

Universität zu Lübeck
Aus der Medizinischen Klinik I
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**Einfluß von Hyperbarer Sauerstofftherapie auf die therapeutische
Effizienz einer Chemotherapie
bei menschlichen Tumoren im Nacktmausmodell**



Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Rainer Mario Poll
aus Papenburg

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Fischer
Tag der mündlichen Prüfung: 01.04.2009
zum Druck genehmigt: Lübeck, den 01.04.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Meinen Eltern

Das Leben ist eines der Schönsten!

(Dr. Erwin Hauf, Paraguay, 2001)

Universität zu Lübeck
Aus der Medizinischen Klinik I
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**Einfluß von Hyperbarer Sauerstofftherapie auf die therapeutische
Effizienz einer Chemotherapie
bei menschlichen Tumoren im Nacktmausmodell**

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Rainer Mario Poll
aus Papenburg

Lübeck 2008

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin triphosphat
ca.	circa
CO-Vergiftung	Kohlenstoffmonoxid-Vergiftung
DAB	Diaminobenzidin
DNA / DNS	Desoxyribunucleinacid / Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
°C	Grad Celsius
FKS	Fetales Kälberserum
Hb	Hämoglobin
HBO	Hyperbare Oxygenation, Hyperbare Sauerstofftherapie
HE	Hämatoxylin-Eosin
Ifo	Ifosfamid
KG	Körpergewicht
LSAB-Methode	Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode
min	Minuten
MTP	Mikrotiterplatten
MW	Mittelwerte
µl	Mikroliter
NAD-PH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat,
OD	Optischen Dichte
OP	Operation
pO₂	pressure Oxygen = Sauerstoffpartialdruck
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribunucleinacid, Ribunukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard error of the main
Temp.	Temperatur
VEGF	vascular endothel growth factor
W	Watt
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsübersicht

<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	5
-------------------------------------	----------

<u>Inhaltsübersicht</u>	6
--------------------------------	----------

I. Einleitung und Fragestellung

I.1	Tumorhypoxie in der heutigen Tumorthherapie	9
I.2	Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO) und Tumoroxygenierung	10
I.3	Abhängigkeit der Alkylantien und des Zellzyklus von Sauerstoff	13
I.4	Fragestellung	17

II.1 Material und Methoden

II.1.1	Tumorzellen, Mx1 und S117	18
II.1.2.1	NMRI-Mäuse	18
II.1.2.2	Nu/Nu-Nacktmäuse	18
II.1.3	Ifosfamid	19
II.1.4	Blutbildbestimmungen	19
II.1.5	Hyperbare Sauerstofftherapie in der Dräger-Druckkammer	19

II.2 Versuchsdurchführungen

II.2.1	Hyperbarer Sauerstoff und Therapieschemata	22
II.2.2	Kammerbedienung und Anwendung der Therapie	23
II.2.3	Temperaturmeßversuche in der Druckkammer	24
II.2.4	Toxizität von Ifosfamid unter Hyperbarer Sauerstofftherapie	24
II.2.5.1	Blutabnahmen an NMRI-Mäusen	25
II.2.5.2	Narkose der Versuchstiere	25
II.2.5.3	Intravenöse Injektion	25
II.2.6.1	Aufarbeitung von cryokonserviertem Tumormaterial	26
II.2.6.2	Transplantation, Lokalisation der Tumoren an Flanke oder Pfote	26
II.2.6.2	Bestimmung und Berechnung des Tumolvolumens	28
II.2.7.1	Anfertigung der Tumorgewebeschnitte	29
II.2.7.2	Ki-67-Färbungen (Kaninchen-Anti-Human) der Mikrotomschnitte mittels Immunhistochemie nach der Labelled StreptAvidin-Biotin-Methode	29
II.2.7.3	Bilderfassung der Histologie auf einem digitalen Datenträger	32
II.2.8	Kristallviolett-Färbungen in der Zellkultur	34
II.2.9	Zellkultur, Wachstumsversuche in Hypoxie und Normoxie	35

