

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methodik

Das CC531-Adenokarzinom in der Leber von WAG/Rij stellt ein etabliertes Tumormodell für Lebermetastasen des humanen kolorektalen Karzinoms dar (Thomas et al., 1993). Der Tumor ist reproduzierbar und zeigt eine Angehrate von 98 %.

Durch die Lagerung der Tiere auf dem Rücken in einer Kunststoffhalbschale war eine weitgehend standardisierte Positionierung und Wiederfindung der interessierenden Tumorschichten möglich. Als Orientierungspunkt diente der Processus xiphoideus des Brustbeins.

Aus vorangegangenen Überlegungen und Versuchen resultierend wurden der Liposomen-Typus, das Kontrastmittel, das Zytostatikum und das Embolisat gewählt.

In Vorversuchen (Päuser et al., 1997) wurden drei verschiedene Liposomentypen (REV, SUV und MLV), die superparamagnetische Eisenoxide (SPIO) enthielten, hinsichtlich ihres Anreicherungsverhaltens im Leber- und Tumorgewebe mit Hilfe der MRT getestet. Die Reduktion der Signalintensität in der T2-gewichteten Untersuchung von Leber und Tumor wurde als ein Zeichen der Anreicherung der verschiedenen Liposomentypen im jeweiligen Gewebe angenommen. Eine gleichbleibende, starke Signalreduktion, beginnend unmittelbar post injectionem und über 48 h anhaltend, wurde für die sterisch mit Polyethylenglykol (PEG) stabilisierten SUV beobachtet. In den histologischen Schnitten von Tumor- und Lebergewebe aller Liposomen-Gruppen wurden in den Kupffer-Zellen, im nekrotischen Tumorgewebe und vor allem im Grenzbereich zwischen Tumor- und gesundem Lebergewebe Eisen nachgewiesen. Lediglich in der SUV-PEG-Gruppe konnte in vitalen Tumorzellen Eisen festgestellt werden. Damit galt dieser Liposomen-Typ als favorisiert.

Es lag nahe, daß, wenn man über das Signalverhalten des verwendeten Kontrastmittels auf den Therapeutikumgehalt des Zielgewebes schließen will, ein Kontrastmittel zu nutzen, das im Normalfall rasch eliminiert wird, um durch eine erfolgreiche Kopplung an die sich im Zielgewebe anlagernden Liposomen eindeutig eine Aussage über ein verändertes Signalverhalten machen zu können. Unter den MR-fähigen Kontrastmitteln zählt Gd-DTPA zu den extrazellulären Substanzen, das u.a. bei Tumoren, Entzündungen und vaskulären Erkrankungen indiziert ist und in der Klinik seit Jahren eine sehr breite Anwendung erfährt (Niendorf et al., 1991; Lanadio und Kopp, 1997).

In Vorversuchen wurden auch eisenhaltige Kontrastmittel in Erwägung gezogen; da diese jedoch eine sehr lange Verweildauer (Tage bis Wochen) aufwiesen (Weissleder et al., 1989; Schumann-Giampieri, 1993; eigene Untersuchungen), schieden sie zur Lösung des vorliegen-den Problems aus.

Um Gd-DTPA mit Liposomen zu koppeln, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: entweder bringt man das Kontrastmittel in das Liposomeninnere oder verbindet es mit der äußeren Liposomenmembran. Da sich im wäßrigen Kompartiment der Liposomen bereits das

Chemotherapeutikum (5-FU) befindet, außerdem durch die Verkapselung von Gd-DTPA in Abhängigkeit von der Durchlässigkeit der Liposomenmembran für Wassermoleküle immer eine Verringerung der Relaxivität des Kontrastmittels gegenüber der freien Form zu erwarten ist (s. Grundlagen), sollte das Gd-DTPA mit der Liposomenhülle verbunden werden. Dazu war es aufgrund dessen Hydrophilität nötig, eine Verbindung mit dem Liposom über eine Fettsäurekette (FS-Kette) zu schaffen. Der Gd-DTPA-FS-Komplex wurde während der Liposomenherstellung in die Hülle inkorporiert.

Das Pyrimidinanalogon 5-FU befindet sich seit über 40 Jahren als Zytostatikum auf dem Markt (Findlay and Leach, 1994). Es läßt sich problemlos in der wäßrigen Phase von Liposomen verkapseln und die Arbeitsgruppe kann auf einschlägige Erfahrungen mit diesem Medikament zurückblicken (Berger et al, 1998; Pohlen et al., 1998). Es zählt zu den Standardsubstanzen in der Behandlung von Lebertumoren, gegen das sich neue Medikamente behaupten müssen (van der Wilt, 1995).

Um unter lokoregionären Bedingungen die Vorteile der Chemoembolisation nutzen zu können, wurde auf Stärkemikrosphären zurückgegriffen, die eine präkapilläre Blockade zum Schutz des gesunden Leberparenchyms durch eine Partikelgröße von 40 bis 80 µm erreichen. So ist, unter Erhaltung der Tumorperfusion, bei zentraler Gabe eine selektive Anreicherung in multiplen Herden möglich. Mikrosphären, am bekanntesten sind DSM (Degradable Starch Microspheres), haben eine homogene Größe und werden durch die körpereigene Amylase kurzfristig (10-30 min) in der Gefäßbahn abgebaut (Ziessmann et al., 1983; Suzuki et al., 1987).

