

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
(im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, WBex)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Ulrich Pohl

Experimentelle Tumorthherapie mit liposomal enkapsuliertem Camptothecin

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Siiri Lüdemann
aus Erfurt

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marc Dellian
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Volker Heinemann
Prof. Dr. Christiane J. Bruns

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Martin E. Eichhorn

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2011

Meiner Familie

I.	Einleitung	1
I.1.	Vorbemerkung	1
I.2.	Tumorangiogenese	2
I.3.	Antivaskuläre Tumorthherapie	6
I.4.	Kationische Liposomen	8
I.5.	Ziel der vorliegenden Arbeit	10
II.	Material und Methoden	11
II.1.	Versuchstiere	11
II.2.	Tumormodelle	11
II.2.1.	Lewis Lungen Karzinom (LLC-1)	11
II.2.1.1	Subkutane Implantation der LLC-1 Zellen	12
II.2.2.	Amelanotisches Melanom (A-Mel-3)	13
II.2.2.1.	Modell der transparenten Rückenhautkammer	13
II.2.2.2.	Präparation der Rückenhautkammer	14
II.2.2.3.	Implantation der A-Mel-3 Tumorzellen in die Rückenhautkammer	15
II.2.2.4.	Implantation des Verweilkatheters	16
II.3.	EndoTAG®-2	17
II.3.1.	Synthese von EndoTAG®-2	17
II.3.2.	Analyse von EndoTAG®-2	18
II.4.	Untersuchungsmethoden	19
II.4.1.	Fluoreszenzmakroskopie	19
II.4.2.	Intravitalmikroskopie (IVM)	20
II.4.2.1.	Mikrohämodynamische Parameter	21
II.4.2.1.1.	Bestimmung der funktionellen Gefäßdichte (fvd)	21
II.4.2.1.2.	Bestimmung des Gefäßdurchmessers (d)	21
II.4.2.1.3.	Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC})	21
II.4.2.1.4.	Berechnung des mikrozirkulatorischen Perfusionsindexes	22
II.4.3.	Histologische Untersuchungen	23
II.4.3.1.	Immunhistochemische CD31-Färbung	23
II.4.4.	Molekularbiologische Untersuchungen	24
II.4.4.1.	RNA Extraktion	25
II.4.4.2.	Reverse Transkription (RT)	25
II.5.	Versuchsgruppen und -protokolle	28
II.6.	Statistik	30

III.	Ergebnisse	31
III.1.	Antransport von EndoTAG®-2 in solide Tumore	31
III.2.	Intratumorale Verteilung von EndoTAG®-2	34
III.3.	Ergebnisse der EndoTAG®-2 Tumorstudie	35
III.4.	Tumorgefäßdichte	38
III.5.	Ergebnisse der Intravitalmikroskopie.....	40
III.5.1.	Funktionelle Gefäßdichte	41
III.5.2.	Tumorgefäßdurchmesser	42
III.5.3.	Erythrozytenfließgeschwindigkeit	43
III.5.4.	Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex	44
III.6.	Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen	45
III.6.1.	β-ACTIN Expression.....	45
III.6.2.	VEGF-A Expression	46
III.6.3.	VEGF-R1 Expression.....	47
III.6.4.	VEGF-R2 Expression.....	48
IV.	Diskussion	49
IV.1.	Diskussion der Methodik	49
IV.1.1.	Tumormodelle	49
IV.1.1.1	LLC-1	49
IV.1.1.2	A-Mel-3	50
IV.1.2.	Histologische Untersuchungen.....	54
IV.1.3.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	54
IV.2.	Diskussion der Ergebnisse	56
IV.2.1.	Camptothecin, seine Analoga und EndoTAG®-2.....	56
IV.2.2.	Targeting von EndoTAG®-2	59
IV.2.3.	Therapeutische Effektivität von EndoTAG®-2	60
IV.2.4.	Vorteile einer EndoTAG®-2 Therapie.....	65
V.	Zusammenfassung.....	67
VI.	Literaturverzeichnis.....	69
VII.	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	92
VIII.	Danksagung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin Complex
A-Mel-3	amelanotisches Hamstermelanom 3
AUC	Area under curve
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid
CD31 (=PECAM-1)	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
CPT	Camptothecin
d	Gefäßdurchmesser bzw. Tag
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOTAP	1,2 Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan
EndoTAG®-2	liposomal enkapsuliertes Camptothecin
EPR	Enhanced Permeability and Retention
fd	funktionelle Gefäßdichte
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HBO	Quecksilber Kurzbogenlampe von Osram
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
ID	Innendurchmesser
i.v.	intravenös
IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
LLC-1	Lewis lung carcinoma 1
M-MLV-RT	Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
n	Anzahl
MW	molecular weight bzw. Mittelwert
NSCLC	non small cell lung carcinoma
OD	Außendurchmesser
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pCO ₂	Partialdruck Kohlendioxid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PIGF	Placental Growth Factor

Abkürzungsverzeichnis

pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
Q	segmentaler Blutvolumenfluss
RBC	red blood cell (Erythrozyt)
RGB	Rot-Grün-Blau
ROI	Regions of Interest
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach dem Roswell Park Memorial Institut
RT	Reverse Transkription
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklusses
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGI	Vascular Endothelial Growth Inhibitor
VEGF-R	Vascular Endothelial Growth Factor Rezeptor
V _{RBC}	Erythrozytenfließgeschwindigkeit

I. Einleitung

I.1. Vorbemerkung

Krebserkrankungen sind in den industrialisierten Ländern nach wie vor die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems. Im Frühjahr 2010 veröffentlichte die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (www.gekid.de) in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut (www.rki.de) ihre aktuellen Schätzungen. Demnach wurden im Jahr 2006 etwa 426.800 Krebsneuerkrankungen in Deutschland registriert (Männer 229.200, Frauen 197.600) (Abb.1), 93.800 Fälle mehr als im Jahr 1995 (Gesamt 333.000, Männer 161.600, Frauen 171.400). Obwohl die Zahl für 2006 etwas niedriger als die für das Jahr 2004 publizierte Gesamtzahl von 436.500 ist, kann dies nicht einem Rückgang der Krebsneuerkrankungen in Deutschland zugeschrieben werden, sondern ist eher dadurch bedingt, dass deutlich mehr regionale Krebsregister ihre Daten zur Schätzung beigetragen haben und so eine insgesamt höhere Bevölkerungszahl die Datengrundlage bilden. Wie schon in den vorherigen Jahren sind Erkrankungen der Prostata (26,2 %), des Darms (15,8%) und der Lunge (14,2%) die häufigsten Tumorlokalisationen bei Männern. Frauen erkrankten am häufigsten an Brust- (29,3%), Darm- (16,4%) oder Lungenkrebs (7,4%). Die bundesweit eingeführten Früherkennungsmaßnahmen, wie z.B. das Mammographie-Screening oder das 2008 eingeführte Hautkrebs-Screening, werden in den kommenden Jahren die Zahl der neu auftretenden Brust- bzw. Hautkrebsneuerkrankungen erheblich beeinflussen.

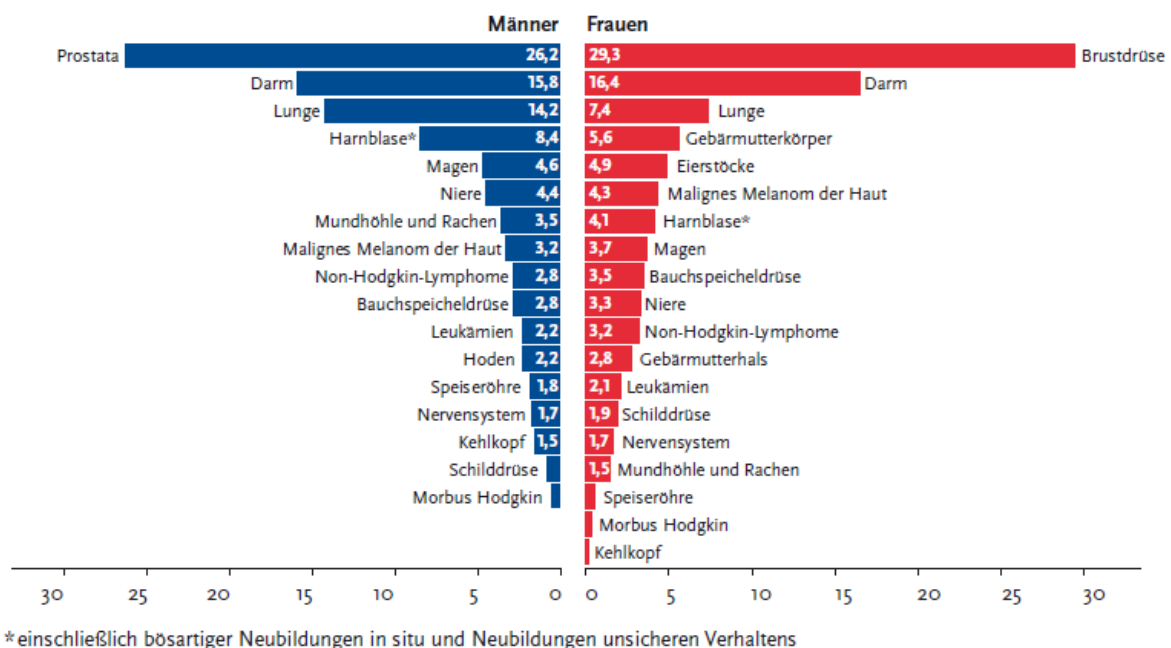


Abb. 1: Prozentualer Anteil an Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2006

(Männer n = 229.200, Frauen n = 197.600, laut Krebsregister für Deutschland 2010)

1995 lag die Anzahl der Sterbefälle durch Krebs in Deutschland bei 212.913 (Männer 108.334, Frauen 104.579) (www.gbe-bund.de). Im Jahr 2006 starben dagegen nur noch 210.930 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Dieser Rückgang konnte registriert werden trotz steigender Beteiligung der regionalen Krebsregister (Männer 112.438, Frauen 98.492) (Abb. 2).

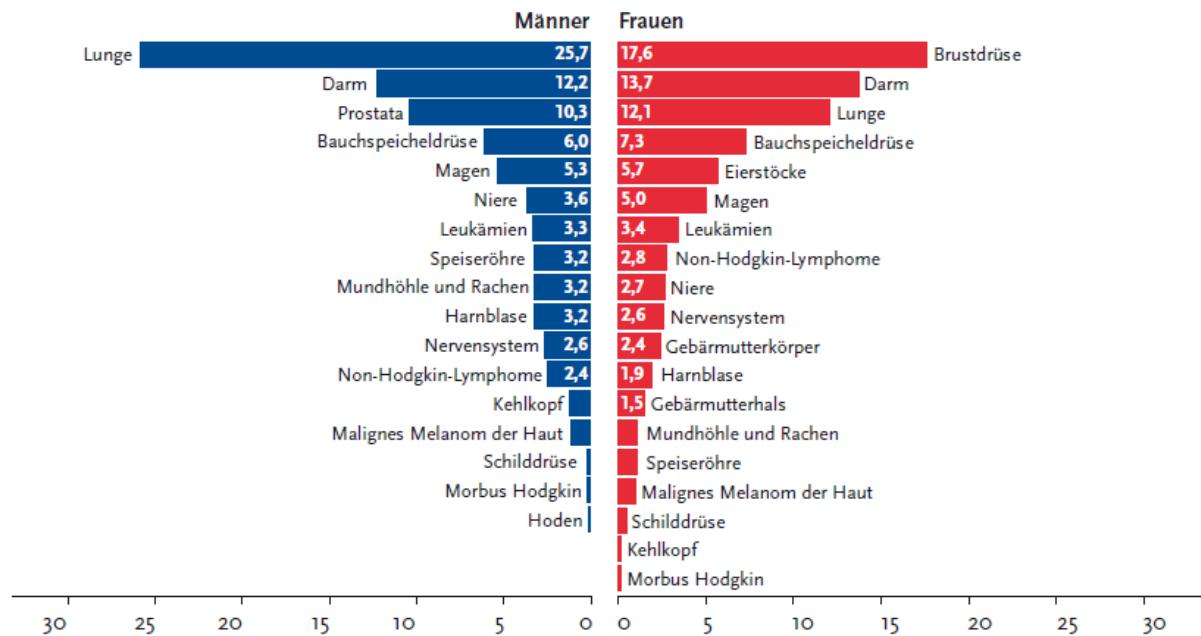


Abb. 2: Prozentualer Anteil an Krebssterbefällen in Deutschland 2006

(Männer n = 112.438, Frauen n = 98.492, laut Krebsregister für Deutschland 2010)

Diese Daten zeigen, dass durch weiterentwickelte Methoden zur Früherkennung von Tumoren zwar mehr Krebsneuerkrankungen registriert wurden, aber durch intensive Forschung und Weiterentwicklung der Therapiemethoden weniger Menschen sterben mussten. In den vergangenen Jahrzehnten hat sich das Wissen über Ursachen und molekulare Grundlagen zur Entstehung und Wachstum von Tumoren wesentlich erweitert.

I.2. Tumorangiogenese

Für die Entwicklung und Größenzunahme ist ein Tumor auf die Ausbildung eines eigenen Blutgefäßsystems angewiesen. Der Prozess der Neubildung von Blutgefäßen aus dem bereits bestehenden Gefäßsystem wird als Angiogenese bezeichnet [Folkman, 1995a]. Nach der Embryonalentwicklung findet Angiogenese normalerweise nur noch bei wenigen physiologischen Vorgängen statt, wobei die Perioden der Blutgefäßbildung relativ kurz und streng reguliert sind. Zum Beispiel im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus [Modlich et al., 1996; Folkman and Shing, 1992; D'Amore and Thompson, 1987], der

Plazentaentwicklung [Djonov et al., 2001] und der Milchdrüsenentwicklung während einer Schwangerschaft [Matsumoto et al., 1992].

Eine zentrale Rolle spielt die Angiogenese aber auch bei einigen pathophysiologischen Prozessen, wie der Wundheilung [Clark et al., 1982; Folkman, 1997; Hunt et al., 1984; Tonnesen et al., 2000], bei chronischen Entzündungen (z.B. rheumatoider Arthritis, Crohn'sche Krankheit) [Auerbach and Auerbach, 1994; Folkman, 1995a; Griffioen and Molema, 2000; Paleolog, 2002] und bei ophthalmologischen Erkrankungen (z.B. diabetische Retinopathie) [Brooks et al., 1998; Hammes et al., 1996; Kakizawa et al., 2004]. Entscheidenden Einfluss nimmt die Angiogenese aber auch auf das Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren und auf einige Leukämieformen [Aguayo et al., 2000; Folkman, 1990; Parangi et al., 1996; Weidner et al., 1991; Weidner et al., 1993].

Maligne entartete Zellen können sich bis zu einem Durchmesser von ca. 1-2 mm durch Diffusion aus dem umliegenden Gewebe ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen [Folkman, 1971; Folkman et al., 1989]. In diesem Stadium halten sich Proliferation und Apoptose von Tumorzellen im Gleichgewicht und können so über mehrere Jahre verweilen, was als „tumor dormancy“ bezeichnet wird [Folkman, 1995b; Holmgren et al., 1995]. Für ein Wachstum über diese Größe hinaus benötigen solide Tumore die Ausbildung eines eigenen Blutgefäßsystems, welches die nutritive Versorgung der Tumorzellen gewährleisten kann. Dieser Vorgang wird als Tumorangiogenese bezeichnet. Der Beginn der Tumorangiogenese, der so genannte „angiogenetic switch“, bezeichnet das Umschalten von einem ruhenden Tumorzellverband in einen endothelzellaktivierten, wachsenden Tumor [Folkman et al., 1989; Hanahan and Folkman, 1996; Senger et al., 1996]. Solange die Tumorzellen im Stadium der „tumor dormancy“ vorliegen, überwiegen die Inhibitoren der Angiogenese bzw. besteht ein Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Regulatoren der Tumorangiogenese (Abb. 3). Einer der wichtigsten proangiogenetischen Faktoren ist der Vascular Endothelial Growth Faktor (VEGF) [Leung et al., 1989].


Proangiogenetische Faktoren	Antiangiogenetische Faktoren
Angiopoietin -1, -2 Angiogenin Interleukin-8 EGF bFGF HGF IGF PDGF TGF - α , - β TNF- α TIE-2 VEGF -A, -B, -C, -D	 Angiostatin Endostatin Interleukin -4, -12, -18 Interferon - α , - β , - γ PF-4 PFDF Prolactin TGF: - α , - β TSP -1, -2 TIMPs Tumstatin Vasostatin VEGI

Abb. 3: Übersicht pro- und antiangiogenetischer Faktoren (nach [Distler et al., 2003; Eichhorn et al., 2007a])

EGF: Epidermal Growth Factor, **bFGF:** basic Fibroblast Growth Factor, **HGF:** Hepatocyte Growth Factor, **IGF:** Insulin-like Growth Factor, **PDGF:** Platelet derived Growth Factor, **TGF:** Transforming Growth Factor, **TNF:** Tumor Necrosis Factor, **TIE:** Tyrosinkinase-Rezeptor, **VEGF:** Vascular Endothelium Growth Factor, **PF:** Platelet Factor, **PFDF:** Pigment Epirghelium derived Factor, **TSP:** Thrombospondin, **TIMPs:** Tissue Inhibitors of MMP, **VEGI:** Vascular Endothelial Growth Inhibitor

Der „angiogenic switch“ kann ausgelöst werden durch Veränderungen des Tumormikromilieus, wie z.B. durch Hypoxie [Folkman, 1997; Shweiki et al., 1992], was zu einer Erhöhung des pCO_2 , Verringerung des pO_2 , sowie einem Abfall des pH-Wertes führt. Außerdem können Genmutationen, wie die Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, eine Induktion der Tumorangiogenese auslösen [Kerbel et al., 1998; Kerbel et al., 2000; Rak et al., 2000; Rak et al., 2002]. Der Ablauf der Tumorangiogenese ist in Abbildung 4 dargestellt. Durch die Ausschüttung von Aktivatoren (z.B. VEGF) und die Herunterregulation von Inhibitoren (z.B. VFGI) der Angiogenese kommt es zur initialen Stimulation der Endothelzellen bereits bestehender Blutgefäße. Diese Aktivierung erhöht die Gefäßpermeabilität und die Sekretion von proteolytischen Enzymen, wie z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), die zur Auflösung der extrazellulären Matrix und der vaskulären Basalmembran führen [Brooks et al., 1998]. Die Endothelzellen wandern aus dem Verbund aus in Richtung angiogenetischen Stimulus, proliferieren und bilden Röhren mit Lumen, welche sich zu Blutgefäßen weiterentwickeln. Diese neu gebildeten Blutgefäße erreichen den Tumor und gewährleisten dessen nutritive Versorgung. Abschließend wird zur Stabilisierung der neu gebildeten Blutgefäße die Basalmembran wiederhergestellt und Perizyten werden in die Gefäßwand rekrutiert [Findlay, 1986; Hammersen et al., 1985; Klagsbrun and Moses, 1999]. Der so entstandene vaskularisierte Tumor kann nun wachsen und die hämatogene Metastasierung ist ermöglicht [Eliceiri and Cheresch, 2000; Gupta and Qin, 2003; Sutherland et al., 1988].

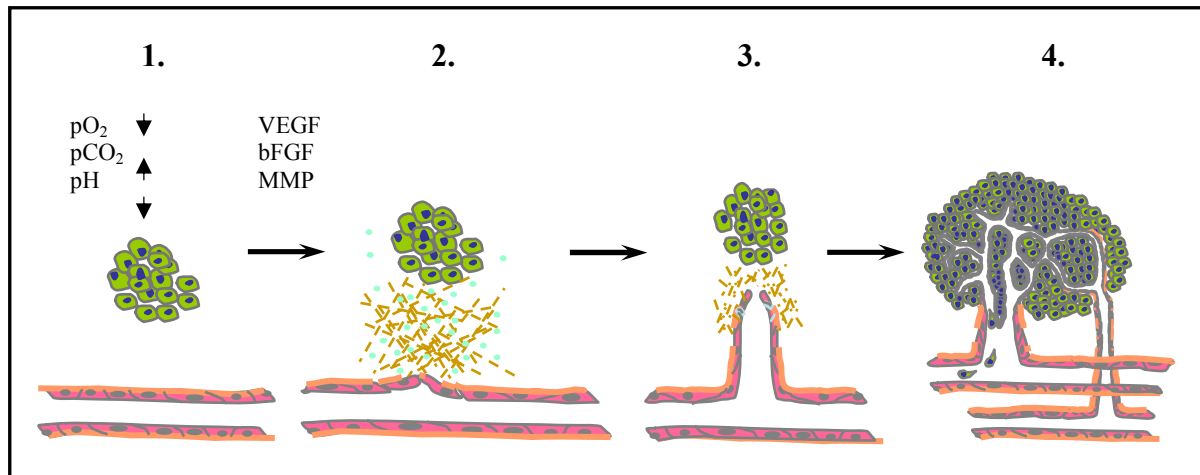


Abb. 4: Ablauf der Tumorangiogenese

1. Ruhestadium/„tumor dormancy“: Tumor hat kritische Größe von ca. 1-2 mm³ erreicht. Entweder stagniert das Tumorwachstum und er verbleibt im Stadium der „tumor dormancy“...

2. Initialisierung: ...oder der Tumor geht aufgrund von Veränderungen im Tumormikromilieu in die vaskuläre Phase und die Tumorzellen sezernieren proangiogenetische Faktoren.

3. Proliferation: Es kommt zur Endothelzellproliferation und –migration in Richtung Tumor.

4. vaskularisierter Tumor: Der Anschluss des Tumors an das vaskuläre System ermöglicht ihm Wachstum und Metastasierung.

Das aus der Tumorangiogenese hervorgegangene Blutgefäßsystem zeichnet sich im Gegensatz zum Blutgefäßsystem des Normalgewebes durch eine chaotisch wirkende Architektur mit dünner Wandstruktur und irregulären Blutfluss aus. Morphologisch besteht kein Unterschied zwischen der Gefäßwand von Arteriolen, Kapillaren und Venolen. Das neu gebildete Tumorblutgefäßsystem besitzt größere Endothelzelllücken (ca. 200 nm – 2 µm), irreguläre Perizyten und eine nur bruchstückhaft ausgebildete Basalmembran [Hobbs et al., 1998; McDonald and Baluk, 2002; Morikawa et al., 2002], was die Permeabilität in den Tumorgefäßen im Gegensatz zu den Gefäßen des Normalgewebes erhöht [Dvorak et al., 1988; Endrich et al., 1982b; Gerlowski and Jain, 1986; Hammersen and Hammersen, 1983]. Die großen Poren im Endothel der Tumorblutgefäße würden einen selektiven Antransport von Substanzen in den Tumor ermöglichen. Jedoch herrscht ein hoher interstitieller Druck innerhalb des Tumors, der die Extravasation von Flüssigkeiten und Makromolekülen entgegenwirkt, und so die Erreichbarkeit für systemisch verabreichte Therapiesubstanzen stark beeinflusst [Curnis et al., 2002; Dellian et al., 1996; Leunig et al., 1992].

I.3. Antivaskuläre Tumorthherapie

Bei der Behandlung von Tumorerkrankungen dominieren die konventionellen Therapieformen wie Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie, aber auch neue Therapiestrategien zur Bekämpfung von Krebs sind auf dem Vormarsch. Während die konventionellen Therapiekonzepte vor allem primär auf die Tumorzelle selbst abzielen, richteten sich zum Beispiel neuartige antivaskuläre Therapieansätze auf die den Tumor versorgenden Blutgefäße [Burrows and Thorpe, 1994; Folkman, 1971]. Das Ziel dieser Therapieform besteht darin, den Tumor „auszuhungern“, indem man die Angiogenese inhibiert und so die nutritive Blutzufuhr stoppt. Erst sekundär erfolgt ein Untergang der Tumorzellen aufgrund einer Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen.

Generell können zwei unterschiedliche antivaskuläre Therapiekonzepte unterschieden werden (Abb. 5).

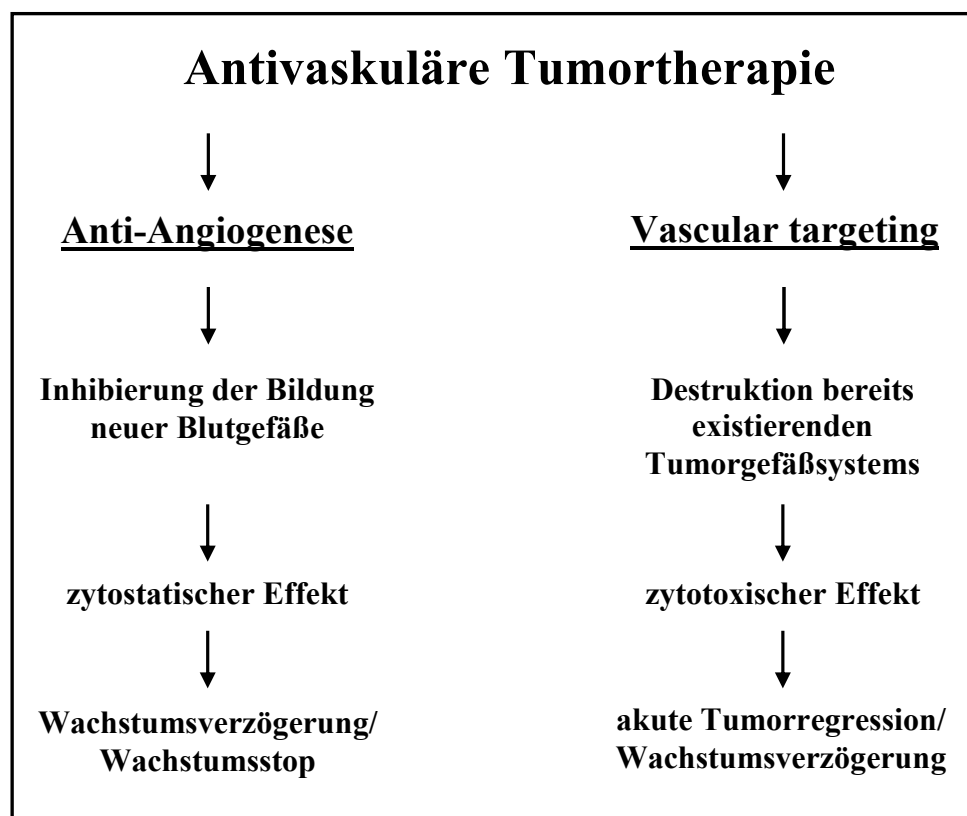


Abb. 5: Gliederung der Antivaskulären Tumorthherapie nach [Dellian et al., 2002]

Die Anti-angiogenetische Therapie inhibiert die Ausbildung neuer Tumorblutgefäße und wurde erstmals von Folkman postuliert [Folkman, 1971]. Da diese Therapieform bereits existierende Blutgefäße nicht angreift, besitzt sie eher einen zytostatischen Effekt und bewirkt

eine Wachstumsverzögerung. In der Klinik werden für diesen Therapieansatz zum Beispiel Inhibitoren der angiogenetischen Wachstumsfaktoren eingesetzt, wie z.B. von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), der ein wichtiger Wachstumsfaktor der Angiogenese ist. Bevacizumab (Avastin®) ist ein monoklonaler Antikörper, der sich an freies VEGF bindet. Er ist seit 2004 als erstes antiangiogenetisches Medikament bei metastasiertem und fortgeschrittenem Kolorektalkarzinom zugelassen [Hurwitz et al., 2004; Hurwitz and Saini, 2006; Scott, 2007]. Weiterhin wurde er in den letzten Jahren auch an anderen Tumorarten getestet und wird derzeit beim fortgeschrittenen Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC = non small cell lung carcinoma), beim Mammakarzinom und Glioblastom eingesetzt. Außerdem werden zur Bekämpfung von Tumorerkrankungen Tyrosinkinase-Inhibitoren eingesetzt, wie die kleinmolekularen Substanzen SU5416 und SU6668, die eine intrazelluläre Signalweiterleitung verhindern [Bergers et al., 2003; Klenke et al., 2007; Krystal et al., 2001; Litz et al., 2004; Wang et al., 2004; Yee et al., 2002], oder Matrix-Metalloproteinasen-Inhibitoren [Duerr et al., 2008; Ohta et al., 2001].

Dem gegenüber zielt eine „Vascular targeting“ Therapie, erstmals von Denekamp postuliert, auf eine selektive und effiziente Destruktion des bereits existierenden Tumorblutgefäßsystems ab [Denekamp, 1982; Denekamp, 1984]. Diese Therapie hat für die Tumorzellen einen zytotoxischen Charakter, im günstigsten Fall kann hierdurch eine akute Tumorregression oder erhebliche Wachstumsverzögerung erreicht werden. In den letzten Jahren konnten kleinmolekulare Substanzen entwickelt werden, wie z.B. tubulinbindendes Combretastatin oder ZD6126, die im fortgeschrittenen Stadium solider Tumoren eine selektive Zerstörung von angiogenetisch aktiven Tumorendothelzellen ermöglichen [Hinnen and Eskens, 2007]. Darüber hinaus stellen Liposomen, besonders kationisch geladene Liposomen, eine neue attraktive Substanzklasse dar, um eine „Vascular targeting“ Therapie realisieren zu können. Aufgrund ihrer Struktureigenschaften, mit lipophiler Phospholipid-Doppelmembran und hydrophilem Kompartiment im Inneren, eignen sie sich hervorragend als Transportmedium um wasser- oder fettlösliche Stoffe zu enkapsulieren. Sie dienen so als Carrier für pharmazeutisch wirksame Substanzen, um an die Tumorendothelzellen zu gelangen [Campbell et al., 2002; Dass, 2003; Krasnici et al., 2003; Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004; Thurston et al., 1998; Torchilin, 2005].

