

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Ziel und experimentelles Design**

Ziel der Experimente war es, die Konzentration des Chemotherapeutikums 5-Fluorourazil (5-FU) in Lebertumoren durch die Kopplung an ein kontrastmitteltragendes Liposom im Sinne eines Therapie-Diagnostik-Liposoms (TDL) in der MRT sichtbar zu machen. Es wurden verschiedene Applikationsvarianten untersucht:

- a) venös (Schwanzvene)
- b) arteriell (A. hepatica) und
- c) arterielle Chemoembolisation (A. hepatica).

Der Effekt der verschiedenen Applikationsformen wurde durch wiederholte MR-Messungen anhand des Signal-Zeit-Verlaufes in Leber, Tumor und Tumorrandgebiet kontrolliert. Das Beobachtungsintervall wurde variiert (Messung bis zum sichtbaren Signalabfall) und zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h erfaßt.

Als Referenzmethode diente die HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) der Proben von Leber, Tumor, Tumorrandsaum, Niere, Milz, Magen, Pankreas, Lunge Herz und Serum.

Aus sämtlichen Proben wurden die entsprechenden 5-FU/M3-Profile gewonnen.

Zur Erfassung des Einflusses von 5-FU auf die kontrastmittelgelabelten Liposomen wurden Gruppen gebildet, bei denen die Applikation von liposomalem Diagnostikum ohne 5-FU erfolgte (Gruppen 1, 4, 6). Die Gruppen 3 und 8 stellten Kontrollgruppen dar, wobei Gruppe acht 250 µmol/kg Gd-DTPA und Gruppe drei 33 µmol/kg Gd-DTPA verabreicht wurden.

##### **3.1.1 Fragestellung und Versuchsgruppen**

Im einzelnen sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Besteht unter intravenöser, intraarterieller und intraarterieller Applikation in Kombination mit einem Embolisat eine Korrelation zwischen den ermittelten Signalintensitäten im MRT-Bild und den mit der HPLC gemessenen 5-FU-Gehalten?
2. Verändert sich die Kontrastmittel-Kinetik durch die Anwesenheit von 5-FU?
3. Welche Folgen hat die Anlagerung eines Kontrastmittels an das 5-FU-Liposom hinsichtlich des Anreicherungsverhaltens des Therapeutikums im Zielgewebe und in der Peripherie?
4. Wird durch die Verkapselung von Gd-DTPA eine spezifische Anreicherung des Kontrastmittels im Tumorgewebe erreicht?

Um sich einen Überblick zu verschaffen, bei welcher Konzentration ein maximales Signal erreicht wird bzw. die T2-Effekte von Gd-DTPA überwiegen und Auslöschungsphänomene auftreten, wurden zusätzlich die Signalintensitäten von liposomalem Gd-DTPA ohne und mit verkapseltem 5-FU in einer Verdünnungsreihe mit Blut bzw. isotonischer Kochsalzlösung ermittelt und einer Konzentrationsreihe von reinem Gd-DTPA gegenübergestellt. Pro Gruppe und Zeitpunkt wurden 5 Tiere untersucht. In den Gruppen, in denen lediglich MRT-Messungen durchgeführt wurden (Gruppen 1, 3, 4, 6, 8), wurden pro Tier sämtliche Zeitpunkte bis zum Abklingen des Signals erfaßt.

**Tab. 1: Darstellung der Versuchsgruppen:** i.v. = intravenös; i.a. = intraarteriell; SUV-PEG = kleine, sterisch mit Polyethylenglykol stabilisierte Einschicht-Liposomen; 5-FU = 5-Fluorourazil; Embolisat = Spherex<sup>®</sup> (DSM); MRT = Magnetresonanztomographie; HPLC = Hochdruckflüssigkeits-chromatographie; \* = Gruppe 8 erhielt 250 µmol/kg Gd-DTPA

