

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

Funktion von Thrombozyten bei
antivaskulärer Tumorthherapie durch
Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen

Dissertation
Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claudia Franziska Nußbaum
aus
Kaufbeuren
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Marc Dellian
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard F. Becker
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Bernhard Heindl Priv. Doz. Dr. Jan Braess
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Sebastian Strieth
Dekan:	Prof. Dr. Dietrich Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	24.04.2008

Meiner Familie

	Seite
I	EINLEITUNG 1
1.	Das Tumorblutgefäßsystem 2
1.1	Tumorangiogenese 2
1.2	Besonderheiten der Tumorgefäße und der Tumormikrozirkulation 3
1.3	Die Rolle von Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation 5
2.	Antivaskuläre Therapiestrategien 6
2.1	Grundlagen antivaskulärer Therapien 6
2.2	<i>Vascular Targeting</i> mit kationischen Liposomen 8
2.3	Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG [®] -1) 9
3.	Hypothese und Zielsetzung 11
II	MATERIAL UND METHODIK 13
1.	Versuchstiere und Versuchstierhaltung 13
2.	Wirksubstanzen 13
2.1	Paclitaxel 13
2.2	Kationische Liposomen und liposomales Paclitaxel (EndoTAG [®] -1) 14
2.2.1	Synthese kationischer Liposomen und Enkapsulierung von Paclitaxel 14
2.2.2	Analyse der Liposomen 15
3.	Modelle und Methoden 15
3.1	Tumormodelle 15
3.1.1	Tumore 16
3.1.1.1	Zellkultur 16
3.1.2	Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation 16
3.1.3	Das Modell der transparenten Rückenhautkammer 17
3.1.3.1	Kammerpräparation 18
3.1.3.2	Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer 19
3.1.3.3	Ausschlusskriterien 19
3.1.3.4	Makroskopische Dokumentation 20
3.1.4	Das subkutane Tumormodell 21
3.1.5	Venöser Zugang 21
3.2	<i>Ex vivo</i> Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten 21
3.2.1	Blutentnahme am Spendertier 22
3.2.2	Isolierung und Markierung der Thrombozyten 22
3.3	Durchflusszytometrie 23
3.4	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie 24

3.4.1	Fluoreszenzmarkierung von Dextran.....	24
3.4.2	Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes.....	25
3.4.3	Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und Videobildanalyse	26
3.5	Histologie.....	27
3.6	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	28
4.	Versuchsprotokolle	29
4.1	<i>In vitro</i> Versuche.....	29
4.1.1	Versuchsaufbau.....	29
4.1.2	Versuchsgruppen.....	30
4.1.3	Messparameter	30
4.2	<i>In vivo</i> Versuche mit akutem Versuchsablauf	30
4.2.1	Versuchsaufbau.....	31
4.2.2	Versuchsgruppen.....	32
4.2.3	Messparameter: Tumorwachstum und Mikrozirkulation.....	32
4.2.3.1	Tumorfläche	32
4.2.3.2	Gefäßdurchmesser.....	33
4.2.3.3	Funktionelle Gefäßdichte.....	33
4.2.3.4	Erythrozytenfließgeschwindigkeit	34
4.2.3.5	Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex.....	34
4.2.4	Messparameter: Thrombozyten-Endothelinteraktion	35
4.2.4.1	Thrombozytenflux.....	35
4.2.4.2	Thrombozytenadhärenz _{Gefäß}	35
4.3	<i>In vivo</i> Versuche mit chronischem Versuchsablauf.....	35
4.3.1	Versuchsaufbau.....	36
4.3.2	Versuchsgruppen.....	36
4.3.3	Messparameter	37
4.3.3.1	Thrombozytenadhärenz _{ROI}	37
4.3.3.2	Mikrothrombosen.....	37
4.4	Histologie/ Laser-Scanning-Mikroskopie.....	38
4.4.1	Versuchsablauf.....	38
4.4.2	Versuchsgruppen.....	39
5.	Darstellung der Ergebnisse und Statistik	39
III	ERGEBNISSE	40
1.	Ergebnisse der <i>in vitro</i> Versuche	40

2.	Ergebnisse der <i>in vivo</i> Versuche mit akutem Versuchsablauf.....	41
2.1	Effekte auf die Tumormikrozirkulation.....	42
2.1.1	Gefäßdurchmesser.....	42
2.1.2	Funktionelle Gefäßdichte.....	42
2.1.3	Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	44
2.1.4	Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex.....	45
2.2	Effekte auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor.....	46
2.2.1	Thrombozytenflux.....	47
2.2.2	Thrombozytenadhärenz _{Gefäß}	48
2.3	Vergleichende Untersuchung von Tumor und Normalgewebe.....	49
3.	Ergebnisse der histologischen Untersuchung.....	52
4.	Ergebnisse der <i>in vivo</i> Versuche mit chronischem Versuchsablauf.....	54
4.1	Effekte auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor.....	54
4.1.1	Thrombozytenadhärenz _{ROI}	54
4.1.2	Mikrothrombosen.....	54
4.2	Vergleichende Untersuchung von Tumor und Normalgewebe.....	55
IV	DISKUSSION.....	58
1.	Diskussion der Methodik.....	58
1.1	Das Modell der transparenten Rückenhautkammer.....	58
1.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und offline Videobildanalyse.....	59
1.3	Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten.....	61
2.	Diskussion der Ergebnisse.....	63
2.1	<i>In vitro</i> Untersuchung der Thrombozytenaktivierung.....	63
2.2	<i>In vivo</i> Untersuchung der Tumormikrozirkulation.....	64
2.3	<i>In vivo</i> Untersuchung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen.....	68
2.4	Tumorselektive Wirkung von EndoTAG [®] -1.....	73
2.5	Ausblick.....	74
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	77
VI	LITERATURVERZEICHNIS.....	80
VII	ANHANG.....	96
1.	Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	96
2.	Danksagung.....	98
3.	Lebenslauf.....	99

I EINLEITUNG

Maligne Neoplasien stellen in den industrialisierten Ländern weiterhin die zweithäufigste Todesursache nach Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems dar. Das Statistische Bundesamt Deutschland berichtete für das Jahr 2006 eine Gesamtzahl von 211.523 Todesfällen infolge bösartiger Krebserkrankungen. Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 25,7% aller Todesfälle. Folglich stirbt derzeit jeder 4. Einwohner Deutschlands an einem Krebsleiden. Ähnliche Zahlen gelten laut National Cancer Institute (NCI) auch für die USA.

Der Begriff „Krebs“ [karkinos (griech.)] wurde vor über 2500 Jahren von Hippokrates geprägt, den geschwollene Venen in der Umgebung eines Brustgeschwürs an die Beine eines Krebses erinnerten. Er führte die Entwicklung von Krebs auf ein Ungleichgewicht der Körpersäfte mit Überwiegen von schwarzer Galle zurück. Dank intensiver Forschungsaktivitäten weiß man heute, dass die Karzinogenese ein äußerst komplexer Prozess ist, der in mehreren Schritten verläuft und eine Aneinanderreihung genetischer Veränderungen beinhaltet, die die Transformation von Normalgewebe zum bösartigen Tumor steuern (Nowell, 1976; Vogelstein and Kinzler, 1993). Mit dem exponentiellen Wissensanstieg in den letzten 30 Jahren haben sich auch die Therapiekonzepte weiterentwickelt. Man betrachtet Krebs heute als eine Krankheit, die drei Kompartimente umfasst, nämlich die Tumorzellen, das Tumorgefäßsystem und das Tumorstroma (Jain, 1990). Hierdurch bieten sich verschiedene therapeutische Angriffspunkte. Während chirurgische Maßnahmen, Chemotherapie und Bestrahlung - als klassische Grundpfeiler der herkömmlichen Tumorthherapie - die Tumorzellen selbst zum Ziel haben, wurden in den letzten Jahren zunehmend Medikamente und Behandlungsmethoden entwickelt, die sich gegen die Gefäße oder das Tumorstroma richten (Eichhorn et al., 2004a; Ferrara and Kerbel, 2005). Trotz experimenteller Fortschritte und Marktzulassung neuartiger Therapeutika wie z.B. Avastin (Bevacizumab), ein Antikörper gegen Vascular Endothelial Growth Factor, besteht weiterhin ein großer Forschungsbedarf, um in Zukunft eine erfolgreichere Behandlung maligner Tumore zu ermöglichen (Kramer and Lipp, 2006).

1. Das Tumorblutgefäßsystem

1.1 Tumorangiogenese

1971 postulierte Judah Folkman erstmals, dass das Wachstum solider Tumore abhängig ist von der Ausbildung eines funktionstüchtigen Tumorgefäßsystems (Folkman, 1971). Bis zu diesem Zeitpunkt war zwar in zahlreichen Studien ein Zusammenhang zwischen Tumorprogression und der Entwicklung neuer Blutgefäße beschrieben worden, man ging jedoch davon aus, dass es sich hierbei um eine Art Entzündungs- oder Abwehrreaktion des Organismus handeln würde (Ide et al., 1939; Algire and Chalkley, 1945; Feigin, 1958).

Folkmans Hypothese hingegen basierte auf den Ergebnissen einer Reihe von *in vitro* und *in vivo* Experimenten vornehmlich aus den 1960-er Jahren (Folkman, 1963; Folkman et al., 1966; Gimbrone, Jr. et al., 1969). In diesen konnte gezeigt werden, dass die Versorgung eines malignen Zellklons mit Nährstoffen durch Diffusion maximal bis zu einer Größe von 1-2 Kubikmillimetern möglich ist. Unterbleibt darüber hinaus eine Neovaskularisation des Tumorgewebes, so wird in der Regel die hohe Zellproliferation durch einen zunehmenden Zelluntergang ausgeglichen, was letztendlich zu einem Wachstumsstillstand führt. Der Tumor verharrt dann in einem scheinbar „schlafenden“ Zustand, der auch als *tumor dormancy* bezeichnet wird und unter Umständen jahrelang andauern kann (Gimbrone, Jr. et al., 1972; Brem et al., 1976; Folkman and Kalluri, 2004).

In den vergangenen drei Jahrzehnten konnte Folkmans Hypothese bestätigt werden (Folkman, 1990). Es gilt mittlerweile als allgemein anerkannt, dass die Tumorangiogenese, d.h. die Einsprossung neuer Blutgefäße aus dem bereits existierenden Gefäßsystem heraus, eine Schlüsselrolle in der Entstehung, Progression und Metastasierung maligner Tumore einnimmt. Es konnte gezeigt werden, dass der äußerst komplexe Angiogeneseprozess von einer Subpopulation maligner Zellen in einem frühen Entwicklungsstadium des Tumorzellverbandes induziert wird (Folkman et al., 1989; Kandel et al., 1991). Warum einige Zellen plötzlich den ruhenden Zustand verlassen und eine angiogene Aktivität entwickeln ist weiterhin nicht vollständig geklärt. Folkman prägte für dieses Geschehen den Begriff *Angiogenic Switch*. Hierunter kann man sich modellhaft eine Art „Kippschalter-Mechanismus“ vorstellen, der durch Aktivatoren der Angiogenese einerseits (z.B. basic- und acidic Fibroblast Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor) und Inhibitoren andererseits (z.B. Interferon α , Plättchenfaktor 4, Angiostatin) kontrolliert wird (s. Abb. 1). Während der *tumor dormancy* überwiegen die Inhibitoren oder es besteht ein Gleichgewicht zwischen beiden Seiten. Wird dieses Gleichgewicht zugunsten der Angiogenese verschoben,

kommt es zu einer raschen Ausbildung von Tumorgefäßen (Folkman, 1995; Hanahan and Folkman, 1996; Naumov et al., 2006). Das neu entstandene Gefäßnetzwerk sichert fortan nicht nur die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen, sondern fördert auch über die Produktion von Wachstumsfaktoren (z.B. Insulin-like Growth Factor I, bFGF) im Sinne einer parakrinen Stimulation das Tumorstadium (Hamada et al., 1993; Nicosia and Villaschi, 1999). Dies äußert sich in einer exponentiellen Größenzunahme und raschen Metastasierung des Tumors nach suffizienter Neovaskularisation.

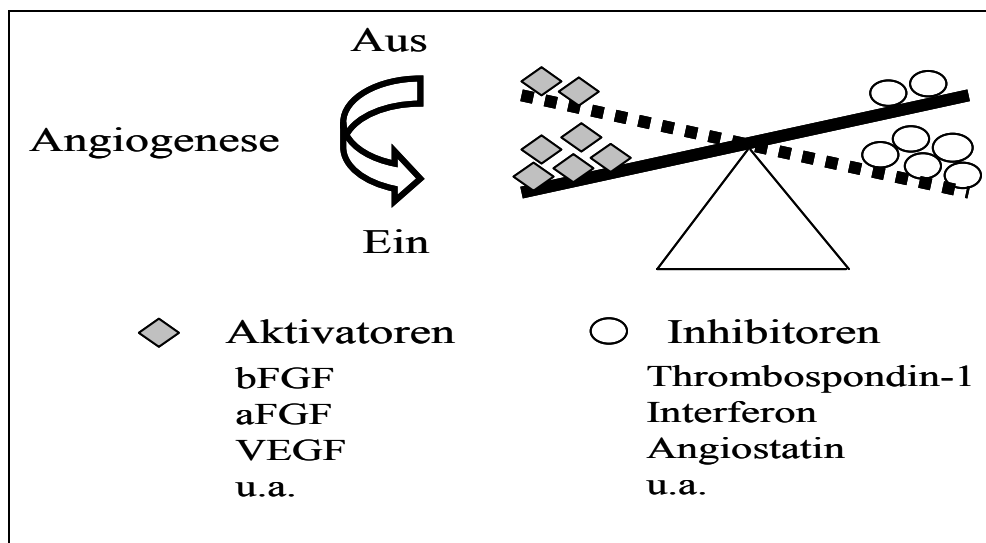


Abb. 1: Modell des Angiogenic Switch nach Hanahan & Folkman. Der Angiogeneseprozess wird hypothetisch durch eine Art „Kippschalter-Mechanismus“ reguliert, der von Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese gesteuert wird. Überwiegen die Inhibitoren, so ist der Schalter auf „Aus“ gestellt, d.h. es findet keine Angiogenese statt. Kommt es nun z.B. unter dem Einfluss verschiedener Onkogene oder Milieueränderungen zu einem Überwiegen von Aktivatoren, so kippt der Schalter auf die Position „Ein“ und der Angiogeneseprozess beginnt.

1.2 Besonderheiten der Tumorgefäße und der Tumormikrozirkulation

Zahlreiche Studien über den Aufbau des Tumorgefäßsystems und die Pathophysiologie der Tumormikrozirkulation stammen aus dem Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München (Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1982a; 1982b; Oda et al., 1984; Hammersen et al., 1985; Endrich et al., 1988). Mittels intravitalmikroskopischer und histologischer Untersuchungen am amelanotischen Melanom des Hamsters (A-Mel-3) konnte ein stadienabhängiges Bild der Tumorangio- und der intratumoralen Hämodynamik gezeichnet werden.

Bereits innerhalb von 24 Stunden nach Transplantation der Tumorzellen treten strukturelle Veränderungen der Wirtsgefäße auf in Form einer lokalen Vasodilatation mit einer resultierenden Hyperämisierung des Wirtsgewebes. Bei diesen frühen Veränderungen handelt es sich um unspezifische Reaktionen, die ebenso bei posttraumatischen und entzündlichen Prozessen beobachtet werden können (Algire and Chalkley, 1945; Witte and Goldenberg, 1967; Warren et al., 1978). Erste tumoreigene Gefäßstrukturen entstehen nach ca. 72 Stunden durch Aussprossung präformierter Gefäße im Randbereich des Tumors. Im weiteren Verlauf wird der nun rasch wachsende Tumor zunehmend vaskularisiert.

Zwischen den neu gebildeten Tumorgefäßen und den Gefäßen im Normalgewebe bestehen erhebliche Unterschiede (Jain, 1988). Im Vergleich zu reifen Gefäßen, die sich unter physiologischen Bedingungen in einem ruhenden Zustand befinden, besitzen die Endothelzellen in angiogenetischen Gefäßen einen über 50-fach erhöhten Proliferationsindex (Denekamp and Hobson, 1982). Dies führt zum Vorkommen vieler unreifer Endothelzellen in den Tumorgefäßen mit Auswirkungen auf die Regulation von Immun-, Entzündungs- und Gerinnungsprozessen (Fajardo, 1989). Das angiogenetische Gefäßnetzwerk hat eine chaotische Architektur mit Kalibersprüngen, Aussackungen und Schlingelung von Gefäßen. Die Auskleidung der Tumorgefäße ist durch zahlreiche Endothellücken gekennzeichnet. Diese endothelialen Lücken führen zu einer gesteigerten Permeabilität für Makromoleküle (Dvorak et al., 1988; Hashizume et al., 2000). Durch den Austritt von Plasmaproteinen erhöht sich der onkotische Druck im Tumorinterstitium und es kommt zu einer Hämokonzentration mit Steigerung des Perfusionswiderstandes aufgrund von transkapillären Flüssigkeitsverlusten. Während in den frühen Entwicklungsstadien eine hohe intratumorale Gefäßdichte vorliegt, verringert sich die Anzahl der Gefäße bezogen auf die Zellmasse im Laufe der Tumorexansion (Endrich et al., 1982b; 1988). Durch den zunehmenden Abstand zwischen den einzelnen Kapillaren und die hierdurch bedingte Verlängerung der Diffusionsstrecke kann vor allem in den zentralen Tumorbereichen die Versorgung nicht mehr gewährleistet werden. Die genannten Faktoren führen zu einer starken Heterogenität der Tumorperfusion mit Auftreten von Hypoxie, Azidose und Tumorzellnekrosen insbesondere im Tumorzentrum (Jain, 1988; Netti et al., 1996; Vaupel, 2004). Darüber hinaus findet man auf angiogenetischen Endothelzellen ein verändertes Expressionsmuster spezifischer Oberflächenmoleküle wie z.B. VEGF und VEGF-Rezeptoren, Integrine, Tie1/2-Rezeptoren etc., die eine Abgrenzung zu reifen Gefäßen erlauben können (Bloemendal et al., 1999; Brekken et al., 2002).

Der zeitliche Ablauf der geschilderten Veränderungen sowie die morphologischen Besonderheiten des neuen Gefäßsystems variieren hierbei je nach Tumortyp und Wachstumsmuster (Shubik, 1982). Das A-Mel-3 Melanom ist charakterisiert durch eine sehr frühe Induktion des Angiogeneseprozesses und eine ausgeprägte Neovaskularisation.

1.3 Die Rolle von Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation

Bereits 1865 erkannte Trousseau, dass ein Zusammenhang zwischen Tumoren und dem Auftreten von Thrombosen besteht (Trousseau, 1865). Heute weiß man, dass es im Rahmen maligner Grunderkrankungen auf verschiedenen Wegen und Ebenen zu einer Aktivierung des hämostatischen Systems kommt (Caine et al., 2002; Lip et al., 2002). Betroffen sind hiervon sowohl plasmatische Gerinnungsfaktoren, als auch korpuskuläre Blutbestandteile (Falanga et al., 2003). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien häufig Thrombozytenanomalien und einen erhöhten Thrombozytenumsatz aufweisen (Scialla et al., 1979; Blann et al., 2001). Gesteigerte Thrombozytenzahlen gelten als ein unabhängiger Indikator für eine schlechtere Prognose (Pedersen and Milman, 1996). Eine entscheidende Beteiligung von Thrombozyten bei der Metastasierung von Tumorzellen wurde mehrfach nachgewiesen (Gasic et al., 1968; Pearlstein et al., 1984; Janowska-Wieczorek et al., 2005). Hierbei sind verschiedenen Mechanismen involviert: Thrombozyten können sich an zirkulierende Tumorzellen binden und diese vor einer immunvermittelten Zerstörung schützen (Nieswandt et al., 1999). Die Adhäsion der Tumorzellen an das Endothel wird erleichtert und somit ihre metastatische Absiedelung begünstigt (Poggi et al., 1993). Darüber hinaus wurden Thrombozyten als ein Hauptspeicherort für proangiogene Wachstumsfaktoren, z.B. VEGF, Angiopoietin-1 und PDGF identifiziert. Durch Freisetzung dieser Faktoren können Thrombozyten Einfluss auf das Überleben und die Proliferation sowohl von Tumorzellen als auch von Endothelzellen nehmen (Browder et al., 2000b).

Die Rolle von Thrombozyten im Rahmen der Tumorangiogenese wurde in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. Einige Autoren sehen eine funktionelle Verbindung zwischen der Angiogenese und der intratumoralen Gerinnung (Pinedo et al., 1998; Sierko and Wojtukiewicz, 2004). So erlauben die neu gebildeten Tumorgefäße durch ihre erhöhte Permeabilität einen Austritt plasmatischer Gerinnungsfaktoren in den extravaskulären Raum, wo prokoagulatorisch wirksame Strukturen in der Lage sind, die Gerinnungskaskade zu starten. Weiterhin bieten angiogenetische Gefäße durch Freilegung thrombogener Strukturen

an den endothelialen Lücken mögliche Bindungsstellen für zirkulierende Thrombozyten. In Verbindung mit den pathophysiologischen Besonderheiten der Tumormikrozirkulation werde hierdurch die Entstehung lokaler Mikrothromben gefördert. Dies wiederum habe die Freisetzung der gespeicherten Wachstumsfaktoren und somit eine Induktion des Angiogeneseprozesses zur Folge (Banks et al., 1998; Arisato et al., 2003).

Andererseits setzten aktivierte Thrombozyten aber auch antiangiogene Faktoren frei, die die Proliferation von Endothelzellen und somit den Angiogeneseprozess hemmen können. Hierzu zählen beispielsweise Plättchenfaktor 4, Thrombospondin und PAI-1 (Browder et al., 2000b; Staton and Lewis, 2005). Darüber hinaus konnte vor wenigen Jahren in einer Studie unserer Arbeitsgruppe überraschenderweise gezeigt werden, dass selbst nach hinreichender Stimulation des Tumorendothels *in vivo* keine wesentlichen Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Verlauf der Angiogenese von zwei unterschiedlichen Tumorzelllinien auftreten (Manegold et al., 2003).

Aufgrund dieser kontroversen Vorstellungen werden derzeit unterschiedliche Konzepte bei der Therapie maligner Tumore verfolgt. Während einige Forschungsgruppen versuchen, das Tumorstadium durch Hemmung des Gerinnungssystems und insbesondere der Thrombozytenaggregation aufzuhalten (Amirkhosravi et al., 2003; Falanga, 2004), sehen andere gerade in der gezielten Induktion einer intravasalen Gerinnung eine Therapieoption (Dienst et al., 2005; Narazaki and Tosato, 2005)

2. Antivaskuläre Therapiestrategien

2.1 Grundlagen antivaskulärer Therapien

Mit der Erkenntnis, dass die Entwicklung und die Streuung maligner Tumore entscheidend von der Ausbildung eines versorgenden Gefäßnetzwerks abhängig sind, wurde erstmals auch der Gedanke geäußert, dass die Inhibition der Tumorneovaskularisation eine therapeutische Option bei der Tumorbehandlung darstellen könnte (Folkman, 1971). Die genaue Erforschung der anatomischen und funktionellen Besonderheiten des Tumorgefäßsystems trug hierbei entscheidend zu der Entwicklung neuer Therapiestrategien bei. Im Rahmen konventioneller Therapieformen, die primär gegen die Tumorzellen gerichtet sind, stellt die Pathophysiologie der Tumormikrozirkulation wie zum Beispiel die heterogene Perfusion, die erhöhte Permeabilität und die zentrale Hypoxie ein Problem dar, welches den Therapieerfolg häufig erheblich limitiert (Jain, 1990; Denekamp, 1999). Im Gegensatz dazu sieht ein antivaskuläres Therapiekonzept das Gefäßsystem als „Achillesferse“ in der Tumorbehandlung und macht

sich dessen Besonderheiten zunutze (Denekamp, 1993). So ermöglichen die Unterschiede zwischen angiogenetischen und reifen Gefäßen einen selektiven Angriff auf das Tumorgefäßsystem.

Im Rahmen antivaskulärer Therapiestrategien können zwei unterschiedliche Konzepte verfolgt werden (s. Abb. 2) (Denekamp, 1993; Los and Voest, 2001; Eichhorn et al., 2004a). Dabei handelt es sich zum einen um das von Folkman postulierte Konzept der „Antiangiogenese“ (Folkman, 1971). Diese Therapieform sieht eine Inhibition des Angiogeneseprozesses und somit der Bildung neuer Blutgefäße vor. Bereits existierende Tumorgefäße werden hierbei nicht angegriffen. Aus diesem Grund wirkt eine antiangiogenetische Therapie im Wesentlichen zytostatisch und könnte hierdurch eine Wachstumsverzögerung bzw. eine Verlängerung der *tumor dormancy* bewirken. Im Gegensatz dazu zielt Denekamp mit ihrem Konzept des *Vascular Targeting* auf eine Destruktion des bereits etablierten Tumorgefäßsystems ab (Denekamp, 1984). Durch den möglichen zytotoxischen Effekt dieser Therapieform könnte es zu einer stärkeren Wachstumsverzögerung oder sogar zu einer Tumorregression kommen.

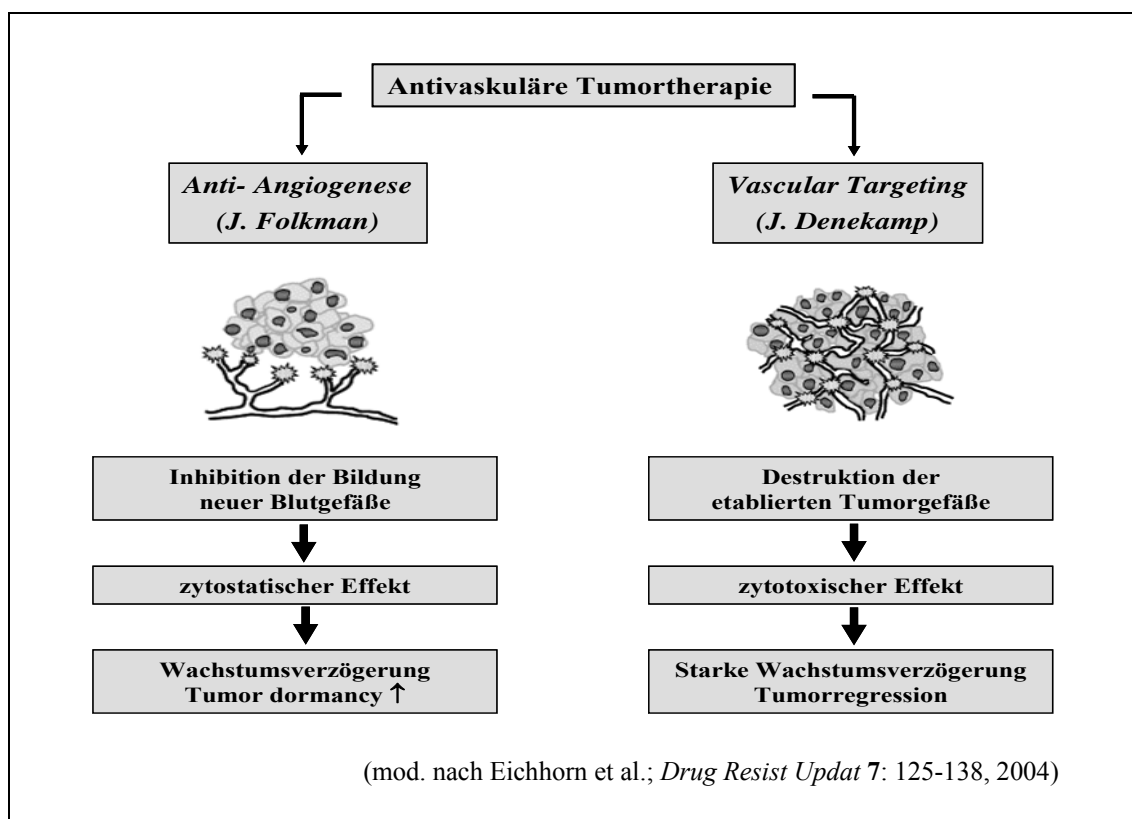


Abb. 2: Im Rahmen antivaskulärer Therapiestrategien lassen sich zwei Konzepte unterscheiden. Während bei der „Antiangiogenese“ (Folkman, 1971) die Bildung neuer Gefäße inhibiert werden soll, sieht das Konzept des „Vascular Targeting“ (Denekamp, 1984) eine Destruktion der bereits etablierten Tumorgefäße vor.

Eine Therapie, die gegen das Tumorgefäßsystem gerichtet ist, hat theoretisch verschiedene, wesentliche Vorteile gegenüber bisher etablierten Therapieformen (Burrows and Thorpe, 1994; Eichhorn et al., 2004a):

Da alle soliden Tumore unabhängig von ihrem histologischen Erscheinungsbild eine Angiogenese induzieren, könnte durch eine antivaskuläre Therapie ein weites Wirkspektrum erreicht werden. Zudem bietet der direkte Angriff von Endothelzellen den Vorteil, dass Wirksubstanzen nicht erst eine Barriere überwinden müssen, um an ihr Ziel zu gelangen. Im Tumor ist eine Vielzahl von Zellen von der Versorgung durch ein einzelnes Gefäß abhängig, so dass eine antivaskuläre Therapie äußerst effektiv sein könnte (Denekamp, 1986; 1999). Hinzu kommt, dass der Angiogeneseprozess physiologischerweise beim Erwachsenen nur unter speziellen Bedingungen stattfindet. Zu diesen zählen der Menstruationszyklus und die Wundheilung (D'Amore and Thompson, 1987). Es ist also damit zu rechnen, dass eine Therapie, die sich gegen angiogenetische Gefäße richtet, eine hohe Selektivität aufweist und somit evtl. geringere Nebenwirkungen hat. Da Endothelzellen genetisch stabil sind, ist eine antivaskuläre Therapie möglicherweise weniger anfällig für die Entwicklung von Resistenzen (Kerbel, 1991; Boehm et al., 1997).

2.2 *Vascular Targeting* mit kationischen Liposomen

Die grundlegende Strategie beim *Vascular Targeting* beruht auf einer selektiven Zerstörung des Tumorgefäßsystems unter Schonung der übrigen Gefäße des Organismus. Die Voraussetzung für eine systemische *Vascular Targeting* Therapie besteht in der gezielten Anreicherung von Wirksubstanzen in den Tumorgefäßen nach intravenöser Applikation. In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Entwicklung so genannter *Vascular Targeting Agents* (VTA) bzw. *Vascular Disrupting Agents* (VDA) beschäftigt (Thorpe, 2004; Eichhorn et al., 2004a; Gaya and Rustin, 2005).

Hierbei haben Liposomen zunehmend an Bedeutung gewonnen, da gezeigt werden konnte, dass insbesondere Liposomen mit einer positiven Oberflächenladung über sog. *Targeting*-Eigenschaften verfügen, indem sie sich nach systemischer Gabe selektiv am Tumorendothel anreichern (Thurston et al., 1998).

Liposomen sind sphärische Vesikel, die aus einer lipophilen Phospholipid-Doppelmembran und einem hydrophilen Kompartiment im Inneren bestehen. Aufgrund ihrer Struktureigenschaften eignen sie sich hervorragend als Transportmedium sowohl für wasserlösliche

als auch für fettlösliche Stoffe (Ostro and Cullis, 1989). Durch Einkapsulierung in Liposomen konnte für eine Vielzahl von Medikamentenklassen, z.B. Chemotherapeutika, Antibiotika, Impfstoffe etc., eine verbesserte Wirksamkeit und Verträglichkeit erzielt werden (Lasic, 1998). Je nach Zusammensetzung der Lipidkomponenten kann die Oberflächenladung der Liposomen und damit ihre pharmakokinetische Eigenschaft variiert werden (Lian and Ho, 2001).

Kationische Liposomen reichern sich nach systemischer Gabe bevorzugt in den Tumorgefäßen an und werden in die Endothelzellen aufgenommen (Thurston et al., 1998; Campbell et al., 2002; Krasnici et al., 2003). Es handelt sich hierbei um ein ladungsabhängiges Phänomen, welches unter Verwendung neutraler oder anionischer Liposomen nicht beobachtet werden konnte. Die intratumorale Verteilung der Liposomen wird durch die Höhe der positiven Ladung beeinflusst, wobei eine Steigerung der Gesamtladung mit einer zunehmenden Akkumulation der Liposomen im vaskulären Kompartiment des Tumors einhergeht (Campbell et al., 2002; Dass and Choong, 2006).

Der genaue Mechanismus dieser ladungsvermittelten Interaktion ist bislang noch nicht eindeutig identifiziert worden. In einem Hirntumor-Modell wurden entlang des Endothels unregelmäßige anionische Areale anhand der Verteilung von kationischen Ferritinpartikel identifiziert (Vincent et al., 1988). Zusätzlich konnte *in vitro* auf proliferierenden Endothelzellen im Vergleich zu ruhenden Endothelzellen eine Hochregulierung negativ geladener Membranmoleküle beobachtet werden (Augustin et al., 1994). Auch Thorpe und Mitarbeiter haben in verschiedenen Tumoren eine gesteigerte Expression anionischer Phospholipide auf dem Tumorendothel nachgewiesen (Ran et al., 2002; 2005). Diese negativ geladenen Strukturen könnten Bindungsstellen für kationische Liposomen darstellen.

2.3 Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG[®]-1)

Die *Targeting*-Eigenschaften kationischer Liposomen macht man sich zunutze, um antiproliferative Wirkstoffe gezielt an das Tumorendothel zu transportieren. In diesem Sinn wurde Paclitaxel für eine antivaskuläre Therapie solider Tumore in kationische Liposomen enkapsuliert. Die dabei entstehende Formulierung trägt den Namen EndoTAG[®]-1.

Paclitaxel, ein in der Rinde verschiedener Eibenarten vorkommender chemischer Stoff, gehört zur Gruppe der Taxane. Durch abnorme Stabilisierung und Abbauhemmung der Mikrotubuli des Spindelapparates entfaltet Paclitaxel eine antimetabolische Wirkung (Bartsch, 2005).