Die Vorteile der antivaskulären Therapie sind einerseits das breite Wirkspektrum, da alle soliden Tumore zum Wachstum ein eigenes Blutgefäßsystem benötigen und somit Angiogenese induzieren, andererseits bedeutet der direkte Angriff auf die Tumorendothelzellen eine gute Zugänglichkeit der Wirksubstanz, da keine endothelialen

Barrieren überwunden werden müssen. Außerdem sind Tumorendothelzellen im Gegensatz zu Tumorzellen nicht neoplastisch und somit genetisch stabil, wodurch eine geringere Resistenzentwicklung erwartet wird [Boehm et al., 1997; Hobson and Denekamp, 1984; Kerbel, 1991]. Des Weiteren ist eine antivaskuläre Therapie sehr effizient, da ein Tumorgefäß hunderte von Tumorzellschichten mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, und es bei der Zerstörung eines Tumorblutgefäßes zum Untergang von tausenden Tumorzellen kommt [Denekamp, 1984; Denekamp, 1999; Neri and Bicknell, 2005].

I.4. Kationische Liposomen

In verschiedenen Studien konnte eine ladungsvermittelte Anheftung von Lipidkomplexen an proliferierende Tumorendothelien nachgewiesen werden. Durch eine kationische Oberflächenladung der Liposomen kommt es zu einer weitaus höheren selektiven Anreicherung im Tumorendothel als im Vergleich zu anionischen oder neutralen Liposomen [Alessi et al., 2004; Campbell et al., 2002; Dass, 2003; Krasnici et al., 2003; Thurston et al., 1998; Torchilin, 2005]. Die stärkere Anreicherung am Tumorendothel kommt zustande, weil im angiogenetisch aktivierten Endothel mehr negativ geladene Membranproteine, z.B. Phosphatidylserin, expremiert werden als im normalen Endothel [Augustin et al., 1994; Ran and Thorpe, 2002; Ran et al., 2002].

Die „Targeting“ Eigenschaften von kationischen Liposomen macht man sich zu nutze, um antiproliferierende Wirkstoffe zu verpacken und gezielt an das Tumorendothel zu transportieren. Hierzu wurden in den letzten Jahren viele Studien unternommen, bei denen Liposomen als Carrier für verschiedenste Chemotherapeutika, wie z.B. Doxorubicin, Paclitaxel, Daunorubicin oder 5-Fluorouracil, dienen [Eichhorn et al., 2006; Eichhorn et al., 2010; Gokhale et al., 1996; Kunstfeld et al., 2003; Lasic, 1996; Mazumder, 1981; Richardson et al., 1997; Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004; Strieth et al., 2008a; Strieth et al., 2008b].

Camptothecin (CPT) ist ein zytostatisch wirksames Alkaloid, welches 1966 beim Screening nach natürlich vorkommenden und potentiellen Krebstherapeutika entdeckt wurde [Wall et al., 1966]. Es wird aus der Rinde des chinesischen Baumes *Camptotheca acuminata* isoliert. Seine zytotoxische Wirkung verursacht CPT durch die Hemmung der DNA-Topoisomerase I [Hsiang et al., 1985; Hsiang and Liu, 1988]. Die DNA-Topoisomerase I ist ein Enzym, dass im Zellkern lokalisiert ist und wichtige Vorgänge der DNA-Replikation, DNA-Transkription und DNA-Reparatur koordiniert [Liu et al., 1989]. Durch Bildung eines Komplexes aus DNA, DNA-Topoisomerase I und CPT wird eine Re-Ligation der Einzelstränge verhindert,

und es kommt zu irreversiblen Schäden der DNA [Hertzberg et al., 1989a; Verweij, 1995]. CPT ist nur in der S-Phase des Zellzyklus aktiv, wodurch nur proliferierende Zellen durch CPT geschädigt werden können. CPT zeigte zytostatische Wirksamkeit in klinischen Studien, aber aufgrund der ungünstigen physikochemischen und pharmakologischen Eigenschaften kam es bislang zu keiner Anwendung in der Krebstherapie.

CPT liegt in Lösung in einem pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen einer Lacton-Form und einer ringoffenen Carboxylat-Form vor [Fassberg and Stella, 1992; Garcia-Carbonero and Supko, 2002] (Abb. 6).

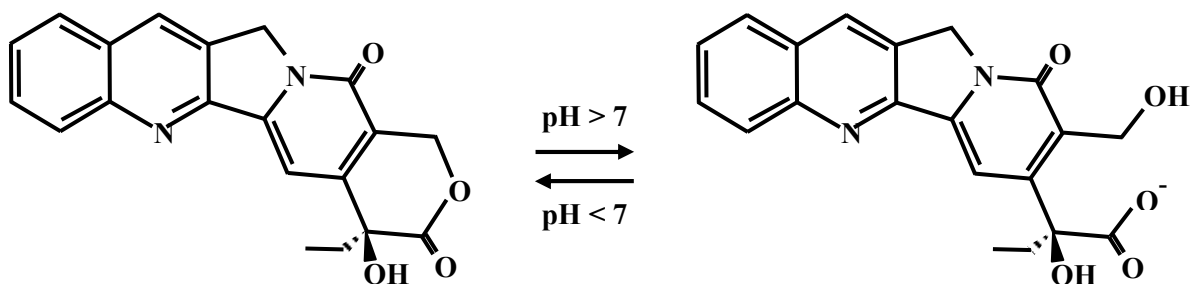


Abb. 6: Gleichgewicht zwischen Lacton- und Carboxylat-Form von Camptothecin

Bei einem physiologischem pH-Wert und oberhalb von pH 7 geht das Lacton in die wasserlösliche, ringoffene Carboxylat-Form über [Jung and Zamboni, 2001]. Da die Lacton-Form zu lipophil ist um es ohne Schwierigkeiten zu verabreichen, wurde zunächst CPT in das wasserlösliche Natriumsalz NCS-100880 umgewandelt [Gottlieb et al., 1970; Muggia et al., 1972]. In Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass das Gleichgewicht zwischen Lacton-Form und Carboxylat-Form entscheidend für die zytotoxische Aktivität und das Auftreten von Nebenwirkungen ist. Dabei wurde die Carboxylat-Form den auftretenden Nebenwirkungen, wie der hämorrhagischen Zystitis, zugeordnet und die Lacton-Form als die pharmakodynamisch aktivere Form angesehen [Giovanella et al., 2000; Hertzberg et al., 1989b; Ikegami et al., 2002; Schaeppi et al., 1974]. Aufgrund dieser Tatsachen wurde die Entwicklung von CPT Medikamenten in seiner Lacton-Form vorangetrieben. Durch eine liposomale Formulierung von CPT verspricht man sich viele Vorteile. Neben der Löslichkeit kann auch die Stabilität der Lacton-Form von CPT in physiologischem pH-Wert durch liposomalen Einschluss verbessert werden [Burke et al., 1993].

In Zusammenarbeit mit der Firma Munich Biotech/MediGene entsteht durch die Einkapsulierung von CPT in kationische Liposomen eine neue Substanz, die den Namen EndoTAG®-2 trägt.

I.5. Ziel der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit soll erstmals die antitumorale Wirkung und der Wirkmechanismus der neu entwickelten Substanz EndoTAG®-2 (liposomal enkapsuliertes Camptothecin) in verschiedenen Tumormodellen erforscht werden.

Hierzu sollte zunächst geklärt werden, ob nach Beladung der kationischen Liposomen mit CPT die "Vascular targeting" Eigenschaften erhalten bleiben. Am Modell der transparenten Rückenhautkammer mit A-Mel-3 Tumor sollte der Antransport und die Verteilung von EndoTAG®-2 im malignen und umliegenden gesunden Gewebe mittels quantitativer Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden.

Danach sollte in verschiedenen Tier- und Tumormodellen überprüft werden, in wie weit der therapeutische Wirkstoff gezielt an das Tumorblutgefäßsystem transportiert wurde und zu welchem therapeutischen Effekt dies führt.

Am subkutanem LLC-1 Karzinommodell in der C57/Bl6 Maus sollte die therapeutische Effizienz von EndoTAG®-2 im Vergleich zu freiem CPT untersucht werden.

Weiterhin sollten mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie (IVM) am Modell der Rückenhautkammer und implantiertem A-Mel-3 Tumor funktionelle Veränderungen am Tumorblutgefäßsystems im Verlauf einer EndoTAG®-2 Behandlung charakterisiert werden. Der Fokus lag hier auf der Tumolvaskularisierung und den mikrohämodynamischen Parametern, wie funktionelle Gefäßdichte, Tumorgefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und dem mikrozirkulatorischen Perfusionsindex.

Zusätzliche Erkenntnisse bezüglich des Wirkmechanismus von EndoTAG®-2 sollen immunhistologische (CD31-Färbung) und molekularbiologische (Expression von VEGF-A, VEGF-Rezeptor 1 und VEGF-Rezeptor 2) Untersuchungen des Tumorgewebes post mortem liefern.

II. Material und Methoden

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden von der Regierung Oberbayern genehmigt und am Institut für Chirurgische Forschung (im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, WBex) der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

II.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 11-13 Wochen alte männliche C57/Bl6 Mäuse oder männliche Syrische Goldhamster (*Mesocricetus aureatus*) im Alter von 6-8 Wochen aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Das mittlere Körpergewicht der Mäuse betrug 25-32 g, die Goldhamster wogen durchschnittlich 60-70 g. Im Tierstall herrschte eine Raumtemperatur von 24 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50%. Eine Zeitschaltuhr für die Beleuchtung gewährleistete einen zirkadianen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere wurden mit handelsüblichem Futter für Nagetiere (ssniff® GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser *ad libitum* versorgt. Nach chirurgischem Eingriff wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten, als Einstreu wurden Sägespäne verwendet. In die Versuche wurden nur Tiere aufgenommen, die keine Anzeichen von Erkrankungen aufwiesen, sowie normales Fress-, Putz- und Spielverhalten zeigten.

II.2. Tumormodelle

II.2.1. Lewis Lungen Karzinom (LLC-1)

Die Lewis Lungen Karzinom Zellen stammen aus einer murinen Zelllinie LLC-1 und wurden ursprünglich aus einem spontan auftretenden Lungentumor von C57/Bl6 Mäusen isoliert. Sie wurden erstmals 1951 von Frau Dr. Margaret R. Lewis beschrieben. Die in dieser Studie verwendete Zelllinie LLC-1 wurde aus einer Lungenmetastase des subkutan wachsenden Lewis Lungen Karzinom gewonnen [Bertram and Janik, 1980]. Die Zellen werden am Institut für Chirurgische Forschung in Kultur gehalten und sind als Tumormodell etabliert.

Das Tumormodell bietet eine gute Grundlage für immunhistochemische und molekularbiologische Fragestellungen, da für die Spezies Maus ein breites Spektrum an kommerziell erhältlichen Antikörpern besteht.

II.2.1.1 Subkutane Implantation der LLC-1 Zellen

Für die Untersuchung des therapeutischen Effekts von EndoTAG®-2 auf das Tumorstadium wurden 2×10^6 Lewis Lungen Karzinom (LLC-1) Zellen subkutan in den Rücken von C57/Bl6 Mäusen injiziert.

Hierzu wurden zunächst die tiefgefrorenen Tumorzellen (Passage 11) aufgetaut und in 50 ml RPMI (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) suspendiert. Um das Einfriermedium zu entfernen wurden die Zellen dreimal für 8 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Die Tumorzellen wurden nach der letzten Zentrifugation in einer 1 ml Tubulinspritze (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aufgezogen.

Die Versuchstiere wurden durch eine intramuskuläre Injektion mit einer Kombinationsanästhesie aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG, Ketavet®, Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (25 mg/kg KG, Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert. Die Rückenhaut wurde großflächig durch einen Elektrorasierer (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und anschließender chemischer Depilation (Pilca med, Olivia, Hamburg, Deutschland) enthaart und mit 70 %igem Alkohol desinfiziert. Nach subkutaner Implantation der 2×10^6 Lewis Lungen Karzinom Zellen wurden die Versuchstiere in einem Intensivpflege-Inkubator (Modell 7510, Dräger-Werk AG, Lübeck, Deutschland) bei 32 °C und 50 % Luftfeuchte aufbewahrt, um unter standardisierten Bedingungen ein schnelles Anwachsen der Tumorzellen zu gewährleisten.

Nach Erreichen eines Tumorstadiums von ca. 120 mm³ wurden die Tiere randomisiert den jeweiligen Versuchsgruppen zugeteilt und therapiert. Die Therapie wurde über die laterale Schwanzvene (*Vena caudalis*) verabreicht. Dabei wurden die Tiere mit einer Inhalationsnarkose aus Sauerstoff und Halothan (Halocarbon Laboratories, NJ, USA) narkotisiert, um eine reibungslose Punktion der Schwanzvene und Applikation des Therapeutikums zu gewährleisten. Die Kontrolltiere erhielten α -Trehalose, das als Lösungsmittel der kationischen Liposomen verwendet wurde. Die Therapietiere wurden mit liposomal enkapsuliertem bzw. freiem Camptothecin oder kationischen Leerliposomen behandelt. Alle Versuchstiere erhielten das gleiche Injektionsvolumen.

Mit einer Schieblehre wurden der längste und kürzeste horizontale Durchmesser, sowie die Höhe der Tumore gemessen. Das Tumorstadium [mm³] wurde errechnet aus: Länge x Breite x Höhe x 0,873 [Tomayko and Reynolds, 1989; Weiss et al., 1990].

II.2.2. Amelanotisches Melanom (A-Mel-3)

Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Mikrozirkulation in der Rücken-
hautkammer wurde das Tumormodell des syngenesischen amelanotischen Melanoms A-Mel-3
verwendet. Dieses spontan entstandene Hamstermelanom wurde von Fortner et al. erstmals
beschrieben [FORTNER et al., 1961]. Das Tumormodell ist seit vielen Jahren am Institut für
Chirurgische Forschung verwendet und eingehend charakterisiert. Implantiert in die
transparente Rücken-
hautkammer ist dieses Modell in der Mikrozirkulationsforschung
international etabliert und anerkannt [Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1980].

II.2.2.1. Modell der transparenten Rücken- hautkammer

Als Modell zur Untersuchung der Mikrozirkulation des A-Mel-3 Tumors wurde die
transparente Rücken-
hautkammer am Syrischen Goldhamster gewählt. Endrich et al.
beschrieben erstmals die Möglichkeit der Rücken-
hautpräparation mit dem Ziel, eine
intravitale mikroskopische Untersuchung am wachen Tier durchzuführen [Endrich et al.,
1980].

Die aus Titan bestehende Rücken-
hautkammer mit einem Gewicht von ca. 6 g besteht aus zwei
symmetrischen Kammerhälften und einer im Zentrum liegenden Öffnung von ca. 11 mm
Durchmesser (Abb. 7). In dieser Öffnung befindet sich ein 0,1 mm dickes Deckglas (Ø 11,8
mm, Hefe-
le Medizin-Technik, München, Deutschland), welches mittels eines
Kupferspreng-
rings fixiert wird. Um die Rücken-
haut des Hamsters an der Kammer fixieren zu
können, wurden kleine Löcher für Haltefäden am oberen Ende der Kammer angebracht.

Wie in Abbildung 7 erkennbar, dienen drei Verbindungsschrauben der definitiven Fixierung
der beiden Kammerhälften an die Rücken-
haut. Auf dem quergestreiften Rücken-
hautmuskel *Musculus cutaneus maximus* können im Bereich der zentralen Öffnung die Tumor-
zellen
implantiert werden und mit Hilfe der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie die
Mikrozirkulation der Tumorblutgefäße mehrmalig beobachtet und verfolgt werden.

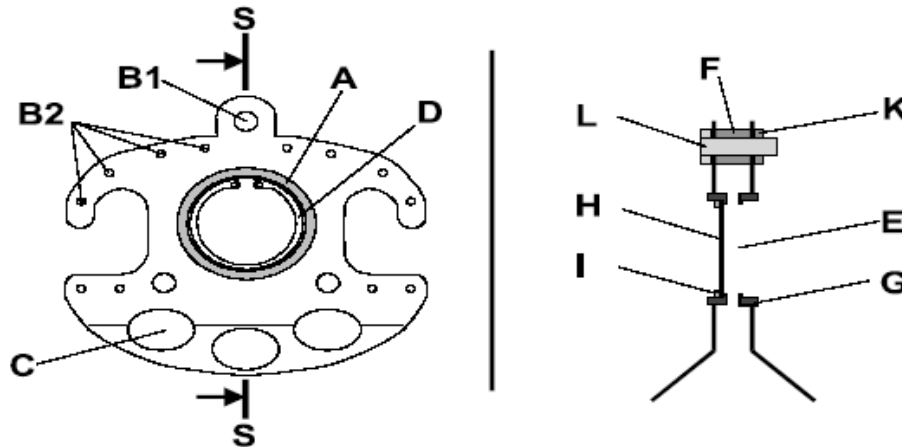


Abb. 7: Konstruktions-skizze einer Rücken-hautkammer [Nolte et al., 1995a]

Links: Seitenansicht

- A= Beobachtungsfenster zur IVM Untersuchung,
- B= Bohrung für Schrauben und Fixationsfäden,
- C= Ausstanzung für Kammergewichtsreduzierung,
- D= Spreng-ring aus Kupfer zur Fixation des Deckglases

Rechts: Querschnitt

- E= optischer Ausschnitt, F= Distanzmutter,
- G= Kammerring, H= Deckglas, I= Spreng-ring,
- K= Mutter, L= Schraube

II.2.2.2. Präparation der Rücken-hautkammer

Vor der chirurgischen Implantation der Rücken-hautkammer wurden die Versuchstiere zunächst durch eine intraperitoneale Injektion mit einer Kombinationsanästhesie aus Ketaminhydrochlorid (100 mg/kg KG) und Xylazinhydrochlorid (10 mg/kg KG) narkotisiert. Die Rücken-haut der Tiere wurde großflächig rasiert, chemisch enthaart und desinfiziert.

Der folgende operative Eingriff wurde auf einer auf 37 °C vorgeheizten Wärmeplatte durchgeführt, um das Auskühlen des Tieres während der Operation zu verhindern. Die dorsale Rücken-haut wurde angehoben und die Kammer kaudal an die entlang der Schulterbasis verlaufenden Versorgungsgefäße implantiert [Goetz, 1987]. Im Areal des Beobachtungsfensters der Rücken-hautkammer wurde die Cutis, die Subcutis mit dem Hautmuskel, sowie die beiden Schichten des *Musculus retractor*, zirkulär in einem Durchmesser von ca. 15 mm entfernt. Die verbleibenden Gewebeschichten wurden mit einem wieder entfernbarem Deckglas vor Infektion und Trauma geschützt (Abb. 8). Das Deckglas wurde mittels eines Spreng-ringes so im Titanrahmen fixiert, dass es möglich war durch Abnehmen des Deckglases freien Zugang zur Präparation zu erhalten. Die Titanrahmen wurden an der Hautfalte mit 5,0 Seidenfäden (Ethibond 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) durch die Bohrungen fixiert.

Die Tiere tolerierten die Rückenhautkammer sehr gut und zeigten keine Zeichen von Unbehagen oder Beeinträchtigung ihrer Schlaf – und Fressgewohnheiten.

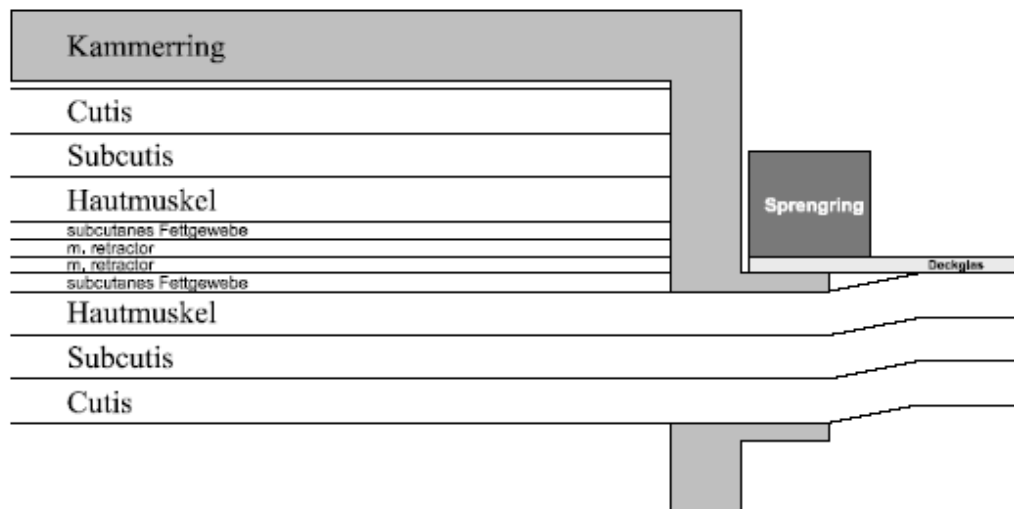


Abb. 8: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch die Rückenhaut nach Rückenhautkammerpräparation nach [Goetz, 1987]

II.2.2.3. Implantation der A-Mel-3 Tumorzellen in die Rückenhautkammer

Zwei Tage nach der Kammerpräparation wurden die A-Mel-3 Tumorzellen implantiert. Zunächst wurden die tiefgefrorenen Tumorzellen (Passage 20) aufgetaut und in 50 ml RPMI (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) suspendiert und gewaschen. Die Zellen wurden dreimal für 8 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen. Die Tumorzellen wurden nach dem letzten Waschschrift in einer 1 ml Tubulinspritze aufgezogen.

Für die Implantation der Tumorzellen, wie auch für die weiteren mikroskopischen Untersuchungen, wurden die Tiere in Plexiglasröhren (Effenberger, München, Deutschland) immobilisiert. Das Deckglas der Kammer wurde steril geöffnet und unter mikroskopischer Kontrolle (Mikroskop M650, Wild Heerbrugg, Schweiz) wurden 2×10^5 A-Mel-3 Zellen auf dem quergestreiften Rückenhautmuskel implantiert. Das Deckglas wurde anschließend steril und Luftblasenfrei wieder verschlossen. Die Tiere wurden anschließend in einem Intensivpflege-Inkubator bei einer Temperatur von 32 °C und 50 % Luftfeuchte gehalten, um unter standardisierten Bedingungen ein schnelles Anwachsen der Tumorzellen zu gewährleisten. In Abbildung 9 ist ein implantiertes A-Mel-3 Tumor mit umliegendem Normalgewebe exemplarisch dargestellt.

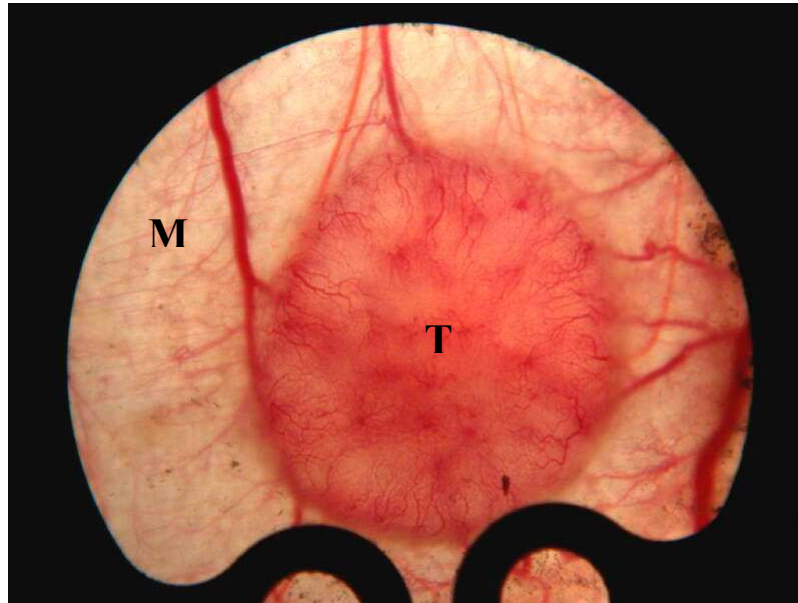


Abb. 9: Rückenhautkammerfenster mit implantiertem A-Mel-3 Tumor (Durchlicht)

M: quergestreifter Rückenhautmuskel *Musculus cutaneus maximus* mit Blutgefäßen

T: A-Mel-3 Tumor (5 Tage alt)

Deutlich sind die neu gebildeten Tumorgefäße zu erkennen, die von außen einwachsen.

II.2.2.4. Implantation des Verweilkatheters

Zwei bis drei Tage vor Untersuchungsbeginn erfolgte die Insertion der Verweilkatheter im Bereich der rechten *Vena jugularis interna*. Die Tiere wurden intraperitoneal narkotisiert (Ketamin 100 mg/kg KG, Xylazin 10 mg/kg KG). Zunächst wurde die frontale Halsregion der Hamster rasiert, chemisch enthaart und desinfiziert. Danach wurde mittels eines großlumigen Abbocaths (13 G x 51mm, Abbocath®-T, Ingelheim, Deutschland) ein subkutaner Hauttunnel bis kurz vor dem kranialen Ende der Rückenhautkammer gelegt, um den Katheter auszuleiten. Die rechte *Vena jugularis interna* wurde chirurgisch freigelegt, ein mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gefüllter Polyethylenkatheter (0,28 mm ID; 0,61 mm OD; Portex, Kent, England) eingeführt und bis kurz vor das Atrium des rechten Herzens vorgeschoben. Der Katheter wurde mit chirurgischen Fäden (Perma-Handseide 6-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) an der Vene fixiert. Nach Zunaähen der Wunde wurde der Katheter verschlossen und an der Rückseite der Rückenhautkammer aufgewickelt und befestigt. Am Tag der Untersuchungen wurde der Katheter mit einer Einmalkanüle (27 G, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) punktiert und die verschiedenen Substanzen zur Tumorthherapie oder Fluoreszenzmarker für die Intravitalmikroskopie (IVM) verabreicht.

II.3. EndoTAG®-2

II.3.1. Synthese von EndoTAG®-2

Zur Synthese von EndoTAG®-2 wurde das kationische Lipid 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propan (DOTAP) (Avanti Polar Lipids Inc, Alabaster, USA) und der Wirkstoff Camptothecin (CPT) (Boehringer Ingelheim, Deutschland) verwendet. Für die Einkapsulierung von CPT wurde zunächst die anionische Carboxylat-Form von CPT durch Zugabe von Ammoniumhydroxid gebildet (Abb.10).

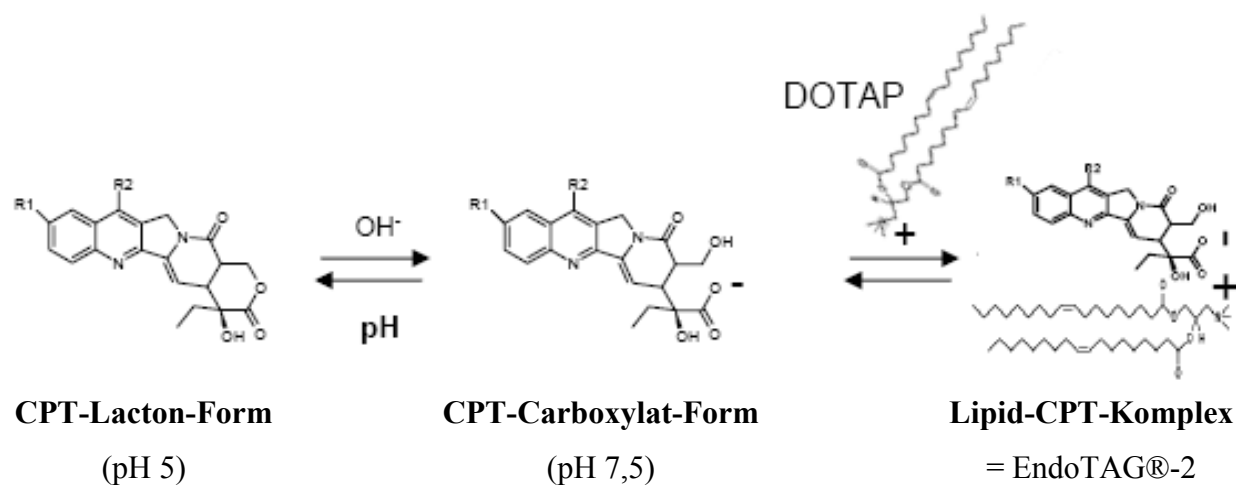


Abb. 10: Bildung von EndoTAG®-2 nach [Eichhorn et al., 2007b]

Das Gleichgewicht zwischen CPT in Lacton-Form (neutral, lipophil) und Carboxylat-Form (anionisch, wasserlöslich) ist pH-Wert abhängig und reversibel.

Die anionisch geladene Carboxylat-Form von CPT bildet mit dem kationischen Lipid DOTAP ein Komplex das als EndoTAG®-2 bezeichnet wird.

