

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Molls)

und aus dem  
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung  
der Technischen Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. med. B. Gänsbacher)  
Arbeitsgruppe Experimentelle Chirurgie  
(Leiter: Prof. Dr. med. vet. W. Erhardt)

eingereicht über den

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Vorstand: Prof. Dr. med. vet. K. Hartmann)  
Prof. Dr. med. vet. J. Hirschberger

**Auswirkungen von Tirapazamine in Kombination mit cis-Platin und  
Bestrahlung auf das Tumorwachstum der tumortragenden Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Georg Künzel  
aus Madrid  
München 2004

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle

Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Hirschberger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 13. Februar 2004

Meinen Eltern  
und  
Katharina

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>LITERATUR .....</b>   | <b>3</b>  |
| 2.1      | Hypoxie .....  | 3         |
| 2.1.1    | Methoden zur Messung und Darstellung der Hypoxie .....                           | 6         |
| 2.2      | Tirapazamine (TPZ) .....   | 7         |
| 2.2.1    | Wirkungsmechanismus .....  | 7         |
| 2.2.2    | Metabolismus von Tirapazamine .....  | 9         |
| 2.2.3    | Aerobe Toxizität.....  | 10        |
| 2.2.4    | Verfügbarkeit im Körper und LD50 .....   | 10        |
| 2.2.5    | Kombination von Tirapazamine mit Bestrahlung .....                               | 11        |
| 2.2.6    | Kombination von TPZ mit cis-Platin.....  | 12        |
| 2.3      | Cis-Platin.....  | 12        |
| 2.3.1    | Wirkungsmechanismus .....  | 12        |
| 2.3.2    | Metabolismus und Ausscheidung .....  | 13        |
| 2.3.3    | Toxizität.....   | 13        |
| 2.4      | Strahlentherapie.....  | 13        |
| 2.5      | Fibrosarkom der Maus: der RIF -1-Tumor .....                                     | 14        |
| <b>3</b> | <b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN .....</b>   | <b>15</b> |
| 3.1      | Material und Methoden.....   | 15        |
| 3.1.1    | Zielsetzung .....  | 15        |
| 3.1.1.1  | Aufzucht und Haltung der strahleninduzierten Mäusesarkomzelllinie<br>RIF-1 ..... | 16        |
| 3.1.1.2  | Einfrieren und Auftauen der Zelllinien .....                                     | 16        |
| 3.1.1.3  | Zellaufbereitung für Experimentaltumoren.....                                    | 17        |
| 3.1.1.4  | Mäusestamm .....   | 18        |
| 3.1.1.5  | Mäusehaltung.....  | 18        |
| 3.1.1.6  | Inokulation der Experimentaltumoren .....  | 19        |
| 3.1.1.7  | Wachstumsphase .....   | 19        |
| 3.1.1.8  | Definition der Tumormaßgrößen.....   | 20        |
| 3.1.2    | Therapie .....   | 20        |
| 3.1.2.1  | Vorbereitende Arbeiten.....  | 20        |

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| 3.1.2.2   | Behandlungszeitraum .....  | 21 |
| 3.1.2.3   | Bestrahlung.....   | 21 |
| 3.1.2.4   | Bestrahlungsgerät RT 100 .....   | 22 |
| 3.1.2.5   | Inhalationsnarkose .....   | 23 |
| 3.1.2.6   | Chemotherapeutika .....  | 24 |
| 3.1.2.6.1 | cis-Platin.....  | 24 |
| 3.1.2.6.2 | Tirapazamine .....   | 24 |
| 3.1.2.7   | Chemotherapie.....   | 25 |
| 3.1.3     | Datenerhebung .....  | 25 |
| 3.1.3.1   | Tumorvolumen und Körpergewicht.....  | 25 |
| 3.1.4     | Vorversuche zur Dosisfindung .....   | 26 |
| 3.1.4.1   | Strahlendosis.....   | 27 |
| 3.1.4.2   | cis-Platin.....  | 27 |
| 3.1.4.3   | Tirapazamine (TPZ) .....   | 27 |
| 3.1.4.4   | Hauptversuche zur Einteilung der Versuchsgruppen.....  | 28 |
| 3.1.5     | Statistische Berechnungen und Dokumentation .....  | 31 |
| 3.2       | Ergebnisse.....  | 32 |
| 3.2.1     | Anzucht der Experimentaltumoren .....  | 32 |
| 3.2.2     | Metastasierung.....  | 32 |
| 3.2.3     | Vorversuche .....  | 32 |
| 3.2.4     | Hauptversuche .....  | 33 |
| 3.2.4.1   | Kontrollgruppen.....   | 33 |
| 3.2.4.1.1 | Unbehandelt (KU) .....   | 33 |
| 3.2.4.1.2 | Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (KB) .....  | 36 |
| 3.2.4.1.3 | TPZ (21.6mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (KTB) .....                         | 38 |
| 3.2.4.1.4 | cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (KCB).....                      | 40 |
| 3.2.4.2   | Therapiegruppen .....  | 42 |
| 3.2.4.2.1 | TPZ (7.2mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (7) .....   | 42 |
| 3.2.4.2.2 | TPZ (14.4mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (14) ..... | 45 |
| 3.2.4.2.3 | TPZ (18.0mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (18) ..... | 47 |

# INHALTSVERZEICHNIS

---

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.4.2.4 | TPZ (21.6mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung<br>(10x2Gy Einzeldosis) (21) ..... | 49        |
| 3.2.4.2.5 | TPZ (28.8mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung<br>(10x2Gy Einzeldosis) (28) ..... | 51        |
| 3.2.5     | Körpergewicht .....   | 54        |
| 3.2.6     | Tumorzellen-Verdoppelungszeit $t_{2V_0}$ und Letalität.....                                     | 56        |
| 3.2.7     | Zusammenfassung aller Teilergebnisse .....  | 57        |
| <b>4</b>  | <b>DISKUSSION</b> .....   | <b>58</b> |
| 4.1       | Diskussion der Versuchsdurchführung .....   | 58        |
| 4.2       | Diskussion der Ergebnisse .....   | 60        |
| 4.3       | Schlussfolgerung .....  | 65        |
| 4.4       | Ausblick .....  | 66        |
| <b>5</b>  | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....  | <b>67</b> |
| <b>6</b>  | <b>SUMMARY</b> .....  | <b>68</b> |
| <b>7</b>  | <b>LITERATURLISTE</b> .....   | <b>69</b> |
| <b>8</b>  | <b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....  | <b>78</b> |
| <b>9</b>  | <b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>79</b> |
| <b>10</b> | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....  | <b>81</b> |
| <b>11</b> | <b>FIRMENVERZEICHNIS</b> .....  | <b>84</b> |
| <b>12</b> | <b>DANKSAGUNG</b> .....   | <b>86</b> |
| <b>13</b> | <b>LEBENS LAUF</b> .....  | <b>87</b> |

## 1 EINLEITUNG

Bei der Behandlung solider Tumorerkrankungen stehen neben chirurgischen Maßnahmen, die Strahlen- und die Chemotherapie zur Verfügung. Jedoch können diese drei Disziplinen nicht immer eine sichere Methode zur Heilung anbieten, da die individuelle Tumorbilologie der betroffenen Patienten sehr vielfältig sein kann.

In der Strahlentherapie ist die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff von zentraler Bedeutung. Diese kann, je nach Tumorart und Lokalisation, stark variieren. Die Wirksamkeit einer Strahlentherapie wird von einem niedrigen Sauerstoffgehalt in den Tumorzellen stark beeinträchtigt. Unter Sauerstoffarmut ist die Zelle nicht teilungsaktiv, wodurch die DNS kondensiert und somit widerstandsfähiger gegen ionisierende Strahlung ist. Der Sauerstoffmangel hat des Weiteren zur Folge, dass die ionisierende Strahlung keine Radikalbildung in der Zelle induziert, die ihrerseits ebenfalls die DNS schädigen könnte. Klinische Studien bestätigen, dass ein niedriger intratumoraler Sauerstoffspiegel mit einer höheren Lokalrezidiv- und Metastasierungsrate nach Strahlentherapie einhergeht (MOLLS und VAUPEL, 1998). Ursächlich dafür ist eine verminderte Bildung von strahleninduzierten Radikalen unter Abwesenheit von Sauerstoff.

Es gibt verschiedene therapeutische Ansätze, die darauf abzielen, hypoxische Areale im Tumor besser mit Sauerstoff zu versorgen oder maligne Zellen gegenüber Bestrahlung zu sensibilisieren. Durch hyperbare Sauerstofftherapie kann der partielle Sauerstoffdruck im malignen Gewebe erhöht werden und somit die Bildung hypoxischer Areale verhindert werden. Mit „Radiosensitisern“ wiederum sensibilisiert man Tumorgewebe gegenüber ionisierender Strahlung. Dies geschieht durch die Redox-Eigenschaften der verwendeten Substanzen. Sie entfalten ihre toxische Wirkung dort, wo Strahlen, bedingt durch den fehlenden Sauerstoff nicht ausreichend zytotoxisch wirken können. Beide Therapieansätze sind jedoch nicht in der Lage hypoxische Zellpopulationen zuverlässig zu kontrollieren.

Um sich die Hypoxie zu Nutzen zu machen, untersucht man seit etwa zwei Jahrzehnten Substanzen, die gerade diese Sauerstoffarmut benötigen, um ihre

## EINLEITUNG

---

Wirksamkeit zu entfalten. Tirapazamine (TPZ) ist so eine Substanz, der die größten Chancen zugesprochen werden, zukünftig in der Klinik eingesetzt zu werden.

Die nicht-toxische Ausgangssubstanz wird nur bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck, wie er spezifisch im Tumor vorkommt, durch zelleigene Enzyme in ihre zytotoxische Form umgewandelt.

Ziel dieser Untersuchung ist es, im In-vivo-Experiment den therapeutischen Nutzen von TPZ unter klinikrelevanten Bedingungen zu untersuchen. Die in der Klinik häufig angewandte Radiochemotherapie mit cis-Platin und Bestrahlung und eine Kombination aus TPZ, cis-Platin und Bestrahlung soll in ihrer Wirkung auf das Tumorstadium und ihre Nebenwirkungen auf den Organismus vergleichend untersucht werden. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen die in der klinischen Testphase befindliche Anwendung von TPZ untermauern.

## 2 LITERATUR

### 2.1 Hypoxie

Hypoxie wird definiert als der Mangel von Sauerstoff im Gewebe (ZANDER und VAUPEL, 1985). Die Ursachen für das Absinken des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe können in der gestörten Aufnahme, dem Transport oder der Diffusion des Sauerstoffes im Gewebe liegen (HÖCKEL und VAUPEL, 2001b; GANDARA et al., 2002).

Ein zu geringer Sauerstoffgehalt in der Atemluft oder eine verminderte Lungenfunktion bedingen ein Absinken des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes. Des weiteren kann die Sauerstofftransportkapazität im Blut durch Anämie, Methämoglobinbildung oder Kohlenmonoxid herabgesetzt werden. Im Bereich der kapillaren Blutversorgung kann es zur Störung oder der Unterbrechung des Blutflusses kommen. Auch die Distanzzunahme zwischen Zellen und Blutgefäßen kann sich durch Proliferation der Zellen, die auf dieser Strecke liegen, erhöhen und eine verschlechterte Sauerstoffversorgung des Gewebes zur Folge haben (HÖCKEL und VAUPEL, 2001a; GANDARA et al., 2002).

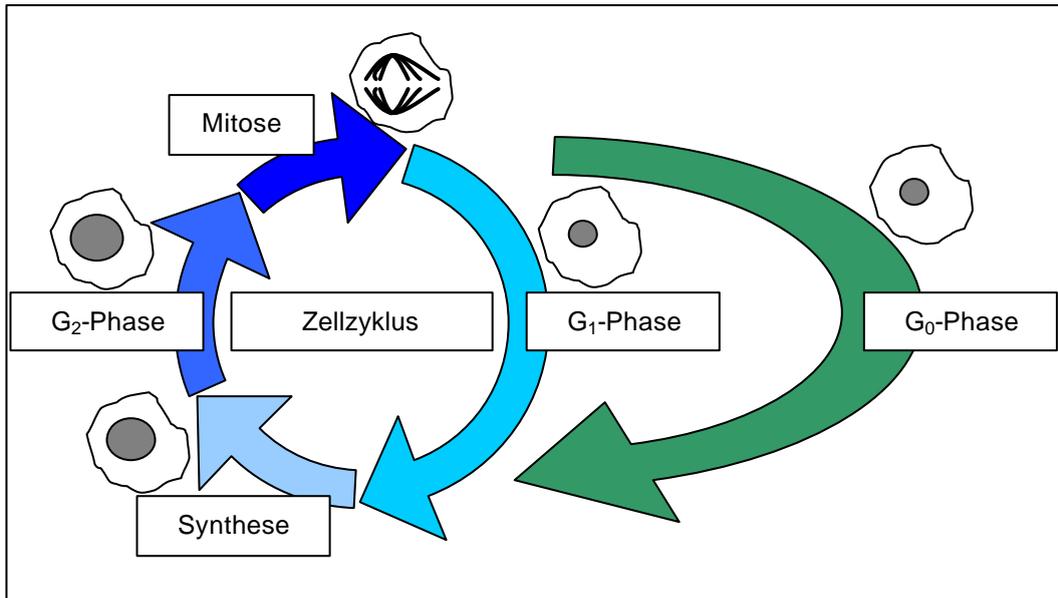
Ein Merkmal solider Tumoren ist die chaotische Gefäßarchitektur. Die Gefäße können dilatiert sein, korkenzieherartig verlaufen, blind enden oder untereinander Shunts bilden. Dies kann zu einem verlangsamten, sistierenden oder gar rückläufigen Blutfluss führen. Eine Unterbrechung des Blutflusses kann auch durch den Druck proliferierender Zellen auf Gefäße hervorgerufen werden, durch Thromben, die in arrodieren Gefäßen entstehen oder durch abgesprengtes Tumorgewebe (SHAH-YUKICH und NELSON, 1988; ENDRICH B, 1995).

Die Vielzahl Hypoxie verursachender Mechanismen können eine chronische oder akute Hypoxie auslösen. Im Falle einer chronischen Hypoxie kann mit der Erhöhung des Sauerstoffgehaltes in der Atemluft oder der Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität im Blut die Versorgung des Gewebes verbessert werden. Bei der akuten Hypoxie ist ein Gegensteuern auf Grund der zuvor

genannten Ursachen wesentlich schwieriger. Hypoxie ist kein statischer Zustand, sondern ein dynamischer Prozess (GRAY et al., 1953; THOMLINSON und GRAY, 1955; CHAPLIN et al., 1987; HÖCKEL und VAUPEL, 2001a; GANDARA et al., 2002).

Unter dem Mangel an Sauerstoff setzen in der Zelle eine Vielzahl von Prozessen ein, die alle das Überleben der Zelle als Ziel haben. Ein Beispiel hierfür stellt der anaerobe Abbau von Glukose zur Bildung von Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) als Energieträger für sämtliche Reaktionen in der Zelle dar. Die Folge ist ein erhöhtes Aufkommen von Acetat, das als Abfallprodukt von der Zelle ausgeschieden werden muss. Durch den erhöhten Acetatausstoß sinkt der pH-Wert im extrazellulären Raum ab (VAUPEL, 1992; SCHAEFER et al., 1992; WALENTA et al., 1994; HÖCKEL und VAUPEL, 2001b).

Der Zellzyklus erlebt durch die Hypoxie ebenfalls eine Veränderung. Statt des normalen Verlaufs von Mitose (Verdoppelung der DNS und Zellteilung), G<sub>1</sub>- und S-Phase (Syntheseleistung der Zelle), G<sub>2</sub>-Phase (Vorbereitung der Mitose) geht die Zelle nach der Mitose in die G<sub>0</sub>-Phase über. Die G<sub>0</sub>-Phase wird als Ruhephase bezeichnet, in der die Zelle sich nicht teilt. In diesem Zustand ist sie gegen äußere Einflüsse äußerst widerstandsfähig (s. Abb.1). Hieraus ergeben sich Schwierigkeiten für die Strahlen- und Chemotherapie solider Tumoren (VAUPEL, 1992; BROWN und GIACCIA, 1998; HÖCKEL und VAUPEL, 2001b).



**Abbildung 1:** Zellteilungszyklus mit eingeteilten Zyklusphasen (modifiziert nach Fritz-Niggli (1991)).

Untersucht man den Effekt von ionisierender Strahlung auf menschliche oder tierische Zellkulturen, wird unter hypoxischen verglichen mit normoxischen Bedingungen eine 2.5- bis 3-fach höhere Strahlendosis benötigt, um einen vergleichbaren Schaden an der DNS zu verursachen (GRAY et al., 1953). Hierfür ist u.a. der Sauerstoffeffekt verantwortlich. Sauerstoff steigert die Bildung von aktiven Produkten, beispielsweise Peroxidradikale und Wasserstoffperoxid, die wiederum Einzel- und Doppelstrangbrüche an der DNS verursachen können.

Im Falle der Chemotherapie kann die verwendete Substanz, zum Beispiel durch einen blockierten Transportweg, die hypoxischen Tumorzellen nicht in ausreichendem Maße erreichen (BROWN, 2000).

## 2.1.1 Methoden zur Messung und Darstellung der Hypoxie

Um Hypoxie mess- oder sichtbar zu machen, sind verschiedene Methoden entwickelt worden, die sich in ihrer Anwendung stark unterscheiden:

Als Goldstandard gilt die polarographische Sauerstoffmessung mit Hilfe einer Feinnadelektrode (KALLINOWSKI et al., 1990). Dabei wird eine Nadelsonde schrittweise mit Hilfe eines mechanischen Vorschubes durch das Tumorgewebe getrieben. Auf der zurückgelegten Wegstrecke werden die Messwerte über den Sondenkopf der Nadel gesammelt. Über eine an der Nadelspitze angelegte Spannung wird Sauerstoff im Gewebe reduziert. Der dabei entstehende Strom ist proportional zum Sauerstoffpartialdruck im Gewebe.

Eine Variation dieser Technik arbeitet auf der Basis von Lumineszenz. Hier wird die Elektrode durch eine optische Faser ausgetauscht. An der Spitze dieser Sonde befindet sich ein Fluorofor, das über blaues Licht angeregt wird. Die Dauer der Fluoreszenz ist umgekehrt proportional zur vorhandenen Sauerstoffkonzentration (GRIFFITHS und ROBINSON, 1999).

Unter den physikalischen Bildgebungsverfahren lassen sich [<sup>123</sup>J]-Iodoazomizin-Arabinose mit einer Single Photonen Emissions Computer Tomographie (SPECT) (GROSHAR et al., 1993), [<sup>18</sup>F]-Fluoromisonidazole (PET) (KOH et al., 1992) und [<sup>19</sup>F]-Magnetische-Resonanz-Relaxometrie (HUNJAN et al., 1998), [<sup>1</sup>H]-MRI (STUBBS und GRIFFITHS, 1999) nennen.

Eine weitere nicht invasive Technik ist die paramagnetische Elektronen-Resonanz-Oximetrie, die den Sauerstoffgehalt im Gewebe misst (HALPERN et al., 1994).

Zur intravasalen Sauerstoffmessung werden die Kryospektrophotometrie (ROFSTAD et al., 1988), die Infrarot-Spektroskopie (HULL et al., 1999) und das Phosphoreszenz-Imaging (WILSON und CERNIGLIA, 1992) angewendet.

Für die immunhistochemische Darstellung stehen u.a. folgende vier Substanzen als Hypoxiemarker zur Verfügung: Misonidazol (URTASUN et al., 1986), Pimonidazol (RALEIGH et al., 1996), Etanidazol (LORD et al., 1993) und Nitroimidazole-Theophyllin (HODGKISS et al., 1997). Hierbei handelt es sich um Imidazolderivate, die in Abwesenheit von Sauerstoff an Membranproteine der Zelle binden.

## **2.2 Tirapazamine (TPZ)**

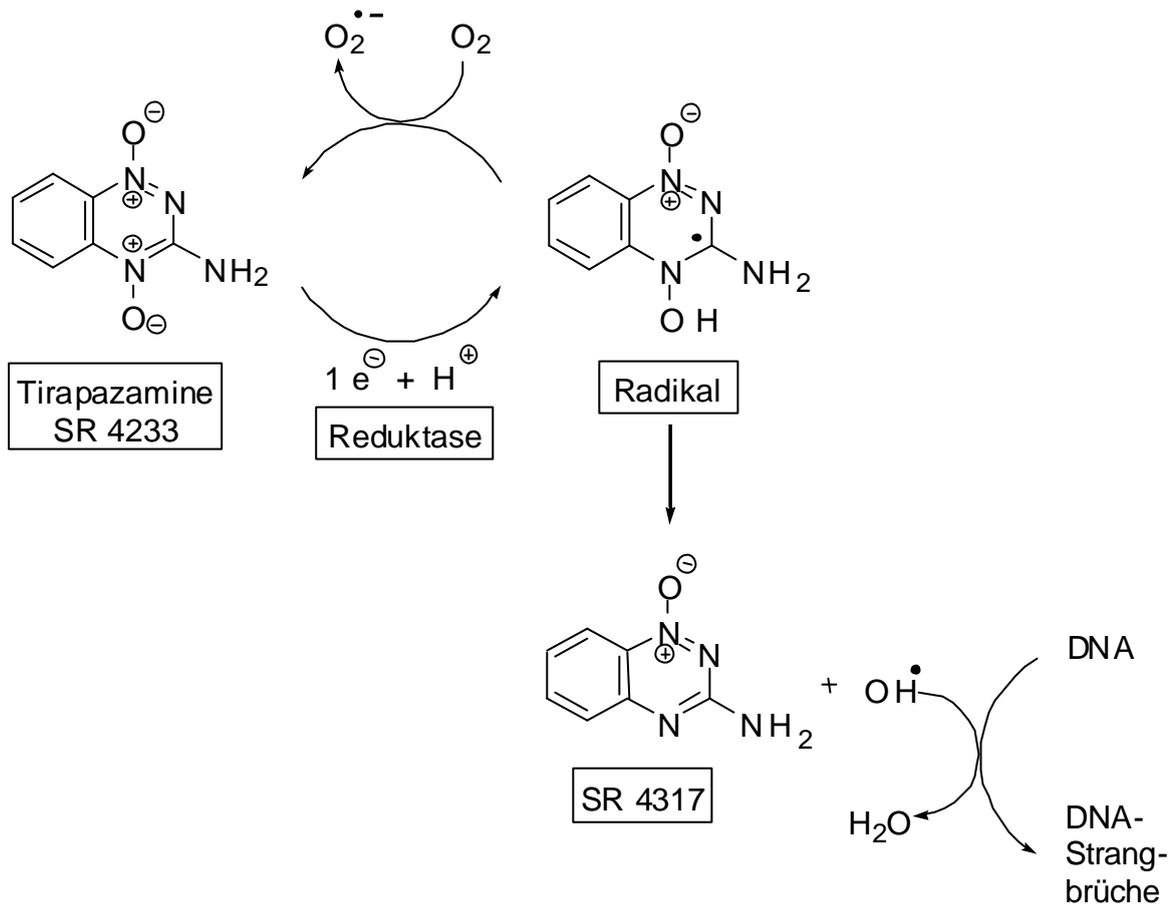
Tirapazamine (TPZ, 3-Amino-1,2,4-Benzotriazine-1,4-Dioxid, SR4233, WIN 59075 und Tirazone) (ZEMAN et al., 1986; BROWN, 1993; DURAND und OLIVE, 1997), ist ein zytotoxisches Chemotherapeutikum aus der Stoffgruppe der Benzotriazine Di-N-Oxide (ZEMAN et al., 1989). Seine Summenformel lautet  $C_7H_6N_4O_2$  und sein Molekulargewicht beträgt 178.15g/mol.

TPZ wird in der Zelle durch Enzyme reduziert und somit aktiviert. Es entfaltet seine Toxizität selektiv unter hypoxischen Bedingungen (ZEMAN et al., 1986; ZEMAN und BROWN, 1989; BROWN und LEMMON, 1990; BROWN, 1993) (siehe Punkt 2.2.1)

### **2.2.1 Wirkungsmechanismus**

Der Reaktionsmechanismus von TPZ läuft in zwei Schritten ab, in denen Tirapazamine zu SR 4317 (3-Amino-1,2,4-Benzotriazine-1-Monooxid) abgebaut wird. Der erste Schritt, die enzymatische Aktivierung, erfolgt durch Kofaktor-abhängige Reduktasen. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand sind hier Zytochrom P450, NADPH-zytochrom-P450-Reduktase, Xanthin-Oxidase und DT-Diaphorase beteiligt (BOSTERLING und TRUDELL, 1981; COSTA et al., 1989; DELAHOUSAYE et al., 2001). Das entstehende freie Radikal kann durch Sauerstoff zu der nicht toxischen Ausgangssubstanz rückoxidieren oder mit Hilfe eines Protonendonors zum Endprodukt SR 4317 (3-Amino-1,2,4-Benzotriazine-1-Monooxid) reagieren, welches wiederum nicht toxisch ist. Das Prinzip der Toxizität ist der Entzug eines Protons aus einem beliebigen Molekül in der Zelle. Dadurch wird die Funktion der Zelle

beeinträchtigt. Je nach der Funktion des betroffenen Moleküls in der Zelle richtet sich auch der Schweregrad der Störung. Ziel ist letztendlich das Setzen von Einzel- und Doppelstrangbrüchen an der DNS (BAKER et al., 1988; COSTA et al., 1989) (s. Abb.2).



**Abbildung 2:** Intrazellulärer Stoffwechsel von Tirapazamine unter hypoxischen Bedingungen (modifiziert nach BROWN 1993)

Um den Grad der Toxizität von TPZ in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdruckes zu zeigen, sind verschiedene Studien *in vitro* und *in vivo* durchgeführt worden. Costa et al. (1989) zeigten an Leberzellkulturen, dass ein sinkender Sauerstoffpartialdruck im Kulturmedium die toxische Wirkung von TPZ steigerte. Die Toxizität lag bei hypoxischen Zellen 15- bis 200-fach höher, als bei normoxischen Zellen. Ähnliche Werte ergaben Versuche an der Zelllinie V79 (Lungenfibroblasten, chinesischer Hamster). Hier ergab sich eine 2000-fach höhere Toxizität in hypoxischen Zellkulturen gegenüber normoxischen Versuchsreihen (KOCH, 1993).