Um eine eindeutige Schichtzuordnung vor und nach Applikation zu sichern, wurde in Vorversuchen nach mikroskopischer Plazierung des Katheters und nachfolgender Nativaufnahme von Tumor und Leber die Suspension im Tomographen appliziert. Da auf diese Weise keinerlei Einfluß auf einen retrograden Fluß des applizierten Volumens genommen werden konnte, wurden die Tiere, nach Selektion einer geeigneten Schicht im Bereich der tumortragenden Leber und anschließender Aufnahme T1-gewichteter Nativbilder, der mikrochirurgischen Operation unter mikroskopischer Applikation der Liposomen-Komplexe zugeführt. Die wiederholte Positionierung erfolgte unter Orientierung am Processus xiphoideus. Die Tiere der intravenösen Gruppen verblieben während der gesamten MR-Untersuchung im Tomographen.

Die bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführten Versuche mit liposomal verkapseltem 5-FU (Therapie-Liposom) und seiner Applikation intravenös und intraarteriell bzw. intraarteriell in Kombination mit einem Emolisat (DCES) erbrachten ermutigende Ergebnisse im Hinblick auf eine sehr hohe Anreicherung von 5-FU und dessen Umwandlung in den wirksamen Meaboliten M3 im Tumorgewebe von Lebermetastasen (Berger et al., 1998). Um nicht nur eine eventuelle Korrelation von 5-FU und Kontrastmittel prüfen zu können, sondern gleichzeitig anhand der bereits aus den früheren Versuchen vorliegenden Daten den Einfluß des gekoppelten Kontrastmittels auf die Anreicherung und Umwandlung des Zytostatikums

in seine Metaboliten erfassen zu können, wurde auf eine bis auf das Kontrastmittel gleiche Strukturierung des Therapie-Diagnostik-Liposoms im Vergleich zum früher genutzten Therapie-Liposom Wert gelegt.

Generell wurden fünf Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt untersucht; bei den Gruppen, die eine Kombination ohne 5-FU erhielten (Diagnostik-Gruppen), konnten sämtliche Zeitpunkte mit jeweils einem Tier erfaßt werden, da keine invasive Untersuchung nötig war.

Als Kontrollgruppen für die Kontrastmittelanreicherungsuntersuchungen dienten die Tiere der Gruppen 3 und 8, die 33,3 bzw. 250 $\mu\text{mol/kg}$ Gd-DTPA intravenös verabreicht bekamen. Gruppe 8 repräsentierte die im Tierversuch an der Ratte übliche Dosierung zur Darstellung von Läsionen im Lebergewebe, da diese Spezies zu den "guten" Ausscheidern aufgrund ihrer verstärkten Blutumlaufgeschwindigkeit zählen (Schumann-Giampieri, 1993). Gruppe 3 wies die gleiche Dosierung von Gd-DTPA auf, die mit sämtlichen Liposomenformulierungen verabreicht wurde.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Korrelation von 5-FU-Konzentration und MR-Signal

Gd-DTPA zählt zu den extrazellulären, unspezifisch anreichernden MR-Kontrastmitteln. Normalerweise verteilt sich Gd-DTPA nach intravenöser Applikation sehr rasch im zirkulierenden Blut und reichert sich, entsprechend der Perfusion, in den Geweben an. Es extravadiert, gelangt in den Extrazellularraum und wird vorwiegend über die Nieren ausgeschieden.

Es wurden viele Versuche unternommen, die Spezifität dieses Kontrastmittels im Leberbereich zu erhöhen. Es besteht die Möglichkeit

1. einer Anreicherung in den Hepatozyten (z.B. Gd-EOB-DTPA, Gd-BOPTA),
2. einer Anreicherung in den Zellen des MPS in der Leber, den Kupfferschen Sternzellen (z.B. konventionelle Gd-DTPA-Liposomen), oder
3. des Verbleibs des Kontrastmittels im Blutstrom (Blood-Pool-Agents) (z.B. Gd-DTPA-Polylysine) (Schumann-Giampieri, 1993). Damit soll die Sensitivität und Spezifität bei der Suche nach vor allem kleinen Läsionen verbessert und deren sichere Abgrenzung und Charakterisierung ermöglicht werden. Spezifische Kontrastmittel sollten eine einfache intravenöse Applikation und Handhabung und, im Gegensatz zu nichtspezifisch anreichernden Kontrastmitteln, eine niedrigere Dosierung durch eine verstärkte Akkumulation aufweisen (Leander, 1995).

Prinzipiell ist die Relaxivität von in konventionellen Liposomen verkapselten Kontrastmitteln geringer als die der freien Form (Tilcock et al., 1989). Es besteht eine Abhängigkeit vom Durchmesser der Liposomen und von deren Membranbestandteilen. Je

kleiner die Liposomen, desto stärker ist das Signal, da kleine Liposomen eine relativ große Oberfläche besitzen, die die Annäherung von vielen Wassermolekülen erlaubt (Unger et al., 1989b). Die zunehmende Präsenz von Cholesterol senkt außerdem den Permeabilitätskoeffizienten für Wasser (Tilcock et al., 1989), was den Durchtritt durch die Liposomenmembran für Wassermoleküle erschwert.