Gruppe	Appl.art	SUV-PEG	Gd-DTPA (33 µmol/kg)*	5-FU (40 mg/kg)	Sherex <sup>®</sup> (24 mg/kg)	MRT bis/ HPLC nach
1	i.v.	x	x			15, 30, 45, 60, 90 min
2	i.v.	x	x	x		15, 30, 45, 60, 90 min
3	i.v.		x			15, 30, 45, 60, 90 min
4	i.a.	x	x			15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 4, 8 h
5	i.a.	x	x	x		15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 4, 8 h
6	i.a.	x	x		x	15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h
7	i.a.	x	x	x	x	15, 30, 45, 60, 90 min, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h
8	i.v.		x			15, 30, 45, 60 min

### 3.1.2 Ablauf eigener Untersuchungen

Nach Transport und Aufarbeitung des Tumorzellmaterials wurde den Tieren in Narkose die Suspension nach der Ermittlung der entsprechenden Zelldichte unter die Leberkapsel implantiert.

Nach palpatorischer Ermittlung einer ausreichenden Tumorgröße (mind. 1,2 cm) wurden von den Tieren der intraarteriellen Gruppen nach Narkotisierung MR-Nativbilder angefer-

tigt. Es folgte die mikrochirurgische Operation und intraarterielle Applikation des Liposomenpräparates mit anschließender dynamischer MRT-Untersuchung bis zur Euthanasie.

Die intravenösen Gruppen wurden gleichfalls narkotisiert, die Schwanzvene katheterisiert und die Tiere in der Meßspule plaziert. Nach Erhebung der Nativbilder wurde das Liposomen-konstrukt über die Schwanzvene verabreicht und anschließend die dynamische MRT-Messung durchgeführt.

Nach Euthanasie in tiefer Narkose wurden die Organ- bzw. Blutproben der Tiere gewonnen und für die HPLC aufgearbeitet. Es erfolgte die Erfassung der Rohdaten m.H. der HPLC.

### **3.2 Versuchstiere**

#### **3.2.1 Herkunft und Haltung**

Bei den verwendeten Versuchstieren handelt es sich um männliche WAG/Rij-Ratten. Dieser Stamm wurde ursprünglich von Bacharach 1924 in den Glaxo-Laboratorien, Großbritannien aus einem Wistar-Stamm (Wistar Albino Glaxo) gezüchtet und schließlich seit 1960 in Rijswijk, Niederlanden weiter entwickelt (Charles River Laboratories, 1997). Die Tiere stammten aus dem Labor Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld, Deutschland und gelangten bei einer Körpermasse von 250-300 g in den Versuch.

Die Ratten wurden in Gruppen zu je 5 Tieren in Makrolonkäfigen (ca. 55x32 cm, Höhe: ca. 20 cm) auf entstaubtem Holzgranulat (Firma Altromin, Lage, Lippe, Deutschland) bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 45-55 % und einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie erhielten als Futter Altromin Standard-Diät für Ratten und Mäuse sowie Wasser ad libitum.

#### **3.2.2 Narkose**

Sämtliche Eingriffe an den Tieren erfolgten unter Narkose.

Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Xylazin (12 mg/kg) und Ketamin-HCl (80 mg/kg) intramuskulär (i.m.) anästhetisiert und je nach Bedarf i.m. bzw. i.v. (intravenös) nachdosiert.

### **3.3 Tumorimplantation**

#### **3.3.1 Tumormodell, Charakterisierung und Herkunft der Tumorzellen**

Es wurde das CC531-Adenokarzinom in die Leber der Versuchstiere implantiert, das ein etabliertes Modell humaner Lebermetastasen des kolorektalen Karzinoms darstellt. Histomorphologisch handelt es sich beim CC531 um ein mit 1,2 Dimethylhydralazin-

induziertes, moderat differenziertes, kaum immunogenes Adenokarzinom des Kolons (Thomas et al., 1993). Die Zellen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe "Drug Targeting", Max-Delbrück-Zentrum für Molekulardiagnostische Medizin, Berlin-Buch, zur Verfügung gestellt.

### 3.3.2 Aufarbeitung der Tumorzellsuspension

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

Nach dem Transport ruhte das Zellmaterial nochmals über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Spannung von 5.0 %, um eventuelle transportbedingte Vitalitätsschäden der Tumorzellen zu minimieren.