Dieselbe Fragestellung wurde auch an verschiedenen Tumor-Maus-Modellen untersucht. Der Sauerstoffgehalt im Gewebe wurde hier über die Atemluft der Tiere gesteuert. Die Versuchsgruppen wurden jeweils mit 21% oder 10% Sauerstoff beatmet. Es zeigte sich dabei, dass bei niedrigem Sauerstoffgehalt in der Atemluft TPZ eine bis zu 10-fach höhere Toxizität aufwies (MINCHINTON und BROWN, 1992; DURAND und OLIVE, 1997).

### **2.2.2 Metabolismus von Tirapazamine**

Die Verstoffwechslung von TPZ lässt sich anhand von zwei Parametern messen. Chemisch als die Abnahme der Grundsubstanz SR4233 und die gleichzeitige Zunahme des Metaboliten, SR4317. Zellbiologisch kann der Grad der Schädigung an der Zelle über die Anzahl der Einzel- und Doppelstrangbrüche gemessen werden (BIEDERMANN et al., 1991; SIIM BG, 1995). In Studien an humanen Tumorzelllinien (HT 1080, SCCVII, A 549) konnten einige der an der Reduzierung beteiligten Enzyme und Kofaktoren identifiziert werden. Zu den Enzymen, die unter Hypoxie und Gabe von TPZ einen Aktivitätsanstieg zeigen, gehören NADPH, NADH, Cytochrom p 450 Reduktase und die Quinon-Oxidoreduktase. Für NADPH und NADH konnten jeweils die höchsten Aktivitätssteigerungsraten gemessen werden (WANG et al., 1993; ELWELL et al., 1997; SAUNDERS et al., 2000). Diese Aktivitätsrate korreliert auch mit der Menge an produzierten SR4317, dem Abbauprodukt von TPZ (PATTERSON et al., 1995).

Des Weiteren wird die Toxizität von TPZ auch von der Lokalisation der oben aufgeführten Enzyme beeinflusst. Ein weiteres Enzym, dessen Aktivität unter TPZ gesteigert wird, ist die DT-Diaphorase. Es handelt sich bei diesem Enzym um eine zwei-Elektronen-Reduktase, die nur im Zytoplasma zu finden ist (PATTERSON et al., 1994; SHARP et al., 2000; DELAHOUSAYE et al., 2001).

In einer weiteren Untersuchung wurden die Metaboliten von TPZ im Zytoplasma versus Zellkern verglichen. Es zeigte sich, dass 80% des TPZ im Zytoplasma

reduziert wird und nur 20% im Zellkern. Dieser nukleäre Anteil ist schließlich für den letalen Schaden an der DNS verantwortlich (EVANS et al., 1998).

### **2.2.3 Aerobe Toxizität**

Neben der hypoxischen Toxizität wird auch eine aerobe Toxizität beobachtet. Diese wird vermutlich durch TPZ-Radikale verursacht, die bei der zyklischen Redoxreaktion von TPZ unter aeroben Verhältnissen entstehen (ELWELL et al., 1997). An isolierten Mitochondrien ist ein Abfallen des Membranpotentials beobachtet worden, das vermutlich auf das gesteuerte Öffnen eines großen, nicht näher bekannten transmembranären Kanals zurückzuführen ist (WOUTERS et al., 2001).

Der Grad der aeroben Toxizität hängt mit der Kapazität der Zelle zusammen, Radikale zu eliminieren (GIACCIA et al., 1992; HERSCHER et al., 1994). Dies kann über zelleigene Enzyme geschehen, wie der Superoxid-Dismutase oder verschiedene Katalasen, die Sauerstoffradikale in Wasser und Sauerstoff umwandeln. Auch biologische Antioxidantien, wie Vitamin C und E, Coenzym Q,  $\beta$ -Carotin oder Glutathion können die Zelle vor Schäden durch TPZ schützen.

### **2.2.4 Verfügbarkeit im Körper und LD50**

Die Halbwertszeit von TPZ im Plasma beträgt ca. eine halbe Stunde. Bei intravenöser oder intraperitonealer Applikation wird eine Dosierung von 18 bis 54 mg/kg KGW angewandt. Diese Konzentrationen gewährleisten eine vergleichbare Toxizität, wie sie *in vitro* gezeigt werden konnte (WALTON und WORKMAN, 1993; GRAHAM et al., 1997).

Die therapeutische Breite ist relativ eng, was sich im geringen Unterschied zwischen der LD<sub>10</sub> (294mg/m<sup>2</sup>) und der LD<sub>50</sub> (303mg/m<sup>2</sup>) (GRAHAM et al., 1997) widerspiegelt.

## **2.2.5 Kombination von Tirapazamine mit Bestrahlung**

In verschiedenen Studien ist die Fragestellung untersucht worden, wie TPZ in Kombination mit Bestrahlung oder cis-Platin wirkt. Zu Grunde gelegt wurde jeweils die Wirkung, die jedes einzelne Therapeutikum für sich alleine auf ein Tumor-Maus-Modell oder eine Zelllinie hat. Um eine These zu formulieren, werden die Einzelergebnisse miteinander addiert. Dieser additive Effekt gilt als Referenzgröße für die Ergebnisse aus Kombinationsversuchen.

Im Falle der Kombination von TPZ mit Bestrahlung konnte gezeigt werden, dass das beste Ergebnis leicht über dem additiven Effekt liegt. ZEMAN et al. (1986) behandelten verschiedene humane (HCT-8, AG1522, A549) und tierische (HA-1, 10T1/2, RIF-1, SCC VII) Zelllinien mit einer einmaligen Bestrahlung (20 Gy) und einer einmaligen Dosis TPZ (0.3 mmol/kg) eine Stunde vor bzw. zwei Stunden nach der Bestrahlung. Für die hypoxischen Versuchsgruppen ergab sich für die tierischen Zelllinien eine 75- bis 200-fach höhere Toxizität im Vergleich zu den normoxischen Versuchsgruppen. Bei den humanen Zelllinien lag das Ergebnis bei 15- bis 50-facher Toxizitätszunahme. BROWN und LEMMON (1990) untersuchten an tierischen Zelllinien (SCC VII, RIF-1, EMT6, KHT/Ro) eine Kombinationsbehandlung mit Bestrahlung (8x2.5 Gy) und TPZ (8x0.08 mmol/kg) bis zu drei Stunden vor oder im direkten Anschluss an die Bestrahlung. Es konnte gezeigt werden, dass gegenüber alleiniger Bestrahlung der dosismodifizierende Faktor bei 1.5 bis 3 lag. SIIM et al. (1997) konnten ebenfalls an menschlichen und tierischen Zelllinien zeigen, die sie jeweils 30 min vor der Bestrahlung mit TPZ behandelte, dass TPZ (8x0,12mmol/kg) die Wirkung fraktionierter Bestrahlung (8x2.5 Gy) verstärkt.

## **2.2.6 Kombination von TPZ mit cis-Platin**

In der Kombination von TPZ (1x0.27-0.35mmol/kg) mit cis-Platin (1x4-10mg/kg) wurde ebenfalls eine Verbesserung der tumortötenden Wirkung gegenüber alleiniger Behandlung mit cis-Platin gezeigt. Der dosismodifizierende Faktor lag hier bis zu 5. Eine Verstärkung der Wirkung konnte allerdings nur beobachtet werden, wenn TPZ zwei bis drei Stunden vor der cis-Platin-Gabe verabreicht wurde. Eine gegenseitige negative Beeinflussung der Nebenwirkungen wurde nicht beobachtet (DORIE und BROWN, 1993; SIEMANN und HINCHMAN, 1998).

## **2.3 Cis-Platin**

cis-Platin (DDP, CDDP, cis-DDP, cis-Diaminedichloroplatinum, cis-Platinum II, Peyrone's salt, Platinum Diaminchloride) ist ein Zytotoxin, das eine breite Anwendung in der medizinischen und veterinärmedizinischen Tumorthherapie findet. Seine Strukturformel lautet  $N_2Cl_2PtH_6$ . Mitte der Sechziger Jahre erkannte man, dass Platin die Teilung von *E. coli* hemmt (ROSENBERG et al., 1967). Dieses Erkenntnis war die Grundlage für die Entwicklung von cis-Platin und weiteren platinhaltigen Zytotoxinen.

### **2.3.1 Wirkungsmechanismus**

cis-Platin besitzt die Fähigkeit mit RNS, DNS und Proteinen kovalente Bindungen einzugehen (PASCOE und ROBERTS, 1974a; PASCOE und ROBERTS, 1974b). Bevorzugt geschieht dies mit den N7-Positionen von Guanin und Adenin (PINTO AL, 1985). Bei diesen Reaktionen entstehen sogenannte „interstrand adducts“ wie d(GpG) zu ca. 60%; d(ApG) zu ca. 30%, „interstrand crosslinks“ <1%, DNS-Protein Crosslinks und „monoadducts“. Diese Bindung führt bei der DNS zu einer Konfigurationsänderung und anschließend zu Strangbrüchen (SUNDQUIST et al., 1986; REED et al., 1995).

## **2.3.2 Metabolismus und Ausscheidung**

cis-Platin wird in der Blutbahn zu ca. 50% an Serumproteine gebunden und direkt wieder ausgeschieden. Der Rest dringt passiv in die Zellen ein. Intrazellulär wird cis-Platin hydrolysiert und nimmt eine kationische Konfiguration an. Durch diese positive Ladung kann cis-Platin mit anderen negativ geladenen Molekülen, wie beispielsweise der DNS reagieren. cis-Platin wird aus dem Blut zu ca. 90% über die Nierenglomerula ausgeschieden. Weitere 10% werden nach Glukoronidierung in der Leber ausgeschieden. Intrazellulär gebundenes cis-Platin wird nach dem Untergang der Zelle über die normalen Zellabbaumechanismen entsorgt (REED et al., 1995).

## **2.3.3 Toxizität**

cis-Platin weist eine Reihe von Nebenwirkungen auf, die bei der Anwendung beachtet werden müssen. Hier sind zu nennen: Übelkeit und Erbrechen (GO und ADJEI, 1999), Schädigung der proximalen und distalen Nierentubuli (HARDAKER et al., 1974; MADIAS und HARRINGTON, 1978; DAUGAARD et al., 1986; DAUGAARD und ABILDGAARD, 1989), Schädigung des Innenohres (O'DWYER et al., 2000) mit einem Hörverlust im hohen Frequenzbereich (PIEL et al., 1974) und Neurotoxizität, die in eine gestörte Propriozeption und Missempfindung in den Gliedmassen, sowie Lähmungen bewirken kann (HACKER, 1991). Schließlich kann eine Kardiotoxizität beobachtet werden, die durch Schäden der reizbildenden und -leitenden Fasern hervorgerufen wird (WILTSHAW und CARR, 1974).

## **2.4 Strahlentherapie**

In der Strahlentherapie werden u.a. Röntgenstrahlen zur Behandlung von Tumoren eingesetzt. Hierzu werden in einer Röntgenröhre Elektronen an einer Glühkathode erzeugt, die durch ein elektromagnetisches Feld auf eine Anode aus schweren Atomen (z.B. Wolfram) beschleunigt werden. Beim Auftreffen der Elektronen auf die Atomkerne oder Atomhülle der Anode oder beim Abbremsen der Elektronen auf ihrer Flugbahn, geben diese ihre Energie in Form von Photonen bzw. Röntgenstrahlen ab.

Beim Auftreffen der Photonen auf lebende Zellen werden Schäden an den zellulären Molekülen verursacht. Ziel der Bestrahlung ist die Schädigung der DNS bis zum Abtöten der Zelle (SAUER, 1998).

### 2.5 **Fibrosarkom der Maus: der RIF-1-Tumor**

Die RIF-1-Zelllinie entstand 1979 aus Bestrahlungsversuchen an C3H/Km-Mäusen. In diesem Versuch wurden durch Strahlung Fibrosarkome induziert und anschließend als Zelllinie isoliert. Diese Zellen lassen sich als Klone sowohl *in vivo* als auch *in vitro* leicht züchten. *In vivo* lösen sie keine oder nur eine minimale immunologische Reaktion aus (BROWN, 1979b; TWENTYMAN et al., 1980; BROWN et al., 1980).

RIF-1-Metastasen entstehen nur sehr selten und scheinen das Ergebnis eines klonalen Prozesses zu sein (TWENTYMAN, 1980; REEVE und TWENTYMAN, 1982). RIF-1-Zellen können als Monolayer und als Spheroide in Kultur gehalten werden. In der Maus wachsen die Zellen nach Injektion über die Schwanzvene als Lungenmetastasen oder intrakutan injiziert als lokale Tumoren (TWENTYMAN et al., 1980).

## **3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN**

### **3.1 Material und Methoden**

#### **3.1.1 Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit soll eine kombinierte und fraktionierte Radiochemotherapie mit Bestrahlung, cis-Platin und Tirapazamine in seiner Wirkung an einem Tumor-Maus-Modell evaluiert werden. Die Ergebnisse sollen einer Standard-Radiochemotherapie mit Bestrahlung und cis-Platin gegenübergestellt werden um den eventuellen Nutzen der zusätzlichen Gabe von TPZ feststellen zu können. Um die Ergebnisse später als Grundlage für klinische Studien zu verwenden, wird das Behandlungsschema möglichst nahe an die klinischen Bedingungen angepasst.

Neben der direkten therapeutischen Wirkung, die am Tumor gemessen werden soll wird zusätzlich die Wirkung auf den gesamten Organismus ausgewertet. Nach Beendigung der Versuche werden hierfür Gewebeproben der einzelnen Tiere entnommen und histologisch ausgewertet. Die Ergebnisse hierzu sind in der Arbeit von OTTENJANN (2003) veröffentlicht worden.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes mit Bescheid vom 25. Mai 1998 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

### **3.1.1.1 Aufzucht und Haltung der strahleninduzierten Mäusesarkomzelllinie RIF-1**

Die klonale Mäusesarkomzelllinie RIF-1, wurde von Dr. M. Adam im Jahr 1999 dem Institut für Strahlentherapie und radiologische Onkologie zur Verfügung gestellt. Sie wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Vor Beginn der Experimente wird ein Aliquot des Originalstammes aufgetaut (Passagezahl „x“) und in Kultur genommen. Diese Zellen werden zweimal passagiert (x+1 und x+2) und die nicht benötigten Kulturen zur Erhaltung der Zelllinie für weitere Versuche bei  $-196^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Um den Phänotyp der Zelle konstant zu halten, wurden nur Passagen bis x+15 für die Experimente verwendet.

Die Zellen werden zur Aufzucht in 270ml ( $127.5\text{cm}^2$ ) Plastikgewebekulturflaschen (TPP, Schweiz) gehalten. Als Kulturmedium dient Dulbecco's Waymouth (Invitrogen, Karlsruhe), das mit 10% fetalem Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe) supplementiert wird. Die Zellen werden bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5% Kohlendioxid in wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Das Medium wird drei mal pro Woche gewechselt und die Zellen nach Erzeugen eines konfluenten Zellrasens passagiert. Zur Passagierung werden die Zellen zweimal mit einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gespült und anschließend mit einer 0.05% Trypsin-0.02% EDTA Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) bedeckt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 2min lassen sich die Zellen von der Unterlage ablösen und in neue Kulturflaschen überführen. Das Teilungsverhältnis („split ratio“) beträgt je nach Verwendungszweck 1:3 bis 1:10.

### **3.1.1.2 Einfrieren und Auftauen der Zelllinien**

Konfluente Zellen werden, wie unter Punkt 3.1.2.1 beschrieben, von ihrer Unterlage abgelöst, in 10ml kälberserumenthaltendem Medium ( $37^{\circ}\text{C}$ ) aufgenommen und für 5min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1000rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Hereaus Sepatech). Der Überstand wird verworfen und das entstandene Zellpellet erneut mit 10ml Medium in

Suspension gebracht. Diese Suspension wird 1min auf Eis gestellt und erneut zentrifugiert. Das resultierende Zellpellet wird in einer Einfrierlösung, bestehend aus 90% FKS-haltigen Medium und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma), aufsuspendiert und nochmals für 5min auf Eis inkubiert. Jeweils 1ml der resultierenden Zellsuspension wird in Kryoröhrchen aliquotiert und in Styroporbehältern über Nacht auf  $-70^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Nach 24 Stunden werden diese in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen in den Kryoröhrchen erfolgt bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad. Die Zellen werden anschließend sofort in Kulturflaschen pipettiert, die serumhaltiges Medium enthalten. Nach Anwachsen der Zellen, spätestens aber nach 24 Stunden, wird das DMSO-haltige Medium durch frisches Medium ohne DMSO ersetzt.

### **3.1.1.3 Zellaufbereitung für Experimentaltumoren**

Konfluente Zellen werden, wie unter Punkt 3.1.2.1 beschrieben, von ihrer Unterlage abgelöst und in 10ml Serum-haltigem Medium ( $37^{\circ}\text{C}$ ) suspendiert. Die absolute Zellzahl wird mit Hilfe einer Neubauerschen Zählkammer bestimmt. Dazu werden 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau, zum Anfärben der nicht vitalen Zellen, gemischt. Aus den vier Eckquadraten der Neubauerschen Zählkammer werden jeweils die vitalen Zellen gezählt und ein Mittelwert pro Eckquadrat errechnet. Der Mittelwert wird mit 20.000 multipliziert (10.000 entspricht dem Kammerfaktor, 2 entspricht dem Verdünnungsfaktor mit Trypanblau). Als Ergebnis erhält man die Konzentration an Zellen pro ml. Für die absolute Zellzahl muss noch das Gesamtvolumen der Zellsuspension berücksichtigt werden. Nach der Bestimmung der absoluten Zellzahl in der Zellsuspension wird diese für 5min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1000rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Hereaus Sepatech). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in der entsprechenden Menge Medium resuspendiert, so dass eine Zellkonzentration von ca.  $10^6$  Zellen pro ml resultiert.

### 3.1.1.4 Mäusestamm

Als Versuchstiere werden 160 C3H/HeJ Mäuse verwendet. Die Tiere werden mit einem Körpergewicht von 16 bis 19g, in einem Alter von 6 bis 8 Wochen von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen. Das durchschnittliche Körpergewicht bei Versuchsbeginn liegt zwischen 20 und 35g.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Gesamtheit der verwendeten Versuchstiere.

| <b>Verwendungszweck</b>  | <b>Anzahl der Tiere</b> |
|--|-------------------------|
| Anzucht von Tumoren für die Zellkultur   | 8                       |
| Tiere, die nicht in die statistische Auswertung des Hauptversuches aufgenommen sind (Dosisfindung) | 74                      |
| Statistisch ausgewertete Tiere (Hauptversuch)  | 78                      |
| <b>Gesamt</b>  | <b>160</b>              |

### 3.1.1.5 Mäusehaltung

Gruppen von 6 bis 10 Tieren werden in Macrolon®-Käfigen des Typs III ohne Trennwände und mit Gitteraufsatz gehalten. Die Einstreu erfolgt mit entstaubtem und entkeimtem Weichholzgranulat (Altromin®, Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage) und wird zweimal pro Woche gewechselt. Die Tiere erhalten Leitungswasser ad libitum ohne Zusatzstoffe über eine Nippeltränke (150ml). Die Fütterung erfolgt mit Altromin® 1324 (Altromin®, Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage) ad libitum. Das Raumklima wird mit einer Temperatur von 19 bis 24°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60% konstant gehalten. Eine Zeitautomatik steuert einen

Licht/Dunkel-Zyklus von je 12 Stunden. Die Lichtintensität im Käfig beträgt je nach Standort 50 bis 100 Lux.

### **3.1.1.6 Inokulation der Experimentaltumoren**

Je 25µl einer Zellsuspension, (siehe 3.1.2.3) werden in Einweginsulinspritzen aufgezogen. Die Nadelführung erfolgt subkutan von distal zwischen der zweiten und dritten Zehe des rechten Fußes, parallel zu den Mittelfußknochen.

### **3.1.1.7 Wachstumsphase**

Das Wachstum der Experimentaltumoren wird täglich kontrolliert. Ungefähr ab dem vierten Tag nach der Inokulation ist eine leichte Wölbung des Fußrückens zu beobachten. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Messung der Höhe, Breite und Länge des Tumors, die täglich bis zur Beendigung des Versuches fortgeführt wird. Die durchzuführenden Therapien werden bei einem Tumolvolumen von durchschnittlich 160 mm<sup>3</sup> begonnen (s. Abb.3). Dieses Volumen wird im allgemeinen nach 12.5 Tagen (+/- 1.5 Tage) Wachstum erreicht. Bei dieser Tumorgröße sind reproduzierbare Volumenmessungen am Tumor durchführbar, so dass therapiebedingte Volumenschwankungen gut erfasst werden können. Nach Beendigung der Beobachtungsphase werden die Mäuse euthanasiert und histologisch aufbereitet.



**Abbildung 3:** RIF-1-Tumor auf dem Fußrücken des rechten hinteren Laufes einer C3H-Maus

### 3.1.1.8 Definition der Tumormassgrößen

Das Tumolvolumen bei jeder Maus am ersten Tag der Behandlung wird als  $V_0$  definiert. Die Beobachtung des Tumorstwachstums endet mit dem Verdoppeln des initialen  $V_0$  Wertes und wird als  $t_{2V_0}$  definiert.

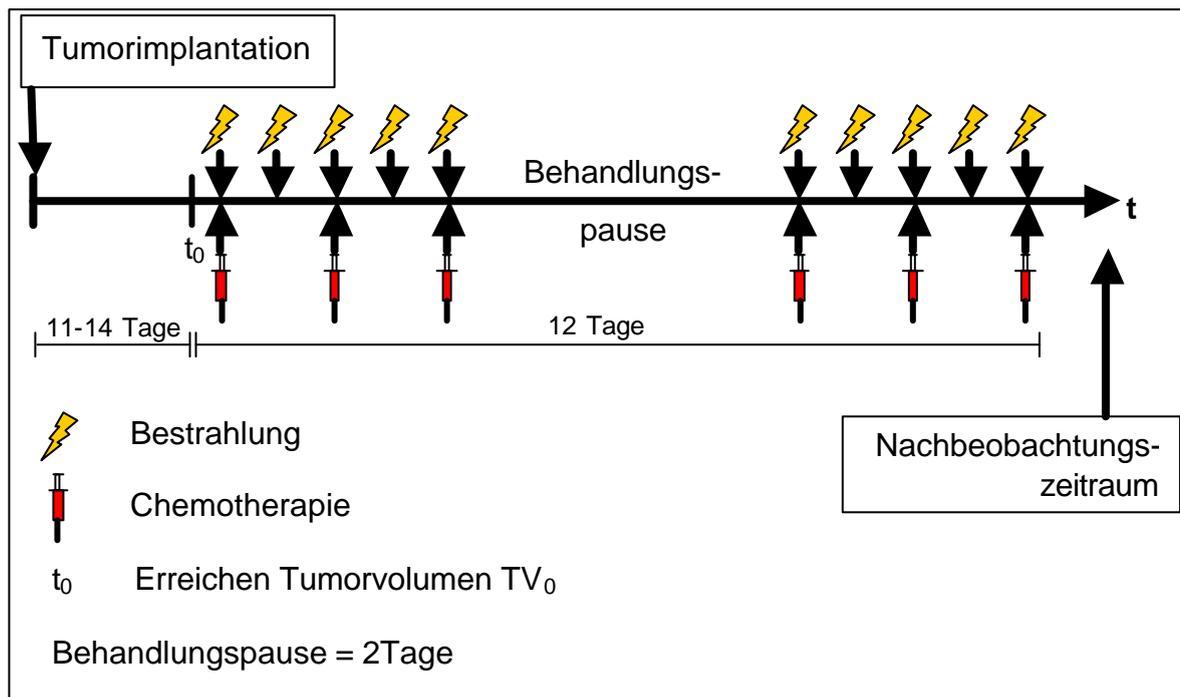
### 3.1.2 Therapie

#### 3.1.2.1 Vorbereitende Arbeiten

Bei Erreichen der Richtgröße  $TV_0$  werden die einzelnen Tiere einer Versuchsgruppe zugeordnet. Um die Streuung der Tumorstgrößen zu berücksichtigen, wird darauf geachtet, dass der Mittelwert aller Tumorstgrößen einer Gruppe mit denen der anderen Gruppen vergleichbar ist.

### 3.1.2.2 Behandlungszeitraum

Im Anschluss an die Gruppeneinteilung wird mit der kombinierten Strahlen- und Chemotherapie begonnen. Behandelt wird alle 24 Stunden über einen Zeitraum von 12 Tagen. Nach dem fünften Behandlungstag wird in Anlehnung an klinische Schemata eine zweitägige Behandlungspause eingelegt. Nach Beendigung der Therapie werden die Mäuse in ihren Käfigen weiter beobachtet (s.Abb.4).

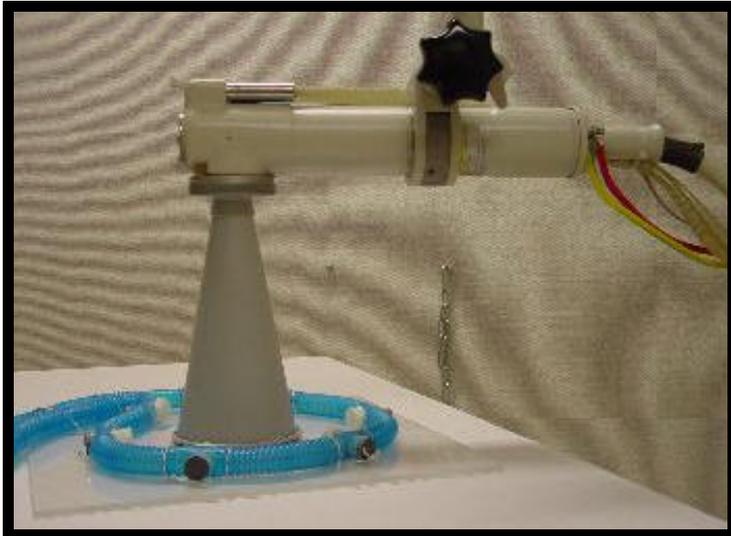


**Abbildung 4:** Übersicht des fraktionierten Behandlungsschema.

### 3.1.2.3 Bestrahlung

Zur Bestrahlung der Experimentaltumoren werden die narkotisierten Mäuse auf die Narkoseringapparatur (HIEBER et al., 2001) gelegt (siehe Punkt 3.1.4.5). Sie werden jeweils auf die rechte Körperseite gelegt, so dass der Kopf in der Beatmungsmaske liegt und der rechte tumortragende Fuß im Bestrahlungsfeld fixiert werden kann. Nach dem Fixieren der Mäuse wird der konische Tubus des Röntgengeräts direkt über dem Bestrahlungsfeld platziert (s. Abb.5). Anschließend werden die Tumoren

bestrahlt. Nach der Bestrahlung wird die Narkose (siehe Punkt 3.1.4.5) beendet und die Mäuse zum Aufwachen in den Käfig gelegt.