Im Gegensatz dazu ist der Effekt von Liposomen, die das Kontrastmittel in ihre äußere Hülle inkorporiert tragen, ähnlich dem des freien Kontrastmittels, da sowohl eine unbeschränkte Zugänglichkeit für die Wassermoleküle besteht als auch eine höhere Verkapselungsrate erreicht werden kann (Leander, 1995). Die Aufnahme dieser Liposomen erfolgt relativ rasch durch die Zellen des MPS, die sowohl in der Leber als auch in lebereigenen Tumoren vorkommen. Das bedeutet, daß bei Applikation von konventionellen Gadolinium-Liposomen ein Enhancement in allen Kompartimenten, die MPS-Zellen enthalten, auftritt. Leberfremde Tumoren (z.B. Metastasen des kolorektalen Karzinoms) dagegen nehmen dieses verkapselte Kontrastmittel nicht auf; man erhält, bezogen auf das Tumorgewebe, einen Negativ-Kontrast.

Um eine verlängerte Zirkulation der Gd-Liposomen im Blut zu erreichen, werden die Vesikel über die Bindung von PEG-Ketten auf deren Oberfläche "getarnt". Das bedeutet, sie rufen nun keine Immunantwort mehr hervor (Richter und Akerblom, 1983). Die Intensität der Tarnung dieser sogenannten Stealth[®]-Liposomen ist abhängig von der Dichte der aufgelagerten Polymerketten.

Es ist bekannt, daß das angiogenetische System der Tumoren (Jain, 1997) Fenestrations (Endothelschäden) aufweist (Folkmann, 1997), die eine unspezifische Anreicherung entsprechend kleiner Partikel zuläßt, um so mehr, je länger sie sich im Blutgefäßsystem des Organismus befinden.

Neben der vermehrten unspezifischen Anreicherung von Stealth[®]-Liposomen durch die verzögerte Plasma-Clearance wird in der Literatur eine bevorzugte Anreicherung in Tumorzellen nach intravenöser Applikation beschrieben. Das ist auf die erhöhte vaskuläre Permeabilität von Stealth[®]-Liposomen gegenüber konventionellen Liposomen zurückzuführen (Wu et al., 1993; Dewhirst and Needham, 1995), wodurch eine (heterogene) Extravasation möglich wird (Yuan et al., 1994; Dewhirst and Needham, 1995). Die Stealth[®]-Liposomen gelangen aufgrund ihrer auf biologische Membranen abstoßend wirkenden Eigenschaften (Needham et al., 1992) vermehrt durch die Lücken des endothelialen Zellverbandes der Kapillaren aus dem Gefäßsystem (Wu et al., 1993; Yuan et al., 1994; Dewhirst und Needham, 1995).

Aus früheren Versuchen der Arbeitsgruppe ist bekannt, daß eine verstärkte Anreicherung von in Stealth[®]-Liposomen verkapseltem 5-FU im Tumor im Vergleich zum Lebergewebe nach intraarterieller Applikation mit und ohne Embolisat DSM erreicht wird. Nach

Diskussion

intravenöser Gabe wird die vermehrte Anreicherung im Tumorgewebe erst mit der Untersuchung der M3-Spiegel deutlich, die nur innerhalb der Zelle gebildet werden können. Das heißt, es gelangt zwar insgesamt weniger 5-FU in das Tumorgewebe als in die Leber, aber die Aufnahme in die Zelle geschieht im Tumor der Leber gegenüber bevorzugt.

Mit der Kopplung von Gd-DTPA und 5-FU an Stealth[®]-Liposomen waren nun die Voraussetzungen gegeben, daß unter lokoregionärer Embolisation eine synchrone Anreicherung von Kontrastmittel und Zytostatikum im Tumor möglich wurde. Durch die Coapplikation eines Embolisates wurde ein Liposomen-Embolisations-System geschaffen, das aufgrund seiner Größe (45 µm im Mittel) in der Lage ist, bis in kleinste Tumorgefäße vorzudringen (ohne in das venöse System überzugehen), dort hängenzubleiben, zu extravadiere und in die Leberzellen aufgenommen zu werden.

Für eine praktische Ausnutzung der Korrelation von Signal und Zytostatikum-Anreicherung kommen nur solche Zeitpunkte in Frage, die, unter klinischen Bedingungen, für eine MR-Untersuchung nach Applikation eines Therapie-Diagnostik-Gemisches realistisch sind. Das bedeutet, daß, gerechnet vom Beenden der Applikation an, mindestens eine Stunde bis zur Aufnahme der Bilder vergeht. Kürzere Zeiträume können in der klinischen Routine nicht eingehalten werden.

Eine Korrelation von 5-FU-Gehalt und relativer Signalintensität konnte im Tumorbereich der intraarteriellen Gruppe mit Embolisat für die Zeitpunkte 90 bis 240 min gefunden werden ($r=0,82$). Hier besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem Anstieg des relativen Signals und dem Nachweis von 5-FU im Zielgewebe. Sowohl vor als auch im Anschluß an diese Zeitspanne (ab 720 min) ist ein Zusammenhang nicht mehr gegeben. Da innerhalb der Zeit von 90 bis 240 min eine gute Korrelation vorhanden ist, ist es zumindest für die vorangegangene Zeit unwahrscheinlich, daß eine Trennung von Vehikel (Liposom) und Beladung (5-FU, Gd-DTPA) erfolgt ist.