III. Ergebnisse	36
III.1 Toxizitätsversuche mit Ifosfamidgabe vor 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie an NMRI-Mäusen	36
III.2.1 Versuche mit Ifosfamidgabe vor 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit Mx1-Tumoren	38
III.2.2 Versuche mit Ifosfamidgabe während 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit Mx1-Tumoren	39
III.2.3 Versuche mit Ifosfamidgabe während 4 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit Mx1-Tumoren	40
III.3.1 Versuche mit Ifosfamidgabe vor 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit S117-Tumoren wie unter III.2.1	42
III.3.2 Versuche mit Ifosfamidgabe während 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit S117-Tumoren wie unter III.2.2	43
III.3.3 Versuche mit Ifosfamidgabe während 4 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit S117-Tumoren wie in III.2.3	44
III.4 Einfluß der Hyperbaren Sauerstofftherapie auf die Proliferationsrate der Tumorzellen in der Immunhistochemischen Ki-67-Darstellung	45
III.5 Zellkultur zur Prüfung einer Hypoxieadaptation der S117-Tumorzellen	48
IV. Diskussion	50
IV.1 Ergebnisse im Lichte der aktuellen Literatur	50
IV.2 Kombinationen von Hyperbarer Sauerstofftherapie in weiteren Therapieansätzen, Ausblick	59
IV.3 Fazit	60
V. Zusammenfassung	62
VI. Literaturverzeichnis	64
VII. Anhänge	78
VII.1 Präparate/Herkunftsnachweise/Adressen/Tabellen	78
1. Tierversuchsantrag	78
2. Reagentien/ Präparate/etc. (alphabetisch)	78
3. Geräte /Programme (alphabetisch)	78

4.	Statistik	79
5.	Einzeltablelle Temperaturmessungen, rektal	79
6.	Arbeitsgruppe „Hyperbare Sauerstofftherapie“	79

VIII. Danksagung **80**

IX. Lebenslauf **81**

Aus der Arbeit mit hervorgegangene Beiträge/Veröffentlichungen: **83**

I. Einleitung und Fragestellung

I.1. Tumorhypoxie in der heutigen Tumorthherapie

Malignen Tumoren kann in der modernen Medizin therapeutisch unterschiedlich begegnet werden. Neben dem operativen Ansatz basiert der heutige therapeutische Standard im Wesentlichen auf zytostatischer Chemotherapie, Strahlentherapie, Hormontherapie und auf Antikörpertherapie (Schmid und Possinger, 2000, Sayer und Höffken, 2003, Schneeweis et al., 2003, Untch et al., 2006). Diese Behandlungsstrategien sind verschieden wirksam. Eine wichtige Rolle in der Therapie solider Tumore spielt deren Oxygenierung und Stoffwechselsituation. Der überwiegende Anteil menschlicher Zellen benötigt zur Zellatmung Sauerstoff. Der Sauerstoff wird im Citratzyklus bei dem Vorgang der oxidativen Phosphorylierung zur Gewinnung von Energie in Form von ATP und NAD-PH benötigt. Zellen sind jedoch auch in Abwesenheit von Sauerstoff in der Lage Energie zu gewinnen. Dies erklärt ein Überleben oder sogar das Wachstum von Zellen in Hypoxie. Maligne Tumore bestehen aus genetisch instabilen heterogenen Zellpopulationen innerhalb derer sich Areale unterschiedlichster Mikrozirkulation, Sauerstoffversorgung, Säure-Basen-Homöostase und Energiestoffwechselsituation in unmittelbarer Nachbarschaft finden. Normoxische Areale existieren neben hypoxischen Arealen. Als Ursache konnten Vaupel et al., 1997 größtenteils eine chaotische Gefäßarchitektur im Tumorgewebe verantwortlich machen. Bis zu einer Größe von ca. 1-2 mm können Tumorzellen ohne Gefäßanbindung wachsen und werden per diffusionem ernährt. Bei weiterer Größenzunahme ergeben sich Mangelversorgungen durch unphysiologisch lange Diffusionswege zwischen Blutgefäßen und Tumorzellen. Gimbrone et al., konnten 1972 zeigen, daß Tumore ab dieser Größe beginnen, Tumor-Angiogenese-Faktoren wie z.B. den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zu produzieren (Gimbrone et al., 1972). VEGF induziert das Einsprossen von Mikrogefäßen in Tumore und sichert auf diese Weise deren Nährstoff-Sauerstoffversorgung und ermöglicht ein Tumorstadium über die genannten Größen von ca. 1-2 mm hinaus (Folkman, 1985, Folkman und Klagsbrun, 1987). Die neuen Gefäßstrukturen weisen jedoch strukturelle und funktionelle Anomalien im Vergleich zu gesunden Gefäßen auf und bedingen durch Störungen der Mikrozirkulation das Entstehen hypoxischer und malnutritiver Tumorareale. Der normale Sauerstoffpartialdruck (pO_2) im Gewebe beträgt 25–65 mmHg. Dies wird als normoxisch bezeichnet. Als hypoxisch gilt ein $pO_2 \leq 5$ mmHg (Vaupel et al., 1997). Die Existenz solcher hypoxischen Areale im Tumorgewebe wurde schon 1955 über die histologische Photomikrographie von Thomlinson und Gray, 1955 am Bronchialcarcinom

