

4.2.3 Versuch III

Im III. Versuch wurden 132 weiblichen nude-Mäusen Glioblastomzellen (U-373) in die rechte Großhirnhemisphäre appliziert. 18 Tage später wurden die Mäuse mit den Nanopartikelzubereitungen behandelt. Als Kontrolle für das erfolgreiche Anwachsen der Tumorzellen wurden 4 Tiere willkürlich ausgewählt, zu Behandlungsbeginn getötet und die Gehirne lichtmikroskopisch beurteilt und mit Hilfe eines Computerauswertungsprogramms vermessen. Bei allen vier Tieren kam es zu einem Tumorwachstum. Das errechnete Tumolvolumen betrug im Mittel $2,24 \text{ mm}^3$ ($\text{SD} = \pm 0,08 \text{ mm}^3$) und liegt damit genau im Wachstumsverlauf, der in den Vorversuchen gewonnenen Werte.

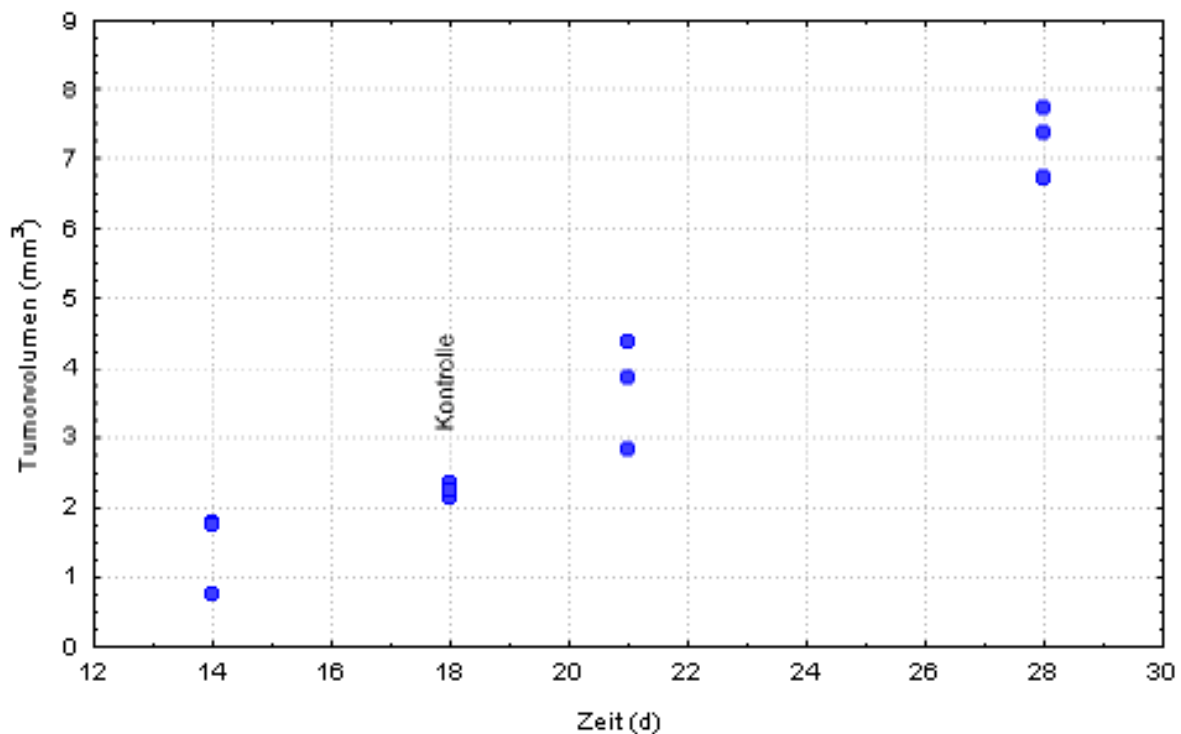


Abb. 33: Vergleich der in den Vorversuchen gewonnenen Wachstumsintensitäten der Hirntumorzellen mit den Tumorgößen (mm^3) der 4 Kontrolltiere aus Versuch III am Tag 18 nach intrazerebraler Inokulation

Um die Unterschiede in der Partikelaufnahme zwischen Glioblastom und Gehirn zu ermitteln, wurde das Großhirn in seine beiden Hemisphären geteilt und eingewogen. Da der Tumor nicht aus der rechten Hemisphäre herauspräpariert werden konnte, mußten beide Hemisphären:

Linke: tumorfrei (*tumorfrei.*) und

Rechte: tumortragend (*tumortrag.*) miteinander verglichen werden.

4.2.3.1 Konzentrationsverläufe in der *tumortrag.* und *tumorfrei.* Gehirnhemisphäre

In den vier folgenden Säulendiagrammen sind die PMMA-Konzentrationen in der *tumorfrei.* und in der *tumortrag.* Großhirnhemisphäre der 4 Präparationen zu den 8 Untersuchungszeiten dargestellt. Auf eine tabellarische Darstellung der Werte wurde verzichtet. Wie auch in den Versuchen I und II sind nur die Gruppen C und D in der Lage, hohe Konzentration im Gehirn zu erreichen. Zwischen den Konzentrationswerten der *tumorfrei.* und der *tumortrag.* Seite sind bei allen Präparationen nur vereinzelt auftretende Unterschiede zu erkennen, die auch statistisch nicht erfaßbar waren. In 21,9% aller Einzeluntersuchungen zeigten die *tumortrag.* Gehirnhälften eine höhere Konzentration als die *tumorfrei.* Hälfte. Diese Werte traten so unregelmäßig auf, daß sie wahrscheinlich auf die Streuung der Einzelwerte zurückzuführen sind.

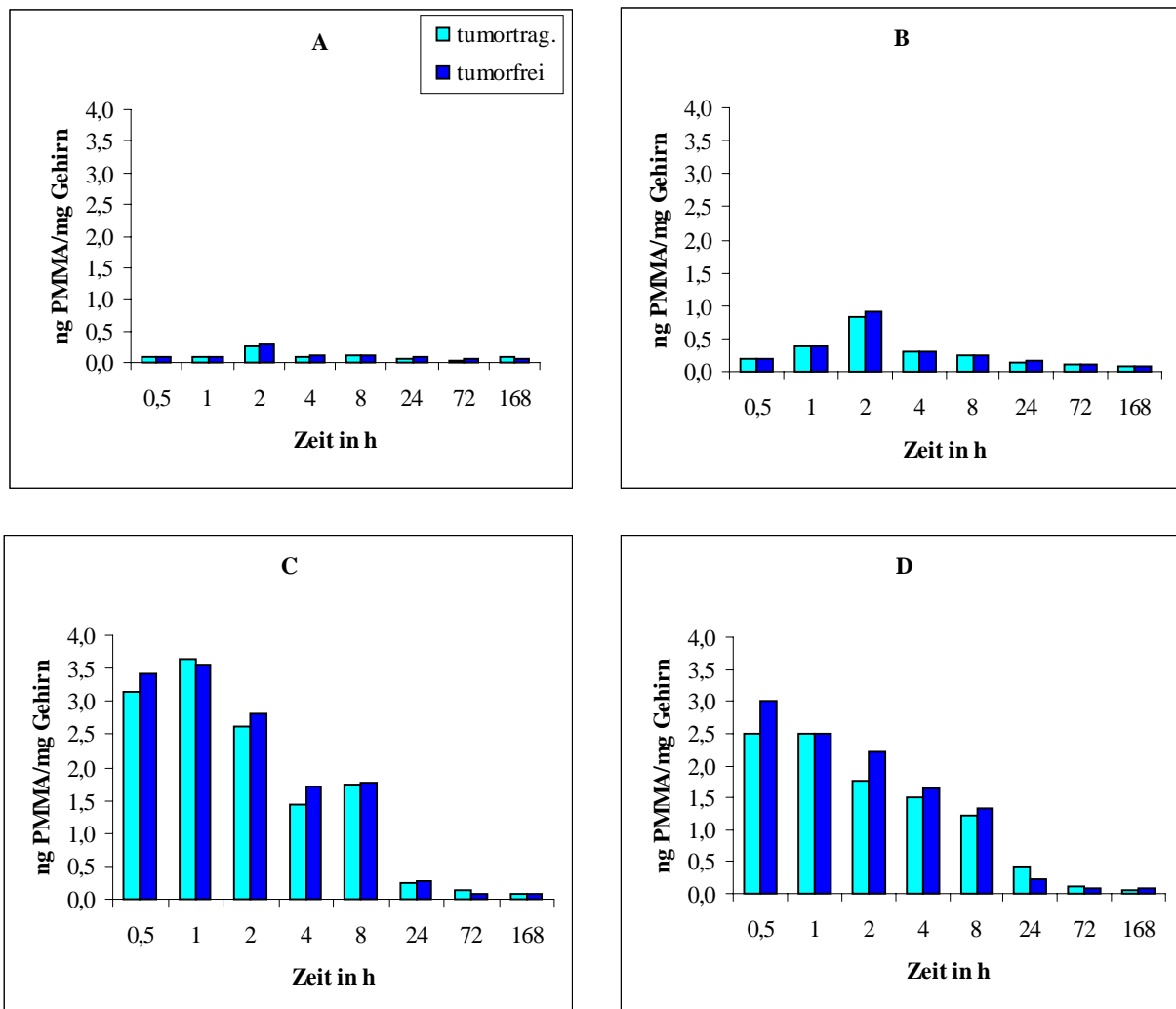


Abb. 34: Zeitlicher Verlauf der Nanopartikelkonzentrationen (A, B, C, D) in der tumorfreien und der tumortragenden Gehirnhemisphäre

