

Um Carrier-Erythrozyten, die wie native Erythrozyten in allen Teilen des RES abgebaut werden, zum spezifischen Lebertargeting zu modifizieren, bestehen verschiedene Möglichkeiten. Dabei spielt die Größe des Zellschadens der Carrier-Zellen eine entscheidende Rolle. Bei geringfügigen Schädigungen kommt es hauptsächlich zu einer Akkumulation in der Milz, bei Überschreiten eines grenzwertigen Zerstörungsausmaßes hingegen steigt die Ansammlung des Wirkstoffes in der Leber überproportional an [105, 106].

Bei einem erfolgreichen Lebertargeting ist neben den Metastasen auch gesundes, nicht maligne entartetes Lebergewebe der wachstumshemmenden Wirkung von 5-FU ausgesetzt. Allerdings wurden bereits andere Zytostatika wie Methotrexat, Bleomycin oder Adriamycin mittels Carrier-Erythrozyten erfolgreich in experimentellen Tumoren im Tierversuch getestet und zeigten signifikante Vorteile im Vergleich zu der Applikation der freien Substanzen [48].

Diskussion

Weiterhin ist davon auszugehen, dass die Freisetzung des Wirkstoffes aus nicht modifizierten Carriern und aus der Bindung mit den Makromolekülen vermutlich über einen Zeitraum von mehreren Tagen bis Wochen vonstatten geht, so dass die Wirkstoffspiegel ein dauerhaft niedriges Niveau halten und daher nur wenige oder im besten Fall keine hepatischen Nebenwirkungen hervorrufen [99].

Eine Möglichkeit der Oberflächenmodifikation von Erythrozyten besteht in der Membranstabilisierung mittels Glutaraldehyd. Die hierdurch erreichte Verringerung der Verformbarkeit führt zu einer schnellen Aufnahme in das RES. Bei der Verwendung niedriger Glutaraldehyd-Konzentrationen kommt es vorzugsweise zu einer Akkumulation in der Milz; werden hohe Konzentrationen verwendet, wird ein bevorzugtes Lebertargeting erreicht [107]. Darüber hinaus führt die Behandlung mit Glutaraldehyd zu einer längeren Haltbarkeit der Carrier-Erythrozyten, einer größeren physikalischen Stabilität sowie verzögerten Freisetzung der eingekapselten Wirkstoffe. Dennoch handelt es sich bei Glutaraldehyd sowohl um eine toxische als auch in Untersuchungen in vitro als karzinogen eingestufte Substanz, die aus diesem Grund nicht die bevorzugte Methode eines spezifischen Lebertargetings darstellt [108].

Eine weitere Möglichkeit der Spezifizierung des Targetings zur Leber ist die Biotinylierung der Erythrozytenoberfläche mittels NHS-Biotin. Dabei nimmt mit der Steigerung des Biotinylierungsgrades auch das Lebertargeting zu [109]. Mishra und Jain [108] verwendeten succinyliertes Rinderserumalbumin als nicht-nucleophilen Träger für die Quervernetzung zwischen dem hydrophoben Biotin und der Erythrozytenmembran. Durch die Verwendung dieser Methode sollten Formveränderungen der Carrier-Erythrozyten, welche durch Interkalation von Biotin in die Zellmembran bei einer direkten Biotinylierung und Interaktion mit Membranproteinen entstehen, vermieden werden. Die Beladung der Carrier erfolgte mittels Druckwellen-Verdünnungsmethode und führte zu einem Beladungserfolg von annähernd 48% des zur Beladung verwendeten Methotrexat (MTX) bei einer Inkubationskonzentration von 5mg/ml. Eine Steigerung der zur Inkubation verwendeten MTX-Konzentration führte zu einer Reduktion des Beladungserfolges. Die angewandte Biotinylierungsprozedur führte wie erwartet zu keiner Veränderung der Erythrozytenmorphologie oder Lyserate. Anhand der Analyse der Glycerin-Lyse-Zeit (GLT₅₀), bei welcher die Zeit gemessen wird, bis 50% der Erythrozyten in einer standardisierten Glycerinlösung hämolysieren, konnte eine Zunahme der Stabilität biotinylierter Erythrozyten verglichen mit nicht biotinylierten Carrier-Erythrozyten gezeigt

werden. Diese Ergebnisse legen überzeugend dar, dass es sich bei dieser Methode um einen geeigneten Weg zum gezielten Lebertargeting handelt.

Eine weitere Methode, Carrier-Erythrozyten gezielt in die Leber zu transportieren, ist die Ankopplung von Antikörpern an die Erythrozyten. Dabei führt die Beschichtung mit IgG-Antikörpern durch spezifische Fc-Rezeptoren hauptsächlich zu einer Akkumulation in der Milz. Die Verwendung von IgM-Antikörpern hingegen führt über C3b-Oberflächenrezeptoren zur Ansammlung in der Leber [110, 111]. Aus früheren Arbeiten der AG Bäumler ist bekannt, dass die Beladungskapazität der Carrier-Erythrozyten durch eine Oberflächenbeladung mit Immunglobulinen nicht beeinträchtigt wird.

Eichler et al. [51] untersuchten in vivo die Kinetik von Gentamicin-beladenen Carrier-Erythrozyten. Die von ihnen beladenen Zellen besaßen, in Abhängigkeit von der injizierten Menge an beladenen Carriern, eine Halbwertszeit im Blutkreislauf von 13-35min. Dabei stieg die intrazirkuläre Halbwertszeit mit dem Volumen der injizierten Erythrozyten, was durch eine schnelle Sättigung des RES erklärbar ist. Dieser Effekt sollte besonders bei der Verwendung von Substanzen, die in der Lage sind die Membranen intakter Erythrozyten zu passieren, Beachtung finden. Hierbei empfiehlt sich die schrittweise Applikation kleiner Mengen beladener Zellen, um ein schnelles RES-Targeting zu erreichen.

4.6. Weg des Wirkstoffes von der Injektion zum Tumor

Die Wirkungsentfaltung der meisten Chemotherapeutika ist nicht nur auf Tumorzellen begrenzt, sondern erstreckt sich auch auf nicht entarteten Zellen. Aus diesem Grund ist eine geringe therapeutische Breite mit Hinnahme toxischer Nebenwirkungen in der systemischen Therapie unumgänglich [8]. Das spezifische Targeting zu einem Zielgewebe eröffnet aufgrund der Reduktion an unerwünschten Arzneimittelwirkungen die Möglichkeiten einer Prognoseverbesserung sowie positiven Beeinflussung der Lebensqualität während und nach einer Chemotherapie.