Das Medium wurde vorsichtig mit Hilfe einer Vakuumpumpe aus den Kulturflaschen abgesaugt und verworfen. Pro Flasche wurden 2 ml STV (0.05 % Trypsin/ 0.5 mM EDTA in PBS) einpipettiert, die Flasche vorsichtig geschwenkt und der Überstand abgesaugt. Die Pipettierung wurde wiederholt mit einer anschließenden Inkubation der Zellen bei 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Spannung von 5.0 % über 25 min. Nach der Entnahme des Zellmaterials aus dem Wärmeschrank wurden die Kulturflaschen mit der Handfläche gegen den Flaschenboden geschlagen, um den Zellrasen zu lösen. Mit der Zugabe von 10 ml Kulturmedium (GIBCO, RPMI 1640 with HEPES Buffer, with L-Glutamine; L-Glutamin: 1ml/100 ml Medium einer Stammlsg. von 29 mg/ml; Penicillin: 100 U/ml PBS; Streptomycin: 100 µg/ml PBS) pro Flasche wurde der Trypsinierungsvorgang abgeschlossen. Der gesamte Flascheninhalt kam in ein Falcon-Röhrchen und wurde kräftig geschüttelt. 50 µl des Röhrcheninhaltes wurden für die Zellzählung abgenommen.

Die übrige Suspension wurde bei 2500 U/min über 10 min zentrifugiert (Varifuge 3.0R, Hereus Instruments, Hanau, Deutschland), der Überstand anschließend abpipettiert und 20 ml PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4) zum Zellpellet hinzugefügt. Nach Schütteln des Röhrchens bis zur Klumpenfreiheit wurden das Zentrifugieren und Abpipettieren wiederholt. Nach dem Auffüllen mit RPMI-Medium auf das gewünschte Applikationsvolumen erfolgte die sofortige Implantation der Zellen.

Für die Zellzählung wurde die 50 µl Zellsuspension mit der gleichen Menge Trypanblau in einem Eppendorfgefäß gemischt und mit 50 µl dieser Mischung eine Neubauer-Zählkammer mit Hilfe einer Pipette befüllt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

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

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

### 3.3.3 Tumorimplantation

Nach Rasur und Desinfektion des OP-Feldes wurde kaudal des Processus (Proc.) xiphoideus in der Linea alba über 1-1,5 cm das Cavum abdominis eröffnet, der Lobus hepatis sinister hervor-gelagert, in cranialer Richtung die frisch aufgearbeitete Tumorzellsuspension ( $7,5 \times 10^5$  Zellen pro Tier) mit einer Kanüle 0,45x15 mm streng subkapsulär appliziert und der Einstich mit Gewebekleber (Histoacryl<sup>®</sup>, B. Braun Surgical GmbH, Melsungen, Deutschland) versiegelt.



**Abb. 2: Lobus hepatis sinister einer WAG/Rij-Ratte mit verschlossenem Stichkanal nach Tumorzellapplikation:** Zur streng subkapsulären Implantation wurde der linke Leberlappen auf die äußere Bauchdecke gelagert. Der Verschluss des Stichkanals erfolgte mit Fibrinkleber (schwarzer Pfeil). Im cranialen Wundwinkel erkennt man den Proc. xiphoideus, kaudal davon das Reservoir der subkapsulären Tumorzellsuspension (weißer Pfeil).

Mit einer Mischung aus je 0,03 ml Penicillin-G (Penicillin "Grünenthal", 1 Mega; Grünenthal GmbH, Stolberg, Deutschland) und Streptomycin (Streptomycin-Heyl 1g; Heyl, Chem.-pharm. Fabrik, Berlin, Deutschland) erfolgte die Infektionsprophylaxe intraperitoneal; die Laparotomiewunde wurde anschließend schichtweise verschlossen. Die Tiere bildeten nach 12 bis 16 Tagen Lebertumoren von 1 bis 1,5 cm im Durchmesser aus. Die Erfassung der Tumorgöße bis zum Beginn der Versuche erfolgte palpatorisch.

### **3.4 Liposomenpräparationen**

#### **3.4.1 Bestandteile des Liposomensystems**

Für die vorliegende Arbeit wurden die SUV-PEG-Liposomen als Vehikel für das Chemotherapeutikum (5-FU) und das MR-Kontrastmittel (Gd-DTPA) verwendet, das intravenös und intraarteriell sowie intraarteriell in Kombination mit einem Embolisat (DSM) appliziert wurde. Während die Effektivität von Liposomen als Carrier jeweils für Arznei-stoffe und Kontrastmittel bereits gezeigt wurde, liegen nach unserem Wissen noch keinerlei Erfahrungen für die Anwendung von Liposomen als gemeinsames Transportmolekül für Therapeutikum und Diagnostikum vor.

