

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Untersuchung von Alkylphosphocholinen, im besonderen Hexadecylphosphocholin, wurden Therapieversuche und Stoffwechseluntersuchungen in vivo und in vitro durchgeführt.

Am Benzo(a)pyren induzierten Fibrosarkom wurde die antineoplastische Wirkung von Alkylphosphocholinen untersucht. Die Fibrosarkome wurden bei SD-Ratten mit 6mg Benzo(a)pyren in Maiskeimöl induziert. Die Behandlung der Fibrosarkome mit Hexadecylphosphocholin- und 1-O-Octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-Phosphocholin-Liposomen, Δ 9-cis-Oleylphospho-(N,N-dimethyl-N-ethyl)-ethanolamin, Δ 13-cis-Erucylphosphocholin und Octadecyl-Phospho-piperidinium-(N-hydroxy-ethyl-N-methyl)-ester hatte keine hemmende Wirkung auf das Tumorwachstum.

Hexadecylphosphocholin wurde an dem transplantierten primär MNH-induzierten PYH-transplantierten Mammakarzinom der F344 Ratte untersucht. Die Therapie erfolgte in der fünften und zehnten Passage. In der fünften Passage bewirkte Hexadecylphosphocholin (HPC; 112,5mg/kg) eine signifikante Verringerung des medianen Tumolvolumens während in der zehnten Passage ein Wirkungsverlust beobachtet wurde. Um den Sensitivitätsverlust zu erklären, wurden Histologie und Cytoskelett untersucht. Die wichtigste Veränderung zeigte sich im histopathologischen Bild des Tumors, es wechselte von einem tubulo-papillären Adenokarzinom zu einem malignen Adenoakanthom mit epithelialer Struktur. Vimentin als endothelialer Marker des Cytoskelett war in allen Passagen gleich stark exprimiert. Cytokeratin war in den ersten Passagen nur schwach vorhanden, in den späten Passagen jedoch deutlich ausgeprägt. Die histopathologische Änderung vom tubulären Adenokarzinom zum malignen Adenoakanthom ist entweder auf ein verstärktes Wachstum von primär vorhandenen epithelialen Tumorzellen oder auf einen tatsächlichen Wechsel in der morphologischen Expression zurückzuführen, der während der wiederholten Transplantation erfolgte.

Mit der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) wurde der Therapieeffekt von HPC auf den Glucosestoffwechsel an MNH-induzierten Mammatumoren bei SD-Ratten untersucht. Die Untersuchung mit PET erfolgte vor Therapie sowie einen und sieben Tage nach Therapie. Die Fluorodeoxyglucose-Anreicherung in den unbehandelten Tumoren war im Vergleich zum Muskelgewebe erhöht, die Werte streuten jedoch sehr stark, was durch die Heterogenität der chemisch induzierten Mammakarzinome erklärt werden kann. Nach einer einmaligen Gabe von 200 mg/kg HPC nahm bei einem Tier

die ^{18}F -Fluorodeoxyglucoseanreicherung einen Tag nach der Therapie um 50% ab. Während bei einer Dosierung von 100 mg/kg HPC eine geringe Abnahme oder eine konstante Aufnahme gefunden wurde. Eine Woche nach Therapie stieg die mittlere Fluorodeoxyglucose-Anreicherung wieder an, lag aber noch niedriger als vor der Therapie. Diese Studie mit PET zeigte, daß metabolische Änderungen mit PET zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Therapie gemessen werden können. Der Anstieg der Fluorodeoxyglucose-Aufnahme eine Woche nach Therapie entspricht den Therapiestudien mit HPC an diesem Tumormodell, wo auch nach Absetzen der Therapie ein erneutes Tumorwachstum beobachtet wird.

In vitro wurden Stoffwechseluntersuchungen an humanen und Rattenmammakarzinomzellen durchgeführt. Es wurde die Glucose- und Aminosäureaufnahme nach HPC Therapie bestimmt. Die humanen MCF-7, MDA-MB231 Mammakarzinomzellen sowie die 1C2 Rattenmammakarzinomzelllinie wurden für 2 und 24 Stunden mit HPC inkubiert. Die ^{14}C -Fluorodeoxyglucoseaufnahme war bei den humanen Mammakarzinomzellen dosisabhängig erhöht, wobei bei den MCF-7 Zellen eine stärkere Stimulation zu beobachten war als bei den MDA-MB231 Zellen. Je länger das therapiefreie Intervall zwischen HPC Inkubation und Fluorodeoxyglucose-Aufnahme war, desto niedriger war die Anreicherung des Radiotracers in der Zelle. 1C2 Zellen waren weniger sensibel auf die HPC Therapie. Nach zwei Stunden Inkubation mit HPC war bei den niedrigen Dosierungen kein Effekt auf die Glucoseaufnahme zu sehen, nach 24 stündiger HPC-Therapie war 4 Stunden nach Therapieende ein dosisabhängiger Anstieg der Fluorodeoxyglucose-Aufnahme vorhanden.

Die ^3H - γ -Aminoisobuttersäureaufnahme durch das natriumionenunabhängige System A war bei den MCF-7 ebenfalls dosisabhängig erhöht, und sank nach Verlängerung des inkubationsfreien Intervalls ab. In MDA-MB231 und 1C2 Zellen war nach zweistündiger Inkubation mit HPC keine Änderung der Transportaktivität von System A zu beobachten. Nach 24 stündiger HPC Behandlung war in den MDA-MB231 Zellen ein dosisabhängiger Anstieg der Aminoisobuttersäure-Aufnahme festzustellen, während die 1C2 Rattenmammakarzinomzellen bei höheren Dosierungen eine dosisabhängige Verminderung der Aminoisobuttersäure-Transportrate zeigten. Der Anstieg des Glucose- und Proteinstoffwechsels kann als Reaktion auf Detoxifikation und Reparatur in der Zelle nach der HPC-Therapie verstanden werden. Die Verminderung der Stoffwechselrate wird als antineoplastische Wirkung von HPC gewertet.