Es verbleibt die Frage, wie 5-FU im Anschluss an die Modifikation, Kopplung an die verwendeten Makromoleküle und Beladung in Carrier-Erythrozyten nach intravenöser Applikation die malignen Zellen in der Leber erreicht. Dass dies der Fall ist belegen verschiedene Studien, in denen Chemotherapeutika in Erythrozyten beladen zum Lebertargeting verwendet wurden. Hierbei zeigte sich als Maß für die Sicherheit ein

signifikanter Anstieg des therapeutischen Index. Darüber hinaus wurde ein Metastasenwachstum deutlich effektiver verhindert als durch die freien Substanzen [112, 113]. Bei der systemischen Applikation von Chemotherapeutika erreichen die Medikamente durch den kapillären Blutstrom die Tumorzellen. Dieser wird in der Leber durch die Lebersinusoiden gebildet, die in Abbildung 26 dargestellt sind. Die Sinusoide werden in der frühen, arteriellen Phase von der Arteria hepatica gespeist und in der portalen Phase der Durchblutung von der Vena portae. Dabei werden der Leber über die Leberarterie sauerstoffreiches, nährstoffarmes und über die Pfortader sauerstoffarmes, nährstoffreiches Blut zugeführt.

Nach der Gabe von Dextran- oder Nanopartikel-gekoppeltem FUAC gelangen diese Wirkstoffmakromolekülkonjugate über die genannten zuführenden Gefäße in die Leber. Dort überwinden sie das poröse Endothel der Tumorgefäße aufgrund transzellulärer Fenestrierungen und reichern sich über den EPR-Effekt, der unter 4.2.2. näher erläutert wurde, in den Tumorzellen an [103]. Die Wirkstoffkonjugate, welche nicht durch die Tumorgefäße fließen, gelangen in die Lebersinusoiden. Dort werden die FUAC-Konjugate durch die Kupffer-Sternzellen erkannt, phagozytiert und abgebaut. Das dabei freigesetzte 5-FU diffundiert aus den hepatischen Makrophagen in das Interstitium und von dort in die Leberzellen sowie in die malignen Zellen (siehe Abb. 26).

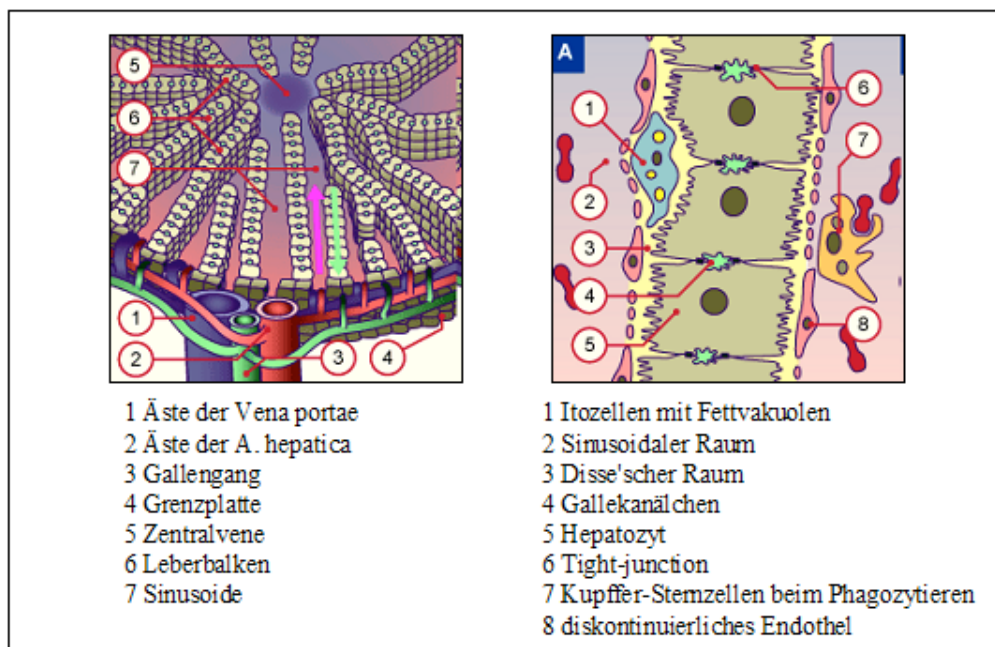


Abbildung 27: Histologischer Aufbau der Leber. Verändert nach [114].

Bei einer zusätzlichen Beladung der Makromolekülkonjugate in Carrier-Erythrozyten kommt es nach der intravenösen Applikation und Fluss in die Leber zu einem ähnlichen Verlauf. Allerdings sind die beladenen Erythrozyten aufgrund ihrer Größe nicht in der Lage die

Fenestrierungen der Tumorgefäße zu passieren. Sofern es zu einer Gefäßinvasion der Lebermetastase bzw. eines primären hepatischen Karzinoms oder es sich um intravaskuläre Tumorzellen in der Metastasierungskaskade handelt, wird ein direkter Kontakt der Carrier-Zellen mit dem Tumorgewebe möglich. Diese Voraussetzung kann man sich im Hinblick auf einen noch weitgehend unbekanntem Mechanismus, den zellulären Kannibalismus, zunutze machen. Hierbei handelt es sich um einen von Phagozytose oder Endozytose zu unterscheidenden Vorgang, der in vielen verschiedenen Malignitäten beschrieben wurde und scheinbar mit der Aggressivität der Neoplasie korreliert [115]. Dabei umschließen Krebszellen mit ihrem Zytoplasma vollständig kleinere Zellen unterschiedlicher Herkunft. Die aufgenommenen Zellen sterben vermutlich an einem Nährstoffmangel ab [115]. Dieser Prozeß ähnelt einem Treibsand-Mechanismus, bei dem es durch das Zusammenspiel verschiedener membranständiger Proteine zu einer plötzlichen Aufnahme von Substanzen kommt, welche die Krebszellmembran berühren [116]. Dieses Phänomen ereignet sich scheinbar selten und setzt einen direkten Zell-Zell-Kontakt voraus [117]. Marin-Padilla et al. beschrieben die Aufnahme und Verdauung von Erythrozyten durch maligne Zellen eines Mammakarzinoms. Sie schlußfolgerten, dass eine Schädigung der Erythrozytenmembran Voraussetzung für die Aufnahme der Blutzellen sei [118].

Die Beobachtung von T-Zell-Kannibalismus spricht für einen Immunescape-Mechanismus als Äthiogenese, da diese Zellen in der Immunantwort bei malignen Erkrankungen beteiligt sind. Hierdurch konnte eine signifikante Steigerung des Überlebens maligner Zellen in einem Milieu mit unzureichender Nährstoffversorgung gezeigt werden [116]. Außerdem wurde Kannibalismus durch Krebszellen in azidotischer Umgebung weitaus häufiger beobachtet als in pH-neutralem Milieu, was für eine Nährstoffversorgung durch die Verdauung fremder Zellen als ätiologische Theorie spricht.