**Abbildung 5:** Röntgenstrahlgerät RT 100 mit aufgesetztem Tubus über der Narkose-Ring-Apparatur.

### **3.1.2.4 Bestrahlungsgerät RT 100**

Die Experimentaltumoren werden mit einem Röntgenstrahlengerät (RT 100, Philips, Hamburg, Leistungsspektrum: 10-100 kV) bestrahlt. Die angewendeten Einzeldosen betragen in Anlehnung an die Arbeiten von Brown und Dorie 2 Gy bzw. 2.5 Gy (BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991; DORIE und BROWN, 1993). Bei einer Leistung von 75 kV entspricht dies einer Bestrahlungsdauer von 1.97 min bzw. 2.05 min. Das Bestrahlungsfeld wird zum Schutz der Tiere mit einem konischen Tubus auf einen Durchmesser von 12.5 cm begrenzt.

## 3.1.2.5 Inhalationsnarkose

Die Narkose wird in einer Plexiglaskammer mit 25 cm Länge und 15 cm Durchmesser eingeleitet. In den Deckel und den Boden des Gefäßes ist je ein Einlass- und Auslassstutzen zum Anschluss an das Narkosegerät, Sulla 19 (Dräger Werke, Lübeck) eingearbeitet. Sechs Mäuse werden über den luftdicht verschließbaren Deckel in der Kammer narkotisiert. Zur Durchführung der Inhalationsnarkose wird das Inhalationsnarkotikum Isofluran (Forene?, Abbot GmbH, Wiesbaden) verwendet. Die Narkose wird mit 5% Isofluran in der Atemluft eingeleitet und mit einem Sauerstoffflow von 1l/min in die Narkosekammer gepumpt (s. Abb.6). Zur Erhaltung der Narkose stellt man den Isoflurananteil in der Atemluft anschließend auf 1.4% ein.



**Abbildung 6:** Narkosekammer zur Einleitung der Inhalationsnarkose. Rechts und links Anschlüsse für das Narkosegerät

Für die Bestrahlung der Experimentaltumoren werden die Tiere narkotisiert auf der Narkose-Ring-Apparatur (HIEBER et al., 2001) fixiert. Auf einer Plexiglasplatte ist ein Beatmungsschlauch von 2.2 cm Durchmesser und 25.5 cm Länge montiert. Er bildet auf der Platte einen Kreis von ca. zweieinhalb „Mäusekörperlängen“ (ca. 28 cm) Durchmesser. Innerhalb des Kreises sind je sechs Atemmasken in den Schlauch eingearbeitet. Auf der Unterseite der Platte befindet sich eine Heizdecke, die ein Auskühlen der Tiere während der Narkose verhindert (s. Abb.7).



**Abbildung 7:** Narkose-Ring-Apparatur mit sechs, unter Vollnarkose fixierten C3H-Mäusen.

### **3.1.2.6 Chemotherapeutika**

#### **3.1.2.6.1 cis-Platin**

cis-Platin (Ribosepharm, München) wird in einer Sicherheitswerkbank (Heraeus, Hanau) in den Räumlichkeiten der Apotheke des Klinikums rechts der Isar zum Einsatz vorbereitet. Das Pharmakon wird in einem Verhältnis von 1:1 in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und in Einweginsulinspritzen aufgezogen. Die Spritzen werden zum Transport in Plastikfolie eingeschweißt und gekennzeichnet.

#### **3.1.2.6.2 Tirapazamine**

Das pulverförmige Tirapazamine (Sanofi-Synthelabo, Paris, Frankreich) wird zur Herstellung einer Stammlösung in einer Konzentration von 7 mg/ml aufgelöst. Je 0.7 mg TPZ-Pulver werden mit 8.7 mg Natriumchlorid, 0.96 mg Zitronensäure (pH 4), 0.25 mg Natriumhydroxid in 1 ml H<sub>2</sub>O (ad injectionem) gelöst. Die hergestellte Menge TPZ-Lösung füllt man anschließend in 12 50ml Glasampullen steril ab. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

## 3.1.2.7 Chemotherapie

Die Behandlung mit Tirapazamine erfolgt intraperitoneal unmittelbar im direkten Anschluss an die Bestrahlung (siehe Punkt 3.1.4.3). Die Injektion erfolgt entlang der Linea alba, auf halber Höhe zwischen Pecten ossis pubis und Xiphoid mit kaudo-kranialem Verlauf. Die Kanüle wird in einem spitzen Winkel durch die Bauchdecke geführt, um eine Verletzung der inneren Organe zu vermeiden. Nach zwei Stunden erfolgt auf demselben Wege die Behandlung mit cis-Platin.



**Abbildung 8:** Intra-peritoneale Injektion von TPZ in der linea alba einer C3H-Maus

## 3.1.3 Datenerhebung

### 3.1.3.1 Tumorzvolumen und Körpergewicht

Mit der Erhebung der Versuchsdaten wird am Tag der Inokulation der Experimentaltumoren, mit Ausnahme des Tumorwachstums wie unter Punkt 3.1.3.4 beschrieben, begonnen. Das Körpergewicht bestimmt man mit einer Laborwaage (Sartorius Universal, Göttingen). Höhe, Breite und Länge des Tumors werden mit einer digitalen Schublehre (Rennsteig, Viernau) täglich zur gleichen Uhrzeit

unmittelbar vor der Behandlung gemessen. Die letzte Messung erfolgt unmittelbar vor der Tötung der Tiere. Zur Berechnung des Tumorumfanges wird folgende Formel verwendet:  $\frac{\text{Höhe} * \text{Breite} * \text{Länge} * \pi}{6}$  (DORIE et al., 1991). Die Formel leitet sich von der Volumenberechnung eines ellipsoiden Körpers ab.



**Abbildung 9:** Messung der Tumorbreite am rechten Hinterlauf einer C3H-Maus mit Hilfe einer Schublehre.

### 3.1.4 Vorversuche zur Dosisfindung

Zur Durchführung der Hauptversuche wird in Vorversuchen die geeignete Dosierung der drei Therapiekomponenten ermittelt. Als Ausgangspunkt dienen Daten aus der Literatur, die unter den folgenden Punkten genannt werden. Die Kriterien für die Auswahl der Dosierungen für die drei Therapiekomponenten sind eine gut messbare Wachstumsverzögerung, ein möglichst ausgewogener Anteil der einzelnen Therapeutika an der Wachstumsverzögerung, sodass keine einzelne Therapiekomponente die Wirkung der anderen verdeckt, keine Tumorheilung und eine möglichst geringe Letalität. Zusätzlich wird das Körpergewicht und das

Allgemeinbefinden täglich beurteilt. Fällt das Körpergewicht unter 20% des Initialwertes und ist ein sehr schlechtes Allgemeinbefinden absehbar, werden die betroffenen Tiere eingeschläfert.

### **3.1.4.1 Strahlendosis**

Die Bestrahlung erfolgt in Anlehnung an publizierte Fraktionierungsschemata (BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991; MINCHINTON und BROWN, 1992; DORIE und BROWN, 1993; SIIM et al., 1997), in denen eine Gesamtstrahlendosis von 20Gy verwendet wird. Zwei Versuchsgruppen werden mit einer kombinierten Radiochemotherapie wie unter Punkt 3.1.4.2, Punkt 3.1.4.3 und Punkt 3.1.4.7 beschrieben, behandelt. Die Einzelbestrahlungsdosis liegt bei 2 und 2.5Gy.

### **3.1.4.2 cis-Platin**

Publizierte Versuche verwenden in verschiedenen Fraktionierungsschemata 2 bis 12mg cis-Platin pro kg KGW in Kombination mit Tirapazamine (DORIE und BROWN, 1993; SIEMANN und HINCHMAN, 1998; BROWN und WANG, 1998). Drei Versuchsgruppen werden mit einer kombinierten Radiochemotherapie wie unter Punkt 3.1.4.3 und Punkt 3.1.4.7 beschrieben, behandelt. Für die Chemotherapie werden 3.0, 4.0 und 5.0mg cis-Platin pro kg KGW appliziert.

### **3.1.4.3 Tirapazamine (TPZ)**

Für Tirapazamine werden sechs Versuchsgruppen mit einer kombinierten Radiochemotherapie, wie unter Punkt 3.1.4.3 und Punkt 3.1.4.7 beschrieben, behandelt. Die Einzeldosierungen betragen 7.2, 14.4, 18.0, 21.6, 25.2 und 28.8mg Tirapazamine pro kg KGW. Die Einzelbestrahlungsdosis liegt bei 2Gy und die Einzelgabe cis-Platin wird mit 4.0mg pro kg KGW dosiert.

### **3.1.4.4 Hauptversuche zur Einteilung der Versuchsgruppen**

Die Einteilung der Versuchsgruppen folgt in der Dosierung der Therapeutika den Angaben aus der Literatur. Die Gruppengröße wird aus statistischen Gründen mit mindestens vier Tieren festgelegt. Versuchsgruppen, deren Dosierung sich wiederholt, werden zusammengefasst. Für TPZ soll eine Dosisescalation mit 7.2, 14.4, 18.0, 21.6 und 28.8mg/kg KGW erfolgen.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 2:** Versuchsgruppen zur Dosisfindung.

| Dosierung          |                          | Bestrahlungs<br>Dosis (Gy) | Klinische<br>Erscheinungen | Anzahl<br>der Tiere |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|
| TPZ (mg/kg<br>KGW) | cis-Platin(mg/kg<br>KGW) |                            |                            |                     |
| 0                  | 0                        | 0                          | keine Tumorhemmung         | 2                   |
|                    | 4                        | 2.5                        | geringe Tumorhemmung       | 4                   |
| 7.2                | 3                        | 2                          | geringe Tumorhemmung       | 4                   |
|                    | 3                        | 2.5                        | geringe Tumorhemmung       | 4                   |
|                    | 5                        | 2                          | hohe Letalität             | 8                   |
| 14.4               | 3                        | 2                          | geringe Tumorhemmung       | 4                   |
|                    | 3                        | 2.5                        | geringe Tumorhemmung       | 4                   |
|                    | 5                        | 2                          | hohe Letalität             | 8                   |
| 21.6               | 3                        | 2                          | geringe Tumorhemmung       | 4                   |
|                    | 3                        | 2.5                        | geringe Tumorhemmung       | 4                   |
|                    | 4                        | 2.5                        | hohe Letalität             | 5                   |
|                    | 5                        | 2                          | hohe Letalität             | 8                   |
| 25.4               | 4                        | 2                          | hohe Letalität             | 5                   |
|                    | 4                        | 2.5                        | hohe Letalität             | 5                   |
| 28.8               | 4                        | 2.5                        | hohe Letalität             | 5                   |
| <b>Gesamt</b>      |                          |                            |                            | <b>74</b>           |

mg: Milligramm, kg: Kilogramm, KGW: Körpergewicht, Gy: Gray.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

**Tabelle 3:** Versuchsgruppen im Hauptversuch.

| Gruppe        | n =       | Dosierung       |                        |                         |
|---------------|-----------|-----------------|------------------------|-------------------------|
|               |           | TPZ (mg/kg KGW) | cis-Platin (mg/kg KGW) | Bestrahlungs Dosis (Gy) |
| „KU“          | 11        | 0               | 0                      | 0                       |
| „KB“          | 5         | 0               | 0                      | 2                       |
| „KCB“         | 5         | 0               | 4                      | 2                       |
| „KTB“         | 5         | 21.6            | 0                      | 2                       |
| Therapie „7“  | 4         | 7.2             | 4                      | 2                       |
| Therapie „14“ | 14        | 14.4            | 4                      | 2                       |
| Therapie „18“ | 6         | 18.0            | 4                      | 2                       |
| Therapie „21“ | 19        | 21.6            | 4                      | 2                       |
| Therapie „28“ | 9         | 28.8            | 4                      | 2                       |
| <b>Gesamt</b> | <b>78</b> |                 |                        |                         |

KU = Gruppe Kontrolle unbehandelt

KB = Gruppe Kontrolle Bestrahlung

KCB = Gruppe Kontrolle cis-Platin und Bestrahlung

KTB = Gruppe Kontrolle Tirapazamine und Bestrahlung

Therapie „7“ = Tirapazamine 7.2 mg/kg KGW, cis-Platin 4 mg/kg KGW, Bestrahlung 10\*2 Gy

Therapie „14“ = Tirapazamine 14.4 mg/kg KGW, cis-Platin 4 mg/kg KGW, Bestrahlung 10\*2 Gy

Therapie „18“ = Tirapazamine 18.0 mg/kg KGW, cis-Platin 4 mg/kg KGW, Bestrahlung 10\*2 Gy

Therapie „21“ = Tirapazamine 21.6 mg/kg KGW, cis-Platin 4 mg/kg KGW, Bestrahlung 10\*2 Gy

Therapie „28“ = Tirapazamine 28.8 mg/kg KGW, cis-Platin 4 mg/kg KGW, Bestrahlung 10\*2 Gy

## 3.1.5 Statistische Berechnungen und Dokumentation

Die gemessenen Daten zu Körpergewicht und Tumorzvolumen werden zunächst für jedes Tier einzeln und für gleiche Behandlungsgruppen in Tabellen zusammengefasst. Tumorzvolumen und Körpergewicht der Tiere mit gleicher Behandlung werden zusammengefasst und gemittelt. Zusätzlich werden die Standardabweichung, Maxima und Minima berechnet. Die errechneten Werte werden zusätzlich auf den ersten Tag der Behandlung normiert um einen Vergleich der verschiedenen Gruppen zu ermöglichen. Die Ergebnisse werden auf einer logarithmischen Skala graphisch dargestellt.

Die Tumorzvolumen-Verdoppelungszeiten errechnen sich als Differenz zwischen dem Tag eins der Behandlung und dem Tag, an dem der Tumor das doppelte Volumen  $TV_0$  erreicht. Liegt dieser Zeitpunkt noch innerhalb des Therapiezeitraumes, muss darauf geachtet werden, ob im weiteren Verlauf  $2TV_0$  noch einmal unterschritten wird und zu einem späteren Zeitpunkt, nach der Therapie, wieder erreicht wird. In diesem Falle gilt als Tumorverdoppelung der spätere Zeitpunkt.

In der graphischen Darstellung wird der Verlauf des Körpergewichtes und des Tumorzvolumens dargestellt. Für das Körpergewicht wird als Referenzbereich das Intervall 80 bis 100% Körpergewicht gekennzeichnet. Der Tag eins der Behandlung wird markiert. Für das Tumorzvolumen wird das Intervall 100 bis 200% Tumorzvolumen gekennzeichnet. Der Tag eins der Behandlung und  $t_{2V_0}$  werden markiert. Als Referenzgröße wird jedem Tumorzvolumendiagramm die lineare Regressionskurve des Tumorzvolumenverlaufes der Kontrollgruppe „KU“ hinzugefügt.

Eine analytische Statistik erfolgt in dieser Untersuchung nicht. Die zum Teil sehr kleinen Fallzahlen in den einzelnen Untersuchungsgruppen von  $n=3$  lassen keine Ergebnisse erwarten die von Relevanz sind.

## 3.2 Ergebnisse

### 3.2.1 Anzucht der Experimentaltumoren

Für die Anzucht der Experimentaltumoren wird 152 Tieren eine Suspension (25µl [ $1 \cdot 10^6$ ]) RIF-1-Zellen subkutan in den Mittelfußrücken gespritzt. Bei allen 152 Tieren (100%) entstand ein Tumor.

Zum Zeitpunkt  $T_0$  tragen 151 von 152 Tieren (99.34%) einen messbaren Tumor, mit einem durchschnittlichen Volumen von  $161.8 \text{ mm}^3$  (SD  $\pm 102.5$ ;  $0.0 \text{ mm}^3$  min,  $505.5 \text{ mm}^3$  max). Bei einem Tier (156/01, Therapiegruppe „14“) entwickelt sich der Tumor nur sehr langsam, so dass es nicht in die Versuchsreihe aufgenommen wird.

Das Allgemeinbefinden aller tumortragenden Tiere weicht bis zum Beginn der Behandlung ( $T_0$ ) nicht vom Zustand vor Versuchsbeginn ab. Die Motorik und das Verhalten der Tiere unterscheidet sich nicht von den unbehandelten nicht-Tumortragenden Tieren.

### 3.2.2 Metastasierung

Alle 152 Tiere zeigten zum Zeitpunkt der Euthanasie keine makroskopisch wahrnehmbaren Metastasen.

### 3.2.3 Vorversuche

Die Versuchsergebnisse von 74 der 152 verwendeten Tiere dienen zur Dosisfindung für den Hauptversuch. Für cis-Platin zeigt die Dosierung mit 3 mg/kg KGW eine zu geringe und die Dosierung mit 5 mg/kg KGW eine zu starke Wachstumsverzögerung bzw. Letalität. Für den Hauptversuch wird eine Dosierung von 4 mg/kg KGW

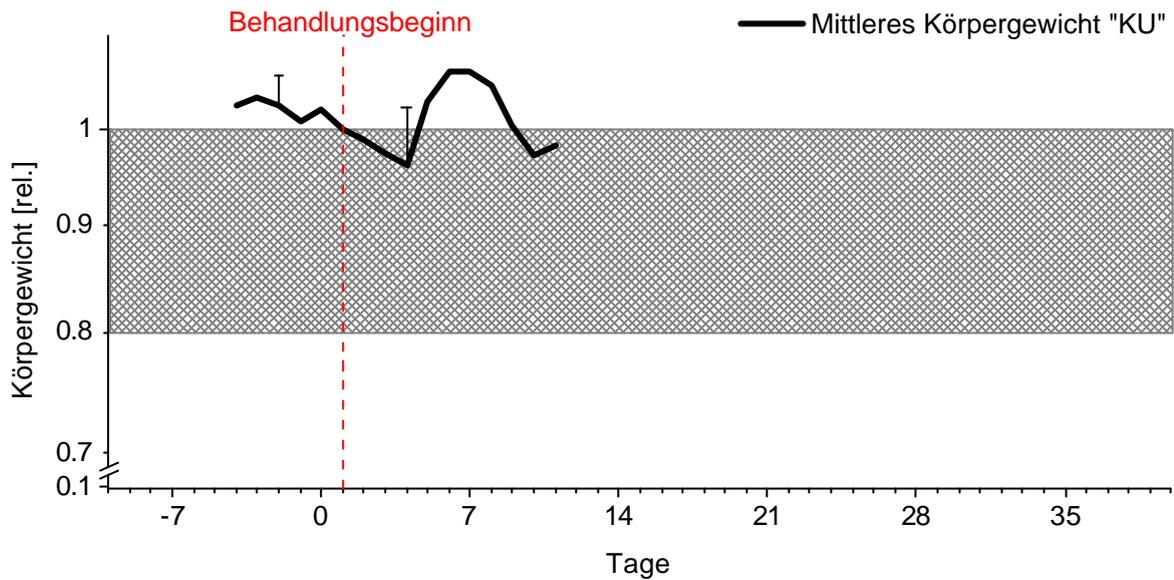
gewählt. Bei der Bestrahlung zeigt sich kein messbarer Unterschied zwischen 10x2 Gy und 10x2.5 Gy. Für den Hauptversuch wird eine Bestrahlungsdosis von 10x2Gy festgelegt. Die Dosierung für Tirapazamine wird für den Hauptversuch mit 7.0, 14.4, 18.0, 21.6 und 28.8 mg/kg KGW festgelegt.

### **3.2.4 Hauptversuche**

#### **3.2.4.1 Kontrollgruppen**

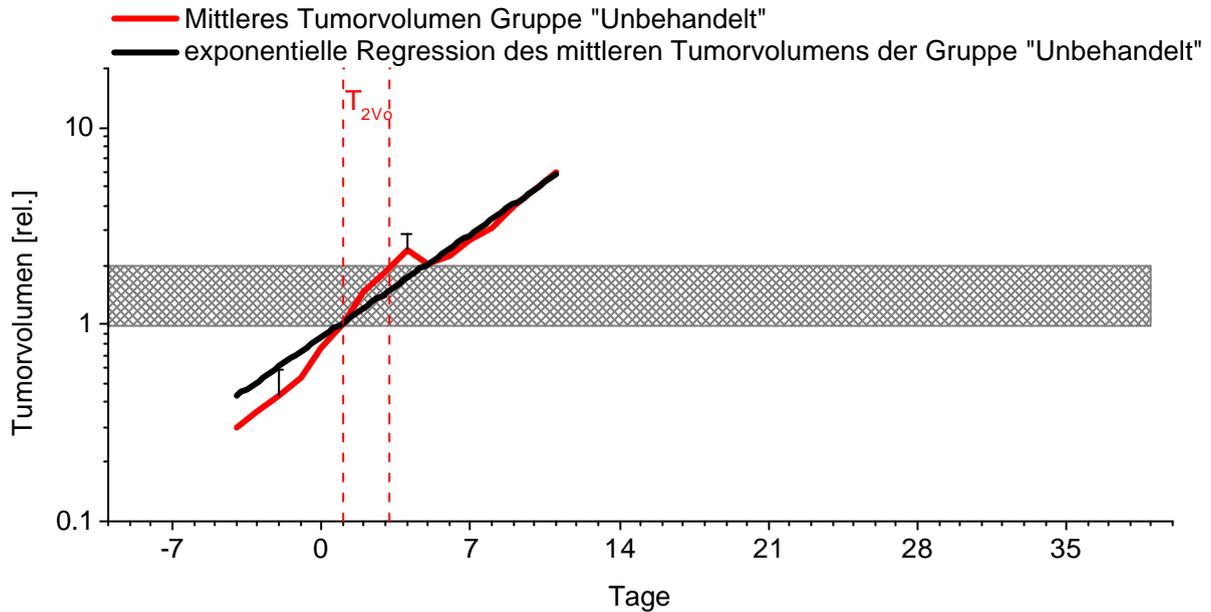
##### **3.2.4.1.1 Unbehandelt (KU)**

Die aus elf Tieren bestehende Kontrollgruppe „KU“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumolvolumen von 274.7mm<sup>3</sup> (SD+/- 99.4) und ein mittleres Gewicht von 24.5 g (SD +/-2.74) auf. Im Verlauf der Behandlung, die von T<sub>0</sub> bis zur Euthanasie der Tiere reicht, weicht das Allgemeinbefinden der Tiere trotz der täglichen Narkose (Dauer 10 min) und der täglichen intraperitonealen Applikation von zwei mal 0.5 ml physiologischer Kochsalzlösung nicht vom Zustand vor Versuchsbeginn ab. Der Gewichtsverlauf liegt zwischen +6.7% und -3.9% vom mittleren Körpergewicht zum Zeitpunkt T<sub>0</sub>. Diese Schwankungen entsprechen der physiologischen Gewichtszunahme und dem Gewichtsverlust der Tiere. Die Gewichtsbestimmungen der Kontrolltiere dienen als Referenz für die Behandlungsgruppen. Zusätzlich wird in der graphischen Darstellung der Körpergewichtsverläufe die Marke „80% Körpergewicht“ dargestellt. Sie markiert die Grenze, ab der die Wahrscheinlichkeit des Todes eines Tieres nach Verlust von 20% seines Körpergewichtes stark ansteigt (siehe Punkt 3.2.5)



**Abbildung 10:** Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KU“.

Der Wachstumsverlauf der unbehandelten Tumoren zeigt ohne Chemo- oder Strahlentherapie eine Verdoppelung des initialen Tumolvolumens im Mittel nach 3.18 Tagen (SD +/-0.94; 2d min, 5d max). Alle Tiere außer der Nr. 1636/01 wurden am 3. bzw. 4. Tag nach Behandlungsbeginn euthanasiert. Die Maus Nr. 1636/01 wurde am 12. Tag nach Behandlungsbeginn euthanasiert. Der Wachstumsverlauf wird zur besseren Darstellung an eine exponentielle Regressionskurve angepasst und dient als Referenz für alle Versuchgruppen. In der logarithmischen Darstellung stellt sich diese Kurve als Gerade dar.



**Abbildung 11:** Mittleres Tumorzusammenfassung der Kontrollgruppe „KU“ mit Darstellung der exponentiellen Regressionskurve des mittleren Tumorzusammenfassung der Kontrollgruppe „KU“.