EndoTAG®-2 wurde nach der Lipid-Film-Methode [Szoka et al., 1980] hergestellt. Hierzu wurden zunächst das kationische Lipid DOTAP und die anionische Carboxylat-Form von CPT eingewogen, in Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst und in einen Rundkolben überführt. Im Rotationsverdampfer wurde das Gemisch langsam unter Vakuum erwärmt, so dass das Lösungsmittel (Ethanol) verdampfte und ein gleichmäßiger dünner Lipidfilm am Rundkolben entstand. Durch Zugabe von 10%iger α -Trehalose (Ferro Pfanstiehl, Waukegan, USA) bildeten sich spontan multilamillare Liposomen aus. Die anschließende Extrusion (Druckfiltration) (Northern lipids Inc., Vancouver, Kanada) durch eine Polycarbonat-Membran (Osmonics, Minnetonka, USA) mit einer Porengröße von 200nm ermöglichte die Entstehung von unilamellare Liposomen. Diese Suspension wurde

lyophilisiert und bei 4 °C gelagert. Eine halbe Stunde vor Applikation wurde das lyophilisierte EndoTAG®-2 mit *Aqua ad injectabilia* (Braun, Melsungen, Deutschland) resuspendiert.

II.3.2. Analyse von EndoTAG®-2

Die Partikelgröße der Lipidkomplexe wurde mittels Photonen-Korrelations-Spektroskopie durch einen Malvern Zetasizer 3000 (Malvern Instrumente, Herrenberg, Deutschland) analysiert. Die durchschnittliche Größe betrug 180 - 200 nm. Die Konzentration von Lipid und Wirkstoff wurde mit Hilfe einer High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) bestimmt. Durch einen UV-Detektor konnten die Lipide bei 205 nm und CPT bei 350 nm detektiert werden. Zur Trennung und Quantifizierung der Komponenten wurde eine C8 LiChrospher 60 RP-select B Säule (250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße) mit einer C18 Vorsäule verwendet. Vor jeder HPLC Messung wurden die Proben im Verhältnis 1:3 mit Tetrahydrofuran (J. T. Baker, Phillipsburg, USA) verdünnt.

II.4. Untersuchungsmethoden

II.4.1. Fluoreszenzmakroskopie

Mit Hilfe dieses Verfahrens kann die Anreicherungskinetik von fluoreszenzmarkiertem EndoTAG®-2 im Gewebe über einen Zeitraum von sechs Stunden quantitativ bestimmt werden. Hierzu wurden Syrische Goldhamster mit transparenter Rückenhautkammer und A-Mel-3 Tumor verwendet. Für die Untersuchungen wurden die Tiere in Plexiglasröhren (Effenberger, München, Deutschland) immobilisiert und auf einer Plexiglasbühne (Effenberger, München, Deutschland) so fixiert, dass die Kammer mit dem Deckglas nach oben zeigte und trotz leichten Bewegungen des wachen Tieres unter dem Objektiv des Makroskops (Type 307-143003/514660, Leitz, München, Deutschland) befestigt war.

Den Tieren wurde über einen Katheter in der *Vena jugularis* Rhodamin-markiertes EndoTAG®-2 injiziert (Rhodamin: Anregung $\lambda = 551$ nm, Emission $\lambda = 573$ nm) und die Fluoreszenz (100 W HBO-Quecksilber Kurzbogenlampe von Osram, München, Deutschland) mit einer SIT-Kamera (C2400-08, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) aufgenommen. Mittels digitaler Bildanalyse wurde die Fluoreszenzintensität ausgewertet (KS400, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) (Abb. 11).

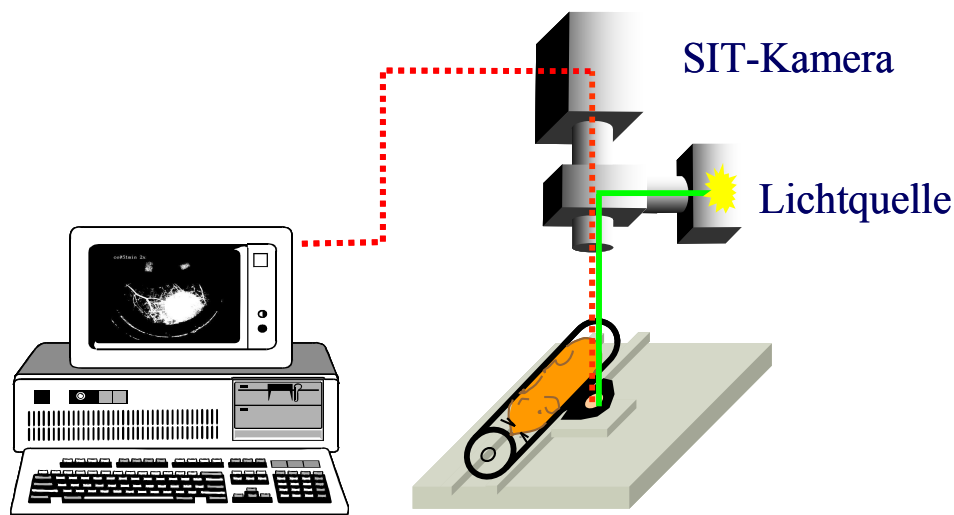


Abb. 11: Aufbau zur Messung der Fluoreszenzkinetik

Fluoreszenzmakroskop, SIT-Kamera und digitales Bildanalyse- und Bildverarbeitungssystem zur quantitativen Analyse der Fluoreszenz

II.4.2. Intravitalmikroskopie (IVM)

Um die Mikrozirkulation in den Tumorgefäßen zu untersuchen und zu analysieren, wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als Untersuchungsmethode gewählt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, am wachen Tier ohne Einsatz von Anästhetika verschiedene mikrohämodynamische Parameter zu ermitteln und zu bewerten [Endrich et al., 1980; Menger et al., 1992].

Den Versuchstieren wurde eine transparente Rückenhautkammer präpariert und in diese A-Mel-3 Tumorzellen implantiert. An den jeweiligen Untersuchungstagen wurden die Tiere für die IVM Aufnahmen in Plexiglasröhren immobilisiert. Um die Blutgefäße sichtbar zu machen, wurde den Versuchstieren der Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein-Isothiocyant (FITC)-markiertes Dextran (MW 500000, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) intravenös injiziert (0,06 mg/kg KG). Dieser hochmolekulare Plasmamarker (Anregung $\lambda = 495$ nm, Emission $\lambda = 517$ nm) bewirkt einen deutlichen Kontrastunterschied von mit Plasma angefärbten hellen Gefäßen und dem dunkel erscheinenden umliegenden Gewebe.

Die IVM Untersuchungen der Tumorgefäße erfolgten mittels eines Stereomikroskops Axiotech vario (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit 20-facher Vergrößerung (Leitz, Wetzlar, Deutschland). Jeweils acht ROI's (Regions Of Interest) pro Tier wurden zufällig im Tumor ausgewählt und mit Hilfe einer CCD-Videokamera (Modell XC-77CE, Sony, Tokio, Japan) visualisiert. Für die später folgende Auswertung mikrohämodynamischer Parameter wurden die IVM Aufnahmen auf einem digitalen Videorekorder (DSR-45P, Sony, Tokio, Japan) aufgezeichnet. Die Aufnahmedauer pro ROI betrug 30 Sekunden.

Die IVM Auswertung erfolgte offline durch das Bildanalysesystem CapImage (Zeintl, Heidelberg, Deutschland). Untersuchungen von Kübler 1997 zeigten, dass die Messgenauigkeit des Bearbeitungssystems $\pm 1 \mu\text{m}$ beträgt [Kübler, 1997].

II.4.2.1. Mikrohämodynamische Parameter

Als mikrohämodynamische Parameter wurden die folgenden intravitalmikroskopischen Parameter quantitativ aus den IVM Aufnahmen erfasst:

II.4.2.1.1. Bestimmung der funktionellen Gefäßdichte (fvd)

Mit Hilfe der IVM Aufnahmen kann die Intensität des Gefäßwachstums im Gewebe durch Messung der funktionellen Gefäßdichte quantifiziert werden [Nolte et al., 1995b; Schmid-Schoenbein et al., 1977]. Die funktionelle Gefäßdichte ist definiert als die Länge der mit Erythrozyten perfundierten Tumorgefäße pro Beobachtungsfläche [cm^{-1}]. Sie stellt ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes dar [Nolte et al., 1995b], und ist ein zentraler Parameter zur Beurteilung der Tumorangiogenese im Verlauf über mehrere Tage [Dellian et al., 1996]. Für die Auswertung wurden nur Gefäße mit Perfusion berücksichtigt. Die Markierung aller Gefäße erfolgte wie in Abbildung 12 gezeigt.

II.4.2.1.2. Bestimmung des Gefäßdurchmessers (d)

Die Auswertung der Gefäßdurchmesser [μm] erfolgte ebenfalls mit einer manuellen Funktion des CapImage Systems. Dabei wurden die gegenüberliegenden Gefäßwände markiert, und es wurde die Strecke der Senkrechten beider Gefäßseiten berechnet [Zeintl et al., 1989]. Hierzu wurde ein Mittelwert aus 30 gemessenen Tumorgefäßdurchmessern pro ROI berechnet. Abbildung 12 zeigt die Bestimmung des Gefäßdurchmessers eines perfundierten Tumorgefäßes.

II.4.2.1.3. Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC})

Die Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit [mm/s] erfolgte mittels „line-shift“-Methode [Klysz et al., 1997] und berechnet sich aus dem Quotienten der zurückgelegten Strecke Δs der FITC-markierten Erythrozyten und der dazu benötigten Zeit Δt . Es wurden drei Gefäße pro ROI markiert (Abb. 12) und der Mittelwert berechnet.

II.4.2.1.4. Berechnung des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex

Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] stellt ein Maß für die Durchblutung des Tumors dar. Errechnet wird er aus der funktionellen Gefäßdichte (fvd) und dem Blutvolumenfluss (Q) [Strieth et al., 2004]. Der Blutvolumenfluss [pl/s], d.h. das Blutvolumen, das pro Zeiteinheit einen Gefäßquerschnitt passiert, kann aus der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC}) und dem Gefäßdurchmesser (d) nach einer modifizierten Formel von Baker und Wayland berechnet werden [Baker and Wayland, 1974]:

$$Q = \frac{v_{RBC}}{1,6} \times \left(\frac{d}{2}\right)^2$$

Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex wurde anschließend aus den Mittelwerten von funktioneller Gefäßdichte und Blutvolumenfluss nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex} = fvd \times \left[\frac{v_{RBC}}{1,6} \times \left(\frac{d}{2}\right)^2 \right] \times 10^{-3}$$

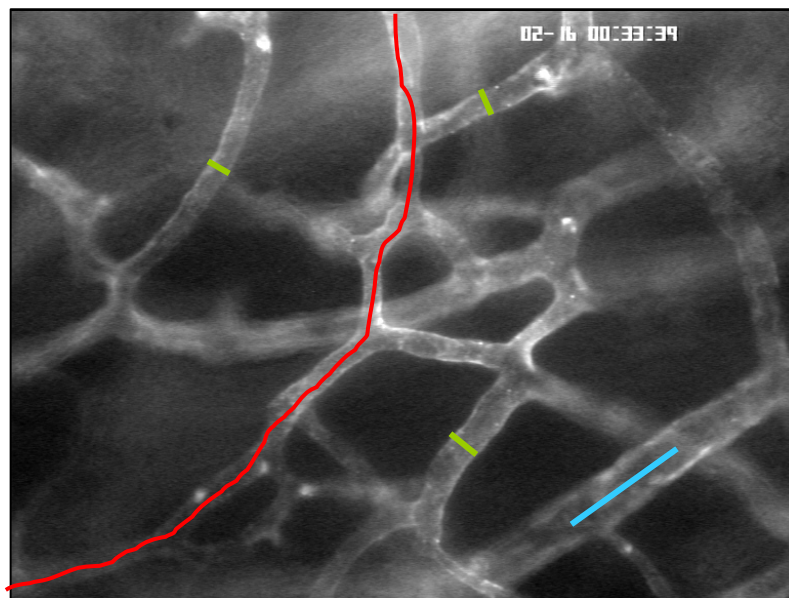


Abb. 12: CapImage Auswertung der IVM-Aufnahmen

- Markierung für die funktionelle Gefäßdichte
- Messung des Gefäßdurchmessers
- Markierung der Gefäße für die Fließgeschwindigkeitsmessung

II.4.3. Histologische Untersuchungen

II.4.3.1. Immunhistochemische CD31-Färbung

Zur Untersuchung der Gefäßdichte wurde eine CD31-Immunhistologie durchgeführt. Hierzu wurden die subkutanen LLC-1 Tumore aus der Tumorwachstumsstudie am Tag 19 entnommen und eingefroren. Es wurden ca. 5 µm dicke Kryoschnitte der Tumore angefertigt und zur Fixierung auf die Objektträger (SuperFrost Ultra Plus®, Firma Menzel, Braunschweig, Deutschland) 10 Minuten in 100 %igen Ethanol bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte in Coverplates (Coverplate®, Firma Shandon, Frankfurt, Deutschland) eingespannt und mit PBS Tween gespült. Der primäre Antikörper goat anti mouse (PECAM-1, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) wurde mit einer Verdünnung von 1:250 auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate mit PBS Tween gespült. Die Inkubation des sekundären Antikörpers 1:200 donkey anti goat (sc-2042, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach folgte ein Waschschrift mit anschließender einstündiger Inkubation der Schnitte mit einer ABC-Lösung (Vectastain® ABC Kit, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, England). Die Präparate wurden danach mit PBS Tween gespült und mit einer AEC-Lösung (PerkinElmer Kit, Waltham, USA) für 30 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Abschließend wurden die Präparate mit PBS Tween gewaschen und mittels Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt. Die fertigen Präparate wurden eingedeckelt (Dako® Cytomation Ultra Mount, Hamburg, Deutschland) und mikroskopisch ausgewertet.

Die Quantifizierung der CD31-Immunhistologie erfolgte mittels digitaler Bildverarbeitung (KS400, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Hierzu wurden zunächst 18 zufällig ausgewählte ROI's pro Versuchstier fotografiert (20-facher Vergrößerung), so dass ein repräsentativer Eindruck der Vaskularisierung des Tumors entstand. Für die CD31-Auswertung wurde das Ausgangsbild mittels RGB Threshold Technik bearbeitet, um nur die CD31-markierten Gefäße als Pixel darzustellen. Aus dem so entstehenden binären Bild kann die markierte Gefäßfläche zur Gesamtbildfläche quantifiziert werden (Abb. 13).

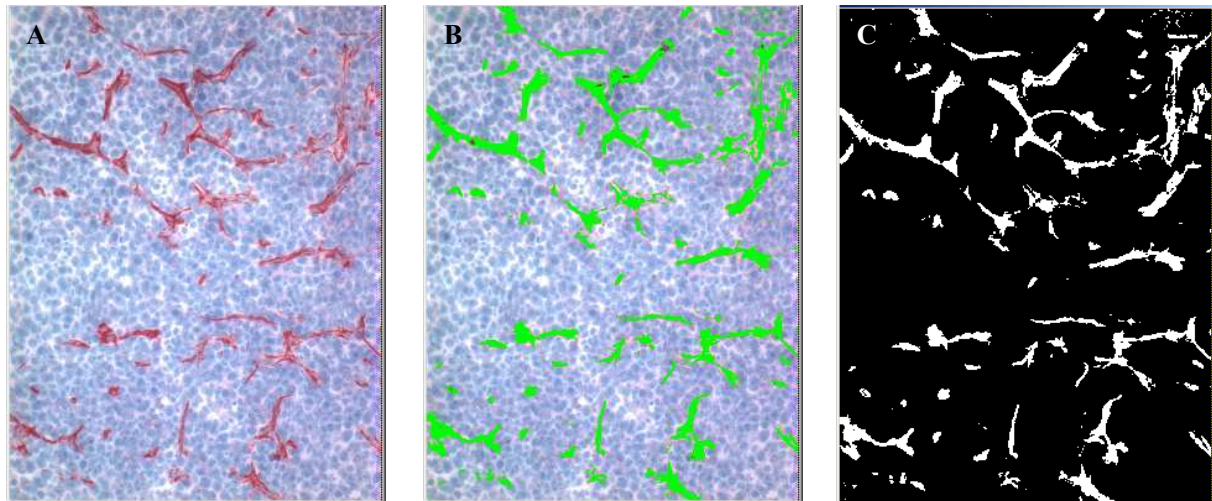


Abb. 13: Digitale Auswertung der CD31-Immunhistologie

A: Ausgangsbild, B: Threshold RGB, C: binäres Bild

II.4.4. Molekularbiologische Untersuchungen

Um den Effekt einer EndoTAG®-2 Therapie auf molekularbiologischer Ebene zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die Expression von VEGF-A, VEGF-Rezeptor1 (VEGF-R1) und VEGF-Rezeptor2 (VEGF-R2), welche wichtige Faktoren der Angiogenese darstellen, wurden näher untersucht.

Da nicht jede PCR gleich effizient abläuft [Liu and Saint, 2002], wurde zur Korrektur von Schwankungen im Grundniveau der cDNA in jeder PCR Probe die Menge eines „housekeeping gene“ gemessen. In dieser Arbeit wurde als „housekeeping gene“ β -ACTIN ausgewählt, welches ein Protein des Cytoskeletts der Zelle codiert.

II.4.4.1. RNA Extraktion

Die Isolierung der RNA erfolgte aus den Tumoren der Tumorwachstumsstudie. Hierzu wurden jeweils 30 mg Tumorgewebe homogenisiert (OMNI 2000 Homogenisator, Süd-Laborbedarf, Gauting, Deutschland) und nach Anleitung des Nucleospin Kit (NucleoSpin® RNA II, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) die RNA extrahiert.

Die RNA Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Hierzu wurde die Absorption bei 260 nm der nukleinsäurehaltigen Lösungen in einer kalibrierten Küvette gemessen [Sambrook et al., 1989].

II.4.4.2. Reverse Transkription (RT)

Mittels der Reversen Transkription wurde nun aus 2 µg isolierter RNA eine komplementäre DNA (cDNA) nach Rieder et al., synthetisiert [Rieder et al., 1997]. Das zugrunde liegende Prinzip dieser cDNA Synthese basiert auf einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase – der Reversen Transkriptase. Dieses Enzym stammt aus Retroviren und katalysiert die Reaktion, bei der die RNA als Matrize zur DNA Herstellung dient.

cDNA-Synthese Ansatz:

2 µg	RNA
1,5 µM	Oligo p(dt) ₁₅ -Primer (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
0,5 mM	dNTP-Mix (Boehringer, Mannheim, Deutschland)
1 x	First-Strand-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) (50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl ₂)
30 U	RNase-Inhibitor (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
200 U	M-MLV-RT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Der cDNA Ansatz wurde auf Eis zusammen pipetiert, anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert und danach für 10 Minuten auf 95 °C erwärmt. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Durchführung der RT-PCR bei -80 °C gelagert.

Die folgenden genspezifischen Primer (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) wurden für die RT-PCR verwendet:

Tabelle 1: Merkmale der verwendeten Primer

Primer	Sequenz in 5' -> 3' Orientierung	Produktlänge	Annealingtemperatur
β -ACTIN forward	GGACTCCTATGTGGGTGACGAGG	366 bp	64 °C
β -ACTIN reverse	ATCTACGAGGGCTATGCTCTCCC		
VEGF-A forward	CTACCAGCGAAGCTACTGCC	310 bp	60 °C
VEGF-A reverse	GTGAGCCTTGTTTCAGAGCGG		
VEGF-R1 forward	CGGAGCTCAATACGAGGGTG	600 bp	60 °C
VEGF-R1 reverse	GACAAGTCCTCACTTGCACCG		
VEGF-R2 forward	CACAGTCTACGCCAACCCCTC	290 bp	60 °C
VEGF-R2 reverse	AGAGAGGGTCATCTCCTTCC		

RT-PCR Ansatz:

3 μ l	cDNA
je 0,4 μ M	Primer (forward und reverse, MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland)
0,1 mM	dNTP-Mix
1 x	PAN-PCR-Puffer (PAN-Biotech TM , Aidenbach, Deutschland) (50 mM Tris-HCl, pH 8,8; 16 mM (NH ₄)SO ₄ ; 0,1 % Tween-20)
1,5 mM	MgCl ₂ (PAN-Biotech TM , Aidenbach, Deutschland)
1 U	PAN-DNA-Polymerase (PAN-Biotech TM , Aidenbach, Deutschland)

Die RT-PCR wurde in einem DNA Thermocycler (Perkin-Elmer 480, Cetus Corp., Norwalk, CT) durchgeführt.

RT-PCR Programm:	60 sec	Prenaturierung	94 °C	
	45 sec	Denaturierung	94 °C	} 18–35 Zyklen
	45 sec	Annealing	60/64 °C	
	60 sec	Elongation	72 °C	
	10 min	Elongation	72 °C	

10 µl des Amplifizierungsprodukts wurden auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und durch UV Bestrahlung visualisiert.

Die angefärbten Agarosegele wurden digitalisiert und densitometrisch mit dem Photodokumentationsprogramm Bio-1D (LTF-Labortechnik, Wasserburg, Deutschland) ausgewertet. Der Grauwert von VEGF-A, VEGF-R1, VEGF-R2 wurde abzüglich des „housekeeping gene“ β-ACTIN Wertes berechnet.

II.5. Versuchsgruppen und -protokolle

Es sollte erstmal die neu entwickelte Substanz EndoTAG®-2 (liposomal enkapsuliertes Camptothecin) tierexperimentell untersucht werden. Hierzu wurden die Tiere vor Beginn der ersten Therapie randomisiert unterschiedlichen Versuchsgruppen zugeordnet.

Für die Tumorwachstumsstudie wurden C57/Bl6 Mäuse mit subkutanem LLC-1 Tumor verwendet. Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet:

- Kontrollgruppe: Behandlung mit α -Trehalose
- Versuchsgruppe I: Behandlung mit kationischen Liposomen
- Versuchsgruppe II: Therapie mit freiem CPT [2,5 mg/kg] (3x wöchentlich)
- Versuchsgruppe III: Therapie mit EndoTAG®-2 [2,5 mg/kg] (3x wöchentlich)

Die Tiere wurden an den Tagen 7, 9, 11, 14, 16 und 18 nach Tumorimplantation behandelt (Abb.14). Die effektive CPT-Dosierung pro Injektion betrug 2,5 mg/kg KG. Die am Tag 19 entnommenen Tumore wurden für immunhistochemische CD31-Färbung und molekularbiologische Analysen aufgearbeitet.

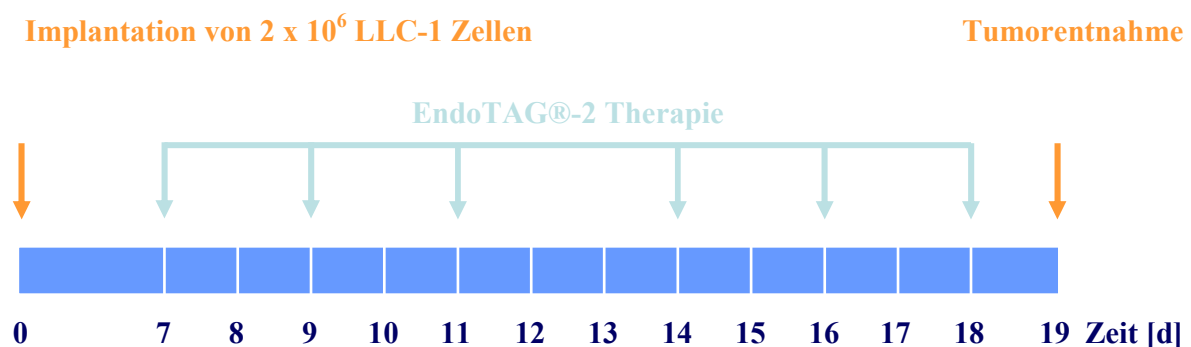


Abb. 14: Experimentelles Versuchsprotokoll der EndoTAG®-2 Tumorwachstumsstudie

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden Syrische Goldhamster mit transparenter Rückenhautkammer und implantiertem A-Mel-3 Tumor verwendet.

Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet:

Kontrollgruppe:	Behandlung mit α -Trehalose	
Therapiegruppe:	Behandlung mit EndoTAG®-2	[2,5 mg/kg/d]

An den Tagen 5, 7, 9 und 11 wurden die Therapie und an den Tagen 5, 10 und 12 die IVM Untersuchungen durchgeführt (Abb.15). Die effektive Dosis von CPT an dem jeweiligen Therapietag betrug 2,5 mg/kg KG.

Kammerpräparation

Implantation von 2×10^5 A-Mel-3-Zellen

Katheterimplantation *V. jug.*

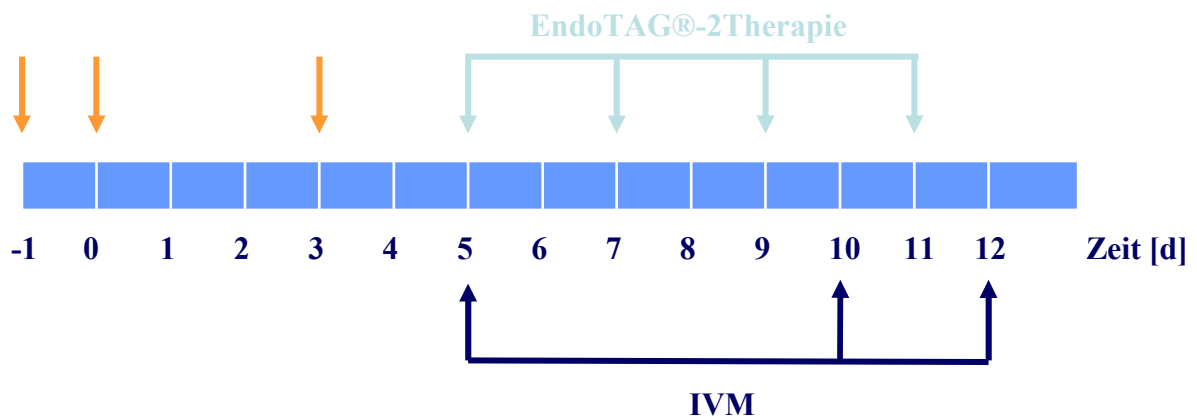


Abb. 15: Experimentelles Versuchsprotokoll der EndoTAG®-2-Therapiestudie

II.6. Statistik

Die statistische Auswertung der gemessenen und errechneten Parameter erfolgte mittels Statistikprogramm SigmaStat (Jandel Corp., San Rafael, USA).

Aufgrund der geringen Versuchsgruppengröße wurde auf die Überprüfung einer zugrunde liegenden Normalverteilung verzichtet und ausschließlich nichtparametrische Tests durchgeführt.

Die Versuchsgruppen wurden mittels Varianzanalyse nach Kruskal Wallis und anschließendem Dunn's Test unverbunden gegeneinander auf signifikante Unterschiede getestet.

Die Signifikanz wurde jeweils bei einer Wahrscheinlichkeit für den Fehler der 1. Art unter 5 % angenommen ($p < 0,05$). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) dargestellt.

III. Ergebnisse

III.1. Antransport von EndoTAG®-2 in solide Tumore

Nach intravenöser Applikation von Rhodamin-markiertem-EndoTAG®-2 konnte mittels Fluoreszenzmakroskopie über einen Zeitraum von sechs Stunden eine tumorselective Anreicherung der Substanz im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe nachgewiesen werden (Abb. 16). Das erste Bild in Abbildung 16 zeigt das Shadingbild, welches den Fluoreszenzstandard enthält und dazu dient, inhomogene Ausleuchtung der Kammer zu kompensieren. Rechts daneben ist das Auflichtbild der Kammer, in dem das Tumorareal mit den umliegenden Normalgewebe und seinen Gefäßen zu erkennen ist. Danach folgen die makroskopischen Fluoreszenzaufnahmen der Kammer zu den verschiedenen Zeitpunkten [min]. Deutlich ist nach intravenöser Applikation von Rhodamin-markiertem-EndoTAG®-2 die vaskuläre Phase zu erkennen. Die Substanz befindet sich in den Gefäßen des Normalgewebes, aber reichert sich nach einer Minute auch schon in Tumor an. Die bevorzugte Anreicherung von EndoTAG®-2 im Tumor bleibt über sechs Stunden bestehen, wobei die Fluoreszenzintensität im Normalgewebe rasch abnimmt.

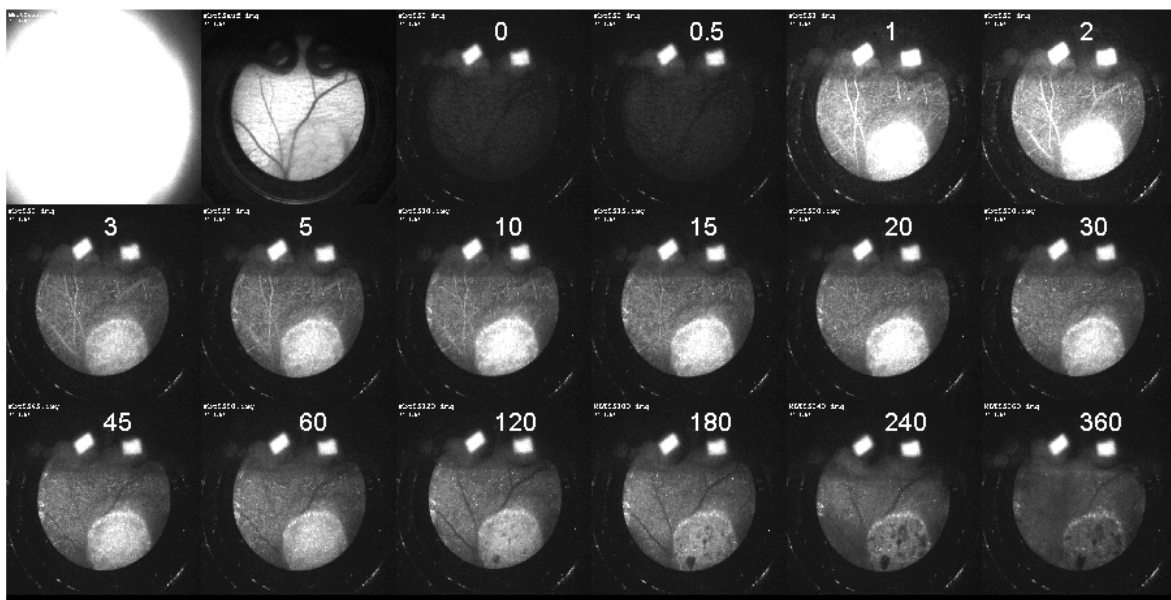


Abb. 16: Fluoreszenzkinetik von EndoTAG®-2 in der transparenten Rückenhautkammer

Rhodamin-markiertes-EndoTAG®-2 wurde über einen venösen Katheter injiziert und die Fluoreszenzkinetik über sechs Stunden mittels eines Makroskops und computerunterstützten Systems aufgenommen.

Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität (Abb. 17) bestätigt die Beobachtung aus Abbildung 16 und zeigt ein Fluoreszenzmaximum nach einer halben Stunde. Nach systemischer Injektion von EndoTAG®-2 wird die Substanz in weit höherem Maße an das Tumorgewebe transportiert als im Vergleich zum Normalgewebe.

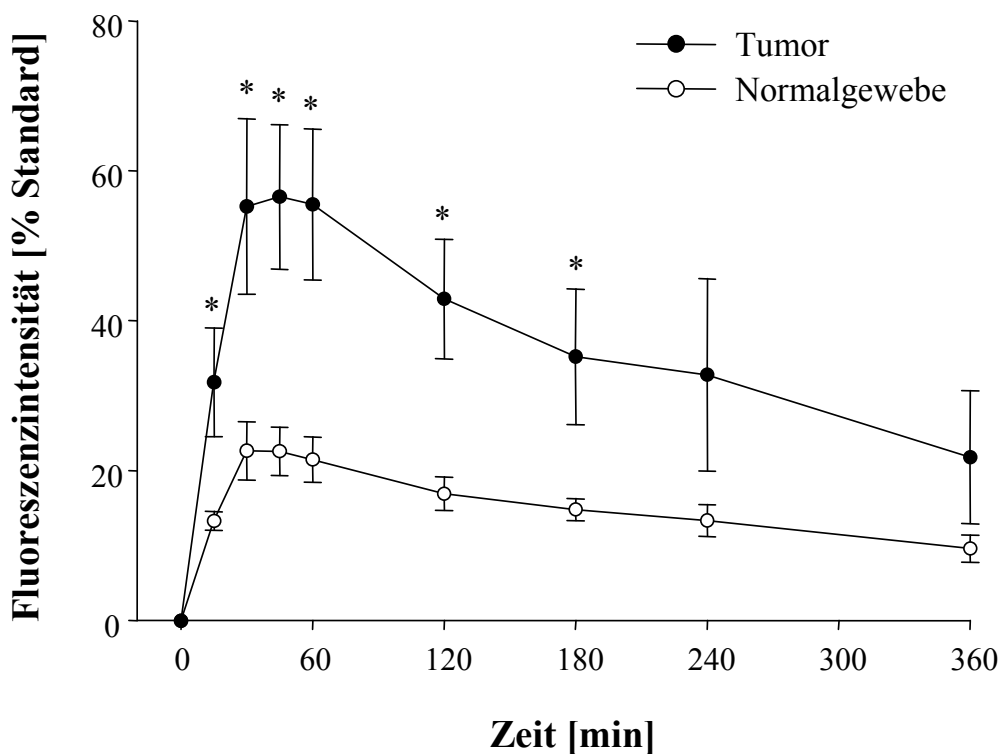


Abb. 17: Quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität von EndoTAG®-2

Dargestellt ist die berechnete Fluoreszenzintensität der Fluoreszenzkinetik in der Rückenhautkammer (n=6) ± SEM (*p < 0,05 Tumor vs. Normalgewebe).

Die Berechnung der Fläche unter der Kurve (AUC) zeigt deutlich, dass es zu einer signifikant höheren Anreicherung von EndoTAG®-2 im Vergleich zum Normalgewebe kam. Die Anreicherung im Tumorgewebe war im Vergleich zum umliegenden Normalgewebe um das 2,5 fache erhöht (Abb. 18).

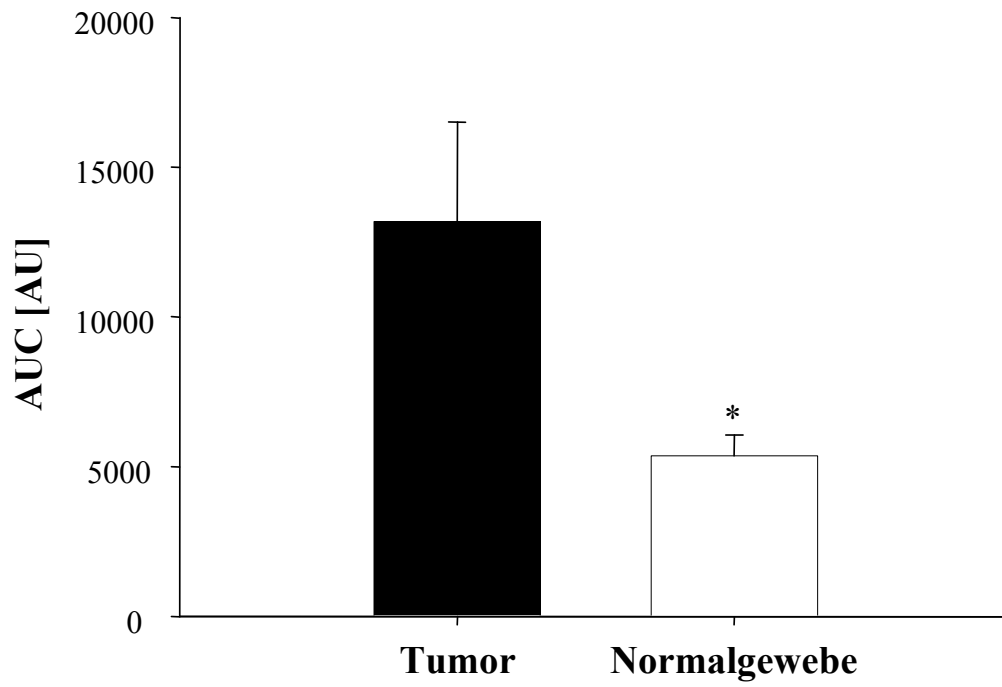


Abb. 18: Berechnung der Fläche unter der Kurve aus Abbildung 17

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, n=6 (*p< 0,05 Tumor vs. Normalgewebe).

III.2. Intratumorale Verteilung von EndoTAG®-2

Zur Untersuchung der intratumoralen Verteilung von EndoTAG®-2 wurden C57/Bl6 Mäuse mit subkutanem LLC-1 Tumor verwendet. Den Tieren wurde Rhodamin-markiertes-EndoTAG®-2 in die Schwanzvene injiziert, nach einer Stunde Zirkulation wurden die Tumore entnommen und histologisch aufgearbeitet.

In Abbildung 19 ist deutlich zu erkennen, dass sich EndoTAG®-2 hochselektiv in den Tumorgefäßen anreichert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Substanz nach einstündiger Zirkulation nicht in das umliegende Tumorinterstitium extravasiert.

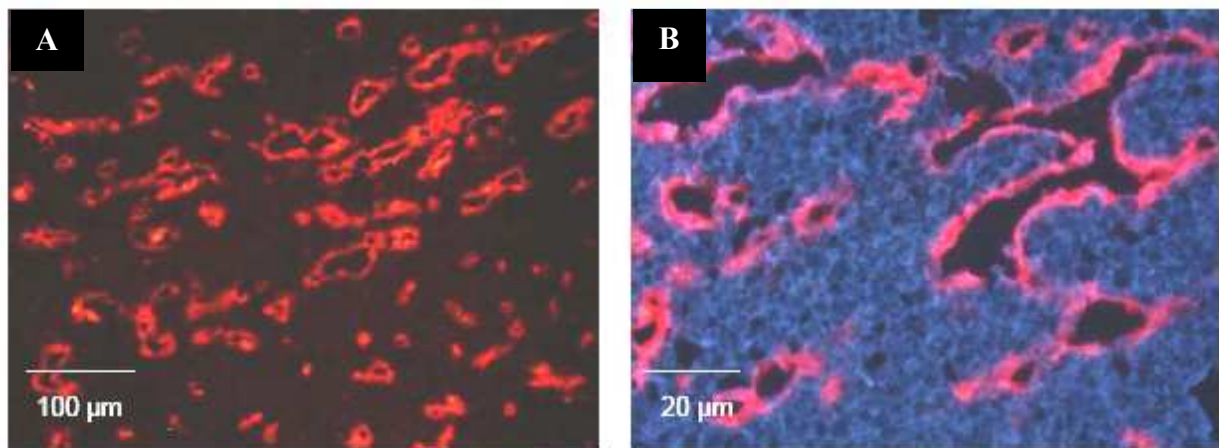


Abb. 19: Intratumorale Verteilung von Rhodamin-markierten-EndoTAG®-2 im subkutanem LLC-1 Tumor

A: 10x Vergrößerung **B:** 20x Vergrößerung

Deutlich ist die spezifische Akkumulation von EndoTAG®-2 in den Tumormikrogefäßen zu erkennen.

III.3. Ergebnisse der EndoTAG®-2 Tumorwachstumsstudie

Um die therapeutische Effektivität von EndoTAG®-2 zu untersuchen, wurde eine Tumorwachstumsstudie mit C57/Bl6 Mäusen und subkutanem Lungenkarzinom (LLC-1) durchgeführt (Abb. 20). Nach Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 120 mm³ wurden die Tiere entweder mit EndoTAG®-2, freiem CPT oder kationischen Liposomen 3x wöchentlich therapiert. Die Kontrolltiere erhielten α -Trehalose, welches das Lösungsmittel der kationischen Liposomen darstellt. Die Kontrolltumore zeigten ein exponentielles Wachstum, wie es für die LLC-1 Zellen typisch ist. Dagegen zeigte sich schon nach zweimaliger Behandlung (Tag 11 nach Tumorzellimplantation) mit EndoTAG®-2 eine signifikante Wachstumsverzögerung der Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch Behandlung der Versuchstiere mit kationischen Liposomen (Tumolvolumen: 903 \pm 133 mm³) oder mit freiem CPT (759 \pm 103 mm³) konnte am Ende der Studie ebenfalls eine Tumorwachstumsverzögerung im Vergleich zu den Kontrolltieren (1710 \pm 219 mm³) gezeigt werden. Der beste therapeutische Effekt, eine Reduktion um 81 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, war durch eine Therapie mit EndoTAG®-2 (332 \pm 71 mm³) erkennbar.

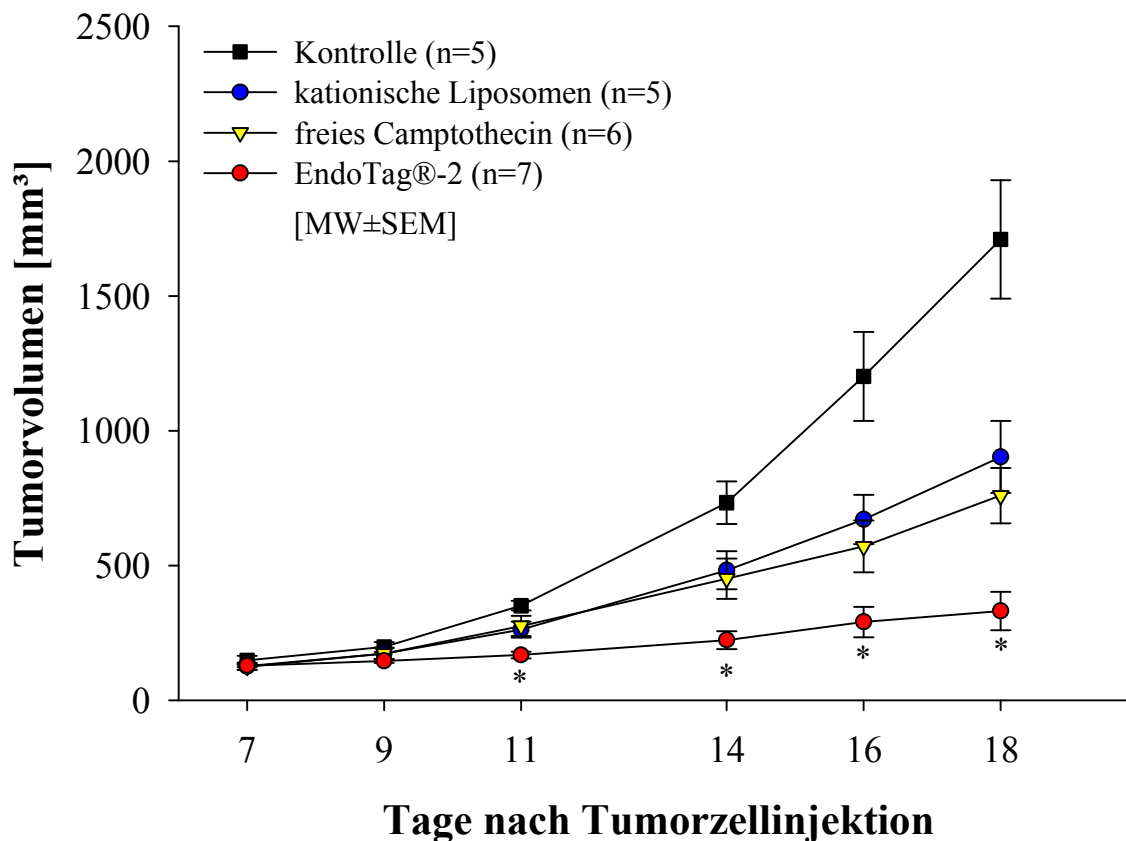


Abb. 20: Tumorwachstumskurve nach EndoTAG®-2 Therapie

LLC-1 Zellen wurden in C57/Bl6 Mäusen meso-dorsal implantiert, und nach Erreichen eines mittleren Tumolvolumens von ca. 120 mm³ wurden die Tiere durch i.v. Injektion in die Schwanzvene behandelt. Das Tumolvolumen wurde alle zwei Tage bestimmt. Dargestellt ist das mittlere Tumolvolumen \pm SEM (*p < 0,05 vs. Kontrolle).

Am Tag 19 wurden die Tumore entnommen und fotografiert. In Abbildung 21 sind exemplarisch Tumore der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Tumore, die mit EndoTAG®-2 therapiert wurden, kleiner sind als die der anderen Versuchsgruppen, was die Ergebnisse der Tumorwachstumsstudie (siehe Abb. 20) widerspiegelt.

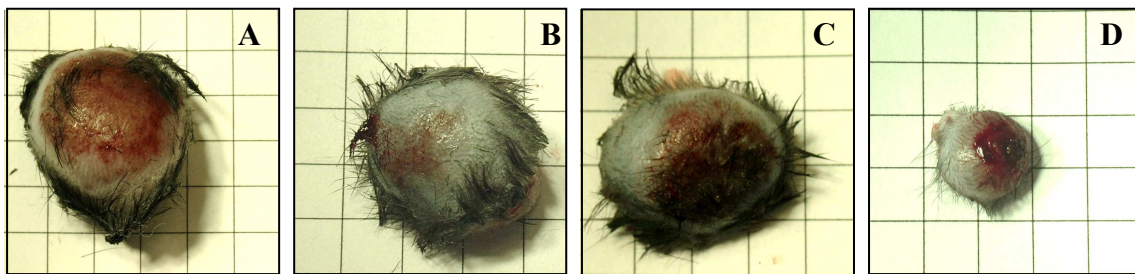


Abb. 21: Exemplarische Tumore aus der Tumorwachstumsstudie

A: Kontrollgruppe, B: kationische Liposomen,
C: freies CPT, D: EndoTAG®-2

In Abbildung 22 ist das Körpergewicht der Versuchstiere aus der Tumorwachstumsstudie dargestellt. Die Versuchstiere tolerierten die Behandlung gut und zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Körpergewichtsentwicklung während des gesamten Beobachtungszeitraums von 18 Tagen.

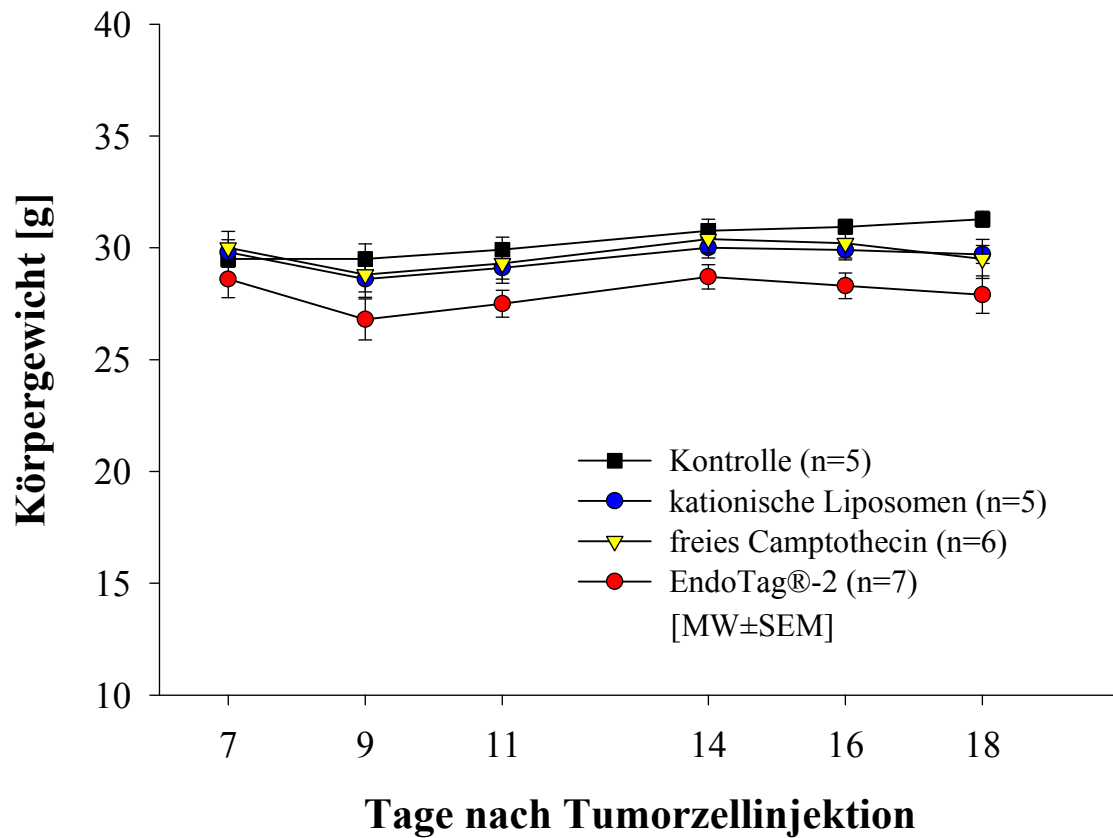


Abb. 22: Körpergewicht der Versuchstiere

Die Tiere wurden nach Behandlungsbeginn alle zwei Tage gewogen. Dargestellt ist das mittlere Körpergewicht \pm SEM

III.4. Tumorgefäßdichte

Die am Tag 19 entnommenen subkutanen LLC-1 Tumore wurden zur Untersuchung des antivaskulären Effekts von EndoTAG®-2 histologisch aufgearbeitet und eine immunhistochemische CD31-Färbung durchgeführt. In Abbildung 23 sind repräsentative histologische Bilder der CD31-Färbung aus der Tumorwachstumsstudie dargestellt. Deutlich zu erkennen sind die rotbraun gefärbten Tumorblutgefäße und die mit Hämalaun blau gefärbten umliegenden Tumorzellen.

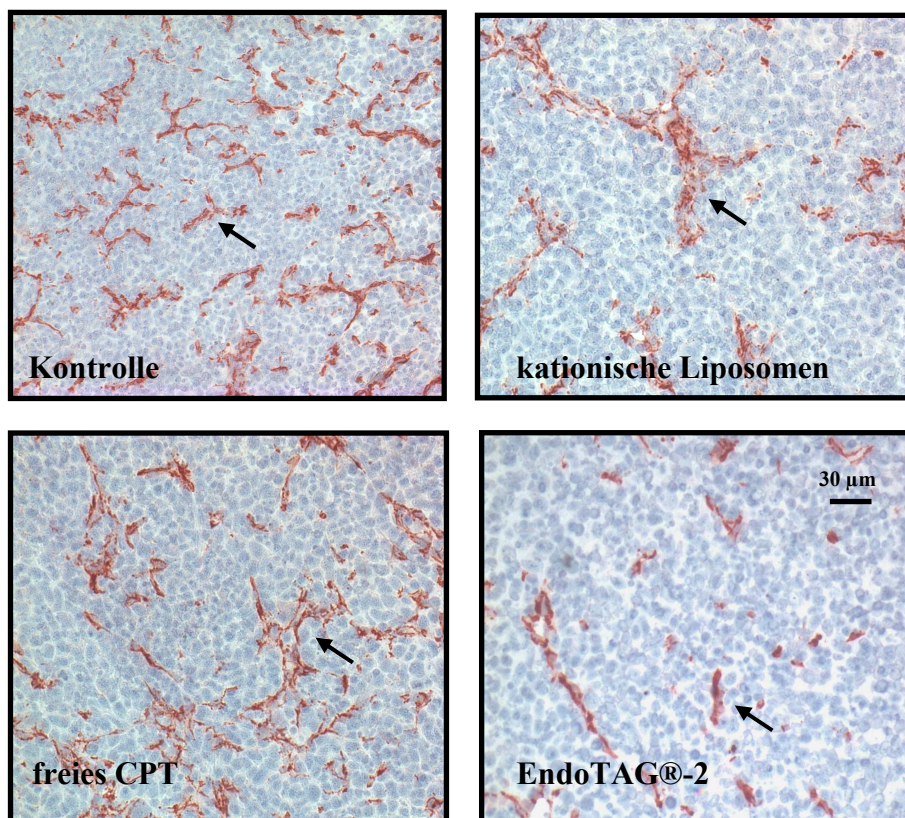


Abb. 23: CD31-markierte Tumorgefäße nach immunhistochemischer Färbung

Tumorgefäße rotbraun (←) und Tumorzellen blau dargestellt

Während sich bei den Kontrolltieren und nach Behandlung mit freien CPT und kationischen Liposomen eine hohe Anzahl angefarbter Tumorgefäße nachweisen ließ, zeigte sich nach Behandlung mit EndoTAG®-2 eine signifikante Reduktion der Mikrogefäßdichte (Abb. 24).

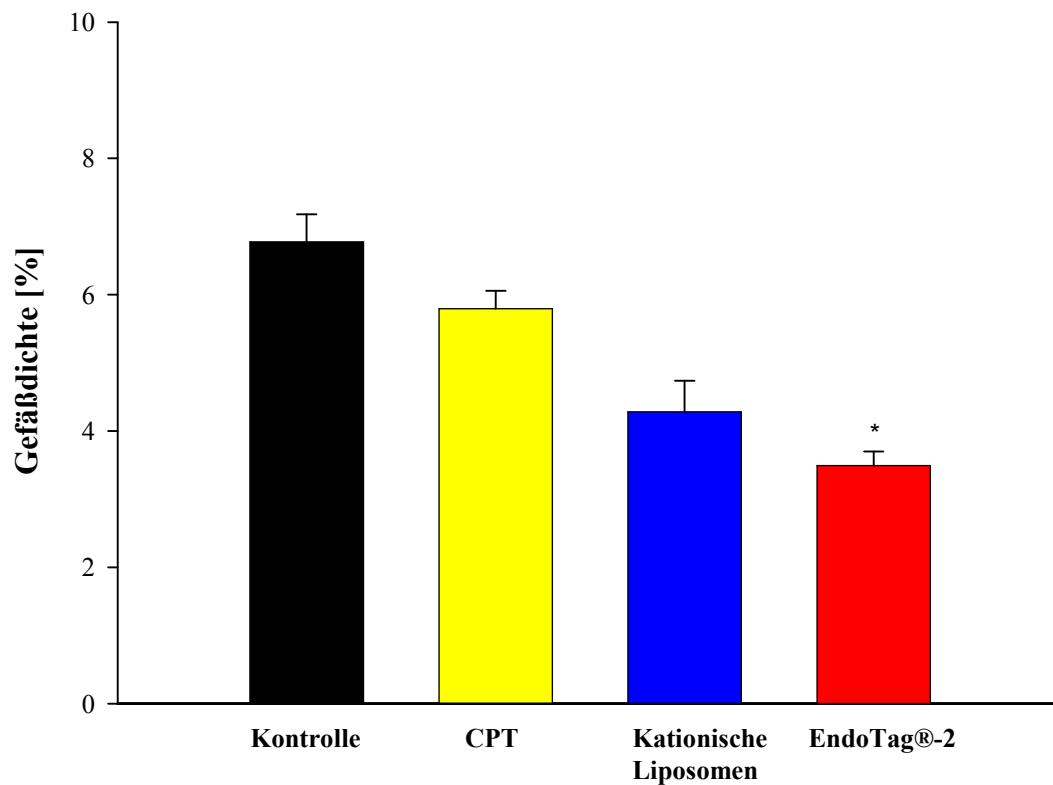


Abb. 24: Quantitative Auswertung der CD31-Immunhistologie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus 18 ausgewerteten Bildern pro Tier (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Die quantitative Auswertung der Gefäßdichte wurde mittels digitaler Bildverarbeitung, wie im Abschnitt II.4.3.1. beschrieben, durchgeführt. Deutlich zu erkennen ist eine Reduktion der Gefäßdichte durch Therapie mit freiem CPT ($5,8 \pm 0,3$ = Reduktion um 15 %) und Behandlung mit kationischen Liposomen ($4,3 \pm 0,5$ = Reduktion um 37 %) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($6,8 \pm 0,4$). Eine signifikante Reduktion der Gefäßdichte ist durch eine Therapie mit EndoTAG®-2 ($3,5 \pm 0,2$ = Reduktion um 48 %) zu erzielen. Diese Ergebnisse deuten auf einen antivaskulären Effekt von EndoTAG®-2 hin und bestätigen die Ergebnisse der Tumorwachstumsstudie.

III.5. Ergebnisse der Intravitalmikroskopie

Die Analyse der Veränderungen der Mikrozirkulation nach zweiwöchiger Therapie mit EndoTAG®-2 erfolgte anhand intravitaler Fluoreszenzmikroskopie. Abbildung 25 zeigt intravitalmikroskopische Aufnahmen des A-Mel-3 Tumorgewebes in der transparenten Rückenhautkammer. Deutlich ist das typische Bild einer heterogenen Tumorgefäßarchitektur mit Kalibersprüngen, zahlreichen Anastomosen und Gefäßschleifen zu erkennen. Bild 25 A und C sind vor Therapiebeginn, am Tag 5, aufgenommen. Es besteht kein wesentlicher Unterschied zwischen Kontroll- und Therapietieren. Jedoch am Tag 12, nach viermaliger Gabe von EndoTAG®-2 (Bild 25 D), zeigte sich eine Rarifizierung des Tumorblutgefäßnetzwerkes im Vergleich zur Kontrollgruppe (Bild 25 B).

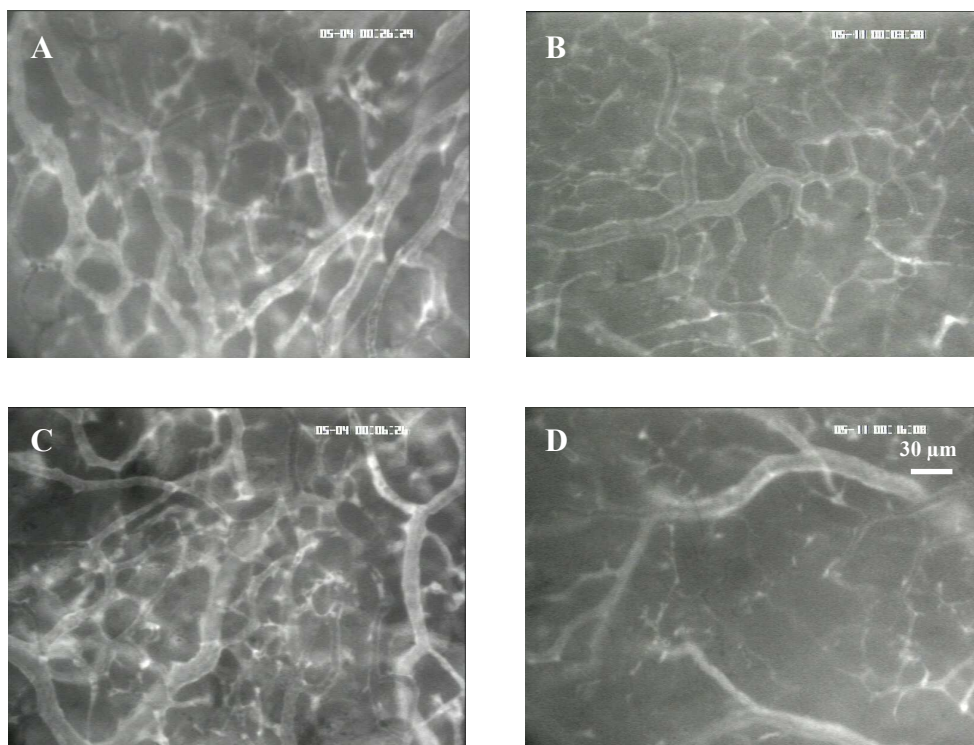


Abb. 25: Intravitalmikroskopische Aufnahmen des A-Mel-3 Tumorblutgefäßsystems

Kontrolltier:	Tag 5 (A), Tag 12 (B)
EndoTAG®-2:	Tag 5 (C), Tag 12 (D)

Die Veränderungen der einzelnen mikrohäodynamischen Parameter zur Quantifizierung der Tumormikrozirkulation werden im Folgenden dargestellt.