In einer früheren Arbeit der AG Bäumlner wurde der zelluläre Kannibalismus von Erythrozyten durch Krebszellen im Hinblick auf ein mögliches Krebszelltargeting von Chemotherapeutika untersucht. Hierbei wurden Tumorantikörper gegen das epithelspezifische Antigen, welches auf einer großen Mehrzahl von Karzinomen exprimiert wird, an die Erythrozytenoberfläche gebunden. Es konnte gezeigt werden, dass die modifizierten Carrier-Erythrozyten an Krebszellen binden, durch diese aufgenommen werden und die Zell-in-Zell-Aufnahme durch eine PEGylierung der Erythrozyten gesteigert wird [119].

Modifizierte Carrier-Erythrozyten, die nicht durch den oben beschriebenen Kannibalismus in die Krebszellen aufgenommen werden, gelangen, wie zuvor für die FUAC-Konjugate beschrieben, in die Lebersinusoiden und werden dort durch Kupffer-Sternzellen phagozytiert.

Diskussion

Der freigesetzte Wirkstoff gelangt in das Interstitium und von dort in die Leber- und Tumorzellen.

Die Erläuterung des Weges der Konjugate und Carrier verdeutlicht, dass anhand dieser neuartig beladenen Erythrozyten als Drug-Carrier für 5-FU zur Therapie hepatischer Metastasen des Kolonkarzinom weiterhin kein ausnahmsloses Krebszelltargeting ermöglicht wird. Dennoch ist zu vermuten, dass in dem maligne entarteten Gewebe angesichts der verschiedenen Anreicherungswege und dem EPR-Effekt eine verhältnismäßig höhere Konzentration des Chemotherapeutikums als in gesunden Leberzellen erzielt wird. Darüber hinaus kann die eingesetzte Dosis an 5-FU durch ein effizientes Lebertargeting - ohne Wirkstoffverlust in andere Organe und konsekutiver Schonung dieser Gewebe - deutlich reduziert werden. Dadurch könnte auch die hepatobiliäre Toxizität vermindert werden, welche vor allem in einer biliären Sklerose besteht und sich nach Therapieende oft nicht ausreichend zurückbildet [12]. Weiterhin besteht in Anbetracht der höheren Teilungsrate neoplastischer Zellen eine größere Sensitivität auf Zytostatika. So wird wahrscheinlich mit entsprechend niedrigen Dosen über eine möglichst lange Expositionsdauer ein prognostisch vielversprechender therapeutischer Endpunkt bei voraussichtlich geringgradigen hepatobiliären Schädigungen zu erreichen sein. Die nachfolgende Skizze (Abb. 27) zeigt die Anreicherungswege der verschiedenen Wirkstoffkonjugate und Erythrozyten in der Leber sowie den Weg des freigesetzten Wirkstoffes in die Krebszellen.

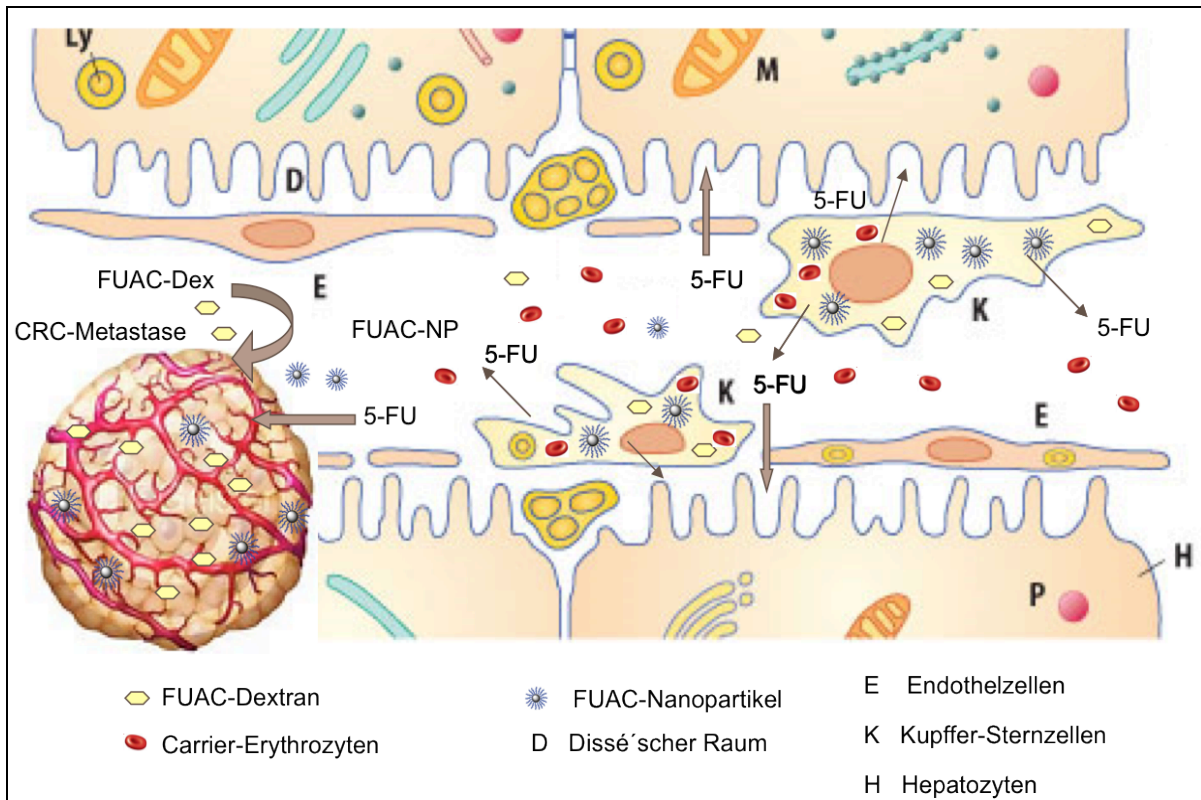


Abbildung 28: Schematische Darstellung des Weges der unterschiedlichen FUAC-Makromolekülkomplexe zu den Krebszellen einer Lebermetastase des Kolonkarzinoms. Hierbei gelangen FUAC-Dextran (FUAC-Dex) und FUAC-Nanopartikel (FUAC-NP) über die Endothelfenestrierungen der Metastase direkt in das Tumorgewebe. Dort wird der Wirkstoff über einen Zeitraum von Tagen bis Wochen freigesetzt. Die übrigen Konjugate und beladenen Erythrozyten werden von den Kupfer-Sternzellen phagozytiert und abgebaut. Das durch den Abbau innerhalb des hepatischen RES freigesetzte 5-FU gelangt in das Interstitium und von dort in das Tumorgewebe und die Hepatozyten. Verändert nach [120].