4.2.3.2 Konzentrationsverläufe in der Leber (ng PMMA/mg Leber)

A: PMMA-Partikel

B: Polysorbat 80 beschichtete PMMA-Partikel

C: Poloxamer 407 beschichtete PMMA-Partikel

D: Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Partikel

Tab. 78: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Lebergewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation A | | | B | | |
|--------|----------------|---------|---------|----------------|---------|---------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 110,549 | 102,626 | 113,967 | 83,143 | 76,386 | 88,219 |
| 1 | 90,093 | 82,567 | 98,802 | 89,584 | 76,695 | 99,55 |
| 2 | 104,736 | 96,269 | 117,906 | 89,096 | 87,115 | 93,173 |
| 4 | 119,343 | 112,947 | 122,321 | 97,139 | 81,26 | 99,839 |
| 8 | 128,682 | 120,237 | 144,324 | 99,345 | 91,325 | 112,664 |
| 24 | 117,102 | 106,863 | 124,459 | 92,944 | 83,698 | 101,024 |
| 72 | 130,344 | 109,049 | 144,346 | 120,034 | 108,007 | 128,836 |
| 168 | 112,306 | 99,021 | 145,555 | 105,239 | 103,993 | 124,439 |

Tab. 79: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen C und D im Lebergewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation C | | | D | | |
|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 25,36 | 20,445 | 28,232 | 22,255 | 21,031 | 24,627 |
| 1 | 20,204 | 17,986 | 47,603 | 14,88 | 11,708 | 27,378 |
| 2 | 42,126 | 36,87 | 45,411 | 25,092 | 20,119 | 30,125 |
| 4 | 50,303 | 46,627 | 62,109 | 21,158 | 18,813 | 22,829 |
| 8 | 29,266 | 23,937 | 34,164 | 18,421 | 16,522 | 20,559 |
| 24 | 58,58 | 46,98 | 71,017 | 39,044 | 32,067 | 42,831 |
| 72 | 56,753 | 47,395 | 67,015 | 31,193 | 25,149 | 37,879 |
| 168 | 68,333 | 27,239 | 87,681 | 27,718 | 23,736 | 33,612 |

Tab. 80: Statistische Auswertung (Mann-Whitney-Test) der Präparationen A, B, C, D zu den einzelnen Zeitpunkten gegeneinander

| Zeit/h | Präparation | | | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A-B | A-C | A-D | B-C | B-D | C-D |
| 0,5 | x | x | x | x | x | |
| 1 | | x | x | x | x | |
| 2 | x | x | x | x | x | x |
| 4 | x | x | x | x | x | x |
| 8 | x | x | x | x | x | x |
| 24 | x | x | x | x | x | |
| 72 | | x | x | x | x | x |
| 168 | | x | x | x | x | |

x:p<0,05

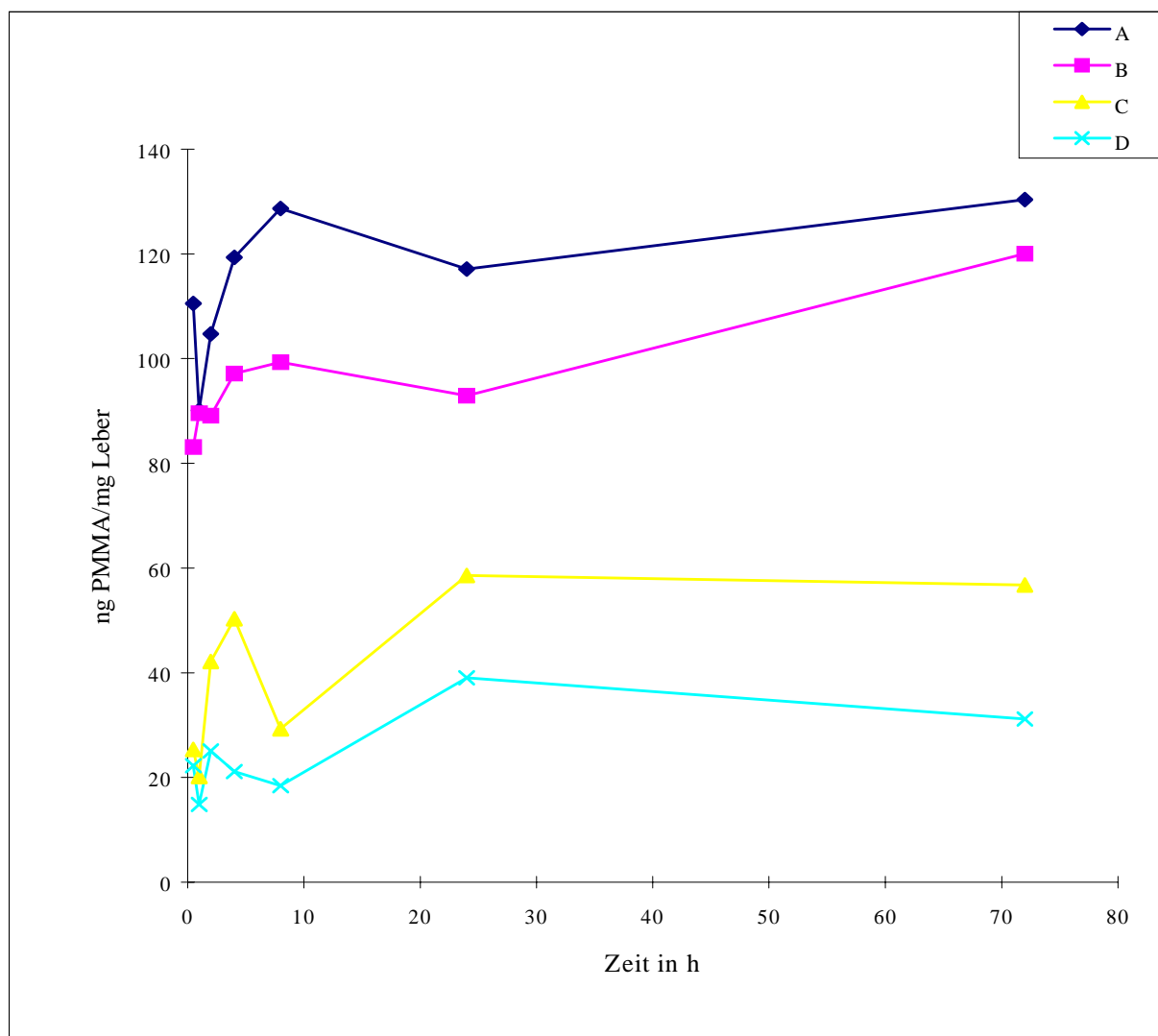


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf der PMMA-Konzentrationen (A, B, C, D) in der Leber (ng PMMA/mg Organmasse)

In der Leber zeigen alle 4 Nanopartikelpräparationen einen m. o. w. eigenen Verlauf, mit einem langsamen aber kontinuierlichen Anstieg. Die Werte der Gruppe C sind ab der 2. Stunde um das Doppelte höher als D. Zwischen den Gruppen A und B kommt es erst zum Ende der Untersuchung zu einer Annäherung der Leberkonzentrationen.

4.2.3.3 Konzentrationsverläufe in der Milz (ng PMMA/mg Milz)

A: PMMA-Partikel

B: Polysorbat 80 beschichtete PMMA-Partikel

C: Poloxamer 407 beschichtete PMMA-Partikel

D: Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Partikel

Tab. 81: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Milzgewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation A | | | B | | |
|--------|----------------|--------|---------|----------------|---------|---------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 63,505 | 43,958 | 71,715 | 203,472 | 146,801 | 238,019 |
| 1 | 47,981 | 44,088 | 54,195 | 208,213 | 181,511 | 273,049 |
| 2 | 65,112 | 42,919 | 102,901 | 211,297 | 179,868 | 240,969 |
| 4 | 60,931 | 58,134 | 64,732 | 227,760 | 111,673 | 307,382 |
| 8 | 87,644 | 59,094 | 125,325 | 373,103 | 293,384 | 491,714 |
| 24 | 104,793 | 94,739 | 138,886 | 254,523 | 221,927 | 284,252 |
| 72 | 65,749 | 52,897 | 73,756 | 286,810 | 234,113 | 344,131 |
| 168 | 65,977 | 43,947 | 71,781 | 167,580 | 162,564 | 227,297 |

Tab. 82: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen C und D im Milzgewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation C | | | D | | |
|--------|-----------------|----------|----------|-----------------|----------|----------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 391,713 | 378,806 | 402,880 | 294,297 | 274,152 | 397,255 |
| 1 | 451,038 | 414,845 | 498,203 | 488,914 | 403,206 | 500,472 |
| 2 | 774,731 | 649,041 | 903,010 | 1136,662 | 819,734 | 1345,941 |
| 4 | 870,538 | 798,642 | 908,293 | 1631,501 | 1353,056 | 2067,658 |
| 8 | 1217,036 | 1079,478 | 1386,347 | 1849,095 | 1612,521 | 1968,786 |
| 24 | 1395,379 | 1337,218 | 1456,948 | 1320,830 | 1091,768 | 1604,079 |
| 72 | 1192,255 | 890,749 | 1411,526 | 663,497 | 548,861 | 768,872 |
| 168 | 1109,813 | 664,934 | 1217,250 | 1226,679 | 699,062 | 1580,470 |