III.5.1. Funktionelle Gefäßdichte

Die quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte (Abb. 26) bestätigt die Beobachtungen aus Abbildung 25. Vor Therapiebeginn (Tag 5) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchgruppen, die durchschnittliche funktionelle Gefäßdichte betrug 286 cm^{-1} . Nach dreimaliger bzw. viermaliger EndoTAG®-2 Therapie (Tag 10: $250 \pm 8,2 \text{ cm}^{-1}$; Tag 12: $215 \pm 5,7 \text{ cm}^{-1}$) nahm jedoch die Gefäßdichte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab (Tag 10: $347 \pm 7,6 \text{ cm}^{-1}$; Tag 12: $335 \pm 4,3 \text{ cm}^{-1}$). Die Gefäßdichte in den Kontrolltieren nahm dagegen bis zum Tag 10 noch weiter zu.

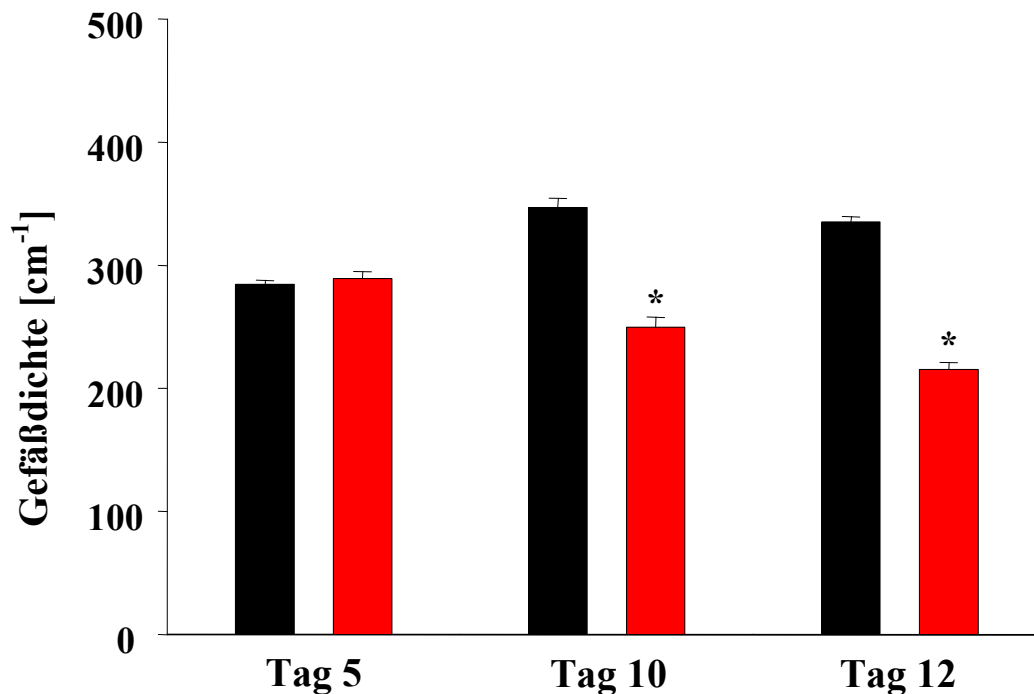


Abb. 26: Quantifizierung der funktionellen Gefäßdichte

■ Kontrolle ■ EndoTAG®-2 Therapie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (n=8) an den Tagen 5, 10 und 12 nach Tumorzellimplantation, (*p < 0,05 vs. Kontrolle).

III.5.2. Tumorgefäßdurchmesser

Die Behandlung mit EndoTAG®-2 hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Tumorgefäßdurchmesser. In Abbildung 27 ist deutlich zu erkennen, dass die Gefäßdurchmesser der Therapiegruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe abnahmen. Vor Therapiebeginn lag der durchschnittliche Gefäßdurchmesser in beiden Versuchsgruppen bei 18,6 μm . Bei der Kontrollgruppe kam es im Untersuchungszeitraum zu keinen größeren Veränderungen der Gefäßdurchmesser (Tag 10: $17,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$; Tag 12: $18,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$). Jedoch konnte durch eine EndoTAG®-2 Therapie ein signifikanter Rückgang der Tumorgefäßdurchmesser erreicht werden (Tag 10: $13,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$; Tag 12: $13,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$).

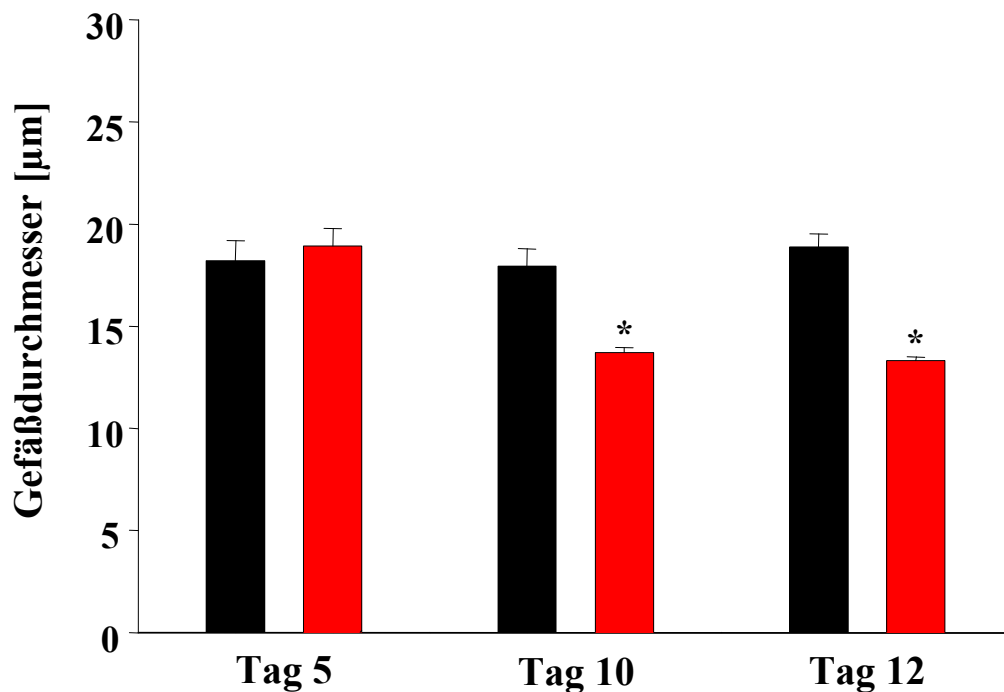


Abb. 27: Quantifizierung der Tumorgefäßdurchmesser

■ Kontrolle ■ EndoTAG®-2 Therapie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (n=8) an den Tagen 5, 10 und 12 nach Tumorzellimplantation, (*p < 0,05 vs. Kontrolle).

III.5.3. Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit ist in Abbildung 28 dargestellt. Zu Studienbeginn am Tag 5 war kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ersichtlich. Die durchschnittliche Erythrozytenfließgeschwindigkeit betrug 0,1 mm/s. Am Tag 10 und 12 herrschte dagegen eine signifikant niedrigere Fließgeschwindigkeit in den Tumorgefäßen der Therapiegruppe (Tag 10: $0,2 \pm 0,01$ mm/s; Tag 12: $0,2 \pm 0,02$ mm/s) als in denen der Kontrollgruppe (Tag 10: $0,3 \pm 0,03$ mm/s; Tag 12: $0,4 \pm 0,04$ mm/s). Die höhere Erythrozytenfließgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe spiegelt die allmähliche Ausreifung der Tumorgefäße und den dadurch verbesserten Fluss in den Gefäßen wieder.

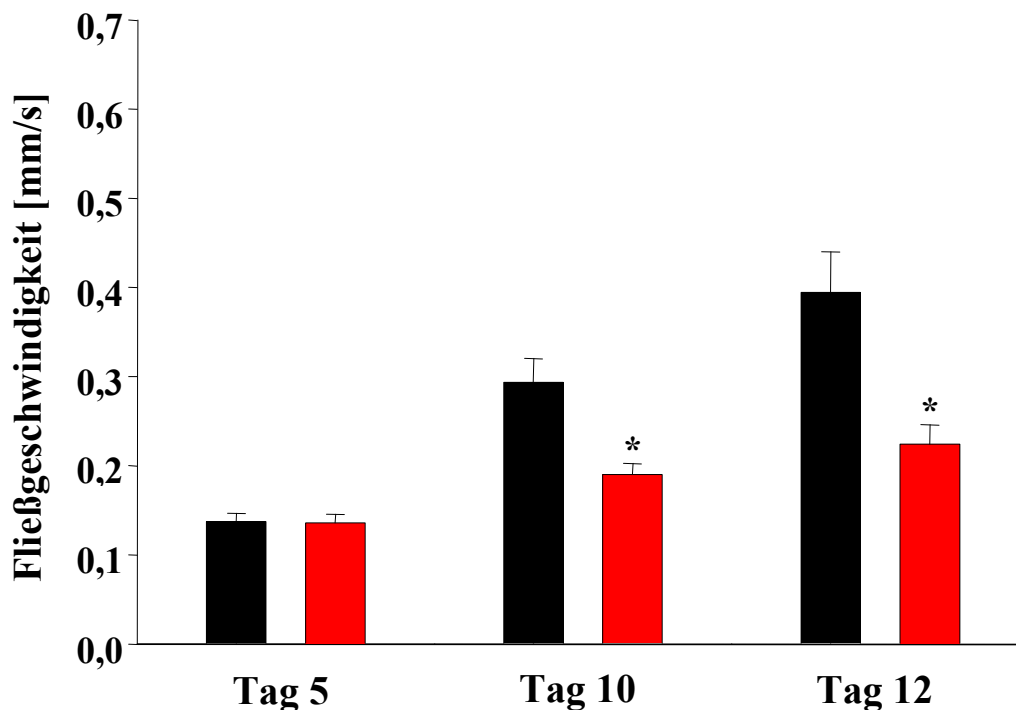


Abb. 28: Quantifizierung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit

■ Kontrolle ■ EndoTAG®-2 Therapie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (n=8) an den Tagen 5, 10 und 12 nach Tumorzellimplantation, (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

III.5.4. Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex

Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex berücksichtigt alle mikrohäodynamischen Parameter der Mikrozirkulation und ist ein Maß, um die Effekte einer Therapie auf die Tumorperfusion darzustellen.

Vor Therapiebeginn (Tag 5) betrug der mikrozirkulatorische Perfusionsindex in beiden Versuchsgruppen $2,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Eine drei- bzw. viermalige Gabe von EndoTAG®-2 (Tag 10: $1,4 \pm 0,1 \mu\text{m}^2/\text{s}$; Tag 12: $1,3 \pm 0,2 \mu\text{m}^2/\text{s}$) führte zu einer signifikanten Abnahme des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex im Vergleich zu den Kontrolltieren (Tag 10: $5,2 \pm 0,5 \mu\text{m}^2/\text{s}$; Tag 12: $7,9 \pm 1,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$).

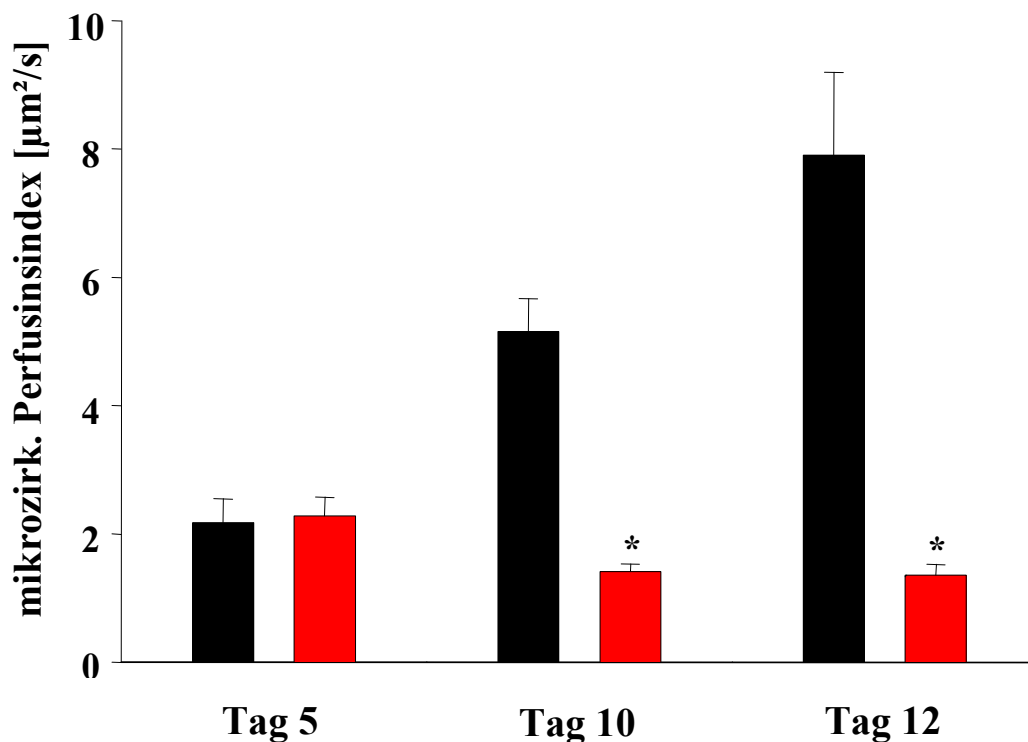


Abb. 29: Darstellung des berechneten Mikrozirkulatorischen Perfusionsindex

■ Kontrolle ■ EndoTAG®-2 Therapie

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (n=8) an den Tagen 5, 10 und 12 nach Tumorzellimplantation, (*p < 0,05 vs. Kontrolle).

III.6. Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen

Um den Effekt der EndoTAG®-2 Therapie auf die mögliche Regulation von angiogenen Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die RT-PCR Produkte wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und densitometrisch ausgewertet. Es wurde die Genexpression von VEGF-A, VEGF-R1 und VEGF-R2, die wichtige Gene der Tumorangiogenese darstellen, untersucht. Zur Kontrolle der gleichen cDNA Integrität wurde die Expression des „housekeeping gene“ β -ACTIN abgeglichen.

III.6.1. β -ACTIN Expression

Das „housekeeping gene“ β -ACTIN, welches in dieser Arbeit als interne Kontrolle eingesetzt wurde, zeigte gleichmäßige Mengen der cDNA in den untersuchten Proben (Abb. 30).

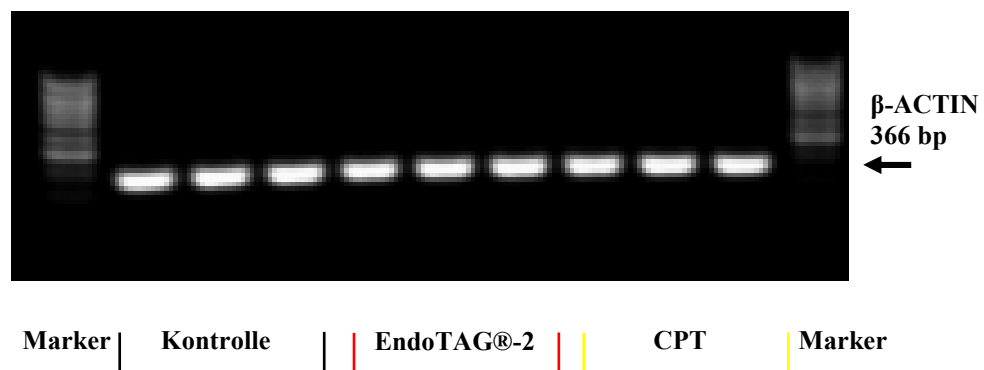


Abb. 30: RT-PCR Analyse der β -ACTIN Expression im subkutanem LLC-1 Tumor

Das β -ACTIN Produkt (366 bp) ist mit ← markiert.

III.6.2. VEGF-A Expression

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der VEGF-A RT-PCR der LLC-1 Tumore dargestellt. Es ist deutlich die spezifische Bande von VEGF-A bei 310 bp zu erkennen und das VEGF-A Gen wird in allen drei Versuchsgruppen expremiert.

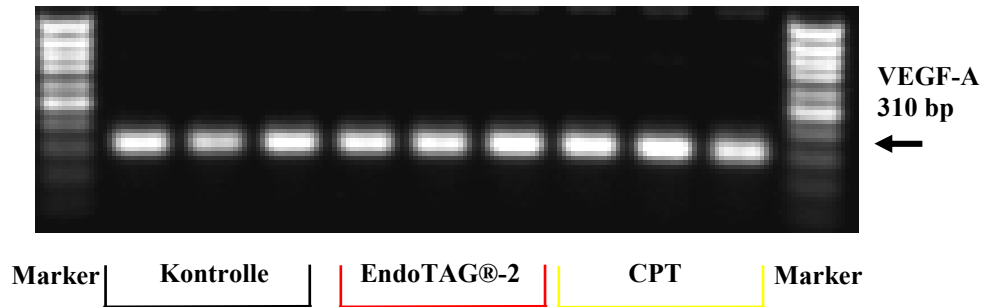


Abb. 31: RT-PCR Analyse der VEGF-A Expression im subkutanem LLC-1 Tumor

Das VEGF-A Produkt (310 bp) ist mit ← markiert.

Nach densitometrischer Auswertung der Banden wird deutlich, dass die VEGF-A Expression durch eine EndoTAG®-2 Therapie im Vergleich zu unbehandelten Tieren zwar leicht erhöht war, aber durch den großen Standardfehler kein Signifikanzniveau erreicht wurde (Abb. 32).

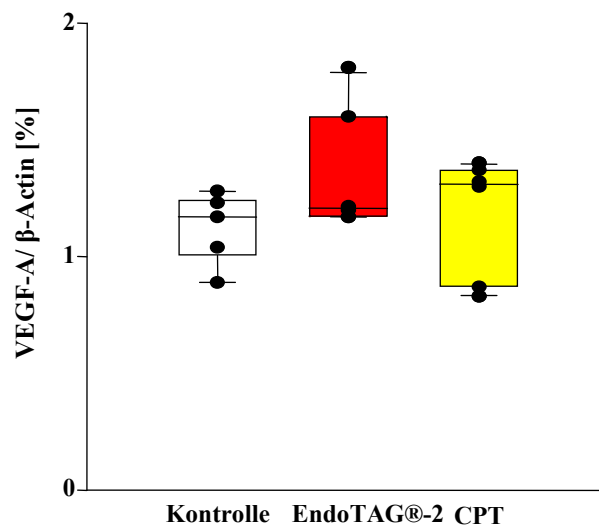


Abb. 32: Densitometrische Quantifizierung der VEGF-A Expression

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (n=6)

III.6.3. VEGF-R1 Expression

Die Analyse der RT-PCR von VEGF-R1 zeigt, dass in jeder Versuchsgruppe VEGF-R1 expremiert wurde (Abb. 33). Die spezifische Bande für VEGF-R1 liegt bei 600 bp.

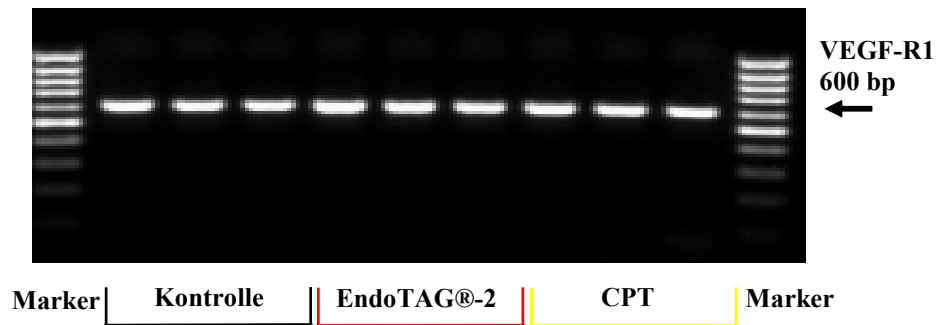


Abb. 33: RT-PCR Analyse der VEGF-R1 Expression im subkutanem LLC-1 Tumor

Das VEGF-R1 Produkt (600 bp) ist mit ← markiert.

Die densitometrische Analyse der VEGF-R1 Expression hat ergeben, dass es durch eine EndoTAG®-2 Therapie zu keiner signifikant erhöhten Expression von VEGF-R1 kam (Abb. 34).

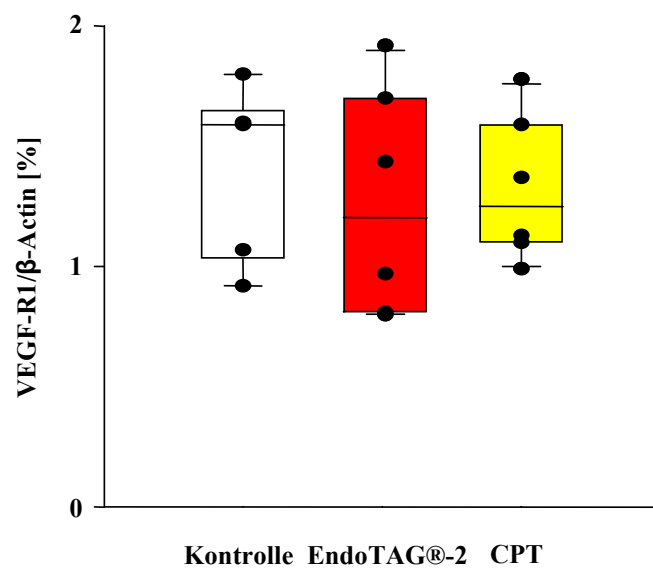


Abb. 34: Densitometrische Quantifizierung der VEGF-R1 Expression

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (n=6)

III.6.4. VEGF-R2 Expression

Abbildung 35 zeigt die RT-PCR Analyse der VEGF-R2 Expression in subkutanen LLC-1 Tumoren. Deutlich ist die spezifische Bande von VEGF-R2 mit 290 bp zu erkennen.

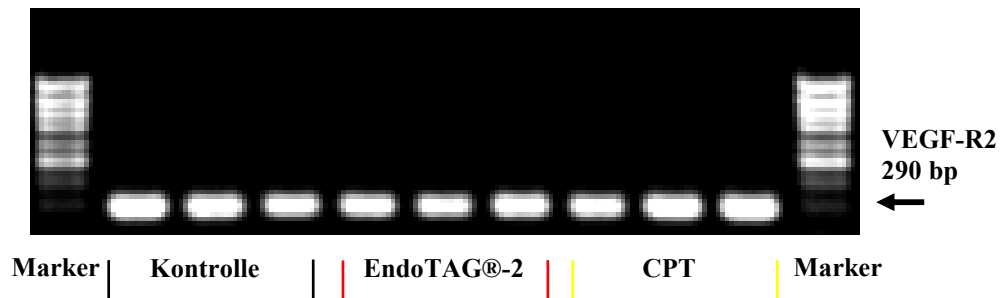


Abb. 35: RT-PCR Analyse der VEGF-R2 Expression im subkutanem LLC-1 Tumor

Das VEGF-R2 Produkt (290 bp) ist mit ← markiert.

Nach densitometrischer Auswertung der Banden wird deutlich, dass eine EndoTAG®-2 Behandlung der Versuchstiere zu keiner signifikant veränderten VEGF-R2 Expression führt im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen (Abb. 36).

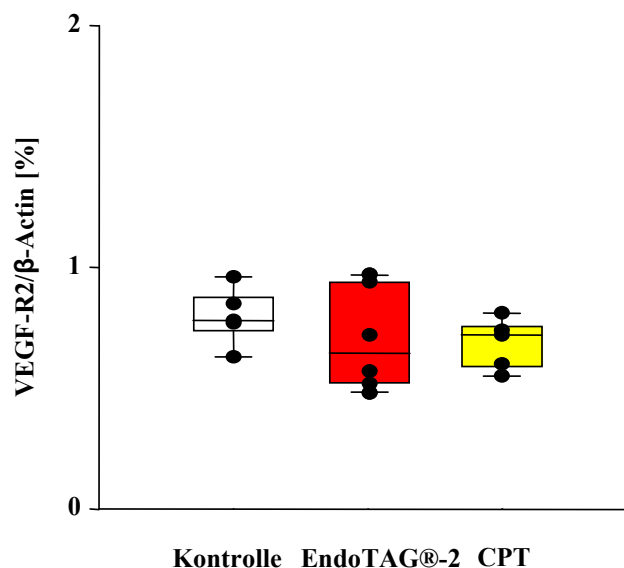


Abb. 36: Densitometrische Quantifizierung der VEGF-R2 Expression

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM (n=6)

IV. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, erstmals die Wirksamkeit von liposomal verpackten Camptothecin (EndoTAG®-2) tierexperimentell (C57/Bl6 Mäuse, Syrische Goldhamster) auf seine antitumorale Wirksamkeit zu untersuchen und dessen zugrunde liegenden Wirkmechanismus an verschiedenen Tumormodellen (LLC-1, A-Mel-3) zu klären.

IV.1. Diskussion der Methodik

IV.1.1. Tumormodelle

IV.1.1.1 LLC-1

Das murine Lewis Lungen Karzinom-1 (LLC-1) wurde erstmals 1951 von Dr. Margaret R. Lewis beschrieben. Diese Zelllinie LLC-1 wurde aus einer Lungenmetastase des subkutan wachsenden Lewis Lungen Karzinom von C57/Bl6 Mäusen gewonnen [Bertram and Janik, 1980] und ist seit langem am Institut für Chirurgische Forschung als Tumormodell etabliert.

Der Tumor zeichnet sich durch eine ausgesprochen hohe Angehrate und ein schnelles, aggressives Tumorstadium aus. Aufgrund der besonderen Tumorigenität und des schnellen Wachstums ist diese Tumorzelllinie ein viel verwendetes Tumormodell und wird sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für verschiedenste therapeutische Studien mit Zytostatika und antiangiogenetischen Substanzen eingesetzt [Amano et al., 2003; Ambati et al., 2002; Boehm et al., 1997; Borgstrom et al., 1995; Borgstrom et al., 1997; Manegold et al., 2003; Mauceri et al., 1998; Mauceri et al., 2002; O'Reilly et al., 1994; Ohira et al., 1992; Prontera et al., 1999; Teicher et al., 1996; Teicher et al., 1999; Teicher et al., 2001].

Der Vorteil eines Maustumormodells besteht darin, dass es ein breites Spektrum an kommerziell erhältlichen Antikörpern für nachfolgende immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen gibt, die mögliche Angriffspunkte oder Wirkmechanismen der neuen Substanz EndoTAG®-2 erklären können.

Entscheidend bei einer Krebstherapie ist die Beeinflussung des Wachstums und der Metastasierung von Tumoren. Deshalb wurde zunächst die therapeutische Effektivität der neu entwickelten Substanz am subkutanen LLC-1 Tumormodell untersucht.

Das Volumen des halbellipsoid wachsenden Tumors wurde nach der Formel: Länge x Breite x Höhe x 0,873 errechnet [Tomayko and Reynolds, 1989; Weiss et al., 1990]. Bei kleinen Tumoren spielt zu Versuchsbeginn die Messungengenauigkeit von ungefähr $\pm 0,5$ mm eine nicht zu verachtende Rolle, da sie dreifach in die Volumenberechnung eingeht. Aber spätestens wenn die Tumore ein Volumen von ca. 100 mm^3 erreicht haben, hat die Messungengenauigkeit für die Berechnung des Tumolvolumens nur noch einen geringen Einfluss auf den berechneten Wert. Deshalb wurde bei den in dieser Arbeit durchgeführten Tumorwachstumsstudien die Therapie erst ab Tag sieben nach Tumorzellimplantation begonnen, da die Tumore dann ca. 120 mm^3 groß waren und eine exakte Tumormessung möglich war. Außerdem wurde darauf geachtet, dass in jeder Versuchsgruppe zu Beginn der Therapie gleichgroße Tumore eingeschlossen wurden, um nach Therapierende diese Tumore auch direkt vergleichen zu können.

Um den Mechanismus aufzuklären, der zu einer Hemmung des subkutanen Tumorwachstums durch eine EndoTAG®-2 Therapie führt, wurden Experimente am Modell der Rückenhautkammer durchgeführt.