4.7. Fazit und Ausblick

Nach dem gegeneinander Abwägen der untersuchten Makromoleküle und den verschiedenen Möglichkeiten in der Beladung und Oberflächenmodifikation von Carrier-Erythrozyten können nachfolgende Empfehlungen für die optimale Beladung von Erythrozyten mit dem modifizierten Zytostatikum 5-FU und für die Spezifizierung des Targetings zur Leber gegeben werden:

Aufgrund ihrer längeren Überlebensdauer, physiologischeren Morphologie sowie einer einfacheren Herstellung sind für den Medikamententransport mittels zellulärer Carrier die Erythrozyten den white Ghost deutlich überlegen.

Diskussion

5-FU überwindet die Erythrozytenmembran und hat gravierende Auswirkungen auf das intrazelluläre Milieu der Erythrozyten. Ursächlich für die Membrangängigkeit sind die Hydrophobizität und geringe Größe der Substanz, wodurch eine passive Diffusion über die Erythrozytenmembran begünstigt wird. Sowohl die negative Beeinflussung des intrazellulären Milieus als auch das ungewollte Passieren der Zellmembran machen die Kopplung an geeignete Makromoleküle notwendig. Hierfür wurden die Substanzen Dextran und EPS 4-Polymerpartikel ausgewählt. Sie bieten über verschiedene Anreicherungsmechanismen die Möglichkeit eines effizienten Tumortargetings.

Dextran und Nanopartikel führen über eine Akkumulation im Tumorgewebe durch den EPR-Effekt zu einer deutlichen Steigerung der therapeutischen Effektivität gegenüber der Applikation des freien Wirkstoffes. Pharmakodynamik, Nebenwirkungsprofil und Immunogenität werden positiv beeinflusst. Da sich Dextran negativ auf die Gerinnung auswirkt, erfolgt das Lebertargeting über den Transport in oberflächenmodifizierten Carrier-Erythrozyten. Die hierfür geeigneteste Methode stellt die hochgradige Biotinylierung der Erythrozytenoberfläche mit NHS-Biotin dar. Dadurch werden die Zellen nicht nur selektiv in der Leber angesammelt, sondern sie gewinnen auch zusätzlich an Stabilität. Alternativ ist eine Oberflächenbeschichtung mit Immunglobulinen der Gruppe M erfolgsversprechend.

FUAC-gekoppelte Nanopartikel und Dextrane akkumulieren nach intravenöser Applikation schnell in der Leber. Nanopartikel bieten die Möglichkeit einer krebszellspezifischen Modifikation. Durch die Beladung von Carrier-Erythrozyten mit möglichst physiologischer Membranstruktur könnten sie über einen langen Zeitraum, vermutlich über Wochen, aus den Carrier-Zellen abgegeben werden und ihre antiproliferative Wirkung in der Leber entfalten.

Bei der Erythrozytenbeladung mit FUAC-Konjugaten ist zum Schutz der Membranintegrität eine Inkubationsosmolarität um 150mOsm zu wählen und auf ein Vorschwellen bei 160mOsm zu verzichten. Die vermutlich dem Dextran ähnlichen gerinnungshemmenden Eigenschaften der Nanopartikel würden während des intraerythrozytären Aufenthaltes blockiert. Ob die kurze Zeit der Kreislaufzirkulation bis zur Phagozytose in der Leber zu einer klinisch relevanten Suppression der Gerinnung führt, ist eine wichtige Frage, die in weiterführenden tierexperimentellen Untersuchungen zu klären bleibt. Dabei sind die Ergebnisse in Relation zu der Myelotoxizität des freien Wirkstoffes 5-FU zu betrachten, die ebenfalls eine Gerinnungshemmung zur Folge haben kann.

Diskussion

Im Anschluss an die Herstellung der entsprechenden Wirkstoff-Makromolekülkonjugate erfolgte eine möglichst effektive und schonende Beladung der Erythrozyten. Hierfür ist das Verfahren der hypotonen Hämolyse eine etablierte und schnelle Methode zur Beladung mit den analysierten Makromolekülen. Aufgrund der niedrigen Beladungseffizienz sollte die etwas zeitaufwendigere Methode der hypotonen Dialyse mit höheren Beladungserfolgen für die Eignung zur Beladung mit Dextran und den Nanopartikeln untersucht werden.

Zuletzt sollte bei der intravenösen Applikation der modifizierten, FUAC-Konjugat-beladenen Carrier-Erythrozyten auf eine schrittweise Applikation kleiner Mengen geachtet werden, um eine Aufsättigung des hepatischen RES zu umgehen und ein schnelles Lebertargeting mit geringstmöglicher Akkumulation in anderen Zellen des RES zu erreichen und dadurch die geringsten systemischen Nebenwirkungen zu gewährleisten.

Die langsame Freisetzung von Wirkstoffen aus der Verbindung mit den Makromolekülen und eine Bioverteilung der Makromoleküle hauptsächlich in der Leber führen zu der Überlegung, ob nicht schon die alleinige Applikation der FUAC-Makromolekülkonjugate zu einer starken Reduktion der Nebenwirkungen und einer günstigeren Verteilung der Substanz im Organismus führen würde. Tatsächlich ist mit einer therapeutisch positiven Beeinflussung der Pharmakodynamik und Toxizität zu rechnen.

Durch die Beladung der Carrier-Erythrozyten können die gerinnungshemmenden Effekte der Makromoleküle deutlich reduziert oder sogar vermieden werden [75, 101, 121]. Darüber hinaus wird durch die Verwendung der Zellcarrier eine prolongierte Freisetzung der FUAC-Polymerpartikel und folglich eine verlängerte Expositionsdauer mit konsekutiver Wirkungssteigerung erzielt.

Kritisch hervorzuheben sind die eingeschränkten Lagerungsbedingungen. Ein mit der Lagerungszeit zunehmendes Kontaminationsrisiko macht eine schnelle Reinfusion der modifizierten Erythrozyten notwendig [122]. Darüber hinaus müssen modifizierte Blutprodukte sofort nach der Herstellung appliziert werden, was zu einer deutlichen Zunahme des organisatorischen Aufwandes führt.