Aufgrund vorangegangener Versuche mit liposomal verkapseltem 5-FU und entsprechender Erfahrungen im Anreicherungsverhalten durch Organprofilierung von 5-FU und M3 mit der HPLC (s. Diskussion) wurde auch in der vorliegenden Arbeit dieses Therapeutikum angewendet.

Nach entsprechenden Vorversuchen (s. Diskussion) wurde Gd-DTPA als Kontrastmittel gewählt. Der Gd-DTPA-FS-Komplex wurde freundlicherweise von der Schering-AG, Berlin zur Verfügung gestellt.

Für die Embolisation wurde Spherex<sup>®</sup> (Degradable starch microspheres, DSM) genutzt. Dieses Embolisat besteht aus Stärkekügelchen bis 60 µm im Durchmesser, die eine temporäre mechanische Blockade des arteriellen Flusses auf der Verschlusschance von Arteriolen verursachen. Sie werden durch Serumamylase mit einer Halbwertszeit von 15 bis 30 min abgebaut (Dakhil et al., 1982). Die Applikation erfolgt intraarteriell in Suspension mit 5-FU im Sinne einer Chemoembolisation.

#### **3.4.2 Herstellung der Liposomen**

Die Liposomenpräparation erfolgte durch die Arbeitsgruppe "Drug Targeting", Max-Delbrück-Zentrum für Molekulardiagnostische Medizin, Berlin-Buch.

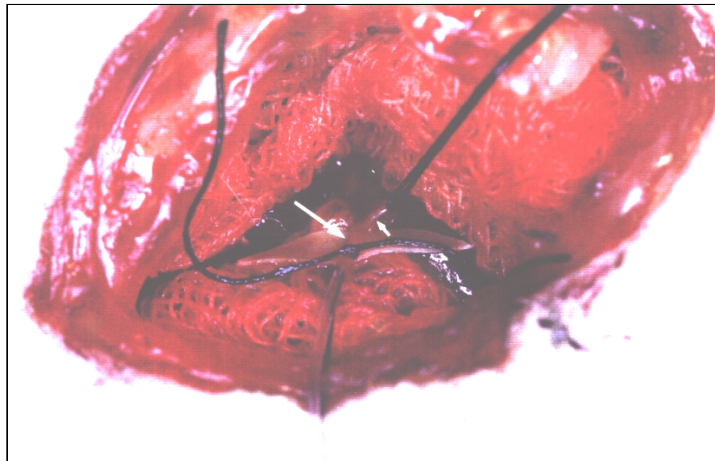
Hydriertes Ei-Phosphatidylcholin (HEPC, 50 mg/ml; Nattermann Phospholipid GmbH, Köln, Deutschland), Cholesterin (CH, 24,8 g/ml; Merck, Darmstadt, Deutschland) und Polyethylenglykol (MPEG-DSPE, 3000, 5,4 mg/ml; Sygena LTD, Liestal, Schweiz) wurden im molaren Verhältnis 1:1:0,1 in Chloroform gelöst. Die organische Phase wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der entstandene, gut getrocknete Lipidfilm mit einer 5-FU-Lösung (Ribolur<sup>®</sup> 1000; 50 mg/ml Infusionslösung, Ribosepharm GmbH, München, Deutschland) sowie einer Gd-DTPA-FS-Lösung resuspendiert. Diese Liposomendispersion wurde 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt, die dabei entstandenen Multischichtvesikel (MLV) einer Beschallung unterworfen (Rüsselbeschaller, 6x4 min mit 50 % Intensität, Branson B225 sonifer; Branson, Carouge-Geheve, Schweiz) und anschließend zentrifugiert

(3000 U/min über 20 min), um von der Liposomendispersion den Titanabrieb zu entfernen. Die Vesikelgröße wurde mit einem Photonenkorrelationspektrometer (Coulter Counter N4 MD modell and the AccuComp<sup>®</sup> System, Coulter Electronics Inc., Hialeah, US) bestimmt und bewegte sich in einer Größenordnung von  $100 \pm 50$  nm.