Wie im einführenden bzw. methodischen Teil bereits erwähnt, sind lediglich 10 % der verabreichten Menge an 5-FU innerhalb der wäßrigen Phase der Liposomen verkapselt. 90 % des Zytostatikums befinden sich in Lösung und ein Großteil davon in einer festen Verbindung mit den PEG-Ketten der verwendeten Stealth[®]-Liposomen (Reszka et al., 1999). Die Autoren konnten auf elektronenmikroskopischen Bildern sichtbar machen, daß bei Kombination der Liposomen mit einem Embolisat die ca. 100 nm großen Liposomen auf den etwa 40 µm großen Stärkemikrosphären aufsitzen. Die Mikrosphären gehen ebenfalls mit den PEG-Schwänzen der Liposomen Bindungen ein, die dazu führen, daß bis zum Aufschluß der Stärke durch Amylase eine relativ feste Verankerung neben dem flußverlangsamenden Effekt besteht, die die Liposomen zusätzlich im Zielgebiet zurückhält (Reszka et al., 1999).

Durch die Wirkung als Multi-Release-System werden im Zeitraum bis 60 min die 5-FU-Partikel im Gewebe angereichert, die sich unverkapselt in Lösung befinden und durch die

Assoziation an die PEG-Ketten der Stealth[®]-Liposomen ebenfalls Target-Eigenschaften aufweisen. Die durch die 5-FU-Moleküle besetzten Stellen werden nun frei und können vermehrt durch Wasserstoffprotonen besetzt werden. Das resultiert in einer verstärkten Relaxivität von an Stealth[®]-Liposomen gebundenem Gd-DTPA (Torchilin et al., 1995b), das nun ein der angereicherten Menge an 5-FU adäquates MR-Signal hervorbringt.

Ein weiterer Mechanismus, der zu einem erhöhten Tumorsignal führt, ist die vermehrte Anwesenheit von Wasserstoffprotonen. Es ist bekannt, daß im Tumor vermehrt Extrazellulärflüssigkeit im Vergleich zum Lebergewebe existiert (Clement et al., 1993). Das wiederum hat eine gesteigerte Relaxivität von Gd-DTPA zur Folge, was bedeutet, daß aus einer identischen Menge an Gd-DTPA im Gefäß- bzw. im Extrazellulärraum des Tumors unterschiedliche Signalintensitäten resultieren. Daher wird die Einschätzung des Signals zusätzlich aufgrund der Anreicherung und der veränderten Relaxivität des Kontrastmittels erschwert.

5.2.2 Einfluß von 5-FU auf die Signalintensität im MRT-Bild

Um den Einfluß von 5-FU, das sich sowohl verkapselt als auch zu einem nicht näher quantifizierbaren Teil mit den PEG-Ketten der Stealth[®]-Liposomen assoziiert ist, auf das sich anreichernde Kontrastmittel über die Signalveränderung im MR-Bild evaluieren zu können, wurden Gruppen untersucht, die Diagnostik-Liposomen (Gd-SUV-PEG) ohne Zytostatikum im entsprechenden Applikationsmodus erhielten (intravenös, intraarteriell, intraarteriell mit Embolisat). Es wurden die Signalveränderungen nach Applikation in Relation zum Ausgangswert (Nativaufnahme) und das Signalverhalten von Tumor und Leber zueinander (Kontrast) eingeschätzt.

Aus den Vergleichen der Kontrastmittel-Dynamik von Leber und Tumor unter den verschiedenen Applikationsvarianten ging hervor, daß die intraarterielle Gruppe ohne 5-FU in Kombination mit Embolisation (Gd-SUV-PEG, Gruppe 6) den höchsten Signalanstieg im Tumor bei moderatem Leber-Enhancement zeigte. Einen ähnlich hohen Signalanstieg wies die zweite intraarterielle Gruppe mit Embolisat und 5-FU (5-FU-Gd-SUV-PEG, Gruppe 7) zu späteren Zeitpunkten auf. Die zeitliche Verschiebung des Signalanstieges im Tumorgewebe spricht dafür, daß nach Aufnahme in die Zelle oder Abbau der an die PEG-Ketten assoziierten 5-FU-Moleküle Wasserstoffprotonen in der Lage waren, deren Platz einzunehmen und durch Erhöhung der Relaxivität von Gd-DTPA einen Signalanstieg hervorzurufen (Torchilin et al., 1995b).

Die intravenösen Kontrollgruppen wiesen entsprechend ihrer Gd-DTPA-Dosierung ein unterschiedlich starkes Signal auf. Sowohl in der Leber als auch im Tumor stieg das Signal um ca. 30 % nach intravenöser Gabe von 250 µmol/kg (Gruppe 8) gegenüber der Gruppe mit 33 µmol/kg Gd-DTPA (Gruppe 3) an, was durch die unspezifische Anreicherung im

Extrazellularraum von Tumor und Leber mittels Diffusion zu erklären ist. Nach intravenöser Gabe von Stealth[®]-Liposomen wurde hingegen eine gegenüber dem Tumor vermehrte Anreicherung im Lebergewebe erreicht.