IV.1.1.2 A-Mel-3

Für die Experimente mit der transparenten Rückenhautkammer wurden Syrische Goldhamster verwendet, denen das 1961 erstmals von Fortner et al. beschriebene amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 implantiert wurde [FORTNER et al., 1961]. Das A-Mel-3 wird seit langem am Institut für Chirurgische Forschung für Studien der Tumormikrozirkulation verwendet und besitzt eine hohe Angehrate, von bis zu 100%, und zeichnet sich durch ein schnelles Wachstum und frühzeitige Metastasierung in den axillären und inguinalen Lymphknoten aus. Bei subkutaner Tumorumplantation entstehen im fortgeschrittenen Tumorstadium Organmetastasen in Lunge, Niere und Leber [FORTNER et al., 1961]. Während des Beobachtungszeitraums von zwei Wochen kam es in dieser Studie zu keiner Metastasenbildung bei den verwendeten Versuchstieren. Das Allgemeinbefinden der Tiere wurde durch die implantierten Tumore während der Versuchsdauer nicht erkennbar beeinflusst. Die Tiere nahmen an Gewicht zu und zeigten über den gesamten Untersuchungszeitraum normale Putz – und Fressgewohnheiten.

Beide Tumormodelle sind am Institut für Chirurgische Forschung seit langem etabliert. Die Zellen werden regelmäßig im Zellkulturlabor zu bestimmten Passagen (LLC-1 Passage 11, A-Mel-3 Passage 20) angezüchtet und anschließend als Kryokultur gelagert.

Es gibt nur wenige Modelle, die *in vivo* mikrozirkulatorische Parameter visualisieren können und durch mehrmalige intravitalmikroskopische und intravitalmakroskopische Untersuchungen eine Darstellung des dynamischen Verlaufs der Angiogenese ermöglichen.

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster wurde am Institut für Chirurgische Forschung von Endrich und Mitarbeitern entwickelt und ist über viele Jahre in der internationalen Mikrozirkulationsforschung anerkannt und etabliert [Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1980; Goetz, 1987].

Es wurden vielfältige Untersuchungen der Mikrozirkulation am Tumorgewebe und dem umliegenden Normalgewebe durchgeführt, z.B. mit vasoaktiven Substanzen [Funk et al., 1983; Goetz et al., 1987], Anästhetika [Franke et al., 1982; Franke and Endrich, 1983], Hämodilution [Nolte et al., 2000; Oda et al., 1984], nach Hypo- und Hyperthermie [Dellian et al., 1993; Dellian et al., 1994] und mittels Stoßwellen und photodynamischer Therapie [Dellian et al., 1994; Dellian et al., 1995; Gamarra et al., 1993; Leunig et al., 1994]. Aber auch für Untersuchungen zur Angiogenese und Revaskularisierung wurde das Rückenhautkammermodell in verschiedenen Geweben etabliert, z.B. beim Kolon-Adeno-Karzinoms [Leunig et al., 1992], bei soliden Tumoren [Endrich et al., 1982a; Endrich et al., 1982b], malignen Gliomen [Vajkoczy et al., 1998], synthetischen bzw. biologischen Implantationsmaterialien [Menger et al., 1990; Menger et al., 1992; Strieth et al., 2010], bei Fettgewebe [Langer et al., 2002] und Ovarialfollikeln [Vollmar et al., 2001]. Die Präparation des Rückenhautmuskels beim Kammermodell erlaubt eine Beurteilung der Mikrozirkulation der quergestreiften Skelettmuskulatur sowohl an Mäusen [Lehr et al., 1993], als auch an Ratten [Cardon et al., 1970] und Hamstern [Endrich et al., 1980]. Das in der vorliegenden Studie angewendete Modell der Rückhautkammer am Syrischen Goldhamster ermöglicht zum einen eine sequenzielle Beobachtung und Dokumentation des Verlaufes der Angiogenese von ein und demselben Versuchstier, zum anderen erlaubt es die Untersuchungen am wachen Versuchstier durchzuführen ohne jegliche Narkose. Dies stellt einen besonderen Vorteil des Modells dar, da so der Einfluss einer Injektions- oder auch Inhalationsnarkose auf die mikrohämodynamischen Parameter, wie Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit, vermieden werden kann [Intaglietta and Messmer, 1983].

Um eine repräsentative Tumorperfusion mit intakter Mikrozirkulation zu gewährleisten wurden bestimmte Ausschlusskriterien der Rückenhautkammerpräparation angewendet. So führten Eiteransammlungen, Blutungen oder jegliche Anzeichen von Entzündungen oder Ödembildung mit ausgeprägter Stase in den Gefäßen zum Ausschluss eines Versuchstiers [Asaishi et al., 1981; Goetz, 1987; Sewell, 1966]. Die maximale Beobachtungszeit nach

Kammerpräparation betrug ca. 3-4 Wochen, da nach dieser Zeit die Hautspannung abnimmt und die Kammer nicht mehr starr fixiert ist [Funk et al., 1986]. Für die Versuche reichte diese Zeit aus, da diese nach 14 Tagen beendet waren.

In unterschiedlichen Untersuchungen wurde darauf hingewiesen, dass Fluoreszenzfarbstoffe akkumulieren und nach intensiver Beleuchtung phototoxische Reaktionen auslösen können [Miller et al., 1992; Saetzler et al., 1997; Steinbauer et al., 2000]. Dies wird in verschiedenen Studien zwar als therapeutischer Ansatz genutzt, ist aber in dieser dargestellten Arbeit nicht erwünscht. Um phototoxische Effekte zu verhindern wurde eine Beleuchtungsintensität von 1 mW pro cm² je Bildaufnahme nicht überschritten [Harris et al., 2002; Steinbauer et al., 2000]. Studien zur photodynamischen Therapie mit demselben Setup, wie es in dieser Studie verwendet wurde, zeigten keine phototoxischen Effekte [Dellian et al., 1995; Leunig et al., 1994]. Mehrere Arbeitsgruppen arbeiteten schon erfolgreich mit dieser Methode im Institut für Chirurgische Forschung [Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1982a; Endrich et al., 1988; Goetz, 1987; Leunig et al., 1994; Leunig and Messmer, 2001; Nolte et al., 1995a; Nolte et al., 1997] (Dissertationen z.B. von: [Botzlar, 2003; Fritsch, 1996; Goetz, 1987; Manegold, 2003; Nussbaum, 2008; Strelczyk, 2009; von Johnston, 2005; Wagner, 2002]).

Dieses Modell erlaubt eine kontinuierliche Quantifizierung der Gewebekinetik und Permeabilität mittels Intravitalmakroskopie, sowohl im malignen, als auch im gesunden Gewebe [Eichhorn et al., 2004]. Die Auswertung erfolgte digital mittels des Bildanalysenprogramms KS400 und wurde in meiner Arbeitsgruppe schon mehrfach eingesetzt, da es eine personenunabhängige Auswertung ermöglicht. So konnte in dieser Arbeit die Verteilung von fluoreszenzmarkiertem EndoTAG®-2 im Tumor und im umliegenden Normalgewebe über einen Zeitraum von sechs Stunden reproduzierbar verglichen werden.

Des Weiteren ermöglicht das Rückenhautkammermodell die Quantifizierung der Tumormikrozirkulation mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung mittels Intravitalmikroskopie zu untersuchen. Hierzu wurden jeweils acht ROI's (Regions Of Interest) pro Versuchstier zufällig im Kammerareal ausgewählt, mit zentralen und peripher gelegenen Tumorbereichen, so dass ein repräsentativer Eindruck der Vaskularisierung des Tumors entstand. Die Auswertung der auf digitalem Videorekorder aufgezeichneten IVM Bilder erfolgte offline mit Hilfe des CapImage Bildanalysenprogramms [Klyszcz et al., 1997].

Es wurde die funktionelle Gefäßdichte quantifiziert, welches ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes ist und einen zentraler Parameter zur Beurteilung der Tumorangiogenese darstellt [Dellian et al., 1996; Nolte et al., 1995b; Schmid-Schoenbein et

al., 1977]. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur perfundierte, also funktionell wirksame Gefäße markiert werden, um das Ausmaß einer eventuellen Gefäßzerstörung zu dokumentieren. Außerdem wurden Veränderungen der Gefäßdurchmesser nach der EndoTAG®-2 Therapie mit der manuellen Funktion des CapImage Systems untersucht, um die Ausreifung der Gefäße zu vergleichen. Die Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurde nach der line-shift-Diagramm-Methode berechnet [Klyscz et al., 1997]. Diese Methode ist eine Kombination aus interaktiven und automatischen Verfahren des CapImage Programms. Zur Darstellung der Gefäße und des Plasmaflusses wurde fluoreszenzmarkiertes FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 500.000 Da verwendet, welches den endothelialen Randstrom mit erfasst, was wiederum die Genauigkeit der Gefäßdurchmesserbestimmung erhöht [Rovainen et al., 1993]. Außerdem wurde das hochmolekulare FITC-Dextran verwendet, um eine Extravasation des Fluoreszenzfarbstoffes in das Tumorinterstitium während der Untersuchung zu vermeiden, da die Tumorgefäße eine höhere Permeabilität als normale Blutgefäße aufweisen [Dvorak et al., 1988; Gerlowski and Jain, 1986; Hobbs et al., 1998; Yuan et al., 1994].

Die Messergebnisse konnten mit dem CapImage System zuverlässig, objektiv und reproduzierbar ermittelt werden. Das Auswertungssystem ist im Bereich der Mikrozirkulation bewährt und allgemein akzeptiert.

IV.1.2. Histologische Untersuchungen

Um Aussagen über morphologische Veränderungen des Tumorgewebes nach einer EndoTAG®-2 Therapie zu erhalten, wurden die subkutanen LLC Tumore nach Beendigung der Tumorwachstumsstudie entnommen und histologisch aufbereitet. Zur Beurteilung der Gefäßdichte wurde eine immunhistochemische CD31-Färbung durchgeführt. Die CD31-Antikörper binden an die Endothelzellen von Tumorgefäßen, auch wenn die Gefäße noch sehr unreif sind. Außerdem binden sie im geringen Maß an Blutplasmabestandteile und Fibroblasten, aber nicht an lymphatisches Gewebe.

Die Färbung war sehr spezifisch und reproduzierbar. Die Auswertung der CD31-Färbung erfolgte mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung. Es wurden hierzu 18 ROI's pro Tumor fotografiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass unterschiedliche Tumorareale ausgewählt wurden, um eine Über- bzw. Unterschätzung der Vaskularisierung des Tumors zu vermeiden und einen repräsentativen Eindruck des Tumors zu erhalten. Danach wurde aus dem Ausgangsbild mittels RGB Threshold Technik ein binäres Bild erstellt, das nur die CD31-markierten Gefäße als Pixel darstellt. Aus den CD31 positiven Pixeln konnte nun das Verhältnis zur Gesamtbildfläche quantifiziert werden. Da die Auswertung der Bilder mit Hilfe des KS400 Programms automatisiert ist, konnte eine subjektive und personenabhängige Auswertung vermieden werden.

IV.1.3. Molekularbiologische Untersuchungen

Die Familie des „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) besteht aus sieben verschiedenen Formen: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F und PlGF (Placental Growth Factor) [Yla-Herttuala et al., 2007]. VEGF ist ein wichtiges Signalmolekül für die Vaskulogenese (Ausbildung des embryonalen Blutkreislaufes) und der Angiogenese (Ausbildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen). Wenn die Zellen nicht genügend mit Sauerstoff versorgt werden, produzieren sie HIF (Hypoxia Inducible Factor), welches die Produktion und Ausschüttung von VEGF fördert und so die Angiogenese auslöst. VEGF vermittelt dabei seine Signale über die Bindung an seine Rezeptortyrosinkinasen, wodurch das extrazelluläre Signal ins Zellinnere weitergeleitet wird. Es gibt drei verschiedene Rezeptortypen, 1, 2 und 3, wobei jedes VEGF-Molekül spezifisch an seinen Rezeptor bindet.

In der Tumorangiogenese spielt VEGF-A eine wichtige Rolle, da in malignen Tumoren eine positive Korrelation zwischen der Bildung von VEGF-A und der Vaskularisierung, dem

Wachstum und der Metastasierung eines Tumors nachgewiesen wurde [Guidi et al., 1995; Mattern et al., 1996; Suzuki et al., 1996]. VEGF-A wird von hypoxischen Tumorzellen, Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems gebildet [Brown et al., 1997]. Es wirkt ausschließlich auf Endothelzellen durch Bindung an den VEGF-Rezeptor 1 und VEGF-Rezeptor 2 [Ferrara et al., 2003]. VEGF-B ist vorwiegend an der Entwicklung der Herzkranzgefäße und der inflammatorischen Angiogenese beteiligt und überträgt seine Signale über eine Bindung an den VEGF-Rezeptor 1. VEGF-C und VEGF-D sind dagegen hauptsächlich für die Lymph-Angiogenese verantwortlich und binden an den VEGF-Rezeptor 2 und VEGF-Rezeptor 3 [Tammela et al., 2005].

In den letzten Jahren sind einige Medikamente in klinische Studien eingegangen, die eine Expression von VEGF während der Tumorangio-genese durch Blockade der VEGF-Signalkaskade unterdrücken sollen. Im Jahr 2004 wurde Bevacizumab (Avastin®) als erstes antiangiogenetisches Medikament zur First-line-Therapie in Kombination mit Chemotherapien beim metastasierenden und fortgeschrittenen Kolorektalkarzinom zugelassen [Hurwitz et al., 2004; Hurwitz and Saini, 2006; Scott, 2007]. Dieser monoklonale Antikörper Bevacizumab bindet an freies VEGF, wodurch dieser nicht mehr an seine Rezeptoren binden kann und letztendlich die Angiogenese gehemmt wird. Bevacizumab wurde in den letzten Jahren auch an anderen Tumorarten getestet und wird derzeit in der Klinik auch beim fortgeschrittenen Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC = non small cell lung carcinoma), beim Mammakarzinom und Glioblastom eingesetzt. Außerdem wurden VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitoren entwickelt, wie Sunitinib (Sutent®), Sorafenib (Nexavar®) und Vatalanib, die die VEGF-Signalkaskade unterbrechen können und die bei der Behandlung beim fortgeschrittenen Nieren- bzw. Kolorektalkarzinom zugelassen sind [Escudier et al., 2009; Goodman et al., 2007; Kane et al., 2006; Motzer et al., 2007; Prat et al., 2007].

Um den Einfluss der EndoTAG®-2 Therapie auf die Regulation der VEGF-Kaskade zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Expression von VEGF-A und deren Rezeptor 1 (VEGF-R1) und 2 (VEGF-R2) untersucht. Die RNA Extraktion aus dem Tumorgewebe der Tumorstudie und die anschließende RT-PCR wurden wie im Abschnitt II.4.4. beschrieben durchgeführt und ergaben reproduzierbare Ergebnisse. Zur Korrektur von Schwankungen im Grundniveau der cDNA wurde in jeder PCR Probe die Menge eines „housekeeping gene“ gemessen, welches konstitutiv expremiert wird [Szyroki et al., 2001]. In dieser Arbeit wurde β -ACTIN als „housekeeping gene“ gewählt, da es ein Protein des Cytoskeletts der Zelle codiert.

IV.2. Diskussion der Ergebnisse

IV.2.1. Camptothecin, seine Analoga und EndoTAG®-2

Als Camptothecin (CPT) beim Screening nach natürlich vorkommenden Zytostatika entdeckt wurde, konnte in anschließenden Untersuchungen gezeigt werden, dass diese Substanz zytotoxische Eigenschaften bei verschiedenen Tumorarten besitzt [Wall et al., 1966]. Das aus der Rinde des chinesischen Baumes *Camptotheca acuminata* gewonnene Alkaloid ist ein effektiver Inhibitor der Topoisomerase I, welches ein wichtiges Enzym der DNA-Replikation, DNA-Transkription und DNA-Reparatur ist [Hsiang et al., 1985; Liu et al., 1989].

Eine grundlegende molekulare Eigenschaft von CPT ist sein pH-abhängiges Gleichgewicht zwischen der Lacton – und Carboxylat-Form [Fassberg and Stella, 1992; Garcia-Carbonero and Supko, 2002]. Bei physiologischem pH-Wert und oberhalb von pH 7 geht die lipophile Lacton-Form in seine wasserlösliche Carboxylat-Form über [Jung and Zamboni, 2001]. Da aber eine Verabreichung des lipophilen Lacton ohne Komplikationen schwierig ist, muss zunächst CPT in sein wasserlösliches Natriumsalz NCS-100880 umgewandelt werden [Gottlieb et al., 1970; Muggia et al., 1972].

Obwohl es Beweise der antitumoralen Aktivität am Menschen gab, gefährdete die akute Toxizität, besonders die hämorrhagischen Zystitis von CPT, weiterführende klinische Studien [Schaeppi et al., 1974]. In anschließenden Forschungsarbeiten konnte unter anderem belegt werden, dass das Gleichgewicht zwischen den CPT-Formen entscheidend für die zytostatische Aktivität bei einer Krebsbehandlung und das Auftreten von Nebenwirkungen ist. Der Carboxylat-Form ordnete man die auftretenden Nebenwirkungen zu, wohingegen die Lacton-Form als die pharmakodynamisch aktivere Form angesehen wird [Hertzberg et al., 1989b]. Aufgrund dieser Tatsachen wurde die Entwicklung von CPT-Medikamenten in seiner Lacton-Form vorangetrieben. Allgemein sind folgende Struktureigenschaften für die antitumorale Wirksamkeit von CPT wichtig: Zum einen muss die *S*-Konfiguration von CPT vorhanden sein, da die *R*-Camptothericin Konfiguration pharmakologisch inaktiv ist. Zum anderen ist die *S*-konfigurierte Hydroxylgruppe an Position 20, das Vorhandensein einer Pyridongruppe in Ring D und eine Lactonstruktur in Ring E essentiell (siehe Abb. 37). Bei Abweichung von dieser Stereochemie kommt es zum deutlichen Wirkungsverlust der Substanz [Verma and Hansch, 2009].

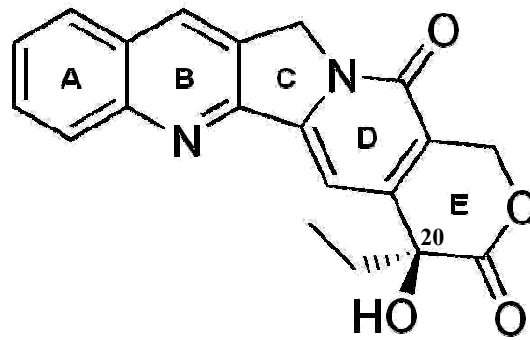


Abb. 37: Formel von Camptothecin

Mehrere Inhibitoren der menschlichen Topoisomerase I wurden in den letzten Jahren entwickelt und werden teilweise zur Zeit schon in der Klinik zur Inhibierung der Tumorzellproliferation eingesetzt [Garcia-Carbonero and Supko, 2002]. Zum Beispiel sind Irinotecan und Topotecan semisynthetische Analoga von CPT, die zur Behandlung von malignen Tumoren zugelassen sind. Irinotecan (Campto®) wird seit 1999 zur First-Line-Therapie beim fortgeschrittenen, metastasierenden Kolonkarzinom in Kombination mit 5-Fluorouracil und Folinsäure eingesetzt. Es wird als wasserlösliches Prodrug verabreicht und wird erst in der Leber durch die Carboxylesterase gespalten, wodurch die aktive lipophile Form SN38 entsteht, die zytotoxische Wirksamkeit besitzt [Cersosimo, 1998]. Topotecan (Hycamtin®) wird derzeit als Second-Line-Therapeutikum von rezidivierten Ovarialkarzinom und kleinzelligem Bronchialkarzinom (SCLC) angewendet [Ahmad and Gore, 2004; Ardizzoni et al., 1997; Armstrong and O'Reilly, 1998; Armstrong et al., 2005]. Auch Belotecan (Camtobell®), ein neues CPT Analogon, zeigte in einer multizentrisch angelegten Phase II Studie starke antitumorale Effektivität gegen SCLC [Lee et al., 2008].

Aber all diese Anwendungen von CPT zielen auf die Bekämpfung der Tumorzellen selbst ab, obwohl eine Inhibition der Tumorendothelzellproliferation möglicherweise viel effektiver wäre, da man weiß, dass die Proliferationsrate der Tumorendothelzellen 50-1000-fach höher ist, als die der normal ruhenden Endothelzellen [Denekamp and Hobson, 1982]. Ein neuartiger Therapieansatz, die – antivaskuläre Tumorthherapie - richtet sich auf die Zerstörung der tumorversorgenden Blutgefäße, um letztendlich den Tumor „auszuhungern“, indem man die nutritive Blutversorgung destruiert [Burrows and Thorpe, 1994; Folkman, 1971]. Es können dabei zwei unterschiedliche antivaskuläre Therapiekonzepte verfolgt werden: Eine Antiangiogenetische Therapie, welche die Ausbildung neuer Tumorblutgefäße inhibiert und einen zytostatischen Effekt besitzt [Folkman, 1971]. Und eine „Vascular targeting“ Therapie, die das bereits existierende Tumorblutgefäßsystems angreift und zerstört, und einen eher zytotoxischen Effekt ausübt [Denekamp, 1982; Denekamp, 1984; Folkman, 1971].

Kationische Liposomen zeigten in verschiedenen Studien eine selektive Bindung und Aufnahme an angiogenetische Endothelzellen von soliden Tumoren [Campbell et al., 2002; Dass, 2003; Krasnici et al., 2003; Thurston et al., 1998]. Daher stellen sie geeignete Carrier für eine gezielte Wirkstoff Anreicherung im Tumor dar. Sie binden bevorzugt an neu gebildete Tumorgefäße und weniger an schon existierende reife Blutgefäße und versprechen so, eine große therapeutische Effektivität an angiogenen Blutgefäßen [Abu-Lila et al., 2009; Kalra and Campbell, 2006]. Der genaue Mechanismus der selektiven Bindung, kationischer Liposomen an die aktivierten Tumorendothelzellen, ist abschließend noch nicht geklärt. Es scheint, dass die ladungsabhängige Bindung und die mögliche Aufnahme von kationischen Liposomenkomplexen durch das negativ geladene Lipid Phosphatidylserin, welches auf der luminalen Oberfläche von Tumorblutgefäßen besonders hoch expremiert wird, vermittelt wird [Ran et al., 2002]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Tumorgefäße spezifische Oberflächenrezeptoren, Antigene und negativ geladene Makromoleküle, wie Glykoproteine, anionische Phospholipide und Proteoglycane, überexpremieren [Fears et al., 2006; Iozzo and San Antonio, 2001; Ran and Thorpe, 2002]. Über elektrostatische Anziehungskräfte, zwischen den kationisch geladenen Liposomen und den anionisch geladenen Molekülen, könnte so eine selektive Bindung zustande kommen.

Durch eine liposomale Formulierung von CPT verspricht man sich viele Vorteile. Zum einen kann neben der Löslichkeit auch die Stabilität der Lacton-Form von CPT im physiologischen pH-Wert verbessert werden [Burke et al., 1993]. Zum anderen kann eine Enkapsulierung von CPT die Bindung und Aufnahme in die Zielmembran außerordentlich erleichtern. Die sonst geringe Membranpermeabilität des anionisch geladenen CPT in seiner Carboxylat-Form durch die ebenfalls anionisch geladene Zellmembran wird so umgangen und das Medikament kann in das Tumorinterstitium leichter diffundieren. Ein weiterer wichtiger Vorteil durch einen liposomalen Einschluss einer antitumoralen Substanz ist nicht nur die Steigerung einer antitumorale Aktivität, sondern auch dass die Nebenwirkungen einer Therapie reduziert werden [Gill et al., 1995; Sadzuka et al., 1998]. Mehrere Ansätze einer liposomalen Enkapsulierung von den CPT-Analoga, z.B. von Irinotecan und Topotecan, werden in der Literatur beschrieben [Sadzuka et al., 1998; Sadzuka et al., 1999; Tardi et al., 2000]. Die Realisierung einer antivaskulären Tumorthherapie durch Enkapsulierung von CPT in kationische Liposomen wurde bislang nicht verfolgt.

EndoTAG®-2 stellt somit erstmals einen neuen therapeutischen Ansatz von CPT dar, nämlich die gezielte Anreicherung und Zerstörung der proliferierenden Tumorendothelzellen. CPT in seiner Carboxylat-Form bildet mit dem kationischen Lipid DOTAP einen Komplex mit

vorteilhaften molekularen Eigenschaften. Die Substanz EndoTAG®-2 wurde von der Firma Munich Biotech/MediGene synthetisiert und für diese Studie zur Verfügung gestellt.

IV.2.2. Targeting von EndoTAG®-2

Im Vergleich zu anionisch oder neutral geladenen Liposomen binden die kationischen Liposomen selektiver und länger im Tumor als im umliegenden Normalgewebe [Krasnici et al., 2003]. Es konnte festgestellt werden, dass Tumorgefäße auf ihrer Lumenseite vorwiegend anionisch geladene Moleküle exprimieren, welches die bevorzugte Bindung von kationischen Liposomen erklären könnte [Charonis and Wissig, 1983; Ran et al., 2002; Roberts and Palade, 1997; Vincent et al., 1988]. Studien mit den Zytostatika Paclitaxel, Doxorubicin und 5-Fluorouracil, welche in kationische Liposomen verpackt wurden, zeigten deutliche antivaskuläre Eigenschaften nach selektiver Bindung an die Tumorgefäße [Kalra and Campbell, 2006; Kunstfeld et al., 2003; Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004; Wu et al., 2007].

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die neu entwickelte Substanz EndoTAG®-2, welches liposomal verpacktes CPT in seiner Carboxylat-Form enthält, *in vivo* getestet. An zwei verschiedenen Tumormodellen konnte gezeigt werden, dass auch nach Komplexierung der kationischen Liposomen mit CPT, die „Targeting“-Eigenschaften an das Tumorendothel erhalten bleiben. Am Modell der transparenten Rückenhautkammer mit dem A-Mel-3 Tumor, konnte mittels quantitativer Fluoreszenzmakroskopie über einen Zeitraum von sechs Stunden, eine selektive Anreicherung von fluoreszenzmarkierten EndoTAG®-2 im Tumor beobachtet werden. Ebenso zeigten mikroskopische Aufnahmen subkutaner LLC-1 Tumoren eine deutliche, bevorzugte Anreicherung von fluoreszenzmarkierten EndoTAG®-2 im Blutgefäßkompartiment ohne Extravasation in das Tumorinterstitium. Dies zeigt, dass CPT effektiv und mit hoher Konzentration an die Tumorendothelzellen und nicht an die Tumorzellen selbst transportiert wird und somit eine antivaskuläre Tumorthherapie mit EndoTAG®-2 realisierbar ist.

IV.2.3. **Therapeutische Effektivität von EndoTAG®-2**

In präklinischen Studien zeigte sich, dass die antitumorale Effektivität von Irinotecan und Topotecan stark vom Applikationsschema abhängig war. Während eine intensive, kurze Applikationssequenz, z.B. einmal alle drei Wochen, nur eine geringe therapeutische Auswirkung hatte, war bei einer täglichen, geringen Dosis der CPT Analoga, z.B. an fünf aufeinander folgenden Tagen, eine größere therapeutische Effizienz ersichtlich [Furman et al., 1999; Houghton et al., 1995; Thompson et al., 1997].

Auch in der hier dargestellten Arbeit, wurde eine eher metronomische Applikationssequenz angewandt, um die Effizienz der neu entwickelten Substanz EndoTAG®-2 erstmals *in vivo* an einer LLC-1 Tumorstudie zu untersuchen. Das LLC-1 Tumormodell zeichnet sich durch ein schnelles, aggressives Wachstum aus und wird international für verschiedene therapeutische Studien mit Zytostatika und antiangiogenetischen Substanzen eingesetzt [Amano et al., 2003; Ambati et al., 2002; Boehm et al., 1997; Borgstrom et al., 1995; Manegold et al., 2003; Mauceri et al., 1998; O'Reilly et al., 1994; Prontera et al., 1999; Teicher et al., 1996; Teicher et al., 2001]. Im Rahmen dieser Arbeit war der Behandlungszeitraum zwei Wochen lang und die Versuchstiere wurden alle zwei Tage therapiert. Die effektive wöchentliche Dosis von CPT betrug 7,5 mg/kg KG. In Folge einer EndoTAG®-2 Therapie, kam es zu einer signifikanten Reduktion des LLC-1 Tumorstudiums um 81 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Behandlung mit freiem CPT führte dagegen zu keiner signifikanten Wachstumsverzögerung. Eine Studie mit liposomal verpackten Paclitaxel und ähnlichem Applikationsschema führte bei Lungen – und Pankreastumoren ebenfalls zu signifikanten Wachstumsverzögerungen [Eichhorn et al., 2010].

Interessanterweise hatten unbeladene kationische Liposomen einen fast genauso starken wachstumsverzögernden Effekt auf die LLC-1 Tumore wie freies CPT. Andere experimentelle Studien zeigten bereits das unbeladene kationische Liposomen einen geringen antitumoralen Effekt besitzen [Kunstfeld et al., 2003; Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004]. Die genauen Mechanismen der Wachstumsinhibition von kationischen Liposomen auf Endothelzellen konnten jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Aufnahme der kationischen Liposomen in die Endothelzelle geschieht wahrscheinlich durch Endozytose [Miller et al., 1998; Thurston et al., 1998]. Die enkapsulierten Wirkstoffe können so in die Zelle aufgenommen werden und nach Freisetzung ihre spezifische Wirkung auf proliferierende Endothelzellen ausüben. Das kationische Substanzen selbst therapeutisch aktiv

sein können, stellte auch Dass fest [Dass, 2003]. Obwohl CPT ausreichend stabil in die Liposomen enkapsuliert wurde, kann ein additiver Effekt von freiem CPT und kationisch geladenen Liposomen für die therapeutische Wirkung von EndoTAG®-2 nicht völlig ausgeschlossen werden.