### 3.4.3 Applikation der Liposomenpräparationen

Die intraarterielle Applikation der therapeutisch-diagnostischen Präparationen wurde unter mikrochirurgischen Bedingungen mit Hilfe eines Operationsmikroskopes (20fache Vergrößerung, Zeiss Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

Nach einem rechtsseitigen Rippenbogenrandschnitt wurden die A. hepatica und die A. gastroduodenalis präpariert.



**Abb. 3: Operationssitus während der intraarteriellen Applikation:** Oben im Bild sind der rechte Rippenbogen (links) bzw. der Processus xiphoideus (rechts) zu sehen. Am unteren Bildrand verläßt der Katheter kaudal den OP-Bereich. Sowohl Magen und Darmkonvolut als auch Leber werden mit Gaze in ihrer Lage gehalten. Dargestellt sind die A. gastroduodenalis (großer Pfeil) mit fixiertem Katheter, die in der Tiefe als A. hepatica propria cranial verschwindet, sowie die A. hepatica (kleiner Pfeil), deren Blutfluß über Seidenzügel kontrolliert wurde.

Nach Ligatur der A. gastroduodenalis unmittelbar proximal der Aufzweigung in die Versorgungsgebiete von Magen und Pankreas bzw. Duodenum und Pankreas wurde die zuführende A. hepatica passager angezügelt, um die Regulation des Blutzufusses zu gewährleisten und gleichzeitig den Reflux in Magen und Pankreas zu verhindern. Proximal der Ligatur erfolgten die Arteriotomie der A. gastroduodenalis und anschließend die Implantation eines Polyethylen-Katheters (Außendurchmesser 0,8 mm) in Richtung der A. hepatica propria, dessen Spitze auf dem Niveau der Einmündungsstelle der A. hepatica plaziert und mit einer Ligatur gesichert wurde (s. Abb. 3).

Die Applikation der Gesamtmenge von maximal 0,3 ml erfolgte in 30- $\mu$ l-Schritten mit gleichzeitiger Unterbrechung des Blutflusses durch Straffung des Zuges der A. hepatica und zwischengeschaltetem Blutzufuß, um eine homogene und vollständige Aufnahme der Suspension in die Leber zu erreichen. Nach einer letzten Spülung des Katheters mit isotoner Kochsalzlösung wurde der Katheter gezogen, die bereits bestehende Ligatur proximal der Eröffnungsstelle der A. gastroduodenalis zum permanenten Verschuß genutzt und die Bauch-muskulatur und Bauchhaut schichtweise verschlossen.

Die intravenöse Verabreichung der Liposomenvarianten erfolgte über die Schwanzvene.

### **3.5 Magnetresonanztomographische Untersuchungen**

#### **3.5.1 Lagerung der Versuchstiere**

Die Positionierung der Versuchstiere erfolgte in Rückenlage in einer aus Kunststoff bestehenden Halbschale, deren Breite dem Innendurchmesser der verwendeten Spule entsprach. Die Tiere wurden mit Klebeband in Höhe des Brustkorbes in der Schale fixiert, um bei Manipulationen eine Positionsänderung zu vermeiden.

#### **3.5.2 Untersuchungsparameter**

Die MRT-Experimente wurden an einem BRUKER Biospec BMT 24/40 (2,35 Tesla, Bruker Medizintechnik GmbH, Ettlingen, Deutschland) in der Abteilung für Röntgendiagnostik des Universitätsklinikums "Benjamin Franklin" der Freien Universität Berlin durchgeführt, wobei eine Spin-Echo-Sequenz mit einer TR von 400 ms, einer TE von 15 ms, 4 Mittelungen (NA), einem Bildausschnitt (FOV) von 80x80 mm, einer Matrix von 256x256 Bildpunkten und einer resultierenden Meßzeit von 6 min 57 s genutzt wurde. Es handelt sich hierbei um eine T1-gewichtete kontrastmittelempfindliche Sequenz, die in einer Selenoid-Spule mit einem Innendurchmesser von 8 cm aquiriert wurde.