Die Annahme, daß bei der Herstellung von 5-FU-Gd-SUV-PEG tatsächlich weniger Wassermoleküle an die PEG-Ketten gebunden werden, da die 5-FU-Moleküle deren Platz einnehmen, erklärt das Enhancement der intraarteriellen Gruppen mit Embolisation: Bedingt durch den Target-Effekt der Stealth[®]-Liposomen und unterstützt durch den Embolisationseffekt der Stärkemikrosphären kommt es zu einer den anderen Gruppen überlegenen Anreicherung von Kontrastmittel und 5-FU im tumorösen Gewebe. Da der relaxationserhöhende Effekt der wasserbindenden PEG-Schwänze von den Liposomen ohne 5-FU besser ausgenutzt werden kann, kommt hier das den 5-FU-tragenden Liposomen überlegene Signal des Tumors zum Tragen. Gleichzeitig wird das nach Austausch der 5-FU-Moleküle gegen Wassermoleküle (Gruppe 7) allmählich bis auf Werte der Gruppe ohne 5-FU (Gruppe 6) ansteigende Signal erklärbar. Da in den intravenösen und intraarteriellen Gruppen ohne Embolisation keine durch den flußverlangsamenden Effekt unterstützte Anreicherung von 5-FU und Kontrastmittel im Tumorgewebe erfolgen kann, zeigen sich hier geringere 5-FU-Spiegel und kaum Signalanreicherungen verglichen mit den Embolisationsgruppen (Gruppen 6 und 7).

Bei Aufnahme des Signals bzw. der Erfassung der 5-FU-Profile durch die HPLC kann nicht unterschieden werden, ob sich Kontrastmittel und Zytostatikum perivaskulär oder in den Hepatozyten bzw. Tumorzellen befindet. Gelangt 5-FU in die Zelle, ist dort die Umwandlung in den Metaboliten M3 möglich, dessen Nachweis ebenfalls mit der HPLC erfolgte. Da keine Korrelation von Signal zu M3-Gehalt existierte und die M3-Anreicherungen sehr großen Schwankungen unterlagen, wird davon ausgegangen, daß zum einen perivaskuläre Clusterbildung vorlag (Yuan et al., 1994; Dewhirst und Needham, 1995), zum anderen eine Aufnahme der Liposomen durch Endocytose in die Leber- bzw. Tumorzellen (Dini et al., 1998) favorisiert wurde (Cay et al, 1997; Daemen et al, 1997), ohne daß auf diese Vorgänge Einfluß genommen werden konnte. Das erklärt die enormen Schwankungen des Zytostatikumgehaltes im Tumor und die anfänglich hohen Signalintensitätswerte ohne entsprechende 5-FU-Gehalte. Bei Aufnahme des Kontrastmittels in die Zelle steht weniger Wasser zur Verfügung, wodurch die Relaxivität und damit das Signal sinken. Im Unterschied zu den intraarteriellen Gruppen ohne Embolisation (Gruppen 4 und 5) wird außerdem neben der Wirkung der Stealth[®]-Liposomen durch das Embolisat verstärkt eine verzögerte Freisetzung von 5-FU und Gd-DTPA gefördert. Das verhindert die vorzeitige Elimination aus dem Organismus (Joshi et al., 1993) sowie die bevorzugte Aufnahme durch andere Organe und garantiert eine protrahierte Anreicherung (Segal et al., 1975).

5.2.3 Kontrastentwicklung im MRT-Bild nach Applikation von Gd-DTPA-Liposomen

Um in der MRT eine sichere Diagnostik zu praktizieren, ist es von Vorteil, Gewebe optimal voneinander differenzieren zu können. Der Kontrast zwischen den interessierenden Kompartimenten sollte, als Ergebnis einer entsprechenden Signaldifferenz, möglichst groß sein. Als Ausdruck des Kontrastes dient das Verhältnis der Signalintensitäten einander angrenzender Gewebe, in diesem Fall von Tumor und umgebender Leber.

Der stärkste Kontrast zwischen Tumor und umgebendem Lebergewebe wurde von der intraarteriellen Gruppe mit Embolisat ohne gekoppeltes 5-FU (Gruppe 6), gefolgt von der intraarteriellen Gruppe mit 5-FU unter Embolisierung (Gruppe 7) erreicht. Es handelte sich hierbei um einen Positiv-Kontrast durch einen Signalunterschied zwischen Tumor und Leber von 66 % in der Gruppe ohne 5-FU (Gruppe 6). Zum Zeitpunkt 12 h betrug die Signaldifferenz in dieser Gruppe noch immer 50 %. Die Gruppe mit 5-FU (Gruppe 7) zeigte ab 90 min ebenfalls eine Signaldifferenz von über 50 % zwischen Tumor und Leber und damit einen deutlichen Kontrast beider Strukturen. Das Tumorgewebe stellte sich der Leber gegenüber hyperintens dar.

Sämtliche weiteren liposomalen Gruppen bildeten einen mehr oder weniger ausgeprägten Negativ-Kontrast aus, der sich unter intravenöser Applikation ohne 5-FU besonders stark äußerte; der Tumor stellte sich der Leber gegenüber hypointens dar.