nachgewiesen. Hypoxische Areale konnten mittlerweile in verschiedenen Tumorentitäten in unterschiedlicher Ausprägung beschrieben werden (Beinert et al., 1999). Für die Tumorthherapie ist die Hypoxie im Tumor bedeutsam, da sie die Wirksamkeit einer Therapie deutlich beeinträchtigen kann. Bekannt ist, dass hypoxische Tumorzellen weit weniger auf die bekannten Therapiemethoden ansprechen als normoxische Tumorzellen und daß diese Zellen aus dem Zellzyklus austreten können (Brizel et al 1995, Beinert et al., 1999). Diese Zellen können nach Erreichen einer Remission als Ausgangspunkt für Rezidive angesehen werden (DeCosse und Rogers, 1966, Shewell und Thompson, 1980). Tumore mit einem hohen Anteil an hypoxischen Arealen weisen zudem eine deutlich erhöhte Rate zur Bildung von Metastasen auf und besitzen eine schlechtere Prognose als normoxische Tumore (Brizel et al., 1996, Höckel et al., 1996, Beinert et al., 1999). Hypoxie induziert im Genom von Tumorzellen eine Resistenzbildung gegenüber verschiedenen Therapiemethoden, wie der Chemotherapie oder der Strahlentherapie und begünstigt durch eine Vielzahl an Neumutationen neben der Resistenzbildung eine zunehmende Tumoraggressivität (Teicher, 1994, Reynolds et al., 1996, Vaupel et al., 2001 u. 2004). Somit ist der Oxygenierungsstatus in Tumoren für das Therapieergebnis von großer Bedeutung.

1.2 Hyperbare Sauerstofftherapie (HBO) und Tumoroxygenierung

Der Transport von Sauerstoff im menschlichen Organismus erfolgt im Blut unter atmosphärischen Normbedingungen hauptsächlich über Bindung an das in den Erythrozyten vorhandene Hämoglobin und in geringem Maße über physikalisch im Blutplasma gelösten Sauerstoff. Beim Blutplasma handelt es sich de facto um eine Flüssigkeit. Der physikalisch im Plasma gelöste Sauerstoff verhält sich daher den Gasdruckgesetzen von Boyle-Mariotte, Dalton und Henry zufolge proportional zum Umgebungspartialdruck. Unter atmosphärischen Normbedingungen ist dieser Anteil mit einem pO_2 von 70 bis 120 mmHg im Blut und im Gewebe mit einem pO_2 von 25 bis maximal 65 mmHg eher gering. Den Gasdruckgesetzen entsprechend läßt sich durch eine HBO bei einer Verdreifachung des Druckes bei 100 Prozent Sauerstoff-Inhalation der pO_2 sowohl im Blut, im gesunden Gewebe als auch im Tumorgewebe auf über 2000 mmHg erhöhen (Camporesi, 1996, Brizel et al., 1997). Dies bietet über eine HBO die Möglichkeit auch hypoxische Areale in Tumoren besser zu oxygenieren (Daruwalla und Christophi, 2006). Definiert wird eine HBO als eine medizinische Therapie, bei der ein Patient 100 % Sauerstoff atmet während er einem Überdruck ausgesetzt ist (Kindwall und Goldmann, 1995, Camporesi, 1996, Almeling und

Weslau, 1996). Mittels einer HBO läßt sich der pO_2 in Tumorgewebe nicht nur während, sondern noch 25 min nach Ende einer HBO deutlich erhöhen (Becker et al., 2002).