Aufgrund dieser Eigenschaft wird es derzeit unter dem Markennamen Taxol® (Bristol-Myers Squibb, New York, USA) als Chemotherapeutikum bei einer Vielzahl fortgeschrittener maligner Tumore, unter anderem Ovarial- und Mammakarzinom, nicht kleinzelliges Lungenkarzinom, Melanom und Tumore im Kopf-Hals Bereich, eingesetzt (Rowinsky and Donehower, 1995; Rowinsky, 1997). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel auch auf proliferierende Endothelzellen im Tumor wirkt und hierdurch eine antivaskuläre Wirkung entfaltet (Belotti et al., 1996).

Paclitaxel weist als hydrophober Stoff eine geringe Wasserlöslichkeit auf und muss daher für den klinischen Gebrauch in einer Mischung aus Cremophor EL (Polyethylen-35-Rizinusöl) und Ethylalkohol gelöst werden. Der Lösungsvermittler Cremophor EL ist für das Auftreten schwerwiegender allergischer und neurotoxischen Nebenwirkungen verantwortlich, wodurch der Einsatz von Taxol® limitiert wird (Lorenz et al., 1977; Weiss et al., 1990b; Brat et al., 1992). Im Rahmen intensiver Bemühungen, die Verträglichkeit von Paclitaxel zu verbessern, wurden auch diverse liposomale Formulierungen analysiert. Als stark lipophile Substanz lässt sich Paclitaxel gut in die Lipiddoppelmembran von Liposomen enkapsulieren (Straubinger et al., 1993). Hierdurch konnten die zuvor beschriebenen toxischen Nebenwirkungen deutlich verringert werden (Sharma et al., 1993; Treat et al., 2001).

Unsere Arbeitsgruppe hat sich in den letzten Jahren intensiv mit der Wirkung von Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG®-1) auf das Gefäßsystem solider Tumore beschäftigt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die *Vascular Targeting*-Eigenschaften der kationischen Liposomen durch die Enkapsulierung von Paclitaxel nicht beeinträchtigt werden. Die Therapie mit EndoTAG®-1 führte zu einer signifikanten Retardierung des Wachstums und der Metastasierung von subkutan implantierten A-Mel-3 Tumoren verglichen mit konventionellem Paclitaxel (Schmitt-Sody et al., 2003). In einer weiteren Reihe von *in vivo* Versuchen gelang Strieth und Mitarbeitern der Nachweis, dass dieser Therapieeffekt tatsächlich auf einem *Vascular Targeting* Mechanismus beruht. Die intravitalmikroskopische Analyse der Tumorneovaskularisation offenbarte eine massive Schädigung des Gefäßsystems nach wiederholter Therapie mit EndoTAG®-1. Zusätzlich zeigte sich in der histologischen Untersuchung nach TUNEL-Färbung eine gefäßassoziierte Apoptose, wohingegen in den Kontrollgruppen nur vereinzelt apoptotische Tumorzellen in diffuser Verteilung nachweisbar waren (Strieth et al., 2004). Vergleichbare Effekte konnten auch an einem humanen Melanommodell nachgewiesen werden. Hier ergab die histologische Analyse der intratumoralen Gefäßdichte eine signifikante Reduktion nach wiederholter Therapie mit

Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen im Vergleich mit konventionellem Paclitaxel (Kunsthof et al., 2003). Diese Untersuchungen haben bestätigt, dass durch Enkapsulierung von Paclitaxel in kationische Liposomen die Umstellung von einem bisher antitumoralen zu einem antivaskulären Therapieansatz möglich ist.

3. Hypothese und Zielsetzung

In vorausgegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine wiederholte Therapie mit Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen einen antivaskulären Effekt auf A-MEL-3 Tumore hat (Strieth et al., 2004). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte, insbesondere unter Berücksichtigung der rheologischen Verhältnisse und der Hyperkoagulabilität im Tumor, könnte die Rekrutierung von Thrombozyten mit Entstehung intratumoraler Thrombosen darstellen.

Eine Beteiligung von Thrombozyten beim *Vascular Targeting* wurde bereits zuvor in verschiedenen Veröffentlichungen diskutiert. So konnten unter Therapie mit dem kleinmolekularen Wirkstoff ZD6126 ausgeprägte Thrombosen in verschiedenen Tumormodellen nachgewiesen werden (Blakey et al., 2002). Auch die antivaskuläre Wirkung von Combretastatin A-4-P wurde zum Teil auf einen thrombotischen Verschluss der Gefäße zurückgeführt (Tozer et al., 2001; Tozer et al., 2005). Bei einem Liganden-basierten *Vascular Targeting*-Ansatz mit gezielter Anreicherung von Gerinnungsfaktoren im Tumor ist die Thrombosierung der Gefäße sogar das erklärte Ziel (Nilsson et al., 2001; Dienst et al., 2005; Kessler et al., 2005). Direkte Untersuchungen der intratumoralen Gerinnung und im Speziellen der Thrombozyten-Endothelinteraktionen unter antivaskulärer Therapie *in vivo* wurden bisher allerdings nicht durchgeführt.

Eine Einbeziehung von Thrombozyten erscheint beim *Vascular Targeting* mit EndoTAG[®]-1 aus verschiedenen Gründen durchaus möglich. Durch die Enkapsulierung in kationische Liposomen wird Paclitaxel gezielt in das Tumorgefäßsystem transportiert (Schmitt-Sody et al., 2003) und kann dort seine zytotoxische Wirkung an den Endothelzellen entfalten. Die hierbei entstehenden Endothelläsionen könnten gemäß der Virchow-Trias den Ausgangspunkt einer vermehrten Thrombozytenadhärenz darstellen (Brotman et al., 2004). Darüber hinaus gibt es Anhalt dafür, dass die Funktion von Thrombozyten durch kationische Liposomen beeinflusst wird. Eichhorn und Mitarbeiter haben die Interaktion positiv geladener Liposomen mit Blutzellen untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass es unmittelbar nach intravenöser

Applikation zu einer Bindung der Liposomen an Thrombozyten kommt. Dieses Phänomen wurde von einer Reduktion der Thrombozytenzahl begleitet (Eichhorn et al., 2004b). Es ist vorstellbar, dass Thrombozyten während dieses Vorgangs aktiviert werden.

Während die Okklusion von Tumorgefäßen eine erwünschte Folge antivaskulärer Therapien darstellt, muss im Normalgewebe die Integrität der Gefäße unbedingt garantiert werden, um schwerwiegende thromboembolische Komplikationen zu vermeiden (Kuenen et al., 2003). Um dies zu gewährleisten, sollte bei der Erprobung neuartiger Therapeutika in vorklinischen Studien überprüft werden, ob diese ihre antivaskuläre Wirkung auch primär im Tumor entfalten. Ziel dieser Arbeit war demnach neben der Analyse der Tumormikrozirkulation und der Thrombozyten-Endothelinteraktionen unter Therapie mit EndoTAG[®]-1 auch der Vergleich zwischen Tumor- und Normalgewebe im Hinblick auf die Tumorselektivität der erzielten Effekte.

Hierfür wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Werden Thrombozyten *in vitro* durch EndoTAG[®]-1 aktiviert?
- Welchen akuten Effekt hat die Gabe von EndoTAG[®]-1 auf die Mikrozirkulation und die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im soliden Tumor *in vivo*?
- Welchen akuten Effekt hat die Gabe von EndoTAG[®]-1 auf die Mikrozirkulation und die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Normalgewebe *in vivo*?
- Welchen Effekt hat eine wiederholte Gabe von EndoTAG[®]-1 auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im soliden Tumor *in vivo*?
- Welchen Effekt hat eine wiederholte Gabe von EndoTAG[®]-1 auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Normalgewebe *in vivo*?

II MATERIAL UND METHODIK

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen wurden mit Genehmigung der Regierung Oberbayern im Zeitraum von Februar 2003 bis Mai 2004 am Institut für Chirurgische Forschung durchgeführt.

1. Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Als Versuchstiere dienten männliche Syrische Goldhamster aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld). Es wurden jeweils 6 Tiere in einem Käfig mit freiem Zugang zu Wasser und Standardtrockenfutter (Sniff; Spezialdiäten GmbH, Soest) bei einer Umgebungstemperatur von 24° C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% im Tierstall des Instituts gehalten. Die Beleuchtung erfolgte durch künstliches Licht in einem 12 stündlich wechselndem Hell-Dunkel-Rhythmus.

Das mittlere Gewicht der Tiere betrug 60g (55-65g) für das Modell der transparenten Rückenhautkammer (s. 3.1.2.) bzw. 75g (70-80g) für das subkutane Tumormodell (s. 3.1.3.).

Nach Aufnahme in den Versuch wurden die Hamster in Einzelkäfigen unter Wahrung der zuvor genannten Umgebungsbedingungen gehalten. Im Anschluss an die Implantation der Tumorzellen erfolgte eine vorübergehende Unterbringung der Tiere in einem Intensivpflege-Inkubator (Modell 7510, Drägerwerk AG, Lübeck) bei 32° C und einer Luftfeuchtigkeit von 70% für 2 Tage (subkutane Tumore; vlg. 3.1.3) bzw. 4 Tage (Tumore in der Rückenhautkammer; vlg. 3.1.2).

Als Spendertiere für die Isolierung syngener Thrombozyten (s. 3.2.) dienten ebenfalls männliche Syrische Goldhamster (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von mindestens 100 g, um ein ausreichend hohes Gesamtblutvolumen zur Vereinfachung der Thrombozytengewinnung sicherzustellen.

2. Wirksubstanzen

Im Rahmen der Versuche kamen folgende Substanzen zum Einsatz:

2.1 Paclitaxel

Zur Enkapsulierung in Liposomen wurde reines Paclitaxel (Synopharm, Barsbüttel) eingesetzt (siehe 2.2.1). Für die Kontrollgruppen wurde Taxol® (Bristol-Myers Squibb, New York,

USA) in einer Dosierung von 5 mg/kg KG verwendet. Um gleiche Injektionsvolumina in den verschiedenen Therapiegruppen zu gewährleisten, erfolgte eine Verdünnung mit 5 % Glukose (B. Braun AG, Melsungen) zu einer resultierenden Konzentration von 0,5 mg Paclitaxel/ml.

2.2 Kationische Liposomen und liposomales Paclitaxel (EndoTAG[®]-1)

Für die Versuche wurden unbeladene kationische Liposomen und mit Paclitaxel beladene kationische Liposomen (EndoTAG[®]-1; Paclitaxeldosis: 0,5mg/ml) mit einer Lipidkonzentration von je 20 mM hergestellt. Zur Darstellung der Liposomen in der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wurde eine Fluoreszenzmarkierung mit Rhodamin-haltigem Lipid (Rh-DOPE; Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, New York, USA) durchgeführt (siehe 2.2.1)

2.2.1 Synthese kationischer Liposomen und Encapsulierung von Paclitaxel

Kationische Liposomen wurden aus 1,2 Dioleyl-3-Trimethylammoniumpropan (DOTAP) und 1,2 Dioleyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC; Avanti Polar Lipids) nach der Film-Methode (Bangham et al., 1965) hergestellt. Zur Encapsulierung wurde reines Paclitaxel (Synopharm, Barsbüttel) verwendet.

Zunächst wurden 0,1 mmol DOTAP und 0,1 mmol DOPC (unbeladene kationische Liposomen) bzw. 0,1 mmol DOTAP, 0,094 mmol DOPC und 0,006 mmol Paclitaxel (Paclitaxel beladene kationische Liposomen) in 15 ml Chloroform (Merck, Darmstadt) gelöst und die entsprechende Mischung in einem Rundkolben behutsam auf 40° C erwärmt. Anschließend wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers das Lösungsmittel unter Vakuum abgezogen bis sich ein dünner Lipidfilm gebildet hatte. Um Überreste des Lösungsmittels vollständig zu entfernen, wurde der Lipidfilm für 60 Minuten bei 5 mbar getrocknet. Unter Zugabe von 10 ml 5% Glukose (B. Braun AG, Melsungen) in das Gefäß kam es zur spontanen Bildung multilamellarer Liposomen. Nachdem die Liposomen über Nacht zum Quellen belassen wurden, erfolgte eine Extrusion in einem 10 ml Thermobarrel Extruder (Northern Lipids Inc, Vancouver, Kanada) bei 30° C. Die Suspension wurde hierbei mittels Stickstoff durch eine Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 200 nm gepresst. Durch 5-malige Wiederholung des Vorgangs wurde eine hinreichende Homogenisierung der Liposomen erreicht. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter dem Schutzgas Argon.

Die Herstellung fluoreszierender Liposomen erfolgte nach dem gleichen Prinzip unter Verwendung von 0,1 mmol DOTAP, 0,098 mmol DOPC und 0.002 mmol Rhodamin-1,2, Dioleoyl-sn-Glycero-3- Phosphatidylethanolamin (Rh-DOPE; Avanti Polar Lipids Inc.).

2.2.2 Analyse der Liposomen

Die Größenbestimmung der Liposomen erfolgte mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS). Die Messungen wurden mit einem Malvern Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Herrenberg) durchgeführt und ergaben ein Z_{average} (mittlerer intensitätsgewichteter Liposomendurchmesser) von 180-200 nm.

Der Lipid- und Paclitaxelgehalt der Liposomen wurde anhand *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) mit einem UV/VIS Detektor (Lipid: 205 nm, Paclitaxel: 227 nm; Shimadzu Japan) bestimmt. Zur Auftrennung und Quantifizierung der einzelnen Komponenten wurde eine *C8 LiChrospher 60 PR-select B column* (250 x 4mm, 5 μm Partikelgröße, Merck, Darmstadt) mit einer *C18 pre-column* (Merck) eingesetzt. Vor den Messungen wurden die Proben im Verhältnis 1:3 mit Tetrahydrofuran (J.T. Baker, Phillipsburg, USA) verdünnt.

Der Anteil fluoreszierender Lipide wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie mit einem Fluoreszenzdetektor (Jobin-Yvon, Grasbrunn) gemessen. Hierfür wurden die Proben in Chloroform (Merck) verdünnt und die Messung bei einer für Rhodamin spezifischen Wellenlänge (Anregung: 560 nm, Emission: 580 nm) durchgeführt.

Weiterhin wurden die Proben auf das Vorhandensein nadelförmiger Paclitaxelkristalle (Sharma and Straubinger, 1994) als Zeichen für eine Instabilität der Formulierung untersucht.

3. Modelle und Methoden

3.1 Tumormodelle

Zur Klärung der Fragestellung wurden Versuche an verschiedenen Tumormodellen durchgeführt. Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde das Modell der transparenten Rückenhautkammer gewählt, auf welches später im Detail eingegangen wird. Die histologische Untersuchung solider Tumore erfolgte anhand eines subkutanen Tumormodells.

3.1.1 Tumore

Alle Untersuchungen wurden am amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3 (Fortner et al., 1961), das am Institut für Chirurgische Forschung in Zellkultur gehalten wird, durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit der Tumore zu gewährleisten, wurden zur Implantation ausschließlich Zellen derselben Kulturpassage verwendet. Hierfür wurden im Vorfeld durch wiederholte Passage große Zellzahlen angezüchtet und letztlich die Kulturpassage 11 aliquotiert und eingefroren.

3.1.1.1 Zellkultur

Zur Herstellung von Kultur- und Einfriermedium wurden einem Liter *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RMPI 1640; PanSystems, Aidenbach) 10 ml einer 1%-igen Lösung von Penicillin/Streptomycin, entsprechend 10^5 I.E. Penicillin und 10^5 I.E. Streptomycin (PanSystems), zugesetzt. Weiterhin wurde dem Kulturmedium 10% fetales Kälberserum (FKS; PanSystems) zugegeben, dem Einfriermedium 20% FKS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg).

Zur *in vitro* Passage wurden die Zellen in Kulturmedium suspendiert und in Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Brutschrank (CO₂-Auto-Zero Typ B 5061 EK-02; Heraeus, Hanau) bei 37°C, 90% relativer Luftfeuchtigkeit und mit 5% CO₂ angereicherter Luft. Nach drei Tagen konnten die Zellen in der Regel gesammelt werden. Hierfür wurden zum Ablösen der Zellen zunächst 4 ml Trypsin-EDTA (PanSystems) auf die Zellen gegeben und nach einer 5-minütigen Inkubationszeit 10 ml RPMI-Medium hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend mit 450 x g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Zellpellet mit RPMI resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die so gewonnenen Tumorzellen konnten nun eingefroren oder weitergezüchtet werden.

Zum Einfrieren wurden ca. 50×10^6 Zellen mit 1,5 ml kaltem Einfriermedium suspendiert, schrittweise abgekühlt und in flüssigem Stickstoff bei – 198°C gelagert.

3.1.2 Vorbereitung der Tumorzellen zur Implantation

Ca. 30 Minuten vor geplanter Implantation wurden die eingefrorenen A-Mel-3 Zellen unter fließendem, lauwarmem Wasser aufgetaut und in Falconröhrchen (Becton Dickinson, Heidelberg) umgefüllt. Die Zellen wurden in 50 ml Phosphatpuffer (PBS mit Kalzium, mit

Magnesium; PanSystems) suspendiert, bei 23°C für 5 Minuten mit 620 x g zentrifugiert (Universal 30RF; Hettich Zentrifugen, Tuttlingen) und der Überstand anschließend abgossen. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, um das Einfriermedium auszuwaschen, wobei zuletzt für 10 Minuten zentrifugiert und dann das Tumorzellpellet am Boden der Röhre mit einer 1 ml- Insulinspritze aspiriert wurde.

3.1.3 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

Zur Beurteilung und Quantifizierung der Tumormikrozirkulation sowie der Thrombozyten-Endothelinteraktion *in vivo* wurde die von Endrich und Mitarbeitern entwickelte transparente Rückenhautkammer eingesetzt (Endrich et al., 1980; Asaishi et al., 1981). Hierbei handelt es sich um ein aus zwei spiegelbildlichen Hälften bestehendes Titangestell mit einer zentralen, kreisrunden Aussparung im Sinne eines Beobachtungsfensters. In diese Aussparung kann ein Deckglas (Durchmesser 11,8 mm, Stärke 1 mm, Edgar Hefele Medizintechnik, München) eingefügt und durch einen Sprengring fixiert werden. Durch Abnehmen des Deckglases von außen ist die Implantation von Tumorzellen in das Präparationsareal möglich. Die Kammerhälften werden über Distanzmuttern in einem Abstand von 4 mm gehalten, wodurch eine Kompression des dazwischen liegenden Gewebes vermieden wird. Entlang des oberen und unteren Randes beider Kammerhälften finden sich Bohrlöcher zur Fixierung der Kammer an der Rückenhaut des Hamsters mit Hilfe von Schrauben und Nähten (s. Abb. 3).



Abb. 3: Das Modell der transparenten Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster. (Endrich et al., 1980)

3.1.3.1 Kammerpräparation

Vor Beginn der Präparation wurde die Kammer über drei Schrauben in den dafür vorgesehenen Bohrungen zusammengesetzt, um die Parallelstellung beider Hälften zu überprüfen. Anschließend wurden die Kammerhälften getrennt, wobei eine Hälfte mit den Schrauben und Distanzmuttern bestückt blieb. In die zentrale Aussparung der Gegenseite wurde ein Deckglas eingesetzt. Die Kammern wurden so gemeinsam mit den Instrumenten und Abdecktüchern sterilisiert.

Die Narkose des Versuchstieres erfolgte während der gesamten Dauer der Präparation durch eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®; Pharmacia GmbH, Karlsruhe) und 10 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun®; Bayer, Leverkusen). Die Rückenhaare des Tieres wurden nach Eintritt der Narkosewirkung mit einem Langhaarrasierer und durch chemische Depilation (Pilca® med Creme, Asid Bonz GmbH, Bieblingen) vollständig entfernt. Anschließend wurde die Rückenhaut mit 72% Alkohol (Cutasept®; Bode Chemie, Hamburg) gereinigt und das Tier auf einer Wärmeplatte derart gelagert, dass die linke Seite dem Operateur zugewandt war.

Die Rückenhaut wurde nun mittig gefasst und zu einer Falte angehoben. Mittels Transluminatation konnte die Gefäßversorgung der Haut lokalisiert und die Hautfalte so verschoben werden, dass die großen Gefäßarkaden (Rami cutanei der rechten und linken A. costalis) bei der Präparation geschont werden. Die Hautfalte wurde in dieser Position mit zwei Haltefäden (Ethibond® Excel 5/0; Ethicon, Nordstedt) fixiert und die mit den Schrauben versehene Kammerhälfte an ihrem Oberrand auf der Rückseite der Falte angenäht. Die Schrauben am Unterrand der Kammerhälfte wurden nach Stichinzision durch die Haut geführt und mit Minibulldogklemmen gefasst. Das der zentralen Aussparung der Kammer entsprechende Areal wurde auf der Vorderseite der Hautfalte mit einem Filzschreiber eingezeichnet. Anschließend wurde das Tier in Rechtsseitenlage umgelagert, so dass sich die markierte Seite in horizontaler Lage dem Operateur zugewandt befand.

Nun wurde unter 25-facher Vergrößerung (Wild M650; Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) im zuvor eingezeichneten Areal die gesamte Dermis einschließlich des subkutanen Bindegewebes mit mikrochirurgischen Instrumenten abpräpariert und hierdurch der Blick auf die kontralaterale Seite mit Hautmuskel und versorgenden Gefäßen freigegeben. Während der Präparation wurde sorgfältig auf eine atraumatische Präparationstechnik geachtet, um Blutungen zu vermeiden. Durch Benetzen mit NaCl 0,9% wurde eine Austrocknung des Präparationsareals verhindert. Abschließend wurde die zweite Hälfte der Rückenhautkammer

mit dem eingesetzten Deckglas auf die Schrauben der Gegenseite gesetzt und mit Muttern befestigt sowie durch Einzelknopfnähte an der Haut fixiert. Hierbei legte sich das feuchte Präparationsareal durch Adhäsionskräfte an das Deckglas an.

3.1.3.2 Implantation der Tumorzellen in die Rückenhautkammer

Die Implantation von Tumorzellen erfolgte zwei Tage nach Präparation der Rückenhautkammern. Im Vorfeld wurden Deckgläser (Edgar Hefele Medizintechnik, München), mikrochirurgische Pinzetten und Mullkompressen (10 x 10 cm; NOBA Verbandsmaterial Danz GmbH, Wetter) sterilisiert. Die wachen Versuchstiere wurden in luftdurchlässigen Plexiglasröhren (Effenberger, München) immobilisiert. Die Kammer ragte hierbei durch einen Längsschlitz der Röhre heraus. Die Röhren wurden dann auf einer speziell gefertigten Plexiglasbühne (Effenberger) so fixiert, dass die Kammer mit dem Präparationsareal waagrecht unter dem Operationsmikroskop zu liegen kam. Nach oberflächlicher Reinigung des Deckglases mit einem angefeuchteten Wattestäbchen wurde der Sprengring entfernt und das Deckglas behutsam abgehoben. Mit einer Mikropipette wurden 1-2 µl des Tumorzellkonzentrates ($\sim 2 \times 10^5$ Tumorzellen) aus der 1-ml Spritze (s. 3.1.1.2.) entnommen und unter Zuhilfenahme einer 11-er Skalpellspitze (Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan) zentral in das freiliegende Präparationsareal aufgebracht. Anschließend wurde ein steriles Deckglas eingesetzt und mit dem Sprengring gesichert. Die Unversehrtheit der Kammer, insbesondere die vollständige Adhärenz des Präparationsareals an das neue Deckglas ohne Bildung von Luftblasen, wurde mikroskopisch kontrolliert.

3.1.3.3 Ausschlusskriterien

Versuchstiere tolerierten die Kammerpräparation nach einer postoperativen Erholungsphase von ein bis zwei Tagen in der Regel sehr gut und zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten. Tiere, die durch ein Fehlen von arttypischen Verhaltensweisen, Gewichtsverlust und verminderte Reaktion auf äußere Reize auffällig waren, wurden von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

Alle Kammern wurden makroskopisch und mikroskopisch auf die Intaktheit der Kammerpräparation untersucht. Als Ausschlusskriterien galten Lufteinschlüsse, Einblutungen, traumatisch bedingte Neovaskularisationen sowie allgemeine Entzündungszeichen wie putride Sekretion, ödematöse Schwellung, Schängelung und Dilatation der Postkapillaren und Venen, etc. (Sewell, 1966).

Weiterhin führten Hinweise auf eine gestörte Mikrozirkulation wie z.B. Stase im Kapillarbett bei mikroskopischer Betrachtung der Kammern unter Durchleuchtung zum Ausschluss des entsprechenden Versuchstieres.

3.1.3.4 Makroskopische Dokumentation

Vor Durchführung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einer Digitalkamera (Nikon Coolpix 995; Nikon Corp, Tokio, Japan) Übersichtsaufnahmen der Rückenhautkammern im Auflicht und unter Durchleuchtung angefertigt. Die Tiere wurden hierfür wie schon bei der Implantation der Tumorzellen in einer Plexiglasröhre auf der Plexiglasbühne fixiert. Die Positionierung der Tiere unter der Kamera und der Fokus der Kamera wurden so gewählt, dass das gesamte Präparationsareal mit Tumor und umgebendem Sprengring zur Darstellung kam (s. Abb. 4). Die Übersichtsaufnahmen dienten zum einen der Dokumentation der Tumore zur Bestimmung der Tumorphäche. Zum anderen erfolgte eine letzte Kontrolle der Kammern auf Unversehrtheit vor Einschluss der Tiere in eine der Versuchsgruppen.

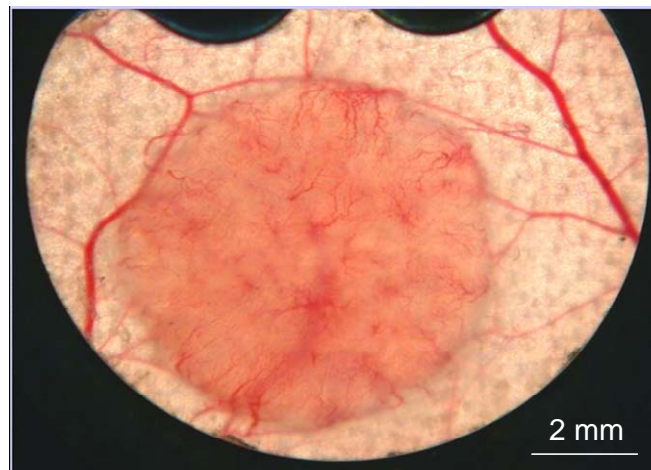


Abb. 4: Übersichtsaufnahme einer Kammerpräparation unter Durchleuchtung. Man erkennt einen gegenüber dem normalen Kammergewebe gut abgrenzbaren Tumor. Von den subkutanen Gefäßen ausgehend hat eine Neovaskularisation des Tumorgewebes eingesetzt. Es finden sich keine Anzeichen für eine Entzündung der Präparation.

3.1.4 Das subkutane Tumormodell

Um eine ausreichende Größe der Tumore für die Histologie zu gewährleisten, wurde ein subkutanes Tumormodell gewählt, welches in der Vergangenheit bereits mehrfach in unserer Arbeitsgruppe zum Einsatz kam (Weiss et al., 1990a; Buerkle et al., 2002; Krasnici et al., 2003). Die Injektion von Tumorzellen erfolgt hierbei unter die Rückenhaut der Hamster.

Für die Injektion der Zellen erhielten die Tiere eine Narkose (siehe 3.1.3.1). Anschließend wurde der gesamte Rücken der Tiere mit einem Langhaarrasierer rasiert und chemisch depiliert (Pilca® med Creme, Asid Bonz GmbH). Nach Desinfektion der Haut mit 72%-igem Alkohol (Cutasept®, Bode Chemie) erfolgte eine Lagerung der Tiere auf einer Wärmeplatte zum Schutz vor Auskühlung. Mit Hilfe einer Einmalkanüle (27 Gauge; B Braun AG) wurden 10 µl ($\sim 2 \times 10^6$ Zellen) der vorbereiteten Tumorzellsuspension aus der Insulinspritze (siehe 3.1.2) subkutan im lumbosakralen Bereich der Rückenhaut injiziert.

3.1.5 Venöser Zugang

Einen Tag vor Therapiebeginn wurden die Tiere mit einem Verweilkatheter in der rechten Vena jugularis interna versehen. Hierfür wurden die Tiere narkotisiert (100 mg/kg KG Ketavet®, 10 mg/kg KG Rompun®) und die rechte Regio jugularis freigelegt. Nach mikrochirurgischer Darstellung der Vena jugularis interna unter dem Operationsmikroskop wurde das Gefäß nach kranial mit Seide ligiert (Perma-Handseide 4-0, Ethicon, Nordstedt), inzidiert und ein Ende eines 20 cm langen Polyethylenkatheters (PE 10, 0,28 mm ID, Portex, Hythe, UK) bis kurz vor das rechte Herz eingeführt. Der Katheter wurde durch zwei vorgelegte Seidenfäden mit Einzelknopfnähten an der Vene fixiert. Das freie Ende des Katheters wurde nach Untertunnelung der Haut im zervikalen Bereich der Rückenhaut ausgeleitet und dort eingenäht, wobei eine Länge von ca. einem Zentimeter als Spielraum für Kopfbewegungen des Tieres gewährleistet wurde, um Zugkräfte auf den Katheter zu vermeiden. Bis zur Durchführung der Experimente wurde der Katheter am distalen Ende verknotet, zusammengerollt und mit Leukosilk (3M Health Care, Neuss) zum Schutz vor Verletzungen durch das Versuchstier verklebt.

3.2 Ex vivo Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten

Um eine separate Visualisierung der Thrombozyten und der Tumormikrozirkulation während der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen, kamen Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren zum Einsatz.

Die Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten erfolgte *ex vivo* nach dem von Massberg et al. etablierten Protokoll in der Modifikation von Manegold et al. (Massberg et al., 1998; Manegold et al., 2003). Als Marker wurde Carboxyfluorescein-diazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine nicht fluoreszierende Vorstufe, welche nach passiver Diffusion und intrazellulärer Spaltung durch Esterasen den grün fluoreszierenden, stabilen Fluorophor Carboxyfluorescein-Succinimidylester (CFSE; Absorptionsmaximum 492 nm, Emissionsmaximum 518 nm) bildet. Diese enzymatische Reaktion findet vor allem in Plättchen und Leukozyten statt. Der Einsatz von CFDA-SE bietet gegenüber anderen Farbstoffen den Vorteil einer lang anhaltenden Markierung korpuskulärer Blutbestandteile durch Reaktion des Fluorophors mit Aminogruppen intrazellulärer Proteine. Hierdurch ist eine Visualisierung über mehrere Stunden möglich (Suematsu et al., 1994; Katayama et al., 2000).

3.2.1 Blutentnahme am Spendertier

Zur Isolierung syngener Thrombozyten wurden pro Versuch 2 ml Vollblut bei einem Spendertier entnommen. Hierfür wurden 400 µl Alsevers Puffer (41,0 g Glukose-Monohydrat, 16,0 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 1,1 g Zintronensäure-Monohydrat, 8,4 g Natriumchlorid, pH 6,2; Apotheke Klinikum Innenstadt der Universität München) und 40 µl Prostaglandin E₂ (PGE₂; 20ng/ml; Serva, Heidelberg) in einer 2-ml Spritze aufgezogen.

Die Blutentnahme erfolgte unter Narkose (siehe 3.1.3.1) in Rückenlage der Tiere durch Punktion des Herzens mit einer Einmalkanüle (20 Gauge; Becton Dickinson, Heidelberg). Nach der Blutentnahme wurden die Tiere durch eine intrakardial verabreichte Überdosis der Narkosemischung getötet.

3.2.2 Isolierung und Markierung der Thrombozyten

Das entnommene Blut wurde zu gleichen Teilen auf zwei Polypropylen-Röhrchen (12 x 75 mm; Greiner Labortechnik) mit jeweils 500 µl Phosphatpuffer (PBS ohne Kalzium, ohne Magnesium; PanSystems) aufgeteilt und mit 130 x g für 10 Minuten zentrifugiert (Rotina 35R; Hettich Zentrifugen). In der Zwischenzeit wurden zwei weitere Polypropylenröhrchen mit jeweils 1500 µl PBS (ohne Calcium, ohne Magnesium; PanSystems), 300 µl Alsevers (Apotheke Klinikum Innenstadt der Universität München) und 50 µl PGE₂ vorbereitet. Das plättchenreiche Plasma, welches sich als Überstand von den übrigen Blutbestandteilen separiert hatte, wurde mit einer Mikroliterpipette (200 µl, Eppendorf, Hamburg) vorsichtig in

die zuvor präparierten Röhren abpipetiert. Im nächsten Schritt wurde der Fluoreszenzmarker CFDA-SE (Molecular Probes, Eugene, USA) in einer Konzentration von 0,75 µl/ml zugegeben und der Ansatz für 5 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurden die Röhren mit 1430 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Thrombozytenpellet am Boden der Röhren wurde nach Abgießen des Überstandes mit je 350 µl PBS (ohne Calcium, ohne Magnesium; PanSystems) resuspendiert und der Inhalt beider Röhren vereinigt. Die Konzentration der Thrombozytensuspension wurde mittels A^CT Counter (Coulter Corp, Miami, USA) bestimmt.

3.3 Durchflusszytometrie

Um die Auswirkungen einer Therapie mit EndoTAG[®]-1 auf den Aktivierungsgrad von Thrombozyten zu untersuchen, wurden im Vorfeld der intravitalmikroskopischen Versuchsreihen *in vitro* Analysen mittels Durchflusszytometrie (FACScan) durchgeführt.

In der Durchflusszytometrie kann eine Aktivierung von Thrombozyten auf unterschiedliche Weise nachgewiesen werden. Betrachtet man die typische Punkteverteilung der Thrombozyten im Vorwärts-/Seitwärtsstreulicht aufgrund ihrer Größe und Granularität, so sieht man nach Aktivierung eine deutliche Verlagerung der Verteilung basierend auf einer Formveränderung der Thrombozyten. Des weiteren präsentieren aktivierte Thrombozyten spezifische Adhäsionsmoleküle wie z.B. GPIIb/IIIa oder P-Selektin (CD-62), die anhand direkter Immunfluoreszenz durchflusszytometrisch nachgewiesen werden können (Ruf and Patscheke, 1995).