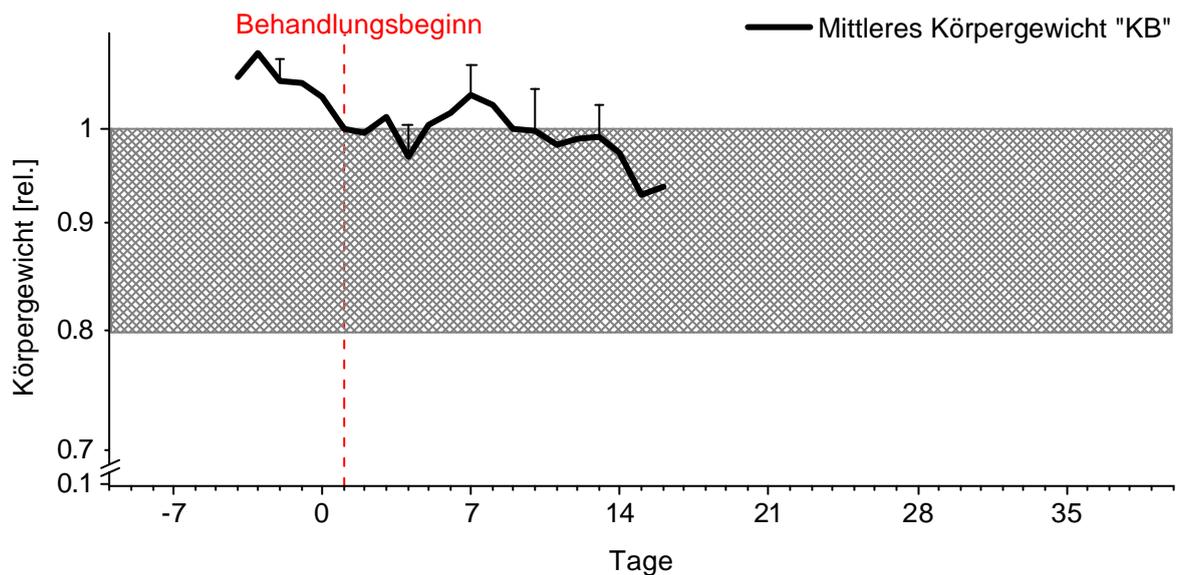
**Tabelle 4** Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe „KU“.

| VGr. | Id-Nr.  | $t_{2V_0}$                                    | $TV_0$                               | $KGW_0$               | $KGW_{min}$            | L        |
|------|---------|---|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| „KU“ | 1952/00 | 3 d   | 238.5 mm <sup>3</sup>                | 24.0 g                | 22.0 g                 | 0        |
|      | 1951/00 | 2 d   | 223.4 mm <sup>3</sup>                | 26.5 g                | 25.0 g                 | 0        |
|      | 1950/00 | 3 d   | 360.0 mm <sup>3</sup>                | 28.0 g                | 26.0 g                 | 0        |
|      | 1948/00 | 2 d   | 222.6 mm <sup>3</sup>                | 29.0 g                | 25.0 g                 | 0        |
|      | 1949/00 | 2 d   | 284.6 mm <sup>3</sup>                | 26.0 g                | 23.0 g                 | 0        |
|      | 1947/00 | 3 d   | 299.2 mm <sup>3</sup>                | 27.0 g                | 25.0 g                 | 0        |
|      | 1634/01 | 3 d   | 309.6 mm <sup>3</sup>                | 22.3 g                | 22.0 g                 | 0        |
|      | 1635/01 | 4 d   | 293.8 mm <sup>3</sup>                | 20.7 g                | 20.7 g                 | 0        |
|      | 1636/01 | 5 d   | 96.4 mm <sup>3</sup>                 | 22.3 g                | 21.7 g                 | 0        |
|      | 1632/01 | 4 d   | 188.4 mm <sup>3</sup>                | 22.3 g                | 21.7 g                 | 0        |
|      | 1633/01 | 4 d   | 505.5 mm <sup>3</sup>                | 21.6 g                | 21.6 g                 | 0        |
|      |         | 3.18d<br>(SD +/-0.94;<br>2d Min.; 5d<br>Max.) | 274.7mm <sup>3</sup><br>(SD +/-99.4) | 24.5g<br>(SD +/-2.74) | 23.06g<br>(SD +/-1.75) | 0 von 11 |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2V_0}$ : Tumorzusammenfassung-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumorzusammenfassung  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

**3.2.4.1.2 Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (KB)**

Diese aus fünf Tieren bestehende Kontrollgruppe „KB“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumolvolumen von 213.5mm<sup>3</sup> (SD +/- 110.6) und ein mittleres Körpergewicht (KGW) von 21.6g (SD +/-1.33) auf. Im Verlauf der Therapie zeigt sich ein Körpergewichtsverlust von maximal 7.1%. Die Narkose und die strahlentherapeutische Behandlung haben keinen Einfluss auf das Allgemeinbefinden und das Verhalten der Tiere. Der Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt bei alleiniger strahlentherapeutischer Behandlung eine Verdoppelung des initialen Tumolvolumens im Mittel nach 4.6 Tagen (SD +/-0.49; 4d min, 5d max).



**Abbildung 12:** Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KB“.

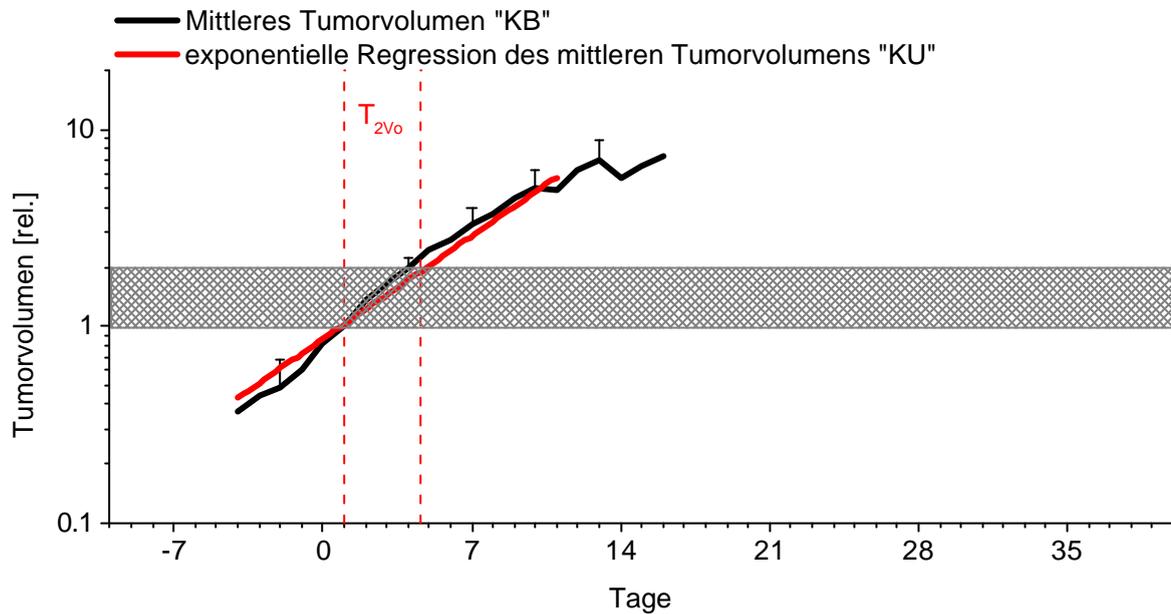


Abbildung 13: Mittleres Tumorzvolumen der Kontrollgruppe „KB“.

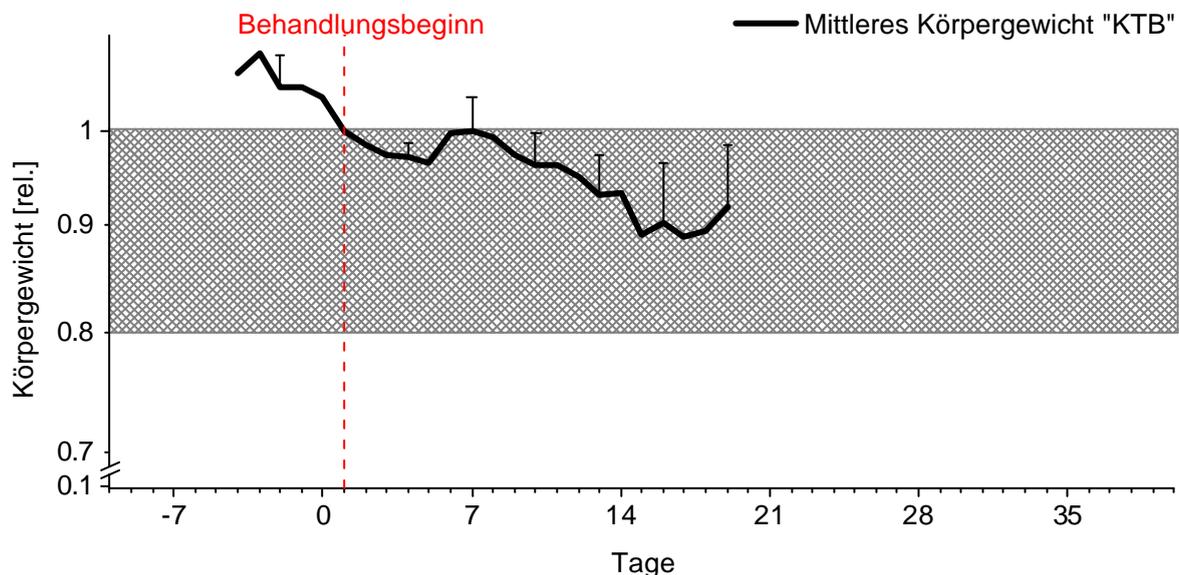
Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe „KB“

| VGr. | Id-Nr.  | $t_{2V_0}$ | $TV_0$                                     | $KGW_0$                               | $KGW_{min}$           | L                      |
|------|---------|------------|--|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| "KB" | 1629/01 | 4 d        | 358.8 mm <sup>3</sup>                      | 19.9 g                                | 18.4 g                | 0                      |
|      | 1630/01 | 4 d        | 322.3 mm <sup>3</sup>                      | 21.5 g                                | 20.8 g                | 0                      |
|      | 1631/01 | 5 d        | 87.6 mm <sup>3</sup>                       | 22.6 g                                | 21.0 g                | 0                      |
|      | 1637/01 | 5 d        | 103.9 mm <sup>3</sup>                      | 23.6 g                                | 22.1 g                | 0                      |
|      | 1638/01 | 5 d        | 194.9 mm <sup>3</sup>                      | 20.6 g                                | 20.6 g                | 0                      |
|      |         |            | 4.6d<br>(SD +/-0.49;<br>4d min; 5d<br>max) | 213.5mm <sup>3</sup><br>(SD +/-110.6) | 21.6g<br>(SD +/-1.33) | 20.58g<br>(SD +/-1.21) |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2V_0}$ : Tumorzvolumen-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumorzvolumen  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

**3.2.4.1.3 TPZ (21.6mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (KTB)**

Die aus fünf Tieren bestehende Kontrollgruppe „KTB“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumervolumen von 216.0mm<sup>3</sup> (SD +/- 65.8) und ein mittleres Gewicht von 27.5g (SD +/-2.92) auf. Im Verlauf der Therapie verlieren die Tiere maximal 11.2% ihres Körpergewichtes. Im Verlauf der täglichen Narkose, der strahlentherapeutischen Behandlung und der intraperitonealen Applikation von Tirapazamine verändert sich das Allgemeinbefinden. Die Tiere zeigen eine leichte Abnahme ihrer Aktivität innerhalb der ersten 4 Stunden nach der kombinierten Strahlen- und Chemotherapie, die nach dieser Zeitspanne wieder in ein wachsameres und aktives Verhalten übergeht. An den Behandlungstagen mit alleiniger Strahlentherapie gleicht das Allgemeinbefinden und das Verhalten den Tieren aus Gruppe „KB“. Die Tumorverdoppelungszeit nach Applikation von Tirapazamine in Kombination mit Strahlentherapie beträgt im Mittel 9.8 Tage (SD +/-2.71; 7d min, 14d max).



**Abbildung 14:** Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KTB“

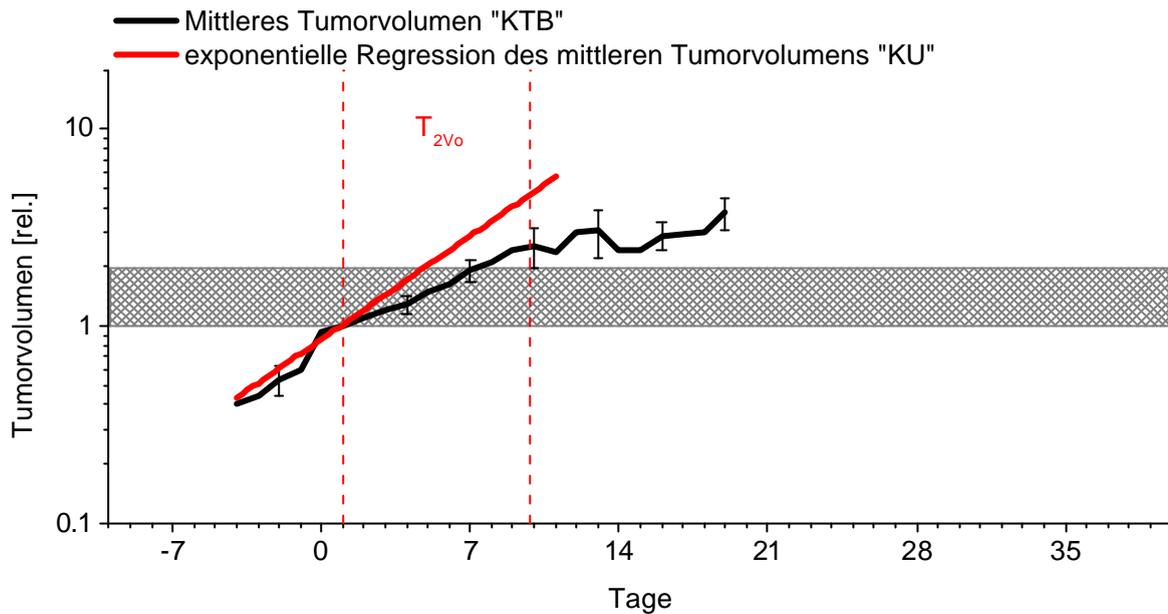


Abbildung 15: Mittleres Tumorzvolumen der Kontrollgruppe „KTB“.

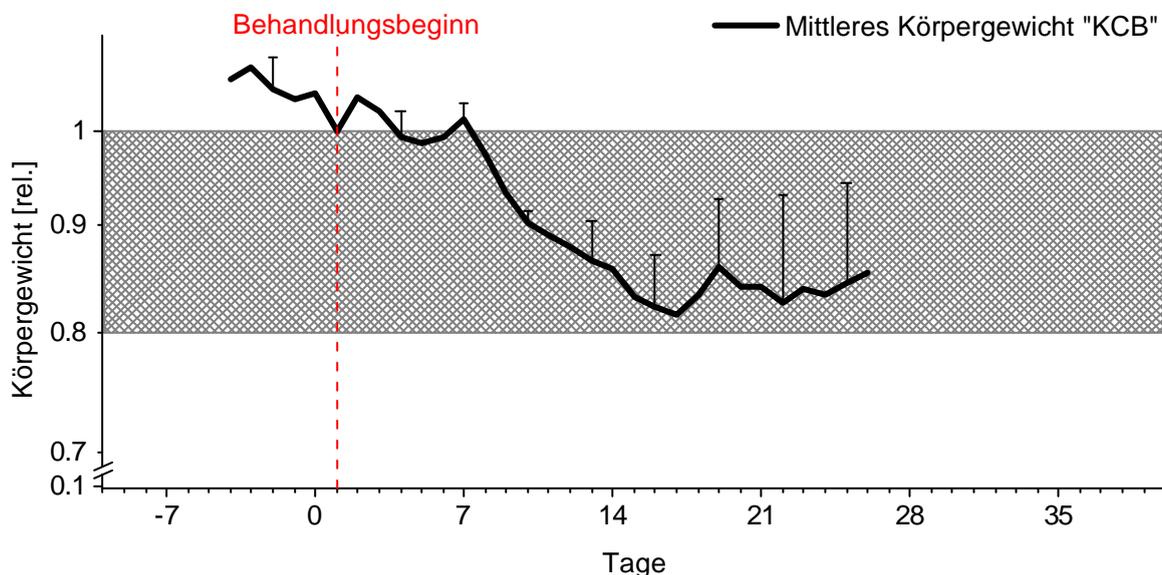
Tabelle 6: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe „KTB“

| VGr.  | Id-Nr. | $t_{2v_0}$ | $TV_0$                                      | $KGW_0$                              | $KGW_{min}$           | L                      |
|-------|--------|------------|---|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| "KTB" | 171/01 | 8 d        | 195.4 mm <sup>3</sup>                       | 32.3 g                               | 30.1 g                | 0                      |
|       | 172/01 | 14 d       | 225.1 mm <sup>3</sup>                       | 26.5 g                               | 22.0 g                | 0                      |
|       | 173/01 | 7 d        | 213.2 mm <sup>3</sup>                       | 24.8 g                               | 23.3 g                | 0                      |
|       | 174/01 | 12 d       | 120.8 mm <sup>3</sup>                       | 24.6 g                               | 23.3 g                | 0                      |
|       | 175/01 | 8 d        | 325.7 mm <sup>3</sup>                       | 29.2 g                               | 26.6 g                | 0                      |
|       |        |            | 9.8d<br>(SD +/-2.71;<br>7d min; 14d<br>max) | 216,0mm <sup>3</sup><br>(SD +/-65,8) | 27,5g<br>(SD +/-2,92) | 25.06g<br>(SD +/-2.94) |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2v_0}$ : Tumorzvolumen-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumorzvolumen  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

**3.2.4.1.4 cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (KCB)**

Die Behandlungsgruppe „KCB“ setzt sich aus fünf Tieren zusammen. Das mittlere Tumervolumen am ersten Behandlungstag beträgt 179.5mm<sup>3</sup> (SD +/- 101.8) und weist ein mittleres Gewicht von 27.7g (SD +/-2.06) auf. Das Körpergewicht nimmt im Verlauf der Therapie maximal 18.5% ab. Innerhalb der ersten 4 Stunden nach der kombinierten Strahlen- und Chemotherapie zeigen die Tiere ein leicht gedämpftes Verhalten, das nach dieser Zeitspanne wieder in ein wachsaues und aktives Verhalten übergeht. An den Tagen mit alleiniger Strahlentherapie gleicht das Allgemeinbefinden und das Verhalten dem der Tiere aus Gruppe „KB“. Der Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt nach Applikation von cis-Platin in Kombination mit einer strahlentherapeutischen Behandlung eine Verdoppelung des initialen Tumervolumens, im Mittel nach 18.6 Tagen (SD +/-2.0; 18d min, 22d max).



**Abbildung 16:** Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KCB“.

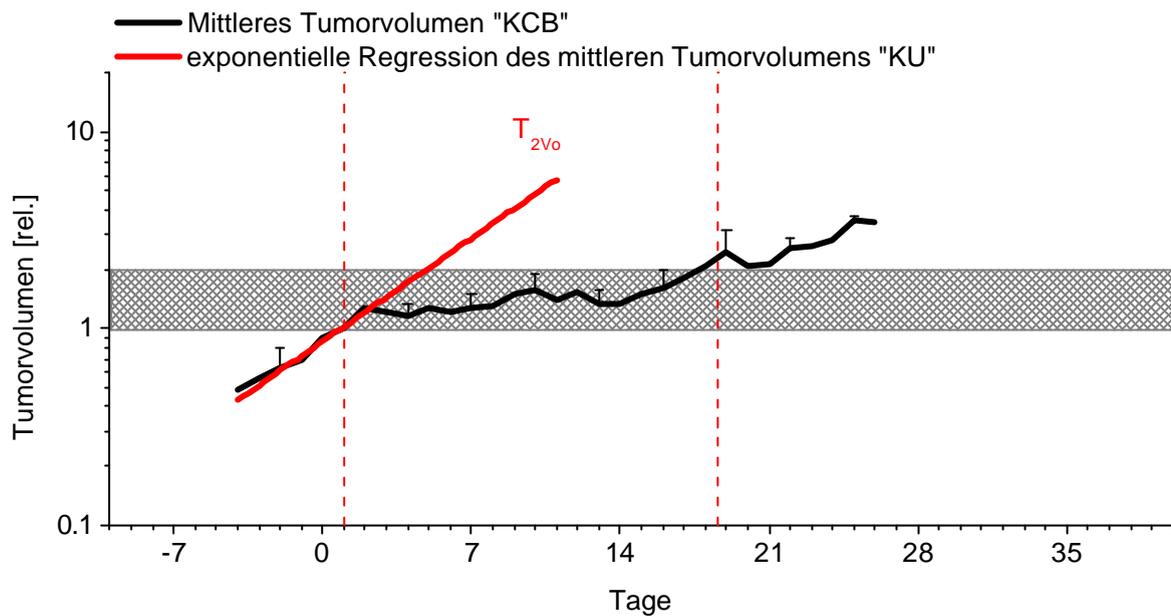


Abbildung 17: Mittleres Tumorzellen der Kontrollgruppe „KCB“.

Tabelle 7: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe „KCB“

| VGr.  | Id-Nr. | $t_{2Vo}$ | $TV_0$                                       | $KGW_0$                               | $KGW_{min}$           | L                      |
|-------|--------|-----------|--|---------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| "KCB" | 176/01 | 18 d      | 195.9 mm <sup>3</sup>                        | 25.9 g                                | 21.0 g                | 0                      |
|       | 177/01 | 18 d      | 206.0 mm <sup>3</sup>                        | 29.0 g                                | 23.2 g                | 0                      |
|       | 178/01 | 18 d      | 344.6 mm <sup>3</sup>                        | 25.0 g                                | 21.9 g                | 0                      |
|       | 179/01 | 22 d      | 44.1 mm <sup>3</sup>                         | 30.7 g                                | 22.1 g                | 0                      |
|       | 181/01 | 19 d      | 106.9 mm <sup>3</sup>                        | 27.8 g                                | 23.7 g                | 0                      |
|       |        |           | 18.6d<br>(SD +/-2.0;<br>18d min; 22d<br>max) | 179.5mm <sup>3</sup><br>(SD +/-101.8) | 27.7g<br>(SD +/-2.06) | 22.05g<br>(SD +/-0.78) |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2Vo}$ : Tumorzellen-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumorzellen-Volumen  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

## **3.2.4.2 Therapiegruppen**

### **3.2.4.2.1 TPZ (7.2mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (7)**

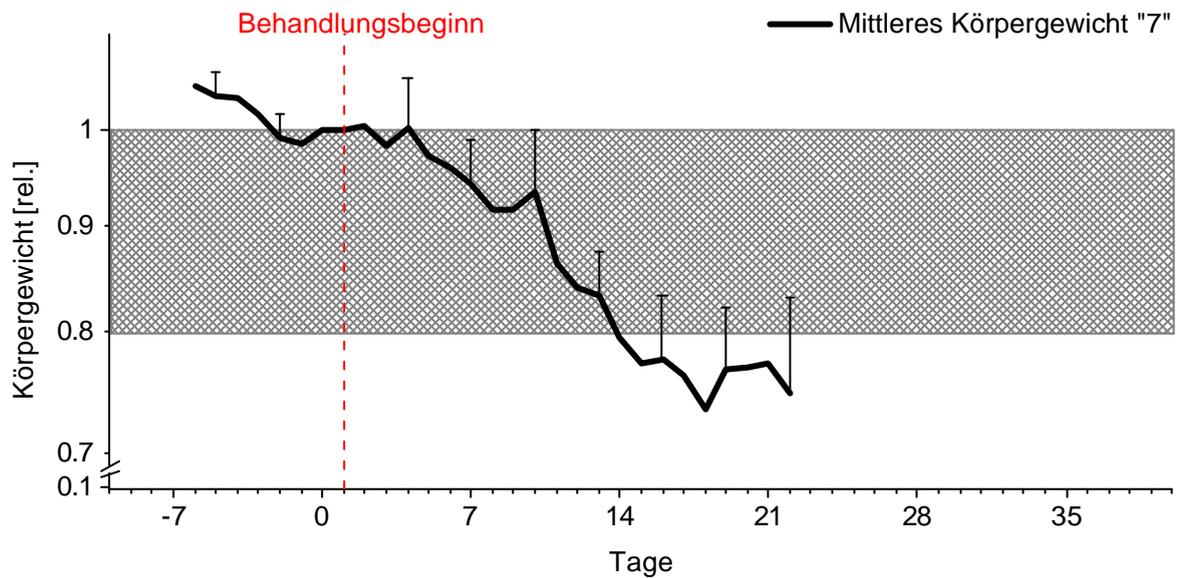
Die aus vier Tieren bestehende Therapiegruppe „7“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumolvolumen von  $149.9\text{mm}^3$  (SD +/- 61.9) und ein mittleres Gewicht von 25.3g (SD +/-0.87) auf. Der Gewichtsverlauf zeigt einen Gewichtsverlust im Verlauf der Therapie von maximal 26.5%.

Durch die wiederholte Narkose zur Durchführung der strahlentherapeutischen Behandlung und der intraperitonealen Applikation von Tirapazamine und cis-Platin verändert sich das Allgemeinbefinden der Tiere. Im Laufe der zweiwöchigen kombinierten Strahlen- und Chemotherapie zeigen die Tiere eine kontinuierliche Abnahme des Lauf-, Putz- und Nestbautriebes. An den Tagen mit alleiniger Strahlentherapie (siehe Punkt 3.1.4.2) kann eine teilweise Erholung des Allgemeinbefindens und des Verhaltens beobachtet werden. Im Verlauf der Therapie zeigen die Tiere eine zunehmende Piloerektion. Dies gilt für alle Tiere, die das kombinierte Behandlungsschema mit Strahlentherapie, cis-Platin und Tirapazamine durchlaufen, unabhängig von der Höhe der Tirapazaminedosierung (siehe Tabelle 9).

Die Tiere, die am Ende des Versuches den Zielwert der Tumolvolumenverdoppelung erreichen, zeigen vier bis fünf Tage nach der Therapie eine Erholung des Allgemeinbefindens und Verhaltens auf Werte wie am ersten Behandlungstag. Der Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt nach Applikation von Tirapazamine in Kombination mit cis-Platin und einer strahlentherapeutischen Behandlung eine Verdoppelung des initialen Tumolvolumens im Mittel nach 8.25 Tagen (SD +/-6.18; 0d min, 16d max). Ein Tier (Letalität = 1 von 4) stirbt, bevor es die Zielgröße der Tumorverdoppelung erreichen konnte.

**Tabelle 8:** Übersicht des Allgemeinbefindens und Verhaltensmerkmale der Gruppen mit kombinierter Radiochemotherapie mit Tirapazamine und cis-Platin und Dauer der Erholungsphase nach Behandlungsende.

| Gruppe                                  | „7“  | „14“ | „18“ | „21“ | „28“ |
|---|------|------|------|------|------|
| Allgemeinbefinden                       | -    | -    | -    | --   | --   |
| Piloerektion                            | +    | +    | +    | +    | +    |
| Lauftrieb                               | -    | -    | -    | --   | --   |
| Putztrieb                               | -    | -    | -    | --   | --   |
| Nestbautrieb                            | -    | -    | -    | --   | --   |
| Dauer der Erholung nach Behandlungsende | 4-5d | 5-6d | 5-6d | 7-8d | 8-9d |



**Abbildung 18:** Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „7“.

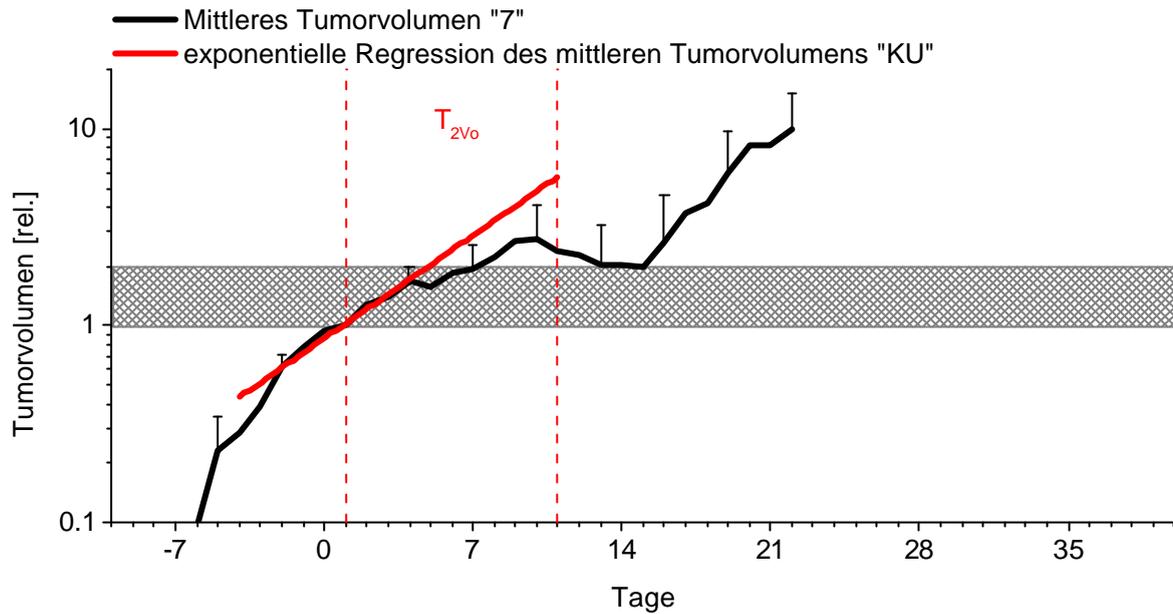


Abbildung 19: Mittleres Tumorvolumen der Therapiegruppe „7“.