Zu keinem Zeitpunkt existierte zwischen den beiden Kontrollgruppen mit unterschiedlichen Gd-DTPA-Konzentrationen (Gruppen 3 und 8) ein signifikanter Kontrastunterschied, was auf die gleichmäßige und unspezifische Anreicherung in den Geweben von Tumor und Leber zurückzuführen ist.

Das Kontrastverhalten sämtlicher Gruppen ist eine logische Folge der veränderten Kontrastmittel-Dynamik der Gd-DTPA-Liposomen. Die verlängerte Zeitspanne der Anreicherung durch die verzögerte Ausscheidung (Joshi et al., 1993), die Wasserstoffprotonen-Bindung (Torchilin et al., 1995b) und der Anteil des freien Wassers (Clement et al., 1993) spielen dabei entscheidende Rollen.

5.2.4 5-FU- und M3-Anreicherung unter dem Einfluß von Gd-DTPA

Parallel zu den Zytostatikagehalten in Tumor, Tumorrandsaum und Leber wurden die 5-FU- und M3-Profile der peripheren Organe dieser Tiere aufgenommen. Überraschend war die große Streuung der 5-FU- und M3-Daten. Um trotzdem einen Überblick über die Verteilung geben zu können, wurden die Werte untereinander und mit denen der korrespondierenden Gruppen ohne Kontrastmittelkopplung aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe verglichen (Berger et al., 1998). Das war nötig, um den Einfluß des an die 5-FU-tragenden Liposomen gekoppelten Kontrastmittels auf das Anreicherungs-

verhalten von 5-FU und seinen Transport in die Zelle anhand der Bildung von M3 beurteilen zu können.

Es wurden die oben aufgeführten Werte von 5-FU und M3 den Daten der Tiere zu den jeweiligen Zeitpunkten gegenübergestellt, die die gleiche Kombination des Therapeutikums ohne Kontrastmittel in früheren Versuchen der Arbeitsgruppe erhalten hatten.

Obwohl im Hinblick auf die 5-FU-Anreicherung in Tumor und Leber keine überraschend großen Unterschiede gefunden wurden, zeigten doch die Umwandlungsraten in den wirksamen Metaboliten M3 eine empfindliche Störung durch die Anwesenheit des Kontrastmittels. Die M3-Spiegel waren in den Fällen der Kontrastmittelkopplung starken Schwankungen ausgesetzt und niedriger als in den Gruppen ohne Kontrastmittelkopplung. Die Auswertung der 5-FU-Gehalte der intravenösen und intraarteriellen Gruppen unterstrich den enormen Vorteil der lokoregionären Applikation unter Chemoembolisation bei geringer systemischer Belastung. Dabei wird eine relative Schonung des Gesamtorganismus und eine beachtliche Senkung der Leberlast erreicht.

Fest steht, daß zwar prinzipiell sehr hohe Umwandlungsraten von 5-FU in M3 in Tumor und Leber unter Kontrastmittelkopplung möglich, aber offensichtlich nicht reproduzierbar sind. Es ist bekannt, daß M3 nur im Zellinneren aus 5-FU gebildet werden kann. In diesem Zusammenhang muß in Betracht gezogen werden, daß zwar ein Transport *zur* Zelle relativ verlässlich passiert, jedoch das Einschleusen *in* die Zelle spontan und nicht regelmäßig geschieht.

Eine Anreicherung von 5-FU und seinem Metaboliten M3 im Tumorrandgebiet war lediglich nach lokoregionärer Chemoembolisation gegeben. Mit einem liposomalen Kontrastmittel mit und ohne 5-FU-Kopplung nach intraarterieller Gabe in Kombination mit Embolisat sind Ringphänomene im MR-Bild erkennbar.

Das Bild eines ringförmigen Enhancements im Grenzbereich zwischen Tumor- und Lebergewebe zeigten auch Leander et al. (1996) als Folge einer liposomalen Kontrastmittelanreicherung. Dieses Phänomen wird in der Literatur als Resultat der Anreicherung eines leberspezifischen Kontrastmittels im Tumorgrenzbereich durch die Komprimierung des Lebergewebes diskutiert (Rofsky und Weinreb, 1992). Andere Autoren sprechen von tumoröser Infiltration des den Tumor umgebenden Lebergewebes, was komprimierte Gallengänge nach sich zieht und aus diesem Grund die Elimination von Kontrastmittel verhindert (Ni et al., 1994). Die Komprimierung des Lebergewebes konnte durch Wernecke et al. (1992) histologisch bestätigt werden.

Durch Boucher et al. (1990) wurden die Druckverhältnisse in verschiedenen Tumoren untersucht und festgestellt, daß der Druck im Tumorzentrum sehr hoch ist, zur Peripherie hin abnimmt und im Bereich des vitalen Randsaumes gegen Null geht. Für Partikel, die in diesen Raum vordringen, bedeutet das, daß durch eine zusätzliche "mechanische" Komponente eine Anreicherung im Tumorrandgebiet unterstützt wird.

Unabhängig von den tatsächlichen Ursachen einer der Leber überlegenen Anreicherung von Kontrastmittel und Therapeutikum bei Verkapselung in Stealth[®]-Liposomen wird dieses Phänomen wiederum nur, entgegen der in der Literatur gängigen Meinung, bei lokoregionärer Applikation unter Kombination mit einem Embolisat erreicht (Berger et al., 1998; eigene Untersuchungen).