Die HBO ist ein etabliertes Verfahren in der Medizin, das ursprünglich zur Behandlung der Dekompressionskrankheit, arterieller Gasembolien im ZNS und Kohlenmonoxid-Vergiftungen entwickelt wurde (Molbo, 1967). In den „US Navy and Royal Navy diving treatment tables“, wurden Internationale Therapieschemata unterschiedlichen Charakters zur HBO zusammengefasst, die mittlerweile überwiegend in der Tauchmedizin Anwendung finden (Doll, 1965, Plafki, 1997, Carl et al., 1998). In der Bundesrepublik Deutschland wurde die HBO am 22. November 1994 im Bundesausschuß für Ärzte und Krankenkassen ohne Differenzierung nach Indikationen zur Therapie zugelassen. Mittlerweile gibt es aus Kostengründen Einschränkungen. Weltweit anerkannte Indikationen sind der akute Hörsturz, das akute Knalltrauma, die Otitis externa necroticans, Clostridiale Myonekrosen (Gasbrand-Infektionen), Crush-Verletzungen, die chronische Strahlencystitis, sowie auch die Prophylaxe der Osteoradionekrose bei Zahnbehandlungen nach Bestrahlungen (Kindwall und Goldmann, 1995, Almeling und Weslau, 1996, Overgaard und Horsmann, 1996).

Die Behandlung des Menschen mit Sauerstoff als Medizinische Therapie ist seit Anfang des neunzehnten Jahrhunderts bedeutsam (Strätling und Schmucker, 2002, 2003). Im Jahre 1923 wurde von Petry die biologische Wirkung von Sauerstoff in Geweben in Kombination mit Therapien wie der Röntgenstrahlung untersucht und beschrieben. Je höher der Sauerstoffanteil war, umso stärker war die Strahlenwirkung auf das behandelte Gewebe (Petry, 1923). Untersuchungen zur Wirkung von HBO auf Tumorzellen fanden bereits 1953 statt (Warburg, 1953). Anfang der sechziger Jahre wurde die therapeutische Wirkung einiger Chemotherapeutika wie dem Cyclophosphamid unter HBO nachgewiesen (Krementz und Knudsen, 1961, Leather und Eckert, 1963, DeCosse und Rogers, 1966, Suit et al., 1966). Anfang der achtziger Jahren wurde in mehreren Arbeitsgruppen, unter anderem der von Teicher die Kombination von Sauerstoff mit verschiedenen Chemotherapien in der Behandlung maligner Tumore intensiv untersucht. Am Tier oder in vitro konnten durch die Kombination von HBO mit einer Strahlentherapie oder auch Chemotherapeutika aus der Gruppe der Alkylantien, wie dem Cyclophosphamid, deutliche Verbesserungen der antiproliferativen Tumorthherapie im Vergleich zu Behandlungen ohne HBO erreicht werden (Teicher et al., 1981, 1988, 1990, 1993). In der Arbeit von Teicher et al., aus dem Jahr 1988 konnte die Wirkung von Cyclophosphamid unter HBO am F5a-II-Fibrosarkom auf Xenograften statistisch sogar als gleichwertig zu den Ergebnissen einer Strahlentherapie unter