In den letzten Jahren wurden einige liposomale Formulierungen mit enkapsulierten Zytostatika entwickelt und deren antitumorale Wirksamkeit im Vergleich zu konventionell verabreichtem Medikament untersucht. Kalra und Campbell enkapsulierten zum Beispiel Doxorubicin und 5-Fluorouracil in kationische Liposomen und zeigten zunächst in *in vitro* Studien, dass sich die liposomalen Formulierungen der Zytostatika in weit höherem Maß an Endothelzellen anlagern als an Pankreastumorzellen [Kalra and Campbell, 2006]. Dabei hatte das liposomale Doxorubicin einen stärkeren zytotoxischen Effekt auf die Zellen als freies Doxorubicin. Auch Wu und Mitarbeiter verpackten Doxorubicin in Liposomen und zeigten, dass die kationische liposomale Formulierung einen stärkeren zytotoxisch Effekt auf Tumorzellen besitzt als die neutrale liposomale Formulierung von Doxorubicin und dass im murinen subkutanen Tumormodell die Überlebensrate durch eine Behandlung mit kationischem liposomalem Doxorubicin im Vergleich zu freiem Doxorubicin oder neutral geladenem liposomalem Doxorubicin deutlich anstieg [Wu et al., 2007]. Wachstumsstudien mit Paclitaxel, welches in kationische Liposomen verpackt wurde, zeigten ebenfalls eine ausgeprägte Tumorstadiumverzögerung im Vergleich zu konventionellen Paclitaxel [Eichhorn et al., 2010; Kunstfeld et al., 2003; Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004; Strieth et al., 2008a]. Auch eine kationische liposomale Formulierung von Etoposid, einem Topoisomerase-II-Inhibitor, wurde auf seine antitumoralen Eigenschaften untersucht. Sengupta und Mitarbeiter zeigten an einer Wachstumsstudie mit solidem Fibrosarkom, dass im Vergleich zu freiem Etoposid das Tumorstadium nach Therapie mit kationischen liposomal enkapsuliertem Etoposid signifikant verzögert war und die maximal tolerierte Dosis von liposomalem Etoposid signifikant höher war [Sengupta et al., 2001].

Durch eine Therapie mit kationisch liposomal verpackten Camptothecin (EndoTAG®-2) kam es im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Wachstumsstudie trotz Tumorstadiumverzögerung zu keinerlei Anzeichen einer hämorrhagischen Zystitis, welche Schaeppi und Mitarbeiter nach Gabe von freiem CPT festgestellt hatten [Schaeppi et al., 1974].

Histologische CD31-Färbungen der Tumore aus der LLC-1 Tumorwachstumsstudie sollten Aufschlüsse über Veränderungen der Vaskularisierung durch eine EndoTAG®-2 Therapie geben. Tatsächlich zeigte die quantitative Auswertung der CD31-Färbungen, dass eine Therapie mit freien CPT oder kationischen Liposomen zu einer geringen Reduktion der Gefäßdichte führte, im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wohingegen es nach einer EndoTAG®-2 Therapie zur signifikanten Inhibierung der intratumorale Gefäßdichte um 48 % kam. Somit deuten die Ergebnisse auf einen eher antivaskulären Effekt von EndoTAG®-2 hin.

Molekularbiologische Untersuchungen sollten klären, ob eine EndoTAG®-2 Therapie zu einer Veränderung der Expression vom angiogenetischen Wachstumsfaktor VEGF-A und seinen Rezeptoren 1 und 2 führt. Der Wachstumsfaktor VEGF-A spielt eine wichtige Rolle bei der Angiogenese und beim Überleben unreifer Blutgefäße [Ferrara, 2002; Ferrara, 2004; Hicklin and Ellis, 2005]. Er besitzt einzigartige spezifische Eigenschaften, z.B. erhöht er die vaskuläre Permeabilität, steigert die Endothelzellproliferation und vermittelt so die Angiogenese [Connolly et al., 1989]. Die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen ergab eine leichte Überexpression von VEGF-A durch eine EndoTAG®-2 Therapie, welche aber durch den großen Standardfehler nicht signifikant verändert war zu den anderen Versuchsgruppen. Auch die Expression von VEGF-R1 und R2 zeigten keine geänderte Regulation durch EndoTAG®-2. Anders als bei der Therapie mit VEGF-Antikörpern kommt es damit bei der Therapie mit EndoTAG®-2 nicht zu einer kompensatorischen Hochregulation der VEGF-Freisetzung.

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie sollte am Modell der transparenten Rückenhautkammer der Wirkmechanismus von EndoTAG®-2 während der Tumorangio-genese des A-Mel-3 aufgeklärt werden. Die Tumormikrozirkulation des A-Mel-3 wurde am Institut für Chirurgische Forschung eingehend untersucht, begleitet von histologischen und elektronenmikroskopischen Studien [Abels et al., 1997; Asaishi et al., 1981; Endrich and Messmer, 1981; Endrich et al., 1982b; Endrich et al., 1988; Hammersen et al., 1985; Oda et al., 1984]. Im frühen Stadium des A-Mel-3 Tumorwachstums, ab Tag drei nach Tumorimplantation, wachsen Gefäßaussprossungen aus Venolen des umliegenden gesunden Gewebes in den Randbereich des Tumors ein [Endrich et al., 1988]. Im weiteren Verlauf der Angiogenese bildet sich ein Gefäßnetzwerk aus, das durch eine heterogene, chaotische Gefäßarchitektur mit Gefäßaussackung, Kalibersprüngen, Anastomosen, Gefäßschleifen und -spiralen charakterisiert ist. Die neu entstandenen Tumorgefäßwände besitzen regelmäßig interzelluläre Lücken, die nur unvollständig durch eine Basalmembran überbrückt sind, was

zu einer erhöhten Permeabilität für Makromoleküle führt [Dvorak et al., 1988; Gerlowski and Jain, 1986; Hammersen and Hammersen, 1983].

Um die zytotoxische Wirkung von EndoTAG®-2 auf die Tumorangio-genese zu beurteilen, wurden für die Tumormikrozirkulation wichtige mikro-hämodynamische Parameter, wie funktionelle Gefäßdichte, Tumorgefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und mikrozirkulatorischer Perfusionsindex analysiert. Die ersten IVM Aufnahmen wurden am Tag 5 nach Tumorzellimplantation durchgeführt, da nach dieser Zeit die neu gebildeten Tumorgefäße deutlich sichtbar waren und die Tumorangio-genese begonnen hatte. Deutlich war das typische Bild einer heterogenen Tumorgefäßarchitektur wie oben beschreiben zu erkennen. Es gab keinerlei Unterschiede der mikrozirkulatorischen Parameter zwischen der EndoTAG®-2-Therapiegruppe und der Kontrollgruppe. Dieser Befund stellt eine wichtige Basis für den gegenseitigen Vergleich der Versuchsgruppen dar. Nach dreimaliger Behandlung mit EndoTAG®-2, kam es zu einer signifikanten Reduktion der funktionellen Gefäßdichte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Das Gefäßnetzwerk nach EndoTAG®-2 Therapie zeigte eine deutliche Rarifizierungen und nicht perfundierte Tumorbereiche. Die funktionelle Gefäßdichte ist ein wichtiges Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes und stellt einen zentralen Parameter zur Beurteilung der Tumorangio-genese dar [Dellian et al., 1996; Nolte et al., 1995b]. Auch die signifikant kleineren Gefäßdurchmesser und die geringere Erythrozytenfließgeschwindigkeit der EndoTAG®-2 Therapiegruppe, lassen darauf schließen, dass die Tumorangio-genese verhindert wurde. Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex, der ein Maß für die Durchblutung eines Tumors ist und sich aus der funktionellen Gefäßdichte und dem Blutvolumen errechnet wird, war ebenfalls signifikant erniedrigt. Dagegen deuten die großen Gefäßdurchmesser und die hohe Fließgeschwindigkeit in der Kontrollgruppe auf eine ungehinderte Ausreifung der neu gebildeten Blutgefäße. Diese Ergebnisse bestätigen deutlich eine Schädigung der Tumormikrozirkulation durch eine EndoTAG®-2 Therapie.

Das schon nach einer so kurzen Therapieperiode mit EndoTAG®-2 ein so großer antivaskuläre Effekt auftreten kann ist höchst interessant. Eventuell kann dies auch mit dem Phänomen des EPR-Effektes (Enhanced Permeability and Retention) zusammenhängen. Dieser passive Effekt ist charakteristisch für solide Tumore. Aufgrund der veränderten Eigenschaften des Tumorendothels, das undifferenziert und fenestriert ist, kommt es zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität, und Makromoleküle können leichter in das Tumorgewebe eindringen [Iyer et al., 2006]. Jedoch durch den vorherrschenden verlangsamten venösen Rückfluss und der niedrigen retikuloendothelialen und lymphatischen Aktivität im

Tumorgewebe kommt es zur beeinträchtigten Clearance der Makromoleküle [COURTICE, 1962; Greish et al., 2003; Matsumura and Maeda, 1986; Skinner et al., 1995]. Bereits extravasierte Moleküle werden zurückgehalten und der Eintritt weiterer Makromoleküle schreitet voran [Iyer et al., 2006]. Somit kann durch den EPR-Effekt die Wirkstoff Akkumulation im soliden Tumor erhöht werden [Fang et al., 2003; Greish et al., 2003; Maeda et al., 2000; Matsumura and Maeda, 1986].

Durch das Einkapsulieren des kleinmolekularen Wirkstoff CPT in die Liposomen entsteht ein hochmolekularer Liposomenkomplex (= EndoTAG®-2). Nach systemischer Applikation bindet EndoTAG®-2 wie gezeigt selektiv an das Tumorendothel und eine Therapie mit EndoTAG®-2 erreicht eine effiziente antivaskuläre Wirkung. Aufgrund des gesteigerten Permeabilitäts- und Retentionseffekt (EPR) kann eventuell EndoTAG®-2 zusätzlich zu den Tumorzellen gelangen und dort eine antitumorale Wirkung auslösen. Was letztendlich zu einer signifikanten Tumorzellwachstumsverzögerung führen kann, wie am Beispiel des LLC-1 Tumors gezeigt wurde. Andererseits konnte für Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen gezeigt werden, dass auch nach wiederholter Applikation keine Extravasation der Liposomen beobachtet werden kann [Strieth et al., 2008a], so dass eine gesteigerte antitumorale Wirksamkeit von kationischen Lipidkomplexen durch einen EPR-Effekt eher unwahrscheinlich ist.

Auch wenn eine detaillierte Toxizitätsstudie in dieser präsentierten Arbeit nicht durchgeführt wurde, kann gesagt werden, dass EndoTAG®-2 bis zu einer effektiven CPT Dosis von 2,5 mg/kg KG gut toleriert wurde und die Versuchstiere über den gesamten Behandlungszeitraum konstante Körpergewichte aufwiesen. Eventuell könnte eine begrenzte Verträglichkeit oder systemische Toxizität nach einer Langzeittherapie oder höherer Wirkstoffdosis von EndoTAG®-2 entstehen, aber im Zeitraum dieser Studie wurden keine Veränderungen am Versuchstier festgestellt. Mögliche toxische Nebenwirkungen könnten dabei durch die nachgewiesene Toxizität von kationischen Lipiden oder Polymeren entstehen, welche aber nur für kationische Lipid-DNA-Komplexe beschrieben wurde [Lv et al., 2006]. Dabei zeigten die kationischen Lipid-DNA-Komplexe in verschiedenen untersuchten Organen eine weitaus geringere Bindung an die Endothelzellen des Normalgewebes [McLean et al., 1997]. Eine Toxizität für die normalen, nicht proliferierenden Endothelzellen ist wegen ihrer besonders geringen Proliferationsrate eher unwahrscheinlich, da die Wirkstoffe nur die Zellen schädigen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, also eher angiogenetisch aktive Tumorendothelzellen.

IV.2.4. Vorteile einer EndoTAG®-2 Therapie

Durch die Enkapsulierung von CPT in kationische Liposomen, stellt eine EndoTAG®-2 Therapie ein neues Prinzip der Tumorthherapie dar, welche viele Vorteile besitzt. Der Angriffspunkt einer EndoTAG®-2 Therapie, die aktivierten proliferierenden Endothelzellen, sind aufgrund ihrer Lokalisation über das Blut besser zu erreichen, als die Tumorzellen selbst, worauf die konventionell eingesetzten Chemotherapeutika abzielen. Die antivaskulär wirkenden Agenzien müssen nicht tief in das Tumorigerinterstitium eindringen um einen therapeutischen Effekt auszuüben. So gefährden bestehende physiologische Barrieren wie der hohe interstitielle Flüssigkeitsdruck und die Hypoxie im Tumor die Therapiestrategie nicht [Campbell et al., 2009; Jain, 1998]. Außerdem ist eine EndoTAG®-2 Therapie sehr effizient, da viele Tumorzellen von wenigen Endothelzellen abhängig sind, im Bezug auf ihr Wachstum und ihre Versorgung, führt der Tod einer Endothelzelle zum Untergang mehrerer Tumorzellen [Denekamp and Hobson, 1982; Denekamp, 1984]. Und aufgrund der Eigenschaften von Endothelzellen, dass sie genetisch stabil sind, kommt es weniger zur Entwicklung einer „Multi drug resistance“ [Kerbel, 2000].

Die EndoTAG®-2 Behandlung zeigt durch die Enkapsulierung des sonst freien toxischen Wirkstoffs CPT, eine sehr geringe Toxizität, trotz starke antitumorale Aktivität. Es wurde gezeigt, dass kationische Liposomen nach systemische Applikation primär auch in Lunge und Leber akkumulieren [Ishiwata et al., 2000]. Eine kovalente Bindung von PEG (Polyethylenglykol) an die kationischen Liposomen ist eine Möglichkeit die Bioverteilung von EndoTAG®-2 zu verbessern. Die Substanz wird maskiert und vor Interaktionen mit Blutbestandteilen und dem frühzeitigen enzymatischen Abbau geschützt. Durch eine Pegylierung von kationischen Liposomen verspricht man sich längere Zirkulationszeiten und die Erhöhung der Pharmakokinetik [Stuart et al., 2000].

Ein weiterer wichtiger Vorteil von EndoTAG®-2 ist, dass die Therapie breit einsetzbar und wirksam ist, unabhängig vom Typ des soliden Tumors. Er muss nur eine eigene Gefäßversorgung ausgebildet haben, um so die proliferierenden Endothelzellen zu töten. Des Weiteren kann die Therapie auch im fortgeschrittenen Tumorstadium angewendet werden, da die Therapie gegen Metastasen wirksam ist, die eine Gefäßversorgung für ihre Verbreitung und ihr Wachstum benötigen.

Abschließend kann gesagt werden, dass EndoTAG®-2 einen neuen Ansatz zur antivaskulären Tumorthherapie repräsentiert, mit gezielter Anreicherung des Wirkstoffes CPT an die proliferierenden Tumorendothelzellen. Diese neue Verbindung besitzt essentielle

Eigenschaften, die eine zelluläre Aufnahme von CPT in Carboxylat-Form verbessern, indem die kationischen Liposomen als Carrier benutzt werden, um den Wirkstoff zu enkapsulieren. Die Wirkungsweise von EndoTAG®-2 ist im Vergleich zu anderen CPT Analoga, die in der Klinik angewandt werden, grundlegend verschieden. Deshalb stellt das liposomal enkapsulierte CPT in kationischen Lipidkomplexen eine viel versprechende neue Alternative für eine bessere systemische Behandlung von Krebserkrankungen dar und verhindert zudem die Entstehung einer Resistenz.

V. Zusammenfassung

Die antivaskuläre Tumorthherapie stellt einen neuartigen Therapieansatz bei der Bekämpfung von Krebserkrankungen dar. Während konventionelle Therapiekonzepte, wie Chirurgie, Chemotherapie und Strahlentherapie, vor allem primär auf die Tumorzelle selbst abzielen, richtet sich das Konzept der antivaskulären Therapie auf die den Tumor versorgenden Blutgefäße. Ziel dieser Therapieform besteht darin, den Tumor „auszuhungern“, indem man die nutritive Blutzufuhr stoppt. Aufgrund der Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen erfolgt sekundär ein Untergang der Tumorzellen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich nach systemischer Applikation kationische Liposomen in einem weit höheren Maß an das angiogenetisch aktive Tumorendothel anreichern, als anionisch oder neutral geladene Liposomen. Somit stellen kationische Liposomen einen attraktiven Carrier für den Transport von zytotoxischen Substanzen zu den Tumorendothelzellen dar.

In dieser Arbeit wurde erstmals die antitumorale Wirkung und der Wirkmechanismus von liposomal enkapsuliertem Camptothecin (EndoTAG®-2) *in vivo* an zwei verschiedenen Tumormodellen (LLC-1, A-Mel-3) erforscht.

Untersuchungen zum „Targeting“ von EndoTAG®-2 zeigten, dass eine liposomale Enkapsulierung von Camptothecin in kationische Liposomen die Bindungseigenschaften der kationischen Liposomen an das aktivierte Tumorendothel nicht verändert. Am Modell der transparenten Rückenhautkammer mit dem A-Mel-3 Tumor konnte mittels quantitativer Fluoreszenzmakroskopie über einen Zeitraum von sechs Stunden eine selektive Anreicherung von fluoreszenzmarkierten EndoTAG®-2 im Tumor beobachtet werden. Ebenso zeigten histologische Aufnahmen subkutaner LLC-1 Tumore eine deutlich erhöhte Anreicherung von fluoreszenzmarkiertem EndoTAG®-2 im Blutgefäßkompartiment ohne Extravasation in das Tumorinterstitium. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass nach systemischer Applikation von EndoTAG®-2 eine antivaskuläre Tumorthherapie möglich wäre, da Camptothecin in dieser Formulierung effektiv und mit hoher Konzentration an die angiogenetisch aktiven Tumorendothelzellen und nicht an die Tumorzellen selbst transportiert wurde.

Eine Tumorwachstumsstudie an subkutanen LLC-1 Tumoren sollte anschließend die therapeutische Effizienz von EndoTAG®-2 im Vergleich zu freiem Camptothecin und unbeladenen kationischen Liposomen aufzeigen.

Bereits eine zweimalige Behandlung mit EndoTAG®-2 führte zu einer signifikanten Wachstumsverzögerung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Wohingegen eine Behandlung mit freiem Camptothecin erst am Ende der Studie eine Wachstumsverzögerung bewirkte. Der beste therapeutische Effekt, eine Reduktion der Tumorgröße um 81 % im Vergleich zur Kontrollgruppe, war jedoch am Studienende nur durch eine Therapie mit EndoTAG®-2 erkennbar.

Eine CD31-Immunhistologie der LLC-1 Tumore der Wachstumsstudie sollte Aufschlüsse über Veränderungen der Tumolvaskularisierung geben. Die quantitative Auswertung der CD31-Immunhistologie zeigte, dass es durch eine Behandlung mit freiem Camptothecin oder kationischen Liposomen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer geringen Reduktion der Gefäßdichte kam. Eine EndoTAG®-2 Therapie führte dagegen zur signifikanten Reduktion der intratumorale Gefäßdichte um 48 %.

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie am Modell der transparenten Rückenhautkammer sollte der Wirkmechanismus von EndoTAG®-2 während der Tumorangiogenese des A-Mel-3 Tumors aufgeklärt werden. Die EndoTAG®-2 Therapie führte zu einer Destruktion des Tumorblutgefäßsystems. Die Analyse der mikrohäodynamischen Parameter deuteten auf eine starke Schädigung der Mikrozirkulation durch EndoTAG®-2 hin. Es kam zu einer signifikanten Reduktion der funktionellen Gefäßdichte und das Gefäßnetzwerk zeigte deutliche Rarifizierungen mit nichtperfundierten Tumorbereichen. Die Tumorgefäßdurchmesser und die Erythrozytenfließgeschwindigkeit waren bedeutsam geringer als die der Kontrollgruppe. Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex, ein Maß für die Durchblutung eines Tumors, war ebenfalls signifikant erniedrigt.

Molekularbiologische Untersuchungen der LLC-1 Tumore sollten klären, ob die EndoTAG®-2 Therapie zu einer wesentlichen Veränderung der Regulation angiogener Wachstumsfaktoren führt. Untersuchungen mittels RT-PCR konnten zeigen, dass keine kompensatorische Hochregulation des Wachstumsfaktors VEGF oder seiner Rezeptoren erfolgt.

All diese Ergebnisse lassen darauf schließen, das EndoTAG®-2 antivaskuläre Eigenschaften besitzt und eine neuartige Camptothecin Formulierung darstellt, um eine antivaskuläre Tumorthherapie zu verwirklichen.

VI. Literaturverzeichnis

- Abels C, Szeimies RM, Steinbach P, Richert C, Goetz AE (1997) Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphycene. *J Photochem Photobiol B* 40: 305-312
- Abu-Lila A, Suzuki T, Doi Y, Ishida T, Kiwada H (2009) Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model. *J Control Release* 134: 18-25
- Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M (2000) Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 96: 2240-2245
- Ahmad T, Gore M (2004) Review of the use of topotecan in ovarian carcinoma. *Expert Opin Pharmacother* 5: 2333-2340
- Alessi P, Ebbinghaus C, Neri D (2004) Molecular targeting of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1654: 39-49
- Amano H, Hayashi I, Endo H, Kitasato H, Yamashina S, Maruyama T, Kobayashi M, Satoh K, Narita M, Sugimoto Y, Murata T, Yoshimura H, Narumiya S, Majima M (2003) Host prostaglandin E(2)-EP3 signaling regulates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *J Exp Med* 197: 221-232
- Ambati BK, Jousen AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, Gillies S, O'Reilly MS, Adamis AP (2002) Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 120: 1063-1068
- Ardizzoni A, Hansen H, Dombernowsky P, Gamucci T, Kaplan S, Postmus P, Giaccone G, Schaefer B, Wanders J, Verweij J (1997) Topotecan, a new active drug in the second-line treatment of small-cell lung cancer: a phase II study in patients with refractory and sensitive disease. The European Organization for Research and Treatment of Cancer Early Clinical Studies Group and New Drug Development Office, and the Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 15: 2090-2096

- Armstrong D, O'Reilly S (1998) Clinical Guidelines for Managing Topotecan-Related Hematologic Toxicity. *Oncologist* 3: 4-10
- Armstrong DK, Spriggs D, Levin J, Poulin R, Lane S (2005) Hematologic safety and tolerability of topotecan in recurrent ovarian cancer and small cell lung cancer: an integrated analysis. *Oncologist* 10: 686-694
- Asaishi K, Endrich B, Gotz A, Messmer K (1981) Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res* 41: 1898-1904
- Auerbach W, Auerbach R (1994) Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther* 63: 265-311
- Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 16: 901-906
- Baker M, Wayland H (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* 7: 131-143
- Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D (2003) Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111: 1287-1295
- Bertram JS, Janik P (1980) Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett* 11: 63-73
- Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390: 404-407
- Borgstrom P, Hughes GK, Hansell P, Wolitsky BA, Sriramarao P (1997) Leukocyte adhesion in angiogenic blood vessels. Role of E-selectin, P-selectin, and beta2 integrin in lymphotoxin-mediated leukocyte recruitment in tumor microvessels. *J Clin Invest* 99: 2246-2253
- Borgstrom P, Torres F, I, Hartley-Asp B (1995) Inhibition of angiogenesis and metastases of the Lewis-lung cell carcinoma by the quinoline-3-carboxamide, Linomide. *Anticancer Res* 15: 719-728

Botzlar, A. Effekte stromafreier Hämoglobinlösungen auf die Mikrozirkulation im quergestreiften Rückenhautmuskel beim Hamster. 2003. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresh DA (1998) Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92: 391-400

Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM, Dvorak HF (1997) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS* 79: 233-269

Burke TG, Mishra AK, Wani MC, Wall ME (1993) Lipid bilayer partitioning and stability of camptothecin drugs. *Biochemistry* 32: 5352-5364

Burrows FJ, Thorpe PE (1994) Vascular targeting--a new approach to the therapy of solid tumors. *Pharmacol Ther* 64: 155-174

Campbell RB, Fukumura D, Brown EB, Mazzola LM, Izumi Y, Jain RK, Torchilin VP, Munn LL (2002) Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. *Cancer Res* 62: 6831-6836

Campbell RB, Ying B, Kuesters GM, Hemphill R (2009) Fighting cancer: from the bench to bedside using second generation cationic liposomal therapeutics. *J Pharm Sci* 98: 411-429

Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH (1970) Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 2: 67-76

Cersosimo RJ (1998) Irinotecan: a new antineoplastic agent for the management of colorectal cancer. *Ann Pharmacother* 32: 1324-1333

Charonis AS, Wissig SL (1983) Anionic sites in basement membranes. Differences in their electrostatic properties in continuous and fenestrated capillaries. *Microvasc Res* 25: 265-285

Clark RA, DellaPelle P, Manseau E, Lanigan JM, Dvorak HF, Colvin RB (1982) Blood vessel fibronectin increases in conjunction with endothelial cell proliferation and capillary ingrowth during wound healing. *J Invest Dermatol* 79: 269-276

Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84: 1470-1478

COURTICE FC (1962) Lipoprotein transport across the vascular endothelium. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 139: 371-379

Curnis F, Sacchi A, Corti A (2002) Improving chemotherapeutic drug penetration in tumors by vascular targeting and barrier alteration. *J Clin Invest* 110: 475-482

D'Amore PA, Thompson RW (1987) Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 49: 453-464

Dass CR (2003) Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumour vasculature. *Int J Pharm* 267: 1-12

Dellian M, Abels C, Kuhnle GE, Goetz AE (1995) Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium interaction: differences between normal and tumour tissue. *Br J Cancer* 72: 1125-1130

Dellian M, Eichhorn ME, Strieth S (2002) [Antivascular strategies--a new concept for diagnosis and therapy of head and neck cancer. A review]. *Laryngorhinootologie* 81: 509-515

Dellian M, Walenta S, Gamarra F, Kuhnle GE, Mueller-Klieser W, Goetz AE (1994) High-energy shock waves enhance hyperthermic response of tumors: effects on blood flow, energy metabolism, and tumor growth. *J Natl Cancer Inst* 86: 287-293

Dellian M, Walenta S, Kuhnle GE, Gamarra F, Mueller-Klieser W, Goetz AE (1993) Relation between autoradiographically measured blood flow and ATP concentrations obtained from imaging bioluminescence in tumors following hyperthermia. *Int J Cancer* 53: 785-791

Dellian M, Witwer BP, Salehi HA, Yuan F, Jain RK (1996) Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, and host microenvironment. *Am J Pathol* 149: 59-71

Denekamp J (1982) Endothelial cell proliferation as a novel approach to targeting tumour therapy. *Br J Cancer* 45: 136-139

- Denekamp J (1984) Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* 23: 217-225
- Denekamp J (1999) The tumour microcirculation as a target in cancer therapy: a clearer perspective. *Eur J Clin Invest* 29: 733-736
- Denekamp J, Hobson B (1982) Endothelial-cell proliferation in experimental tumours. *Br J Cancer* 46: 711-720
- Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47: 149-161
- Djonov V, Andres AC, Ziemiecki A (2001) Vascular remodelling during the normal and malignant life cycle of the mammary gland. *Microsc Res Tech* 52: 182-189
- Duerr S, Wendler O, Aigner T, Karosi S, Schick B (2008) Metalloproteinases in juvenile angiofibroma--a collagen rich tumor. *Hum Pathol* 39: 259-268
- Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, Dvorak AM (1988) Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 133: 95-109
- Eichhorn ME, Becker S, Strieth S, Werner A, Sauer B, Teifel M, Ruhstorfer H, Michaelis U, Griebel J, Brix G, Jauch KW, Dellian M (2006) Paclitaxel encapsulated in cationic lipid complexes (MBT-0206) impairs functional tumor vascular properties as detected by dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer Biol Ther* 5: 89-96
- Eichhorn ME, Ischenko I, Luedemann S, Strieth S, Papyan A, Werner A, Bohnenkamp H, Guenzi E, Preissler G, Michaelis U, Jauch KW, Bruns CJ, Dellian M (2010) Vascular targeting by EndoTAG-1 enhances therapeutic efficacy of conventional chemotherapy in lung and pancreatic cancer. *Int J Cancer* 126: 1235-1245
- Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ (2007a) Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg* 392: 371-379
- Eichhorn ME, Luedemann S, Strieth S, Papyan A, Ruhstorfer H, Haas H, Michaelis U, Sauer B, Teifel M, Enders G, Brix G, Jauch KW, Bruns CJ, Dellian M (2007b) Cationic Lipid Complexed Camptothecin (EndoTAG((R))-2) Improves Antitumoral Efficacy by Tumor Vascular Targeting. *Cancer Biol Ther* 6: 920-929