Tab. 83: Statistische Auswertung (Mann-Whitney-Test) der Präparationen A, B, C, D zu den einzelnen Zeitpunkten gegeneinander

| Zeit/h | Präparation | | | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A-B | A-C | A-D | B-C | B-D | C-D |
| 0,5 | x | x | x | x | x | |
| 1 | x | x | x | x | x | |
| 2 | x | x | x | x | x | |
| 4 | | x | x | x | x | x |
| 8 | x | x | x | x | x | x |
| 24 | x | x | x | x | x | |
| 72 | x | x | x | x | x | x |
| 168 | x | x | x | x | x | |

x:p<0,05

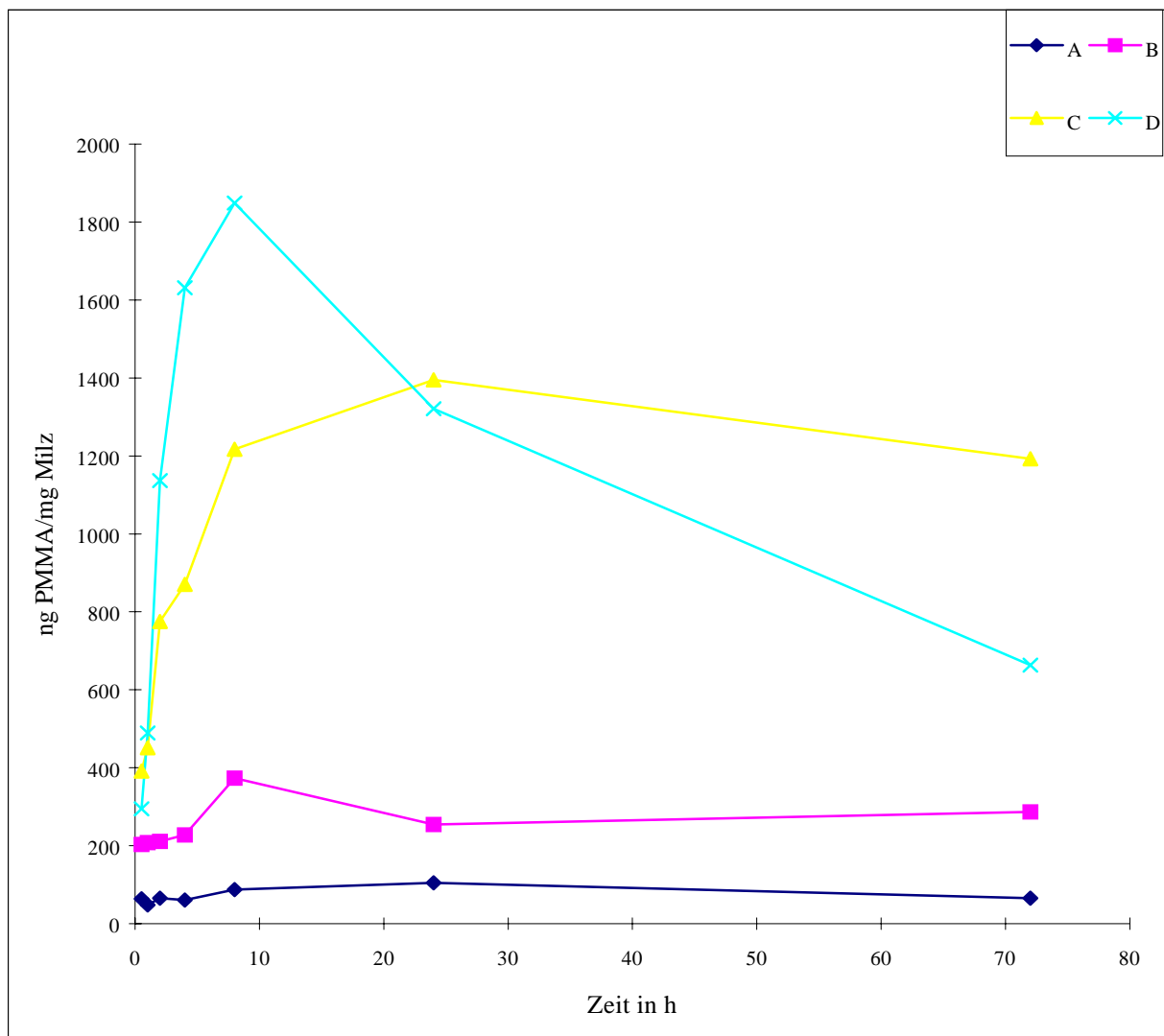


Abb. 36: Zeitlicher Verlauf der PMMA-Konzentrationen (A, B, C, D) in der Milz (ng PMMA/mg Organmasse)

Die Werte der Gruppen C und D zeigen nach einem sprunghaften Anstieg in den ersten 8 Stunden einen plateauartigen Verlauf, der aber in der Grafik bedingt durch den nichtingezeichneten 168-Stunden-Wert nicht sichtbar wird. Die Werte der Gruppe B sind 3-5mal höher als die der Kontrolle A. Für A und B kommt es während des Untersuchungszeitraumes zu keiner gravierenden Veränderung der Milzkonzentration.

4.2.3.4 Konzentrationsverläufe in der Niere (ng PMMA/mg Niere)

A: PMMA-Partikel

B: Polysorbat 80 beschichtete PMMA-Partikel

C: Poloxamer 407 beschichtete PMMA-Partikel

D: Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Partikel

Tab. 84: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Nierengewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation A | | | B | | |
|--------|---------------|-------|-------|---------------|--------|--------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 1,066 | 1,001 | 1,385 | 21,553 | 11,126 | 24,113 |
| 1 | 1,053 | 0,921 | 1,680 | 25,245 | 22,127 | 29,189 |
| 2 | 2,497 | 2,094 | 2,892 | 12,531 | 11,401 | 14,769 |
| 4 | 0,620 | 0,594 | 0,697 | 12,636 | 8,173 | 13,760 |
| 8 | 0,656 | 0,559 | 0,768 | 8,148 | 7,297 | 8,771 |
| 24 | 0,419 | 0,383 | 0,458 | 2,163 | 2,079 | 2,528 |
| 72 | 0,246 | 0,216 | 0,356 | 2,653 | 2,453 | 3,573 |
| 168 | 0,287 | 0,216 | 0,330 | 1,992 | 1,780 | 2,712 |

Tab. 85: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Nierengewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation C | | | D | | |
|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 20,383 | 18,698 | 26,349 | 14,648 | 14,385 | 17,184 |
| 1 | 18,835 | 15,451 | 19,730 | 9,735 | 8,464 | 13,007 |
| 2 | 12,902 | 9,768 | 16,183 | 10,538 | 9,503 | 12,209 |
| 4 | 9,470 | 8,767 | 10,152 | 10,377 | 9,274 | 11,348 |
| 8 | 10,981 | 9,784 | 11,456 | 8,769 | 7,756 | 9,062 |
| 24 | 4,075 | 3,270 | 5,002 | 2,393 | 1,921 | 2,688 |
| 72 | 1,665 | 1,468 | 2,018 | 1,702 | 1,305 | 2,343 |
| 168 | 1,584 | 1,530 | 2,658 | 1,881 | 0,932 | 2,415 |

Tab. 86: Statistische Auswertung (Mann-Whitney-Test) der Präparationen A, B, C, D zu den einzelnen Zeitpunkten gegeneinander

| Zeit/h | Präparation | | | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A-B | A-C | A-D | B-C | B-D | C-D |
| 0,5 | x | x | x | | | x |
| 1 | x | x | x | x | x | x |
| 2 | x | x | x | | | |
| 4 | x | x | x | | | |
| 8 | x | x | x | x | | x |
| 24 | x | x | x | x | | x |
| 72 | x | x | x | x | | |
| 168 | x | x | x | | | |