5 Zusammenfassung

Während für die Therapie örtlich begrenzter Primärtumoren operative und strahlentherapeutische Behandlungskonzepte zur Verfügung stehen, basiert die therapeutische Versorgung der meisten metastasierten Krebserkrankungen auf einer systemischen Chemotherapie mittels Zytostatika. Hierbei kommt es zu einer unselektiven Hemmung des Zellwachstums, bevorzugt der entarteten Zellen, da diese höhere Teilungsraten als gesunde Körperzellen aufweisen. Um wirksame Konzentrationen an Zytostatika innerhalb der Metastasen zu erreichen, muss bisher auch das gesunde Gewebe entsprechend hohen Wirkstoffspiegeln ausgesetzt werden. Dadurch können therapielimitierende Nebenwirkungen auftreten.

Ein vielversprechender Lösungsansatz ist der zielgerichtete Transport von Medikamenten mit Hilfe von Carrier-Molekülen zu den Tumorherden unter Umgehung des nicht entarteten Gewebes. Erythrozyten weisen besonders viele günstige Eigenschaften für die Verwendung als Drug-Carrier auf. Sie zeichnen sich durch eine sehr hohe Biokompatibilität, lange Überlebenszeit und eine hohe Beladungskapazität aus. In Abhängigkeit von der Beladungsprozedur und der Oberflächenmodifikation ist es möglich, Carrier-Erythrozyten unter anderem als Langzeit-Arzneimittelreservoir für ein gezieltes RES-, Milz- oder Lebertargeting zu verwenden.

Das kolorektale Karzinom (CRC) stellt eines der häufigsten Karzinome dar und tritt bei etwa 6% der Gesamtbevölkerung auf. Die adjuvante, neoadjuvante und palliative Therapie kolorektaler Karzinome basiert auf der Durchführung eines 5-FU-Folinsäure-haltigen Therapieprotokolles.

Ziel dieser Arbeit war es, das Zytostatikum 5-FU mittels Carrier-Erythrozyten für den zielgerichteten Medikamententransport zu Lebermetastasen des CRC einer optimierten Chemotherapie zugänglich zu machen. Aufgrund der Membrangängigkeit von 5-FU mussten geeignete Modifikationen an 5-FU vorgenommen werden, um die Passage durch die Erythrozytenmembran zu verhindern, jedoch ohne dessen Zytotoxizität wesentlich zu beeinflussen. Deshalb wurde 5-FU in die kopplungsfähigere Fluorouracil-Essigsäure (FUAC) umgewandelt und an die unschädlichen, biologisch abbaubaren Makromoleküle Dextran und EPS 4-Nanopartikel gekoppelt. Diese eignen sich für die Beladung der Erythrozyten, verbessern darüber hinaus die pharmakodynamischen Eigenschaften des gekoppelten Wirkstoffes und führen zu einer Reduktion der Toxizität.

Zusammenfassung

Die zytostatischen Eigenschaften der FUAC-Makromoleküle auf Kolonkarzinomzellen sollten *in vitro* untersucht werden. Außerdem wurden die Erythrozyten mit den Modellsubstanzen FITC-Dextran und FITC-Albumin beladen, um die optimalen Beladungsbedingungen für einen größtmöglichen Beladungserfolg unter Schonung der Erythrozytenmorphologie festzulegen.

Das Gelingen der Umwandlung von 5-FU zu FUAC wurde anhand der UV/VIS-Spektren beider Substanzen belegt. Der Nachweis über eine erfolgreiche Kopplung von FUAC an die Makromoleküle erfolgte mittels NMR-Spektroskopie und Partikelelektrophorese. Eine gelungene Erythrozytenbeladung mit FITC-Albumin und -Dextran wurde mittels Durchflusszytometrie und konfokaler Laserscanningmikroskopie nachgewiesen.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die antiproliferative Wirkung der FUAC-Makromolekülkonjugate im Vergleich zu dem freien Wirkstoff innerhalb des Versuchszeitraumes herabgesetzt ist. Ursache hierfür ist die angestrebte verzögerte Freisetzung des Wirkstoffes aus der Verbindung mit Dextran und Nanopartikeln über vermutlich zwei bis drei Wochen. Daraus resultiert eine später einsetzende, sich mit der Zeit der Wirksamkeit des freien 5-FU annähernden Wirkung. Diese vorteilhafte Eigenschaft der verzögerten Freisetzung in Verbindung mit der Beladung von Carrier-Erythrozyten mit Wirkstoff-Makromolekülkonjugaten statt freien Wirkstoffen eröffnet eine vielversprechende neue Strategie der Chemotherapie.

Denkbar für die Zukunft ist zum einen der Einsatz freier FUAC-Konjugate. Dadurch soll eine langsame Freisetzung des Wirkstoffes innerhalb der Leber erreicht und durch den EPR-Effekt eine Akkumulation im Tumorgewebe bewirkt werden. Zum anderen ist die Verwendung von mit FUAC-Konjugat beladenen Erythrozyten mit möglichst physiologischer Morphologie als Langzeit-Zytostatikareservoir vielversprechend. Dabei würden die durch den Erythrozytenabbau langsam freigesetzten Konjugate in der Leber akkumulieren und die zytostatische Wirkung von 5-FU nach Aufnahme in die Krebszelle bzw. nach Freisetzung aus den hepatischen Makrophagen lokal entfaltet. Um das Lebergewebe zu schonen, ist eine zusätzliche krebszellspezifische Modifikation sowohl der Nanopartikel als auch der Erythrozyten denkbar und vielversprechend.