- Eichhorn ME, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M (2004) Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis* 7: 133-141
- Eliceiri BP, Cheresh DA (2000) Role of alpha v integrins during angiogenesis. *Cancer J* 6 Suppl 3: S245-S249
- Endrich B, Asaishi K, Gotz A, Messmer K (1980) Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125-134
- Endrich B, Goetz A, Messmer K (1982a) Distribution of microflow and oxygen tension in hamster melanoma. *Int J Microcirc Clin Exp* 1: 81-99
- Endrich B, Hammersen F, Gotz A, Messmer K (1982b) Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amelanotic melanoma A-Mel-3. *J Natl Cancer Inst* 68: 475-485
- Endrich B, Hammersen F, Messmer K (1988) Capillary ultrastructure and microcirculatory function of malignant tumors. *Adv Exp Med Biol* 242: 205-214
- Endrich B, Messmer K (1981) Microcirculation of transplanted tumors. *Arzneimittelforschung* 31: 2007-2011
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Staehler M, Negrier S, Chevreau C, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Anderson S, Hofilena G, Shan M, Pena C, Lathia C, Bukowski RM (2009) Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *J Clin Oncol* 27: 3312-3318
- Fang J, Sawa T, Maeda H (2003) Factors and mechanism of "EPR" effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including SMANCS. *Adv Exp Med Biol* 519: 29-49
- Fassberg J, Stella VJ (1992) A kinetic and mechanistic study of the hydrolysis of camptothecin and some analogues. *J Pharm Sci* 81: 676-684
- Fears CY, Gladson CL, Woods A (2006) Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 281: 14533-14536

- Ferrara N (2002) Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol* 29: 10-14
- Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy. *Oncologist* 9 Suppl 1: 2-10
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669-676
- Findlay JK (1986) Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol* 111: 357-366
- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 285: 1182-1186
- Folkman J (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 82: 4-6
- Folkman J (1995a) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1: 27-31
- Folkman J (1995b) Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol Med* 1: 120-122
- Folkman J (1997) Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. *EXS* 79: 1-8
- Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol Chem* 267: 10931-10934
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339: 58-61
- FORTNER JG, MAHY AG, SCHRODT GR (1961) Transplantable tumors of the Syrian (golden) hamster. I. Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas. *Cancer Res* 21(6)Pt 2: 161-198
- Franke N, Endrich B (1983) [Effects of halothane and enflurane on the microcirculation]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 18: 285-290
- Franke N, Endrich B, Laubenthal H, Peter K, Messmer K (1982) [The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 17: 11-14

Fritsch, C. Natrium-Fluoreszein-Fluxmetrie im amelanotischen Melanom des Hamsters A-Mel-3 vor und nach photodynamischer Therapie. 1996. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ref Type: Thesis/Dissertation

Funk W, Endrich B, Messmer K (1986) A novel method for follow-up studies of the microcirculation in non-malignant tissue implants. *Res Exp Med (Berl)* 186: 259-270

Funk W, Endrich B, Messmer K, Intaglietta M (1983) Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance. *Int J Microcirc Clin Exp* 2: 11-25

Furman WL, Stewart CF, Poquette CA, Pratt CB, Santana VM, Zamboni WC, Bowman LC, Ma MK, Hoffer FA, Meyer WH, Pappo AS, Walter AW, Houghton PJ (1999) Direct translation of a protracted irinotecan schedule from a xenograft model to a phase I trial in children. *J Clin Oncol* 17: 1815-1824

Gamarra F, Spelsberg F, Kuhnle GE, Goetz AE (1993) High-energy shock waves induce blood flow reduction in tumors. *Cancer Res* 53: 1590-1595

Garcia-Carbonero R, Supko JG (2002) Current perspectives on the clinical experience, pharmacology, and continued development of the camptothecins. *Clin Cancer Res* 8: 641-661

Gerlowski LE, Jain RK (1986) Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* 31: 288-305

Gill PS, Espina BM, Muggia F, Cabriaes S, Tulpule A, Esplin JA, Liebman HA, Forssen E, Ross ME, Levine AM (1995) Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J Clin Oncol* 13: 996-1003

Giovanella BC, Harris N, Mendoza J, Cao Z, Liehr J, Stehlin JS (2000) Dependence of anticancer activity of camptothecins on maintaining their lactone function. *Ann N Y Acad Sci* 922: 27-35

Goetz, A. Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3. 1987. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ref Type: Thesis/Dissertation

- Goetz A, Deininger FD, Conzen P, Brendel W (1987) Effects of FPL 55712 on leukotriene C4/leukotriene D4-induced vasoconstriction and macromolecular permeability. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B: 651-656
- Gokhale PC, Radhakrishnan B, Husain SR, Abernethy DR, Sacher R, Dritschilo A, Rahman A (1996) An improved method of encapsulation of doxorubicin in liposomes: pharmacological, toxicological and therapeutic evaluation. *Br J Cancer* 74: 43-48
- Goodman VL, Rock EP, Dagher R, Ramchandani RP, Abraham S, Gobburu JV, Booth BP, Verbois SL, Morse DE, Liang CY, Chidambaram N, Jiang JX, Tang S, Mahjoob K, Justice R, Pazdur R (2007) Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 1367-1373
- Gottlieb JA, Guarino AM, Call JB, Oliverio VT, Block JB (1970) Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). *Cancer Chemother Rep* 54: 461-470
- Greish K, Fang J, Inutsuka T, Nagamitsu A, Maeda H (2003) Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. *Clin Pharmacokinet* 42: 1089-1105
- Griffioen AW, Molema G (2000) Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52: 237-268
- Guidi AJ, Abu-Jawdeh G, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Dvorak HF, Brown LF (1995) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 87: 1237-1245
- Gupta MK, Qin RY (2003) Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 9: 1144-1155
- Hammersen F, Endrich B, Messmer K (1985) The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int J Microcirc Clin Exp* 4: 31-43

- Hammersen F, Hammersen E (1983) The structural reaction pattern of endothelial cells to injurious stimuli. *Agents Actions* 13: 442-450
- Hammes HP, Brownlee M, Jonczyk A, Sutter A, Preissner KT (1996) Subcutaneous injection of a cyclic peptide antagonist of vitronectin receptor-type integrins inhibits retinal neovascularization. *Nat Med* 2: 529-533
- Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364
- Harris AG, Sinitsina I, Messmer K (2002) Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res* 7: 117-124
- Hertzberg RP, Caranfa MJ, Hecht SM (1989a) On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex. *Biochemistry* 28: 4629-4638
- Hertzberg RP, Caranfa MJ, Holden KG, Jakas DR, Gallagher G, Mattern MR, Mong SM, Bartus JO, Johnson RK, Kingsbury WD (1989b) Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem* 32: 715-720
- Hicklin DJ, Ellis LM (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 23: 1011-1027
- Hinnen P, Eskens FA (2007) Vascular disrupting agents in clinical development. *Br J Cancer* 96: 1159-1165
- Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP, Jain RK (1998) Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4607-4612
- Hobson B, Denekamp J (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br J Cancer* 49: 405-413
- Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J (1995) Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1: 149-153

- Houghton PJ, Cheshire PJ, Hallman JD, Lutz L, Friedman HS, Danks MK, Houghton JA (1995) Efficacy of topoisomerase I inhibitors, topotecan and irinotecan, administered at low dose levels in protracted schedules to mice bearing xenografts of human tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 36: 393-403
- Hsiang YH, Hertzberg R, Hecht S, Liu LF (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem* 260: 14873-14878
- Hsiang YH, Liu LF (1988) Identification of mammalian DNA topoisomerase I as an intracellular target of the anticancer drug camptothecin. *Cancer Res* 48: 1722-1726
- Hunt TK, Knighton DR, Thakral KK, Goodson WH, III, Andrews WS (1984) Studies on inflammation and wound healing: angiogenesis and collagen synthesis stimulated in vivo by resident and activated wound macrophages. *Surgery* 96: 48-54
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E, Ferrara N, Fyfe G, Rogers B, Ross R, Kabbinavar F (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342
- Hurwitz H, Saini S (2006) Bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer: safety profile and management of adverse events. *Semin Oncol* 33: S26-S34
- Ikegami T, Ha L, Arimori K, Latham P, Kobayashi K, Ceryak S, Matsuzaki Y, Bouscarel B (2002) Intestinal alkalization as a possible preventive mechanism in irinotecan (CPT-11)-induced diarrhea. *Cancer Res* 62: 179-187
- Intaglietta M, Messmer K (1983) Microangiodynamics, peripheral vascular resistance and the normal microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 2: 3-10
- Iozzo RV, San Antonio JD (2001) Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 108: 349-355
- Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, Kikuchi H, Kitagawa T (2000) Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *J Control Release* 69: 139-148
- Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H (2006) Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug Discov Today* 11: 812-818

- Jain RK (1998) The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. *Nat Med* 4: 655-657
- Jung LL, Zamboni WC (2001) Cellular, pharmacokinetic, and pharmacodynamic aspects of response to camptothecins: can we improve it? *Drug Resist Updat* 4: 273-288
- Kakizawa H, Itoh M, Itoh Y, Imamura S, Ishiwata Y, Matsumoto T, Yamamoto K, Kato T, Ono Y, Nagata M, Hayakawa N, Suzuki A, Goto Y, Oda N (2004) The relationship between glycemic control and plasma vascular endothelial growth factor and endothelin-1 concentration in diabetic patients. *Metabolism* 53: 550-555
- Kalra AV, Campbell RB (2006) Development of 5-FU and doxorubicin-loaded cationic liposomes against human pancreatic cancer: Implications for tumor vascular targeting. *Pharm Res* 23: 2809-2817
- Kane RC, Farrell AT, Saber H, Tang S, Williams G, Jee JM, Liang C, Booth B, Chidambaram N, Morse D, Sridhara R, Garvey P, Justice R, Pazdur R (2006) Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 12: 7271-7278
- Kerbel RS (1991) Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 13: 31-36
- Kerbel RS (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21: 505-515
- Kerbel RS, Vitoria-Petit A, Klement G, Rak J (2000) 'Accidental' anti-angiogenic drugs. anti-oncogene directed signal transduction inhibitors and conventional chemotherapeutic agents as examples. *Eur J Cancer* 36: 1248-1257
- Kerbel RS, Vitoria-Petit A, Okada F, Rak J (1998) Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol Med* 4: 286-295
- Klagsbrun M, Moses MA (1999) Molecular angiogenesis. *Chem Biol* 6: R217-R224
- Klenke FM, Abdollahi A, Bertl E, Gebhard MM, Ewerbeck V, Huber PE, Sckell A (2007) Tyrosine kinase inhibitor SU6668 represses chondrosarcoma growth via antiangiogenesis in vivo. *BMC Cancer* 7: 49

- Klyscz T, Junger M, Jung F, Zeintl H (1997) [Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy]. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175
- Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M (2003) Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int J Cancer* 105: 561-567
- Krystal GW, Honsawek S, Kiewlich D, Liang C, Vasile S, Sun L, McMahon G, Lipson KE (2001) Indolinone tyrosine kinase inhibitors block Kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 61: 3660-3668
- Kübler, WM. In-vivo Analyse der Leukozyten-Kinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation. 1997. Med.Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Kunstfeld R, Wickenhauser G, Michaelis U, Teifel M, Umek W, Naujoks K, Wolff K, Petzelbauer P (2003) Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a "humanized" SCID mouse model. *J Invest Dermatol* 120: 476-482
- Langer S, Sinitsina I, Biberthaler P, Krombach F, Messmer K (2002) Revascularization of transplanted adipose tissue: a study in the dorsal skinfold chamber of hamsters. *Ann Plast Surg* 48: 53-59
- Lasic DD (1996) Doxorubicin in sterically stabilized liposomes. *Nature* 380: 561-562
- Lee DH, Kim SW, Suh C, Lee JS, Lee JH, Lee SJ, Ryoo BY, Park K, Kim JS, Heo DS, Kim NK (2008) Belotecan, new camptothecin analogue, is active in patients with small-cell lung cancer: results of a multicenter early phase II study. *Ann Oncol* 19: 123-127
- Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143: 1055-1062
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309

- Leunig M, Goetz AE, Gamarra F, Zetterer G, Messmer K, Jain RK (1994) Photodynamic therapy-induced alterations in interstitial fluid pressure, volume and water content of an amelanotic melanoma in the hamster. *Br J Cancer* 69: 101-103
- Leunig M, Messmer K (2001) Skin fold chamber models. In *Tumor angiogenesis and microcirculation*, Voest EE, D'Amore PA (eds) pp 143-155. Marcel Dekker: New York, Basel
- Leunig M, Yuan F, Menger MD, Boucher Y, Goetz AE, Messmer K, Jain RK (1992) Angiogenesis, microvascular architecture, microhemodynamics, and interstitial fluid pressure during early growth of human adenocarcinoma LS174T in SCID mice. *Cancer Res* 52: 6553-6560
- Litz J, Sakuntala Warshamana-Greene G, Sulanke G, Lipson KE, Krystal GW (2004) The multi-targeted kinase inhibitor SU5416 inhibits small cell lung cancer growth and angiogenesis, in part by blocking Kit-mediated VEGF expression. *Lung Cancer* 46: 283-291
- Liu SY, Hwang BD, Liu ZC, Cheng YC (1989) Interaction of several nucleoside triphosphate analogues and 10-hydroxycamptothecin with human DNA topoisomerases. *Cancer Res* 49: 1366-1370
- Liu W, Saint DA (2002) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal Biochem* 302: 52-59
- Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release* 114: 100-109
- Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K (2000) Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* 65: 271-284
- Manegold, P. C. Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel der Blutgefäße von Tumoren im Verlauf der Tumorangiogenese. 2003. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
- Manegold PC, Hutter J, Pahernik SA, Messmer K, Dellian M (2003) Platelet-endothelial interaction in tumor angiogenesis and microcirculation. *Blood* 101: 1970-1976

- Matsumoto M, Nishinakagawa H, Kurohmaru M, Hayashi Y, Otsuka J (1992) Pregnancy and lactation affect the microvasculature of the mammary gland in mice. *J Vet Med Sci* 54: 937-943
- Matsumura Y, Maeda H (1986) A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 46: 6387-6392
- Mattern J, Kallinowski F, Herfarth C, Volm M (1996) Association of resistance-related protein expression with poor vascularization and low levels of oxygen in human rectal cancer. *Int J Cancer* 67: 20-23
- Mauceri HJ, Hanna NN, Beckett MA, Gorski DH, Staba MJ, Stellato KA, Bigelow K, Heimann R, Gately S, Dhanabal M, Soff GA, Sukhatme VP, Kufe DW, Weichselbaum RR (1998) Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. *Nature* 394: 287-291
- Mauceri HJ, Seetharam S, Beckett MA, Schumm LP, Koons A, Gupta VK, Park JO, Manan A, Lee JY, Montag AG, Kufe DW, Weichselbaum RR (2002) Angiostatin potentiates cyclophosphamide treatment of metastatic disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 50: 412-418
- Mazumder A (1981) Effect of liposome-entrapped 5-fluorouracil on Ehrlich ascites tumour bearing mice. *Indian J Biochem Biophys* 18: 120-123
- McDonald DM, Baluk P (2002) Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 62: 5381-5385
- McLean JW, Fox EA, Baluk P, Bolton PB, Haskell A, Pearlman R, Thurston G, Umemoto EY, McDonald DM (1997) Organ-specific endothelial cell uptake of cationic liposome-DNA complexes in mice. *Am J Physiol* 273: H387-H404
- Menger MD, Hammersen F, Walter P, Messmer K (1990) Neovascularization of prosthetic vascular grafts. Quantitative analysis of angiogenesis and microhemodynamics by means of intravital microscopy. *Thorac Cardiovasc Surg* 38: 139-145

- Menger MD, Vajkoczy P, Leiderer R, Jager S, Messmer K (1992) Influence of experimental hyperglycemia on microvascular blood perfusion of pancreatic islet isografts. *J Clin Invest* 90: 1361-1369
- Miller CR, Bondurant B, McLean SD, McGovern KA, O'Brien DF (1998) Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes. *Biochemistry* 37: 12875-12883
- Miller FN, Sims DE, Schuschke DA, Abney DL (1992) Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc Res* 44: 166-184
- Modlich U, Kaup FJ, Augustin HG (1996) Cyclic angiogenesis and blood vessel regression in the ovary: blood vessel regression during luteolysis involves endothelial cell detachment and vessel occlusion. *Lab Invest* 74: 771-780
- Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM (2002) Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 160: 985-1000
- Motzer RJ, Michaelson MD, Rosenberg J, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, Redman BG, Margolin KA, Wilding G (2007) Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma. *J Urol* 178: 1883-1887
- Muggia FM, Creaven PJ, Hansen HH, Cohen MH, Selawry OS (1972) Phase I clinical trial of weekly and daily treatment with camptothecin (NSC-100880): correlation with preclinical studies. *Cancer Chemother Rep* 56: 515-521
- Neri D, Bicknell R (2005) Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 5: 436-446
- Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E, Messmer K (1997) Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 130: 314-327
- Nolte D, Menger MD, Messmer K (1995a) Microcirculatory models of ischaemia-reperfusion in skin and striated muscle. *Int J Microcirc Clin Exp* 15 Suppl 1: 9-16
- Nolte D, Pickelmann S, Lang M, Keipert P, Messmer K (2000) Compatibility of different colloid plasma expanders with perflubron emulsion: an intravital microscopic study in the hamster. *Anesthesiology* 93: 1261-1270

- Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K (1995b) Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 244-249
- Nussbaum, C. F. Funktion von Thrombozyten bei antivaskulärer Tumorthherapie durch Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen. 2008. Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ref Type: Thesis/Dissertation
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79: 315-328
- Oda T, Lehmann A, Endrich B (1984) Capillary blood flow in the amelanotic melanoma of the hamster after isovolemic hemodilution. *Biorheology* 21: 509-520
- Ohira T, Ohe Y, Saijo N (1992) [Induction of tumor immunity by cytokine cDNA transfected Lewis lung carcinoma]. *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 30 Suppl: 48-51
- Ohta M, Konno H, Tanaka T, Baba M, Kamiya K, Oba K, Kaneko T, Syouji T, Igarashi A, Nakamura S (2001) Effect of combination therapy with matrix metalloproteinase inhibitor MMI-166 and mitomycin C on the growth and liver metastasis of human colon cancer. *Jpn J Cancer Res* 92: 688-695
- Paleolog EM (2002) Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 Suppl 3: S81-S90
- Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D (1996) Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2002-2007
- Prat A, Casado E, Cortes J (2007) New approaches in angiogenic targeting for colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 13: 5857-5866
- Prontera C, Mariani B, Rossi C, Poggi A, Rotilio D (1999) Inhibition of gelatinase A (MMP-2) by batimastat and captopril reduces tumor growth and lung metastases in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Int J Cancer* 81: 761-766
- Rak J, Yu JL, Kerbel RS, Coomber BL (2002) What do oncogenic mutations have to do with angiogenesis/vascular dependence of tumors? *Cancer Res* 62: 1931-1934

- Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS (2000) Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Invest Dermatol Symp Proc* 5: 24-33
- Ran S, Downes A, Thorpe PE (2002) Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res* 62: 6132-6140
- Ran S, Thorpe PE (2002) Phosphatidylserine is a marker of tumor vasculature and a potential target for cancer imaging and therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 54: 1479-1484
- Richardson DS, Kelsey SM, Johnson SA, Tighe M, Cavenagh JD, Newland AC (1997) Early evaluation of liposomal daunorubicin (DaunoXome, Nexstar) in the treatment of relapsed and refractory lymphoma. *Invest New Drugs* 15: 247-253
- Rieder G, Hatz RA, Moran AP, Walz A, Stolte M, Enders G (1997) Role of adherence in interleukin-8 induction in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Infect Immun* 65: 3622-3630
- Roberts WG, Palade GE (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res* 57: 765-772
- Rovainen CM, Woolsey TA, Blocher NC, Wang DB, Robinson OF (1993) Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 359-371
- Sadzuka Y, Hirotsu S, Hirota S (1998) Effect of liposomalization on the antitumor activity, side-effects and tissue distribution of CPT-11. *Cancer Lett* 127: 99-106
- Sadzuka Y, Hirotsu S, Hirota S (1999) Effective irinotecan (CPT-11)-containing liposomes: intraliposomal conversion to the active metabolite SN-38. *Jpn J Cancer Res* 90: 226-232
- Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF (1997) Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45: 505-513
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press: Cold Spring Harbour, N.Y.

Schaeppli U, Fleischman RW, Cooney DA (1974) Toxicity of camptothecin (NSC-100880). *Cancer Chemother Rep* 3 5: 25-36

Schmid-Schoenbein GW, Zweifach BW, Kovalcheck S (1977) The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc Res* 14: 303-317

Schmitt-Sody M, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M (2003) Neovascular targeting therapy: paclitaxel encapsulated in cationic liposomes improves antitumoral efficacy. *Clin Cancer Res* 9: 2335-2341

Scott LJ (2007) Bevacizumab: in first-line treatment of metastatic breast cancer. *Drugs* 67: 1793-1799

Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP, Papadopoulos-Sergiou A, Peruzzi CA, Detmar M (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* 149: 293-305

Sengupta S, Tyagi P, Chandra S, Kochupillai V, Gupta SK (2001) Encapsulation in cationic liposomes enhances antitumour efficacy and reduces the toxicity of etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Pharmacology* 62: 163-171

Sewell IA (1966) Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J Anat* 100: 839-856

Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359: 843-845

Skinner SA, Frydman GM, O'Brien PE (1995) Microvascular structure of benign and malignant tumors of the colon in humans. *Dig Dis Sci* 40: 373-384

Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K (2000) Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298

Strelczyk, D. Einfluss statischer Magnetfelder auf die Mikrozirkulation in gesundem und malignem Gewebe sowie auf Tumorwachstum und Angiogenese. 2009.

Ref Type: Thesis/Dissertation

- Strieth S, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M (2004) Neovascular targeting chemotherapy: encapsulation of paclitaxel in cationic liposomes impairs functional tumor microvasculature. *Int J Cancer* 110: 117-124
- Strieth S, Eichhorn ME, Werner A, Sauer B, Teifel M, Michaelis U, Berghaus A, Dellian M (2008a) Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes increases tumor microvessel leakiness and improves therapeutic efficacy in combination with Cisplatin. *Clin Cancer Res* 14: 4603-4611
- Strieth S, Nussbaum CF, Eichhorn ME, Fuhrmann M, Teifel M, Michaelis U, Berghaus A, Dellian M (2008b) Tumor-selective vessel occlusions by platelets after vascular targeting chemotherapy using paclitaxel encapsulated in cationic liposomes. *Int J Cancer* 122: 452-460
- Strieth S, Weger T, Bartsch C, Bittmann P, Stelter K, Berghaus A (2010) Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF. *J Biomed Mater Res A* 93: 1566-1573
- Stuart DD, Kao GY, Allen TM (2000) A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Ther* 7: 466-475
- Sutherland RM, Rasey JS, Hill RP (1988) Tumor biology. *Am J Clin Oncol* 11: 253-274
- Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T (1996) Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 56: 3004-3009
- Szoka F, Olson F, Heath T, Vail W, Mayhew E, Papahadjopoulos D (1980) Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μmol) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta* 601: 559-571
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 2917-2921

- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65: 550-563
- Tardi P, Choice E, Masin D, Redelmeier T, Bally M, Madden TD (2000) Liposomal encapsulation of topotecan enhances anticancer efficacy in murine and human xenograft models. *Cancer Res* 60: 3389-3393
- Teicher BA, Alvarez E, Mendelsohn LG, Ara G, Menon K, Ways DK (1999) Enzymatic rationale and preclinical support for a potent protein kinase C beta inhibitor in cancer therapy. *Adv Enzyme Regul* 39: 313-327
- Teicher BA, Holden SA, Ara G, Korbut T, Menon K (1996) Comparison of several antiangiogenic regimens alone and with cytotoxic therapies in the Lewis lung carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 38: 169-177
- Teicher BA, Menon K, Alvarez E, Galbreath E, Shih C, Faul MM (2001) Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in murine lewis lung carcinoma and human Calu-6 non-small-cell lung carcinoma xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 48: 473-480
- Thompson J, Zamboni WC, Cheshire PJ, Lutz L, Luo X, Li Y, Houghton JA, Stewart CF, Houghton PJ (1997) Efficacy of systemic administration of irinotecan against neuroblastoma xenografts. *Clin Cancer Res* 3: 423-431
- Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM (1998) Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J Clin Invest* 101: 1401-1413
- Tomayko MM, Reynolds CP (1989) Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 24: 148-154
- Tonnesen MG, Feng X, Clark RA (2000) Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 5: 40-46
- Torchilin VP (2005) Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov* 4: 145-160

- Vajkoczy P, Schilling L, Ullrich A, Schmiedek P, Menger MD (1998) Characterization of angiogenesis and microcirculation of high-grade glioma: an intravital multifluorescence microscopic approach in the athymic nude mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 510-520
- Verma RP, Hansch C (2009) Camptothecins: a SAR/QSAR study. *Chem Rev* 109: 213-235
- Verweij J (1995) Topoisomerase I inhibitors and other new cytotoxic drugs. *Eur J Cancer* 31A: 828-830
- Vincent S, DePace D, Finkelstein S (1988) Distribution of anionic sites on the capillary endothelium in an experimental brain tumor model. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 4: 45-67
- Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD (2001) In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* 159: 1661-1670
- von Johnston, V. Ein neues Tiermodell zur Analyse von Angiogenese und endokriner Funktion bei Transplantation von humanem Nebenschilddrüsengewebe auf die athyme Nacktmaus in vivo. 2005. Ludwig-Maximilians-Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Wagner, C. Effekte von Diaspirin cross-linked Hemoglobin (DCLHbTM) auf die Mikrozirkulation und den Gewebe-pO₂ im Vergleich zu unterschiedlich lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten im validierten Rückenhautkammermodell am Syrischen Goldhamster. 2002. Ludwig-Maximilians-Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Wall ME, Wani MC, Cook CE, Palmer KH, McPhail AT, Sim GA (1966) Plant Antitumor Agents I. The Isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J Am Chem Soc* 88: 3888-3890
- Wang SY, Chen B, Zhan YQ, Xu WX, Li CY, Yang RF, Zheng H, Yue PB, Larsen SH, Sun HB, Yang X (2004) SU5416 is a potent inhibitor of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and blocks HGF-induced invasiveness of human HepG2 hepatoma cells. *J Hepatol* 41: 267-273

- Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J (1993) Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143: 401-409
- Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8
- Weiss N, Delius M, Gambihler S, Dirschedl P, Goetz A, Brendel W (1990) Influence of the shock wave application mode on the growth of A-Mel 3 and SSK2 tumors in vivo. *Ultrasound Med Biol* 16: 595-605
- Wu J, Lee A, Lu Y, Lee RJ (2007) Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes. *Int J Pharm* 337: 329-335
- Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL, McGreevey LS, Griffith DJ, Heinrich MC (2002) SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood* 100: 2941-2949
- Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J (2007) Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 49: 1015-1026
- Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK (1994) Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res* 54: 3352-3356
- Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K (1989) Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 8: 293-302

VII. Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Originalia

ME. Eichhorn, **S. Luedemann**, S. Strieth, A. Papyan, H. Ruhstorfer, H. Haas, U. Michaelis, B. Sauer, M. Teifel, G. Enders, G. Brix, KW. Jauch, CJ. Bruns, M. Dellian:
Cationic Lipid Complexed Camptothecin (EndoTAG®-2) Improves Antitumoral Efficacy by Tumor Vascular Targeting.
Cancer Biol Ther. 2007 June;6(6):920-9

Posterpräsentationen/Abstracts

S. Luedemann, M. Eichhorn, S. Strieth, B. Sauer, M. Teifel, M. Dellian:
Vascular targeting chemotherapy: Encapsulation of Camptothecin in cationic lipid complexes (EndoTag®-2) effectively impairs tumor growth and tumor vasculature.
First European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy (ECTA), Munich, Germany
(veröffentlicht in *Angiogenesis, Volume 7, Supplement 1 / March 2004*)

VIII. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung (im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, WBex) der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Marc Dellian und Herrn Dr. Martin Eichhorn durchgeführt.

Nach Beendigung der vorliegenden Arbeit gilt folgenden Personen mein besonderer Dank.

Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann danke ich herzlich für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung und seine anhaltende Freundschaft.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl bedanken, unter dessen Leitung ich die Arbeit am Institut abschließen durfte.

Herrn Prof. Dr. Marc Dellian, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und für das in mich gesetzte Vertrauen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Martin Eichhorn für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Mit seiner außergewöhnlichen fachlichen und menschlichen Kompetenz und seinem unermüdlichen Engagement unterstützte er mich zu jederzeit und gab mir Ansporn und Hilfe bei jeglichen Fragen und Problemen. Für die fortwährende Unterstützung weit über die Belange dieser Arbeit hinaus danke ich ihm von ganzem Herzen.

Auch allen medizinisch-technischen Assistenten des Instituts gebührt mein Dank, insbesondere Frau Christine Csapó für die Einarbeitung in die Zellkulturarbeiten und Frau Alke Schropp für die Einführung und Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Schnitte und Färbungen.

Herrn Prof. Dr. med. Georg Enders, Frau Claudia Fahney und Frau Bärbel Lorenz danke ich für die kompetente Mitarbeit bei den molekularbiologischen Techniken.

Herrn Dr. hum. biol. Jürgen Peters möchte ich mich für die stetige Beratung in allen statistischen Fragen bedanken.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern und (ehemaligen) Doktoranden des Instituts, die zur außergewöhnlich angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen und so meine Arbeit indirekt unterstützt haben.

Der Firma MediGene für die wissenschaftliche Kooperation und die zur Verfügungstellung der kationischen Liposomen, sowie für die finanzielle Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Dipl. Ing. Thomas Scheckinger, nicht nur für das Korrekturlesen, sondern auch für seinen stetigen Rückhalt.

Mein immerwährender, unermesslich großer Dank gilt meiner Mutti Elfi Lüdemann und meinem Bruder Lars Lüdemann für die ununterbrochene Unterstützung in allen Lebenslagen. Meinem Vati und Opi, die leider den Abschluss dieser Arbeit nicht miterleben durften, die mich aber in besonderer Weise geprägt haben.

Besonders Ihnen und meiner ganzen Familie ist diese Arbeit gewidmet.