Aufgrund der erhöhten Zuckeraufnahme nach der Therapie mit HPC wurde eine Kombinationstherapie mit HPC und Deoxyglucose durchgeführt. Jede Substanz wurde allein und in drei Kombinationen untersucht. Die beste Wirkung wurde jeweils zu dem

Zeitpunkt der höchsten Fluorodeoxyglucose-Aufnahme erzielt (eine Stunde inkubationsfreies Intervall bei MCF-7 Zellen, und vier Stunden bei 1C2 Zellen). Da Deoxyglucose die glycolytischen Enzyme hemmt, wird angenommen, daß durch den Energiemangel die Entgiftung und die Reparaturmechanismen der Zelle gehemmt werden.

6. Summary

In the course of studies on alkylphosphocholines, in particular on hexadecylphosphocholine (HPC), therapy studies and metabolic investigations were performed *in vivo* and *in vitro*.

The antitumor action of alkylphosphocholines was studied in benzo(a)pyrene fibrosarcoma. The fibrosarcoma was induced in SD-rats by administration of 6 mg of benzo(a)pyrene in maize oil. The administration of Hexadecylphosphocholine- and 1-O-Octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-Phosphocholine-liposomes, Δ 9-cis-Oleylphospho-(N,N-dimethyl-N-ethyl)-ethanolamin, Δ 13-cis-Erucylphosphocholine and Octadecyl-Phospho-piperidinium-(N-hydroxy-ethyl-N-methyl)-ester caused no reduction of tumor growth.

HPC was studied in the transplanted primary methylnitrosourea (MNU) induced PYH mammary carcinoma of the F344 rat. The therapy was carried out in the 5th and 10th passage. In the 5th passage HPC (112,5mg/kg) caused a significant reduction of the mean tumor volume, whereas in the 10th passage a loss in activity was observed. To explain the loss in sensitivity, histological findings and cytoskeleton were examined. The most important changes were detected in the pathohistology of the tumor. The initially tubular papillary adenocarcinoma was transformed into a malignant adenoacanthoma with epithelial structure. In all passages, vimentin as an endothelial marker was equally expressed. Cytokeratin was weakly expressed in the early passages and clearly present in the late passages. The histopathological change from tubular adenocarcinoma to malignant adenoacanthoma might be caused by an exceeding growth of primary epithelial tumor cells or by a real transformation of the morphological characteristics of the tumor genuine as a result of repeated transplantation.

Positron emission tomography (PET) was used to clarify the therapeutic effect of HPC on the glucose metabolism in MNU-induced mammary carcinoma in SD-rats. PET examinations were performed prior to therapy, as well as one day and one week after therapy. ¹⁸F-Fluorodeoxyglucose accumulation in untreated tumors showed a twofold increase compared to muscle tissue, however, the values varied considerably, probably due to the heterogeneity of the chemically induced mammary carcinoma. After a single dose of 200 mg HPC/kg a decrease in fluorodeoxyglucose uptake (50%) was observed in one animal. Administration of 100mg/kg HPC caused a slight decrease or constant

fluorodeoxyglucose accumulation. One week after therapy the fluorodeoxyglucose uptake in tumor tissue increased again, but was still lower than before therapy. This PET study shows, that it was possible to determine the metabolic changes at an early stage of therapy. The increase in fluorodeoxyglucose uptake one week after therapy is in accordance with previous therapeutic results in this tumor model, in which tumors regrew after the end of therapy.

Metabolic studies on human and rat mammary carcinoma cells were performed. In vitro the glucose and amino acid uptake after therapy was analyzed. Human MCF-7 and MDA-MB231 mammary carcinoma cells and 1C2 rat mammary carcinoma cells were incubated for 2 and 24 hours with HPC. In the human cells HPC caused a dose-dependent increase in ^{14}C -fluorodeoxyglucose uptake, with a higher increase in MCF-7 cells. It was seen, that the longer the therapy-free period between HPC incubation and fluorodeoxyglucose uptake the lower was the accumulation of radiotracer in the cells. 1C2 cells were less sensitive to HPC. Only a very high dosage caused a decrease in fluorodeoxyglucose uptake, whereas the lower dosage, as used in the human cells, did not affect glucose uptake.

The ^3H - γ -aminoisobutyric acid uptake via the sodiumionindependent system A in MCF-7 cells increased dose-dependently and decreased after a prolonged incubation-free interval. There was no change in transport activity of system A observed in MDA-MB231 and 1C2 cells after two hours of incubation with HPC. A dose-related increase in aminoisobutyric acid uptake was seen in MDA-MB231 cells after 24 hours of HPC incubation, while the 1C2 rat mammary carcinoma cells showed a dose-dependent decrease of aminoisobutyric acid transport at higher dosages. The increase in glucose and protein metabolism could be a reaction to cellular detoxification and repair after HPC therapy. The reduced metabolic rate was assessed as an antineoplastic effect of HPC.

As a result of the enhanced sugar uptake after HPC therapy, this phenomenon was used to develop a metabolically designed combination treatment. Several dose-time combinations of HPC and deoxyglucose were analyzed for their effects on growth delay. The combinations using the time peak of fluorodeoxyglucose uptake (one hour for MCF-7 cells, four hours for 1C2 cells) were found to be most effective in growth delay. Since deoxyglucose inhibited the glycolytic enzymes it might be assumed that the detoxification and repair mechanism of cells was inhibited due to energy shortage.