Da die zu diesem Zweck im Handel erhältlichen fluoreszenzmarkierten Antikörper nicht für Untersuchungen am Hamster geeignet sind, wurden stellvertretend humane Thrombozyten untersucht. Hierfür wurde unter freiwilliger Einwilligung bei sechs gesunden Probanden der Arbeitsgruppe eine venöse Blutentnahme durchgeführt. Das entsprechende Versuchsprotokoll wird unter 4.1.1 detailliert beschrieben. Die anschließenden Messungen erfolgten am FACSort flow cytometer (Becton Dickinson, Heidelberg). Bei allen Proben wurde im FACSort nach 50.000 registrierten Ereignissen abgebrochen. Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der CELLQuest Software (Becton Dickinson) aufgearbeitet und graphisch dargestellt.

3.4 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Untersuchung und quantitative Analyse des Tumorgefäßsystems und der Tumormikrozirkulation sowie der Thrombozyten-Endothelinteraktionen *in vivo* erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

3.4.1 Fluoreszenzmarkierung von Dextran

Zur Darstellung der Gefäße in der intravitale Fluoreszenzmikroskopie haben sich fluoreszierende Dextrane als Plasmamarker bewährt. Durch homogene Verteilung nach intravenöser Applikation ermöglichen sie eine Visualisierung des funktionellen Gefäßsystems und eine Quantifizierung des Blutflusses. In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe wurde bei der Analyse intratumoraler Gefäße, die sich unter anderem durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität auszeichnen, in der Regel hochmolekulares (MW 500 kD), mit Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran verwendet (Buerkle et al., 2002a; Strieth et al., 2004; 2006). Da es hierbei jedoch zu Interferenzen mit dem Fluoreszenzspektrum CFSE-markierter Thrombozyten kommt, war es notwendig für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit einen alternativen Plasmamarker einzusetzen. Es wurde daher in Anlehnung an Manegold et al. hochmolekulares Dextran mit dem aminoreaktiven Fluoreszenzfarbstoff Carboxytetramethylrhodamin-Succinimidylester (5-TAMRA-SE, Absorptionsmaximum 567 nm, Emissionsmaximum 594 nm) markiert (Manegold et al., 2003).

Das Verfahren hierzu basiert auf einem modifizierten Protokoll zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen (Brinkley, 1992; Haugland, 1995). Die Markierung erfolgt durch Reaktion einer an das Dextran gekoppelten Aminogruppe mit dem Succinimidylester des Fluorophors.

Zunächst wurden 10 mg 5-TAMRA-SE (MW 528 D; Molecular Probes, Eugene, USA) in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva, Heidelberg) gelöst. Lyophilisiertes Amino-Dextran (MW 500 kD; Molecular Probes) wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in Natriumbikarbonatpuffer (Nabic 8,4; Serga-Wiessner GmbH, Naila) bei Raumtemperatur durch 30-minütiges Rühren auf einem Magnetrührer (500 U/min; RETbasic; IKA Labortechnik, Staufen) rekonstituiert. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgte sodann durch Zugabe der Farbstofflösung in einer Konzentration von 100 µl/ ml Dextranlösung und

anschließende Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss und kontinuierlichem Rühren auf dem Magnetrührer (500 U/min).

Die Entfernung von nicht-konjugiertem, überschüssigem Farbstoff erfolgte über eine Polypropylen-Gelfiltrationssäule (Econo-Pac 10 DG desalting Column; Bio-Rad, München), die mit 10 ml Gel (Biogel P-6DG-gel, Ausschlussgrenzen 1.000-6.000 Dalton; Bio-Rad) beladen war. Zuletzt wurde die Lösung des 5-TAMRA-Dextrans steril filtriert (Minisart®, 1,2 µm; Sartorius, Göttingen), in 1 ml-Insulinspritzen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.4.2 Aufbau des intravitalmikroskopischen Arbeitsplatzes

Der intravitalmikroskopische Arbeitsplatz wurde unter funktionellen Aspekten gestaltet und beinhaltet eine Verbindung von Mikroskop, Computersystem und Videodokumentationseinheit für die spätere Offline-Analyse. Hierdurch werden eine bedienerfreundliche Handhabung und eine Standardisierung der Untersuchungen ermöglicht (Harris et al., 1997).

Zur Ausstattung der intravitalmikroskopischen Untersuchungseinheit gehören:

- Labormikroskop (Axiotech vario; Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen)
- elektronisch steuerbarer Objektisch (x-y Richtung) mit integrierter fiberoptischer Durchlichtquelle (Fa. Märzhäuser, Wetzlar)
- Objektive verschiedener Vergrößerungsstufen (Plan-Neofluar ® x 4; 10; 20; Zeiss)
- Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 103 W/2; Zeiss)
- Reflektorschieber 3FL mit Filterset 09 (Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm; Zeiss) und Filter Set 14 (Exzitation 510-560 nm, Emission 590 nm; Zeiss)
- SIT-Videokamera (C2400-08; Hamamatsu, Herrsching)

Anhand eines Mikro/Makroantriebs ist die manuelle Feinfokussierung des untersuchten Gewebeareals möglich. Die Steuerung des Objektisches unter dem Mikroskop erfolgt mit einem Schrittmotor, welcher von einem Computer aus mit Hilfe einer speziellen Software (KS 400, Zeiss) bedient wird. Bei jedem Start des Systems erfolgt eine automatische Zentrierung des Objektisches. Von diesem Referenzpunkt ausgehend können ausgewählte Areale anhand ihrer Koordinaten gespeichert und so im Verlauf der Untersuchung wiederholt aufgesucht werden. Die unterschiedlichen Fluoreszenzfilter können abwechselnd in den Lichtweg des Mikroskops eingebracht werden. Darüber hinaus verfügt die Filterleiste über

eine Position ohne Fluoreszenzfilter, so dass eine Untersuchung des Gewebes im Durchlicht möglich ist.

Die Bilder der Videokamera werden direkt online auf einem Videomonitor sichtbar gemacht. Gleichzeitig können mit einem 3/4 Zoll Videorekorder (Video Cassette Recorder 7330; Panasonic Deutschland, Hamburg) die Aufnahmen auf S-VHS Videoband für die spätere offline Analyse festgehalten werden. Ein zwischengeschalteter Videozeitgenerator (VTG 33; FOR-A-Company Ltd., Japan) erlaubt eine Dokumentation von Datum und Uhrzeit auf dem Videoband.

3.4.3 Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie und Videobildanalyse

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Versuchstiere wie zuvor beschrieben (s. 3.1.2.2) in Plexiglasröhren immobilisiert. Mit Hilfe der Plexiglasbühne wurden sie so auf dem Objektisch positioniert, dass die Rückenhautkammer horizontal unter dem Fluoreszenzmikroskop zu liegen kam und man durch Verschieben des Tisches das gesamte Präparationsareal mikroskopisch einsehen konnte. Die Bühne wurde zusätzlich mit Drehschrauben auf dem Objektisch befestigt. Eine Narkose war für den Zeitraum der Untersuchung nicht notwendig, da sich die Tiere in den Plexiglasröhren gewöhnlich ruhig verhielten und die Rückenhautkammer auf der Bühne ausreichend fixiert war.

Zunächst wurde die gesamte Kammerpräparation mit einem 4-fach-Objektiv unter Durchleuchtung begutachtet. Alle anderen intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit dem 20-fach-Objektiv. Der weitere Ablauf der Fluoreszenzmikroskopie unterschied sich entsprechend der beiden *in vivo* Versuchsprotokolle und wird später im Detail erklärt (siehe 4.2.2. und 4.3.2.). Grundsätzlich erfolgte die Transfusion CFSE-markierter Thrombozyten über den zuvor gelegten Jugulariskatheter vor Beginn der Aufnahmen. Die Tiere erhielten dabei jeweils 200×10^6 Thrombozyten, entsprechend ~ 5-10% der physiologischen Thrombozytenzahl eines Hamsters (Hrapkiewicz et al., 1998). Nach Spülung des Katheters mit 0,9% Kochsalzlösung wurde für 5 Minuten gewartet, um eine homogene Verteilung der Thrombozyten im Blutkreislauf zu gewährleisten. Die Visualisierung der Thrombozyten in der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie erfolgte durch Epi-Illumination unter Verwendung des Zeiss Filterset 09 (Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm). Die Aufzeichnung pro ROI (region of interest) betrug ca. 30 Sekunden.

Zur Darstellung des Blutflusses in den Gefäßen wurden 50-100 µl der 2%-igen TAMRA-Dextranlösung langsam über den Katheter gegeben und dieser erneut mit 0,9% Kochsalzlösung nachgespült. Nach Wechsel der Fluoreszenzfilter konnte durch

Fluoreszenzanregung mit dem Zeiss Filterset 14 (Exzitation 510-560 nm, Emission 590 nm) das rasche Anfluten des Dextrans beobachtet werden. Mit Hilfe der Computersteuerung wurden die zuvor ausgewählten ROIs aufgesucht und die Mikrozirkulation in den entsprechenden Regionen auf Videoband festgehalten. Hierbei wurde darauf geachtet, die Belichtungszeiten möglichst kurz zu halten, um phototoxische Effekte im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie zu minimieren (Steinbauer et al., 2000). Sämtliche Therapiesubstanzen wurden intravenös als kontinuierliche Infusion über 90 Minuten mittels eines Perfusors verabreicht.

Die Auswertung der intravitalmikroskopischen Videoaufnahmen erfolgte offline durch ein Bildanalysesystem (Cap Image; Zeintl, Heidelberg) (Klyscz et al., 1997). Dieses setzt sich aus einem Personalcomputer mit Bildbearbeitungskarte (IP-8/AT; Matrox, Kanada) und einem Videorekorder (AG-7350; Panasonic, Hamburg) mit Videomonitor (PVM 1442QM; Sony; Köln) zusammen. Eine Verbindung zwischen PC und Videogerät besteht über eine RS-232 Schnittstelle. Das System ermöglicht sowohl die quantitative Analyse der Mikrozirkulation (s.4.2.3) als auch der Thrombozyten-Endothelinteraktionen (s. 4.2.4).

3.5 Histologie

Neben der Quantifizierung von Thrombozyten-Endothelinteraktionen mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie erfolgte durch Analyse histologischer Schnitte eine qualitative Beurteilung der Verteilung von Thrombozyten und Wirksubstanzen im Gefäßsystem des Tumors. Hierfür dienten Tiere, denen zuvor Tumorzellen unter die Rückenhaut injiziert worden waren (s. 3.1.3). Die Methoden zur Aufbereitung der Tumore nach Ablauf des Versuchs werden im Folgenden kurz dargestellt:

Als Fixiermedium diente 1%-ige Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (Merck, Darmstadt), welche am Versuchstag durch Verdünnung mit Phosphatpuffer (PBS mit Kalzium, mit Magnesium; Pansystem) hergestellt wurde. Die Fixierung erfolgte durch systemische Perfusion der Tiere mit 37 °C warmem Fixiermedium für 2 Minuten unter physiologischen Druckverhältnissen (~ 120 mm Hg). Alle Schritte wurden unter Halothan-Inhalationsnarkose der Tiere (1,3 vol % in O₂/N₂ 2:1) wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurden die Tiere in Rückenlage auf einem Operationstisch positioniert. Nach Darstellung des Bauchraumes und der Zwerchfelle erfolgte die transdiaphragmale Eröffnung des Thorax. Das Herz wurde aufgesucht, der linke Ventrikel inzidiert und mit der Injektionsnadel kanüliert. Um eine Dislokation der Nadel zu verhindern, wurde diese mit einem Klemmchen befestigt. Zusätzlich wurde der rechte Ventrikel eröffnet, um einen Ablauf

für das Fixiermedium zu schaffen. Sodann wurde die Perfusion gestartet. Insgesamt dauerte die Präparation bis zum Perfusionsbeginn 1,5-2 Minuten. Von einer erfolgreichen Fixierung wurde ausgegangen, wenn es unter Perfusion zu einem Abblassen der intraabdominellen Organe kam und das abfließende Perfusat klar wurde. Anschließend wurden die Tumore entnommen und für mindestens 4 Stunden in 1%-iger PFA-Lösung bei 4°C nachfixiert. Zur Kryoprotektion wurden die Tumore in 20% Saccharoselösung (Merck) überführt und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Danach wurden sie bis zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren, in Aluminiumfolie eingepackt und bei -80° C aufbewahrt.

Zur feingeweblichen Untersuchung der Tumore wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Hierfür wurden die Präparate zunächst für eine Stunde bei -20°C gelagert. Anschließend wurden sie auf dem Metallträger des Cryostat (Microm HM 560; Microm International GmbH, Walldorf) in Tissue Tek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holland) eingebettet und durch Anfrieren befestigt. Jeweils 8-10 der angefertigten Schnitte wurden auf einem Objektträger (Super Frost® Plus, Fa. Menzel, Braunschweig) aufgenommen und bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss getrocknet, um ein Verblässen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Anschließend wurden die Schnitte bis zur Durchführung der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie bei -20° aufbewahrt.

3.6 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Analyse der Tumorgefrierschnitte erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Zeiss LSM 510, Göttingen). Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird das Objekt bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie Punkt für Punkt und in einer dünnen Fokusebene, die man schrittweise verschieben kann, aufgenommen. Damit erlaubt dieses Verfahren eine exakte Lokalisierung fluoreszierender Strukturen im untersuchten Gewebe. Durch den Einsatz Rhodamin-markierter Therapiesubstanzen konnte deren Verteilung im Tumorgefäßsystem beurteilt werden. Gleichzeitig war eine davon getrennte Visualisierung CFSE-markierter Thrombozyten aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzspektren möglich. Durch abwechselnde Betrachtung des Tumorgewebes in den unterschiedlichen Fluoreszenzfiltern ließ sich eine Aussage über eine eventuelle Kolo-kalisation von Liposomen und Thrombozyten im Gefäßsystem des Tumors treffen. Zur besseren Kontrastierung wurden zusätzlich die Tumorzellen mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI; Vector laboratories, Burlingame) gegengefärbt. Die verschiedenen Fluoreszenzmarker wurden mit folgenden Filtern detektiert: Dapi (BP390-465), CFDA-SE (BP500-550) und Rhodamin (BP565-615).

4. Versuchsprotokolle

4.1 *In vitro* Versuche

Im Vorfeld der *in vivo* Studien wurde anhand durchflusszytometrischer Messungen *in vitro* untersucht, ob Thrombozyten durch den Kontakt mit unbeladenen kationischen Liposomen bzw. EndoTAG[®]-1 (Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen) aktiviert werden. Die Untersuchungen erfolgten an humanem Vollblut nach folgendem Protokoll:

4.1.1 Versuchsaufbau

Für die Blutentnahme wurden 200 µl Natriumcitrat (3,8%; Apotheke des Klinikum Großhadern) in 10-ml Spritzen aufgezogen. Nach Entnahme von insgesamt 10 ml Blut mit einer Einmalkanüle wurde das Citrat-Blut auf vier Polypropylen-Röhrchen (Greiner Labortechnik) verteilt. Die Proben wurden nun zunächst für 15 Minuten mit den Wirksubstanzen inkubiert. Dann wurden je 5 µl in FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) mit 100 µl Phosphatpuffer (PBS, mit Calcium, mit Magnesium; PanSystems) verdünnt. Zu jedem Ansatz wurden 5 µl eines mit Phycoerythrin-markierten, monoklonalen Antikörpers (IgG1) gegen humanes P-Selektin (mouse anti-human CD62P; Becton Dickinson) gegeben und anschließend für weitere 10 Minuten unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde pro Ansatz 1 ml PBS (mit Calcium, mit Magnesium; PanSystems) hinzugefügt. Sofort im Anschluss erfolgte die Messung mit dem FACSort flow cytometer (Becton Dickinson).

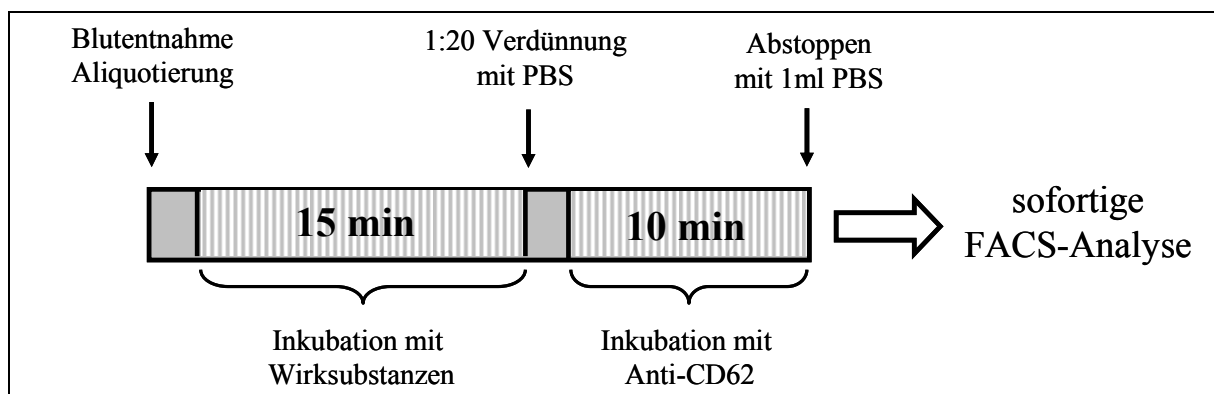


Abb. 5: Versuchsprotokoll zur FACS-Analyse des Aktivierungsgrades von Thrombozyten nach Stimulation mit kationischen Liposomen und EndoTAG[®]-1.

4.1.2 Versuchsgruppen

Der Aktivierungsgrad der Thrombozyten wurde nach Stimulation mit unbeladenen kationischen Liposomen und EndoTAG[®]-1 analysiert. Um den Konzentrationsverhältnissen zu entsprechen, die im Versuchstier nach intravenöser Gabe der Therapiesubstanzen (Injektionsvolumen 10 ml/kg KG) bei einem zirkulierenden Blutvolumen von 65-80 ml/kg KG vorliegen, wurden pro Milliliter humanem Vollblut 150 µl der jeweiligen Wirksubstanz zugegeben. Als Positivkontrolle wurde mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) in einer Endkonzentration von 10⁻⁶ Molar stimuliert. Als Negativkontrolle diente eine Gruppe, die lediglich mit Phosphatpuffer (PBS, mit Calcium, mit Magnesium, PanSystems) inkubiert worden war (s. Tab. 1).

Versuchsgruppen	Wirksubstanz	Anzahl
Gruppe 1	unbeladene kationische Liposomen	n = 6
Gruppe 2	EndoTAG [®] -1 (5mg/kg KG Paclitaxel)	n = 6
Positivkontrolle	Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	n = 6
Negativkontrolle	Phosphatpuffer (PBS)	n = 6

Tab. 1: Versuchsgruppen zur Untersuchung des Aktivierungsgrades von Thrombozyten nach Stimulation mit kationischen Liposomen bzw. EndoTAG[®]-1.

4.1.3 Messparameter

Als Aktivierungsmarker diente das Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD-62), welches nach Stimulation der Thrombozyten aus intrazellulären α -Granula freigesetzt und auf der Oberfläche präsentiert wird (Williams et al., 1995). Die Ergebnisse wurden angegeben als prozentualer Anteil CD-62 positiver Thrombozyten an der Gesamtpopulation sowie als mittlere Fluoreszenzintensität pro Thrombozyt.

4.2 *In vivo* Versuche mit akutem Versuchsablauf

Zur weiteren Klärung der Fragestellung wurde im Rahmen der *in vivo* Versuche zunächst eine Versuchsreihe durchgeführt, bei der die akuten Effekte einer einmaligen Therapie mit EndoTAG[®]-1 auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen und die Mikrozirkulation im Tumor und Normalgewebe untersucht wurden. Hierfür wurde folgendes Protokoll gewählt:

4.2.1 Versuchsaufbau

6-8 Tage nach Implantation von Tumorzellen ($\sim 2 \times 10^5$ Zellen) in die transparente Rückenhautkammer erfolgte die randomisierte Zuteilung der Versuchstiere ($n = 18$) in die verschiedenen Versuchsgruppen.

Vor Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchung erhielten die Tiere eine Transfusion von 200×10^6 CFSE-markierten Thrombozyten über den Jugulariskatheter. Nach einer 5-minütigen Zirkulationszeit wurde eine Aufnahme der Thrombozyten-Endothelinteraktionen zu Ausgangsbedingungen angefertigt (*Baseline Thrombozyten*, Zeitpunkt -30 Minuten). Hierfür wurden je 6 ROIs (regions of interest) im Tumor und 2 ROIs im Normalgewebe festgelegt und ihre Koordinaten gespeichert. Danach wurden zur Visualisierung des Blutflusses in den Gefäßen 50-100 μ l TAMRA-Dextran injiziert und die Mikrozirkulation vor Therapiebeginn in denselben ROIs fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert (*Baseline Mikrozirkulation*, Zeitpunkt -15 Minuten vor Therapie).

Zum Zeitpunkt 0 wurde mit der jeweiligen Therapie begonnen, wobei die entsprechenden Substanzen kontinuierlich über 90 Minuten infundiert wurden. Am Ende der Infusion wurden die zuvor festgelegten ROIs anhand ihrer Koordinaten mit dem x-y steuerbaren Objektisch erneut aufgesucht und Aufnahmen der Thrombozyten-Endothelinteraktionen und der Mikrozirkulation angefertigt (Zeitpunkt 90 Minuten). Abschließend wurden die Tiere mit einer Überdosis Ketavet®/Rompun® (Pharmacia GmbH/Bayer) geopfert.

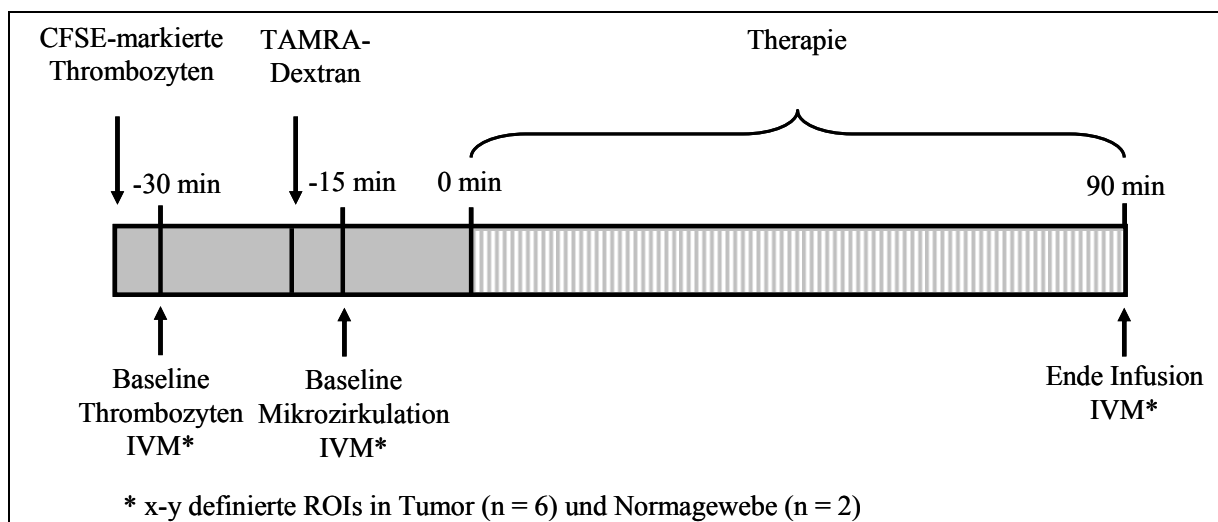


Abb. 6: Versuchsprotokoll zur Quantifizierung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen und der Tumormikrozirkulation unter akuten Therapiebedingungen.

IVM = in vivo Mikroskopie

4.2.2 Versuchsgruppen

In einer vorausgegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit konventionellem Paclitaxel (Bristol-Myers-Squibb) keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum und die Mikrozirkulation von A-Mel-3 Tumoren hat und sich nicht von einer Therapie mit 5%-iger Glukose (Lösungsmittel) unterscheidet (Strieth et al., 2004). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine Kontrollgruppe mit 5%-iger Glukose verzichtet. Als Kontrollsubstanzen zur Therapie mit EndoTAG[®]-1 (20 mM Lipiddosis) dienten Taxol[®] und unbeladene kationische Liposomen (20mM Lipiddosis). Das Injektionsvolumen betrug in allen Gruppen 10 ml/kg KG. Eine Übersicht über die Versuchsgruppen bietet Tabelle 2.

Versuchsgruppe	Wirksubstanz	Anzahl
Gruppe 1	Taxol [®] (5mg/kg KG Paclitaxel)	n = 6
Gruppe 2	unbeladene kationische Liposomen	n = 6
Gruppe 3	EndoTAG [®] -1 (5mg/kg KG Paclitaxel)	n = 6

Tab. 2: Versuchsgruppen zur Untersuchung der akuten Effekte einer einmaligen Therapie mit EndoTAG[®]-1 auf Thrombozyten-Endothelinteraktionen und die Tumormikrozirkulation.

4.2.3 Messparameter: Tumorwachstum und Mikrozirkulation

Die Quantifizierung des Tumorwachstums und der Tumormikrozirkulation erfolgte durch Messung folgender Parameter:

- Tumorfläche [mm²]
- Gefäßdurchmesser (d) [µm]
- Funktionelle Gefäßdichte (fvd) [cm⁻¹]
- Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC}) [mm/s]
- Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex [µm²/s]

4.2.3.1 Tumorfläche

Vor Einschluss der Tiere in eine Versuchsgruppe wurde die Fläche, welche der Tumor in der Kammerpräparation einnimmt, ausgemessen, um eine gleiche Ausgangsgröße und damit ein vergleichbares Wachstumsstadium der Tumore zu gewährleisten. Hierzu wurde die

Tumorfläche in der digitalen Übersichtsaufnahme der Rückenhautkammer (s. 3.1.2.4.) mit der Software KS 400 (Karl Zeiss) planimetrisch bestimmt (s. Abb. 7).

4.2.3.2 Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser wurden mit dem Bildanalyse-System *Cap-Image* interaktiv bestimmt. Durch Messung an verschiedenen Stellen des Gefäßes (mind. 3) wurden Kaliberschwankungen berücksichtigt. Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung wurde das arithmetische Mittel der Einzelwerte berechnet (s. Abb. 8)

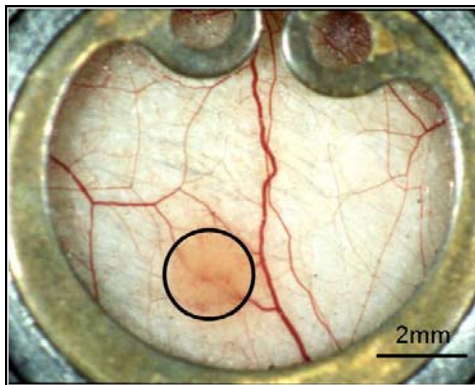


Abb. 7: Planimetrische Messung der Tumorfläche [mm^2] in einer Übersichtsaufnahme der transparenten Rückenhautkammer

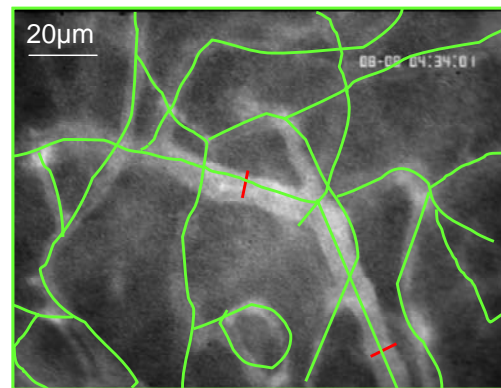


Abb. 8: Bestimmung von Durchmesser und funktioneller Gefäßdichte an einem Standbild der mit TAMRA-Dextran kontrastierten Gefäße.

Durchmesser [μm]

Funktionelle Gefäßdichte [cm^{-1}]

4.2.3.3 Funktionelle Gefäßdichte

Die funktionelle Gefäßdichte ist definiert als Gesamtlänge aller perfundierten Gefäße bezogen auf das Messareal. Sie stellt ein Maß für die nutritive Versorgung des Gewebes dar (Nolte et al., 1995) und ist ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Angiogeneseprozesses (Dellian et al., 1996). Anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen kann die funktionelle Gefäßdichte mit der *Cap-Image* Software quantifiziert werden. Hiefür wurden bei der Auswertung der Videoaufnahmen alle mit Plasmamarker perfundierten und somit kontrastierten Gefäße des jeweiligen ROIs digital nachgezeichnet. Nicht berücksichtigt wurden Gefäße, die sich in der Fluoreszenzmikroskopie kontrastlos darstellten, da hier keine

Perfusion vorlag. Die Berechnung der Gesamtlänge der Gefäße und der daraus resultierenden funktionellen Gefäßdichte erfolgte algorithmisch (s. Abb. 8).

4.2.3.4 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten wurde mit der Line-Shift-Diagramm-Methode (LSD-Methode; (Klyscz et al., 1997) ermittelt. Im Standbildmodus wurde zunächst in das zu untersuchende Gefäß eine zum Gefäßverlauf parallele Messlinie eingezeichnet. Dann wurde das Videoband gestartet und eine Bildsequenz von 10 Sekunden ausgewertet. Während dieser Zeit wurden für jedes Halbbild die Grauwerte entlang der Messlinie registriert und daraus im Bildspeicher ein Line-Shift Diagramm erzeugt. In diesem werden die Grauwertdaten als vertikale Linien nebeneinander geschrieben, wobei die Länge der x-Achse der Messperiode (10 sec) und die Länge der y-Achse der Messlinie entspricht. Ein entlang der Messlinie bewegter Erythrozyt erzeugt im Diagramm eine je nach Geschwindigkeit mehr oder weniger steil verlaufende schräge Linie, da er sich von Halbbild zu Halbbild über die Zeit entsprechend seiner Flussrichtung jeweils ein Stückchen weiter bewegt hat. Aus der Steigung dieser Linie wird die Geschwindigkeit (= ds/dt) berechnet.

4.2.3.5 Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex

Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex stellt ein Maß für die Durchblutung des Tumors dar und errechnet sich aus der funktionellen Gefäßdichte (fvd) und dem Blutvolumenfluss (Q) [pl/s] (Strieth et al., 2004). Hierfür wurde zunächst der Blutvolumenfluss nach einer modifizierten Formel von Baker und Wayland berechnet (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 der oben genannten Parameter wie folgt errechnet:

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

4.2.4 Messparameter: Thrombozyten-Endothelinteraktion

Zur Beurteilung der Thrombozyten-Endothelinteraktion wurden folgende Parameter bestimmt:

- Thrombozytenflux [1/mm/s]
- Thrombozytenadhärenz_{Gefäß} [1/mm²]

4.2.4.1 Thrombozytenflux

Der Thrombozytenflux wurde definiert als Anzahl der Thrombozyten, die pro Zeiteinheit eine imaginäre Linie senkrecht zur Gefäßachse passieren. Hierfür wurde eine entsprechende Linie im Standbild markiert und anschließend eine Videosequenz von 30 Sekunden Dauer ausgewertet. Die Angabe der Werte erfolgte in Anzahl pro Millimeter und Sekunde.

4.2.4.2 Thrombozytenadhärenz_{Gefäß}

Als adhärenz wurden Thrombozyten bezeichnet, welche über einen Zeitraum von 30 Sekunden an der Gefäßwand hafteten. Zur Identifizierung solcher Thrombozyten wurden alle stationären Thrombozyten markiert und über einen entsprechenden Zeitraum beobachtet. Diejenigen Thrombozyten, die sich nach 30 Sekunden weiterhin an der markierten Stelle befanden, wurden ausgezählt und ihre Anzahl pro Quadratmillimeter Gefäßoberfläche angegeben.

4.3 *In vivo* Versuche mit chronischem Versuchsablauf

In einer zweiten *in-vivo* Versuchsreihe sollten die Effekte einer wiederholten Therapie mit EndoTAG[®]-1 auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor untersucht werden. Auf eine erneute Analyse der Mikrozirkulation unter chronischen Therapiebedingungen wurde verzichtet, da hierzu Ergebnisse aus einer vorausgegangenen Studie von Strieth et al. vorliegen. Hier konnte gezeigt werden, dass bereits eine 3-malige Gabe von EndoTAG[®]-1 signifikante Auswirkung auf die Mikrozirkulation in A-MEL 3 Tumoren hat (Strieth et al., 2004). Das Protokoll für den chronischen Versuch wurde in Anlehnung an diese Studie gestaltet.

4.3.1 Versuchsaufbau

Zwei Tage nach Kammerpräparation wurden einem Teil der Tiere ($n = 12$) Tumorzellen in die Rückenhautkammer implantiert (Tag 0). Anschließend erfolgte die Unterbringung in einem Intensivpflege-Inkubator. An Tag 4 nach Tumorzellimplantation wurden die Tiere mit intravenösen Verweilkathetern versehen. Zusätzlich erhielten Tiere ($n = 6$), denen keine Tumorzellen in die Kammerpräparation implantiert worden waren, ebenfalls einen venösen Katheter. An den Tagen 5, 6 und 7 wurden die Tiere therapiert, wobei alle Wirksubstanzen kontinuierlich über 90 Minuten intravenös verabreicht wurden. Da Liposomen nach einem Intervall von 24 Stunden nicht mehr in der Zirkulation nachweisbar sind (Krasnici et al., 2003), wurde mit den intravitalmikroskopischen Untersuchungen bis zum Tag 8 gewartet, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine akute Interaktion von Thrombozyten mit den zirkulierenden Wirksubstanzen sicher auszuschließen. Vor Beginn der Intravitalmikroskopie wurden jedem Tier 200×10^6 CFSE-markierte Thrombozyten transfundiert. Anschließend wurden die Thrombozyten-Endothelinteraktionen nach einer Zirkulationszeit von 15 min in 12 ROIs fluoreszenzmikroskopisch untersucht und auf Videoband dokumentiert.