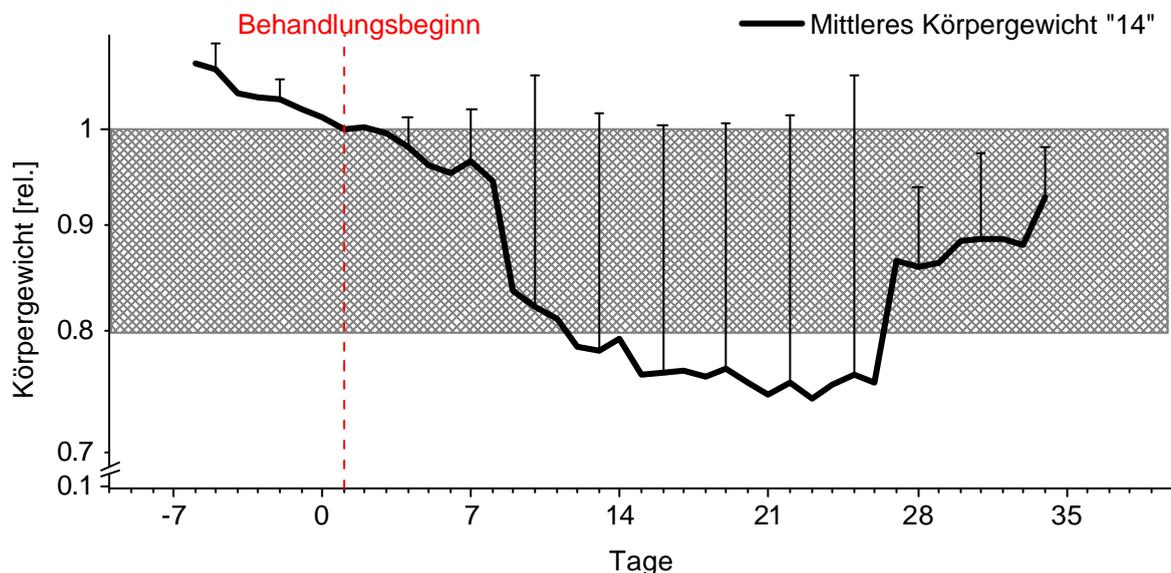
Tabelle 9: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe „7“

| VGr. | Id-Nr.  | $t_{2Vo}$                                  | $TV_0$                               | $KGW_0$               | $KGW_{min}$            | L       |
|------|---------|--|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|---------|
| „7“  | 1299/99 | 16 d                                       | 130.9 mm <sup>3</sup>                | 25.7 g                | 19.9 g                 | 0       |
|      | 1300/99 | †  | 188.5 mm <sup>3</sup>                | 23.8 g                | 16.1 g                 | †       |
|      | 1301/99 | 12 d                                       | 221.7 mm <sup>3</sup>                | 25.4 g                | 16.9 g                 | 0       |
|      | 1302/99 | 5 d  | 58.6 mm <sup>3</sup>                 | 26.1 g                | 21.2 g                 | 0       |
|      |         | 11d<br>(SD +/-4,54;<br>5d min; 16d<br>max) | 149.9mm <sup>3</sup><br>(SD +/-61.9) | 25.3g<br>(SD +/-0.87) | 18.53g<br>(SD +/-2.10) | 1 von 4 |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2Vo}$ : Tumorvolumen-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumor-Volumen  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

**3.2.4.2.2 TPZ (14.4mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (14)**

Die aus vierzehn Tieren bestehende Therapiegruppe „14“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumolvolumen von 150.8mm<sup>3</sup> (SD +/- 69.5) und ein mittleres Gewicht von 25.7g (SD +/-2.66) auf. Im Verlauf der Therapie verlieren die Tiere maximal 25.7% ihres Körpergewichtes. Das Allgemeinbefinden und das Verhalten der Tiere verändert sich wie unter Punkt 3.2.4.2.1 beschrieben (siehe Tab. 8). Die Tiere, die am Ende des Versuches den Zielwert der Tumolvolumenverdoppelung erreichen, zeigen fünf bis sechs Tage nach der Therapie eine Erholung des Allgemeinbefindens und des Verhaltens auf Werte wie am ersten Behandlungstag. Der Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt eine Wachstumsverzögerung von 13.29 Tagen (SD +/-9.92; 0d min, 31d max). Vier Tiere (4 von 14) versterben vor der Verdoppelung des Tumolvolumens.



**Abbildung 20:** Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „14“.

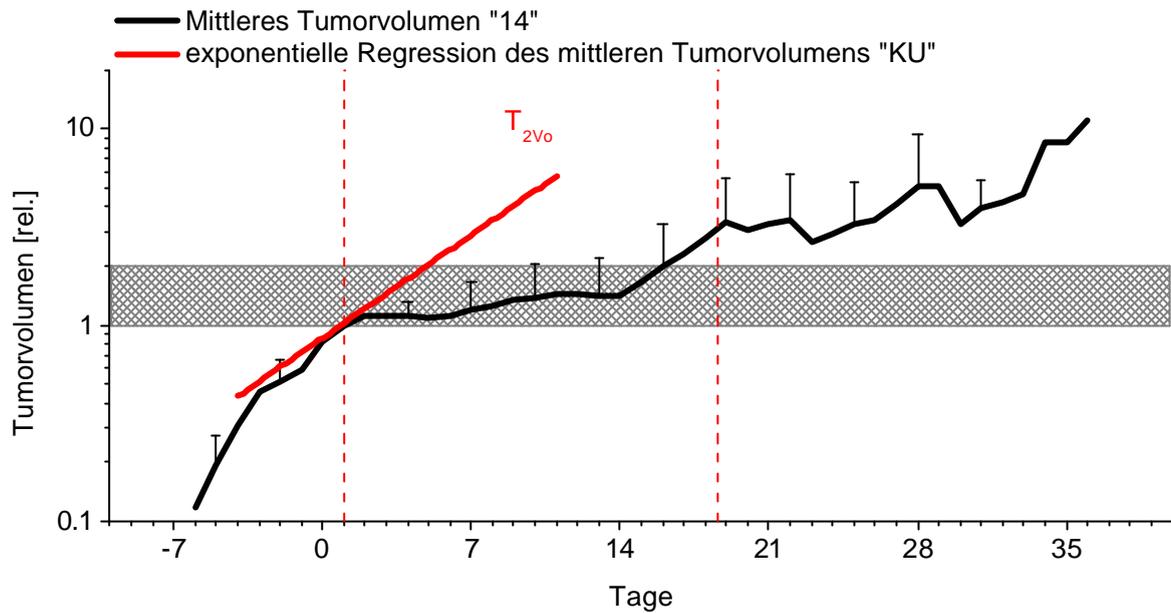


Abbildung 21: Mittleres Tumorzvolumen der Therapiegruppe „14“.

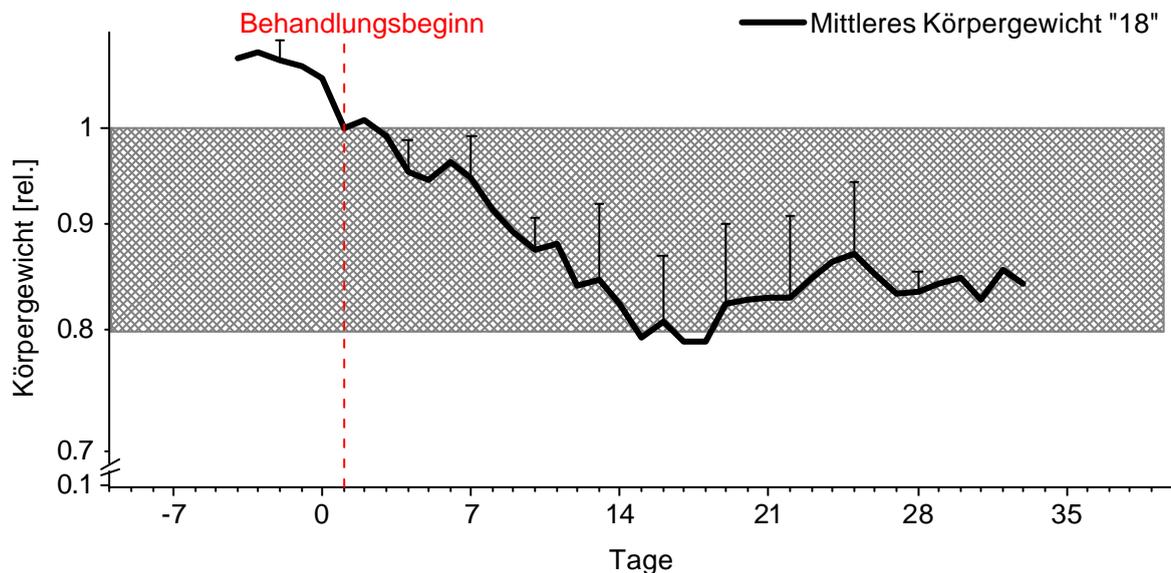
Tabelle 10: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe „14“

| VGr. | Id-Nr.  | $t_{2v_0}$ | $TV_0$                                 | $KGW_0$                              | $KGW_{min}$           | L                      |
|------|---------|------------|--|--------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| "14" | 1295/99 | †          | 66.0 mm <sup>3</sup>                   | 25.3 g                               | 18.4 g                | †                      |
|      | 1296/99 | 16 d       | 219.9 mm <sup>3</sup>                  | 22.3 g                               | 18.4 g                | 0                      |
|      | 1297/99 | 14 d       | 133.5 mm <sup>3</sup>                  | 21.9 g                               | 18.6 g                | 0                      |
|      | 1298/99 | 14 d       | 130.9 mm <sup>3</sup>                  | 22.9 g                               | 17.5 g                | 0                      |
|      | 751/00  | †          | 0.0 mm <sup>3</sup>                    | 25.0 g                               | 24.0 g                | †                      |
|      | 753/00  | 9 d        | 111.9 mm <sup>3</sup>                  | 25.0 g                               | 20.0 g                | 0                      |
|      | 754/00  | 17 d       | 58.6 mm <sup>3</sup>                   | 25.0 g                               | 20.5 g                | 0                      |
|      | 755/00  | 15 d       | 47.6 mm <sup>3</sup>                   | 24.0 g                               | 20.0 g                | 0                      |
|      | 153/01  | 26 d       | 141.8 mm <sup>3</sup>                  | 27.5 g                               | 21.2 g                | 0                      |
|      | 154/01  | †          | 120.5 mm <sup>3</sup>                  | 32.2 g                               | 22.4 g                | †                      |
|      | 182/01  | 21 d       | 221.0 mm <sup>3</sup>                  | 26.3 g                               | 20.4 g                | 0                      |
|      | 156/01  | †          | 260.0 mm <sup>3</sup>                  | 26.2 g                               | 24.0 g                | †                      |
|      | 157/01  | 23 d       | 202.5 mm <sup>3</sup>                  | 27.6 g                               | 21.3 g                | 0                      |
|      | 158/01  | 31 d       | 245.6 mm <sup>3</sup>                  | 29.0 g                               | 20.0 g                | 0                      |
|      |         |            | 18.6d<br>(SD +/-6,24; 9d min; 31d max) | 150.8mm <sup>3</sup><br>(SD +/-69.5) | 25.7g<br>(SD +/-2.66) | 20.48g<br>(SD +/-1.92) |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2v_0}$ : Tumorzvolumen-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumorzvolumen  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

**3.2.4.2.3 TPZ (18.0mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (18)**

Die aus sechs Tieren bestehende Therapiegruppe „18“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumolvolumen von 194.3mm<sup>3</sup> (SD +/- 80.8) und ein mittleres Körpergewicht von 26.7g (SD +/-2.22) auf. Im Verlauf der Therapie verlieren die Tiere maximal 21.0% ihres Körpergewichtes. Das Allgemeinbefinden und das Verhalten der Tiere verändert sich wie unter Punkt 3.2.4.2.1 beschrieben (siehe Tab. 8). Die Tiere, die am Ende des Versuches den Zielwert der Tumorumfangverdoppelung erreichen, zeigen fünf bis sechs Tage nach der Therapie eine Erholung des Allgemeinbefindens und des Verhaltens auf Werte wie am ersten Behandlungstag. Der Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt nach Applikation von Tirapazamine in Kombination mit cis-Platin und einer strahlentherapeutischen Behandlung eine Verdoppelung des initialen Tumorumfangs im Mittel nach 20.17 Tagen (SD +/-9.96; 0d min, 32d max). Die Letalität in der Gruppe beträgt 1 von 6 Tieren.



**Abbildung 22:** Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „18“.

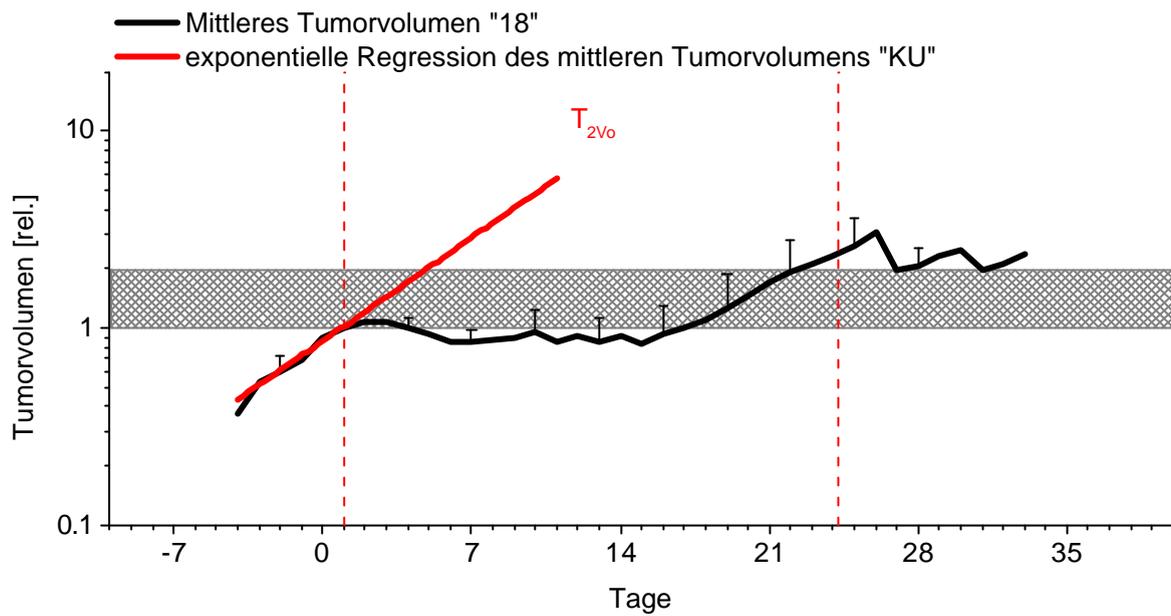


Abbildung 23: Mittleres Tumorzellen der Therapiegruppe „18“.

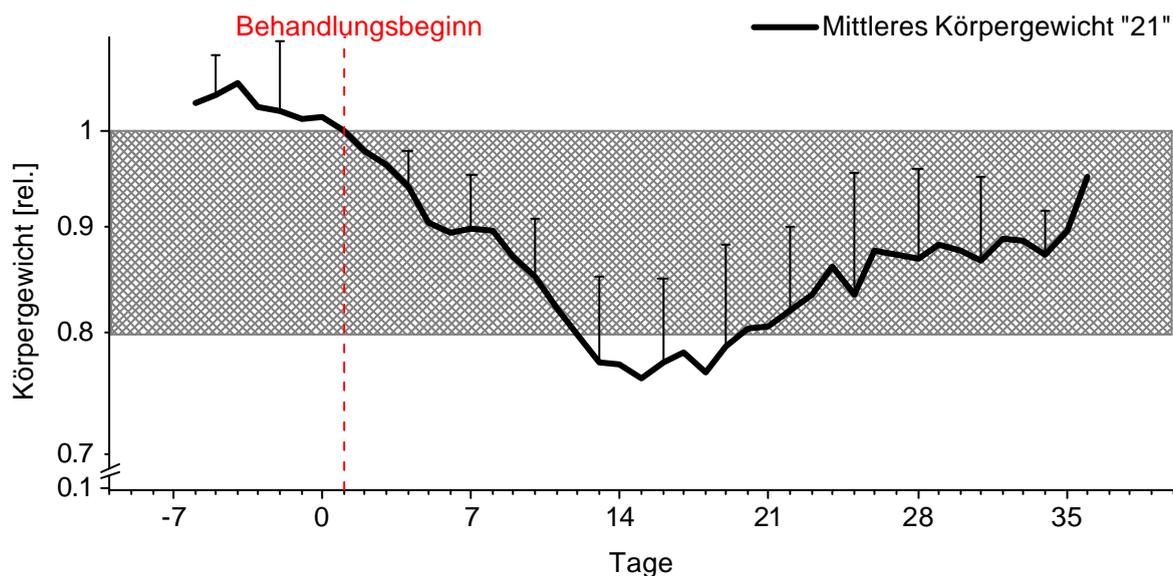
Tabelle 11: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe „18“

| VGr. | Id-Nr. | $t_{2v_0}$ | $TV_0$                                     | $KGW_0$                              | $KGW_{min}$               | L                      |
|------|--------|------------|--|--------------------------------------|---------------------------|------------------------|
| "18" | 159/01 | 25 d       | 141.1 mm <sup>3</sup>                      | 27.9 g                               | 20.4 g                    | 0                      |
|      | 160/01 | †          | 75.8 mm <sup>3</sup>                       | 26.4 g                               | 19.0 g                    | †                      |
|      | 161/01 | 19 d       | 218.5 mm <sup>3</sup>                      | 25.2 g                               | 21.4 g                    | 0                      |
|      | 162/01 | 25 d       | 272.1 mm <sup>3</sup>                      | 22.9 g                               | 16.6 g                    | 0                      |
|      | 163/01 | 32 d       | 310.4 mm <sup>3</sup>                      | 29.6 g                               | 20.1 g                    | 0                      |
|      | 164/01 | 20 d       | 148.0 mm <sup>3</sup>                      | 28.4 g                               | 23.8 g                    | 0                      |
|      |        |            | 24,2d<br>(SD +/-4,62; 19d<br>min; 32d max) | 194.3mm <sup>3</sup><br>(SD +/-80.8) | 26.7g<br>(SD +/-<br>2.22) | 20.22g<br>(SD +/-2.19) |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2v_0}$ : Tumorzellen-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumorzellen-Volumen  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

**3.2.4.2.4 TPZ (21.6mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (21)**

Die aus neunzehn Tieren bestehende Therapiegruppe „21“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumervolumen von 123.4mm<sup>3</sup> (SD +/- 77.7) und ein mittleres Gewicht von 26.2g (SD +/-2.89) auf. Im Verlauf der Therapie verlieren die Tiere maximal 23.9% ihres Körpergewichtes. Das Allgemeinbefinden und das Verhalten der Tiere verändert sich wie unter Punkt 3.2.4.2.1 beschrieben (siehe Tab. 8). Die Tiere, die am Ende des Versuches den Zielwert der Tumervolumenverdoppelung erreichen, zeigen sieben bis acht Tage nach der Therapie eine Erholung des Allgemeinbefindens und Verhaltens auf Werte wie am ersten Behandlungstag. Der Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt nach Applikation von Tirapazamine in Kombination mit cis-Platin und einer strahlentherapeutischen Behandlung eine Verdoppelung des initialen Tumervolumens im Mittel nach 15.05 Tagen (SD +/-12.75; 0d min, 40d max). Die Letalität in dieser Gruppe beträgt 6 von 19 Tieren.



**Abbildung 24:** Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „21“.

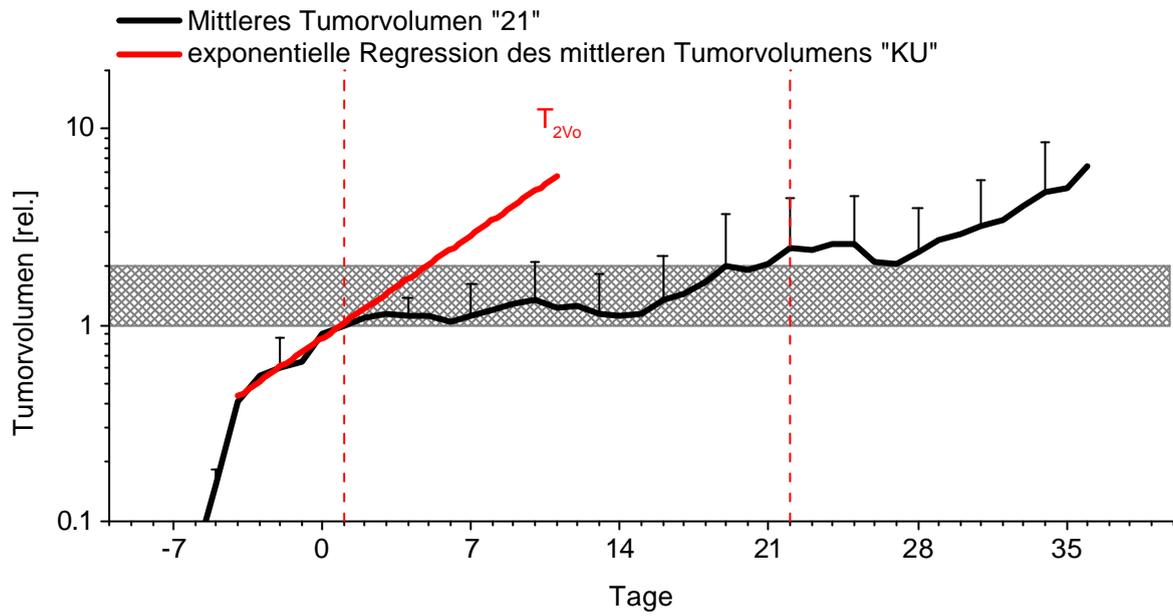


Abbildung 25: Mittleres Tumorstadium der Therapiegruppe „21“.