x:p<0,05

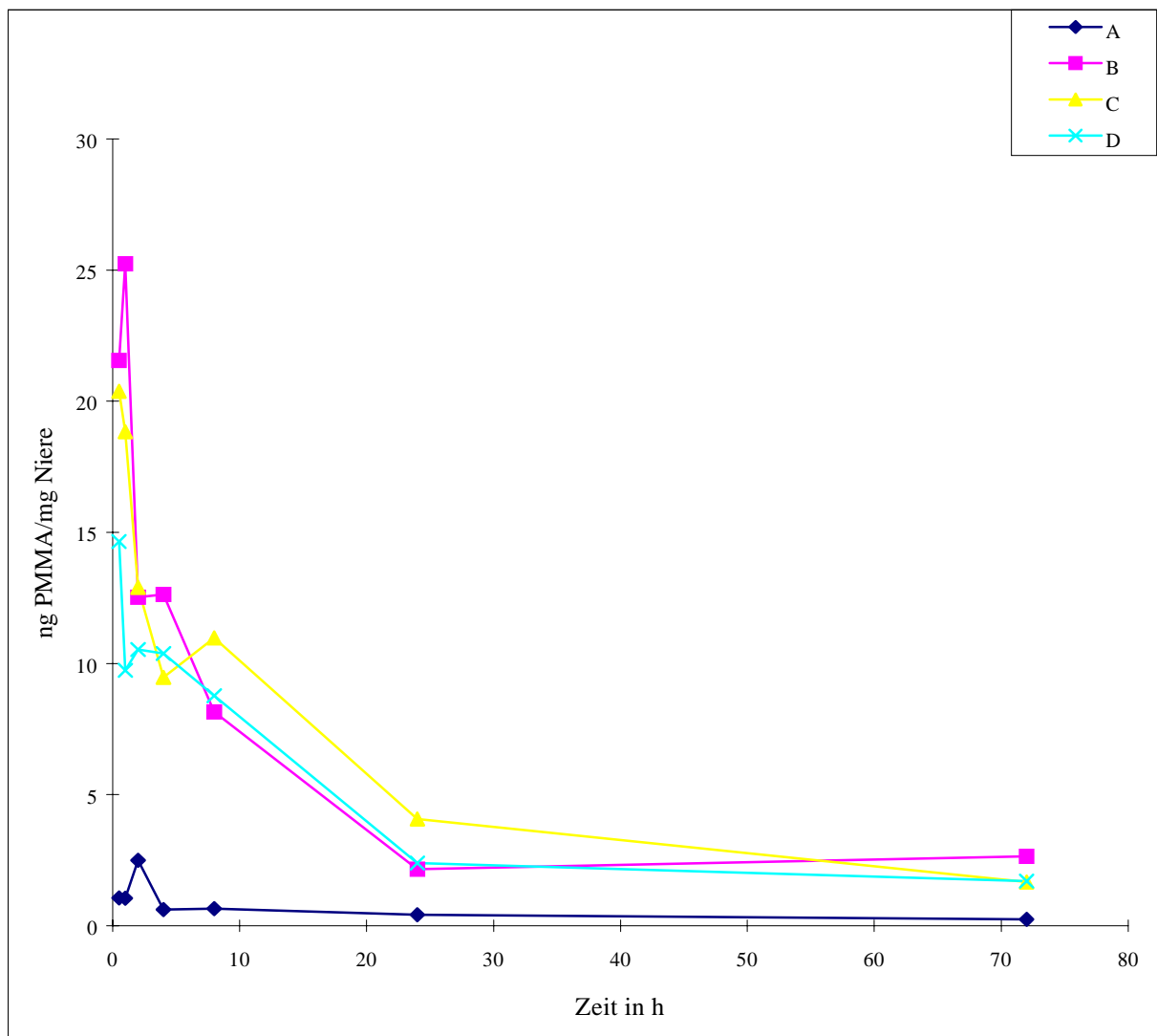


Abb. 37: Zeitlicher Verlauf der PMMA-Konzentrationen (A, B, C, D) in der Nieren (ng PMMA/mg Organmasse)

In der Niere kommt es zu einem gleichmäßigen und kontinuierlichen Abfall der Nanopartikelkonzentrationen für die beschichteten Zubereitungen. Die Unterschiede im Verlauf sind gering, was auch durch die nur vereinzelt auftretenden Signifikanzen unterstrichen wird. Gruppe A zeigt nach einem Anstieg zum 2-Stunden-Wert einen langsamen Abfall, dabei liegen die Werte aber weit unter denen der beschichteten Präparationen.

4.2.3.5 Konzentrationsverläufe in der Lunge (ng PMMA/mg Lunge)

A: PMMA-Partikel

B: Polysorbat 80 beschichtete PMMA-Partikel

C: Poloxamer 407 beschichtete PMMA-Partikel

D: Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Partikel

Tab. 87: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Lungengewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation A | | | B | | |
|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 6,385 | 4,896 | 8,237 | 16,316 | 11,108 | 19,431 |
| 1 | 6,993 | 5,609 | 8,345 | 19,715 | 12,267 | 27,075 |
| 2 | 44,723 | 20,769 | 70,534 | 21,209 | 18,956 | 30,582 |
| 4 | 7,336 | 5,696 | 7,676 | 10,406 | 5,319 | 21,489 |
| 8 | 6,962 | 4,372 | 9,893 | 13,170 | 8,125 | 16,158 |
| 24 | 5,217 | 4,466 | 6,028 | 6,472 | 3,899 | 10,551 |
| 72 | 4,311 | 3,334 | 4,802 | 12,844 | 8,857 | 17,839 |
| 168 | 2,318 | 1,184 | 2,741 | 5,661 | 4,489 | 10,308 |

Tab. 88: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen C und D im Lungengewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation C | | | D | | |
|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 45,661 | 38,322 | 50,836 | 41,702 | 37,687 | 48,204 |
| 1 | 36,962 | 30,608 | 39,028 | 31,203 | 29,815 | 36,370 |
| 2 | 32,113 | 23,674 | 37,931 | 22,014 | 20,333 | 22,998 |
| 4 | 23,793 | 19,078 | 24,744 | 20,706 | 18,563 | 21,368 |
| 8 | 17,678 | 16,681 | 20,515 | 14,565 | 11,859 | 14,932 |
| 24 | 4,564 | 2,624 | 7,069 | 3,803 | 3,426 | 4,893 |
| 72 | 1,464 | 1,157 | 2,742 | 1,090 | 1,029 | 1,630 |
| 168 | 0,477 | 0,361 | 0,968 | 0,786 | 0,583 | 1,036 |

Tab. 89: Statistische Auswertung (Mann-Whitney-Test) der Präparationen A, B, C, D zu den einzelnen Zeitpunkten gegeneinander

| Zeit/h | Präparation | | | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A-B | A-C | A-D | B-C | B-D | C-D |
| 0,5 | | x | x | x | x | |
| 1 | x | x | x | | x | |
| 2 | | | | | | |
| 4 | | x | x | | | |
| 8 | | x | x | x | | x |
| 24 | | | | | | |
| 72 | x | x | x | x | x | |
| 168 | x | x | x | x | x | |

x:p<0,05

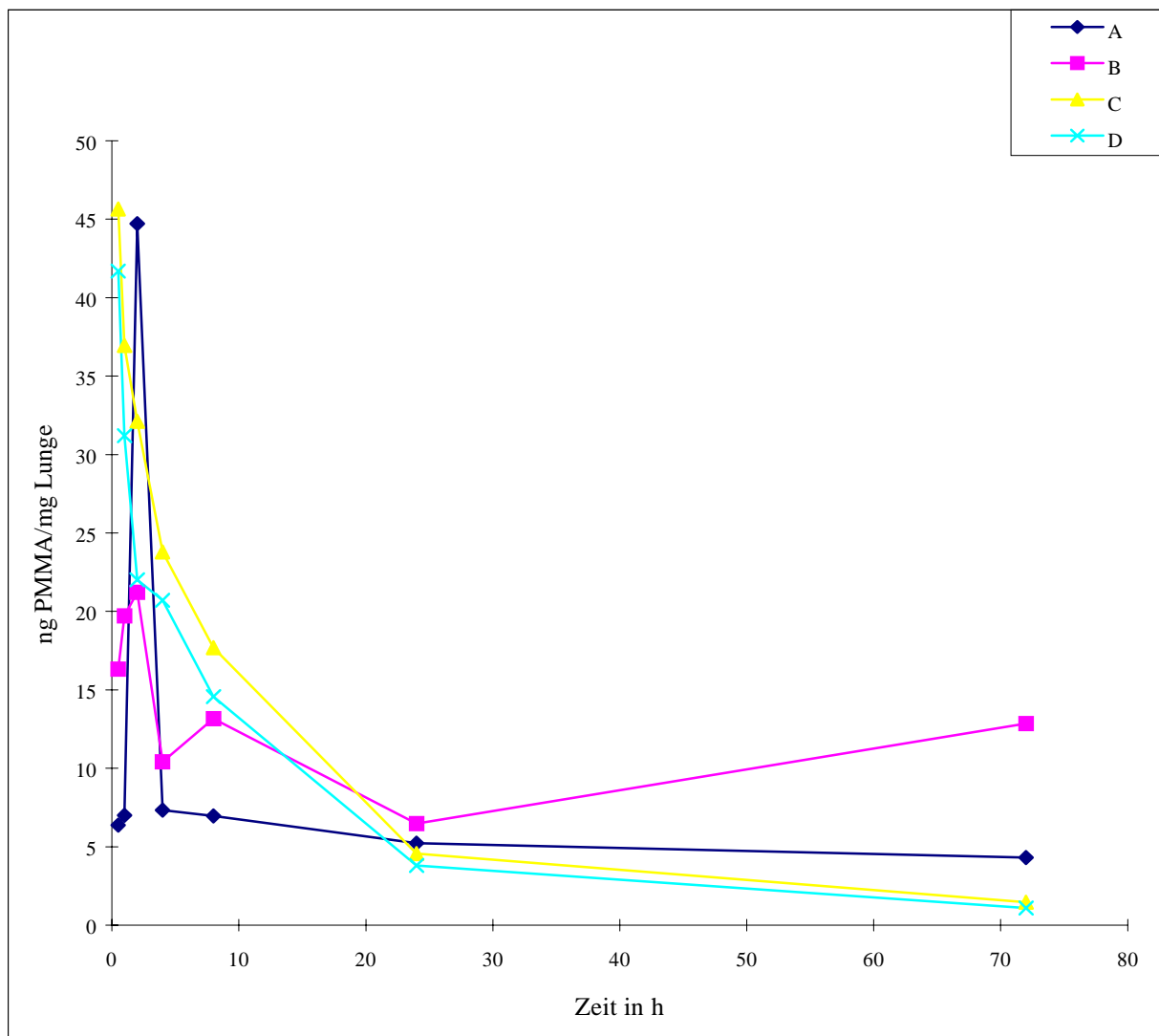


Abb. 38: Zeitlicher Verlauf der PMMA-Konzentrationen (A, B, C, D) in der Lunge (ng PMMA/mg Organmasse)

Die in der Lunge gefundenen Werte zeigen einen nahezu synchronen Verlauf für C und D. Nach einem Maximalwert am ersten Zeitmeßpunkt kommt es in den ersten 8 Stunden zu einem steilen und im weiteren Verlauf zu einem verzögerten Abfall. Der 2-Stunden-Wert der Präparation A weicht sehr stark von denen der übrigen Zeitpunkte ab und ist wahrscheinlich auf eine nicht ausreichende Beschallung der Injektionssuspension zurückzuführen, so daß große Aggregate in den Lungengefäßen herausgefiltert wurden. Der Konzentrationsabfall der Gruppe B verläuft wesentlich langsamer, als der der Zubereitungen C und D, so daß die letzten beiden Werte statistisch signifikant über allen anderen liegen.