HBO beschrieben werden. Allerdings wurde zeitgleich die Sauerstofftransportkapazität im Blut der Versuchstiere mittels Fluosol-DA erhöht. Es handelt sich um einen Sauerstoffchelator, der klinisch keinen festen Eingang in die Tumorthherapie fand. Am Menschen wurde die Kombination von Strahlentherapie mit HBO an bestimmten Tumorentitäten wie z.B. dem Glioblastom ab Mitte der neunziger Jahre in Phase III-Studien untersucht (v.d. Kleij und Voute, 1996, Hartmann et al., 1998, Kohshi et al., 1999, Beppu et al., 2003). Eine jeweilige Therapieverbesserung basierte im Wesentlichen auf einer erhöhten Bildung von Sauerstoffradikalen im Gewebe, die durch eine Erhöhung des im Plasma gelösten physikalischen Anteils an Sauerstoff bewirkt wurde (Brizel et al., 1996, Höckel et al., 1996). In mehreren Studien, z.B. der „COST B14 action Hyperbaric Oxygen Therapie“ wurde und wird international der weitere Nutzen von HBO untersucht und der positive Nutzen auf verschiedene medizinische Anwendungsgebiete weiter verifiziert (Mayer et al., 2005).

Der Höhe und Dauer des Einwirkens von Sauerstoff bei der HBO sind durch die hohe Zelltoxizität des Sauerstoffes selbst jedoch auch Grenzen gesetzt (Horn et al., 2006). Entstehende Sauerstoffradikale zerstören Sulfhydrylbindungen in organischen Molekülen, was zur Peroxidation von Lipiden und Zellmembranen führt, die den Zellhaushalt stören und so z.B. die Abgabe von Neurotransmittern verhindert. Sauerstoffradikale können zu schweren Störungen an der Zellmembran sowie zu Störungen auf DNA- und RNA-Ebene führen und somit gerade in den Zellzyklusphasen Insertionen, Deletionen, Doppelstrangbrüchen oder Basenaustausche verursachen. Je höher die Konzentration an Sauerstoff und je länger die Dauer des Einwirkens ist, desto höher ist der oxydative Stress auf die einzelne Zelle (Dennog et al., 1999, Speit et al., 2002,). Paul Bert beschrieb 1878 erstmals das Auftreten neurologischer Symptome bei Atmung von reinem Sauerstoff und Überdruck („Paul-Bert-Effekt“). Bei längerer Einwirkung und leicht erhöhtem pO_2 wies er die Symptome des Singultus, Skotombildungen beim Sehen, Faszikulationen der N. facialis und der N. phrenicus innervierten Muskulatur und bei stark erhöhtem pO_2 generalisierte Krampfanfälle als Maximalsymptomatik beim Menschen nach. Je höher der auf das Zentrale Nervensystem (ZNS) einwirkende pO_2 ist, desto stärker sind die Symptome (Clark und Fischer, 1977, Kindwall und Goldmann, 1995). Heute erklärt man sich diese Symptome mit der verminderten Abgabe allgemein hemmender Neurotransmitter im ZNS wie Dopamin oder Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) (Wood, 1980). 1899 wurde von J. L. Smith auch eine Veränderung des Lungengewebes und die Verschlechterung verschiedener Atmungsparameter

bei der Atmung von mehr als 50% Sauerstoff bei atmosphärischem Druck beschrieben. Diese Nebenwirkung wird als „Lorrain-Smith-Effekt“ bezeichnet und konnte histologisch in mehrere Phasen unterteilt werden. Bei Atmung von 100% Sauerstoff über 24 Stunden erfährt die Vitalkapazität der Lunge eine Reduktion um 10% des Normwertes. Die Compliance der Lunge reduziert sich bei 100% Sauerstoffatmung über 30 bis 48 Stunden bei normbaren Bedingungen auf ca. 70% des Normalwertes. Im Verlauf fibrosiert das Lungengewebe und wird hypoplastisch. Als weitere Nebenwirkungen einer HBO sind im Allgemeinen auch Barotraumen auf das Mittelohr, der Augen oder die Nasennebenhöhlen sowie auf die Lunge beschrieben (van Laak, 1993). In einer Arbeit von Plafki wurden 1997 weitreichende Untersuchungen über Nebenwirkungen bei Hyperbarer Sauerstofftherapie unter Verwendung kurzzeitiger Expositionsschemata berichtet. Hierbei konnten unter den medizinisch therapeutischen Bedingungen einer HBO keine dauerhafte Schädigungen, z.B. der Lunge festgestellt werden (Plafki, 1997).