Zur genauen Lagebestimmung des Tumors und seiner Abgrenzung zur Umgebung wurde zu Beginn der Meßreihe jeweils ein protonengewichtetes Bild mit Hilfe einer Turbo-Spin-Echo-Sequenz (TSE) angefertigt (RARE-Sequenz: TR: 3000 ms, TE: 20 ms, RARE-Faktor: 8, NA: 4, resultierende Meßzeit: 6 min 34 s).

#### **3.5.3 Datenerfassung und -auswertung**

Die Signalintensitäten von Lebergewebe, Tumor, Tumorrandbereich und Hintergrundrauschen als interner Standard wurden auf einem Power Mac über das



Programm NIH (National Institute of Health) Image ermittelt. Das Relativieren gegen einen internen Standard war nötig, da zwar die Signalintensitäten der Gewebe von den Relaxationszeiten bestimmt werden, jedoch die Höhe des Signals auch von den Geräteparametern (Pulssequenzen, Spulenabstimmung, Magnetfeldinhomogenitäten) des Tomographen abhängt und diese zwischen den Messungen sehr stark variieren können. Das relative Signal wurde wie folgt berechnet:

$$SI_{\text{rel}} = \frac{SI_{\text{abs,post}} / SI_{\text{rau,post}}}{SI_{\text{abs,prae}} / SI_{\text{rau,prae}}}$$

wobei  $SI_{\text{abs}}$  die gemessene Signalintensität des interessierenden Bereiches und  $SI_{\text{rau}}$  die gemessene Signalintensität des Hintergrundrauschens außerhalb von Bewegungs-, Pulsations- und Atmungsartefakten sind. Die Zusätze "prae" und "post" bezeichnen jeweils den Zeitpunkt der Aufnahme vor bzw. nach Applikation des Kontrastmittels oder der Kontrastmittel-Kombination.

Für die Dynamikauswertung wurden die Nativaufnahmen und die Aufnahmen zu jedem erfaßten Zeitpunkt nach Applikation der entsprechenden Schichten hintereinander geordnet, so daß durch Anlegen einer ROI (Region of Interest) und anschließendem "Durchblättern" und Signalerfassung der Zeitpunkte ein Zeitprofil des Kontrastmittels erstellt werden konnte.

Zur Auswertung des Kontrastes zwischen Tumor und Lebergewebe ( $k(\text{Tu/Le})$ ) wurde das Signal-Verhältnis zwischen Tumor und Leber gebildet:

$$k(\text{Tu/Le}) = SI_{\text{Tu,abs}} / SI_{\text{Le,abs}}$$

Dabei bezeichnet  $k(\text{Tu/Le})$  das Signal des Tumors bezogen auf das Lebergewebe. Nimmt  $k(\text{Tu/Le})$  einen Wert von 1 an, so ist keinerlei Signaldifferenz und damit kein Kontrast zwischen den interessierenden Kompartimenten vorhanden (die Gewebe verhalten sich isointens zueinander). Bei  $k(\text{Tu/Le}) > 1$  besteht, bezogen auf das Tumorgewebe, ein Positiv-Kontrast, das heißt die Leber stellt sich hypointens gegenüber dem Tumorgewebe dar, bei  $k(\text{Tu/Le}) < 1$  verhält sich die Situation umgekehrt: Es besteht ein Negativkontrast, wobei der Tumor weniger Signal als die Leber aufweist (Tumor gegen die Leber hypointens).

Zur Darstellung des Kontrastes zwischen Tumor und Leber wurde die Signaldifferenz ( $SI_{\text{diff}}$ ) zwischen Tumor und Leber genutzt:

$$SI_{\text{diff}} = k(\text{Tu/Le}) - 1$$

Dabei wird das Lebersignal gleich 1 (100%) gesetzt. Stellt die Signaldifferenz  $SI_{\text{diff}}$  einen positiven Betrag dar, zeigt der Tumor ein höheres Signal als die Leber, stellt er einen negativen Wert dar, ist die Signalintensität des Tumors niedriger als die der Leber.