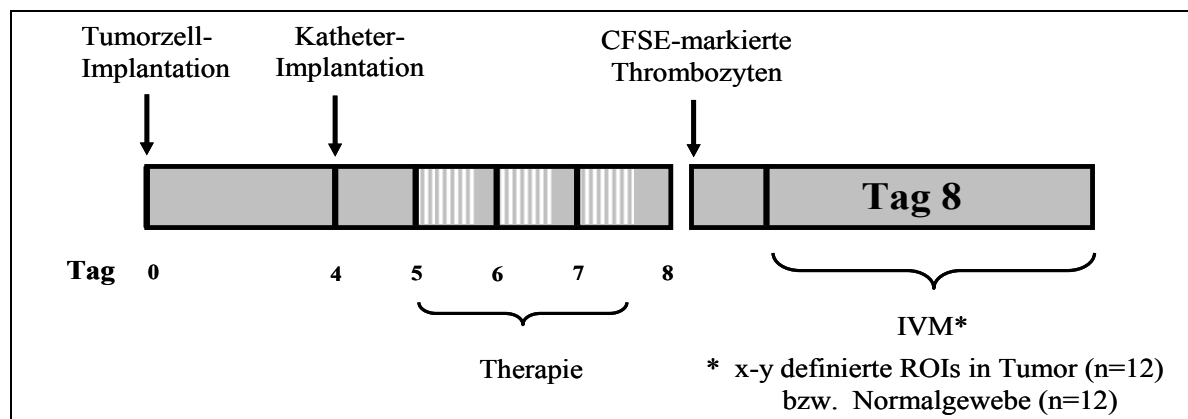


Abb. 9: Versuchsprotokoll zur Quantifizierung der Thrombozyten-Endothelinteraktion unter chronischen Therapiebedingungen. IVM = in vivo Mikroskopie

Tiere mit Tumor in der Rückenhautkammer wurden randomisiert und erhielten entweder unbeladene kationische Liposomen oder EndoTAG[®]-1. Eine zusätzliche Kontrollgruppe wurde von Tieren gebildet, die keine Tumorzellen in die Kammerpräparation implantiert bekommen hatten. Diese als „Normalgewebe-Kontrolle“ fungierende Gruppe erhielt ebenfalls EndoTAG[®]-1. Tabelle 3 fasst die Versuchsgruppen zusammen.

Versuchsgruppe	Tumorimplantation	Wirksubstanz	Anzahl
Gruppe 1	ja	unbeladene kationische Liposomen	n = 6
Gruppe 2	ja	EndoTAG [®] -1 (5mg/kg KG Paclitaxel)	n = 6
Gruppe 3	nein	EndoTAG [®] -1 (5mg/kg KG Paclitaxel)	n = 6

Tab. 3: Versuchsgruppen zur Untersuchung der Thrombozyten- Endothelinteraktionen nach wiederholter Therapie mit EndoTAG[®]-1.

4.3.3 Messparameter

Die Thrombozyten-Endothelinteraktion unter chronischen Therapiebedingungen wurde anhand folgender Parameter quantifiziert:

- Thrombozytenadhärenz_{ROI} [1/mm²]
- Mikrothrombosen [1/mm²]

4.3.3.1 Thrombozytenadhärenz_{ROI}

Bei der Quantifizierung adhärenter Thrombozyten galten die in 4.2.4.2 genannten Definitionskriterien. Es erfolgte eine Normierung auf das Messareal (= ROI). Mit Hilfe der *Cap-Image* Bildanalysesoftware wurden über einen Zeitraum von 30 Sekunden Videobildsequenzen ausgewertet und im untersuchten ROI alle an der Gefäßwand adhärenen Thrombozyten markiert und ausgezählt. Die Angabe erfolgte in Anzahl pro Quadratmillimeter Messareal (= ROI), wobei dieses eine konstante Größe von 0,13 mm² aufwies.

4.3.3.2 Mikrothrombosen

Bei der offline-Analyse der intravitalmikroskopischen Aufnahmen mittels der *Cap-Image* Software wurde eine Ansammlung von mehr als 10 adhärenen Thrombozyten pro 100 µm² als Mikrothrombose definiert, da eine weitere Auflösung einzelner Zellen auf dem Videomonitor mit bloßem Auge unmöglich war. Die Gesamtzahl solcher Mikrothrombosen wurde auf die untersuchte Fläche von Tumor bzw. Normalgewebe (~ 30 mm²) normiert und pro Quadratmillimeter angegeben.

4.4 Histologie/ Laser-Scanning-Mikroskopie

Zusätzlich zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen wurden das Verteilungsmuster der Thrombozyten im Tumor und das Auftreten möglicher Interaktionen mit den Wirksubstanzen nach einmaliger Therapie histologisch evaluiert. Hierzu erfolgte eine qualitative Beurteilung von Tumorgefrierschnitten mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. Das Versuchsprotokoll wurde analog zu den *in vivo* Versuchen mit akutem Versuchsablauf (vgl. 4.2.1.) gestaltet.

4.4.1 Versuchsablauf

8-10 Tage nach Implantation von Tumorzellen ($\sim 2 \times 10^6$ Zellen) unter die Rückenhaut wurden die Tiere ($n = 6$) mit Jugulariskathetern versehen und den Therapiegruppen zugeteilt. Fünf Minuten vor Therapiebeginn wurden jeweils 200×10^6 CFSE-markierte Thrombozyten infundiert. Die anschließende Infusion der Therapiesubstanzen erfolgte kontinuierlich über 90 Minuten mit Hilfe einer Infusionspumpe. Nach Beendigung der Therapie folgte die Fixierung und histologische Aufbereitung der Tumore wie zuvor beschrieben (vgl. 3.5.).

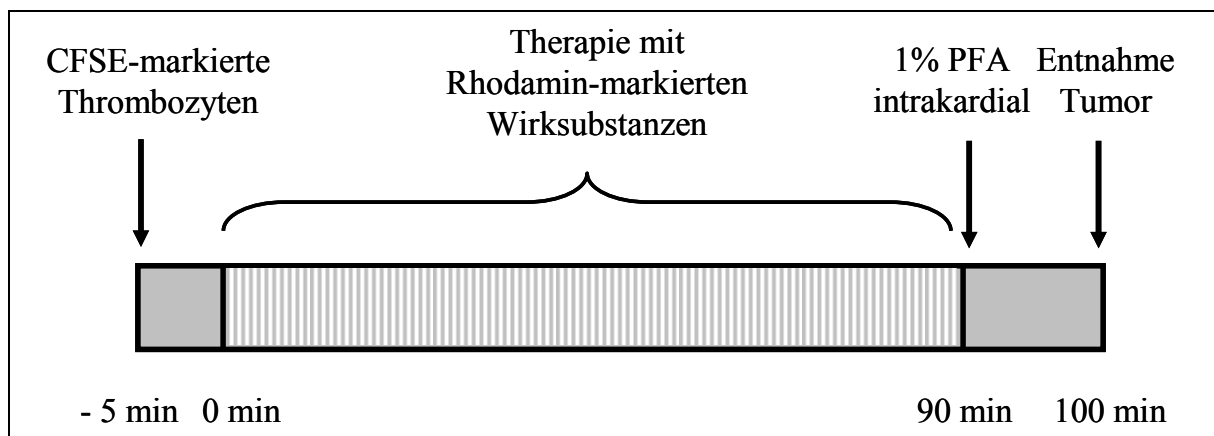


Abb. 10: Versuchsprotokoll zur histologischen Analyse der Verteilung von Thrombozyten und Wirksubstanzen im Tumor unter akuten Therapiebedingungen.

4.4.2 Versuchsgruppen

Tiere mit subkutanem Tumor wurden in zwei Gruppen randomisiert und erhielten entweder unbeladene kationische Liposomen oder EndoTAG[®]-1 wie in Tabelle 4 dargestellt. Zur späteren Visualisierung in der Laser-Scanning-Mikroskopie wurden Rhodamin-markierte Wirksubstanzen eingesetzt.

Versuchsgruppe	Wirksubstanz	Anzahl
Gruppe 1	Rh-markierte unbeladene kationische Liposomen	n = 3
Gruppe 2	Rh- markiertes EndoTAG [®] -1 (5mg/kg KG Paclitaxel)	n = 3

Tab. 4: Versuchsgruppen zur histologischen Analyse der Verteilung von Thrombozyten und Wirksubstanzen unter akuten Therapiebedingungen.

5. Darstellung der Ergebnisse und Statistik

Zur graphischen Darstellung wurde für jedes Versuchstier der Mittelwert aus den Ergebnissen der einzelnen Messungen errechnet. Diese Werte wurden wiederum zum Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (MW \pm SEM) der jeweiligen Versuchsgruppe zusammengefasst.

Der statistische Gruppenvergleich erfolgte anhand nichtparametrischer Rangtests mit Hilfe einer Computersoftware (Sigma Stat; Jandl Corp., San Rafael, USA). Für die Testung innerhalb einer Gruppe (Intragruppenvergleich) wurde der Rangsummentest nach Wilcoxon angewandt. Zum Vergleich der Gruppen untereinander (Intergruppenvergleich) wurde eine Varianzanalyse nach Kruskal- Wallis mit Post-hoc-Analyse nach Student-Newmann-Keuls durchgeführt. Bei Signifikanz der Ergebnisse wurde dies bei der jeweiligen Abbildung vermerkt. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

III ERGEBNISSE

1. Ergebnisse der *in vitro* Versuche

Mittels Durchflusszytometrie (FACScan) wurde untersucht, ob eine 15-minütige Stimulation mit unbeladenen kationischen Liposomen bzw. EndoTAG[®]-1 (mit Paclitaxel beladene kationische Liposomen) in einer Konzentration von 150 Mikroliter pro Milliliter Vollblut zu einer Aktivierung humaner Thrombozyten *in vitro* führt.

Die Thrombozytenpopulation stellte sich bei der durchflusszytometrischen Untersuchung von Vollblut als distinkte Punkteverteilung dar, welche aufgrund ihrer typischen Größe (Vorwärtsstreulicht) und Granularität (Seitwärtsstreulicht) identifiziert werden konnte.

Der Aktivierungsgrad der Thrombozyten nach Stimulation wurde anhand der Expression von CD-62 (P-Selektin) auf der Oberfläche der Thrombozyten mit Hilfe direkter Immunfluoreszenz (mouse anti-human CD 62P Antikörper) bestimmt. Sowohl eine Inkubation mit unbeladenen kationischen Liposomen als auch mit EndoTAG[®]-1 führte zu einer signifikanten Aktivierung der Thrombozyten im Vergleich zur Negativkontrolle (Inkubation mit PBS) (siehe Abb. 11). In der quantitativen Analyse erreichte der prozentuale Anteil CD-62 positiver Thrombozyten an der Gesamtpopulation mit über 60% annähernd die Werte der Positivkontrolle, welche mit PMA in einer 10⁻⁶ molaren Endkonzentration stimuliert worden war (siehe Abb. 12 A). Die Messung der mittleren Fluoreszenzintensität ergab im Vergleich zur Positivkontrolle sogar höhere Werte nach Stimulation mit unbeladenen kationischen Liposomen oder EndoTAG[®]-1, was einer anteilmäßig stärkeren Expression von P-Selektin pro Thrombozyt entspricht (siehe Abb. 12 B).

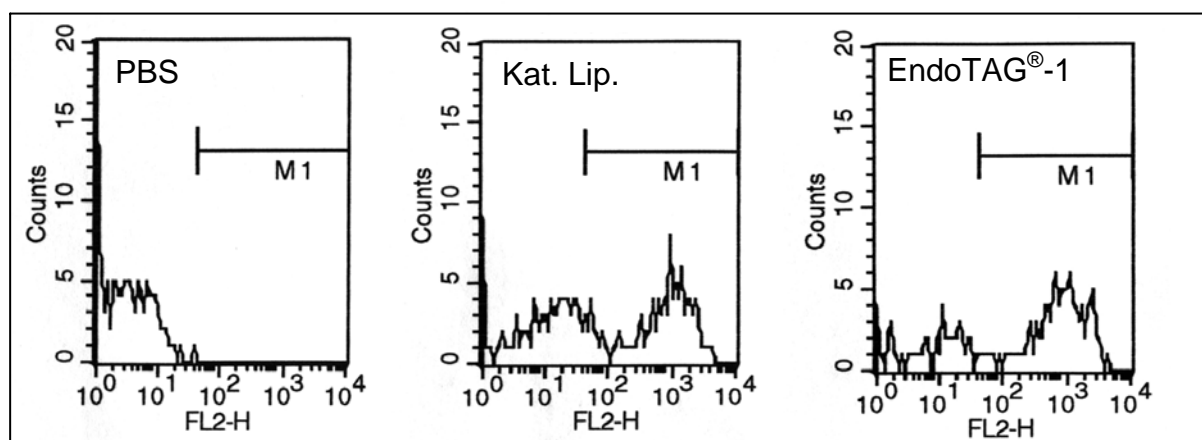


Abb. 11: Durchflusszytometrischer Nachweis der Aktivierung von Thrombozyten mittels direkter Immunfluoreszenz nach *in vitro* Stimulation mit unbeladenen kationischen Liposomen oder EndoTag[®]-1. Im Vergleich zur Negativkontrolle (PBS) fand sich in beiden Gruppen eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals, entsprechend einer gesteigerten Expression von P-Selektin (CD-62) auf der Oberfläche der Thrombozyten.

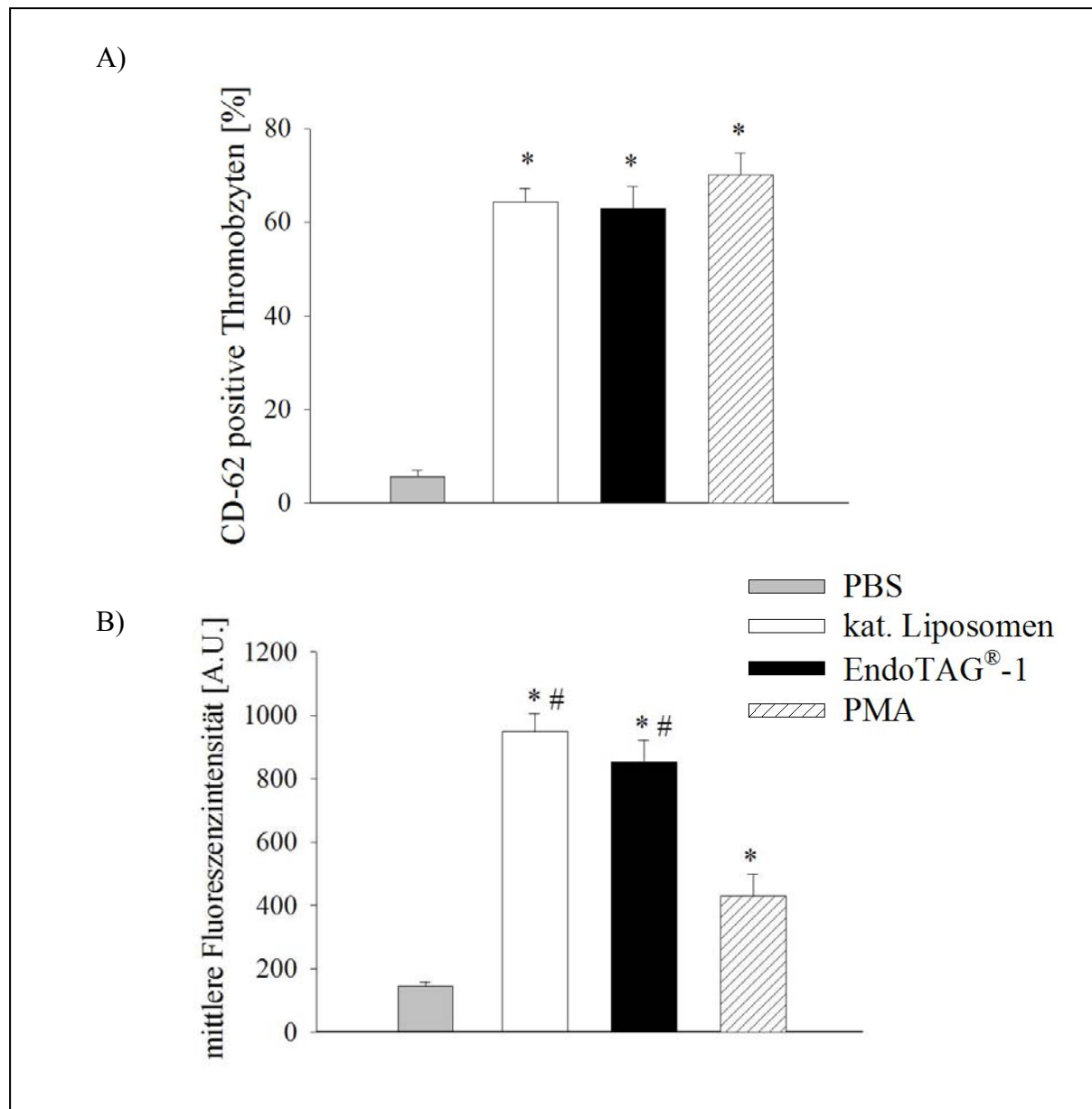


Abb. 12: Darstellung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten in den einzelnen Versuchsgruppen anhand des prozentualen Anteils CD-62% positiver Zellen an der Gesamtpopulation (A) und der mittleren Fluoreszenzintensität pro Thrombozyt (B). Sowohl eine Stimulation mit unbeladenen kationischen Liposomen, als auch mit EndoTAG[®]-1 führte zu einer signifikanten Aktivierung der Thrombozyten.

MW \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. PBS (Negativkontrolle), # $p < 0,05$ vs. PMA (Positivkontrolle)

2. Ergebnisse der *in vivo* Versuche mit akutem Versuchsablauf

Die Analyse akuter Veränderungen der Mikrozirkulation und der Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor unter Therapie mit EndoTAG[®]-1 erfolgte anhand intravitraler Fluoreszenzmikroskopie vor und nach 90-minütiger Infusion. Zum Zeitpunkt der

Untersuchung hatten die Tumore in der Rückenhautkammer eine durchschnittliche Fläche von $16,3 \text{ mm}^2$ (Taxol: $16,4 \text{ mm}^2 \pm 1,2 \text{ mm}^2$; kat. Liposomen $16,3 \text{ mm}^2 \pm 1,2 \text{ mm}^2$; EndoTAG[®]-1: $16,2 \text{ mm}^2 \pm 1,1 \text{ mm}^2$) und das Tumorgefäßsystem war vollständig ausgebildet.

2.1 Effekte auf die Tumormikrozirkulation

Zu Baseline-Bedingungen zeigte sich nach intravenöser Injektion des Plasmamarkers TAMRA-Dextran ein für den Angiogeneseprozess typisches Tumorgefäßnetzwerk mit chaotischer Architektur und ausgeprägter Heterogenität. Neben Kalibersprüngen fanden sich zahlreiche Anastomosen, Gefäßschleifen und ein inhomogener Blutfluss (s. Abb. 17). Die Veränderungen der einzelnen Messparameter zur Quantifizierung der Tumormikrozirkulation unter akuten Therapiebedingungen werden im Folgenden dargestellt:

2.1.1 Gefäßdurchmesser

Die Gefäßdurchmesser waren zu Ausgangsbedingungen mit einem Mittelwert von $9,2 \mu\text{m} \pm 0,25 \mu\text{m}$ in allen Versuchsgruppen vergleichbar. Unter Infusion der Therapiesubstanzen kam es zu keinen signifikanten Veränderungen der Gefäßdurchmesser (siehe Abb. 13).

2.1.2 Funktionelle Gefäßdichte

Die funktionelle Gefäßdichte im Tumor blieb unter Therapie mit konventionellem Paclitaxel (Taxol) im Wesentlichen unverändert. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit EndoTAG[®]-1 bereits unmittelbar nach Infusion zu deutlichen Veränderungen in der Tumormikrozirkulation. In der Intravitalmikroskopie zeigten sich Gefäßabbrüche im Tumor, die durch eine fehlende Perfusion von Gefäßabschnitten bedingt waren (siehe Abb. 17). Interessanterweise kam es in der Kontrollgruppe, die mit unbeladenen kationischen Liposomen behandelt worden war, zu vergleichbaren Befunden. Die quantitative Analyse der funktionellen Gefäßdichte ergab für beide Gruppen eine signifikante Reduktion verglichen mit den Baseline-Werten und den Werten in der Taxol-Gruppe (siehe Abb. 14)

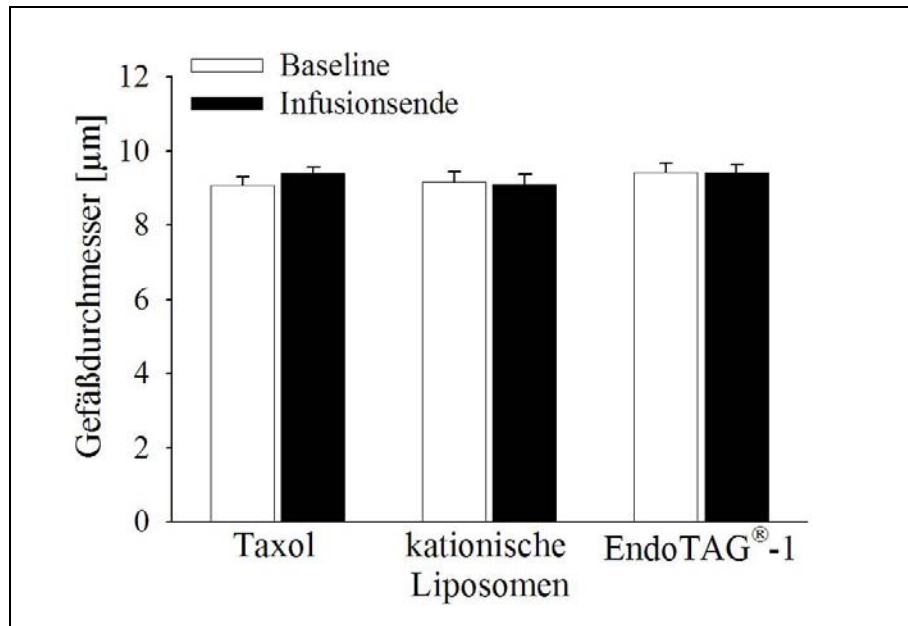


Abb. 13: Darstellung der intratumoralen Gefäßdurchmesser unter akuten Therapiebedingungen. Die Durchmesser blieben in allen Versuchsgruppen im Verlauf der Therapie konstant. $MW \pm SEM$

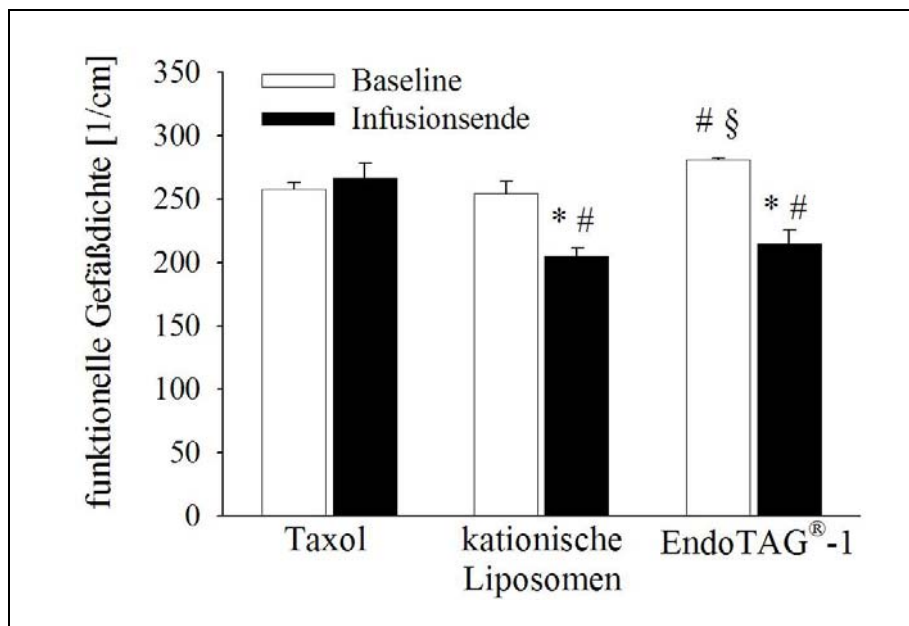


Abb. 14: Sowohl unbeladene kationische Liposomen als auch EndoTAG®-1 führten unmittelbar nach Infusion zu einer signifikanten Verringerung der funktionellen Gefäßdichte im Tumor verglichen mit Baseline-Werten und Taxol. $MW \pm SEM$, * $p < 0,05$ vs. Baseline, # $p < 0,05$ vs. Taxol, § $p < 0,05$ vs. kationische Liposomen

2.1.3 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten war zu Baseline-Bedingungen in allen Gruppen identisch. Vergleichbar zu den Beobachtungen bezüglich der funktionellen Gefäßdichte, zeigte die Quantifizierung, dass es im Verlauf der Infusion sowohl nach Gabe unbelasteter Liposomen als auch nach Gabe von EndoTAG[®]-1 zu einer akuten Verminderung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit kam. In beiden Therapiegruppen waren die ermittelten Werte am Infusionsende signifikant niedriger als in der Taxol-Gruppe, bei der es unter Therapie sogar zu einer Zunahme der Erythrozytenfließgeschwindigkeit gekommen war (siehe Abb. 15).

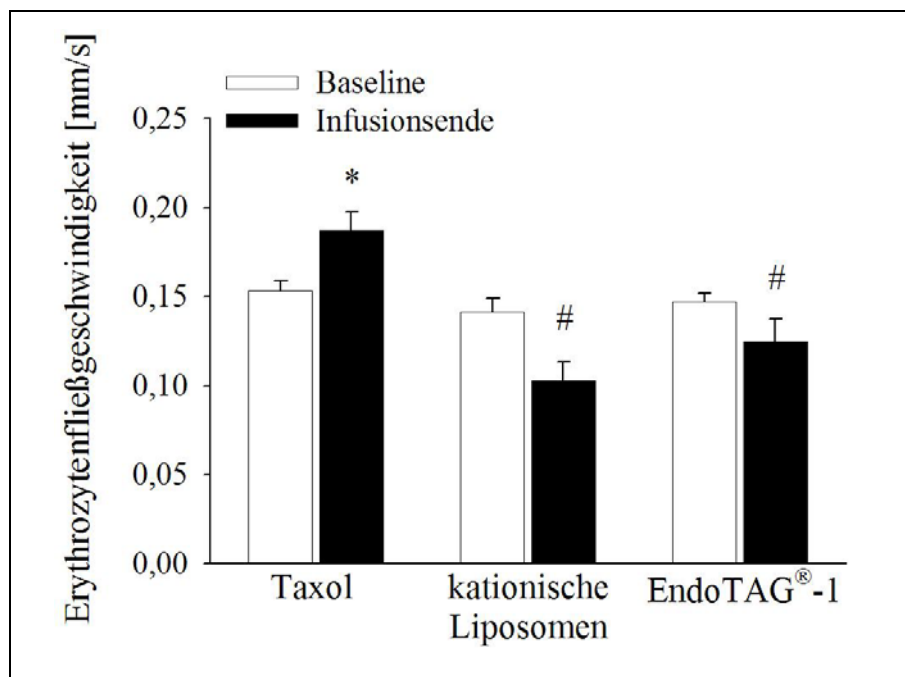


Abb. 15: Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten am Ende der Infusion von unbelasteten kationischen Liposomen und EndoTAG[®]-1 war signifikant geringer als in der Kontrollgruppe mit Taxol, in der es zu einer Zunahme der Werte kam.

*MW ± SEM, * $p < 0,05$ vs. Baseline, # $p < 0,05$ vs. Taxol*

2.1.4 Mikrozirkulatorischer Perfusionsindex

Der mikrozirkulatorische Perfusionsindex berücksichtigt rechnerisch alle Standardparameter der Mikrozirkulation und ist geeignet, die Effekte auf die Tumorperfusion abzuschätzen. Als Konsequenz der zuvor geschilderten Auswirkungen von unbeladenen kationischen Liposomen bzw. EndoTAG[®]-1 auf die Gefäßdurchmesser, die funktionelle Gefäßdichte und die Erythrozytenfließgeschwindigkeit im Tumor, war der mikrozirkulatorische Perfusionsindex am Ende der Infusion in diesen beiden Versuchsgruppen ebenfalls signifikant geringer als zu Ausgangsbedingungen. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Verlauf der Therapie mit Taxol eine tendenzielle Zunahme des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex. Die statistische Auswertung der Messungen nach Infusion ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlung mit Taxol und der Therapie mit unbeladenen Liposomen oder EndoTAG[®]-1 (siehe Abb. 16).

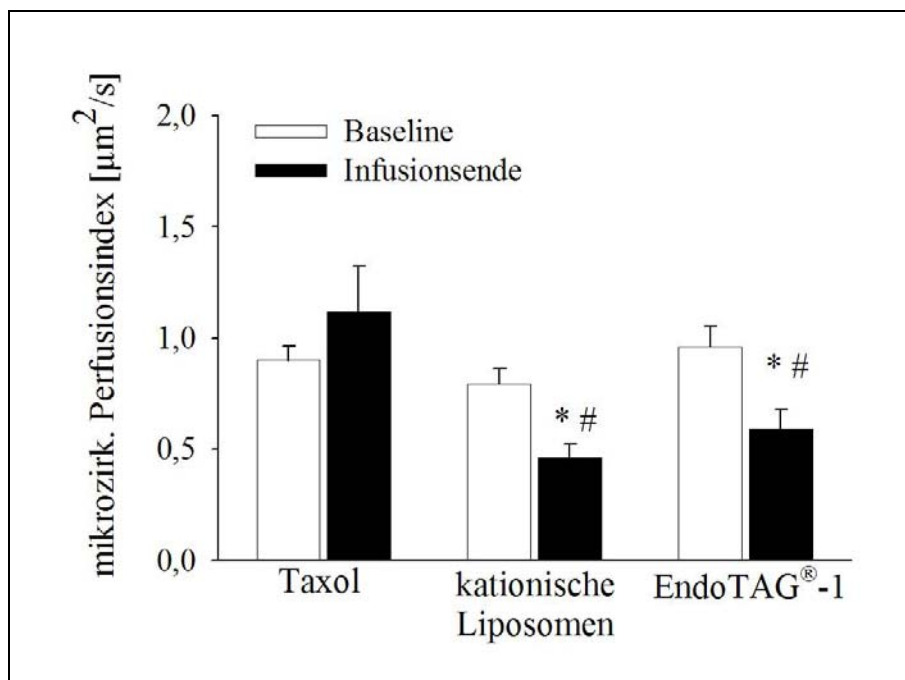


Abb. 16: In den mikrozirkulatorischen Perfusionsindex gehen rechnerisch Gefäßdurchmesser, funktionelle Gefäßdichte und Erythrozytenfließgeschwindigkeit ein. Während es unter Gabe von Taxol zu einer tendenziellen Zunahme der Werte kam, war der Perfusionsindex nach Infusion von unbeladenen Liposomen und EndoTAG[®]-1 signifikant reduziert gegenüber Baseline-Werten und Taxol.

MW ± SEM, * $p < 0,05$ vs. Baseline, # $p < 0,05$ vs. Taxol

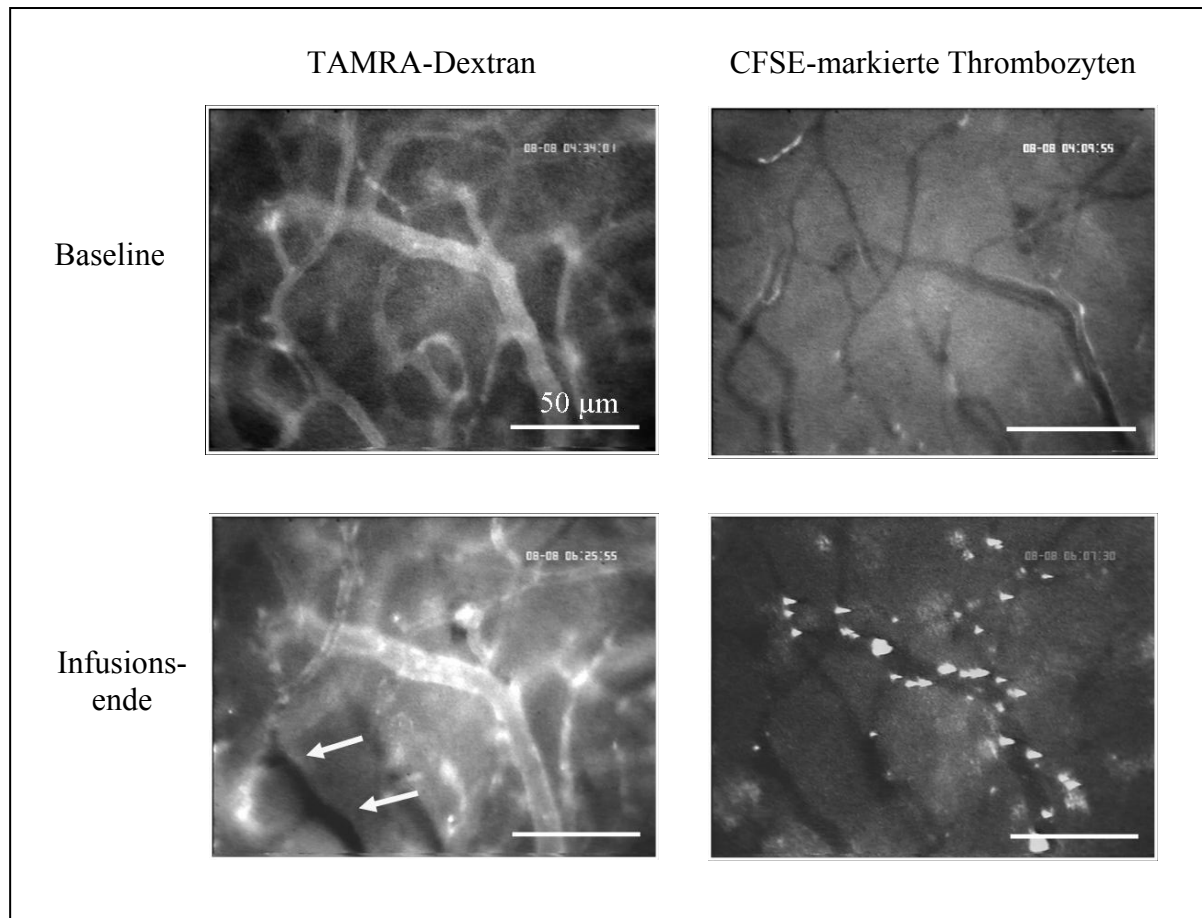


Abb. 17: Intravitalmikroskopie eines Tumor-ROIs in verschiedenen Fluoreszenzfiltern. Nach i.v. Injektion von TAMRA-Dextran stellte sich das typische Tumorgefäßsystem mit chaotischer Architektur und Kalibersprüngen dar. Die ex vivo Markierung mit CFDA-SE erlaubte eine separate Visualisierung der Thrombozyten. Zu Baseline-Bedingungen fand sich eine intakte Tumormikrozirkulation ohne Perfusionsausfälle und es ließen sich keine adhärenenten Thrombozyten nachweisen. Am Ende der Infusion von EndoTAG[®]-1 hingegen kam es zu Perfusionsausfällen in einzelnen Gefäßen (→) und zu einer stark erhöhten Thrombozytenadhärenz.