4.2.3.6 Konzentrationsverläufe im Herz (ng PMMA/mg Herz)

A: PMMA-Partikel

B: Polysorbat 80 beschichtete PMMA-Partikel

C: Poloxamer 407 beschichtete PMMA-Partikel

D: Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Partikel

Tab. 90: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Herzgewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation A | | | B | | |
|--------|---------------|-------|-------|---------------|-------|--------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 0,277 | 0,193 | 0,759 | 8,790 | 4,952 | 12,291 |
| 1 | 0,408 | 0,345 | 0,566 | 12,260 | 6,673 | 16,024 |
| 2 | 1,264 | 0,852 | 2,598 | 4,231 | 3,586 | 4,469 |
| 4 | 0,412 | 0,347 | 0,491 | 5,141 | 2,915 | 6,199 |
| 8 | 0,491 | 0,392 | 0,642 | 2,416 | 1,620 | 3,787 |
| 24 | 0,247 | 0,173 | 0,361 | 1,148 | 0,945 | 1,334 |
| 72 | 0,169 | 0,129 | 0,208 | 1,866 | 1,461 | 2,279 |
| 168 | 0,010 | 0,006 | 0,052 | 1,376 | 1,190 | 2,389 |

Tab. 91: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen C und D im Herzgewebe (mg), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation C | | | D | | |
|--------|---------------|--------|--------|---------------|--------|--------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 19,983 | 18,354 | 22,935 | 18,313 | 14,901 | 21,050 |
| 1 | 14,673 | 10,905 | 18,275 | 9,599 | 8,680 | 11,043 |
| 2 | 10,688 | 7,457 | 13,934 | 7,203 | 6,612 | 7,949 |
| 4 | 8,261 | 7,335 | 10,647 | 7,511 | 7,320 | 9,215 |
| 8 | 6,518 | 5,577 | 7,653 | 5,092 | 4,201 | 5,808 |
| 24 | 1,307 | 0,791 | 1,918 | 1,268 | 1,095 | 1,425 |
| 72 | 0,351 | 0,292 | 0,405 | 0,335 | 0,261 | 0,533 |
| 168 | 0,426 | 0,255 | 0,551 | 0,388 | 0,320 | 0,437 |

Tab. 92: Statistische Auswertung (Mann-Whitney-Test) der Präparationen A, B, C, D zu den einzelnen Zeitpunkten gegeneinander

| Zeit/h | Präparation | | | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A-B | A-C | A-D | B-C | B-D | C-D |
| 0,5 | x | x | x | x | x | |
| 1 | x | x | x | | | |
| 2 | x | x | x | x | x | |
| 4 | x | x | x | x | x | |
| 8 | x | x | x | x | x | |
| 24 | x | x | x | | | |
| 72 | x | x | x | x | x | |
| 168 | x | x | x | x | x | |

x:p<0,05

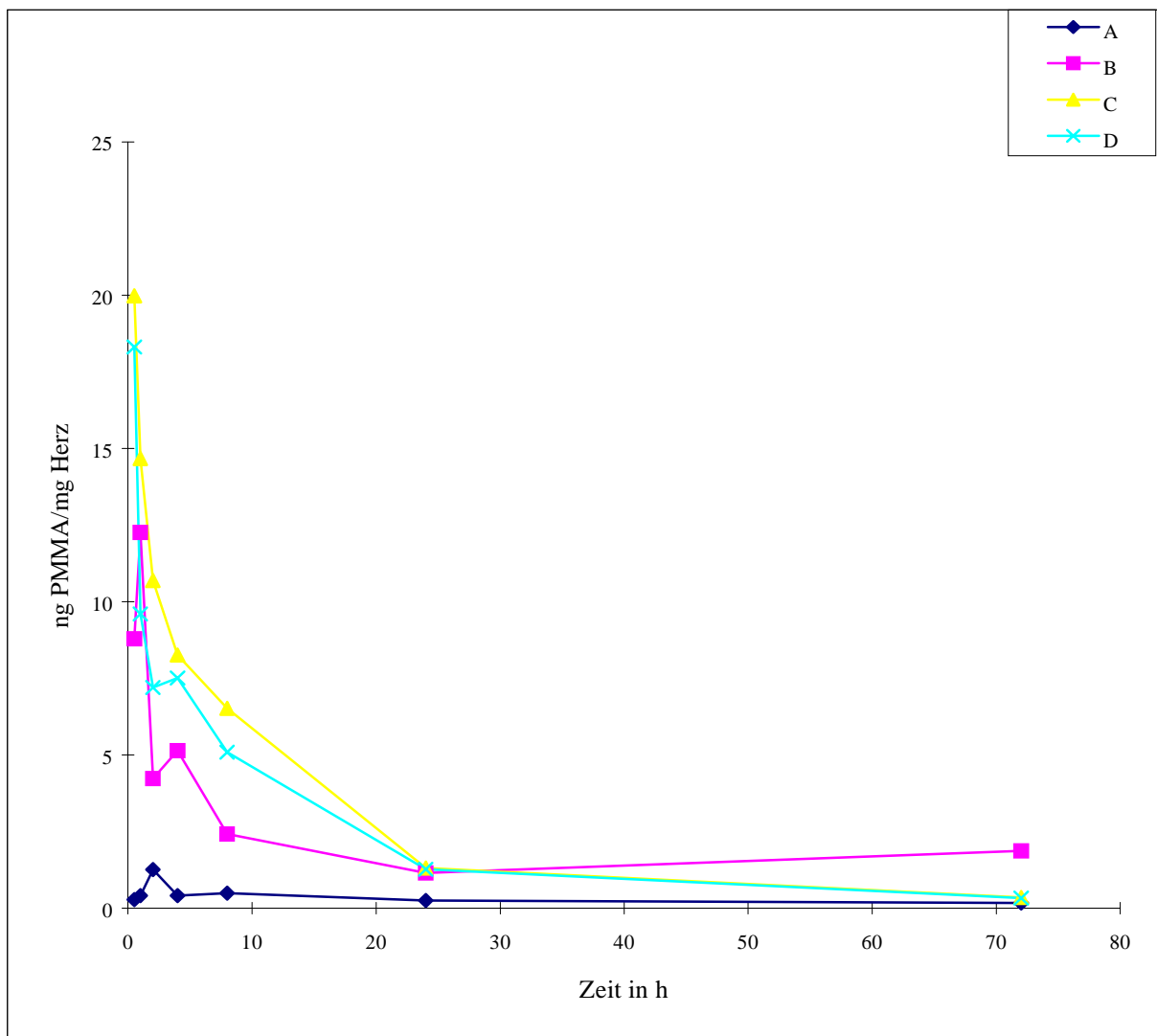


Abb. 39: Zeitlicher Verlauf der PMMA-Konzentrationen (A, B, C, D) im Herz (ng PMMA/mg Organmasse)

Die Konzentrationsabfälle von C und D verlaufen ähnlich wie in der Lunge. Die im Herz gefundenen Werte für B liegen erst nach 24 Stunden statistisch signifikant höher als die der anderen Zubereitungen.

4.2.3.7 Konzentrationsverläufe im linken Os femoris (ng PMMA/Os femoris)

A: PMMA-Partikel

B: Polysorbat 80 beschichtete PMMA-Partikel

C: Poloxamer 407 beschichtete PMMA-Partikel

D: Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Partikel

Tab. 93: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Knochenmark des li. Oberschenkels, dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation A | | | B | | |
|--------|----------------|---------|---------|----------------|---------|---------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 79,669 | 47,023 | 91,525 | 157,305 | 98,771 | 215,955 |
| 1 | 86,089 | 60,748 | 112,790 | 170,225 | 127,601 | 177,140 |
| 2 | 123,800 | 116,720 | 157,205 | 149,700 | 117,405 | 245,015 |
| 4 | 105,115 | 99,979 | 116,500 | 109,020 | 64,660 | 125,105 |
| 8 | 67,394 | 50,829 | 84,221 | 145,418 | 112,218 | 168,829 |
| 24 | 131,602 | 114,403 | 147,239 | 182,140 | 140,651 | 202,834 |
| 72 | 110,980 | 89,913 | 122,425 | 179,050 | 138,145 | 233,435 |
| 168 | 108,735 | 53,599 | 121,168 | 195,052 | 119,040 | 206,109 |

Tab. 94: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen C und D im Knochenmark des li. Oberschenkels, dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation C | | | D | | |
|--------|----------------|---------|---------|----------------|---------|---------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5 | 175,740 | 143,190 | 211,075 | 125,960 | 106,778 | 149,190 |
| 1 | 181,385 | 142,715 | 187,785 | 168,170 | 107,686 | 191,630 |
| 2 | 545,200 | 402,090 | 586,815 | 99,957 | 77,432 | 151,680 |
| 4 | 215,200 | 136,383 | 252,740 | 122,810 | 84,771 | 150,810 |
| 8 | 212,409 | 172,773 | 222,671 | 139,130 | 109,673 | 178,314 |
| 24 | 242,972 | 182,953 | 260,136 | 157,870 | 153,371 | 189,679 |
| 72 | 305,870 | 188,053 | 367,655 | 116,572 | 81,051 | 207,460 |
| 168 | 263,653 | 195,437 | 376,964 | 146,356 | 69,487 | 201,312 |