5.2.5 Einfluß der T2-Relaxivität von Gd-DTPA-Liposomen auf die Signalintensität im T1-gewichteten MRT-Bild

Um zu eruieren, ob die beiden Liposomenformulierungen aufgrund der An- bzw. Abwesenheit von 5-FU Unterschiede in ihrem Signalverhalten zeigen und Auslöschungsphänomene, wie sie bei Gd-DTPA ab einer Konzentration von 10 µmol/ml durch das Überwiegen von T2-Effekten auftreten, für das Signalverhalten verantwortlich sind, wurden zusätzlich Verdünnungsreihen von Gd-SUV-PEG und 5-FU-Gd-SUV-PEG jeweils in heparinisiertem Blut und Wasser einer Konzentrationsreihe von Gd-DTPA in Blut und Wasser gegenübergestellt.

Der Effekt des wiederholten Signalanstieges trotz weiterhin zunehmender Kontrastmittelkonzentration von Gadolinium-tragenden Liposomen ohne 5-FU (s. Abb. 25) konnte in einer Verdünnungsreihe mit Blut nicht bestätigt werden, stellte sich aber in Wasser als reproduzierbar heraus.

Die Konzentrationsreihen in Blut und Wasser können nur Näherungsmodelle für das Verhalten von Gd-DTPA im Gewebe darstellen. Hier verhielten sich beide Liposomenformulierungen ähnlich, ein Überwiegen der T2-Effekte und damit eine Signalabnahme trotz steigender Gd-DTPA-Konzentrationen trat ab einer Konzentration von 5 (5-FU-Gd-SUV-PEG) bis 10 µmol/ml (Gd-SUV-PEG) ein. Vorausgesetzt, daß ungefähr der gleiche Prozentsatz der applizierten Menge an 5-FU wie an Gd-DTPA in das Tumorgewebe gelangt, so kann man davon ausgehen, daß selbst in der Gruppe der maximalen Anreicherung des im Tumor ankommenden Kontrastmittels aufgrund seiner geringen Konzentration (ca. 1-5 % = 0,3-1,5 µmol/ml) nicht in der Lage ist, diese Effekte hervorzurufen, die bei liposomal verkapseltem Gd-DTPA bei ca. 10 µmol/ml Blut einen sichtbaren Einfluß auf das Signal zeigen (Signalabnahme) und bei 70 µmol/ml Blut in Auslöschungserscheinungen übergehen.

Betrachtet man die Verdünnungsreihen von 5-FU-Gd-SUV-PEG und Gd-SUV-PEG, so fällt auf, daß sie sich jeweils in Wasser und Blut bis zu einer Konzentration von ca. 25 µmol/ml beinahe identisch verhalten. Das schließt einen alleinigen Einfluß von 5-FU auf die Relaxivität von Gd-DTPA aus. Vielmehr muß in Betracht gezogen werden, daß das Embolisat DSM neben der 5-FU-Anwesenheit einen großen Einfluß auf das Enhancement im Tumor auszuüben scheint.

Es gibt zwei Möglichkeiten: Entweder wird über die vermehrte Anreicherung oder die erhöhte Relaxivität des Kontrastmittels ein stärkeres Signal im Tumor geschaffen.

Da das Signal in der Leber durch die Anwesenheit von DSM keiner wesentlichen Signaländerung unterliegt, sind beide Varianten möglich:

1. Durch protrahierte Freisetzung und Endothelschäden im Gefäßsystem der Neoplasien entwickelt sich eine vermehrte Anreicherung von Kontrastmittel im Tumorgewebe.
2. Als Folge der Anwesenheit von PEG-Ketten und 5-FU sowie eines vermehrten Wassergehaltes des Tumorgewebes verändert sich die Relaxivität des Kontrastmittels.

Offensichtlich ist das Embolisat in der Lage, Diagnostik-Therapie-Liposom-Komplexe so zu binden, daß tatsächlich kein 5-FU abgebaut wird. Mit dem Auflösen der DSM durch die Amylase ist 5-FU vermehrt in der Lage, die Gefäßbahn zu verlassen und ein erhöhtes Signal nach sich zu ziehen (ab 30 min kein signifikanter Unterschied mehr zur Gruppe ohne 5-FU).

5.3 Schlußfolgerungen

Schlußfolgernd kann gesagt werden, daß es gelungen ist, unter intraarterieller Applikation, in Kombination mit der Chemoembolisation, über einen begrenzten Zeitraum von 90 min bis 4 h eine akzeptable Korrelation von 5-FU-Gehalt und Signalintensität im Tumorgewebe zu erreichen. Offensichtlich geht nur über diesen Zeitraum die Signalintensität des Kontrastmittels Gd-DTPA mit der hohen Empfindlichkeit der HPLC als Nachweis für 5-FU konform. Es muß erwähnt werden, daß ein hoher 5-FU-Spiegel nicht zwingend mit der entsprechenden Metabolisierung zu M3 einhergeht. Daraus ist, im Hinblick auf frühere Versuche ohne Kontrastmittel zu schließen, daß die Aufnahme in die Zelle offensichtlich durch die Anwesenheit des Kontrastmittels gestört wird. Die Verhältnisse der Anreicherung zwischen den Gruppen bleiben insofern erhalten, als daß die Vorteile der regionalen Applikation und der Kombination mit einem Embolisat (Chemoembolisation) deutlich gegenüber der systemischen Anwendung demonstriert werden konnte.