2.2 Effekte auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor

Die Visualisierung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen erfolgte durch Transfusion *ex vivo* fluoreszenzmarkierter Thrombozyten eines Spendertieres. Zu Baseline-Bedingungen waren multiple zirkulierende Thrombozyten in den Tumorgefäßen zu sehen. Adhärenente Thrombozyten wurden dagegen kaum beobachtet (siehe Abb. 17). Zur Quantifizierung akuter

Effekte einer Therapie mit EndoTAG[®]-1 auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen wurden der Thrombozytenflux und die Thrombozytenadhärenz pro Quadratmillimeter Gefäßoberfläche (Thrombozytenadhärenz_{Gefäß}) vor und nach Infusion der Therapiesubstanzen ausgewertet.

2.2.1 Thrombozytenflux

Der Thrombozytenflux in den Tumorgefäßen vor Therapiebeginn war in den drei Versuchsgruppen vergleichbar. Im Verlauf der Infusion kam es in allen Gruppen zu einer signifikanten Reduktion zirkulierender Thrombozyten verglichen mit den Ausgangswerten. Diese Reduktion war jedoch am Ende der Infusion von EndoTAG[®]-1 signifikant stärker ausgeprägt als in der Taxol-Gruppe. Dasselbe galt auch für die Kontrollgruppe, welche unbeladene kationische Liposomen infundiert bekommen hatte (siehe Abb. 18).

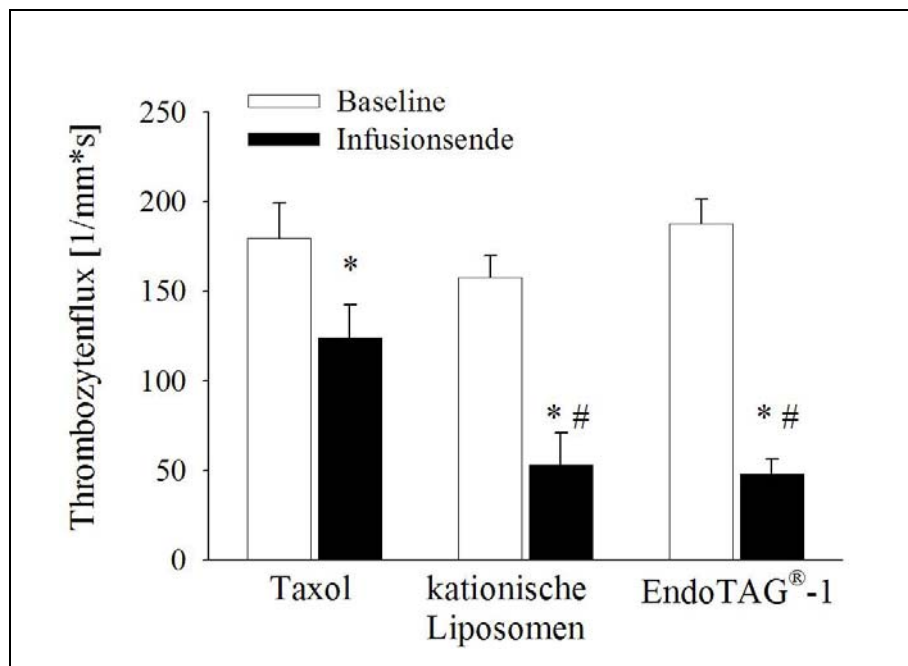


Abb. 18: In allen Therapiegruppen kam es im Verlauf der Infusion zu einer signifikanten Reduktion der im Tumor zirkulierenden Thrombozyten verglichen mit den Ausgangswerten. Dieser akute Effekt war jedoch unter Gabe unbelasteter Liposomen und unter Gabe von EndoTAG[®]-1 signifikant stärker ausgeprägt als in der Taxol-Gruppe. MW \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Baseline, # $p < 0,05$ vs. Taxol

2.2.2 Thrombozytenadhärenz_{Gefäß}

Bei der Quantifizierung der intratumoralen Thrombozytenadhärenz fanden sich in allen Therapiegruppen vergleichbar niedrige Ausgangswerte. Während es nach Gabe von Taxol zu keiner wesentlichen Veränderung kam, wurden sowohl am Ende der Infusion unbeladener kationischer Liposomen als auch nach Infusion von EndoTAG[®]-1 multiple adhärenente Thrombozyten in den Tumorgefäßen beobachtet. Hierbei fiel auf, dass die Thrombozyten auf fast alle Gefäße des Tumors relativ gleichmäßig verteilt waren (siehe Abb. 17). Eine Ansammlung von Thrombozyten im Sinne einer Thrombose kam nicht zustande. Die statistische Auswertung ergab für die Therapie mit unbeladenen Liposomen und mit EndoTAG[®]-1 eine signifikante Erhöhung der Thrombozytenadhärenz im Vergleich zu den Baseline-Werten und der Therapie mit Taxol (siehe Abb. 19)

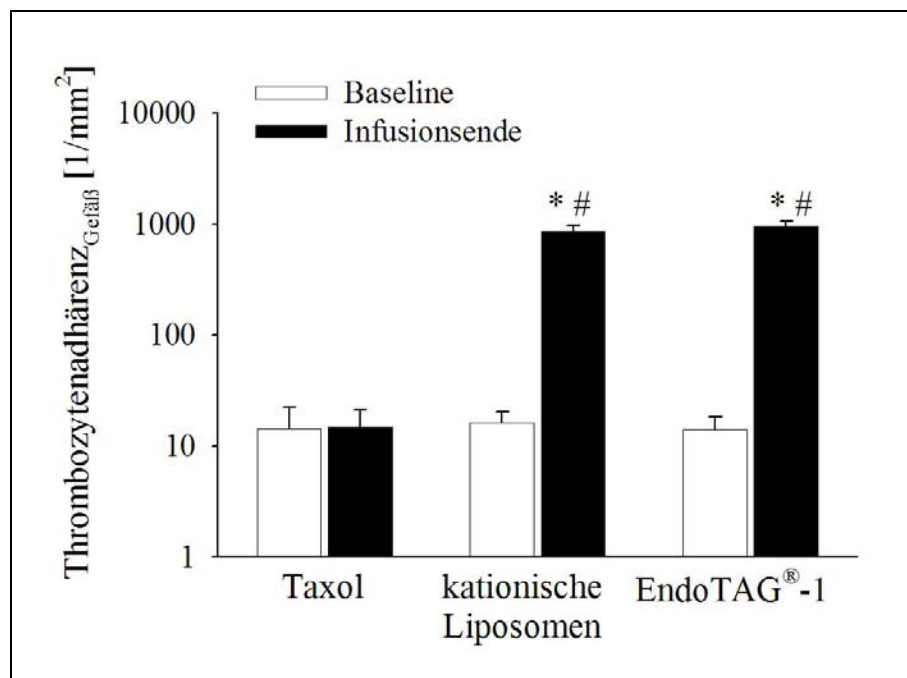


Abb. 19: Darstellung der Thrombozytenadhärenz bezogen auf die Gefäßoberfläche. Vor Infusionsbeginn war die intratumorale Thrombozytenadhärenz in allen Versuchsgruppen gering. Während die Gabe von Taxol zu keiner Veränderung führte, fand sich am Ende der Infusion von unbeladenen kationischen Liposomen und EndoTAG[®]-1 eine signifikante Zunahme adhärenenter Thrombozyten.

MW ± SEM, * $p < 0,05$ vs. Baseline, # $p < 0,05$ vs. Taxol

2.3 Vergleichende Untersuchung von Tumor und Normalgewebe

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer ermöglicht die Untersuchung implantierter Tumore genauso wie die Analyse des umliegenden Gewebes. Hierdurch können Therapieeffekte im Tumor mit einer intrinsischen Normalgewebekontrolle verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen der Akutversuche bei jedem Tier auch die Mikrozirkulation und die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im normalen Kammergewebe analysiert.

Die subkutanen Gefäße der Rückenhautmuskulatur lassen sich durch den parallelen Verlauf der Kapillaren leicht von den Tumorgefäßen unterscheiden. Abbildung 20 zeigt die typischen Kapillarstrukturen eines Normalgewebe-ROIs.

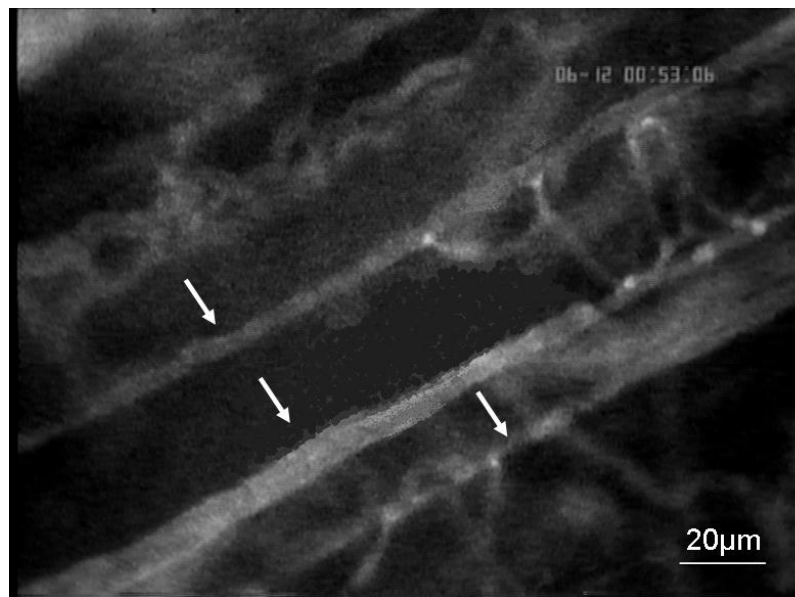


Abb. 20: *Intravitalmikroskopische Aufnahme eines ROIs in der normalen Rückenhaut (20-faches Objektiv). Durch intravenöse Injektion von TAMRA-Dextran wurden die parallel verlaufenden Kapillaren (→) sichtbar gemacht.*

Zur Beurteilung der Mikrozirkulation im Normalgewebe wurden analog zur Untersuchung im Tumor die Gefäßdurchmesser, die funktionelle Gefäßdichte, die Erythrozytenfließgeschwindigkeit und der mikrozirkulatorische Perfusionsindex evaluiert. Zum Vergleich der Thrombozyten-Endothelinteraktionen wurde die Thrombozytenadhärenz bezogen auf die Gefäßoberfläche herangezogen.

Im Folgenden werden die akuten Veränderungen dieser Parameter im Normalgewebe mit denen im Tumor verglichen. Graphisch dargestellt sind die Werte, welche am Ende der Infusion in den drei Therapiegruppen gemessen wurden.

Während die Gefäßdurchmesser in allen Versuchsgruppen unabhängig vom untersuchten Gewebe im Verlauf der Therapie konstant blieben (siehe Abb. 21), zeigte sich bei der Quantifizierung der funktionellen Gefäßdichte, dass es am Ende der Infusion von unbeladenen kationischen Liposomen und EndoTAG[®]-1 lediglich im Tumor zu einer signifikanten Reduktion der Werte gekommen war. Im Normalgewebe blieb die funktionelle Gefäßdichte in diesen Versuchsgruppen dagegen unverändert (siehe Abb. 22 A). Gleichmaßen war eine akute Verringerung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex unter Infusion von unbeladenen Liposomen bzw. EndoTAG[®]-1 nur in Tumorgefäßen zu sehen (siehe Abb. 22 B, C). Ein noch deutlicherer tumorselektiver Effekt unter akuten Therapiebedingungen konnte bei Untersuchung der Thrombozytenadhärenz_{Gefäß} beobachtet werden. Wiederum führten sowohl unbeladene kationische Liposomen als auch EndoTAG[®]-1 zu einer Zunahme adhärenter Thrombozyten, die im Vergleich mit der Normalgewebekontrolle Signifikanz erreichte (siehe Abb. 22 D).

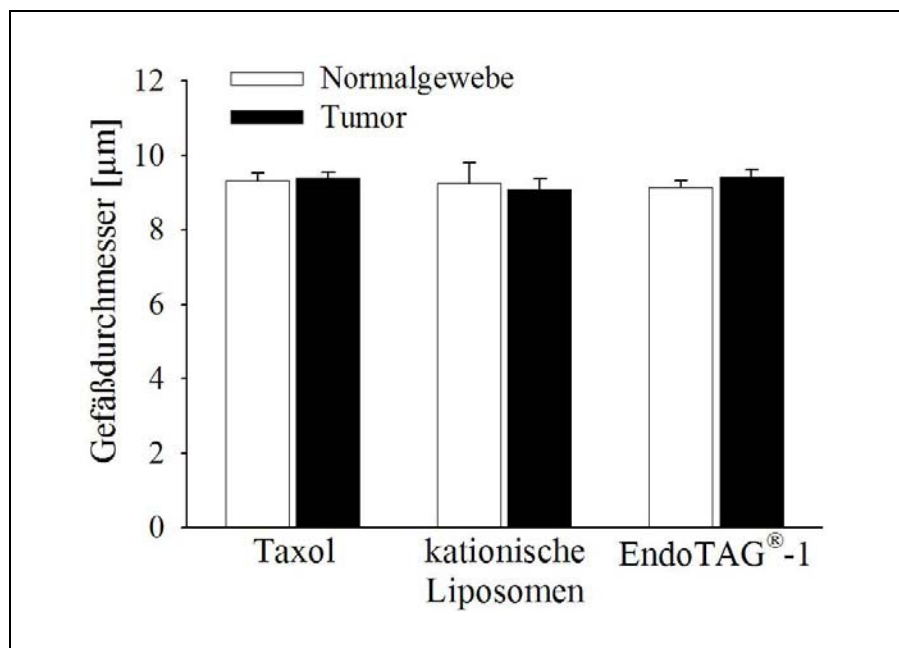


Abb. 21: Die Gefäßdurchmesser blieben nach 90-minütiger Infusion der Wirksubstanzen im Tumor und im Normalgewebe unverändert.

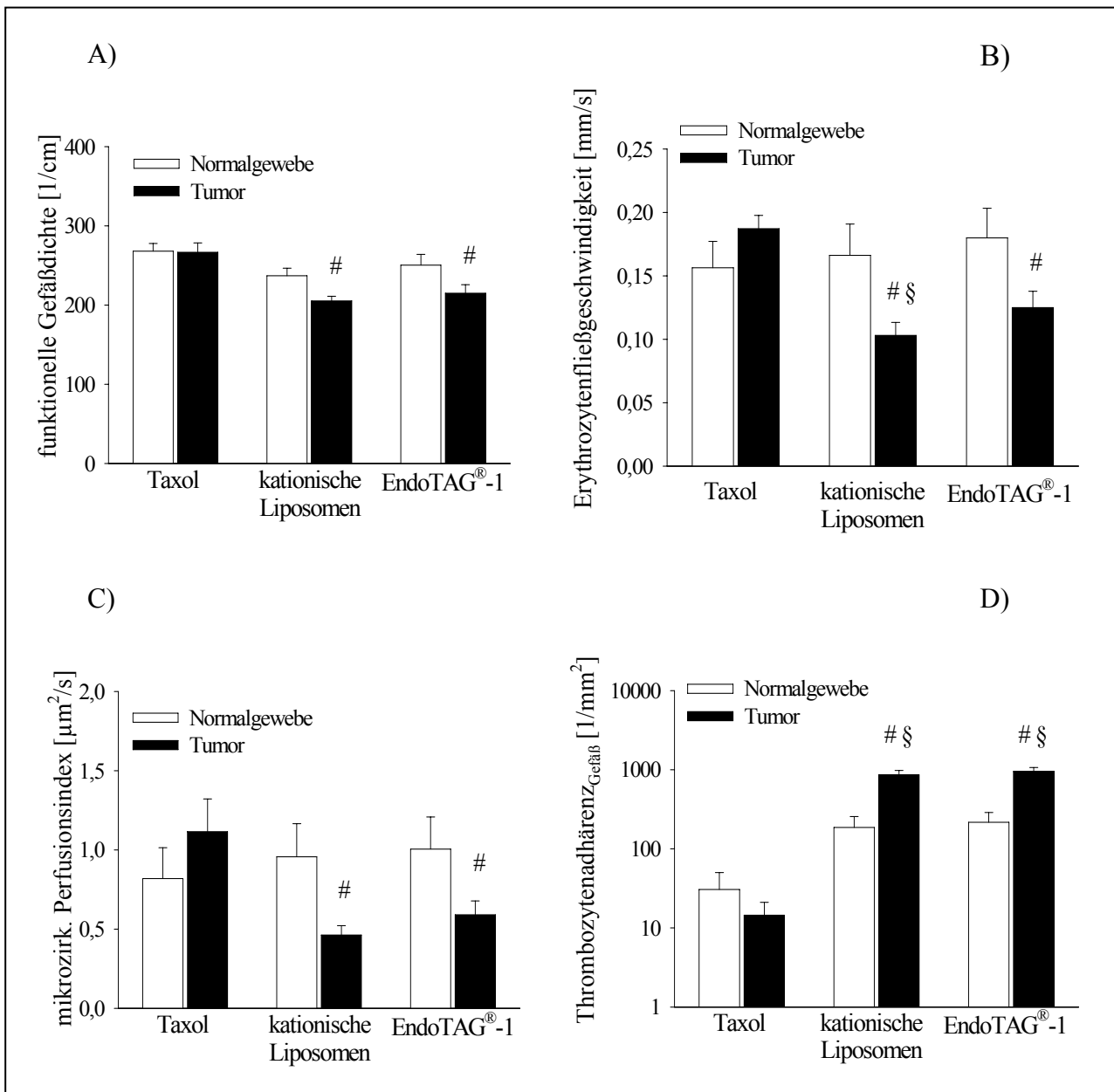


Abb. 22: Quantitativer Vergleich zwischen Tumor und Normalgewebe unter akuten Therapiebedingungen. Mikrozirkulation (Infusionsende): tumorselektive Verminderung der funktionellen Gefäßdichte (A), der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (B) und des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex (C) nach Infusion von kationischen Liposomen und EndoTAG®-1. Thrombozyten-Endothelinteraktionen (Infusionsende): signifikante, tumorselektive Steigerung der Anzahl adhärenter Thrombozyten unter Therapie mit unbeladenen kationischen Liposomen und EndoTAG®-1 verglichen mit der Normalgewebekontrolle (D). MW \pm SEM, # $p < 0,05$ vs. Taxol (Tumor), § $p < 0,05$ vs. Normalgewebe

3. Ergebnisse der histologischen Untersuchung

Durch die histologische Analyse subkutaner Tumore unmittelbar nach einmaliger Infusion von Liposomen bzw. EndoTAG[®]-1 sollte das Ergebnis der *in vivo* Versuche mit akutem Versuchsablauf anhand einer zweiten Methode verifiziert und eine qualitative Aussage über die Verteilung adhärenter Thrombozyten getroffen werden. Der Einsatz verschiedener Fluoreszenzmarker machte hierbei eine separate Visualisierung von Thrombozyten und der jeweiligen Wirksubstanz möglich, so dass gleichzeitig überprüft werden konnte, ob möglicherweise eine Kolokalisation zwischen den beiden besteht. Zu diesem Zweck wurden Gefrierschnitte der perfundierten Tumore angefertigt und mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie ausgewertet.

Wie schon in der intravitalmikroskopischen Untersuchung war unter akuten Therapiebedingungen auch in der Histologie sowohl nach Infusion unbeladener Liposomen als auch nach Infusion von EndoTAG[®]-1 eine Vielzahl adhärenter Thrombozyten in den Tumorgefäßen zu sehen. Hierbei konnte der zuvor gewonnene Eindruck bestätigt werden, dass die Thrombozyten auf fast alle Gefäße des Tumors verteilt sind, ohne einen Thrombus zu formen. Die Wirksubstanzen zeigten in der Laser-Scanning-Mikroskopie ebenfalls eine homogene Verteilung auf das gesamte Gefäßsystem. Eindeutige lokale Mehranreicherungen konnten nicht ausgemacht werden. Hinweise für eine Fusion zwischen Thrombozyten und Liposomen oder eine Internalisierung waren nicht vorhanden (siehe Abb. 23).

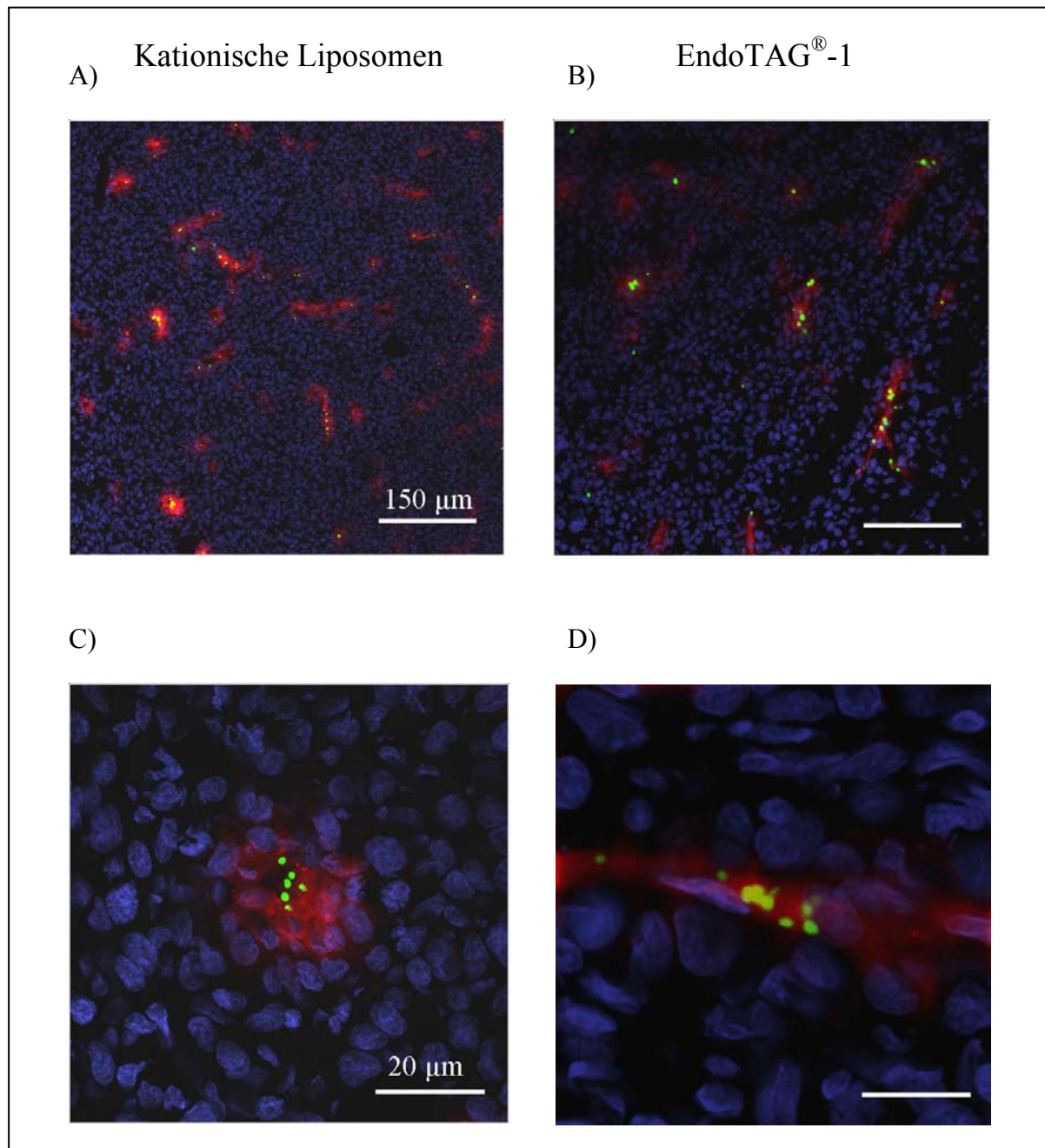


Abb. 23: Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von Gefrierschnitten subkutaner Tumore unmittelbar nach Infusion von unbeladenen kationischen Liposomen (A, C) oder EndoTAG[®]-1 (B, D). Grünfluoreszenz: CFSE-markierte Thrombozyten, Rotfluoreszenz: Rhodamin-markierte Wirksubstanzen. Zur besseren Kontrastierung wurden die Kerne der Tumorzellen mit DAPI blau gegengefärbt. In beiden Versuchsgruppen konnte eine erhöhte Thrombozytenadhärenz nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich in den Übersichtsaufnahmen eine homogene Verteilung der Wirksubstanzen auf das ganze Tumorgefäßsystem mit adhärenenten Thrombozyten in fast allen Gefäßen (A, B). Bei stärkerer Vergrößerung waren die einzelnen Thrombozyten noch gut voneinander abgrenzbar. Eine Bildung vollständiger Mikrothromben wurde nicht beobachtet (C, D).

4. Ergebnisse der *in vivo* Versuche mit chronischem Versuchsablauf

Nachdem die vorherigen *in vivo* Versuche interessanterweise zeigen konnten, dass sich die Therapieeffekte nach einmaliger Gabe von EndoTAG[®]-1 nicht von unbeladenen kationischen Liposomen unterscheiden, wurde eine zweite Versuchsreihe unter chronischen Therapiebedingungen durchgeführt. Hierbei sollte analysiert werden, ob eine wiederholte Therapie zu Unterschieden in den Thrombozyten-Endothelinteraktionen führt. Zu diesem Zweck erhielten Versuchstiere vor Durchführung der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie eine 3-malige Gabe von unbeladenen kationischen Liposomen oder EndoTAG[®]-1. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch akute Interaktionen zwischen Thrombozyten und Wirksubstanzen sicher auszuschließen, erfolgten die Messungen 24 Stunden nach Beendigung der letzten Infusion.

4.1 Effekte auf die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor

4.1.1 Thrombozytenadhärenz_{ROI}

Zur Quantifizierung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor wurde die Thrombozytenadhärenz pro Quadratmillimeter Messareal (= ROI) ausgewertet. Im Gegensatz zum Akutversuch zeigte sich hier ein signifikanter Unterschied zwischen unbeladenen Liposomen und EndoTAG[®]-1. Während in der Versuchsgruppe, die mit EndoTAG[®]-1 therapiert worden war, eine massive Thrombozytenadhärenz beobachtet werden konnte, fanden sich 24 Stunden nach wiederholter Therapie mit unbeladenen Liposomen kaum adhärenz Thrombozyten in den Tumorgefäßen (siehe Abb. 25 A)

4.1.2 Mikrothrombosen

Während der intravitalmikroskopischen Untersuchung fiel ebenfalls auf, dass die Thrombozytenadhärenz nach 3-facher Gabe von EndoTAG[®]-1, anders als bei den Versuchen mit akutem Versuchsablauf, in umschriebenen Gefäßabschnitten so hoch war, dass es zur Entstehung von Thrombosen kam. Zum Teil konnten hierdurch bedingte, vollständige Gefäßverschlüsse im Tumor beobachtet werden (siehe Abb. 24). Die Anzahl solcher Mikrothrombosen wurde ausgewertet und einer statistischen Analyse unterzogen. Hierbei zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie mit unbeladenen kationischen Liposomen und EndoTAG[®]-1 (siehe Abb. 25 B).

4.2 Vergleichende Untersuchung von Tumor und Normalgewebe

Wie auch zuvor unter akuten Versuchsbedingungen wurden nach wiederholter Therapie mit EndoTAG[®]-1 die Ergebnisse der Untersuchungen im Tumor mit einer Normalgewebekontrolle verglichen. Hierdurch sollte evaluiert werden, ob unter chronischen Therapiebedingungen ebenfalls eine Tumorselektivität der induzierten Thrombozyten-Endothelinteraktionen vorliegt.

Als Normalgewebekontrolle diente eine zusätzliche Versuchsgruppe mit Tieren, die keinen Tumor in der Rückenhautkammer trugen. Zur Beurteilung der Therapieeffekte erfolgte wiederum die Quantifizierung der Thrombozytenadhärenz und der Mikrothrombosen.

Die vergleichende Untersuchung von Tumor und Normalgewebe nach 3-maliger Gabe von EndoTAG[®]-1 zeigte, dass es nur in den Tumorgefäßen, nicht jedoch in den Gefäßen der normalen Rückenhautmuskulatur zu einer signifikanten Zunahme adhärenter Thrombozyten gekommen war (siehe Abb. 25 A). Bei der quantitativen Analyse der Mikrothrombosen konnte ebenfalls eine statistisch signifikante Tumorselektivität der Wirkung von EndoTAG[®]-1 nachgewiesen werden (s. Abb. 25 B).

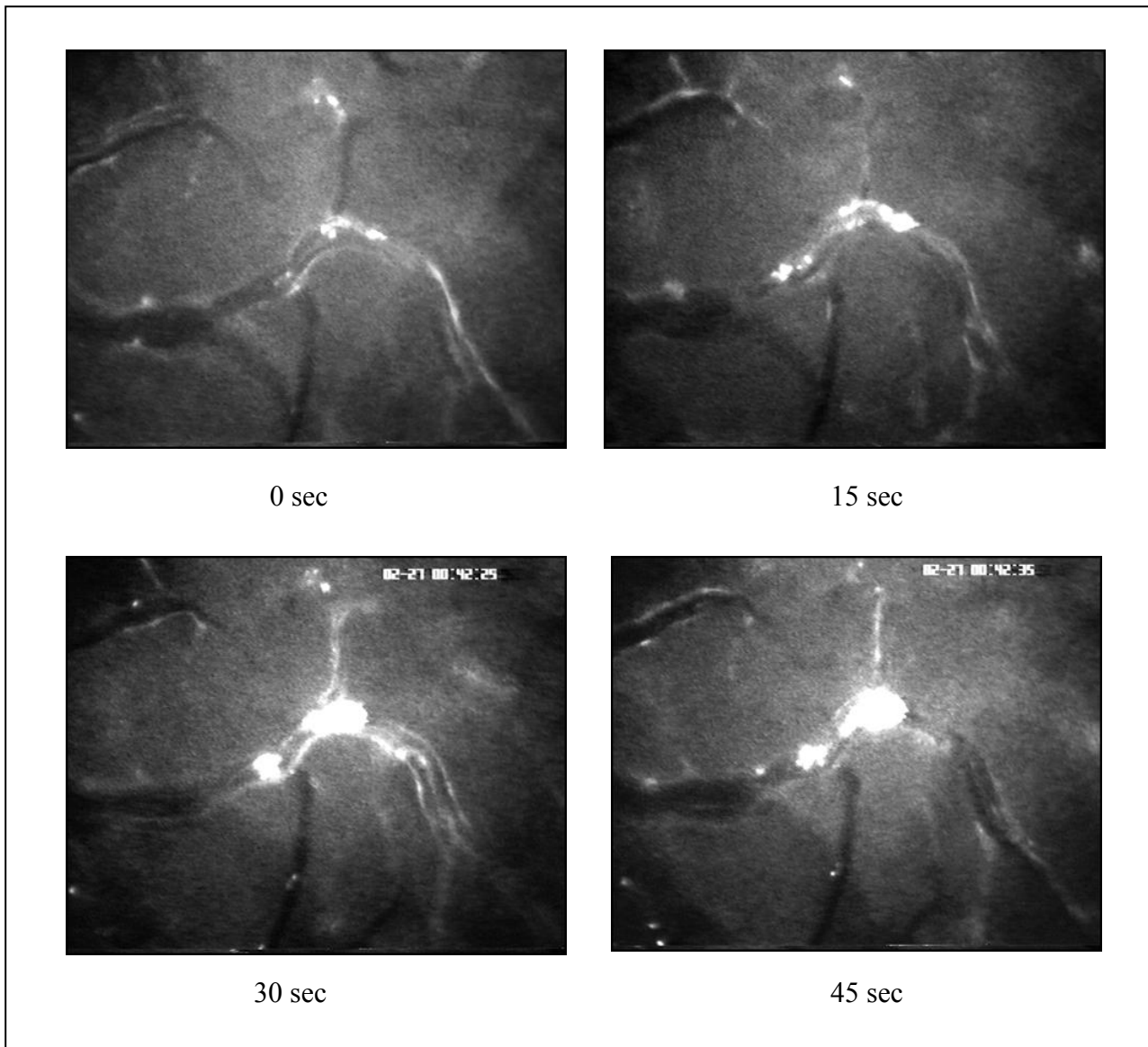


Abb. 24: Entstehung einer Mikrothrombose in einem Tumorblutgefäß nach wiederholter Therapie mit EndoTAG[®]-1. Im zeitlichen Verlauf konnte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die sukzessive Anlagerung CFSE-markierter Thrombozyten an der Gefäßwand bis hin zum vollständigen Verschluss des Gefäßes dokumentiert werden. Solche Mikrothrombosen wurden selektiv im Tumor und nicht in der Normalgewebekontrolle beobachtet. Ebenso hatte die wiederholte Gabe unbeladener kationischer Liposomen keinen derartigen Effekt auf die Thrombozyten-Endothelinteraktion.