Tab. 95: Statistische Auswertung (Mann-Whitney-Test) der Präparationen A, B, C, D zu den einzelnen Zeitpunkten gegeneinander

| Zeit/h | Präparation | | | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A-B | A-C | A-D | B-C | B-D | C-D |
| 0,5 | x | x | x | | | |
| 1 | | x | | | | |
| 2 | | x | | x | | x |
| 4 | | | | | | |
| 8 | x | x | x | | | |
| 24 | | x | x | | | |
| 72 | | | | | | |
| 168 | | x | | | | |

x:p<0,05

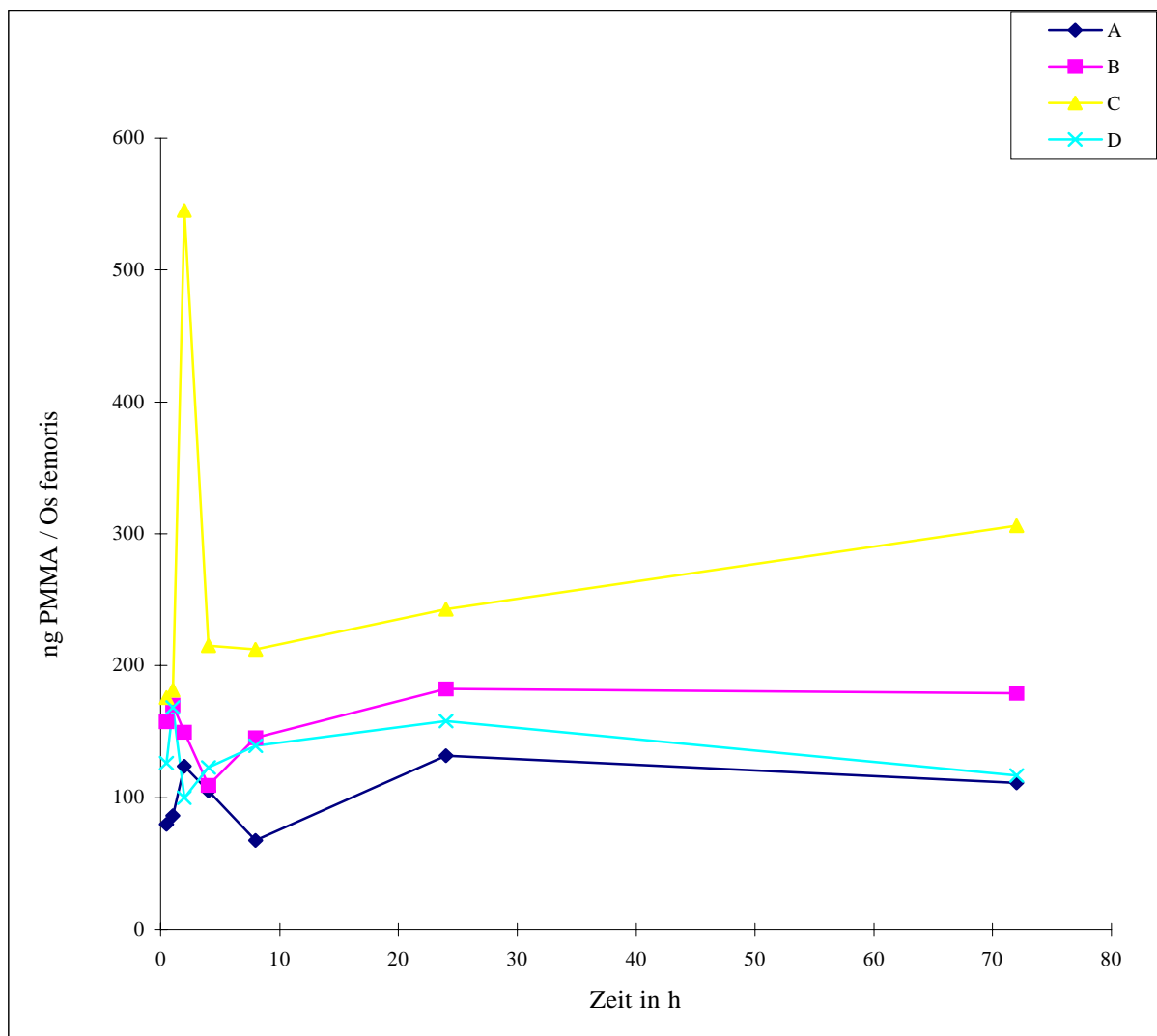


Abb. 40: Zeitlicher Verlauf der PMMA-Konzentrationen (A, B, C, D) im Knochenmark (ng PMMA pro Os femoris)

Die im linken Femur gefunden Nanopartikelkonzentrationen zeigen eine gute Differenzierung der Präparationen, wobei die starken Streuungen der Einzelwerte (1. u. 3.Quartil) mit berücksichtigt werden müssen. Aus diesem Grund sind auch die im Diagramm deutlich sichtbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Nanopartikelzubereitungen nur an wenigen Punkten statistisch signifikant.

4.2.3.8 Konzentrationsverläufe im Blut (ng PMMA/ml Blut)

A: PMMA-Partikel

B: Polysorbat 80 beschichtete PMMA-Partikel

C: Poloxamer 407 beschichtete PMMA-Partikel

D: Poloxamin 908 beschichtete PMMA-Partikel

Tab. 96: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Blut (ml), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation A | | | B | | |
|--------|---------------|--------|---------|----------------|---------|---------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5h | 765,40 | 483,40 | 1094,80 | 1890,00 | 1573,50 | 2148,20 |
| 1h | 765,90 | 679,10 | 822,50 | 632,40 | 479,50 | 896,20 |
| 2h | 422,90 | 258,10 | 721,80 | 291,20 | 265,30 | 317,00 |
| 4h | 884,20 | 732,50 | 998,00 | 271,80 | 239,10 | 313,50 |
| 8h | 700,80 | 533,20 | 839,70 | 266,90 | 230,60 | 282,30 |
| 24h | 924,70 | 686,60 | 1098,80 | 161,90 | 154,70 | 195,70 |
| 72h | 336,70 | 274,60 | 401,90 | 170,30 | 159,00 | 174,70 |
| 168h | 67,10 | 52,10 | 67,40 | 74,20 | 53,20 | 84,20 |

Tab. 97: PMMA-Konzentrationen (ng) der Zubereitungen A und B im Blut (ml), dargestellt als Medianwert mit 1. u. 3. Quartil (Q25, Q75) zu den einzelnen Zeitpunkten

| Zeit/h | Präparation C | | | D | | |
|--------|------------------|-----------|-----------|------------------|----------|-----------|
| | Median | Q25 | Q75 | Median | Q25 | Q75 |
| 0,5h | 123976,40 | 114055,00 | 127864,60 | 102644,00 | 95783,90 | 107783,30 |
| 1h | 79812,40 | 69132,80 | 89048,10 | 60820,40 | 59116,80 | 64238,00 |
| 2h | 65813,80 | 48559,20 | 74318,90 | 48754,40 | 47943,00 | 50876,80 |
| 4h | 53524,50 | 47043,50 | 56848,90 | 46378,90 | 43165,80 | 49674,60 |
| 8h | 38002,40 | 33798,30 | 39351,70 | 30124,90 | 22478,10 | 34104,90 |
| 24h | 6233,40 | 2554,60 | 11134,90 | 4560,90 | 3976,50 | 5085,20 |
| 72h | 66,30 | 61,00 | 77,90 | 89,50 | 75,10 | 103,40 |
| 168h | 64,80 | 40,90 | 79,30 | 85,10 | 75,80 | 100,00 |

Tab. 98: Statistische Auswertung (Mann-Whitney-Test) der Präparationen A, B, C, D zu den einzelnen Zeitpunkten gegeneinander

| Zeit/h | Präparation | | | | | |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A-B | A-C | A-D | B-C | B-D | C-D |
| 0,5 | x | x | x | x | x | x |
| 1 | | x | x | x | x | |
| 2 | | x | x | x | x | |
| 4 | x | x | x | x | x | |
| 8 | x | x | x | x | x | |
| 24 | x | x | x | x | x | |
| 72 | x | x | x | x | x | |
| 168 | | | x | | | |