6 Literaturverzeichnis

1. Leischner, H., Onkologie. 2007: Elsevier Urban & Fischer.
2. Statistisches Bundesamt, Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. 2008: Wiesbaden. p. 52.
3. Karow, T. and R. Lang-Roth, Zytostatika, in Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie, T. Karow, Editor. 2010, Karow, T. p. 931-948.
4. Roessner, A., U. Pfeifer, and H.K. Müller-Hermelink, Allgemeine Pathologie. Vol. 10. 2003: Elsevier Urban & Fischer.
5. Zeller, W. and H. zur Hausen, Onkologie, Grundlagen - Diagnostik - Therapie - Entwicklungen, ed. H.z. Hausen. 2006: ecomed.
6. Schuetz, J., H. Wallace, and R. Diasio, 5-Fluorouracil incorporation into DNA of CF-1 mouse bone marrow cells as a possible mechanism of toxicity. *Cancer Research*, 1984. 44: p. 1.358-1.363.
7. HagerRom, Fluorouracil. 2005, Springer Verlag: Heidelberg.
8. HJ, S., H. K, and P. K, Epidemiologie, Tumorbiologie, Zytostatika, Prinzipien der Tumorthherapie, Supportive Maßnahmen, in Kompendium Internistische Onkologie. 2006, Possinger K.
9. Renz-Polster, H. and S. Krautzig, Basislehrbuch Innere Medizin. 2008, München - Jena: Urban & Fischer.
10. Oka, Y., et al., Apoptosis in cultured human colon cancer cells induced by combined treatments with 5-fluorouracil, tumor necrosis factor-alpha and interferon-alpha. *Jpn J Clin Oncol*, 1997. 27(4): p. 231-5.
11. Saltz, L.B., et al., Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*, 2000. 343(13): p. 905-14.
12. HJ, S., H. K, and P. K, Standards in Diagnostik und Therapie, in Kompendium Internistische Onkologie. 2006, Possinger K.
13. Becker, K., et al., Cardiotoxicity of the antiproliferative compound fluorouracil. *Drugs*, 1999. 57(4): p. 475-84.
14. Alter, P., et al., Cardiotoxicity of 5-fluorouracil. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2006. 4(1): p. 1-5.
15. Spasojevic, I., et al., Effects of 5-fluorouracil on erythrocytes in relation to its cardiotoxicity: membrane structure and functioning. *J Chem Inf Model*, 2005. 45(6): p. 1680-5.

Literaturverzeichnis

16. Spasojevic, I., et al., Decreased oxygen transfer capacity of erythrocytes as a cause of 5-fluorouracil related ischemia. *Molecules*, 2009. 14(1): p. 53-67.
17. Wattanatorn, W., et al., High-performance liquid chromatographic assay of 5-fluorouracil in human erythrocytes, plasma and whole blood. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997. 692(1): p. 233-7.
18. Spasojevic, I., J. Zakrzewska, and G.G. Bacic, ³¹P NMR spectroscopy and polarographic combined study of erythrocytes treated with 5-fluorouracil: cardiotoxicity-related changes in ATP, 2,3-BPG, and O₂ metabolism. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1048: p. 311-20.
19. Tanaka, F., et al., The history, mechanism and clinical use of oral 5-fluorouracil derivative chemotherapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol*, 2000. 1(2): p. 137-64.
20. Yi, Y.M., T.Y. Yang, and W.M. Pan, Preparation and distribution of 5-fluorouracil (¹²⁵I) sodium alginate-bovine serum albumin nanoparticles. *World J Gastroenterol*, 1999. 5(1): p. 57-60.
21. Cai, C., et al., Enhanced liver targeting of 5-fluorouracil using galactosylated human serum albumin as a carrier molecule. *J Drug Target*, 2006. 14(2): p. 55-61.
22. Pohlen, U., et al., Stealth liposomal 5-fluorouracil with or without degradable starch microspheres for hepatic arterial infusion in the treatment of liver metastases. An animal study in VX-2 liver tumor-bearing rabbits. *Anticancer Res*, 2004. 24(3a): p. 1699-704.
23. Pohlen, U., et al., Intra-aortal therapy with 5-fluorouracil- polyethylene glycol stealth liposomes: does the metabolism of 5-fluorouracil into 5-fluoro-2'-deoxyuridine depend on ph value?. An animal study in VX-2 liver tumor-bearing rabbits. *Chemotherapy*, 2004. 50(2): p. 67-75.
24. Li, X., et al., PLGA nanoparticles for the oral delivery of 5-Fluorouracil using high pressure homogenization-emulsification as the preparation method and in vitro/in vivo studies. *Drug Dev Ind Pharm*, 2008. 34(1): p. 107-15.
25. Yan, C., et al., In vivo biodistribution for tumor targeting of 5-fluorouracil (5-FU) loaded N-succinyl-chitosan (Suc-Chi) nanoparticles. *Yakugaku Zasshi*, 2010. 130(6): p. 801-4.
26. Yu, C.Y., et al., Hybrid nanospheres and vesicles based on pectin as drug carriers. *Langmuir*, 2009. 25(19): p. 11720-6.
27. Wang, G.P., et al., Development of novel 5-fluorouracil carrier erythrocyte with pharmacokinetics and potent antitumor activity in mice bearing malignant ascites. *J Gastroenterol Hepatol*. 25(5): p. 985-90.
28. Yi, H., et al., Pharmacokinetic properties and antitumor efficacy of the 5-fluorouracil loaded PEG-hydrogel. *BMC Cancer*. 10: p. 211.

Literaturverzeichnis

29. Braun, A.H., et al., New systemic frontline treatment for metastatic colorectal carcinoma. *Cancer*, 2004. 100(8): p. 1558-77.
30. Subbarayan, P.R., et al., Chronic exposure of colorectal cancer cells in culture to fluoropyrimidine analogs induces thymidylate synthase and suppresses p53. A molecular explanation for the mechanism of 5-FU resistance. *Anticancer Res*, 2010. 30(4): p. 1149-56.
31. Jin, S. and A.J. Levine, The p53 functional circuit. *J Cell Sci*, 2001. 114(Pt 23): p. 4139-40.
32. Tominaga, T., et al., Combination of p53 codon 72 polymorphism and inactive p53 mutation predicts chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Int J Cancer*. 126(7): p. 1691-701.
33. Pierige, F., et al., Cell-based drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 2008. 60(2): p. 286-95.
34. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004. 56(11): p. 1649-59.
35. Coyne, C.P., B.W. Fenwick, and J. Ainsworth, Cytotoxic activity of doxorubicin "loaded" neutrophils against human mammary carcinoma (HTB-19). *Biotherapy*, 1997. 10(2): p. 145-59.
36. Lewis, D.A. and H.O. Alpar, Therapeutic possibilities of drugs encapsulated in erythrocytes. *Int. J. Pharm.*, 1984. 22: p. 137-146.
37. Millan, C.G., et al., Drug, enzyme and peptide delivery using erythrocytes as carriers. *J Control Release*, 2004. 95(1): p. 27-49.
38. Lambert, J.M., Drug-conjugated monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 2005. 5(5): p. 543-9.
39. Hick, C. and A. Hick, *Intensivkurs Physiologie*. 2009: Elsevier Urban & Fischer. 420.
40. Huppelsberg, J. and K. Walter, *Kurzlehrbuch Physiologie*. 3 ed. 2009: Georg Thieme Verlag.
41. Universitätsklinikum des Saarlandes, http://www.uniklinik-saarland.de/med_fak/haemostaseologie/Blutspende/praes/saft-03_1.jpg.
42. Gadner, H., G. Gaedicke, and C. Niemeyer, *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. 2005: Springer Verlag. 1228.
43. Mueller-Eckhardt, C., *Transfusionsmedizin: Grundlagen - Therapie - Methodik*. 2003: Springer. 704.
44. Genesisnet, <http://www.genesisnet.info/bild.php?Sprache=de&ID=179>. 2010.
45. Hoffbrand, A.V., *Grundkurs Hämatologie*. 2003: Georg Thieme Verlag.