**Tabelle 12:** Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe „21“

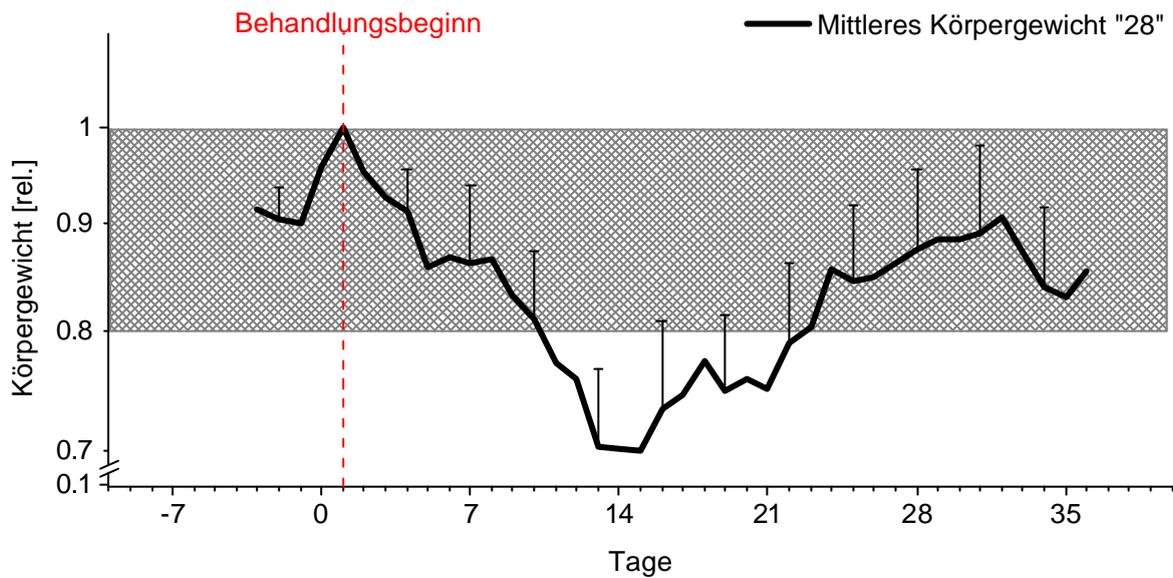
| VGr. | Id-Nr.  | t <sub>2v0</sub> | TV <sub>0</sub>                           | KGW <sub>0</sub>                         | KGW <sub>min</sub>    | L                      |
|------|---------|------------------|---|--|-----------------------|------------------------|
| "21" | 1303/99 | 6 d              | 75.4 mm <sup>3</sup>                      | 28.0 g                                   | 16.5 g                | 0                      |
|      | 1304/99 | 15 d             | 155.5 mm <sup>3</sup>                     | 26.0 g                                   | 15.9 g                | 0                      |
|      | 1305/99 | 19 d             | 346.4 mm <sup>3</sup>                     | 24.8 g                                   | 18.3 g                | 0                      |
|      | 1306/99 | 15 d             | 75.4 mm <sup>3</sup>                      | 23.2 g                                   | 16.6 g                | 0                      |
|      | 755/00  | 28 d             | 70.1 mm <sup>3</sup>                      | 24.0 g                                   | 18.5 g                | 0                      |
|      | 756/00  | 40 d             | 51.3 mm <sup>3</sup>                      | 25.0 g                                   | 20.5 g                | 0                      |
|      | 757/00  | 19 d             | 51.3 mm <sup>3</sup>                      | 23.0 g                                   | 20.0 g                | 0                      |
|      | 758/00  | 9 d              | 157.1 mm <sup>3</sup>                     | 24.0 g                                   | 19.5 g                | 0                      |
|      | 1913/00 | 29 d             | 98.6 mm <sup>3</sup>                      | 25.0 g                                   | 17.0 g                | 0                      |
|      | 1914/00 | †                | 41.3 mm <sup>3</sup>                      | 23.5 g                                   | 14.5 g                | †                      |
|      | 1915/00 | †                | 111.0 mm <sup>3</sup>                     | 27.0 g                                   | 15.0 g                | †                      |
|      | 1916/00 | 24 d             | 100.3 mm <sup>3</sup>                     | 22.0 g                                   | 16.0 g                | 0                      |
|      | 1917/00 | †                | 211.0 mm <sup>3</sup>                     | 27.0 g                                   | 16.0 g                | †                      |
|      | 165/01  | †                | 68.6 mm <sup>3</sup>                      | 34.2 g                                   | 21.3 g                | †                      |
|      | 166/01  | 21 d             | 92.7 mm <sup>3</sup>                      | 26.6 g                                   | 22.7 g                | 0                      |
|      | 167/01  | 31 d             | 84.5 mm <sup>3</sup>                      | 27.9 g                                   | 20.5 g                | 0                      |
|      | 168/01  | 30 d             | 168.8 mm <sup>3</sup>                     | 26.0 g                                   | 18.4 g                | 0                      |
|      | 169/01  | †                | 114.1 mm <sup>3</sup>                     | 30.7 g                                   | 19.4 g                | †                      |
|      | 170/01  | †                | 270.6 mm <sup>3</sup>                     | 29.0 g                                   | 20.4 g                | †                      |
|      |         |                  | 22.0d<br>(SD +/-9.19; 6d<br>min; 40d max) | 123.4mm <sup>3</sup><br>(SD +/-<br>77.7) | 26.2g<br>(SD +/-2.89) | 18.26g<br>(SD +/-2.27) |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer, t<sub>2v0</sub>: Tumorvolumen-Verdoppelungs-Zeit, TV<sub>0</sub>: Tumor-Volumen t<sub>0</sub>, KGW<sub>0</sub>: Körpergewicht t<sub>0</sub>, KGW<sub>min</sub>: kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

### **3.2.4.2.5 TPZ (28.8mg/kg KGW), cis-Platin (4mg/kg KGW) und Bestrahlung (10x2Gy Einzeldosis) (28)**

Die aus neun Tieren bestehende Therapiegruppe „28“ weist am ersten Behandlungstag ein mittleres Tumorvolumen von 53.9mm<sup>3</sup> (SD +/- 27.1) und ein mittleres Gewicht von 27.4g (SD +/-3.34) auf. Im Verlauf der Therapie verlieren die Tiere maximal 30.1% ihres Körpergewichtes. Das Allgemeinbefinden und das Verhalten der Tiere verändert sich wie unter Punkt 3.2.4.2.1 beschrieben (siehe Tab. 8). Die Tiere, die am Ende des Versuches den Zielwert der Tumorvolumenverdoppelung erreichen, zeigen acht bis neun Tage nach der Therapie eine Erholung des Allgemeinbefinden und Verhaltens auf Werte wie am

ersten Behandlungstag. Der Wachstumsverlauf der Tumoren zeigt nach Applikation von Tirapazamine in Kombination mit cis-Platin und einer strahlentherapeutischen Behandlung eine Verdoppelung des initialen Tumorumens im Mittel nach 11 Tagen (SD +/-15.9; 0d min, 41d max). Insgesamt sind 6 Tiere vor Verdoppelung des Tumorumens gestorben. Dies entspricht einer Letalität von 6 von 9 Tieren.



**Abbildung 26:** Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „28“.

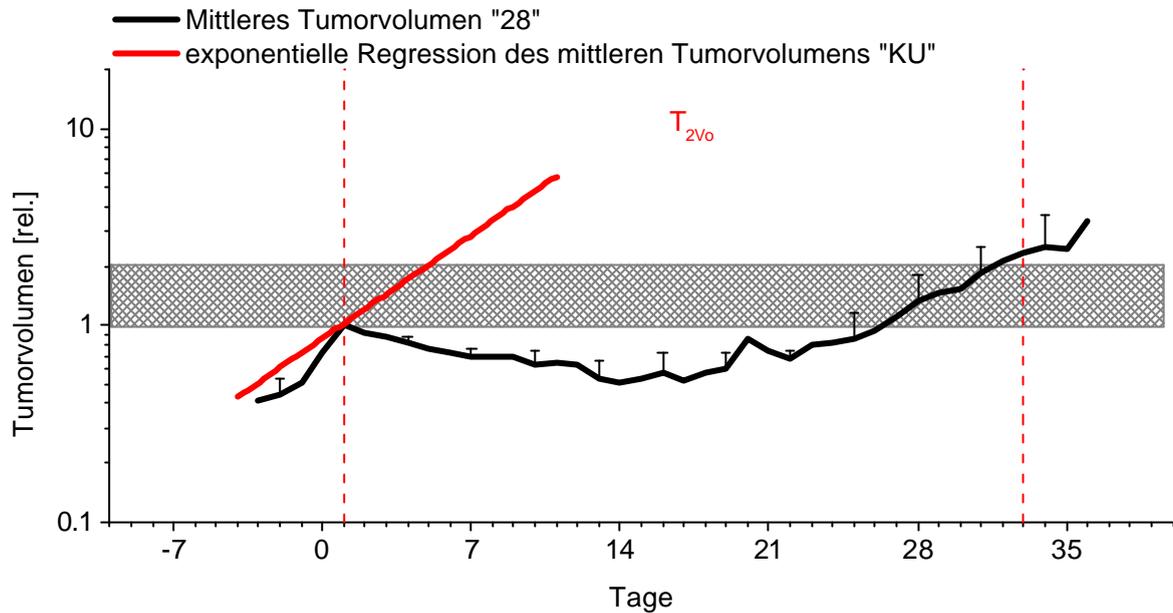


Abbildung 27: Mittleres Tumorstadium der Therapiegruppe „28“.

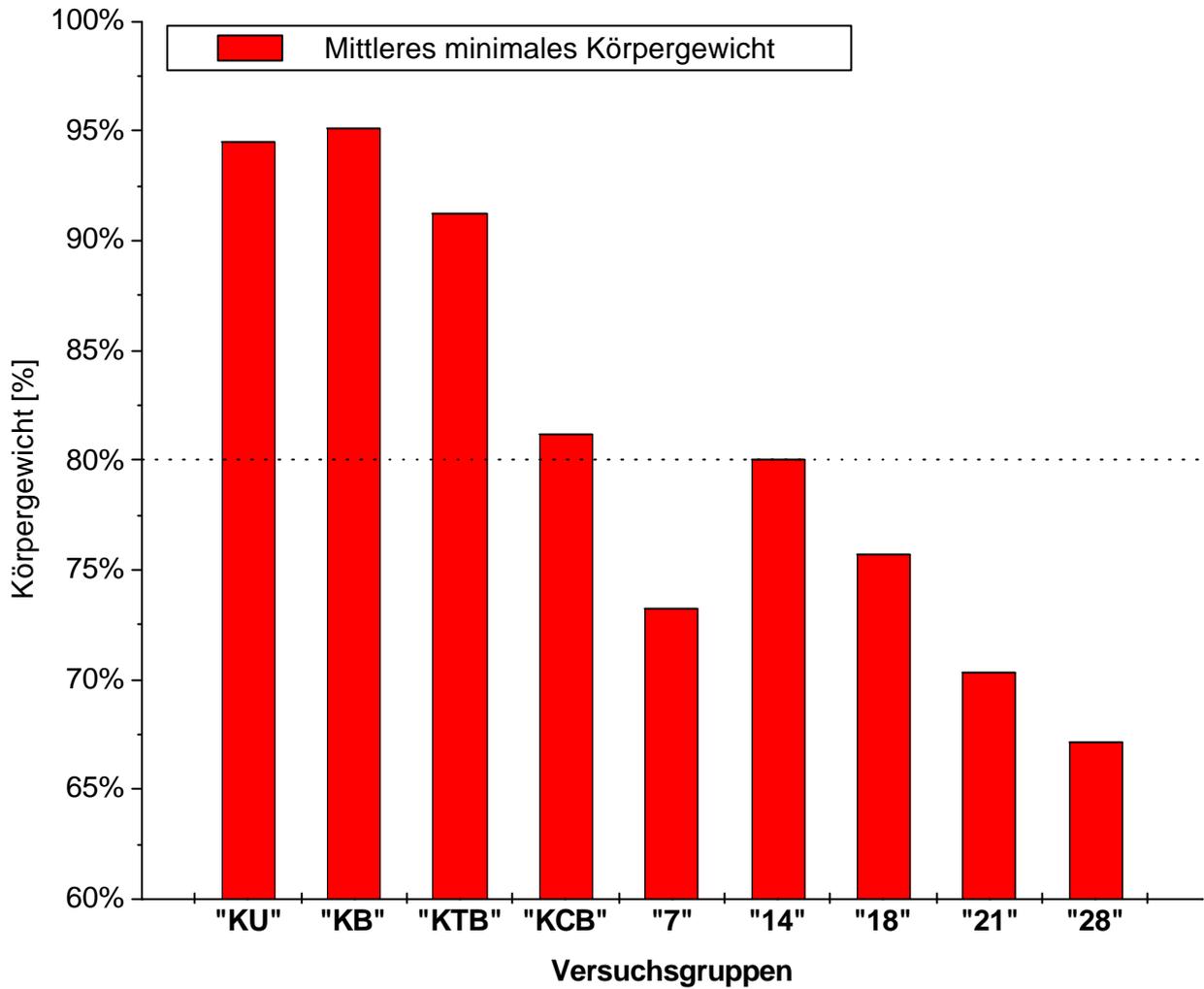
Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe „28“

| VGr. | Id-Nr.  | $t_{2v_0}$ | $TV_0$  | $KGW_0$                                 | $KGW_{min}$           | L                      |
|------|---------|------------|---|---|-----------------------|------------------------|
| "28" | 759/00  | †          | 35.3 mm <sup>3</sup>                          | 26.0 g                                  | 17.5 g                | †                      |
|      | 760/00  | †          | 27.5 mm <sup>3</sup>                          | 23.0 g                                  | 17.5 g                | †                      |
|      | 761/00  | 30 d       | 44.0 mm <sup>3</sup>                          | 22.0 g                                  | 17.0 g                | 0                      |
|      | 762/00  | 28 d       | 74.2 mm <sup>3</sup>                          | 25.0 g                                  | 18.0 g                | 0                      |
|      | 1923/00 | †          | 47.5 mm <sup>3</sup>                          | 30.0 g                                  | 17.5 g                | †                      |
|      | 1924/00 | 41 d       | 37.7 mm <sup>3</sup>                          | 30.0 g                                  | 19.0 g                | 0                      |
|      | 1925/00 | †          | 122.2 mm <sup>3</sup>                         | 32.0 g                                  | 20.0 g                | †                      |
|      | 1926/00 | †          | 47.6 mm <sup>3</sup>                          | 30.0 g                                  | 17.5 g                | †                      |
|      | 1927/00 | †          | 49.0 mm <sup>3</sup>                          | 29.0 g                                  | 20.0 g                | †                      |
|      |         |            | 33,0d<br>(SD +/-5,71;<br>28d min; 41d<br>max) | 53.9mm <sup>3</sup><br>(SD +/-<br>27.1) | 27.4g<br>(SD +/-3.34) | 18.22g<br>(SD +/-1,08) |

VGr.: Versuchsgruppe, Id-Nr.: Tier-Identitäts-Nummer,  $t_{2v_0}$ : Tumorstadium-Verdoppelungs-Zeit,  $TV_0$ : Tumorstadium-Volumen  $t_0$ ,  $KGW_0$ : Körpergewicht  $t_0$ ,  $KGW_{min}$ : kleinstes gemessenes Körpergewicht, L: Letalität.

## 3.2.5 Körpergewicht

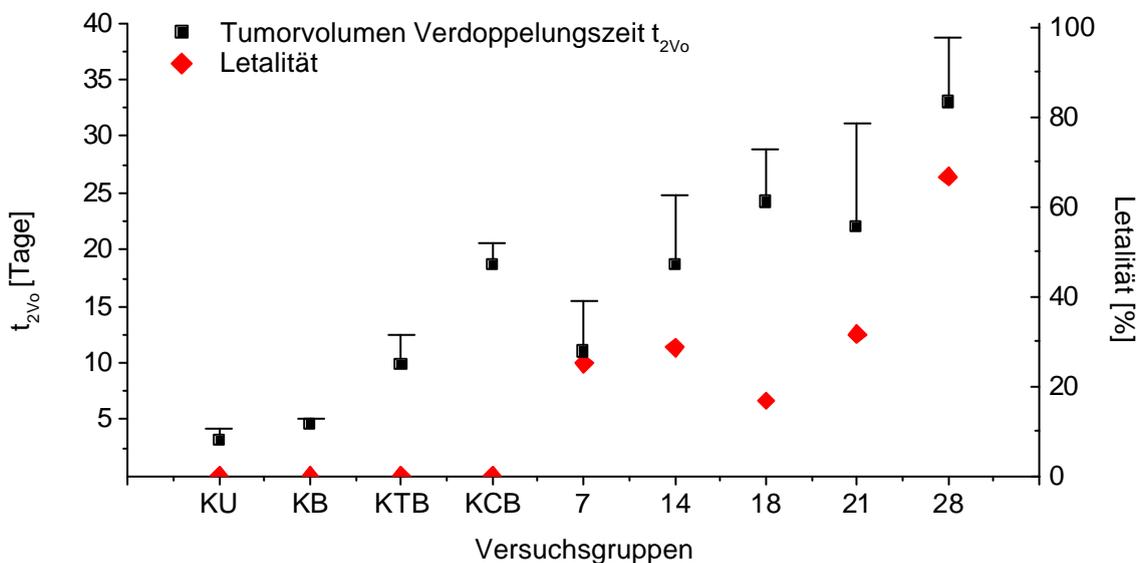
Im Verlauf der Therapie zeigen alle behandelten Tiere einen mehr oder weniger ausgeprägten Gewichtsverlust. Insgesamt 18 Tiere aus den Gruppen „7“ bis „28“, in denen die Kombination aus Bestrahlung, cis-Platin und TPZ untersucht wurde, erreichen nicht den Zielwert der Tumorzellenverdoppelung. Ihr Gewichtsverlust beträgt mehr als 20% vom gemessenen Körpergewicht am Tag  $T_0$ . Wird dieser Wert unterschritten, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit des Todes eines Tieres vor Versuchsende. Die Kontrollgruppe „KU“, ohne Therapie und die Kontrollgruppe „KB“, mit fraktionierter Bestrahlung, weisen ein mittleres niedrigstes Körpergewicht von 94.49% (SD +/-0.04; 86.21% min, 100% max) und 95.15% (SD +/-0.03; 92.46% min, 100%max) bezogen auf das Körpergewicht zum Zeitpunkt  $T_0$  auf. In den zwei Kontrollgruppen, in denen die Chemotherapeutika einzeln mit der Strahlentherapie kombiniert wurden, „KTB“ und „KCB“, liegen die mittleren minimalen Körpergewichte bei 91.19% (SD +/-0.04; 83.02% min, 94.72% max) und 81.18% (SD +/-0.05; 71.99% min, 87.6% max). In allen Therapiegruppen mit kombinierter Radiochemotherapie mit Tirapazamine und cis-Platin liegen die Mittelwerte des minimalen Körpergewichtes alle unter 80% des mittleren Körpergewichtes am Tag  $T_0$ . Die Gruppe „7“ liegt bei 73.21% (SD +/-0.06; 66.54% min, 81.23 max), Gruppe „14“ bei 79.99% (SD +/-0.07; 68.97 min, 96.0 max), Gruppe „18“ bei 75.70% (SD +/-0.06; 67.91% min, 84.92% max), Gruppe „21“ bei 70.28% (SD +/-0.09; 55.56% min, 86.96% max) und die Gruppe „28“ bei 67.13% (SD +/-0.07; 58.33% min, 77.27% max). In der graphischen Darstellung der Körpergewichtsverläufe stellt der Wert „80% Körpergewicht“ die kritische Grenze für den Körpergewichtsverlust dar.



**Abbildung 28:** Darstellung der gemittelten minimalen Körpergewichte der einzelnen Versuchsgruppen.

### 3.2.6 Tumorzvolumen-Verdoppelungszeit $t_{2V_0}$ und Letalität

In allen Gruppen kann ein Ergebnis für die Tumorzvolumen-Verdoppelungszeit ermittelt werden. Für die Kontrollgruppen sind alle 26 Tiere in die Auswertung aufzunehmen. Hier ergeben sich für die vier Gruppen eine  $t_{2V_0}$  von 3.18d (+/-0.94) („KU“), 4.6d (+/-0.49) („KB“), 9.8d (+/-2.71) („KTB“) und 18.6d (+/-2.0) für die Gruppe „KCB“. In den Therapiegruppen scheiden insgesamt 18 von 52 Tieren aus der Auswertung aus. Der Grund ist der Tod der Tiere vor Erreichen der Zielgröße  $t_{2V_0}$ . Für diese Gruppen ergibt sich eine  $t_{2V_0}$  von 11d (+/-4.54) („7“), 18.6d (+/-6.24) („14“), 24.2d (+/-4.62) („18“), 22d (+/-9.19) („21“) und 33d (+/-5.71) für die Gruppe „28“. Zusätzlich wird an den Gruppen „7“ bis „28“ eine Letalität von 1 von 4 Tieren („7“), 4 von 14 Tieren („14“), 1 von 6 Tieren („18“), 6 von 19 Tieren („21“) und 6 von 9 Tieren für die Gruppe „28“ gemessen.



**Abbildung 29:** Darstellung der Einzelergebnisse Tumorzvolumen-Verdoppelungszeit  $t_{2V_0}$  und Letalität aller Gruppen.

**3.2.7 Zusammenfassung aller Teilergebnisse**

**Tabelle 14:** Zusammenfassende Darstellung aller Gruppenergebnisse der  $t_{2V_0}$ , Letalität, Mittleres Tumolvolumen  $T_0$  und mittleres Gewicht  $T_0$ .

| Versuchsgruppe | Mittlere $T_{2V_0}$                     | Mittleres Gewicht $T_0$ | Mittleres Tumolvolumen $T_0$          | Letalität |
|----------------|---|-------------------------|---------------------------------------|-----------|
| <b>KU</b>      | 3.18d<br>(SD +/-0.94; 2d min; 5d max)   | 24.5g<br>(SD +/-2.74)   | 274.7mm <sup>3</sup><br>(SD +/-99.4)  | 0 von 11  |
| <b>KB</b>      | 4.6d<br>(SD +/-0.49; 4d min; 5d max)    | 21.6g<br>(SD +/-1.33)   | 213.5mm <sup>3</sup><br>(SD +/-110.6) | 0 von 5   |
| <b>KTB</b>     | 9.8d<br>(SD +/-2.71; 7d min; 14d max)   | 27.5g<br>(SD +/-2.92)   | 216.0mm <sup>3</sup><br>(SD +/-65.8)  | 0 von 5   |
| <b>KCB</b>     | 18.6d<br>(SD +/-2.0; 18d min; 22d max)  | 27.7g<br>(SD +/-2.06)   | 179.5mm <sup>3</sup><br>(SD +/-101.8) | 0 von 5   |
| <b>7</b>       | 11d<br>(SD +/-4.54; 5d min; 16d max)    | 25.3g<br>(SD +/-0.87)   | 149.9mm <sup>3</sup><br>(SD +/-61.9)  | 1 von 4   |
| <b>14</b>      | 18.6d<br>(SD +/-6.24; 9d min; 31d max)  | 25.7g<br>(SD +/-2.66)   | 150.8mm <sup>3</sup><br>(SD +/-69.5)  | 4 von 14  |
| <b>18</b>      | 24.2d<br>(SD +/-4.62; 19d min; 32d max) | 26.7g<br>(SD +/-2.22)   | 194.3mm <sup>3</sup><br>(SD +/-80.8)  | 1 von 6   |
| <b>21</b>      | 22.0d<br>(SD +/-9.19; 6d min; 40d max)  | 26.2g<br>(SD +/-2.89)   | 123.4mm <sup>3</sup><br>(SD +/-77.7)  | 6 von 19  |
| <b>28</b>      | 33.0d<br>(SD +/-5.71; 28d min; 41d max) | 27.4g<br>(SD +/-3.34)   | 53.9mm <sup>3</sup><br>(SD +/-27.1)   | 6 von 9   |

## 4 DISKUSSION

Bei der Behandlung solider Tumorerkrankungen stehen neben chirurgischen Maßnahmen die Strahlen- und die Chemotherapie zur Verfügung. Jedoch können diese drei Disziplinen nicht immer eine sichere Methode zur Heilung anbieten, da die individuelle Tumorbiologie der betroffenen Patienten sehr vielfältig sein kann.

In der Strahlentherapie ist die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff von zentraler Bedeutung. Diese kann je nach Tumorart und Lokalisation stark variieren. Die Wirksamkeit einer Strahlentherapie wird von einem niedrigen Sauerstoffgehalt in den Tumorzellen stark beeinträchtigt. Unter Sauerstoffarmut ist die Zelle nicht teilungsaktiv, wodurch der Kern kondensiert ist und weniger Angriffsfläche für die schädigende Strahlung bietet. Durch den fehlenden Sauerstoff können durch die ionisierende Strahlung aus diesem auch keine Radikale gebildet werden, die ihrerseits wiederum die strahleninduzierten DNS-Schaden fixieren könnten. Um sich diese Tatsache zu Nutze zu machen, untersucht man seit etwa zwei Jahrzehnten Substanzen, die gerade diese Sauerstoffarmut benötigen, um ihre Wirksamkeit zu entfalten, dazu gehört auch TPZ.

### 4.1 Diskussion der Versuchsdurchführung

Die vorliegende Arbeit sollte zeigen, wie sich die Kombination von Bestrahlung, cis-Platin und TPZ auf das Tumorstadium in einem Tiermodell auswirkt. Zum Vergleich dient die in der Klinik gängige Kombination von Strahlentherapie mit cis-Platin. Die Untersuchung steht in Zusammenhang mit der Arbeit von OTTENJANN (2003), in der die Auswirkungen auf die behandelten Versuchstiere histologisch aufgearbeitet wurden.

Für die Wahl des Versuchsmodells (C3H-Mäuse / RIF-1Tumor) sprachen mehrere Gründe. Zum einen existieren verschiedene Publikationen, die mit diesem Tumor-Maus-Modell gearbeitet haben und so einen Vergleich der von uns erhobenen Daten ermöglicht (BROWN, 1979b; BROWN et al., 1980; BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991; MINCHINTON und BROWN, 1992; DORIE et al.,

1994; SIIM et al., 1997; SIEMANN und HINCHMAN, 1998). Zum anderen liegen Daten vor, die das Vorkommen von Hypoxie und die Wirkung von TPZ im RIF-1-Tumor gezeigt haben (BROWN et al., 1980; BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991; LARTIGAU und GUICHARD, 1996; BROWN und WANG, 1998; ADAM et al., 1999). Zur Beurteilung der Wirksamkeit der Therapie sind die Wachstumsverzögerung und die Tumor-Volumen-Verdoppelung als Zielgröße etabliert (BROWN et al., 1980). Kritisch zu betrachten ist der Vergleich von *in vitro* und *in vivo* gewonnenen Ergebnissen, in denen die Wirksamkeit von TPZ untersucht wurde. Hier hat sich gezeigt, dass die Wirkung von TPZ *in vitro* deutlicher und homogener ist als *in vivo* (SIIM et al., 1997). *In vivo* beeinflusst beispielsweise die unterschiedliche Blutversorgung, die sich unter Umständen rasch verändern kann, den Sauerstoffgehalt und die Verfügbarkeit des TPZ in den Zellen und damit die Wirksamkeit von TPZ (BROWN und LEMMON, 1991; BROWN und SIIM, 1996).

Die Tumorlokalisation wurde aus zwei Gründen am Fußrücken gewählt. Der Tumor ist für die Strahlentherapie sehr gut zugänglich, ohne weitere Körperregionen oder Organe zu belasten. Auch lassen sich die Dimensionen des Tumors am Fuß sehr sicher ermitteln, ohne dass Fell oder Muskulatur die Messungen stören können (ADAM et al., 1999). Es hat sich herausgestellt, dass die Lokalisation am Fußrücken enge Grenzen für einen schnell wachsenden Tumor birgt. Wenn die Tumore ein Volumen von 900 bis 1100 mm<sup>3</sup> erreichen, kommt es vermehrt zu Nekrosen auf der Tumeroberfläche. Dabei entstehen offene Wunden mit Infektionen und teilweise sogar Automutilation, was letztendlich zu einer starken Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens der Tiere führt. Soweit ein sehr schlechtes Allgemeinbefinden abzusehen war, wurden die Tiere eingeschläfert. Des weiteren verändern sich damit die Messparameter des Tumors und die Messergebnisse werden verfälscht. Das Zeitfenster für die Behandlung musste daher sorgsam gewählt werden.

Bei der Tumorlokalisation am Fußrücken kann das Tumolvolumen einfach errechnet werden. Die Wachstumsform ähnelt einem ellipsoiden Körper. In der Volumenberechnung dieses ellipsoiden Körpers wird der geringe Messfehler, der durch Haut und Fußknochen verursacht wird, vernachlässigt (DORIE et al., 1991; ADAM et al., 1999).

Abweichend von den meisten Untersuchungen (BROWN, 1979a; BROWN et al., 1980; BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991; MINCHINTON und BROWN, 1992; DORIE und BROWN, 1993; SIIM et al., 1997), wird ein Behandlungsschema gewählt, das sich am klinischen Alltag orientiert. Somit verlängerte sich der Zeitraum der Behandlung auf 12 Tage. Publizierte fraktionierte Behandlungsschemata erstrecken sich meistens nur über vier Tage (BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991; DORIE und BROWN, 1993). Dies erschwert den Vergleich der Daten.