x:p<0,05

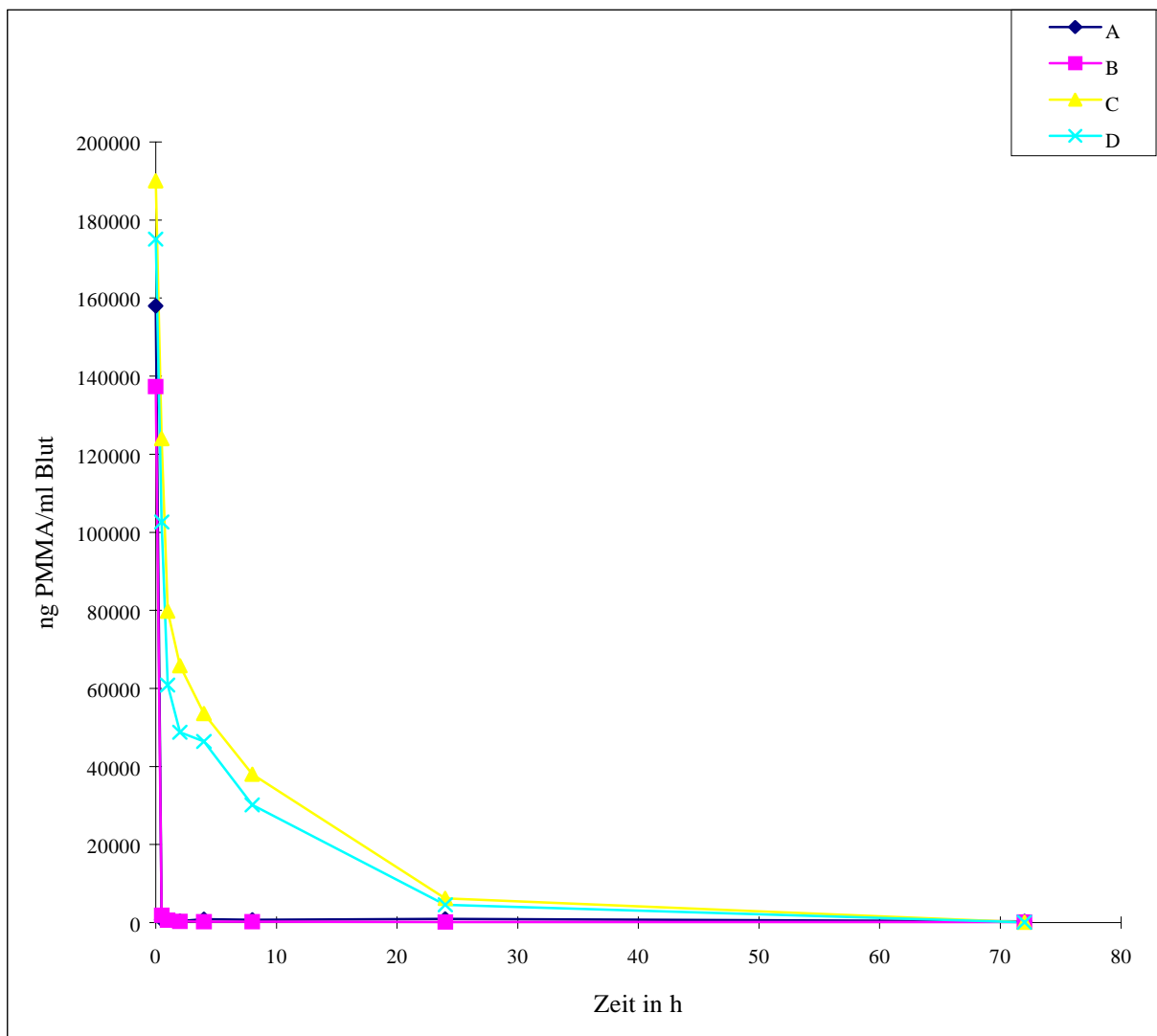


Abb. 41: Zeitlicher Verlauf der PMMA-Konzentrationen (A, B, C, D) im Blut (ng PMMA/ml Blut)

Die Partikel der Gruppen C und D zeigen im Blut eine längere Zirkulation, die sich erst beim 72-Stunden-Wert den Konzentrationen der anderen beiden Zubereitungen annähert. Die Partikelzubereitungen A und B werden schon nach sehr kurzer Zeit, vor dem ersten Zeitmeßpunkt, aus dem Blut eliminiert, so daß am 30-Minuten-Wert nur noch sehr geringe Konzentrationen gemessen werden konnten.

Um das Verhalten der Nanopartikelpräparationen im Blut besser beurteilen zu können, wurden die Blutwerte mit Hilfe des Pharmakokinetikprogramms TOPFIT 2.1 ausgewertet:

Tab. 99: Pharmakokinetische Parameter (Fläche unter der Kurve, Ausscheidungsgeschwindigkeit, Verteilungsvolumen) errechnet mit dem Drei-Kompartiment-Modell aus den ermittelten PMMA-Konzentrationen im Blut

| Präparation | AUC [ng/ml*h] | Cl [ml/min] | Vc [ml] |
|-------------|------------------|----------------|------------|
| A | 78200 | 0,00222 | 13,7 |
| B | 42100 | 0,00359 | 2,45 |
| C | 878000 | 0,000238 | 0,0394 |
| D | 705000 | 0,000273 | 0,00497 |

Die errechneten AUC-Werte der Präparation C u. D liegen um den Faktor 10-20 über denen der Gruppen A u. B. Die relativ hohen Werte von A und B im Vergleich zu Versuch I und II sind auf konstant hohe Werte an den letzten Zeitpunkten zurückzuführen. Die computergestützte Modellanpassung und Berechnung erfolgt bis zum theoretischen Nullwert der Partikel im Blut. Auf eine Darstellung (graphisch und tabellarisch) der absoluten und relativen Differenzen zwischen ermittelten und kalkulierten Werten wurde verzichtet.

4.2.4 Auswertung der Körpergewichtsveränderungen während der Versuche

Während der Versuche wurde von allen Tieren das Körpergewicht zu Beginn und zum Ende der Behandlung bestimmt, um eine Aussage über die Verträglichkeit der Testsubstanzen zu erhalten. Die durchschnittlichen Gewichte der Tiere betragen zu Versuchsbeginn:

Versuch I : 20,01g SD ± 1,11g

Versuch II : 23,96g SD ± 2,14g

Versuch III : 23,18g SD ± 2,43g.

Nach der intravenösen Verabreichung der Nanopartikelzubereitungen kam es in allen drei Versuchen zu einer statistisch signifikanten Gewichtsabnahme ($p < 0,05$). Die statistischen Untersuchungen wurden mit dem Paarvergleich nach Wilcoxon durchgeführt. Die Werte in der Tabelle ergaben sich aus der Berechnung der Differenz (Mittelwert) aus dem Körpergewicht zum Ende (KG2) und zu Beginn (KG1) des Versuchs.

Tab. 100: Veränderung der Körpergewichte (in Versuch I, II, III) während der Versuchszeit, dargestellt als Differenz aus den Körpergewichten (g) zum Ende und zu Beginn der Versuche und den Ergebnissen des Wilcoxon-Tests (↓/↑)

| Zeitpunkt [h] | Versuch I [g] | Versuch II [g] | Versuch III [g] |
|--------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| 0,5 | n.v. | -1,57 [↓] | -0,76 [↓] |
| 1 | -0,67 [↓] | -1,19 [↓] | -1,12 [↓] |
| 2 | -0,62 [↓] | -1,17 [↓] | -0,88 [↓] |
| 4 | n.v. | -1,42 [↓] | -1,18 [↓] |
| 8 | -1,11 [↓] | -1,79 [↓] | -1,49 [↓] |
| 24 | -0,96 [↓] | -0,92 [↓] | -0,81 [↓] |
| 72 | +0,57 [↑] | -0,39 [↓] | -0,87 [↓] |
| 168 | +0,11 [↑] | +0,12 * | -0,83 [↓] |

[↓] : statistisch signifikanter Abfall ($p < 0,05$)

[↑] : statistisch signifikanter Anstieg ($p < 0,05$)

* : statistisch nicht signifikanter Anstieg ($p > 0,05$)

n.v.: nicht verfügbare Daten

Nach Applikation der Nanopartikelzubereitungen kam es in allen Versuchen zu einer deutlichen Gewichtsabnahme, welche nach 8 h ihr Maximum erreichte. Danach erholten sich die Tiere wieder. Die Gewichtsabnahme war zum einen durch die streßbedingte Urin- und Kotabgabe während und nach der Injektion bedingt. Nur die Tiere aus Versuch I zeigten 72 und 168 Stunden nach der Behandlung eine statistisch signifikante Körpergewichtszunahme. Da es von Behandlungsbeginn bis zum Versuchsende zu keiner Tumorgewichtszunahme kam, kann ausgeschlossen werden, daß die Körpergewichtszunahme durch ein weiteres Tumorstadium bedingt war. Bei den in Versuch II und III verwendeten nude-Mäusen konnte zu keinem Zeitpunkt eine statistisch abgesicherte Gewichtszunahme beobachtet werden. Die Abnahme der Körpergewichte betrug maximal (8h-Wert) für:

- Versuch I : 5,54%,
- Versuch II : 7,47% und
- Versuch III : 6,42%

von den Körpergewichten zu Behandlungsbeginn.

Damit liegen die Gewichtsverluste unter denen von der UKCCCR (1998) vorgegebenen Werten. Drastische Gewichtsabnahmen in einem Bereich von mehr als 20% sind ein deutliches Zeichen für eine pharmakonbedingte Toxizität und haben aus tierschützerischen Gründen das Abtöten der Tiere zur Folge.

4.3 Bewertung der Neoangiogenese

Mit Hilfe des immunhistologischen Färbeverfahren sollte versucht werden, den Grad der vom Tumor induzierten Neoangiogenese zu bestimmen und um gleichzeitig eine Aussage über die Blutgefäße des wachsenden Geschwulstgewebes treffen zu können.

Für das untersuchte Protein und seinen Rezeptor konnten für die einzelnen Tumoren folgende Ergebnisse ermittelt werden:

Tab. 100: Grad der Ausstattung der Tumoren (B16, MaTu, U373) mit dem Angiogenesefaktor (VEGF) und seinem Rezeptor (VEGF-Rezeptor)

| Tumor | VEGF | VEGF-Rezeptor |
|-----------------------------|-------------|----------------------|
| Melanom / B16 | ++ | ++ |
| Mammakarzinom / MaTu | + | + |
| Glioblastom / U373 | - | - |

- : keine angefärbten Zellen auf 4x100 ausgezählten Zellen

+ : 2-5 angefärbte Zellen auf 4x100 ausgezählten Zellen

++ : 5-10 angefärbte Zellen auf 4x100 ausgezählten Zellen

Das Melanom weist sowohl die größte Anzahl an VEGF-Protein enthaltende Tumorzellen als auch die meisten markierten Gefäßendothelzellen (VEGF-Rezeptor) auf. In den histologischen Schnitten des Mammakarzinoms zeigen sich angefärbte Zellen (VEGF-Protein und – Rezeptor) in wesentlich geringerer Häufigkeit. In keinem der untersuchten Gehirnschnitte konnten angefärbte Tumor- oder Gefäßendothelzellen gefunden werden. Als Beispiel für den Nachweis von VEGF und VEGF-Rezeptor sind 2 Gewebeschnitte des B16-Melanoms nach der immunhistologischen Färbung abgebildet.