Literaturverzeichnis

46. Dancygier, H., Grundlagen, Diagnostik und Therapie hepatobiliärer Erkrankungen. 2003: Springer. 944.
47. Patel, P.D., et al., Drug loaded erythrocytes: as novel drug delivery system. *Curr Pharm Des*, 2008. 14(1): p. 63-70.
48. Hamidi, M. and H. Tajerzadeh, Carrier erythrocytes: an overview. *Drug Deliv*, 2003. 10(1): p. 9-20.
49. Hamidi, M., et al., Applications of carrier erythrocytes in delivery of biopharmaceuticals. *J Control Release*, 2007. 118(2): p. 145-60.
50. Adriaenssens, K., et al., Use of enzyme-loaded erythrocytes in in-vitro correction of arginase-deficient erythrocytes in familial hyperargininemia. *Clin Chem*, 1976. 22(3): p. 323-6.
51. Eichler, H.G., et al., In vivo clearance of antibody-sensitized human drug carrier erythrocytes. *Clin Pharmacol Ther*, 1986. 40(3): p. 300-3.
52. Bax, B.E., et al., Survival of human carrier erythrocytes in vivo. *Clin Sci (Lond)*, 1999. 96(2): p. 171-8.
53. Kinoshita, K., Jr. and T.Y. Tsong, Survival of sucrose-loaded erythrocytes in the circulation. *Nature*, 1978. 272(5650): p. 258-60.
54. Jaitely, V., et al., Resealed erythrocytes: Drug carrier potentials and biomedical applications. *Indian Drugs*, 1996. 33: p. 589-594.
55. Zanella, A., et al., Desferrioxamine loading of red cells for transfusion. *Adv. Biosci.*, 1987. 67: p. 17-27.
56. Glukhova, M.A., et al., Red blood cell targeting to smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1986. 198(1): p. 155-8.
57. Muzykantov, V.R., et al., Targeting of enzyme immobilized on erythrocyte membrane to collagen-coated surface. *FEBS Lett*, 1985. 182(1): p. 62-6.
58. Muzykantov, V.R., et al., Immunotargeting of erythrocyte-bound streptokinase provides local lysis of a fibrin clot. *Biochim Biophys Acta*, 1986. 884(2): p. 355-62.
59. Muzykantov, V.R., et al., Directed targeting of immunoerythrocytes provides local protection of endothelial cells from damage by hydrogen peroxide. *Am J Pathol*, 1987. 128(2): p. 276-85.
60. Rao, P.N., et al., Inhibition of free radical generation and improved survival by protection of the hepatic microvascular endothelium by targeted erythrocytes in orthotopic rat liver transplantation. *Transplantation*, 1990. 49(6): p. 1055-9.
61. Taylor, R.P., et al., In vivo binding and clearance of circulating antigen by bispecific heteropolymer-mediated binding to primate erythrocyte complement receptor. *J Immunol*, 1992. 148(8): p. 2462-8.

Literaturverzeichnis

62. Jain, S., S.K. Jain, and V.K. Dixit, Erythrocytes based delivery of isoniazid: Preparation and in vitro characterization. *Indian Drugs*, 1995. 32: p. 471-476.
63. Loegering, D.J., J.E. Kaplan, and G.J. Grover, Effect of erythrocyte stroma on reticuloendothelial system phagocytic function. *J Lab Clin Med*, 1983. 102(2): p. 231-9.
64. Alpar, H.O. and W.J. Irwin, Some unique applications for erythrocytes as carrier systems. *Adv. Biosci.*, 1987. 67: p. 1-9.
65. Deloach, J. and G. Ihler, A dialysis procedure for loading erythrocytes with enzymes and lipids. *Biochim Biophys Acta*, 1977. 496(1): p. 136-45.
66. Garin, M.I., et al., Erythrocytes as carriers for recombinant human erythropoietin. *Pharm Res*, 1996. 13(6): p. 869-74.
67. Jain, S., S.K. Jain, and V.K. Dixit, Magnetically, , guided rat erythrocytes bearing isoniazid: Preparation, characterization, and evaluation-. *Drug Devel. Ind. Pharm.*, 1997. 23: p. 999-1006.
68. Herold, G., e.a., *Innere Medizin*. 2006, Köln: Gerd Herold.
69. Takeda, H., et al., Effect of 5- Fluorouracil on Cell Cycle Regulatory Proteins in Human Colon Cancer Cell Line. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1999. 90: p. 677-684.
70. Breul, J., G. Jakse, and R. Hartung, Biomodulation of 5-FU cytotoxicity by folinic acid and its stereoisomers: in vitro experiments with different cell lines of prostatic cancer. *Urol. Res.*, 1995. 23: p. 163-167.
71. LO Laboroptik GmbH,
<http://www.zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>. 05.07.2010.
72. Sigma, Product Information Cell Growth Determination Kit MTT Based, Sigma-Aldrich.
73. Berridge, M.V., et al., The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica*, 1996. 4: p. 14-19.
74. Berridge, M.V. and A.S. Tan, Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 1993. 303(2): p. 474-82.
75. Cartier, R., et al., Latex nanoparticles for multimodal imaging and detection in vivo. *Nanotechnology*, 2007. 18(195): p. 12.
76. Bibby, D.C., et al., Pharmacokinetics and biodistribution of RGD-targeted doxorubicin-loaded nanoparticles in tumor-bearing mice. *Int J Pharm*, 2005. 293(1-2): p. 281-90.