Die Anzahl der Tiere in den einzelnen Versuchsgruppen variiert zum Teil erheblich. Dies ist bedingt durch die Versuchsplanung, nach der sich verschiedene Dosierungen wiederholen. Die Ergebnisse dieser Gruppen werden zusammengefasst.

### **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

Aus dem Vergleich der gemittelten Daten der verschiedenen Untersuchungsgruppen konnte nur ein bedingter Vorteil der fraktionierten Kombinationstherapie aus Bestrahlung, TPZ und cis-Platin gegenüber einer ebenfalls fraktionierten Behandlung mit Bestrahlung und cis-Platin gezeigt werden. Bei den Einzelergebnissen der Dreier-Kombination zeigt sich jedoch für einzelne Tiere eine deutlich verlängerte Tumorzellen-Verdoppelungszeit.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt die Kontrollgruppe „KU“ das schnellste Tumorzellenwachstum und somit den kleinsten Wert (3.18 Tage) für die Tumorzellen-Volumen-Verdoppelungs-Zeit ( $t_{2V_0}$ ). Ausfälle durch das Versterben von Tieren kamen nicht vor. Die Kontrollgruppe „KU“ ist die Referenzgruppe für das Tumorzellenwachstum und für den Verlauf des Körpergewichtes für alle weiteren Kontroll- und Therapiegruppen. Die Kontrollgruppe mit alleiniger Bestrahlung zeigte für die Tumorzellen-Volumen-Verdoppelungszeit einen Wert von 4.6 Tagen. Hier spiegelt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe „KU“ die Wachstumsverzögerung, die durch die Bestrahlung ausgelöst wird, wider. Die Kontrollgruppe „KTB“ wies einen Wert von 9.8 Tagen für

die Tumorzellen-Verdoppelungszeit auf. Dies ist ein deutlicher Gewinn gegenüber der Kontrollgruppe „KB“ und zeigt die Wirksamkeit von TPZ an diesem Tumor-Maus-Modell (ZEMAN et al., 1986; BROWN und LEMMON, 1990; BROWN, 1993). Die Kontrollgruppen „KB“ und „KTB“ wiesen keine letalen Ausfälle auf. Die Kontrollgruppe „KCB“ steht für die fraktionierte Standardbehandlung mit Bestrahlung und cis-Platin. Diese Gruppe zeigte im Mittel eine Tumorzellenverdoppelung innerhalb von 18.6 Tagen ohne eine Letalität während der Behandlung zu zeigen.

Zum Vergleich der Standardtherapie, bestehend aus Bestrahlung und cis-Platin, und der Dreier-Kombination, bestehend aus Bestrahlung, TPZ und cis-Platin, werden die Tumorzellen-Verdoppelungszeit der Kontrollgruppe „KCB“ mit den gemessenen Werten der Therapiegruppen „7“, „14“, „18“, „21“ und „28“ verglichen. Hier ergibt sich für die Therapiegruppe „7“ mit 11 Tagen  $t_{2V_0}$  ein schnelleres Tumorzellenwachstum als für die Kontrollgruppe „KCB“ mit 18.6 Tagen  $t_{2V_0}$ . Die mittlere  $t_{2V_0}$  der Therapiegruppe „14“ (18.6 Tage) entspricht der Kontrollgruppe „KCB“ und übertrifft sie mit 24.2 Tagen der Gruppe „18“, 22.0 Tagen der Gruppe „21“ und 33.0 Tagen der Gruppe „28“ (siehe Abb. 29). In diesem Zusammenhang fallen allerdings drei Dinge auf. Erstens: Mit der Dosissteigerung in den Therapiegruppen „7“ bis „28“ ist eine Verlängerung der Tumorzellen-Verdoppelungszeit zu erzielen. Je höher die TPZ-Dosis desto länger die  $t_{2V_0}$ . Zweitens: Mit der Kombination von TPZ zu der Standard-Therapie von Bestrahlung und cis-Platin verkürzen sich erst einmal  $t_{2V_0}$ . Erst mit 14.4mg TPZ /kg KGW erzielt man dasselbe Ergebnis bzw. verbessert es ab 18mgTPZ/kg KGW gegenüber der Standard-Therapie. Diese Beobachtung spricht gegen einen additiven Effekt von niedrigen Dosen von TPZ und cis-Platin auf den Tumor. Drittens: In der Anwendung der Dreier-Kombination waren immer Todesfälle unter den Versuchstieren zu verzeichnen. Gruppe „7“ mit 1 von 4, „14“ mit 4 von 14, „18“ mit 1 von 6, „21“ mit 6 von 19 und „28“ mit 6 von 9 Tieren. Diese Tiere wurden bei abzusehendem sehr schlechtem Allgemeinbefinden euthanasiert. In den vier Kontrollgruppen konnte dies nicht beobachtet werden.

Vergleicht man die Gewichtsverläufe der einzelnen Gruppen, dann zeigt sich deutlich, dass mit fortschreitender Behandlung, steigender Anzahl verwendeter Therapeutika und steigender Dosierung die systemische Belastung zunimmt. cis-

Platin scheint den Organismus stärker zu belasten als TPZ. Dies zeigt sich bei der Betrachtung der Kontrollgruppe „KTB“, da die Tiere im Mittel nur auf 91.19% des ursprünglichen Körpergewichtes abnehmen und „KCB“ auf durchschnittliche 81.18%. Kombiniert man beide Chemotherapeutika, verstärkt sich der Gewichtsverlust. Die Tiere können dann bis zu 33% ihres anfänglichen Körpergewichtes verlieren. Hier lässt sich empirisch eine Grenze bei 80% Körpergewicht ziehen. Unterschreitet ein Tier dieses Körpergewicht, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es die Zielgröße  $t_{50}$  nicht erreicht und vorher stirbt. Allen Gruppen ist gemeinsam, dass sie das verlorene Gewicht nach Therapieende nicht mehr komplett zurückgewinnen, sondern nur zum Teil durch Futteraufnahme wieder zunehmen.

Das Allgemeinbefinden der Tiere entwickelt sich parallel zum Körpergewicht. Hier lässt sich eine direkte Verbindung zwischen der Applikation der Chemotherapeutika und der Verschlechterung des Allgemeinbefindens herstellen. Die Tiere aus den Kontrollgruppen „KTB“ und „KCB“ zeigen in den Stunden nach der Behandlung eine Verschlechterung des Allgemeinbefindens, erholen sich jedoch wieder nach spätestens 24 Stunden. Die Tiere der Therapiegruppe „7“, „14“, „18“, „21“ und „28“ zeigen zum Teil erst einige Tage nach Ende der Therapie eine Erholung des Allgemeinbefindens. Alle Tiere, die sich nicht mehr erholen, werden euthanasiert.

Den eigenen Untersuchungen zufolge zeigt die Auswertung der Versuchsdaten tendenziell eine stärkere tumorhemmende Wirkung für die Kombination aus Bestrahlung, TPZ und cis-Platin gegenüber der Kombination von Bestrahlung und cis-Platin. Dies bestätigen Hinweise aus Untersuchungen, in denen die Wirkung von TPZ in Kombination mit Bestrahlung oder cis-Platin untersucht wurden (BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991; MINCHINTON und BROWN, 1992; DORIE und BROWN, 1993; SIIM et al., 1997; SIEMANN und HINCHMAN, 1998; BROWN und WANG, 1998).

In einem mehrfach untersuchten fraktionierten Behandlungsprotokoll wurden Mäuse innerhalb von 4 Tagen insgesamt acht mal mit Bestrahlung oder TPZ oder Bestrahlung plus TPZ behandelt (Brown 1990,1991, Minchinton 1992, Dorie 1993, Siim 1997). Die untersuchten Größen waren das Tumorwachstum *in vivo* und die

Fähigkeit zur Koloniebildung in der Zellkultur *in vitro*. An beiden Parametern konnte gezeigt werden, dass die Einzelergebnisse bei alleiniger Anwendung von Bestrahlung oder TPZ sich in der Kombination addierten. Das Tumorwachstum wurde von 13.4 Tagen bei alleiniger Bestrahlung und 5.9 Tagen bei alleiniger Gabe von 14,4 mg/kg TPZ auf 20.6 Tage bei der Kombination der Behandlungen verlangsamt (BROWN und LEMMON, 1990). Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Untersuchung bestätigt (BROWN und LEMMON, 1991). Hier ergab sich für die Tumorwachstumshemmung bei alleiniger Bestrahlung ein Wert von 15 Tagen. Für die TPZ-Behandlung ergab sich ein Wert von 13 Tagen. In der Kombination beider Behandlungen stieg dieser Wert auf 38-48 Tage (BROWN und LEMMON, 1991). Diese Ergebnisse werden durch die Erkenntnisse aus den *in vitro*-Versuchen bestätigt. Die stärkste Hemmung der Koloniebildung wurde jeweils mit der Kombination von Bestrahlung und TPZ erzielt (MINCHINTON und BROWN, 1992; DORIE und BROWN, 1993; SIIM et al., 1997).

Bei den Untersuchungen zu TPZ und cis-Platin ergab sich, dass die Kombination der Therapeutika zum Teil der alleinigen Anwendung überlegen ist. Nicht bestätigt hat sich die Aussage von DORIE und BROWN (1993), dass die tumorhemmende Wirkung der einzelnen Therapeutika in der Kombination addiert wird. Es wurde darauf geachtet, TPZ ca. zwei bis drei Stunden vor cis-Platin zu verabreichen. Nur in dieser zeitlichen Abfolge erzielt man den optimalen Effekt (DORIE und BROWN, 1993). Bei einer Untersuchung an C3H-Mäusen und dem murinen Mammakarzinom C16 konnte für die alleinige TPZ-Anwendung kaum eine Tumorwachstumshemmung festgestellt werden. Wurde an diesem Modell jedoch TPZ mit cis-Platin kombiniert, war die Tumorwachstumshemmung stärker als bei alleiniger Anwendung von cis-Platin (SIEMANN und HINCHMAN, 1998). Auch an Zellkulturversuchen konnte der additive toxische Effekt von TPZ in Kombination mit cis-Platin gezeigt werden. Die Fähigkeit zur Koloniebildung nimmt am stärksten ab, wenn TPZ mit cis-Platin kombiniert wird gegenüber deren alleinigen Anwendung (BROWN und WANG, 1998).

Widersprüche bestehen in den Ergebnissen zu den Nebenwirkungen der Kombinationstherapien. Im Falle der Kombination von TPZ mit Bestrahlung konnte in

der hier vorgestellten Untersuchung keine erhöhte Toxizität gegenüber alleiniger Bestrahlung festgestellt werden. Dies stimmt mit publizierten Untersuchungen überein. Vor allem konnte keine Letalität für die Kombination von TPZ und Bestrahlung festgestellt werden (BROWN und LEMMON, 1990; BROWN und LEMMON, 1991).

Anders verhält es sich aber für die Kombination von cis-Platin und TPZ. In der eigenen Untersuchung konnte teilweise eine erhebliche Letalität beobachtet werden. Bis zu maximal 6 von 9 Tieren in der Gruppe „28“ sind an dieser Kombination zusammen mit der lokalen Strahlentherapie gestorben. Dies steht im Widerspruch zu den Untersuchungen der Kombination von cis-Platin und TPZ. Von einer Letalität in diesem Zusammenhang wird nicht berichtet (DORIE und BROWN, 1993; SIEMANN und HINCHMAN, 1998; BROWN und WANG, 1998). Die Untersuchung konnte lediglich eine leichte Hämotoxizität ermitteln (SIEMANN und HINCHMAN, 1998). Auch eine Leukopenie kann auftreten, die allerdings nach Beendigung der Behandlung wieder vollständig verschwindet (DORIE und BROWN, 1993). Es wird auch beschrieben, dass die von cis-Platin verursachte Nierentoxizität in einer Kombination mit TPZ nicht verstärkt wird (DORIE und BROWN, 1993).

In der Arbeit von OTTENJANN (2003) zeigt sich, dass die Belastung des gesamten Organismus stärker ist als in der Literatur angegeben war. Generell zeigen sich histopathologische Veränderungen an allen untersuchten Organen. Deren Häufigkeit lässt allerdings keine Aussage darüber zu, welchem Therapeutikum der konkrete Schaden zuzuordnen ist. Eine Ausnahme stellen die Veränderungen am Verdauungstrakt dar. Hier zeigt sich eine Häufung bei den Tieren, die zusätzlich zur Bestrahlung und cis-Platin auch TPZ bekommen haben. Dies könnte die Letalität erklären, die in diesen Gruppen zu beobachten waren. Am naheliegendsten ist hier die Vermutung, dass die intraperitoneale Applikation der Chemotherapeutika diese Veränderungen hervorgerufen haben könnte.

## 4.3 Schlussfolgerung

An einem Tumor-Mausmodell konnte die unterschiedliche Wirkung der Therapeutikakombinationen mit ionisierender Strahlung, Tirapazamine und cis-Platin dargestellt werden. Mit Hilfe der Zielgröße, der Tumorumfangverdoppelungszeit, welche die tumorwachstumshemmende Wirkung der einzelnen Therapiekomponenten und ihren Kombinationen widerspiegelt, konnte der Unterschied zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen dargestellt werden.

Der Wirkungsgrad der drei einzelnen Therapiekomponenten ist unterschiedlich. Am schwächsten wird das Tumorumfangwachstum durch die alleinige Bestrahlung gehemmt. Im Vergleich hierzu kann die Kombination von ionisierender Strahlung mit TPZ die tumorwachstumsverzögernde Wirkung um wenige Tage steigern. Am stärksten, im Vergleich der einzelnen Therapiekomponenten, wirkt sich die Kombination aus ionisierender Strahlung und cis-Platin aus. Hier konnte im Vergleich von alleiniger Bestrahlung, Bestrahlung kombiniert mit TPZ und Bestrahlung kombiniert mit cis-Platin die längste Tumorumfangverdoppelungszeit erzielt werden.

Bei dem Vergleich der Standardkombination, bestehend aus ionisierender Strahlung und cis-Platin, mit der Dreierkombination aus ionisierender Strahlung, TPZ und cis-Platin können folgende Aussagen getroffen werden. Die Dreierkombination verursacht neben einer deutlichen tumorhemmenden Wirkung erhebliche systemische Nebenwirkungen in Form von starkem Gewichtsverlust und schlechtem Allgemeinbefinden. Dies hat in allen Untersuchungsgruppen der Dreier-Kombination zu Todesfällen geführt. Die Letalität hat mit steigender TPZ-Dosierung zugenommen. Bei der Standardtherapie mit Bestrahlung und cis-Platin konnten zum Teil die selben Nebenwirkungen beobachtet werden, jedoch ohne Todesfälle.

Ab einer TPZ-Dosierung von 14mg/kg KGW kann in Kombination mit ionisierender Strahlung und cis-Platin eine ähnliche oder bessere tumorhemmende Wirkung erzielt werden als mit ionisierender Strahlung und cis-Platin allein. Für die Dreier-Kombination besteht aber eine erhöhte Letalität.

Phase I und II Studien am Menschen haben gezeigt, dass auch hier erhebliche Nebenwirkungen auftreten und zu immer wiederkehrenden Therapieabbrüchen führen. Diese Ergebnisse lassen eine Anwendung von TPZ in der tiermedizinischen oder medizinischen klinischen Anwendung als sehr fraglich erscheinen (TREAT et al., 1998; PAWEL et al., 2000).

#### **4.4      Ausblick**

Als Therapieansatz hat sich die Nutzung von Hypoxie-aktivierten Chemotherapeutika als nutzbar erwiesen. Die Ergebnisse aus dieser Studie haben gezeigt, dass aus der Kombination von Bestrahlung und cis-Platin mit dem neuen Chemotherapeutikum Tirapazamine die Behandlung eines murinen Fibrosarkoms verbessert werden kann, jedoch das Risiko von Nebenwirkungen und Letalität erheblich steigt. Für eine klinische Anwendung von TPZ sollte dieses Risiko nicht nur kalkulierbar, sondern auch vermeidbar sein. Es stellt sich die Frage nach der Ursache oder dem Ursachenkomplex, der für die Nebenwirkungen und der Letalität verantwortlich ist. Um eine Antwort zu finden, müssen noch weitere Untersuchungen zu den Veränderungen, die TPZ im Organismus verursacht, getätigt werden. Hier kann untersucht werden, ob die Kombinationstherapie an verschiedenen Tumor-Maus-Modellen reproduzierbare Ergebnisse liefert. Weiter kann untersucht werden, ob die Darreichung und das Fraktionierungsschema der Therapie einen Einfluss auf die Nebenwirkungen hat. Zur Zeit sind jedoch keine weiteren Arbeiten geplant, die eine Untersuchung dieser Fragen ermöglichen würde.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Sauerstoffarmut stellt für einen Teil der Tumorzellen, die aus dem Wachstum solider Tumoren entstehen, im besonderen Maße für die Strahlentherapie und auch für die Chemotherapie ein Hindernis dar. Um dieses Hindernis, das zum Teil für die lokale Rezidivierung und die maligne Progression von Tumoren verantwortlich ist, zu einem neuen Ansatzpunkt für die Therapie zu machen, hat man Substanzen wie das Tirapazamine (TPZ) entwickelt, die unter Sauerstoffarmut ihre tumortoxische Wirkung entfalten.

In dieser Untersuchung sollte in einem Tumor-Maus-Modell erforscht werden, wie sich die Kombination von Tirapazamine mit ionisierender Strahlung und cis-Platin auf das Tumorwachstum auswirkt. Als Vergleich diene die Standardtherapie mit ionisierender Strahlung und cis-Platin.

An einem Tumor-Maus-Modell (C3H-Maus, murines Fibrosarkom Rif-1) wurden auf dem rechten Fußrücken durch subkutan-Injektion von Tumorzellsuspensionen Tumoren erzeugt. Nach einer initialen Wachstumsphase wurden die Tumoren mit ionisierender Strahlung, cis-Platin und TPZ behandelt. Die Wirkung der Therapeutika sollte in den oben genannten Kombinationen mit der Wachstumsverzögerung eines unbehandelten Tumors verglichen werden.

Die Kombination von ionisierender Strahlung, TPZ und cis-Platin kann mit steigender TPZ-Dosis eine jeweils stärkere Wachstumsverzögerung des Tumors erreichen. Unter der Kombination von ionisierender Strahlung, TPZ und cis-Platin tritt zum Teil eine hohe Letalität auf. Diese Letalität ist unter der Behandlung mit ionisierender Strahlung und cis-Platin nicht zu beobachten.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse kann die Anwendung von TPZ in der Tumorthherapie derzeit nicht empfohlen werden. Weitere Untersuchungen sollten sich mit den Veränderungen, die TPZ im Organismus verursacht, beschäftigen.

6      **SUMMARY**

**The effect of tirapazamine in combination with cis-platin and radiation on the tumorgrowth of the tumorbearing mouse.**

**Background:** Tissue hypoxia caused by the growth of solide tumors is an obstacle to radio- and chemotherapy. This obstacle is known to enhance local tumor-recurrence and malignant progression. To use hypoxia as a therapeutic object in solid tumors substances like Tirapazamine have been developed which lead to cell death in the absence of oxygen.

In this study we analysed the efficacy of a combined radiochemotherapy with the hypoxic cell killer Tirapazamine, cis-platin and radiation compared with a standard radiochemotherapy with cis-platin and radiation alone.

**Methods:** In a tumor-mouse-model (C3H-mouse, RIF -1 fibrosarcoma of the mouse) tumor cell suspensions were injected subcutaneously in the back of the right hind foot to generate tumorgrowth. After an initial growth-phase tumors were treated with either cis-platin and radiation or with Tirapazamine, cis-platin and radiation. The therapeutical impact was measured comparing tumor-growth-delay of treated and not treated groups.

**Results:** The combination of the hypoxic cell killer Tirapazamine with cis-platin and radiation results in a longer tumor-growth-delay compared with the standard combination of cis-platin and radiation. Additionally higher levels of lethality in this group were observed. This increased level of lethality was not seen in groups with conventional treatment.

**Conclusions:** The additional treatment with tirapazamine in a combined radiochemotherapy may produce a better outcome. However the risk of side effects or even death is too high. Further studies should be performed to analyse the cause of side effects in combination with the hypoxic cell killer Tirapazamine.

**7      LITERATURLISTE**

- Adam M, Dorie MJ, Brown JM (1999)  
Oxygen tension measurements of tumors growing in mice.  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 45, 171-180
- Baker MA, Zeman EM, Hirst VK, Brown JM (1988)  
Metabolism of SR 4233 by Chinese hamster ovary cells: basis of selective hypoxic cytotoxicity.  
Cancer Res. 48, 5947-5952
- Biedermann KA, Wang J, Graham RP, Brown JM (1991)  
SR 4233 cytotoxicity and metabolism in DNA repair-competent and repair-deficient cell cultures.  
Br. J. Cancer 63, 358-362
- Bosterling B, Trudell JR (1981)  
Spin trap evidence for production of superoxide radical anions by purified NADPH-cytochrome P-450 reductase  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 569-575
- Brown JM (1979a)  
Drug or radiation changes to the host which could affect the outcome of combined modality therapy  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5, 1151-1163
- Brown JM (1979b)  
Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation  
Br. J. Radiol. 52, 650-656
- Brown JM (1993)  
SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours  
Br. J. Cancer 67, 1163-1170
- Brown JM (2000)  
Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies  
Mol. Med. Today 6, 157-162
- Brown JM, Giaccia AJ (1998)  
The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy  
Cancer Res. 58, 1408-1416
- Brown JM, Lemmon MJ (1990)  
Potentiation by the hypoxic cytotoxin SR 4233 of cell killing produced by fractionated irradiation of mouse tumors  
Cancer Res. 50, 7745-7749

## LITERATURLISTE

---

- Brown JM, Lemmon MJ (1991)  
Tumor hypoxia can be exploited to preferentially sensitize tumors to fractionated irradiation  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 20, 457-461
- Brown JM, Siim BG (1996)  
Hypoxia-Specific Cytotoxins in Cancer Therapy  
Semin. Radiat. Oncol. 6, 22-36
- Brown JM, Twentyman PR, Zamvil SS (1980)  
Response to the RIF-1 tumor in vitro and in C3H/Km mice to X-radiation (cell survival, regrowth delay, and tumor control), chemotherapeutic agents, and activated macrophages  
J. Natl. Cancer Inst. 64, 605-611
- Brown JM, Wang LH (1998)  
Tirapazamine: laboratory data relevant to clinical activity  
Anticancer Drug Des. 13, 529-539
- Chaplin DJ, Olive PL, Durand RE (1987)  
Intermittent blood flow in a murine tumor: radiobiological effects  
Cancer Res. 47, 597-601
- Costa AK, Baker MA, Brown JM, Trudell JR (1989)  
In vitro hepatotoxicity of SR 4233 (3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4-dioxide), a hypoxic cytotoxin and potential antitumor agent  
Cancer Res. 49, 925-929
- Daugaard G, Abildgaard U (1989)  
Cisplatin nephrotoxicity. A review.  
Cancer Chemother. Pharmacol. 25, 1-9
- Daugaard G, Abildgaard U, Olstein-Rathlou NH, Leyssac PP, Emtorp O, Dikhoff TG (1986)  
Acute effect of cisplatin on renal hemodynamics and tubular function in dog kidneys.  
Ren. Physiol. 9, 308-316
- Delahoussaye YM, Evans JW, Brown JM (2001)  
Metabolism of tirapazamine by multiple reductases in the nucleus  
Biochem. Pharmacol. 62, 1201-1209
- Dorie MJ, Brown JM (1993)  
Tumor-specific, schedule-dependent interaction between tirapazamine (SR 4233) and cisplatin  
Cancer Res. 53, 4633-4636
- Dorie MJ, Kallman RF, Cebulska-Wasilewska A (1991)  
Interleukin-1 modification of the effects of cyclophosphamide and fractionated irradiation.  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 20, 311-314

- Dorie MJ, Menke D, Brown JM (1994)  
 Comparison of the enhancement of tumor responses to fractionated irradiation by SR 4233 (tirapazamine) and by nicotinamide with carbogen  
 Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 28, 145-150
- Durand RE, Olive PL (1997)  
 Physiologic and cytotoxic effects of tirapazamine in tumor-bearing mice  
 Radiat. Oncol. Invest. 5, 213-219
- Elwell JH, Siim BG, Evans JW, Brown JM (1997)  
 Adaptation of human tumor cells to tirapazamine under aerobic conditions: implications of increased antioxidant enzyme activity to mechanism of aerobic cytotoxicity  
 Biochem. Pharmacol. 54, 249-257
- Endrich B VP (1995)  
 Tumoral vascular density in breast tumors and their effect on recurrence-free survival.  
 Chirurg 66, 76-77
- Evans JW, Yudoh K, Delahoussaye YM, Brown JM (1998)  
 Tirapazamine is metabolized to its DNA-damaging radical by intranuclear enzymes  
 Cancer Res. 58, 2098-2101
- Fritz-Niggli H. (1991)  
 Strahlengefährdung/Strahlenschutz  
 Huber, Bern, 3. Auflage, S. 43
- Gandara DR, Lara PN, Jr., Goldberg Z, Le QT, Mack PC, Lau DH, Gumerlock PH (2002)  
 Tirapazamine: prototype for a novel class of therapeutic agents targeting tumor hypoxia  
 Semin. Oncol. 29, 102-109
- Giaccia AJ, Biedermann KA, Tosto LM, Minchinton AI, Kovacs MS, Brown JM (1992)  
 Characterization of a CHO cell line resistant to killing by the hypoxic cell cytotoxin SR 4233  
 Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 22, 681-684
- Go RS, Adjei AA (1999)  
 J. Clin. Oncol. 17, 409-422
- Graham MA, Senan S, Robin H, Jr., Eckhardt N, Lendrem D, Hincks J, Greenslade D, Rampling R, Kaye SB, von Roemeling R, Workman P (1997)  
 Pharmacokinetics of the hypoxic cell cytotoxic agent tirapazamine and its major bioreductive metabolites in mice and humans: retrospective analysis of a pharmacokinetically guided dose-escalation strategy in a phase I trial  
 Cancer Chemother. Pharmacol. 40, 1-10

- Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA (1953)  
The concentration of oxygen dissolved in tissue at the time of irradiation as a factor in radiotherapy  
Br. J. Radiol. 26, 638-648
- Griffiths JR, Robinson SP (1999)  
The OxyLite: a fibre-optic oxygen sensor  
Br. J. Radiol. 72, 627-630
- Groshar D, McEwan AJ, Parliament MB, Urtasun RC, Golberg LE, Hoskinson M, Mercer JR, Mannan RH, Wiebe LI, Chapman JD (1993)  
Imaging tumor hypoxia and tumor perfusion  
J. Nucl. Med. 34, 885-888
- Hacker MP (1991)  
The toxicity of anticancer drugs  
McGraw-Hill, New York, 1. Auflage, S. 82-97
- Halpern HJ, Yu C, Peric M, Barth E, Grdina DJ, Teicher BA (1994)  
Oxymetry deep in tissues with low-frequency electron paramagnetic resonance  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91, 13047-13051
- Hardaker WTJ, Stone RA, McCoy R (1974)  
Platinum nephrotoxicity.  
Cancer 34, 1030-1032
- Herscher LL, Krishna MC, Cook JA, Coleman CN, Biaglow JE, Tuttle SW, Gonzalez FJ, Mitchell JB (1994)  
Protection against SR 4233 (Tirapazamine) aerobic cytotoxicity by the metal chelators desferrioxamine and tiron  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 30, 879-885
- Hieber E, Ottenjann S, Künzel G, Adam M, Erhardt W, Molls M (2001)  
Ringapparatur für Inhalationsnarkose an Mäusen  
DEGRO 2001
- Hodgkiss RJ, Webster L, Wilson GD (1997)  
Measurement of hypoxia in vivo using a 2-nitroimidazole (NITP)  
Adv. Exp. Med. Biol. 428, 61-67
- Höckel M, Vaupel P (2001a)  
Biological consequences of tumor hypoxia  
Semin. Oncol. 28, 36-41
- Höckel M, Vaupel P (2001b)  
Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects  
J. Natl. Cancer Inst. 93, 266-276

- Hull EL, Conover DL, Foster TH (1999)  
 Carbogen-induced changes in rat mammary tumour oxygenation reported by near infrared spectroscopy  
 Br. J. Cancer 79, 1709-1716
- Hunjan S, Mason RP, Constantinescu A, Peschke P, Hahn EW, Antich PP (1998)  
 Regional tumor oximetry: <sup>19</sup>F NMR spectroscopy of hexafluorobenzene  
 Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 41, 161-171
- Kallinowski F, Zander R, Hoeckel M, Vaupel P (1990)  
 Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO<sub>2</sub>-histography  
 Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 19, 953-961
- Koch CJ (1993)  
 Unusual oxygen concentration dependence of toxicity of SR-4233, a hypoxic cell toxin  
 Cancer Res. 53, 3992-3997
- Koh WJ, Rasey JS, Evans ML, Grierson JR, Lewellen TK, Graham MM, Krohn KA, Griffin TW (1992)  
 Imaging of hypoxia in human tumors with [F-18]fluoromisonidazole  
 Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 22, 199-212
- Lartigau E, Guichard M (1996)  
 The effect of tirapazamine (SR-4233) alone or combined with chemotherapeutic agents on xenografted human tumours  
 Br. J. Cancer 73, 1480-1485
- Lord EM, Harwell L, Koch CJ (1993)  
 Detection of hypoxic cells by monoclonal antibody recognizing 2- nitroimidazole adducts  
 Cancer Res. 53, 5721-5726
- Madias NE, Harrington JT (1978)  
 Platinum nephrotoxicity  
 Am. J. Med. 65, 307-314
- Minchinton AI, Brown JM (1992)  
 Enhancement of the cytotoxicity of SR 4233 to normal and malignant tissues by hypoxic breathing  
 Br. J. Cancer 66, 1053-1058
- Molls M, Vaupel P (1998)  
 Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Implications for Clinical Radiooncology  
 In: M. Molls and P. Vaupel (Hrsg.) Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Implications for Clinical Radiooncology Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 68-90

## LITERATURLISTE

---

- O'Dwyer PJ, Stevenson JP, Johnson SW (2000)  
Clinical pharmacokinetics and administration of established platinum drugs.  
Drugs. 59, 19-27
- Ottenjann S, (2003)  
Auswirkungen von Tirapazamine in Kombination mit cis-Platin und Bestrahlung auf die Organe der tumortragenden Maus – Histologische Untersuchung -  
Vet.med.Diss München 2003
- Pascoe JM, Roberts JJ (1974a)  
Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. I. DNA interstrand cross-linking and cytotoxic properties of platinum(II) compounds  
Biochem. Pharmacol. 23, 1359-1365
- Pascoe JM, Roberts JJ (1974b)  
Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds. II. Interstrand cross-linking of isolated and cellular DNA by platinum(IV) compounds  
Biochem. Pharmacol. 23, 1345-1357
- Patterson AV, Barham HM, Chinje EC, Adams GE, Harris AL, Stratford IJ (1995)  
Importance of P450 reductase activity in determining sensitivity of breast tumour cells to the bioreductive drug, tirapazamine (SR 4233)  
Br. J. Cancer 72, 1144-1150
- Patterson AV, Robertson N, Houlbrook S, Stephens MA, Adams GE, Harris AL, Stratford IJ, Carmichael J (1994)  
The role of DT-diaphorase in determining the sensitivity of human tumor cells to tirapazamine (SR 4233)  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 29, 369-372
- von Pawel J, von Roemeling R, Gazemeier U, Boyer M, Elisson LO, Clark P, Talbot D, Rey A, Butler TW, Hirsh V, Olver I, Bergmann B, Ayoub J, Richardson G, Dunlop D, Arcenas A, Vescio R, Viallet J, Treat J (2000)  
Tirapazamine plus cis-Platin versus cis-Platin in advanced non-small-cell lung cancer: A report of the international CATAPULT I study group. Cis-Platin and Tirapazamine in Subjects with advanced previously untreated non-small-cell lung tumors.  
J. Clin. Oncol.; 18:1351-9
- Piel IJ, Meyer D, Perlia CP, Wolfe VI (1974)  
Effects of cis-diamminedichloroplatinum (NSC-119875) on hearing function in man.  
Cancer Chemother. Rep. 58, 871-875
- Pinto AL LSJ (1985)  
Binding of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) to DNA.  
Biochim. Biophys. Acta 780, 167-180
- Raleigh JA, Dewhirst MW, Thrall DE (1996)  
Measuring tumor hypoxia  
Semin. Radiat. Oncol. 6, 37-45

- Reed E, Kohn EC, Sarosy G, Dabholkar M, Davis P, Jacob J, Maher M (1995)  
 Paclitaxel, cisplatin, and cyclophosphamide in human ovarian cancer: molecular rationale and early clinical results.  
 Semin. Oncol. 22, 90-96
- Reeve JG, Twentyman PR (1982)  
 Ploidy distribution of tumour cells derived from induced and spontaneously arising metastases of a murine radiation-induced sarcoma, RIF-1  
 Eur. J. Cancer Clin.Oncol. 18, 1001-1006
- Rofstad EK, Fenton BM, Sutherland RM (1988)  
 Intracapillary HbO<sub>2</sub> saturations in murine tumours and human tumour xenografts measured by cryospectrophotometry: relationship to tumour volume, tumour pH and fraction of radiobiologically hypoxic cells  
 Br. J. Cancer 57, 494-502
- Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ (1967)  
 The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes.  
 J. Biol. Chem. 242, 1347-1352
- Sauer R (1998)  
 Strahlentherapie und Onkologie für MTA-R  
 Urban&Fischer, München, 3. Auflage, S. 118
- Saunders MP, Patterson AV, Chinje EC, Harris AL, Stratford IJ (2000)  
 NADPH:cytochrome c (P450) reductase activates tirapazamine (SR4233) to restore hypoxic and oxycytotoxicity in an aerobic resistant derivative of the A549 lung cancer cell line  
 Br. J. Cancer 82, 651-656
- Schaefer C, Okunieff P, Vaupel P (1992)  
 Oxygenation and bioenergetic status of murine fibrosarcomas  
 Adv. Exp. Med. Biol. 317, 161-167
- Shah-Yukich AA, Nelson AC (1988)  
 Characterization of solid tumor microvasculature: a three-dimensional analysis using the polymer casting technique  
 Lab. Invest. 58, 236-244
- Sharp SY, Kelland LR, Valenti MR, Brunton LA, Hobbs S, Workman P (2000)  
 Establishment of an isogenic human colon tumor model for NQO1 gene expression: application to investigate the role of DT-diaphorase in bioreductive drug activation in vitro and in vivo  
 Mol. Pharmacol. 58, 1146-1155
- Siemann DW, Hinchman CA (1998)  
 Potentiation of cisplatin activity by the bioreductive agent tirapazamine  
 Radiother. Oncol. 47, 215-220

Siim BG WWR (1995)

Efficient redox cycling of nitroquinoline bioreductive drugs due to aerobic nitroreduction in Chinese hamster cells.

Biochem. Pharmacol. 50, 75-82

Siim BG, Menke DR, Dorie MJ, Brown JM (1997)

Tirapazamine-induced cytotoxicity and DNA damage in transplanted tumors: relationship to tumor hypoxia

Cancer Res. 57, 2922-2928

Stubbs M, Griffiths JR (1999)

Monitoring cancer by magnetic resonance

Br. J. Cancer 80 Suppl 1, 86-94

Sundquist WI, Lippard SJ, Stollar BD (1986)

Binding of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) to deoxyribonucleic acid exposes nucleosides as measured immunochemically with anti-nucleoside antibodies.

Biochemistry 25, 1520-1524

Thomlinson RH, Gray LH (1955)

The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy.

Brit. J. Cancer 9, 539-549

Treat J, Johnson E, Langer C, Belani C, Haynes B, Greenberg R, Rodriguez R, Drobins P, Miller W Jr, Meehan L, McKeon A, Devin J, von Roemeling R, Viallet J (1998)

Tirapazamine with cis-Platin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study.

J. Clin. Oncol.; 16: 3524-3527

Twentyman PR (1980)

Experimental chemotherapy studies: intercomparison of assays

Br. J. Cancer Suppl. 41, 279-287

Twentyman PR, Brown JM, Gray JW, Franko AJ, Scoles MA, Kallman RF (1980)

A new mouse tumor model system (RIF -1) for comparison of end-point studies

J. Natl. Cancer Inst. 64, 595-604

Urtasun RC, Chapman JD, Raleigh JA, Franko AJ, Koch CJ (1986)

Binding of <sup>3</sup>H-misonidazole to solid human tumors as a measure of tumor hypoxia

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 12, 1263-1267

Vaupel P (1992)

Physiological properties of malignant tumours

Biomed. 5, 220-225

- Walenta S, Dellian M, Goetz AE, Mueller-Klieser W (1994)  
Correlation between regional ATP and blood flow in tumors and surrounding normal tissue  
Adv. Exp. Med. Biol. 345, 387-393
- Walton MI, Workman P (1993)  
Pharmacokinetics and bioreductive metabolism of the novel benzotriazine di-N-oxide hypoxic cell cytotoxin tirapazamine (WIN 59075; SR 4233; NSC 130181) in mice  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 265, 938-947
- Wang J, Biedermann KA, Wolf CR, Brown JM (1993)  
Metabolism of the bioreductive cytotoxin SR 4233 by tumour cells: enzymatic studies  
Br. J. Cancer 67, 321-325
- Wilson DF, Cerniglia GJ (1992)  
Localization of tumors and evaluation of their state of oxygenation by phosphorescence imaging  
Cancer Res. 52, 3988-3993
- Wiltshaw E, Carr B (1974)  
Cis-Platinum(II)diamminedichloride. Clinical experience of the Royal Marsden Hospital and Institute of Cancer Research, London  
Recent Results Cancer Res. 48, 178-182
- Wouters BG, Delahoussaye YM, Evans JW, Birrell GW, Dorie MJ, Wang J, MacDermid D, Chiu RK, Brown JM (2001)  
Mitochondrial dysfunction after aerobic exposure to the hypoxic cytotoxin tirapazamine  
Cancer Res. 61, 145-152
- Zander R, Vaupel P (1985)  
Proposal for using a standardized terminology on oxygen transport to tissue  
Adv. Exp. Med. Biol. 191, 965-970
- Zeman EM, Baker MA, Lemmon MJ, Pearson CI, Adams JA, Brown JM, Lee WW, Tracy M (1989)  
Structure-activity relationships for benzotriazine di-N-oxides  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 977-981
- Zeman EM, Brown JM (1989)  
Pre- and post-irradiation radiosensitization by SR 4233  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 967-971
- Zeman EM, Brown JM, Lemmon MJ, Hirst VK, Lee WW (1986)  
SR-4233: a new bioreductive agent with high selective toxicity for hypoxic mammalian cells.  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 12, 1239-1242

**8      TABELLENVERZEICHNIS**

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Übersicht über die Gesamtheit der verwendeten Versuchstiere.....   | 18 |
| Tabelle 2: Versuchsgruppen zur Dosisfindung.....  | 29 |
| Tabelle 3: Versuchsgruppen im Hauptversuch.....   | 30 |
| Tabelle 4 Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe „KU“.<br>.....  | 35 |
| Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe „KB“<br>.....  | 37 |
| Tabelle 6: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe „KTB“<br>.....   | 39 |
| Tabelle 7: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Kontrollgruppe<br>„KCB“.....  | 41 |
| Tabelle 8: Übersicht des Allgemeinbefindens und Verhaltensmerkmale der Gruppen<br>mit kombinierter Radiochemotherapie mit Tirapazamine und cis-Platin und<br>Dauer der Erholungsphase nach Behandlungsende..... | 43 |
| Tabelle 9: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe „7“<br>.....   | 44 |
| Tabelle 10: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe<br>„14“.....  | 46 |
| Tabelle 11: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe<br>„18“.....  | 48 |
| Tabelle 12: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe<br>„21“.....  | 51 |
| Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung der Einzeldaten der Therapiegruppe<br>„28“.....  | 53 |
| Tabelle 14: Zusammenfassende Darstellung aller Gruppenergebnisse der $t_{2V_0}$ ,<br>Letalität, Mittleres Tumolvolumen $T_0$ und mittleres Gewicht $T_0$ .....  | 57 |

**9      ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Zellteilungszyklus mit eingeteilten Zyklusphasen (modifiziert nach Fritz-Niggli (1991)).....  | 5  |
| Abbildung 2: Intrazellulärer Stoffwechsel von Tirapazamine unter hypoxischen Bedingungen (modifiziert nach BROWN 1993) .....   | 8  |
| Abbildung 3: RIF -1-Tumor auf dem Fußrücken des rechten hinteren Laufes einer C3H-Maus .....   | 20 |
| Abbildung 4: Übersicht des fraktionierten Behandlungsschema.....   | 21 |
| Abbildung 5: Röntgenstrahlgerät RT 100 mit aufgesetztem Tubus über der Narkose-Ring-Apparatur.....   | 22 |
| Abbildung 6: Narkosekammer zur Einleitung der Inhalationsnarkose. Rechts und links Anschlüsse für das Narkosegerät.....  | 23 |
| Abbildung 7: Narkose-Ring-Apparatur mit sechs, unter Vollnarkose fixierten C3H-Mäusen.....   | 24 |
| Abbildung 8: Intra-peritoneale Injektion von TPZ in der linea alba einer C3H-Maus..  | 25 |
| Abbildung 9: Messung der Tumorbreite am rechten Hinterlauf einer C3H-Maus mit Hilfe einer Schublehre. ....   | 26 |
| Abbildung 10: Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KU“.....   | 34 |
| Abbildung 11: Mittleres Tumolvolumen der Kontrollgruppe „KU“ mit Darstellung der exponentiellen Regressionskurve des mittleren Tumolvolumens der Kontrollgruppe „KU“. .... | 35 |
| Abbildung 12: Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KB“ . ....   | 36 |
| Abbildung 13: Mittleres Tumolvolumen der Kontrollgruppe „KB“ . ....  | 37 |
| Abbildung 14: Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KTB“ .....   | 38 |
| Abbildung 15: Mittleres Tumolvolumen der Kontrollgruppe „KTB“.....   | 39 |
| Abbildung 16: Mittleres Körpergewicht der Kontrollgruppe „KCB“ . ....  | 40 |
| Abbildung 17: Mittleres Tumolvolumen der Kontrollgruppe „KCB“ . ....   | 41 |
| Abbildung 18: Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „7“ .....   | 43 |
| Abbildung 19: Mittleres Tumolvolumen der Therapiegruppe „7“.....   | 44 |
| Abbildung 20: Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „14“.....   | 45 |
| Abbildung 21: Mittleres Tumolvolumen der Therapiegruppe „14“.....  | 46 |
| Abbildung 22: Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „18“.....   | 47 |
| Abbildung 23: Mittleres Tumolvolumen der Therapiegruppe „18“.....  | 48 |
| Abbildung 24: Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „21“.....   | 49 |
| Abbildung 25: Mittleres Tumolvolumen der Therapiegruppe „21“.....  | 50 |
| Abbildung 26: Mittleres Körpergewicht der Therapiegruppe „28“.....   | 52 |
| Abbildung 27: Mittleres Tumolvolumen der Therapiegruppe „28“.....  | 53 |

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 28: Darstellung der gemittelten minimalen Körpergewichte der einzelnen Versuchsgruppen. ....                    | 55 |
| Abbildung 29: Darstellung der Einzelergebnisse Tumervolumen-Verdoppelungszeit $t_{2V_0}$ und Letalität aller Gruppen..... | 56 |

**10      ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| %                     | Prozent  |
| [ <sup>123</sup> J]   | Jod 123  |
| [ <sup>18</sup> F]    | Fluor 18   |
| [ <sup>19</sup> F]    | Fluor 19   |
| [ <sup>1</sup> H]     | Wasserstoff                                      |
| [rel.]                | relative Skalierung                              |
| °C                    | Grad Celsius                                     |
| µl                    | Mikroliter                                       |
| 2TV <sub>0</sub>      | zwei mal Tumolvolumen am Tag 0 der<br>Behandlung |
| 2TV <sub>0t</sub>     | Tumolvolumenverdoppelungszeit                    |
| ca.                   | circa  |
| CDDP                  | cis-Platin                                       |
| cis-DDP               | cis-Platin                                       |
| Cl                    | Chlor  |
| cm                    | Zentimeter                                       |
| cm <sup>2</sup>       | Quadratcentimeter                                |
| CO <sub>2</sub>       | Kohlendioxid                                     |
| d                     | Tag  |
| DDP                   | cis-Platin                                       |
| DMSO                  | Dimethylsulfoxid                                 |
| DNS                   | Desoxiribonukleinsäure                           |
| E.Coli                | Escherichia Coli                                 |
| EDTA                  | Ethylendiaminteraessigsäure                      |
| FKS                   | Fetales Kälber Serum                             |
| g                     | Gramm  |
| G <sub>0</sub> -Phase | Gap-0-Phase                                      |
| G <sub>1</sub> -Phase | Gap-1-Phase                                      |
| G <sub>2</sub> -Phase | Gap-2-Phase                                      |
| Gy                    | Gray   |
| H <sub>2</sub> O      | Wasser   |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| KGW               | Körpergewicht   |
| kV                | Kilovolt  |
| LD <sub>10</sub>  | Letale Dosis bei der 10% der Tiere sterben                        |
| LD <sub>50</sub>  | Letale Dosis bei der 50% der Tiere sterben                        |
| Lux               | Lichtintensität   |
| Max.              | Maximum   |
| mg/kg             | Milligramm pro Kilogramm  |
| mg/m <sup>2</sup> | Milligramm pro Quadratmeter                                       |
| Min.              | Minimum   |
| min               | Minute  |
| ml                | Milliliter  |
| ml/min            | Milliliter pro Minute   |
| mm <sup>3</sup>   | Kubikmillimeter   |
| mmol/kg           | Millimol pro Kilogramm  |
| MRI               | Magnet Resonance Image  |
| NADPH             | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat                              |
| PBS               | Phosphat gepufferte Kochsalzlösung                                |
| PET               | Positronen Emmissions Tomographie                                 |
| pH                | negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| RNS               | Ribonukleinsäure  |
| rpm               | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)                        |
| SD +/-            | Standartabweichung  |
| SPECT             | Single Photon Emission Computed Tomography                        |
| S-Phase           | Synthese-Phase  |
| SR 4317           | reduziertes Tirapazamine  |
| SR 4322           | Tirapazamine  |
| T <sub>0</sub>    | Tag 0 der Behandlung  |
| TPZ               | Tirapazamine  |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

|                    |  |
|--------------------|--|
| TV <sub>0</sub>    | Tumorzvolumen am Tag 0 der Behandlung      |
| u. a.              | unter anderem                              |
| Win 59075          | Tirapazamine                               |
| z.B.               | zum Beispiel                               |
| C3H/HeJ            | Mausstamm                                  |
| „7“                | Therapiegruppe mit 7.2 mg/kg KGW TPZ       |
| „14“               | Therapiegruppe mit 14.4 mg/kg KGW TPZ      |
| „18“               | Therapiegruppe mit 18.0 mg/kg KGW TPZ      |
| „21“               | Therapiegruppe mit 21.6 mg/kg KGW TPZ      |
| „28“               | Therapiegruppe mit 28.8 mg/kg KGW TPZ      |
| „KU“               | Kontrollgruppe, unbehandelt                |
| „KB“               | Kontrollgruppe, Bestrahlung                |
| „KCB“              | Kontrollgruppe, Bestrahlung und cis-Platin |
| „KTB“              | Kontrollgruppe, Bestrahlung und TPZ        |
| V79                | Zellstamm                                  |
| HT 1080            | Zellstamm                                  |
| SCC VII            | Zellstamm                                  |
| A549               | Zellstamm                                  |
| HCT-8              | Zellstamm                                  |
| AG 1522            | Zellstamm                                  |
| HA-1               | Zellstamm                                  |
| 10T1/2             | Zellstamm                                  |
| RIF-1              | Zellstamm                                  |
| EMT-6              | Zellstamm                                  |
| KHT/R <sub>0</sub> | Zellstamm                                  |
| HAT 29             | Zellstamm                                  |
| C3H/Km             | Mausstamm                                  |

11 **FIRMENVERZEICHNIS**

Abbot GmbH & Co KG

Max-Planck-Ring 2

D-65205-Wiesbaden

[www.abbott.de](http://www.abbott.de)

Charles River

Sandhofer Weg 7

D-97633-Sulzfeld

[www.criver.com](http://www.criver.com)

Dräger Werke

Moislinger Allee 53/55

D-23542-Lübeck

[www.draeger.com](http://www.draeger.com)

Altromin Gesellschaft für

Tierernährung

Im Seelenkamp 20

D-32791-Lage

[www.altromin.de](http://www.altromin.de)

Heraeus GmbH

Heraeus Str. 12-14

D-63450-Hanau

[www.heraeus.de](http://www.heraeus.de)

Invitrogen GmbH

Technologiepark Karlsruhe

Emmy-Noether-Str. 10

D-76131-Karlsruhe

[www.lifetech.com](http://www.lifetech.com)

Macrolon

Phillips GmbH

Steindamm 94

D-20099-Hamburg

[www.philips.de](http://www.philips.de)

Rennsteig

An der Koppel 1

D-98547-Viernau

[www.rennsteig.com](http://www.rennsteig.com)

Ribosepharm

Berg am Laim Str. 127

D-81673-München

[www.ribosepharm.de](http://www.ribosepharm.de)

## FIRMENVERZEICHNIS

---

Sanofi-Sythelabo

Av. de France

F-75013-Paris

[www.sanofi-synthelabo.com](http://www.sanofi-synthelabo.com)

Sartorius

Weender Landstr. 94-108

D-37075-Göttingen

[www.sartorius.com](http://www.sartorius.com)

Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Grünwalder Weg 30

D-82041-Deisenhofen

[www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com)

Techno Plastic Products AG

Zollstr. 155

CH-8219-Trasadingen

[www.tpp.ch](http://www.tpp.ch)

### 12 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. M. Molls danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Dr. M. Adam danke ich für die Überlassung des interessanten Themas.

Dr. S. Ottenjann danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. W. Erhardt gilt mein besonderer Dank. Seine Bemühungen bei der Vermittlung, der Betreuung und der Korrektur der Arbeit sind beispielhaft. Ebenfalls gilt dieser Dank für die bereitgestellten Räumlichkeiten und Gerätschaften.

Fr. Dr. L. Sprague danke ich sehr herzlich für die geduldige Unterstützung und Korrektur dieser Arbeit.

Prof. Dr. O. Petrovic danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Fr. G. Stejskal danke ich für die Einführung und Unterstützung in der Laborarbeit.

Fr. R. Bergmeyer und ihren Mitarbeitern Hr. Walasch und Hr. Glöde danke ich für die hervorragende Betreuung der Versuchstiere.

Fr. Pohlheimer und ihren Mitarbeiterinnen Fr. Pichotka, Fr. Hertel und Fr. Leucz danke ich für die gute Unterstützung im OP-Bereich.

Hr. G. Günther, Hr. W. Regnet und Hr. S. Straßmeier danke ich für die gute technische Unterstützung.

Für die Durchsicht des Manuskriptes danke ich besonders Ines und Bernhard Hagemeyer, meinem Großvater Lothar von Sternbach und meiner lieben Mutter Veronika Künzel.

Meinen Freunden Thomas, Ewald und meiner zukünftigen Gattin Katharina danke ich für die Begleitung und geduldige Unterstützung in den letzten Jahren.

Meinen Eltern Veronika und Gernot Künzel möchte ich besonders herzlich dafür danken, dass sie mein Studium ermöglicht haben und mich stets bei der Durchführung meiner Ziele unterstützen.

## 13 LEBENS LAUF

Georg KÜNZEL

Geboren am 8. Februar 1970 in Madrid (Spanien)

Eltern

Dipl. Ing. Gernot Künzel, Maschinenbauer

Veronika Künzel, geb. Sternbach, Fremdsprachensekretärin

Schulbildung

1977-1982 Grundschule, Deutschen Schule Madrid (Spanien)

1982-1989 Gymnasium, Deutsche Schule Madrid (Spanien)

5. Mai 1989 Abitur

1991-1993 Berufsausbildung zum Versicherungskaufmann bei der Deutschen Krankenversicherung AG. Hannover

16. Juni 1993 Erwerb des Kaufmanngehilfenbrief

1993-1999 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Sept. 1999 Approbation

März 2000 Beginn der vorliegenden Dissertation

2001-2003 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radiologische Onkologie, Arbeitsgruppe experimentelle Radioonkologie, am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Sept. 2003 Assistent bei Dr. med. vet. G. Korber, Bruck. A.d.G., Österreich