Sowohl die relativ breiten Varianzen der Signalintensitäten der 5-FU-tragenden Gadolinium-Liposomen als auch die der 5-FU-Gehalte bzw. M3-Umwandlungsraten lassen darauf schließen, daß beim Herstellungs-, Applikations- und/oder Zirkulationsprozeß der Therapie-Diagnostik-Liposomen Prozesse ablaufen, die so nicht kontrolliert werden können.

Bezüglich der Entwicklung eines spezifischen, in leberfremdem Tumorgewebe anreichernden Kontrastmittels ist es gelungen, durch die Kopplung von Gd-DTPA an Stealth[®]-Liposomen und deren intraarterielle Applikation in Kombination mit Embolisation, eine gegenüber der um das über Siebenfache der Dosis an freiem intravenös applizierten Kontrastmittel überlegenes Enhancement in die Tumorzelle zu erreichen. Das zeigt sich durch das anhaltend hohe Signal, während ein vorübergehendes Enhancement für eine

Perfusion des Gewebes mit dem im Blut verbleibenden Kontrastmittel spricht (Ni et al., 1994).

Ein Positivkontrastgewinn läßt sich nur unter den Bedingungen der lokoregionären Embolisation erreichen, da erst so die entsprechend nötige Signaldifferenz zum Ausgangswert im Tumor erzielt wird, wobei kaum Enhancement in der Leber besteht. Das Tumorgewebe entwickelt sich vom hypointensen Signalverhalten zur Hyperintensität gegenüber der Leber.

Unter intravenöser Applikation zeigt sich, entgegen der in der Literatur vertretenen Meinung einer bevorzugten Anreicherung von in Stealth[®]-Liposomen verkapseltem Kontrastmittel, ein deutlicher Negativ-Kontrast, der durch die dem Tumorgewebe gegenüber bevorzugte Aufnahme in die Leber unter Nutzung von Stealth[®]-Liposomen erreicht wird. Der Tumor stellt sich dem Lebergewebe gegenüber hypointens dar. Die Anreicherungen von 5-FU, verkapselt in Stealth[®]-Liposomen, bestätigen diese Verhältnisse. Die Frage besteht, ob bei intravenöser Applikation einer höheren Dosis von Gd-DTPA-Liposomen die in der Literatur beschriebene Anreicherung erreicht werden kann.

Die Korrelation von 5-FU und der Signalintensität von Gd-DTPA nach intraarterieller Applikation von 5-FU-Gd-SUV-PEG mit Embolisat ist hinsichtlich künftiger experimenteller Studien ein großer Fortschritt, bleibt jedoch, mit Blick auf den klinischen Einsatz, vorerst nicht anwendbar, da das MR-Monitoring gegen den Vorteil der mit erhöhter Sicherheit und stärkerer Anreicherung erreichbare 5-FU-Spiegel erkauft werden muß, die in der Spitzengruppe eine sehr hohe M3-Umwandlungsrate garantieren (Berger et al., 1998). Dieser Aspekt bleibt daher in erster Linie der vorklinischen Anwendung vorbehalten, wobei mit der Nutzung der MRT als einem nicht-invasivem Verfahren ein weiterer Schritt bei der Einsparung von Versuchstieren getan werden konnte. Ob getrennt verkapselte Kontrastmittel und Therapeutika, gleichzeitig appliziert, sich gegenseitig in geringerem Maße beeinflussen, muß getestet werden.

Einen weiteren interessanten Aspekt wirft die Frage auf, ob die intraarterielle Gruppe ohne die Anwendung eines Embolisates im Langzeitversuch in der Lage ist, die Ergebnisse der intraarteriellen Gruppe ohne Kontrastmittel und ohne Embolisat zu übertreffen. Voraussetzend muß jedoch eine höhere in vivo-Stabilität bei der Anreicherung von 5-FU und dessen Transport in die Zelle garantiert sein.

Die Nutzung von liposomal verkapseltem Gd-DTPA in Kombination mit Embolisation ist im zeitlichen Zusammenhang mit einer lokoregionären Therapie durchaus im Bereich der klinischen Diagnostik anwendbar. So kann zum Beispiel die Applikation des Liposomen-Kontrastmittel-Konstruktes vor einer erneuten lokoregionären Applikation im Rahmen einer Sequenz-Therapie erfolgen, wie sie heute in der klinischen Routine bei der Behandlung von Lebermetastasen zunehmend selbstverständlicher wird. Sowohl Stealth[®]-Liposomen als auch Spherex[®] sind unbedenklich und mit großer Sicherheit applizierbar. Gd-DTPA stellt seit Jahren ein sehr sicheres und erprobtes Kontrastmittel dar, das in dieser geringen

Diskussion

Dosierung (33 % der üblichen Dosierung) eine noch geringere Belastung des Organismus darstellt, als die in der diagnostischen Routine übliche.