1.3 Abhängigkeit der Wirkung der Alkylantien und des Zellzyklus von Sauerstoff

Die Effizienz einer Chemotherapie am Tumor hängt von verschiedenen Faktoren ab. Die Art des Chemotherapeutikums und des Tumors, die Höhe des Wirkspiegels, die Temperatur im Tumor, die Phase des Zellzyklus, in der sich die Tumorzelle gerade befindet, und die Perfusion des Tumors sind beispielsweise entscheidend. Alkylierende Chemotherapeutika wie z.B. die Stickstofflostderivate Cyclophosphamid (**Abb. 1**) (Brade et al., 1985, Marti et al., 1985, Bramwell et al., 1987) und Ifosfamid (**Abb. 1**) (Brüggemann et al., 1997, Kisro et al., 1997, Börner et al., 2000) gehören zu den phasenunabhängigen Chemotherapeutika und haben in der heutigen Tumorthherapie einen festen Stellenwert erreicht. Alkylantien wirken in allen Phasen des Zellzyklus. Ifosfamid ist mit dem Cyclophosphamid eng verwandt und zeigt wie viele weitere Chemotherapeutika so z.B. Bleomycin, Cyclophosphamid oder Doxorubicin unter Hypoxie gegenüber Normoxie eine deutlich verminderte zytoreduktive Wirksamkeit (Teicher et al., 1995, Vaupel et al., 1997, Schmitt et al., 2002, Koch et al., 2003). Allerdings existieren Hinweise, daß eine erhöhte Oxygenierung in Tumoren einen entscheidend positiven Einfluss auf die Wirkung alkylierender Substanzen haben kann (Suit et al., 1966, Teicher et al., 1993, Gulden und Einecke, 2003). In einer Arbeit von Alagoz et al., konnte 1995 in vivo eine verbesserte therapeutische Wirkung des Alkylanzes Cyclophosphamid unter HBO am Ovarial-Karzinom nachgewiesen werden. Im Jahr 2005 nach dem Beginn dieser Dissertation konnte eine Arbeitsgruppe um Granowitz bei einigen Chemotherapeutika wie dem Melphalan, Gemcitabine und dem Paclitaxel unter HBO eine signifikante Verlängerung eines

antiproliferativen Effektes in vitro an Mamma-Adeno-Karzinomzellen zeigen. Möglicherweise gilt dies in selbem oder sogar besserem Maße für das Ifosfamid als alkylierende Substanz (**Abb. 1**). Klinische Untersuchungen zur therapeutische Wirksamkeit von Ifosfamid unter HBO am Menschen existieren bisher noch nicht. Ifosfamid hat wie alle Alkylantien haben seinen Ursprung im Senfgas, das als biologische Waffe 1919 im ersten Weltkrieg eingesetzt wurde. Es wurde 1975 in Deutschland für die Tumorthherapie zugelassen. Seine Halbwertszeit im menschlichen Organismus beträgt 4 bis 6 Stunden. Es unterscheidet sich im Strukturvergleich zum Stickstofflost ebenso wie das Cyclophosphamid durch einen Oxazaphosphorin-Ring (**Abb. 1**) und ist ein Prodrug, welches zunächst in inaktiver Form vorliegt und hauptsächlich in der Leber durch Cytochrom P-450-Oxidase in aktive Metabolite umgewandelt wird. Hierzu zählt das 4-OH-Ifosfamid, das in Ifosfamidmustard und Acrolein zerfällt, ebenso wie die Metabolite 2- und 3- Dichloräthylifosfamid und das Chloracetaldehyd (Wagner, 1994, Brüggemann et al., 1997). Wie alle Alkylantien zeichnen sich die Metabolite des Ifosfamid wegen ihrer chemischen Labilität durch Bildung hochreaktiver Alkylreste aus, die bevorzugt an elektronenreichen, nukleophilen Schwefel-, Stickstoff-, Sauerstoff-, oder Phosphoratomen kovalente Bindungen eingehen. So greifen Alkylantien und deren Metabolite an der DNA bevorzugt am Stickstoff der Basen an. Am häufigsten sind Bindungen am Stickstoffatom der Base Guanin an Position 7 zu beobachten. Jedoch reagieren auch Sauerstoffatome in Position 6 oder Stickstoffatome in Position 1 des Guanin. Alkylantien reagieren sowohl innerhalb der DNA und RNA als auch in Proteinen oder Aminosäuren. Durch die irreparable Schädigung auf DNA-Ebene tritt die Zelle während des Replikations- oder Transkriptionsversuches wegen verursachter Strangbrüche, Quervernetzungen und weiterer Schäden in den pro-grammierten Zelltod ein (Bubley et al., 1994).