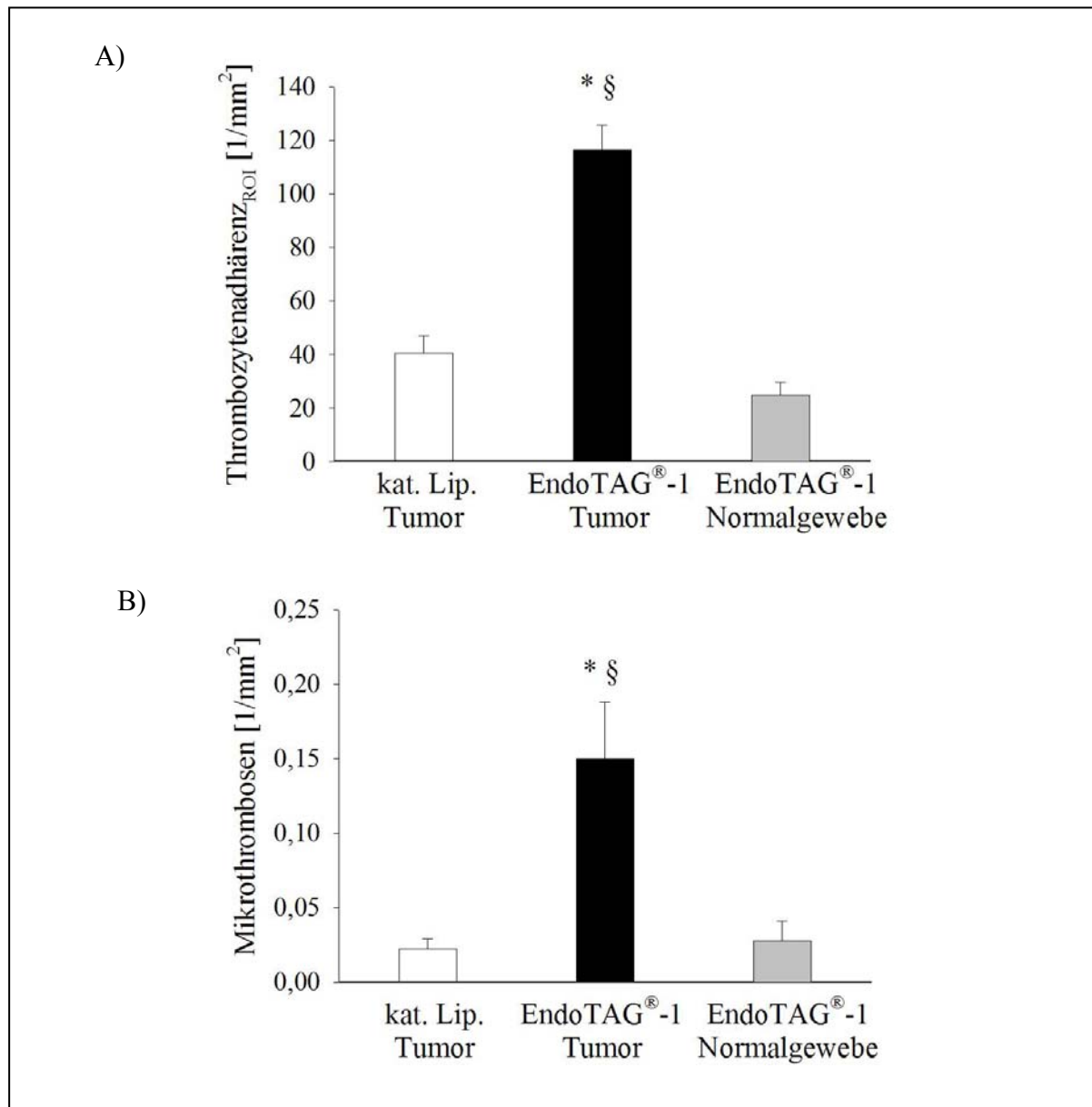


Abb. 25: Darstellung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen unter chronischen Therapiebedingungen. Nur EndoTAG[®]-1 führte nach wiederholter Gabe zu einer signifikanten Thrombozytenadhaerenz (A) und Induktion von Mikrothrombosen (B) im Tumor verglichen mit unbeladenen kationischen Liposomen. Der Vergleich mit einer Normalgewebekontrolle konnte zeigen, dass es sich hierbei um tumorselektive Effekte von EndoTAG[®]-1 handelt.

MW ± SEM, * $p < 0,05$ vs. kat. Liposomen, § $p < 0,05$ vs. Normalgewebe

IV DISKUSSION

1. Diskussion der Methodik

1.1 Das Modell der transparenten Rückenhautkammer

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von Thrombozyten unter antivaskulärer Therapie solider Tumore mit Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG[®]-1) zu untersuchen. Zur Analyse von Zell-Zell- oder Zell-Endothelinteraktionen *in vivo* werden häufig so genannte Akutmodelle wie z.B. Präparationen des Musculus cremaster (Baez, 1973; Vollmar et al., 2001b) oder des Dünndarms (Massberg et al., 1998; 1999) verwendet. Diese haben den Nachteil, dass Untersuchungen lediglich über einen Zeitraum von wenigen Stunden möglich sind und mit einem unmittelbar vorausgegangenem Trauma einhergehen. Weiterhin benötigen die Tiere zur Durchführung der Versuche eine Narkose. Unter Verwendung von Injektions- oder Inhalationsnarkotika kann es jedoch durch Beeinflussung mikrohämodynamischer Parameter zu einer Verfälschung der Untersuchungsergebnisse kommen (Franke et al., 1982; Franke and Endrich, 1983; Colantuoni et al., 1984).

Um derartige Probleme zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studie das von Endrich und Mitarbeitern entwickelte Modell der transparenten Rückenhautkammer am Hamster eingesetzt (Endrich et al., 1980). Dieses Modell erlaubt nach einer Erholungsphase von 1-2 Tagen eine Untersuchung der Mikrozirkulation über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen ohne den störenden Einfluss einer akuten Traumatisierung oder einer Narkose (Messmer and Krombach, 1998). Das Modell bietet gegenüber früheren Kammerpräparationen z.B. am Kaninchenohr (Sandison, 1924), an der Hamsterbackentasche (Warren et al., 1978) oder an der Rückenhaut von Mäusen (Algire, 1943) und Ratten (Papenfuss et al., 1979) einige wesentliche Vorteile. Durch eine optimierte atraumatische Präparationstechnik wird die Bildung von Granulationsgewebe, welches eine Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen Bedingungen erheblich einschränkt, weitgehend verhindert. Makroskopische und mikroskopische Untersuchungen konnten morphologische oder funktionelle Veränderungen der Gefäße im Präparationsareal ausschließen (Endrich et al., 1980). Die Belastung für die Versuchstiere wird durch Anfertigung der Kammern aus Titan, welches sich als Werkstoff durch ein geringes Gewicht, eine hohe Stabilität und seine biologische Inertheit auszeichnet, minimiert (Menger et al., 1990). Darüber hinaus ermöglicht die Kammerkonstruktion eine vereinfachte Implantation und Beobachtung verschiedener syngener oder allogener Gewebe wie z.B. Tumorzellen (Endrich et al., 1982b; Leunig et al.,

1992; Borgstrom et al., 1995), Langerhans Inseln (Menger et al., 1990; Vajkoczy et al., 1995), Ovarialfollikel (Vollmar et al., 2001a) und Nebenschilddrüsengewebe (Strieth et al., 2005).

Aufgrund der angeführten Vorteile eignet sich das Modell hervorragend zur Bearbeitung der Fragestellungen im Rahmen der vorliegenden Studie. Mit Hilfe der Rückenhautkammer können Veränderungen der Tumormikrozirkulation und der Thrombozyten-Endothelinteraktionen *in vivo* sowohl unmittelbar während der Infusion der Wirksubstanzen, als auch im weiteren Therapieverlauf erfasst werden. Es ist somit möglich, akute Therapieeffekte von den Auswirkungen einer wiederholten antivaskulären Behandlung zu unterscheiden. Weiterhin erlaubt die Kammer durch Untersuchung der umgebenden Rückenhautmuskulatur im Präparationsareal einen direkten Vergleich mit einer intrinsischen Normalgewebekontrolle. Die Frage nach der Tumorselektivität der antivaskulären Therapie lässt sich hierdurch einfach klären.

Als Tumorzelllinie wurde das amelanotische Hamstermelanom A-Mel-3 gewählt (Fortner et al., 1961). Dieser Tumor war in der Vergangenheit Gegenstand ausgiebiger Forschungsaktivitäten am Institut für Chirurgische Forschung und wurde in der Rückenhautkammer detailliert charakterisiert (Asaishi et al., 1981; Endrich et al., 1982a; Endrich et al., 1982b; Goetz, 1987). Weiterhin stammen entscheidende Erkenntnisse über die Funktion und Wirkung von EndoTAG[®]-1 aus Untersuchungen am A-Mel-3 Melanom (Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004; Eichhorn et al., 2006). Diese Studien bilden eine wesentliche Grundlage der vorliegenden Arbeit.

Um einer Verfälschung der Untersuchungen durch entzündliche oder traumatische Veränderungen des Präparationsareals vorzubeugen, wurden die von Sewell aufgestellten Anforderungen an eine intakte Mikrozirkulation als Einschlusskriterien für die Versuche definiert (Sewell, 1966). Die Erfolgsrate der Kammerpräparation war hiernach > 80%.

1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und offline Videobildanalyse

Die Darstellung und quantitative Analyse der Mikrozirkulation und der Thrombozyten-Endothelinteraktionen in Tumor und Normalgewebe erfolgten in dieser Studie anhand intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Dank hochauflösender optischer Systeme und der Entwicklung digitaler Technologien stellt die Intravitalmikroskopie in der modernen

Mikrozirkulationsforschung ein unverzichtbares Instrument dar (Vajkoczy et al., 2000). Durch ihren nicht-invasiven Ansatz, die hohe optische Abbildungsqualität und die Möglichkeit einer kontinuierlichen Beobachtung der Gefäßstrukturen ist die Intravitalmikroskopie anderen Untersuchungstechniken überlegen. Bei einer histologischen Analyse beispielsweise wird das Gewebe lediglich zu einem einzelnen Zeitpunkt beurteilt, wodurch Aussagen zu dynamischen Abläufen nur eingeschränkt und erschwert zulässig sind. Zudem können bei der Aufbereitung des Gewebes Gefäßveränderungen auftreten, welche zu einer Beeinträchtigung der Ergebnisse führen (Dobrin, 1996; Choy et al., 2005).

Durch die Entwicklung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe ist neben einer morphologischen Untersuchung der Angioarchitektur auch eine Erfassung dynamischer Prozesse möglich. So können Veränderungen mikrohämodynamischer Messparameter wie z.B. die Erythrozytenfließgeschwindigkeit, die funktionelle Gefäßdichte oder die Gefäßpermeabilität quantifiziert werden. Darüber hinaus ermöglicht eine Fluoreszenzmarkierung die selektive Visualisierung korpuskulärer Blutbestandteile und die Quantifizierung von Zell-Zell- bzw. Zell-Endothelinteraktionen *in vivo* (Menger and Lehr, 1993; Vajkoczy et al., 2000).

Der Gebrauch von Fluoreszenzfarbstoffen während der Intravitalmikroskopie unterliegt jedoch auch Limitationen. Vor allem bei einer wiederholten Untersuchung ausgewählter Gefäßabschnitte kann es durch Akkumulation von Fluoreszenzmarkern, hohe Belichtungsintensitäten und lange Belichtungszeiten zu phototoxischen Reaktionen kommen. Diese bewirken eine Störung der vaskulären Integrität und der Funktion von Blutzellen. (Herrmann, 1983; Povlishock et al., 1983; Reed and Miller, 1988). Die applizierte Menge an Lichtenergie pro Untersuchungsareal sollte demnach so gering wie möglich gehalten werden. Dies kann z.B. durch Verkürzung der Observationsdauer und den Einsatz von Bildverstärkern und Kameras mit einer hohen Lichtsensitivität erreicht werden (Saetzler et al., 1997). Studien zur Abhängigkeit phototoxischer Effekte von der Art des Fluoreszenzfarbstoffes und der Lichtintensität konnten zeigen, dass bei Untersuchungen der Mikrozirkulation unter diesen Maßnahmen nicht mit der Induktion einer phototoxischen Reaktion zu rechnen ist (Steinbauer et al., 2000; Harris et al., 2002).

Um das Ausmaß derartiger phototoxischer Reaktionen zu minimieren, fanden die intravitalmikroskopischen Messungen für die vorliegende Arbeit an einem Mikrozirkulationsarbeitsplatz statt, der unter anderem nach den oben genannten Gesichtspunkten konzipiert wurde. So kann durch Verwendung verschiedener optischer Filter eine Epiillumination ausschließlich im jeweils benötigten Lichtspektrum durchgeführt

werden. Weiterhin ermöglicht ein computergesteuerter Objektisch das rasche Aufsuchen der Untersuchungsareale. Hierdurch kann die Belichtungsdauer und somit die applizierte Lichtenergie verringert werden. Durch die Verbindung der Kamera mit einer Videodokumentationseinheit können Aufnahmen der Untersuchung angefertigt werden. Eine unmittelbare Auswertung während des Versuchs wird dadurch unnötig, was ebenfalls zu einer Reduktion der Belichtungsdauer pro Messareal beiträgt.

1.3 Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten

Zur Visualisierung von Thrombozyten in der Intravitalmikroskopie ist eine Fluoreszenzmarkierung notwendig. Prinzipiell ist eine *in vivo* Markierung durch intravenöse Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes möglich (Tangelder et al., 1982; 1988; Katayama et al., 2000), allerdings ist eine derartige Methodik aufgrund verschiedener Faktoren für diese Studie weniger geeignet. Zum einen wird zwar ein hoher prozentualer Anteil der Thrombozyten angefärbt, es werden aber auch andere korpuskuläre Blutbestandteile wie z.B. Leukozyten markiert (Tangelder et al., 1982; Suematsu et al., 1994). Eine Differenzierung der Zellpopulationen ist dann nur anhand des Größenunterschiedes möglich und gestaltet sich in der Zirkulation entsprechend schwierig. Darüber hinaus kann es durch akzidentelle Markierung von Plasmaproteinen zu einer diffusen intravasalen Fluoreszenz und damit zu einer erheblichen Kontrastverschlechterung kommen. Zum anderen ist im Tumor aufgrund der erhöhten Permeabilität angiogenetischer Gefäße zusätzlich mit einer Extravasation des Fluoreszenzfarbstoffes zu rechnen. Hierdurch nimmt die Hintergrundfluoreszenz zu und die Bildqualität der intravitalmikroskopischen Aufnahmen verschlechtert sich deutlich (Katayama et al., 2000).

Aufgrund dieser Limitationen erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine *ex vivo* Markierung der Thrombozyten. Hierbei ist eine selektive Anfärbung der gewünschten Zellart nach vorausgegangener Isolierung möglich. Außerdem können überschüssige Farbstoffreste leicht entfernt und somit unspezifische Reaktionen mit anderen korpuskulären Blutbestandteilen sowie eine Anreicherung im Extravasalraum vermieden werden. Ein erfolgreiches Protokoll zur *ex vivo* Fluoreszenzmarkierung von Thrombozyten stammt aus einer Studie von Massberg et al. über ein neues Mikrozirkulationsmodell am Dünndarm der Maus (Massberg et al., 1998). Hierbei wurde plättchenreiches Plasma syngener Spendertiere gewonnen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G inkubiert. Dieser Farbstoff zeichnet sich durch Akkumulation in den Membranen der Mitochondrien aus. Die so markierten Thrombozyten

wiesen weder *in vitro* noch *in vivo* Zeichen einer Aktivierung oder einer veränderten Funktion auf. Für Untersuchungen der Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor ist diese Methode der Fluoreszenzmarkierung jedoch nicht optimal, da es hier zu einer raschen Umverteilung des Rhodamin 6G aus den Thrombozyten in das Tumorigerinterstitium kommt. Eine ausreichende Visualisierung der Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation ist hiernach nicht mehr möglich.

Aus diesem Grund wurde das Protokoll von Manegold et al. soweit modifiziert, dass es den veränderten Bedingungen im Tumor gerecht wird (Manegold, 2003). Statt Rhodamin 6G wurde Carboxyfluoreszein-diazetat-Succinimidylester (CFDA-SE) für die Markierung der Thrombozyten verwendet. CFDA-SE ist eine nicht fluoreszierende Vorstufe, welche nach passiver Diffusion in die Zellen durch intrazelluläre Esterasen gespalten wird. Hierbei entsteht der Fluorophor Carboxyfluoreszein-Succinimidylester (CFSE). Ein wesentlicher Vorteil der Fluoreszenzmarkierung mit CFDA-SE besteht in der stabilen Verbindung, die der Farbstoff durch Reaktion mit Lysinresten intrazellulärer Proteine eingeht (Suematsu et al., 1994; Miura et al., 1995). Eine schnelle Umverteilung des Fluorophors wird hierdurch verhindert und die Zellen können über mehrere Stunden hinweg in der Tumormikrozirkulation visualisiert werden. Weiterhin wurde in dem modifizierten Protokoll eine geringere Menge an Prostaglandin E2 (PGE2) eingesetzt, um eine Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* zu verhindern, ohne jedoch eine irreversible Hemmung zu bewirken. Mittels Durchflusszytometrie und Aggregometrie konnte gezeigt werden, dass die Thrombozyten durch die Markierung nicht aktiviert werden und ihre volle Funktionalität behalten (Manegold et al., 2003). Das Verfahren wurde kürzlich erfolgreich auf die Wüstenrennmaus übertragen (Waldner et al., 2007). Funktionstests konnten wiederum bestätigen, dass die Thrombozyten durch die Markierung mit CFDA-SE nicht beeinträchtigt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Tumor intravitalmikroskopisch über einen Zeitraum von 2-3 Stunden analysiert werden. Um eine sichere Darstellung der Thrombozyten während der gesamten Versuchsdauer zu gewährleisten, wurde eine Fluoreszenzmarkierung mit CFDA-SE nach dem Protokoll von Manegold durchgeführt (Manegold et al., 2003). Da Hamster ein größeres Blutvolumen als Mäuse und somit auch eine größere Gesamtzahl an Thrombozyten aufweisen, wurden die Probenvolumina bei konstantem Verhältnis der Einzelkomponenten so angepasst, dass der prozentuale Anteil markierter Thrombozyten an der Gesamtpopulation nach Transfusion weiterhin 5-10% entsprach. Auch wenn mit der Fluoreszenzmikroskopie nur markierte Zellen

quantifiziert werden können, sind bei dieser Relation dennoch repräsentative Aussagen möglich (Tangelder et al., 1988). Auf eine gesonderte *in vitro* Kontrolle der Thrombozytenfunktion nach Markierung wurde verzichtet, da es bei den *in vivo* Untersuchungen keinen Anhalt für eine Aktivierung oder sonstige Veränderungen gab.

2. Diskussion der Ergebnisse

2.1 *In vitro* Untersuchung der Thrombozytenaktivierung

Es ist bekannt, dass kationische Liposomen aufgrund ihrer Ladung mit anionischen Plasmaproteinen und Oberflächenmolekülen korpuskulärer Blutbestandteile interagieren können (Martin and MacDonald, 1976; Nishikawa and Huang, 2001). Da Thrombozyten eine negative Netto-Oberflächenladung besitzen (Seaman and Vassar, 1966), sind solche Interaktionen wahrscheinlich. Eichhorn und Mitarbeiter haben am Syrischen Goldhamster die Effekte einer systemischen Injektion kationischer Liposomen auf die korpuskulären Blutbestandteile genauer untersucht (Eichhorn et al., 2004b). Mittels durchflusszytometrischer Analysen arterieller Blutproben konnte gezeigt werden, dass es nach intravenöser Applikation zu einer ausgeprägten Bindung der Liposomen an Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten kommt. Darüber hinaus wurde fünf Minuten nach Injektion ein vorübergehender, signifikanter Abfall der Thrombozyten- und Leukozytenzahlen beobachtet. Durch eine vorausgehende Injektion von Protamin konnte dieses Phänomen zum Teil aufgehoben werden. Eine Blockade möglicher Bindungsstellen für kationische Liposomen durch das ebenfalls positiv geladene Protamin scheint hierbei eine Rolle zu spielen.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer solchen Interaktion auf den Aktivierungsgrad der Thrombozyten *in vitro* untersucht. Hierbei zeigte sich in der Durchflusszytometrie, dass sowohl eine Stimulation mit unbeladenen kationischen Liposomen, als auch mit EndoTAG[®]-1 zu einer starken Aktivierung der Thrombozyten führt. Der Anteil aktivierter Zellen sowie das erreichte Ausmaß der Aktivierung waren vergleichbar mit der Positivkontrolle, die mit dem löslichen Agonisten Phorbolmyristatacetat (PMA) stimuliert worden war. Die Ergebnisse legen nahe, dass der eigentliche Effektor dieser Reaktion in den Liposomen selbst und nicht im enkapsulierten Paclitaxel zu sehen ist. Gegen eine Aktivierung der Thrombozyten durch Paclitaxel spricht auch eine frühere Studie zum Einfluss Tubulin-stabilisierender Wirkstoffe auf die Thrombozytenphysiologie. Hier konnte gezeigt werden, dass die biochemischen und

strukturellen Eigenschaften von Thrombozyten durch Paclitaxel nicht beeinträchtigt werden. (White and Rao, 1983).

Eine mögliche Erklärung für das Aktivierungspotential kationischer Liposomen bietet sich, wenn man die Ergebnisse einer frühen Studie zum Aggregationsverhalten von Thrombozyten nach Kontakt mit immobilisiertem Kollagen betrachtet (Wilner et al., 1968). Hier wurde deutlich, dass insbesondere positiv geladene Aminogruppen des Kollagens für die Aktivierung und die folgende Aggregation von Thrombozyten verantwortlich sind. Es ist denkbar, dass bei der Stimulation von Thrombozyten durch kationische Liposomen bzw. EndoTAG[®]-1 ebenfalls ein ladungsabhängiger Mechanismus eine Rolle spielt. Darüber hinaus scheinen aber auch andere Faktoren von Bedeutung zu sein. In der Literatur finden sich kontroverse Aussagen über den Einfluss der Ladung von Liposomen auf das Verhalten der Thrombozyten *in vitro* und *in vivo*. So zeigte sich in einer ausführlichen Studie zu diesem Thema überraschenderweise, dass ausschließlich negativ geladene Liposomen eine reversible Thrombozytenaggregation induzieren konnten (Zbinden et al., 1989). In anderen Studien dagegen wurde sowohl für kationische als auch für anionische Liposomen eine aggregationshemmende Wirkung verzeichnet (Juliano et al., 1983; Zakrevskii et al., 1992). Inwiefern diese unterschiedlichen Ergebnisse durch die Zusammensetzung, die Höhe der Ladung und die Konzentration der untersuchten Liposomen bedingt sind, kann an dieser Stelle nicht beurteilt werden.

Da für durchflusszytometrische Untersuchungen am Hamster keine geeigneten Aktivierungsmarker zur Verfügung stehen, wurden in der vorliegenden Arbeit humane Thrombozyten untersucht. Auch wenn die korpuskulären Blutbestandteile verschiedener Säugetiere in ihren morphologischen und funktionellen Eigenschaften weitgehend übereinstimmen, ist ein Rückschluss aufgrund der Speziesunterschiede nur unter Vorbehalt möglich (Bastian, 2002). Die Ergebnisse der *in vivo* Versuchsreihen in Rahmen dieser Arbeit sprechen jedoch dafür, dass die Beobachtungen an humanen Thrombozyten auch auf Thrombozyten des Hamsters zutreffen.

2.2 *In vivo* Untersuchung der Tumormikrozirkulation

Im Rahmen antivaskulärer Therapiekonzepte macht man sich die pathophysiologischen Besonderheiten des Tumorgefäßsystems und des intratumoralen Mikromilieus gezielt zunutze, um die Blutversorgung des Tumors und damit seine Progression einzuschränken. In den frühen Stadien der Tumorentwicklung scheint ein antiangiogenetischer Therapieansatz

besonders viel versprechend, da hierbei die Bildung neu aussprossender Gefäße inhibiert werden soll. In fortgeschrittenen Tumorstadien gewinnen dagegen *Vascular Targeting* Strategien zunehmend an Bedeutung aufgrund der Möglichkeit, das bereits etablierte Gefäßsystem anzugreifen (Eichhorn et al., 2004a). Seit den Anfängen antivaskulärer Therapieformen in den 1970-er Jahren haben sich Forschungsgruppen weltweit mit der Entwicklung geeigneter Therapeutika und deren Auswirkungen auf die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung verschiedener Tumore beschäftigt (Augustin, 2003). Ein grundlegendes Verständnis der strukturellen und funktionellen Veränderungen der Tumormikrozirkulation unter antivaskulärer Therapie stellt dabei eine wichtige Voraussetzung für die Überwachung und Optimierung des Therapieerfolges dar.

Unter den sog. *Vascular Targeting* Agents wurden die kleinmolekularen Substanzen mit Tubulin-bindenden Eigenschaften diesbezüglich in den letzten Jahren eingehend untersucht (Tozer et al., 2005). Insbesondere der Wirkstoff Combretastatin A-4-Phosphat (CA-4-P) war hierbei Gegenstand ausführlicher Studien (Tozer et al., 1999; Malcontenti-Wilson et al., 2001; Chaplin and Hill, 2002; Brooks et al., 2003; Vincent et al., 2005). Mittels Intravitalmikroskopie, Laser-Doppler und Histologie wurden die Auswirkungen von CA-4-P auf das Gefäßsystem und die Mikrozirkulation in verschiedenen Tumormodellen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine einmalige Infusion von CA-4-P zu einer drastischen Schädigung der Neovaskularisation mit Reduktion der Tumorperfusion im Sinne eines vaskulären *Shut Downs* führt (Tozer et al., 2001; Chaplin and Hill, 2002). Die Quantifizierung mikrohämodynamischer Messparameter ergab bereits wenige Minuten nach Therapie eine signifikante Abnahme der Erythrozytenfließgeschwindigkeit und des intratumoralen Blutflusses. Bei einem Teil der Gefäße wurde außerdem eine Reduktion der Gefäßdurchmesser nachgewiesen (Tozer et al., 2001; Malcontenti-Wilson et al., 2001). Die Autoren gehen davon aus, dass die Wirkung von CA-4-P auf einem Zusammenspiel verschiedener Faktoren beruht. Zum einen konnte eine signifikante Zunahme der Gefäßpermeabilität verzeichnet werden, welche zu einer zusätzlichen Steigerung des ohnehin erhöhten interstitiellen Drucks führt. Zum anderen wurde eine vermehrte Interaktion von Blutzellen diskutiert. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestärkt, dass CA-4-P in der Abwesenheit von Blut an einem Modell der isolierten Tumorperfusion zwar antivaskuläre Effekte zeigt, *in vivo* jedoch zu einem wesentlich stärker ausgeprägten antivaskulären Effekt führt (Dark et al., 1997). Die Wirkung von CA-4-P scheint also sowohl auf einer direkten Schädigung der Gefäße als auch auf einer indirekten Beeinträchtigung der Mikrozirkulation in Abhängigkeit von Zellen und/oder Komponenten des Blutes zu beruhen (Tozer et al., 2005).

In Abbildung 26 sind die pathophysiologischen Zusammenhänge der potentiellen Wirkmechanismen schematisch dargestellt.

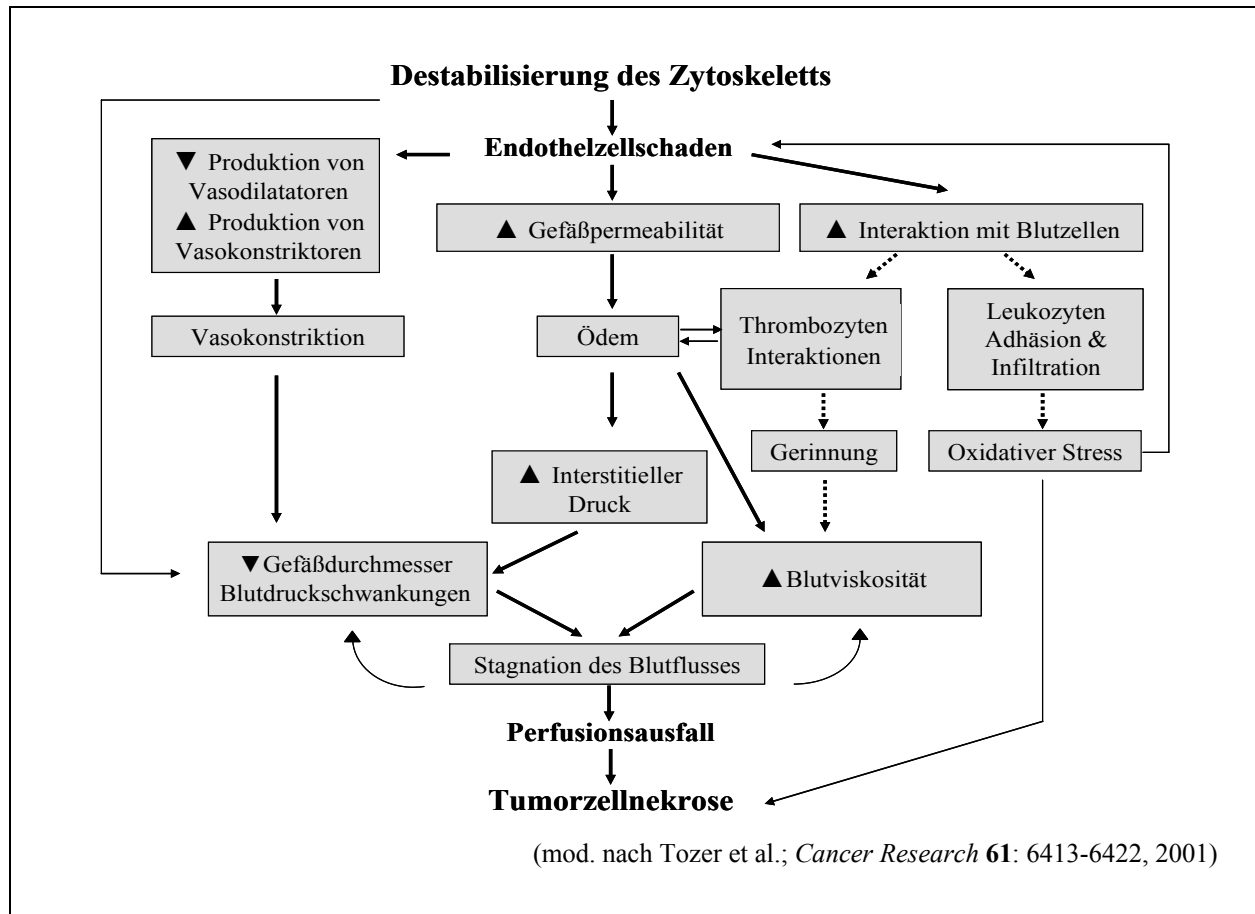


Abb. 26: Mögliche Mechanismen beim *Vascular Targeting* mit *Combretastatin A-4-Phosphat*.

Vergleichbare Mechanismen scheinen auch bei der Therapie mit anderen *Vascular Targeting* Agenzien eine Rolle zu spielen. So führt die kleinmolekulare Wirksubstanz DMXAA (5,6-Dimethylxanthenone-4-Aceti Acid) über eine zytokingesteuerte Schädigung der Endothelzellen ebenfalls zu einer Steigerung der Gefäßpermeabilität. Gleichzeitig konnte eine signifikante Aktivierung von Thrombozyten nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der zuvor dargestellten Zusammenhänge können diese Faktoren zu einer akuten Verringerung der Tumorperfusion beitragen (Baguley, 2003; Zhao et al., 2005).

Es liegt nahe, dass antivaskuläre Therapieformen, die sich primär gegen Endothelzellen richten, grundsätzlich über ähnliche Wirkmechanismen verfügen, da die Endothelläsion bei allen den Ausgangspunkt für die zur Tumornekrose führende Reaktionskette darstellt.

Unsere Arbeitsgruppe hat sich in den letzten Jahren eingehend mit dem Einsatz kationischer Liposomen im Rahmen antivaskulärer Therapiestrategien beschäftigt (Schmitt-Sody et al., 2003; Krasnici et al., 2003; Eichhorn et al., 2004b). Strieth et al. haben die Auswirkungen von EndoTAG[®]-1 auf die Tumormikrozirkulation des A-Mel-3 am Modell der transparenten Rückenhautkammer des Goldhamsters eingehend untersucht (Strieth et al., 2004). Hierbei zeigten sich nach wiederholter systemischer Infusion von EndoTAG[®]-1 (Tag 3, 5 und 7 nach Tumorzellimplantation) qualitativ und quantitativ ähnliche Effekte wie nach antivaskulärer Therapie mit Combretastatin-4-P (siehe 2.2.2.). So führte EndoTAG[®]-1, wenn auch über einen längeren Therapiezeitraum hinweg, ebenfalls zu einer massiven Schädigung der Tumorgefäße. Dies äußerte sich in einer signifikanten Reduktion der funktionellen Gefäßdichte und einer vaskulären Reifungsstörung mit fehlender Zunahme der Gefäßdurchmesser. Zusammen mit einer Verminderung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit resultierte daraus eine Reduktion des Blutflusses um 60% in einzelnen Gefäßabschnitten im Vergleich zur Therapie mit konventionellem Paclitaxel oder unbeladenen kationischen Liposomen. Das Tumorstadium wurde hierunter signifikant verzögert. Interessanterweise konnte auch nach Infusion unbeladener kationischer Liposomen ein moderater antitumoraler Effekt verzeichnet werden. So kam es in dieser Gruppe zu einer tendenziell geringeren Größenzunahme der Tumore als in den mit Glukose oder Taxol therapierten Kontrollen. Dieses Phänomen wurde bereits zuvor beobachtet, jedoch nicht weiter analysiert (Schmitt-Sody et al., 2003).