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Datenanalyse- und Präsentationssystem StatView<sup>®</sup> 5.0 (SAS Institute Inc., North Carolina) genutzt. Die Daten der Gruppen, mit denen eine Korrelation zwischen 5-FU/M3 und der relativen Signalintensität berechnet werden sollte, wurden in eine Korrelationsmatrix eingespeist und anschließend eine lineare Regressions-analyse vorgenommen:

$$y = ax + b$$

Die Variable  $y$  stellt das relative Signal bei einer 5-FU-Konzentration von  $x$   $\mu\text{mol}$  5-FU/Gramm Organewebe dar,  $a$  repräsentiert den Anstieg der Geraden und  $b$  beinhaltet die Ungenauigkeit der Messung und/oder des Modells.

Über eine Varianzanalyse mit anschließendem Fisher PLSD-Test zur Prüfung auf Unabhängigkeit wurden die Daten der Zytostatikaerfassung (Konzentrationen von 5-FU und M3) und die der MR-Signale der Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten ausgewertet sowie Mittelwerte und Standardabweichungen erfaßt. Laut Nullhypothese besteht kein Zusammenhang zwischen der Behandlungsvariante und erstens der Anreicherung des Zytostatikums 5-FU oder dessen Metaboliten M3 in den verschiedenen Geweben bzw. zweitens der Höhe des gemessenen MR-Signals. Das Signifikanz-Level wurde auf  $p < 0,05$  gesetzt.

### **3.6 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)**

#### **3.6.1 HPLC-Anlage und Datenerfassung**

Das Meßsystem bestand aus einer HPLC-Pumpe GYNKOTEK (Hochpräzisionspumpe, Modell 300C), einem LKB (Bromma) 2175-Autosampler und einem programmierbaren UV-Vis-Spektrometrischen Detektor (SHIMADZU, SPD-6AV). Die Auftrennung der Proben erfolgte über eine analytische Säule VDS OPTILAB (ODS Hypersil, 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße, 250x4,6 mm) in Kombination mit einer Vorsäule des gleichen Materials (VDS OPTILAB, 4,5x4,6 mm). Die Datenübertragung wurde über einen D2500 Chromo-Integrator (Merck, Hatachi) realisiert. Der Flow betrug 1,9 ml/min, als Laufmittel dienten 3 % Methanol und 0,05 % Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) ad aqua. Die Wellenlänge betrug 254 nm, die Messung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt (Jung et al., 1997).

### 3.6.2 Probenaufbereitung

Nach Beenden der MRT-Untersuchung wurden die Tiere in tiefer Narkose getötet, die Organe Leber, Pankreas, Magen, Milz, Niere, Lunge, Herz und eine Blutprobe entnommen. Aus der Leber wurde vorsichtig unter stumpfer Präparation der Tumor separiert und der ihn umgebende ca. 3 mm schmale Randsaum als gesonderte Probe gewonnen. Als Probe einer "gesunden" Leber diente ein Ausschnitt aus dem rechten Leberlappen.

Zuerst erfolgte die Homogenisierung der o.g. Proben m.H. eines ULTRA-TURRAX T25 mit einem UT-Zerkleinerungswerkzeug S25 KR-18G (IKA-Labortechnik Staufen) bei einer Geschwindigkeit von 2500 U/min. Für die anschließende Eiweißfällung wurden 200-400 µg der Proben bzw. 200 µl Serum eingewogen und pro 100 µg Gewebe bzw. 100 µl Serum mit jeweils 100 µl 10 %iger Perchloressigsäure und 20 µl internem Standard (5-Bromouracil) versetzt, anschließend auf einem Rotationsmischer 3300 (Eppendorf Gerätebau; Netheler & Hinz GmbH, Deutschland) 2 min geschüttelt und schließlich 1 min gerüttelt (VORTEX-Genie, Modell K550-GE; Digtific Industries, USA), um letztendlich die Probe bei 2500 U/min über 10 min zu zentrifugieren. Der Überstand wurde in 1,5 ml-Probengefäße abpipettiert und in das HPLC-System verbracht (Jung et al., 1997).

### 3.7 Genehmigung der Tierversuche

Diese Studie wurde im Rahmen eines vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt. Die Kurzbezeichnung des Versuchsantrages lautet "Liposomale Anreicherung" und trägt die Genehmigungsnummer G 0121/98.