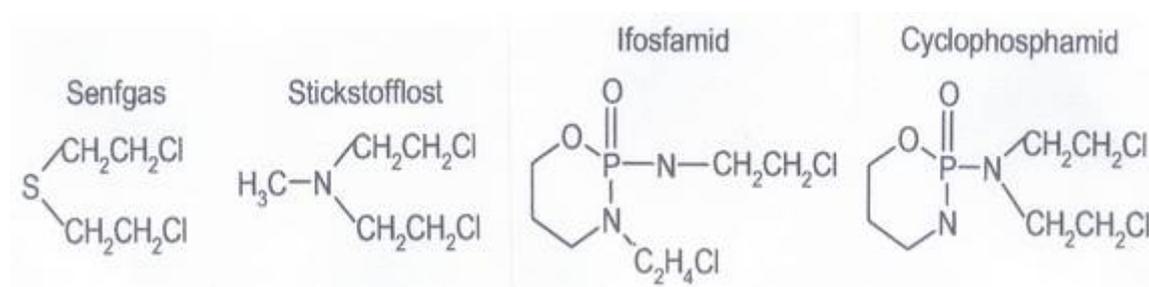


Abbildung 1 Strukturformeln von Senfgas, Stickstofflost, Ifosfamid und Cyclophosphamid

Alkylantien zählen zur Gruppe der phasenunabhängigen Chemotherapeutika, d.h. sie wirken in allen Phasen der Proliferation während des Zellzyklus einer Zelle (G_1 , S-Phase, G_2 und M-Phase). In der G_0 -Ruhephase außerhalb des Zellzyklus greifen sie nur sehr eingeschränkt in die Zellen ein und haben kaum einen Einfluß in den therapeutischen Spiegeln der Chemotherapeutika. Die Wachstumsphase einer Tumorzelle wird von den Stoffwechselbedingungen im Gewebe beeinflusst, z.B. der Versorgung mit Sauerstoff (Vaupel et al., 1997). Bei ausreichender Stoffwechselsituation findet eine Proliferation von Tumorzellen statt. Bei einem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen, wie dies bei hypoxischen Arealen in Tumoren der Fall ist, gehen Tumorzellen vermehrt in die G_0 -Ruhephase über und scheiden damit für unbestimmte Zeit aus dem Zellzyklus aus.

Der Zellzyklus selbst ist eine sorgfältig koordinierte Abfolge biochemischer Veränderungen innerhalb einer Zelle mit dem Ziel der Duplikation des DNA-Gehaltes und der Teilung der Zelle in zwei Tochterzellen (**Abb. 2**). Man unterscheidet vier Phasen: die lichtmikroskopisch sichtbare Mitose-Phase (M-Phase), die G_1 -Ruhephase (G_1 -Phase) die Synthese-Phase (S-Phase) und die weitere G_2 -Ruhephase (G_2 -Phase). Aus der M-Phase kann sich die Zelle aus dem Zellzyklus heraus in eine G_0 -Ruhephase (G_0 -Phase) unterschiedlicher Dauer aus dem Zellzyklus heraus begeben (Lajhta et al., 1963).