Während in vorausgegangenen Studien detailliert auf die mikrozirkulatorischen Veränderungen nach wiederholter Therapie mit EndoTAG[®]-1 eingegangen wurde, gibt es bisher keine Daten zu den akuten Auswirkungen auf das Gefäßsystem und die Hämodynamik im Tumor. Diesbezügliche Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit erbrachten ein überraschendes Ergebnis. Es zeigte sich, dass es bereits im Verlauf einer einmaligen Gabe von EndoTAG[®]-1 zu einer erheblichen Beeinflussung der Tumormikrozirkulation kommt. In der Intravitalmikroskopie imponierten am Ende der 90-minütigen Infusion diffuse Perfusionsausfälle bis hin zu vollständigen Kontrastmittelabbrüchen einzelner Tumorgefäße. Die quantitative Analyse ergab eine signifikante Reduktion der funktionellen Gefäßdichte und eine Verminderung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Hieraus resultierte wiederum eine signifikante Abnahme des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex verglichen mit den Ausgangswerten. In Einklang mit den Ergebnissen vorausgegangener Untersuchungen hatte die Infusion von konventionellem Paclitaxel (Taxol[®]) keine derartigen frühen antivaskulären Effekte. Im Gegenteil kam es hier sogar zu einer tendenziellen Verbesserung der

Tumorperfusion, eventuell infolge eines gesteigerten Perfusionsdruckes durch Zunahme des Intravasalvolumens. Umso erstaunlicher war die Beobachtung, dass es unter Therapie mit unbeladenen kationischen Liposomen zu absolut identischen Gefäßveränderungen im Tumor kam wie unter Therapie mit EndoTAG[®]-1. Diese Beobachtung legt nahe, dass die akuten Therapieeffekte von EndoTAG[®]-1 weniger auf das enkapsulierte Paclitaxel, sondern vielmehr auf das Transportvehikel, nämlich die kationischen Liposomen, zurückzuführen sind. In Anbetracht der deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nach 3-facher Therapie (Strieth et al., 2004) scheinen hier verschiedene Wirkmechanismen eine Rolle zu spielen, wobei die Therapiewiederholung anscheinend von entscheidender Bedeutung ist. Um welche Mechanismen es sich dabei konkret handelt, konnte bisher nicht hinreichend geklärt werden. Ein möglicher Faktor ist die durch intravitalmikroskopische Messungen der Extravasation von fluoreszenzmarkiertem Albumin nachgewiesene signifikante Steigerung der Gefäßpermeabilität nach wiederholter Infusion von EndoTAG[®]-1 verglichen mit der Glukose-Kontrolle (Strieth, in press). Den Überlegungen von Tozer und Mitarbeitern zufolge ist jedoch davon auszugehen, dass eine antivaskuläre Therapie mit EndoTAG[®]-1, die wie Combretastatin A-4-P primär auf eine Schädigung der Endothelzellen abzielt, neben einer Permeabilitätssteigerung auch über andere Mechanismen vermittelt wird. Hier ist insbesondere die Beteiligung von korpuskulären Blutbestandteilen zu nennen. Eine gesteigerte Leukozytenrekrutierung konnte in diesem Zusammenhang bereits ausgeschlossen werden (Strieth, nicht publizierte Daten). Thrombozytenaggregationen wurden bisher nur im Rahmen histologischer Analysen einzelner Tumore nach Behandlung mit unbeladenen kationischen Liposomen beobachtet (Eichhorn et al., 2006). Ziel dieser Arbeit war es daher, die Thrombozyten-Endothelinteraktionen sowohl unmittelbar unter einmaliger Therapie als auch nach wiederholter Therapie mit EndoTAG[®]-1 *in vivo* zu analysieren.

2.3 *In vivo* Untersuchung der Thrombozyten-Endothelinteraktionen

Wie bereits einleitend erwähnt existieren kontroverse Meinungen bezüglich der Rolle von Thrombozyten im Rahmen der Angiogenese solider Tumore.

Pinedo und Mitarbeiter postulierten, dass Thrombozyten durch Veränderungen des Gleichgewichts zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren in der Lage sind, den Angiogeneseprozess zu induzieren. Die Voraussetzung hierfür sahen sie unter anderem durch die heterogene Tumormikrozirkulation und das lückenhafte Endothel mit Exposition der subendothelialen Matrix gegeben. Neben der Freisetzung Thrombozyten-stimulierender

Faktoren durch die Tumorzellen selbst trügen diese Eigenschaften zu einer Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten bei (Pinedo et al., 1998).

Eine Reihe von Studien scheint diese Hypothese zu bestätigen. So konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen *in vitro* unter dem Einfluss von VEGF vermehrt *Tissue Faktor* produzieren und einen thrombogenen Phänotyp annehmen. Hierunter kommt es zu einem vermehrten Auftreten von Thrombozyten-Endothelinteraktionen (Zucker et al., 1998; Verheul et al., 2000b). Weiterhin wurde die Bildung kapillärer Strukturen *in vitro* durch die Anwesenheit von Thrombozyten gefördert (Pipili-Synetos et al., 1998). Allerdings wurden die genannten Studien ausschließlich an HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) durchgeführt, so dass eventuelle Besonderheiten von angiogenetischen Endothelzellen nicht erfasst wurden.

Eine *in vivo* Aktivierung und Adhärenz von Thrombozyten in der Tumormikrozirkulation konnte bei der immunhistologischen Analyse unterschiedlicher humaner Weichteilsarkome nachgewiesen werden (Verheul et al., 2000a). Aufgrund der Heterogenität des Untersuchungsmaterials und der geringen Untersuchungsgröße (n=7) kann anhand dieser Studie allerdings keine allgemeingültige Aussage zu den Verhältnissen in der Tumormikrozirkulation getroffen werden.

In anderen Studien konnte die Hypothese von Pinedo allerdings nicht bestätigt werden. Manegold et al. führten am Modell der transparenten Rückenhautkammer detaillierte Analysen der Thrombozyten-Endothelinteraktionen im Verlauf der Vaskularisierung zweier unterschiedlicher Tumore *in vivo* durch. Hier zeigte sich lediglich eine leicht erhöhte Anzahl von Thrombozyten, die im Sinne des „*thrombocyte rolling*“ eine initiale Interaktion mit dem Tumorendothel eingingen, jedoch keine gesteigerte Thrombozytenadhärenz (Manegold et al., 2003). Vorausgegangenen Untersuchungen zufolge sind diese schwachen Interaktionen alleine nicht ausreichend, um eine Ausschüttung von Wachstumsfaktoren zu bewirken (Wartiovaara et al., 1998; Banks et al., 1998). Überraschenderweise konnte selbst bei hinreichender Stimulation mit dem Kalziumionophor A23187, welches eine endotheliale Expression von P-Selektin und von Willebrand-Faktor bewirkt, keine wesentliche Thrombozytenadhärenz induziert werden (Manegold et al., 2003). Dieses Ergebnis spricht für eine verminderte Fähigkeit angiogenetischer Endothelzellen Thrombozyten über Adhäsionsmoleküle zu binden.

Vergleichbare Beobachtungen wurden bei der Analyse der Interaktion von Leukozyten mit dem Tumorendothel gemacht. Auch hier stellte sich heraus, dass derartige Interaktionen

aufgrund unzureichender Expression von Oberflächenrezeptoren vermindert sind (Dellian et al., 1995; Jain et al., 1996; Dirx et al., 2003). Dieser Mangel an spezifischen Adhäsionsmolekülen ist möglicherweise ein Schutzmechanismus des Tumors vor einer Schädigung der Mikrozirkulation durch Thrombozyten und Leukozyten.

Bei der intravitalmikroskopischen Charakterisierung des A-Mel-3 Melanoms durch Asaishi et al. wurden mit dem Auftreten nekrotischer Areale im Tumorzentrum große Konglomerate in den neu gebildeten Gefäßen beobachtet, die den Blutfluss teilweise vollständig blockierten. Diese Konglomerate wurden von den Autoren als Thrombozytenaggregate interpretiert (Asaishi et al., 1981). Spätere ultrastrukturelle Untersuchungen desselben Tumors konnten diese Beobachtung jedoch nicht stützen. Es wurden nur vereinzelt adhärente Thrombozyten im Bereich von Endothellücken und kleine Aggregate gesehen, welche zu keinem Verschluss der Gefäßlumina führten (Endrich et al., 1988). Diese neueren Ergebnisse decken sich mit der vorliegenden Arbeit. Auch hier konnten zu Ausgangsbedingungen keine relevanten Thrombozyten-Endothelinteraktionen in der Tumormikrozirkulation nachgewiesen werden.

Die Analyse der Thrombozyten-Endothelinteraktionen erfolgte *in vivo* anhand zweier verschiedener Protokolle, die eine Differenzierung zwischen akuten Effekten und Effekten nach wiederholter Therapie erlauben. Hierbei zeigten sich interessanterweise entscheidende Unterschiede in Abhängigkeit vom Behandlungsschema. So führten sowohl unbeladene kationische Liposomen als auch EndoTAG[®]-1 unmittelbar nach Infusion zu einer akuten Steigerung der Thrombozytenadhärenz. Dagegen war eine anhaltende Induktion von Thrombozyten-Endothelinteraktionen nach wiederholter Therapie nur für EndoTAG[®]-1 zu verzeichnen. Auch das intravasale Verteilungsmuster der Thrombozyten war unterschiedlich. Während es unter akuten Versuchsbedingungen zu einer homogenen Adhärenz einzelner Thrombozyten im gesamten Tumorgefäßsystem kam, waren nach wiederholter Therapie umschriebene Thrombosen nachweisbar. Die Ergebnisse lassen die Folgerung zu, dass die beobachtete Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel auf verschiedenen Wegen vermittelt wird.

Wie bereits zuvor erwähnt sind kationische Liposomen eventuell aufgrund ihrer Ladung in der Lage an Thrombozyten zu binden (Eichhorn et al., 2004b). In dieser Arbeit wurde zudem deutlich gemacht, dass es dabei zu einer Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* kommt. Diese Eigenschaften könnten erklären warum kationische Liposomen nach Anreicherung im

Tumorgefäßsystem unabhängig von der Enkapsulierung von Paclitaxel eine akute Interaktion zirkulierender Thrombozyten mit dem Endothel bewirken. Hierfür spricht auch das homogene Verteilungsmuster der Thrombozyten unter akuten Therapiebedingungen. Die Untersuchung von Tumor-Gefrierschnitten mittels Laser-Scanning-Mikroskopie konnte zeigen, dass dieses im Wesentlichen die gleichmäßige Verteilung Fluoreszenz-markierter Liposomen im Tumorgefäßsystem am Ende der Infusion widerspiegelt. Eine direkte Kollokalisierung der Thrombozyten mit den Liposomen konnte aufgrund der einheitlichen Auskleidung aller Tumorgefäße mit den liposomalen Wirksubstanzen zumindest bei der hier verwendeten Dosierung allerdings nicht nachgewiesen werden.

Zur Klärung der Effekte nach wiederholter Therapie sollte eine Beeinflussung durch direkte Interaktion der Thrombozyten mit den Wirksubstanzen ausgeschlossen werden. Hierzu wurden die Messungen im Abstand von 24 Stunden nach der letzten Infusion durchgeführt, da gezeigt werden konnte, dass kationische Liposomen nach diesem Zeitraum nicht mehr in der Zirkulation nachweisbar sind (Schmitt-Sody et al., 2003). Das Fehlen einer relevanten Thrombozytenadhärenz nach wiederholter Therapie mit unbeladenen Liposomen legt nahe, dass es sich bei den zuvor beschriebenen Thrombozyten-Endothelinteraktionen tatsächlich um ein akutes Phänomen handelt. Eine dauerhafte Interaktion kann dagegen durch Liposomen alleine nicht induziert werden. Die im Vergleich hierzu signifikant erhöhte Anzahl von Mikrothrombosen, welche nach wiederholter Infusion von EndoTAG[®]-1 beobachtet wurde, ist demnach am ehesten auf eine Wirkung des enkapsulierten Paclitaxel zurückzuführen. Ausgangspunkt hierfür könnte die zuvor nachgewiesene Schädigung des Tumorendothels mit Induktion von Endothelzelloptosen durch EndoTAG[®]-1 darstellen (Strieth et al., 2004). Die entscheidende Bedeutung solcher Endothelläsionen für die Entstehung von Thrombosen *in vivo* wurde erst kürzlich erneut bestätigt (Kiyomura et al., 2006). Pathophysiologisch kommen hierbei verschiedene Mechanismen zum Tragen. Einerseits werden durch die Schädigung des Endothels Komponenten der subendothelialen Matrix freigelegt, welche eine direkte Aktivierung und Adhärenz von Thrombozyten bewirken (Chen and Lopez, 2005). Andererseits wird die Produktion aggregationshemmender Faktoren wie z.B. von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin durch Zerstörung der Endothelzellen vermindert (Jin et al., 2005).

In Abbildung 27 sind die unterschiedlichen Mechanismen, welche nach antivaskulärer Therapie mit EndoTAG[®]-1 zu einer gesteigerten Thrombozytenadhärenz führen könnten, schematisch dargestellt.

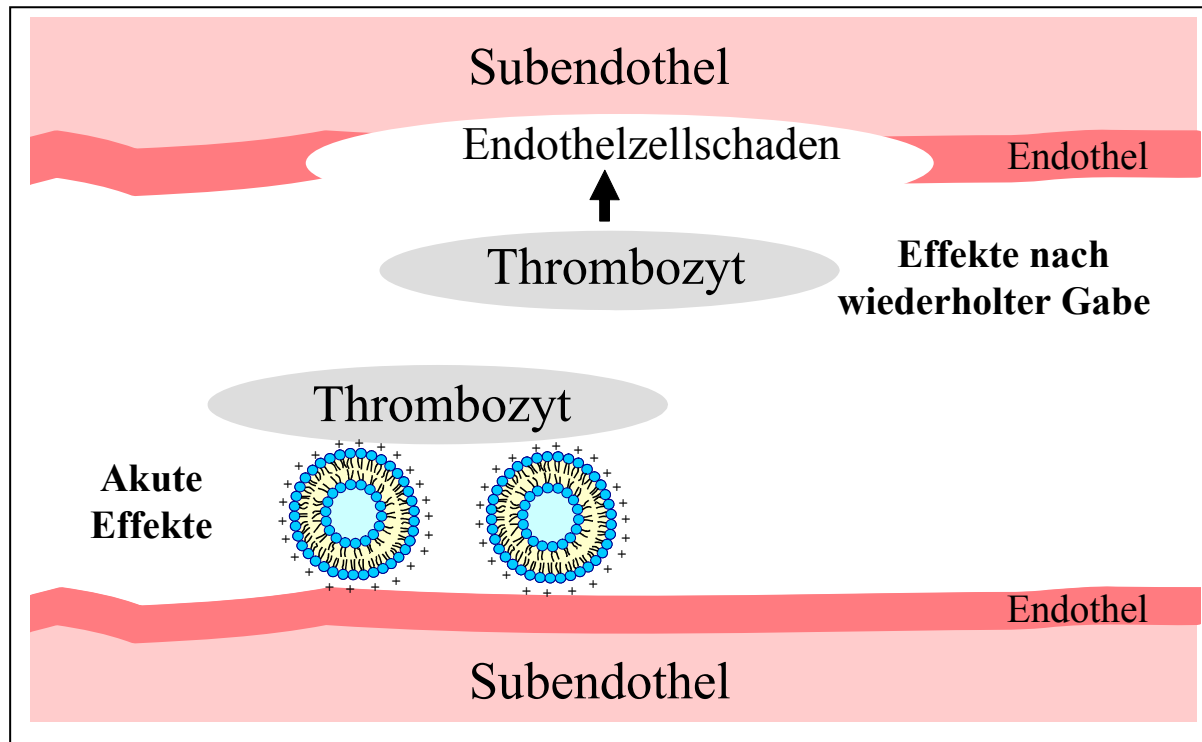


Abb. 27: Schematische Darstellung möglicher Thrombozyten-Endothelinteraktionen nach Therapie mit EndoTAG[®]-1. Eine akute Thrombozytenadhärenz könnte unmittelbar durch eine Bindung und Aktivierung zirkulierender Thrombozyten an endothelständige kationische Liposomen vermittelt werden. Dagegen scheinen nach wiederholter Therapie durch das enkapsulierte Paclitaxel verursachte Endothelläsionen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung intravasaler Thrombosen zu spielen.

Betrachtet man die deutlichen Unterschiede zwischen akuten Therapieeffekten und Effekten nach wiederholter Therapie im Hinblick auf die Induktion von Thrombozyten-Endothelinteraktionen und die Entstehung intratumoraler Thrombosen, so zeichnen sich eindeutige Parallelen zu den zuvor dargestellten mikrozirkulatorischen Veränderungen im Tumor ab. Die vorübergehende Aktivierung und Adhärenz von Thrombozyten auch durch unbeladene kationische Liposomen allein könnte die Ursache für die beobachtete akute Beeinträchtigung der Tumormikrozirkulation in dieser Kontrollgruppe sein, trotz fehlender Enkapsulierung von Paclitaxel. Hierdurch ließe sich auch erklären, warum unbeladene Liposomen in vorausgegangen Studien eine geringe antitumorale Wirkung aufwiesen (Schmitt-Sody et al., 2003; Strieth et al., 2004). Die kurzfristig auftretende Verringerung der

Tumorperfusion im Anschluss an die Infusion von kationischen Liposomen könnte im Rahmen einer wiederholten Therapie durchaus zu einer gewissen Verzögerung des Tumorwachstums führen. Eine längerfristige Unterbrechung des intratumoralen Blutflusses und eine damit einhergehende signifikante Hemmung der Tumorproliferation wurden dagegen nur nach Encapsulierung von Paclitaxel beobachtet. Dieses Phänomen lässt sich gut mit den ebenfalls ausschließlich in dieser Therapiegruppe nachgewiesenen thrombotischen Gefäßverschlüssen vereinbaren.

2.4 Tumorselektive Wirkung von EndoTAG[®]-1

Bei der Erprobung neuartiger Therapeutika in klinischen Studien steht anfänglich die Frage nach der Verträglichkeit des Präparates im Vordergrund. Eine ernstzunehmende Nebenwirkung, die gerade im Rahmen antivaskulärer Therapiestrategien von Bedeutung ist, stellt die generalisierte Aktivierung des hämostatischen Systems mit disseminierter intravasaler Gerinnung und thromboembolischen Komplikationen dar. Derartige unerwünschte Reaktionen sind für einige Angiogeneseinhibitoren, insbesondere in Kombination mit traditionellen Chemotherapeutika, beschrieben worden (Marx et al., 2002). So entwickelten 8 von 19 Patienten (42%) mit fortgeschrittenen soliden Tumoren in einer Phase I Studie unter Therapie mit SU 5416, einem kleinmolekularen Tyrosinkinase-Inhibitor des VEGF-Rezeptors Typ 2, in Verbindung mit Cisplatin und Gemcitabin signifikante Thromboembolien (Kuenen et al., 2002; 2003). Dieses alarmierende Ergebnis führte zum frühzeitigen Abbruch der Studie. Auch der bislang viel versprechende monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin[™]) führte bei gleichzeitiger Chemotherapie in verschiedenen Studien zu einem signifikant erhöhten Risiko für die Entwicklung arterieller Thrombosen (Skillings et al., 2005).

Aufgrund dieser Erfahrungen sollte in der vorliegenden Arbeit die antivaskuläre Therapie mit EndoTAG[®]-1 auch in Bezug auf die Tumorselektivität der erzielten Effekte evaluiert werden. Hierzu wurden vergleichende Messungen im Tumor und im umgebenden Normalgewebe bzw. in Rückenhautkammern ohne Tumor durchgeführt. Es zeigte sich, dass die frühe Induktion einer Thrombozyten-Endothelinteraktion ebenso wie die Entstehung intravasaler Thrombosen nach wiederholter Therapie ausschließlich im Tumorgefäßsystem, nicht jedoch in den Kapillaren des Rückenhautmuskels auftreten. Dieses Ergebnis spiegelt sich in den Veränderungen der Mikrozirkulation wider. So ist die akute Beeinträchtigung mikrohämodynamischer Messparameter ebenfalls streng auf den Tumor begrenzt. Die zuvor

nachgewiesene Tumorselektivität der Verteilung von EndoTAG[®]-1 nach systemischer Infusion (Schmitt-Sody et al., 2003) gilt folglich auch für dessen therapeutische Wirkung.

Trotz der guten Tumorselektivität und Verträglichkeit von EndoTAG[®]-1 in vorklinischen Studien kann das Auftreten thromboembolischer Komplikationen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Kontrolle des Gerinnungssystems mit Identifizierung von Hochrisiko-Patienten und einem frühzeitigen Nachweis prothrombotischer Veränderungen erscheint daher beim klinischen Einsatz von EndoTAG[®]-1 sinnvoll. Hierfür ist die Entwicklung geeigneter Monitoring-Verfahren von großem Interesse. Erst kürzlich wurden diesbezüglich verschiedene Vorschläge publiziert (Unruh et al., 2005; Ma et al., 2005). So konnte beispielsweise anhand der Bestimmung von Thrombin-Antithrombin-Komplexen (TAT), löslichem Fibrin und Antithrombin III im Plasma sowie der Leukozyten- und Thrombozytenzahlen im Blut eine systemische Aktivierung des hämostatischen Systems in Mäusen valide vorausgesagt werden. Mit Hilfe derartiger Marker ist in Zukunft vielleicht auch eine einfache Überwachung antivaskulärer Therapien im klinischen Alltag möglich.

Erste Erfahrungen am Patienten liefern bislang erfreulicherweise keinen Anhalt für das Auftreten unerwünschter Gerinnungsphänomene unter Therapie mit EndoTAG[®]-1 (Kliche et al., 2006).

2.5 Ausblick

Antivaskuläre Therapien haben in den letzten Jahren einen zunehmenden Stellenwert bei der Behandlung von Malignomen, aber auch anderen pathologischen Zuständen, die mit einer Proliferation von Blutgefäßen einhergehen, eingenommen (Folkman, 1995). Ein Grund hierfür dürfte unter anderem in der vielseitigen Einsetzbarkeit dieser Therapieform liegen. So sind antivaskuläre Wirkstoffe im Gegensatz zu vielen herkömmlichen Chemotherapeutika nicht nur gegen einige wenige Tumorarten wirksam, sondern potentiell gegen alle Tumorentitäten (Denekamp, 1999). Auch für EndoTAG[®]-1 wurde eine präklinische Wirksamkeit gegen eine große Bandbreite solider Tumore nachgewiesen (MediGene AG, Pressemitteilung 08.11.2004).

Trotz der unbestrittenen Fortschritte, die seit Einführung der Antiangiogenese (Folkman, 1971) und des *Vascular Targeting* (Denekamp, 1990) erzielt wurden, besteht auch weiterhin ein großer präklinischer Forschungsbedarf, um den Therapieerfolg in der Klinik zu optimieren

und aufkommende Probleme, wie zum Beispiel die Entwicklung von Therapieresistenzen zu antizipieren und zu lösen (Eichhorn et al., 2004a; Ferrara and Kerbel, 2005).

Während die antivaskuläre Wirkung von EndoTAG[®]-1 in der vorliegenden Arbeit unmittelbar durch intravitalmikroskopische Untersuchungen der Tumormikrozirkulation aufgezeigt werden konnte, gestaltet sich ein solcher Nachweis am Patienten schwierig (Kerbel and Folkman, 2002; Tozer, 2003). Gerade beim klinischen Einsatz ist es aber besonders wichtig, das Ansprechen auf eine antivaskuläre Therapie abschätzen zu können, um die Behandlung zu verbessern und gegebenenfalls „Non-Responder“ frühzeitig zu identifizieren. Eine direkte Beurteilung der Gefäße unter antivaskulärer Therapie am Menschen ist nur in manchen Fällen durch histologische Analysen von Tumorbiopsien möglich. Aus diesem Grund gewinnen nicht-invasive bildgebende Verfahren, mit denen der intratumorale Blutfluss als Surrogatmarker für den Zustand des Tumorgefäßsystems gemessen werden kann, zunehmend an Bedeutung (Pahernik et al., 2001; Anderson et al., 2003; Stucker et al., 2006). Kürzlich konnte auch beim *Vascular Targeting* mit EndoTAG[®]-1 der Nutzen von DCE-MRT Untersuchungen (dynamische kontrastverstärkte Magnetresonanztomographie) für diesen Zweck bestätigt werden (Eichhorn et al., 2006).

Ebenfalls von großer Bedeutung, insbesondere im Hinblick auf die zuvor erwähnte Resistenzentwicklung unter antivaskulärer Therapie (Kerbel et al., 2001; Sweeney et al., 2003), ist die Frage nach der optimalen Dosierung und Therapiedauer. In den letzten Jahren wurde zunehmend der Vorteil eines so genannten metronomischen Behandlungsschemas, welches eine gleichmäßige Therapie in niedriger Dosierung vorsieht, diskutiert (Browder et al., 2000a; Gately and Kerbel, 2001). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden deutliche Unterschiede der Therapieeffekte in Abhängigkeit vom Behandlungsschema beobachtet. In einer weiterführenden Studie wurde die Bedeutung dieses Phänomens genauer untersucht. Es zeigte sich, dass die metronomische Applikation von EndoTAG[®]-1 im Vergleich zu einer hoch dosierten Therapie eine signifikante Steigerung der antitumoralen Wirkung gegenüber Lewis-Lungenkarzinomen zur Folge hat (Lüdemann et al., 2006). Die in der vorliegenden Studie verwendete Dosierung von 5 mg Paclitaxel/ kg KG entspricht den Ergebnissen einer kürzlich erschienenen Publikation, bei der die optimale Dosis für eine metronomische Therapie von soliden Tumoren mit einer Cremophor EL freien Paclitaxelformulierung (ABI 007) zwischen 3 und 10 mg/kg KG lag (Ng et al., 2006).

Bei der Konzeption klinischer Studien mit EndoTAG[®]-1 sollten diese Erkenntnisse berücksichtigt werden.

Derzeit befindet sich EndoTAG[®]-1 in einer Phase II Studie in Kombination mit Gemcitabin zur Ersttherapie von Patienten mit fortgeschrittenen Pankreastumoren (Kliche et al., 2006). Eine vorläufige Zwischenanalyse mit den Daten von 73 Patienten konnte das gute Sicherheitsprofil von EndoTAG[®]-1 in vorausgegangenen Studien bestätigen. Zudem bestehen erste Anhaltspunkte für eine gesteigerte Wirksamkeit der Kombinationstherapie (Ansprechrate 67%) im Vergleich zur Monotherapie mit Gemcitabin (Ansprechrate 50%). Die Daten sind zu diesem Zeitpunkt aufgrund der noch geringen Fallzahl allerdings statistisch nicht aussagekräftig. Die Endergebnisse der Studie werden für 2008 erwartet. Seit April 2007 läuft eine weitere Phase II Studie zum Einsatz von EndoTAG[®]-1 bei Patientinnen mit hormonunabhängigem Brustkrebs (Triple receptor negative breast cancer). Ziel der Studie ist es, neben der Sicherheit und Verträglichkeit von EndoTAG[®]-1 vor allem dessen Wirksamkeit bei dieser Indikation zu untersuchen. Der Abschluss dieser Multizenterstudie ist für das Jahr 2009 geplant (MediGene AG, Pressemitteilung 13.04.2007).

V Zusammenfassung

Antivaskuläre Tumorthérapien haben in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. Das Konzept des *Vascular Targeting* sieht hierbei eine gezielte Destruktion des existierenden Tumorgefäßsystems vor mit dem Ziel, die Tumorzellen durch eine Unterbrechung ihrer nutritiven Versorgung zu zerstören. Um dieses Konzept ohne schwerwiegende Nebenwirkungen zu realisieren, bedarf es Wirksubstanzen, die nach systemischer Gabe selektiv das Tumorendothel schädigen. Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen (EndoTAG[®]-1) verfügt über derartige *Targeting*-Eigenschaften und führt nach wiederholter Gabe zu einer signifikanten Beeinträchtigung der Tumormikrozirkulation mit nachfolgender Reduktion des Tumorwachstums. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Effekte stellt die Aktivierung von Thrombozyten mit Entstehung intratumoraler Thrombosen dar. Ziel dieser experimentellen Studie war es daher, die Thrombozytenfunktion und die Thrombozyten-Endothelinteraktionen beim *Vascular Targeting* mit EndoTAG[®]-1 zu quantifizieren und im Hinblick auf eine Tumorselektivität der Therapie zu evaluieren.

Hierzu wurde zunächst *in vitro* der Aktivierungszustand von Thrombozyten nach Stimulation mit unbeladenen Liposomen oder EndoTAG[®]-1 durchflusszytometrisch analysiert. Anschließende Untersuchungen der Mikrozirkulation und der Thrombozyten-Endothelinteraktion erfolgten *in vivo* mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie am Modell der transparenten Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters. Als Tumorzelllinie diente das amelanotische Melanom A-Mel-3. Die Visualisierung der Mikrozirkulation erfolgte durch intravenöse Applikation von Tetramethylrodamin-Dextran. Zur Darstellung der Thrombozyten-Endothelinteraktion wurden syngene Thrombozyten *ex vivo* mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxifluoreszeindiazetat-Succinimidylester markiert und zu Versuchsbeginn den Versuchstieren transfundiert. In einer ersten *in vivo* Versuchsreihe wurden die akuten Effekte einer Therapie mit EndoTAG[®]-1 untersucht. Die Kontrollgruppen erhielten unbeladene kationische Liposomen oder konventionelles Paclitaxel (Taxol[®]). Die Messungen erfolgten zu Ausgangsbedingungen und unmittelbar nach 90-minütiger Infusion der Therapiesubstanzen. Durch gleichzeitige Beobachtung von nativen Gefäßen der Rückenhautmuskulatur war ein Vergleich mit einer intrinsischen Normalgewebekontrolle möglich. In einer zweiten *in vivo* Versuchsreihe wurden die Effekte einer wiederholten Therapie mit EndoTAG[®]-1 auf die Thrombozyten-Endothelinteraktion im Tumor analysiert.

Als Kontrolle dienten Tiere, die mit unbeladenen Liposomen therapiert worden waren. Die intravitalmikroskopischen Messungen erfolgten 24 Stunden nach 3-maliger Infusion der Wirksubstanzen an den Tagen 5, 6, und 7 nach Tumorzellimplantation. Zur Beurteilung der Tumorselektivität von EndoTAG[®]-1 wurden Tiere ohne Tumor in der Kammerpräparation als Normalgewebekontrolle untersucht.

Die *in vitro* Versuche zeigten, dass sowohl eine Stimulation mit EndoTAG[®]-1 als auch mit unbeladenen Liposomen zu einer starken Aktivierung von Thrombozyten führt. Ebenso konnte in beiden Gruppen *in vivo* eine signifikant erhöhte akute Thrombozytenadhärenz bei gleichzeitig reduziertem Thrombozytenflux im Vergleich zu Ausgangsbedingungen und einer Therapie mit Taxol beobachtet werden. Die Evaluation der Mikrozirkulationsparameter unter akuten Therapiebedingungen ergab für EndoTAG[®]-1 und für unbeladene Liposomen eine signifikante Reduktion der funktionellen Gefäßdichte und des mikrozirkulatorischen Perfusionsindex verglichen mit den Ausgangswerten und der mit Taxol therapierten Gruppe. Der Vergleich mit den Gefäßen des Normalgewebes offenbarte, dass es sich hierbei um tumorselektive Effekte handelt. Histologisch konnte der zuvor intravitalmikroskopisch gewonnene Befund einer diffus gesteigerten Thrombozytenadhärenz im gesamten Tumorgefäßsystem nach Infusion von unbeladenen Liposomen oder EndoTAG[®]-1 bestätigt werden. Die Wirksubstanzen waren hierbei ebenfalls gleichmäßig entlang des Tumorgefäßendothels verteilt.

Nach wiederholter Therapie offenbarte sich in der Intravitalmikroskopie dagegen ein anderes Bild. Die mehrfache Gabe von EndoTAG[®]-1 führte auch noch 24 Stunden nach der letzten Infusion zu einer signifikant erhöhten Thrombozytenadhärenz selektiv im Tumorgefäßsystem. Die Verteilung der Thrombozyten war hierbei weniger diffus, sondern konzentrierte sich auf umschriebene Gefäßabschnitte bis hin zur Entstehung kompletter Mikrothrombosen. In der Kontrollgruppe, die mit unbeladenen Liposomen therapiert worden war, konnten dagegen keine wesentlichen Thrombozyten-Endothelinteraktionen verzeichnet werden.

Die Ergebnisse dieser Studie erlauben folgende Schlussfolgerungen:

Die Aktivierung von Thrombozyten mit Induktion von Thrombozyten-Endothelinteraktionen in der Tumorneovaskularisation scheint eine entscheidende Rolle beim *Vascular Targeting* mit EndoTAG[®]-1 zu spielen. Hierbei muss zwischen akuten Vorgängen und Effekten nach wiederholter Therapie unterschieden werden. Während selbst unbeladene kationische Liposomen bereits nach einmaliger Infusion eine akute Interaktion von Thrombozyten mit

dem Endothel der Tumorgefäße vermitteln können, wird eine dauerhafte Thrombozytenadhärenz mit Ausbildung von Mikrothrombosen nur durch die Enkapsulierung von Paclitaxel und eine wiederholte Infusion der Wirksubstanz erreicht. Dieser Unterschied beruht möglicherweise auf einer stärkeren Schädigung der Tumorgefäße mit Entstehung von umschriebenen Endothelläsionen. Die thrombogene Wirkung von EndoTAG[®]-1 ist hierbei streng auf den Tumor begrenzt. Diese Tumorselektivität ist insbesondere im Hinblick auf die Verträglichkeit von EndoTAG[®]-1 bei dessen klinischen Anwendung von Bedeutung.