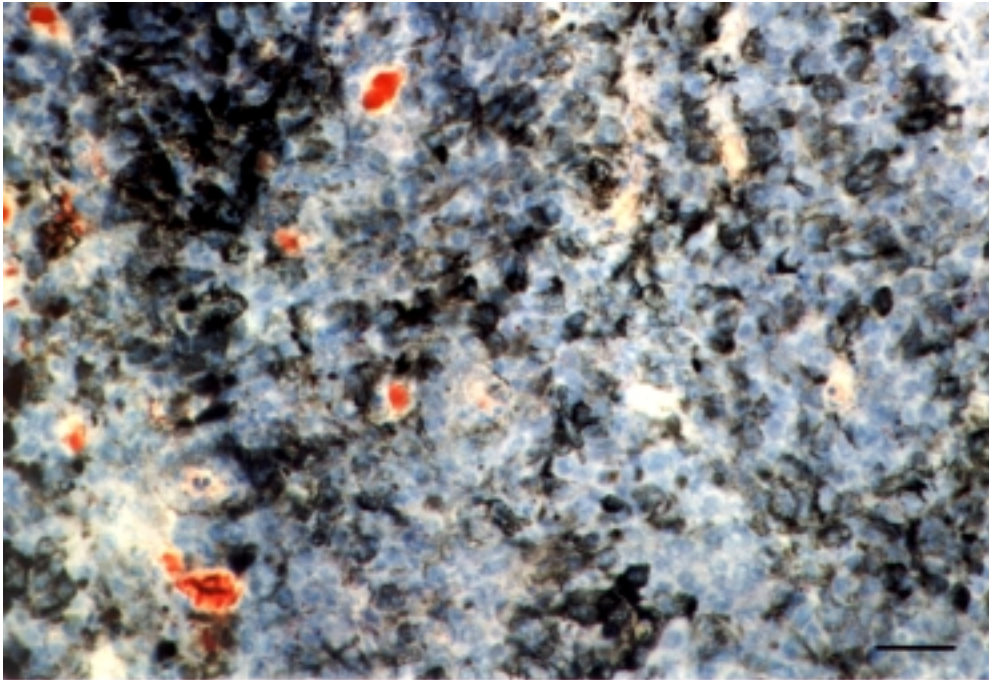


Abb. 42: Immunhistologische Untersuchung des B16-Melanoms, die rot angefärbten Tumorzellen sind VEGF-positiv, Hämalaungegenfärbung, der Balken entspricht 50 μm

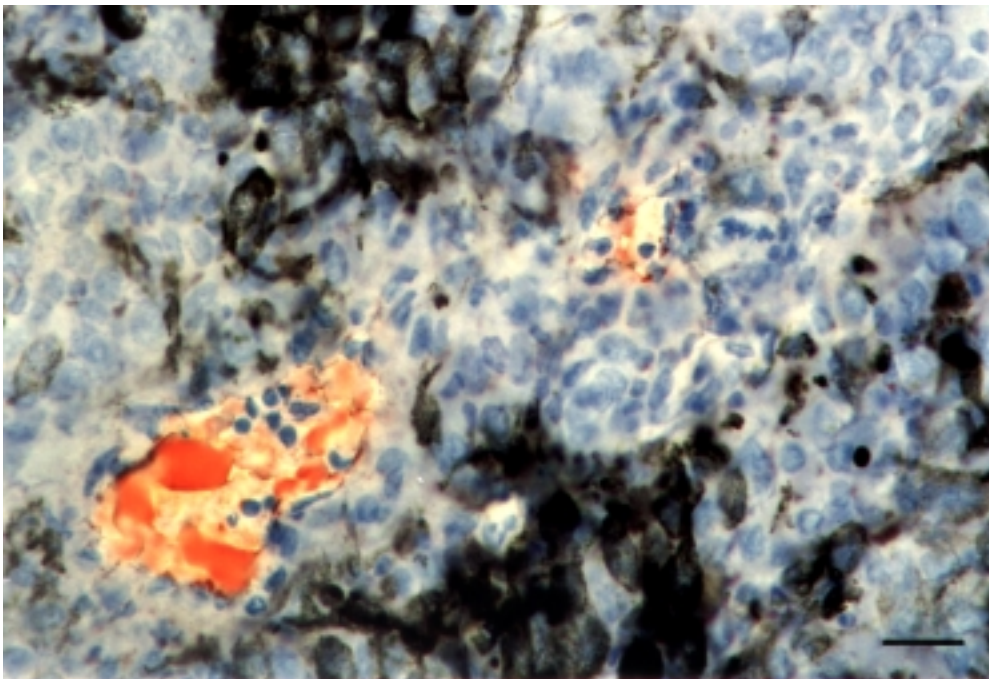


Abb. 43: Immunhistologische Untersuchung des B16-Melanoms, die rot angefärbten Endothelzellen sind VEGF-Rezeptor-positiv, Hämalaungegenfärbung, der Balken entspricht 25 μm

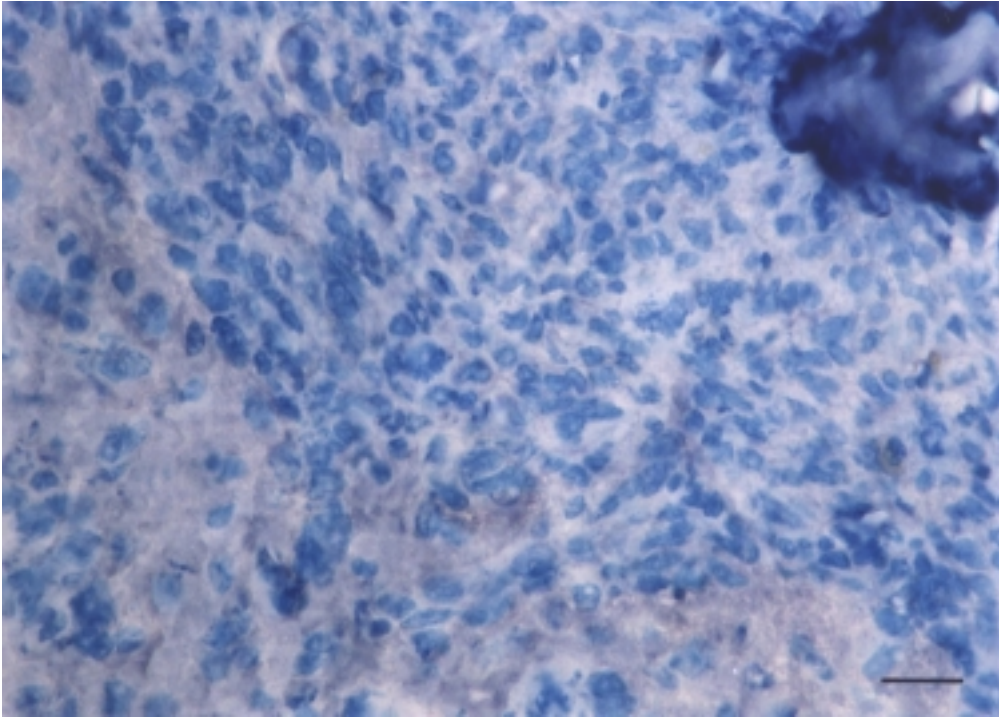


Abb. 44: Immunhistologische Untersuchung des U-373-Glioblastoms (Gewebeschnitt), keine positive Zellen, Hämalaugegegenfärbung, der Balken entspricht 25 μm

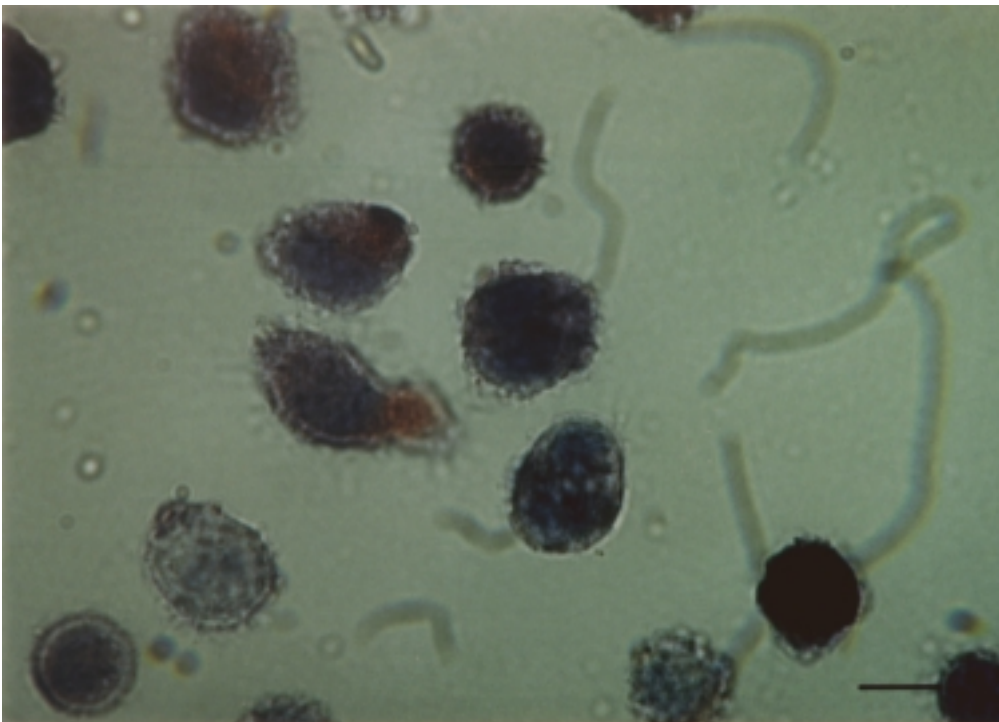


Abb. 45: Immunhistologische Untersuchung der U-373-Zellen aus der Zellkultur, die rot angefärbten Zellen sind VEGF-positiv, Hämalaugegegenfärbung, der Balken entspricht 10 μm

Zusätzlich zu den untersuchten Gewebeschnitten wurden die Glioblastomzellen aus der Kultur auf das Vorhandensein von VEGF untersucht, 40% der Zellen zeigten eine VEGF-Expression.