Literaturverzeichnis

77. Shenoy, D., et al., Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 2. In vivo distribution and tumor localization studies. *Pharm Res*, 2005. 22(12): p. 2107-14.
78. Brähler, M., et al., Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano Lett*, 2006. 6(11): p. 2505-9.
79. Rossi, L., S. Serafini, and M. Magnani, Red Blood Cell Loading: A Selection of Procedures. *Erythrocyte Engineering for Drug Delivery and Targeting*, ed. M. Magnani. 2003, New York: Kluwer Academic / Plenum Press. 1-18.
80. Volkert, B., et al., Highly Substituted Carboxymethyl Starch. *Starch*, 2004. 56: p. 307-314.
81. Hermanson, G.T., Modification of Hydroxyls with Chloroacetic Acid, in *Bioconjugate Techniques*. 1996, Academic Press. Inc. p. 100.
82. Hao, A.J., et al., Synthesis and characteristics of the fluorouracil-dextran conjugates. *Pharmazie*, 2006. 61(5): p. 489-90.
83. Tada, M., Antineoplastic Agents. The Preparation of 5-Fluorouracil-1-acetic Acid Derivates. *Bulletin of the chemical society of Japan*, 1975. 48: p. 3427-3428.
84. Amer, M.M., et al., Spectrophotometric and spectrofluorimetric determination of fluorouracil in the presence of its degradation products. *J Pharm Pharmacol*, 1998. 50(2): p. 133-8.
85. Hitachi, *Spektrophotometer K2800 Users Guide*. 200.
86. Hewlett Packard, *Mein persönliches Handbuch. HPLC in der Laborpraxis*. 2001.
87. Jung, M., et al., Simultaneous determination of 5-fluorouracil and its active metabolites in serum and tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997. 702(1-2): p. 193-202.
88. Waters GmbH,
http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=de_DE. 26.07.2010.
89. BD Biosciences, *FACS Canto User Guide*.
90. Wheelless, L., Flow instrumentation and data analysis., in *Diagnostic flow cytometry*, R. Weinstein, Editor. 1991, Williams and Wilkins. p. 17-34.
91. Zeiss, *LSM510 META Laser Scanning Microscopes Operating Manual*. 2001, Carl Zeiss GmbH. p. 1-10.
92. Lohninger, H., et al., *Das NMR Phänomen*. 2006, Springer.
93. Bornscheuer, U., et al., *ROMPP KOMPAKT. Lexikon Biochemie und Molekularbiologie*, ed. R.D. Schmid. 2000: Georg Thieme Verlag.

Literaturverzeichnis

94. Neu, B., H.J. Meiselman, and H. Bäumler, Electrophoretic mobility of human erythrocytes in the presence of poly(styrene sulfonate). *Electrophoresis*, 2002. 23(15): p. 2363-8.
95. Bäumler, H., et al., Electrophoretic and aggregation behavior of bovine, horse and human red blood cells in plasma and in polymer solutions. *Biorheology*, 2001. 38(1): p. 39-51.
96. Harten, U., *Physik für Mediziner*. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag. 384.
97. Nounou, M.M., et al., In vitro release of hydrophilic and hydrophobic drugs from liposomal dispersions and gels. *Acta Pharm*, 2006. 56(3): p. 311-24.
98. Wong, P., Mechanism of control of erythrocyte shape: a possible relationship to band 3. *J Theor Biol*, 1994. 171(2): p. 197-205.
99. Hamidi, M., et al., Encapsulation of valproate-loaded hydrogel nanoparticles in intact human erythrocytes: A novel nano-cell composite for drug delivery. *J Pharm Sci*.
100. FJ, A., H. A, and T. MC, Fluorescence analysis of carrier rat and human erythrocytes loaded with FITC-dextran. *Cytometry*, 1996. 24(2): p. 181-189.
101. Mehvar, R., Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J Control Release*, 2000. 69(1): p. 1-25.
102. W., A., *Volumenersatztherapie*, in *Interdisziplinäre Intensivmedizin*. 2006, Elsevier, Urban&FischerVerlag: Stuttgart. p. 375-392.
103. Haley, B. and E. Frenkel, Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol Oncol*, 2008. 26(1): p. 57-64.
104. SM, C., et al., Pharmacokinetics of 5-fluorouracil after intravenous infusion of 5-fluorouracil- acetic acid- human serum albumin conjugates to rabbits. *Int J Pharm*, 1991. 68: p. 61-68.
105. Ihler, G.M., R.H. Glew, and F.W. Schnure, Enzyme loading of erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1973. 70(9): p. 2663-6.
106. Summers, M.P., Recent advantages in drug delivery. *The Pharmaceutical Journal*, 1983: p. 643-647.
107. Deloach, J., et al., Effect of glutaraldehyde treatment on enzyme-loaded erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1976. 496(2): p. 507-515.
108. Mishra, P.R. and N.K. Jain, Biotinylated methotrexate loaded erythrocytes for enhanced liver uptake. 'A study on the rat'. *Int J Pharm*, 2002. 231(2): p. 145-53.
109. Muzykantov, V.R., et al., Regulation of the complement-mediated elimination of red blood cells modified with biotin and streptavidin. *Anal Biochem*, 1996. 241(1): p. 109-19.

Literaturverzeichnis

110. Schreiber, A.D. and M.M. Frank, Role of antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes. II. Molecular nature of IgG and IgM complement-fixing sites and effects of their interaction with serum. *J Clin Invest*, 1972. 51(3): p. 583-9.
111. Schreiber, A.D. and M.M. Frank, Role of antibody and complement in the immune clearance and destruction of erythrocytes. I. In vivo effects of IgG and IgM complement-fixing sites. *J Clin Invest*, 1972. 51(3): p. 575-82.
112. Benatti, U., et al., Enhanced antitumor activity of adriamycin by encapsulation in mouse erythrocytes targeted to liver and lungs. *Pharmacol Res*, 1989. 21 Suppl 2: p. 27-33.
113. Zocchi, E., et al., In vivo liver and lung targeting of adriamycin encapsulated in glutaraldehyde-treated murine erythrocytes. *Biotechnol Appl Biochem*, 1988. 10(6): p. 555-62.
114. Universität Freiburg, <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/verdauung/leber/d-leber.php>. 2011.
115. Sharma, N. and P. Dey, Cell cannibalism and cancer. *Diagn Cytopathol*. 39(3): p. 229-33.
116. Lugini, L., et al., Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells. *Cancer Res*, 2006. 66(7): p. 3629-38.
117. Overholtzer, M., et al., A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*, 2007. 131(5): p. 966-79.
118. Marin-Padilla, M., Erythrophagocytosis by epithelial cells of a breast carcinoma. *Cancer*, 1977. 39(3): p. 1085-9.
119. Müller, M.I., Targeting von Tumorzellen durch oberflächenmodifizierte Erythrozyten - in vitro Studie, in *Institut für Transfusionsmedizin*. 2010, Charité-Universitätsmedizin Berlin: Berlin. p. 84.
120. Springer Medizin Verlag, *Zelluläre Bestandteile der Leber*.
121. Bäuml, H., et al., Electrophoresis of human red blood cells and platelets. Evidence for depletion of dextran. *Biorheology*, 1996. 33(4-5): p. 333-51.
122. Luban, N.L., Transfusion safety: Where are we today? *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1054: p. 325-41.

Lebenslauf

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

Erklärung

„Ich, Saphira Göppert, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Erythrozyten als Drug-Carrier für eine Krebstherapie – in vitro Untersuchungen am Kolonkarzinom-Modell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“