VI Literaturverzeichnis

Algire GH (1943) An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* **4**: 1-11

Algire GH, Chalkley HW (1945) Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst* **6**: 73-85

Amirkhosravi A, Mousa SA, Amaya M, Blaydes S, Desai H, Meyer T, Francis JL (2003) Inhibition of tumor cell-induced platelet aggregation and lung metastasis by the oral GpIIb/IIIa antagonist XV454. *Thromb Haemost* **90**: 549-554

Anderson H, Yap JT, Wells P, Miller MP, Propper D, Price P, Harris AL (2003) Measurement of renal tumour and normal tissue perfusion using positron emission tomography in a phase II clinical trial of razoxane. *Br J Cancer* **89**: 262-267

Arisato T, Hashiguchi T, Sarker KP, Arimura K, Asano M, Matsuo K, Osame M, Maruyama I (2003) Highly accumulated platelet vascular endothelial growth factor in coagulant thrombotic region. *J Thromb Haemost* **1**: 2589-2593

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

Augustin HG (2003) Translating angiogenesis research into the clinic: the challenges ahead. *Br J Radiol* **76 Spec No 1**: S3-10

Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* **16**: 901-906

Baez S (1973) An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* **5**: 384-394

Baguley BC (2003) Antivascular therapy of cancer: DMXAA. *Lancet Oncol* **4**: 141-148

Baker M, Wayland H (1974) On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels. *Microvasc Res* **7**: 131-143

Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* **13**: 238-252

Banks RE, Forbes MA, Kinsey SE, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby PJ (1998) Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. *Br J Cancer* **77**: 956-964

- Bartsch V (2005) Angriff auf die mitotische Spindel: Wirkmechanismus der Taxane. *Pharmazie in unserer Zeit* **34**: 104-108
- Bastian, K. Die adulten Zellen des hämatopoetischen Systems der Haussäugetiere - eine Literaturstudie. 2002. Lehrstuhl für Tieranatomie I. Ludwig-Maximilians-Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Belotti D, Vergani V, Drudis T, Borsotti P, Pitelli MR, Viale G, Giavazzi R, Taraboletti G (1996) The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* **2**: 1843-1849
- Blakey DC, Westwood FR, Walker M, Hughes GD, Davis PD, Ashton SE, Ryan AJ (2002) Antitumor activity of the novel vascular targeting agent ZD6126 in a panel of tumor models. *Clin Cancer Res* **8**: 1974-1983
- Blann AD, Gurney D, Wadley M, Bareford D, Stonelake P, Lip GY (2001) Increased soluble P-selectin in patients with haematological and breast cancer: a comparison with fibrinogen, plasminogen activator inhibitor and von Willebrand factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* **12**: 43-50
- Bloemendal HJ, Logtenberg T, Voest EE (1999) New strategies in anti-vascular cancer therapy. *Eur J Clin Invest* **29**: 802-809
- 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, 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
- Brat DJ, Windebank AJ, Brimijoin S (1992) Emulsifier for intravenous cyclosporin inhibits neurite outgrowth, causes deficits in rapid axonal transport and leads to structural abnormalities in differentiating N1E.115 neuroblastoma. *J Pharmacol Exp Ther* **261**: 803-810
- Brekken RA, Li C, Kumar S (2002) Strategies for vascular targeting in tumors. *Int J Cancer* **100**: 123-130
- Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A (1976) Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res* **36**: 2807-2812
- Brinkley M (1992) A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *Bioconjug Chem* **3**: 2-13
- Brooks AC, Kanthou C, Cook IH, Tozer GM, Barber PR, Vojnovic B, Nash GB, Parkins CS (2003) The vascular targeting agent combretastatin A-4-phosphate induces neutrophil recruitment to endothelial cells in vitro. *Anticancer Res* **23**: 3199-3206

- Brotman DJ, Deitcher SR, Lip GY, Matzdorff AC (2004) Virchow's triad revisited. *South Med J* **97**: 213-214
- Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J (2000a) Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* **60**: 1878-1886
- Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S (2000b) The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* **275**: 1521-1524
- Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M (2002) Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours in vivo. *Br J Cancer* **86**: 788-795
- Burrows FJ, Thorpe PE (1994) Vascular targeting--a new approach to the therapy of solid tumors. *Pharmacol Ther* **64**: 155-174
- Caine GJ, Stonelake PS, Lip GY, Kehoe ST (2002) The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia* **4**: 465-473
- 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
- Chaplin DJ, Hill SA (2002) The development of combretastatin A4 phosphate as a vascular targeting agent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**: 1491-1496
- Chen J, Lopez JA (2005) Interactions of platelets with subendothelium and endothelium. *Microcirculation* **12**: 235-246
- Choy JS, Mathieu-Costello O, Kassab GS (2005) The effect of fixation and histological preparation on coronary artery dimensions. *Ann Biomed Eng* **33**: 1027-1033
- Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M (1984) Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature. *Int J Microcirc Clin Exp* **3**: 13-28
- D'Amore PA, Thompson RW (1987) Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* **49**: 453-464
- Dark GG, Hill SA, Prise VE, Tozer GM, Pettit GR, Chaplin DJ (1997) Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Res* **57**: 1829-1834
- Dass CR, Choong PF (2006) Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumour and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. *Cancer Cell Int* **6**: 17

- 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, 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 (1984) Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol* **23**: 217-225
- Denekamp J (1986) Endothelial cell attack as a novel approach to cancer therapy. *Cancer Topics* **6**: 6-8
- Denekamp J (1990) Vascular attack as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metastasis Rev* **9**: 267-282
- Denekamp J (1993) Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol* **66**: 181-196
- 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
- Dienst A, Grunow A, Unruh M, Rabausch B, Nor JE, Fries JW, Gottstein C (2005) Specific occlusion of murine and human tumor vasculature by VCAM-1-targeted recombinant fusion proteins. *J Natl Cancer Inst* **97**: 733-747
- Dirkx AE, Oude Egbrink MG, Kuijpers MJ, van der Niet ST, Heijnen VV, Bouma-ter Steege JC, Wagstaff J, Griffioen AW (2003) Tumor angiogenesis modulates leukocyte-vessel wall interactions in vivo by reducing endothelial adhesion molecule expression. *Cancer Res* **63**: 2322-2329
- Dobrin PB (1996) Effect of histologic preparation on the cross-sectional area of arterial rings. *J Surg Res* **61**: 413-415
- 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, Strieth S, Dellian M (2004a) Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. *Drug Resist Updat* **7**: 125-138
- Eichhorn ME, Strieth S, Krasnici S, Sauer B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M (2004b) Protamine enhances uptake of cationic liposomes in angiogenic microvessels. *Angiogenesis* **7**: 133-141
- 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
- Fajardo LF (1989) The complexity of endothelial cells. A review. *Am J Clin Pathol* **92**: 241-250
- Falanga A (2004) The effect of anticoagulant drugs on cancer. *J Thromb Haemost* **2**: 1263-1265
- Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D (2003) Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. *Clin Adv Hematol Oncol* **1**: 673-678
- Feigin I (1958) The endothelial hyperplasia of the cerebral blood vessels with brain tumors, and its sarcomatous transformation. *Cancer* **11**: 264-277
- Ferrara N, Kerbel RS (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**: 967-974
- Folkman J (1963) Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* **16**: 453-467
- 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 (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**: 27-31

Folkman J, Cole P, Zimmerman S (1966) Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg* **164**: 491-502

Folkman J, Kalluri R (2004) Cancer without disease. *Nature* **427**: 787

Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* **339**: 58-61

Fortner JD, Mahy AG, Schrodt GR (1961) Transplantable Tumors of the Syrian (golden) hamster. Part I: Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas. *Cancer Res* **21**: 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

Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC (1968) Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**: 46-52

Gately S, Kerbel R (2001) Antiangiogenic scheduling of lower dose cancer chemotherapy. *Cancer J* **7**: 427-436

Gaya AM, Rustin GJ (2005) Vascular disrupting agents: a new class of drug in cancer therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **17**: 277-290

Gimbrone MA, Jr., Aster RH, Cotran RS, Corkery J, Jandl JH, Folkman J (1969) Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. *Nature* **222**: 33-36

Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS, Folkman J (1972) Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med* **136**: 261-276

Goetz, A. Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3. 1987. Ludwig-Maximilians-Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation

Hamada J, Cavanaugh PG, Miki K, Nicolson GL (1993) A paracrine migration-stimulating factor for metastatic tumor cells secreted by mouse hepatic sinusoidal endothelial cells: identification as complement component C3b. *Cancer Res* **53**: 4418-4423

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

Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**: 353-364

Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K (1997) An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* **17**: 322-327

Harris AG, Sinitina I, Messmer K (2002) Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur J Med Res* **7**: 117-124

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* **156**: 1363-1380

Haugland RP (1995) Coupling of monoclonal antibodies with fluorophores. *Methods Mol Biol* **45**: 205-221

Herrmann KS (1983) Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* **26**: 238-249

Hrapkiewicz K, Medina L, Holmes D (1998) Hamsters. In *Clinical Laboratory Animal Medicine - An Introduction*, pp 73-92. Iowa State Press, A Blackwell Publishing Company: Ames, Iowa

Ide AG, Baker NH, Warren SL (1939) Vascularization of the Brown-Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Roentgenol* 891-899

Jain RK (1988) Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* **48**: 2641-2658

Jain RK (1990) Vascular and interstitial barriers to delivery of therapeutic agents in tumors. *Cancer Metastasis Rev* **9**: 253-266

Jain RK, Koenig GC, Dellian M, Fukumura D, Munn LL, Melder RJ (1996) Leukocyte-endothelial adhesion and angiogenesis in tumors. *Cancer Metastasis Rev* **15**: 195-204

Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2005) Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* **113**: 752-760

Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J (2005) Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* **12**: 247-258

Juliano RL, Hsu MJ, Peterson D, Regen SL, Singh A (1983) Interactions of conventional or photopolymerized liposomes with platelets in vitro. *Exp Cell Res* **146**: 422-427

- Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D (1991) Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* **66**: 1095-1104
- Katayama T, Ikeda Y, Handa M, Tamatani T, Sakamoto S, Ito M, Ishimura Y, Suematsu M (2000) Immunoneutralization of glycoprotein Ibalpha attenuates endotoxin-induced interactions of platelets and leukocytes with rat venular endothelium in vivo. *Circ Res* **86**: 1031-1037
- Kerbel R, Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2**: 727-739
- 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, Yu J, Tran J, Man S, Vilorio-Petit A, Klement G, Coomber BL, Rak J (2001) Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* **20**: 79-86
- Kessler T, Bieker R, Padro T, Schwoppe C, Persigehl T, Bremer C, Kreuter M, Berdel WE, Mesters RM (2005) Inhibition of tumor growth by RGD peptide-directed delivery of truncated tissue factor to the tumor vasculature. *Clin Cancer Res* **11**: 6317-6324
- Kiyomura M, Katayama T, Kusanagi Y, Ito M (2006) Ranking the contributing risk factors in venous thrombosis in terms of therapeutic potential: Virchow's triad revisited. *J Obstet Gynaecol Res* **32**: 216-223
- Kliche, K. O., Mescheder, A., Schönherr, U., Michaelis, U., and Löhr, J. M. A controlled, randomized, open label phase II trial of a 1st line combination treatment with gemcitabine and lipid complexed Paclitaxel (Endo TAGTM-1) with locally advanced and /or metastatic adenocarcinoma of the pancreas. *Angiogenesis. Second European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy.* 9[S1], 34. 2006.
Ref Type: Abstract
- Klyszcz 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
- Kramer I, Lipp HP (2006) [Bevacizumab. Progress in cancer therapy by antiangiogenesis]. *Med Monatsschr Pharm* **29**: 249-254
- 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
- Kuenen BC, Levi M, Meijers JC, van H, V, Berkhof J, Kakkar AK, Hoekman K, Pinedo HM (2003) Potential role of platelets in endothelial damage observed during treatment with cisplatin, gemcitabine, and the angiogenesis inhibitor SU5416. *J Clin Oncol* **21**: 2192-2198

Kuennen BC, Rosen L, Smit EF, Parson MR, Levi M, Ruijter R, Huisman H, Kedde MA, Noordhuis P, van d, V, Peters GJ, Cropp GF, Scigalla P, Hoekman K, Pinedo HM, Giaccone G (2002) Dose-finding and pharmacokinetic study of cisplatin, gemcitabine, and SU5416 in patients with solid tumors. *J Clin Oncol* **20**: 1657-1667

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

Lasic DD (1998) Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol* **16**: 307-321

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

Lian T, Ho RJ (2001) Trends and developments in liposome drug delivery systems. *J Pharm Sci* **90**: 667-680

Lip GY, Chin BS, Blann AD (2002) Cancer and the prothrombotic state. *Lancet Oncol* **3**: 27-34

Lorenz W, Reimann HJ, Schmal A, Dormann P, Schwarz B, Neugebauer E, Doenicke A (1977) Histamine release in dogs by Cremophor EL and its derivatives: oxethylated oleic acid is the most effective constituent. *Agent Actions* **7**: 63-67

Los M, Voest EE (2001) The potential role of antivasular therapy in the adjuvant and neoadjuvant treatment of cancer. *Semin Oncol* **28**: 93-105

Lüdemann, S., Eichhorn, M. E., Strieth, S., Sauer, B., Funk, M., Guenzi, E., Michaelis, U., and Dellian, M. Antivasular tumor therapy by paclitaxel encapsulated in cationic lipid complexes (EndoTag-1): Comparison of metronomic and maximum tolerated dose treatment. Angiogenesis. Second European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy. 9[S1], 29-30. 2006.

Ref Type: Abstract

Ma L, Francia G, Vilorio-Petit A, Hicklin DJ, du MJ, Rak J, Kerbel RS (2005) In vitro procoagulant activity induced in endothelial cells by chemotherapy and antiangiogenic drug combinations: modulation by lower-dose chemotherapy. *Cancer Res* **65**: 5365-5373

Malcontenti-Wilson C, Muralidharan V, Skinner S, Christophi C, Sherris D, O'Brien PE (2001) Combretastatin A4 prodrug study of effect on the growth and the microvasculature of colorectal liver metastases in a murine model. *Clin Cancer Res* **7**: 1052-1060

Manegold, P. C. Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel der Blutgefäße von Tumoren im Verlauf der Angiogenese. 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
- Martin FJ, MacDonald RC (1976) Lipid vesicle-cell interactions. I. Hemagglutination and hemolysis. *J Cell Biol* **70**: 494-505
- Marx GM, Steer CB, Harper P, Pavlakis N, Rixe O, Khayat D (2002) Unexpected serious toxicity with chemotherapy and antiangiogenic combinations: time to take stock! *J Clin Oncol* **20**: 1446-1448
- Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K (1998) Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* **198**: 23-35
- Massberg S, Enders G, Matos FC, Tomic LI, Leiderer R, Eisenmenger S, Messmer K, Krombach F (1999) Fibrinogen deposition at the postischemic vessel wall promotes platelet adhesion during ischemia-reperfusion in vivo. *Blood* **94**: 3829-3838
- Menger MD, Jager S, Walter P, Hammersen F, Messmer K (1990) The microvasculature of xenogeneic transplanted islets of Langerhans. *Transplant Proc* **22**: 802-803
- Menger MD, Lehr HA (1993) Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today* **14**: 519-522
- Messmer K, Krombach F (1998) [Microcirculation research in experimental surgery]. *Chirurg* **69**: 333-338
- Miura S, Tsuzuki Y, Fukumura D, Serizawa H, Suematsu M, Kurose I, Imaeda H, Kimura H, Nagata H, Tsuchiya M, . (1995) Intravital demonstration of sequential migration process of lymphocyte subpopulations in rat Peyer's patches. *Gastroenterology* **109**: 1113-1123
- Narazaki M, Tosato G (2005) Targeting coagulation to the tumor microvasculature: perspectives and therapeutic implications from preclinical studies. *J Natl Cancer Inst* **97**: 705-707
- Naumov GN, Bender E, Zurakowski D, Kang SY, Sampson D, Flynn E, Watnick RS, Straume O, Akslen LA, Folkman J, Almog N (2006) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J Natl Cancer Inst* **98**: 316-325
- Netti PA, Roberge S, Boucher Y, Baxter LT, Jain RK (1996) Effect of transvascular fluid exchange on pressure-flow relationship in tumors: a proposed mechanism for tumor blood flow heterogeneity. *Microvasc Res* **52**: 27-46
- Ng SS, Sparreboom A, Shaked Y, Lee C, Man S, Desai N, Soon-Shiong P, Figg WD, Kerbel RS (2006) Influence of formulation vehicle on metronomic taxane chemotherapy: albumin-bound versus cremophor EL-based paclitaxel. *Clin Cancer Res* **12**: 4331-4338

- Nicosia RF, Villaschi S (1999) Autoregulation of angiogenesis by cells of the vessel wall. *Int Rev Cytol* **185**: 1-43
- Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Mannel DN (1999) Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* **59**: 1295-1300
- Nilsson F, Kosmehl H, Zardi L, Neri D (2001) Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res* **61**: 711-716
- Nishikawa M, Huang L (2001) Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* **12**: 861-870
- Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K (1995) Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* **15**: 244-249
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**: 23-28
- Oda T, Lehmann A, Endrich B (1984) Capillary blood flow in the amelanotic melanoma of the hamster after isovolemic hemodilution. *Biorheology* **21**: 509-520
- Ostro MJ, Cullis PR (1989) Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *Am J Hosp Pharm* **46**: 1576-1587
- Pahernik S, Griebel J, Botzlar A, Gneiting T, Brandl M, Dellian M, Goetz AE (2001) Quantitative imaging of tumour blood flow by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Br J Cancer* **85**: 1655-1663
- Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA (1979) A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc Res* **18**: 311-318
- Pearlstein E, Ambrogio C, Karpatkin S (1984) Effect of antiplatelet antibody on the development of pulmonary metastases following injection of CT26 colon adenocarcinoma, Lewis lung carcinoma, and B16 amelanotic melanoma tumor cells into mice. *Cancer Res* **44**: 3884-3887
- Pedersen LM, Milman N (1996) Prognostic significance of thrombocytosis in patients with primary lung cancer. *Eur Respir J* **9**: 1826-1830
- Pinedo HM, Verheul HM, D'Amato RJ, Folkman J (1998) Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* **352**: 1775-1777
- Pipili-Synetos E, Papadimitriou E, Maragoudakis ME (1998) Evidence that platelets promote tube formation by endothelial cells on matrigel. *Br J Pharmacol* **125**: 1252-1257
- Poggi A, Stella M, Donati MB (1993) The importance of blood cell-vessel wall interactions in tumour metastasis. *Baillieres Clin Haematol* **6**: 731-752

Povlishock JT, Rosenblum WI, Sholley MM, Wei EP (1983) An ultrastructural analysis of endothelial change paralleling platelet aggregation in a light/dye model of microvascular insult. *Am J Pathol* **110**: 148-160

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, He J, Huang X, Soares M, Scothorn D, Thorpe PE (2005) Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice. *Clin Cancer Res* **11**: 1551-1562

Reed MW, Miller FN (1988) Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc Res* **36**: 104-107

Rowinsky EK (1997) Paclitaxel pharmacology and other tumor types. *Semin Oncol* **24**: S19

Rowinsky EK, Donehower RC (1995) Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med* **332**: 1004-1014

Ruf A, Patscheke H (1995) Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost* **21**: 146-151

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

Sandison JC (1924) A new method for the microscopic study of living growing tissues by introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* **28**: 281-287

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

Scialla SJ, Speckart SF, Haut MJ, Kimball DB (1979) Alterations in platelet surface sialyltransferase activity and platelet aggregation in a group of cancer patients with a high incidence of thrombosis. *Cancer Res* **39**: 2031-2035

Seaman GV, Vassar PS (1966) Changes in the electrokinetic properties of platelets during their aggregation. *Arch Biochem Biophys* **117**: 10-17

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

Sharma A, Mayhew E, Straubinger RM (1993) Antitumor effect of taxol-containing liposomes in a taxol-resistant murine tumor model. *Cancer Res* **53**: 5877-5881

Sharma A, Straubinger RM (1994) Novel taxol formulations: preparation and characterization of taxol-containing liposomes. *Pharm Res* **11**: 889-896

Shubik P (1982) Vascularization of tumors: a review. *J Cancer Res Clin Oncol* **103**: 211-226

Sierko E, Wojtukiewicz MZ (2004) Platelets and angiogenesis in malignancy. *Semin Thromb Hemost* **30**: 95-108

Skillings, J. R., Johnson, D. H., Miller, K., Kabbinavar, F., Bergsland, E., Holmgren, E., Holden, S. N., Hurwitz, H., and Scappaticci, F. Arterial thromboembolic events (ATEs) in a pooled analysis of 5 randomized, controlled trials (RCTs) of bevacizumab (BV) with chemotherapy. J Clin.Oncol.2005 Annual Meeting Proceedings. 23[16S], 3019. 2005.
Ref Type: Abstract

Staton CA, Lewis CE (2005) Angiogenesis inhibitors found within the haemostasis pathway. *J Cell Mol Med* **9**: 286-302

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

Straubinger RM, Sharma A, Murray M, Mayhew E (1993) Novel Taxol formulations: Taxol-containing liposomes. *J Natl Cancer Inst Monogr* 69-78

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, Sutter A, Jonczyk A, Berghaus A, Dellian M (2006) Antiangiogenic combination tumor therapy blocking alpha(v)-integrins and VEGF-receptor-2 increases therapeutic effects in vivo. *Int J Cancer* **119**: 423-431

Strieth S, von J, V, Eichhorn ME, Enders G, Krasnici S, Thein E, Hammer C, Dellian M (2005) A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of parathyroid heterografts in vivo. *Transplantation* **79**: 392-400

Stucker M, Springer C, Paech V, Hermes N, Hoffmann M, Altmeyer P (2006) Increased laser Doppler flow in skin tumors corresponds to elevated vessel density and reactive hyperemia. *Skin Res Technol* **12**: 1-6

Suematsu M, DeLano FA, Poole D, Engler RL, Miyasaka M, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW (1994) Spatial and temporal correlation between leukocyte behavior and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation. *Lab Invest* **70**: 684-695

Sweeney CJ, Miller KD, Sledge GW, Jr. (2003) Resistance in the anti-angiogenic era: nay-saying or a word of caution? *Trends Mol Med* **9**: 24-29

- Tangelder GJ, Slaaf DW, Arts T, Reneman RS (1988) Wall shear rate in arterioles in vivo: least estimates from platelet velocity profiles. *Am J Physiol* **254**: H1059-H1064
- Tangelder GJ, Slaaf DW, Reneman RS (1982) Fluorescent labeling of blood platelets in vivo. *Thromb Res* **28**: 803-820
- Thorpe PE (2004) Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* **10**: 415-427
- 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
- Tozer GM (2003) Measuring tumour vascular response to antivascular and antiangiogenic drugs. *Br J Radiol* **76 Spec No 1**: S23-S35
- Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC (2005) Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* **5**: 423-435
- Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Cemazar M, Shan S, Dewhirst MW, Barber PR, Vojnovic B, Chaplin DJ (2001) Mechanisms associated with tumor vascular shut-down induced by combretastatin A-4 phosphate: intravital microscopy and measurement of vascular permeability. *Cancer Res* **61**: 6413-6422
- Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Locke RJ, Vojnovic B, Stratford MR, Dennis MF, Chaplin DJ (1999) Combretastatin A-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res* **59**: 1626-1634
- Treat J, Damjanov N, Huang C, Zrada S, Rahman A (2001) Liposomal-encapsulated chemotherapy: preliminary results of a phase I study of a novel liposomal paclitaxel. *Oncology (Williston Park)* **15**: 44-48
- Trousseau A (1865) Phlegmasia alba dolens. In *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris*, pp 654-712.
- Unruh M, Grunow A, Gottstein C (2005) Systemic coagulation parameters in mice after treatment with vascular targeting agents. *Thromb J* **3**: 21
- Vajkoczy P, Menger MD, Simpson E, Messmer K (1995) Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation* **60**: 123-127
- Vajkoczy P, Ullrich A, Menger MD (2000) Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia* **2**: 53-61
- Vaupel P (2004) Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol* **14**: 198-206

Verheul HM, Hoekman K, Lupu F, Broxterman HJ, van d, V, Kakkar AK, Pinedo HM (2000a) Platelet and coagulation activation with vascular endothelial growth factor generation in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res* **6**: 166-171

Verheul HM, Jorna AS, Hoekman K, Broxterman HJ, Gebbink MF, Pinedo HM (2000b) Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood* **96**: 4216-4221

Vincent L, Kermani P, Young LM, Cheng J, Zhang F, Shido K, Lam G, Bompais-Vincent H, Zhu Z, Hicklin DJ, Bohlen P, Chaplin DJ, May C, Rafii S (2005) Combretastatin A4 phosphate induces rapid regression of tumor neovessels and growth through interference with vascular endothelial-cadherin signaling. *J Clin Invest* **115**: 2992-3006

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

Vogelstein B, Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**: 138-141

Vollmar B, Laschke MW, Rohan R, Koenig J, Menger MD (2001a) In vivo imaging of physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am J Pathol* **159**: 1661-1670

Vollmar B, Schmits R, Kunz D, Menger MD (2001b) Lack of in vivo function of CD31 in vascular thrombosis. *Thromb Haemost* **85**: 160-164

Waldner M, Hutter J, Uhl E, Baethmann A, Lehmborg J (2007) Modified labeling technique for in vivo visualization of platelets in the cerebral microcirculation of Mongolian gerbils. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**: 327-333

Warren BA, Shubik P, Wilson R, Garcia H, Feldman R (1978) The microcirculation in two transplantable melanomas of the hamster. I. In vivo observations in transparent chambers. *Cancer Lett* **4**: 109-116

Wartiovaara U, Salven P, Mikkola H, Lassila R, Kaukonen J, Joukov V, Orpana A, Ristimaki A, Heikinheimo M, Joensuu H, Alitalo K, Palotie A (1998) Peripheral blood platelets express VEGF-C and VEGF which are released during platelet activation. *Thromb Haemost* **80**: 171-175

Weiss N, Delius M, Gambihler S, Dirschedl P, Goetz A, Brendel W (1990a) 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

Weiss RB, Donehower RC, Wiernik PH, Ohnuma T, Gralla RJ, Trump DL, Baker JR, Jr., Van Echo DA, Von Hoff DD, Leyland-Jones B (1990b) Hypersensitivity reactions from taxol. *J Clin Oncol* **8**: 1263-1268

- White JG, Rao GH (1983) Influence of a microtubule stabilizing agent on platelet structural physiology. *Am J Pathol* **112**: 207-217
- Williams MJ, Du X, Loftus JC, Ginsberg MH (1995) Platelet adhesion receptors. *Semin Cell Biol* **6**: 305-314
- Wilner GD, Nossel HL, LeRoy EC (1968) Aggregation of platelets by collagen. *J Clin Invest* **47**: 2616-2621
- Witte S, Goldenberg DM (1967) The early vascular reactions to heterotransplanted human tumours in the hamster cheek pouch. *Bibl Anat* **9**: 396-402
- Zakrevskii VI, Rud'ko IA, Kubatiev AA (1992) [The effect of negatively charged liposomes on thrombocyte aggregation induced by ADP]. *Biull Eksp Biol Med* **114**: 464-466
- Zbinden G, Wunderli-Allenspach H, Grimm L (1989) Assessment of thrombogenic potential of liposomes. *Toxicology* **54**: 273-280
- Zhao L, Ching LM, Kestell P, Kelland LR, Baguley BC (2005) Mechanisms of tumor vascular shutdown induced by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA): Increased tumor vascular permeability. *Int J Cancer* **116**: 322-326
- Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, Jesty J (1998) Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* **75**: 780-786

VII Anhang

1. Veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

Originalarbeiten

Strieth S*, **Nussbaum CF***, Eichhorn ME, Fuhrmann M, Teifel M, Michaelis U, Berghaus A, Dellian M: Tumor-selective vessel occlusions by platelets after vascular targeting chemotherapy using paclitaxel encapsulated in cationic liposomes. *Int J Cancer* 2008, 122(2):452-60

(*both authors contributed equally to this study)

Vorträge

Nussbaum CF, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M, Strieth S: Die Funktion von Thrombozyten bei antivaskulärer Therapie solider Tumoren durch Paclitaxel enkapsuliert in kationische Liposomen. (Kolloquium über wissenschaftliche Arbeiten aus der Chirurgischen Forschung München, 28.10.2004)

Nussbaum CF, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M, Strieth S: Enhanced in vivo platelet adhesion by neovascular targeting therapy of solid tumors using paclitaxel encapsulated in cationic liposomes. *J Vasc Res* 2004, 41:445-478. (Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V.; Berlin 7.-9.10.2004)

Strieth S, **Nussbaum CF**, Eichhorn ME, Dellian M, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Berghaus A: Tumorselektive Mikrothrombosen nach Vascular Targeting-Therapie mit liposomalem Paclitaxel *in vivo*. (77. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, 1st Joint Meeting of the German Society of Oto-Rhino-Laryngology, Head and Neck Surgery and the American Academy of Otolaryngology, Head and Neck Surgery; 24.05.-28.05.2006 Mannheim).

Strieth S, **Nussbaum CF**, Eichhorn ME, Michaelis U, Berghaus A, Dellian M: Präklinische Evaluation einer neuartigen Vascular Targeting-Therapie solider Tumore mittels liposomalem Paclitaxel. *Laryngo-Rhino-Otologie* in press. (90. Jahrestagung der Vereinigung Südwestdeutscher Hals-Nasen-Ohrenärzte e.V., 22.09.-24.09.2006, Bonn).

Strieth S, **Nussbaum CF**, Eichhorn ME, Fuhrmann M, Michaelis U, Berghaus A, Dellian M: Tumor-selective vessel occlusions by platelets after vascular targeting chemotherapy using paclitaxel encapsulated in cationic liposomes. (5th International Symposium on Advances in Head and Neck Cancer- Recurrences/ 1st International Worldwide Conference on Head and Neck Cancer. 01.-03.02.2007, Marburg).

Strieth S, **Nussbaum CF**, Eichhorn ME, Fuhrmann M, Teifel M, Michaelis U, Berghaus A, Dellian M: Targeted tumor-selective thromboses by liposomal paclitaxel. *Annual Meeting of the American Academy of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, 16.-19.09.2007, Washington, D.C.*

Poster

Nussbaum CF, Eichhorn ME, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Dellian M, Strieth S: Enhanced in vivo platelet adhesion by neovascular targeting therapy of solid tumors using paclitaxel encapsulated in cationic liposomes. *Angiogenesis* 2004, 7(Supp):34-35. *(First European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy, 01.-03.10.2004, Munich)*

2. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München unter der Betreuung von Herrn PD. Dr. med. M. Dellian und Herrn Dr. med. S. Strieth durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei einigen Personen bedanken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht zum Abschluss gekommen wäre.

Zunächst bei Herrn Prof. Dr. med. A. Baethmann, der mir durch die Aufnahme in das Institut einen Zugang zur experimentellen Forschung und zu anspruchsvollem, wissenschaftlichem Arbeiten ermöglicht hat. Durch seine Förderung auch über die Grenzen des Instituts hinaus, hat er meinen beruflichen Werdegang erheblich beeinflusst.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. M. Dellian bedanken, der mich in sein Team aufgenommen, und meine experimentelle Tätigkeit am Institut für Chirurgische Forschung während der letzten Jahre kontinuierlich begleitet hat. Mit fachlicher Kompetenz und konstruktiver Kritik stand er mir stets hilfreich zur Seite und übte einen entscheidenden Einfluss auf meine Arbeit aus.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. S. Strieth für seine hervorragende Betreuung und unermüdliche Unterstützung selbst in schwierigen Situationen. Durch sein Engagement, sein kritisches Denken und seine Sorgfalt bei der Planung und Durchführung der Versuche hat er mein Verständnis von wissenschaftlichem Arbeiten geprägt und einen wesentlichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Er war mir in fachlichen wie persönlichen Belangen jederzeit ein wertvoller Ansprechpartner, dessen Rat und Freundschaft ich sehr wertschätze.

Auch bei Herrn Dr. med. M. Eichhorn möchte ich mich herzlich für seine uneingeschränkte Hilfestellung bei kleinen und größeren technischen Problemen bedanken. Ebenso bei Frau S. Lüdemann und Herrn S. Becker für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das positive Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. med. Hutter danke ich für seine fachlich kompetente Anleitung bei der Fluoreszenzmarkierung der Thrombozyten, Herrn Dr. M. Fuhrmann für seine Unterstützung bei der Durchführung der Laser-Scanning-Mikroskopie und Herrn Dr. J. Peters für seine Beratung bei statistischen Fragestellungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen Christine Csapo, Silvia Münzing und Alke Schropp für die Bereitstellung der Zellkulturen, die Durchführung der Durchflusszytometrie und die Hilfe bei der Erstellung der Histologie ganz herzlich bedanken.

3. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Claudia Franziska Nußbaum
Geburtstag und -ort	31.03.1979, Kaufbeuren
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

Schulbildung

1989 – 1998	Marien-Gymnasium, Kaufbeuren
Juni 1998	Abitur

Studium

Nov. 1999	Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Aug. 2001	Ärztliche Vorprüfung
März 2003	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2006	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

Aug. 2002	Kardiologie, Deutsches Herzzentrum, Berlin
Aug 2003	Hals-, Nasen- Ohrenheilkunde, Klinikum Großhadern, München
März/April 2004	Hämatologie/Onkologie, Klinikum Großhadern, München
Aug. 2004	Radiologie, Children's Memorial Hospital, Chicago, USA
Sept. 2004	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. med. Kränkle-Schmid, Frankfurt

Praktisches Jahr

April – Juli 2005	Stipendiatin im PJ-Programm der Munich-Harvard Alliance Innere Medizin, Brigham and Women's Hospital, Boston, USA
Aug. – Nov. 2005	Viszeral- und Thoraxchirurgie, Inselspital, Bern, Schweiz
Nov. 2005 – März 2006	Pädiatrie, Dr. von Haunersches Kinderspital, München

Berufliche Tätigkeit

Sept. 2006 – Feb. 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Schwerpunkt Medizindidaktik
(Leitung: Dr. Martin Fischer); Medizinische Klinik Innenstadt
Ludwig-Maximilians-Universität München

Seit März 2007 Assistenzärztin für Pädiatrie, Neonatologie Maistraße
(Leitung: Frau Prof. Dr. med. Orsolya Genzel-Boroviczény);
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Ludwig-Maximilians-Universität München

Private Interessen

Sport (Mountainbiking, Skifahren, Snowboarden), Musik (Querflöte und Gitarre), Theater