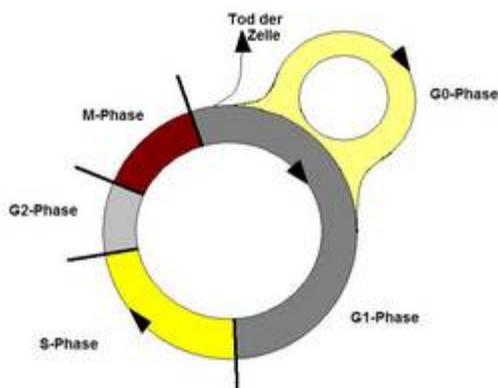


Abbildung 2 Zellzyklus

In dieser G_0 -Ruhephase sind Tumorzellen für viele Arten der Tumorthherapie schwer bis gar nicht angreifbar (Shewell et al., 1980). Diese Phase kann z.T. Jahre andauern. Tumorrezidive finden ihren Ursprung nach mehreren Jahren einer Remission vermutlich in Tumorzellen, die in der G_0 -Phase ruhen und daher schlecht angreifbar für eine Therapie waren (Shewell et al., 1980). Auch Alkylantien wirken in der G_0 -Phase nur sehr eingeschränkt. Strahlentherapeutisch sind diese Zellen ebenfalls schwer angreifbar.

Eine Möglichkeit der verbesserten Angreifbarkeit dieser Zellen wäre diese aus der G₀-Ruhephase in den Zellzyklus zurück zu bewegen. Mittels einer HBO kann die Stoffwechselsituation und die Oxygenierung im Tumor verbessert werden. Es kann durch eine HBO auch eine Sensibilisierung dieser Zellen und die Erhöhung des Anteils verfügbarer Sauerstoffradikale im Gewebe erreicht werden (Alagoz et al., 1995, Brizel et al., 1996, Beinert et al., 1999). Möglicherweise führt die Verbesserung der Oxygenierung in hypoxischen Tumorarealen durch die HBO zu einem vermehrten Wiedereintritt von Tumorzellen aus der G₀-Ruhephase heraus in den Zellzyklus.

Das Verhältnis der Zellen im Zellzyklus im Vergleich zu denen in der Ruhephase kann durch verschiedene Nachweismethoden und Proteine in Geweben untersucht und im Proliferationsindex dargestellt werden. In diesem Zusammenhang ist eine Reihe exprimierter struktureller Proteine der Zellen bekannt. Eines dieser Proteine ist das Ki-67-Protein (Sawhney und Hall, 1992, Endl und Gerdes, 2000). Es ist ein in allen Zellzyklus-Phasen auffindbares DNA-bindendes Protein mit der Molekularmasse von 395 und 345 kDa (Gerdes et al., 1991). Die Expression des Ki-67-Proteins ist eng an den Zellzyklus gebunden und findet nicht in der G₀-Phase statt (Gerdes et al., 1984, Lopez et al., 1994, Duchrow et al., 1996). Die komplette Aminosäuresequenz des Ki-67-Proteins konnte zwar bereits 1993 dargestellt werden (Schlüter et al., 1993), genaue pathophysiologische Zusammenhänge erscheinen jedoch sehr komplex und sind im Detail noch unverstanden (Endl und Gerdes, 2000, Scholzen und Gerdes, 2000). Durch Verwendung einer polyklonalen anti-Ki-67-Antikörper-Färbung ist eine eindeutige Unterscheidung von Zellen, die sich im Zellzyklus befinden von Zellen, die sich in der G₀-Phase befinden möglich. Das Maximum der Expression für das Ki-67-Protein in Zellen liegt nach einer Steigerung der Farbintensität über G₁, S, und G₂ in der M-Phase. Eine leichte Minderexpression findet in der frühen G₁-Phase statt. Mangelversorgte, hypoxische Zellen im Zentrum von Tumoren, die in der G₀-Phase ruhen, zeigen praktisch gar keine Ki-67-Antigen-Expression (Verheijen et al., 1989, Brown und Gatter 1990, Sawhney und Hall, 1992, MacCallum et al., 1999). Durch die immunhistochemische Bestimmung der Anzahl markierter Zellen im Zellzyklus gegenüber nichtmarkierter Zellen in der G₀-Phase lässt sich der Proliferationsindex einzelner Gewebe bestimmen, der die Wachstumsaktivität eines Gewebes abbildet. Bestimmen lässt sich der Proliferationsindex z.B. über das Ki-67 mittels der LSAB-Methode. Bei dieser wird über die Affinität von Avidin zu Biotin die färberische Markierbarkeit spezieller Proteine genutzt.

I.4 Fragestellung

Folgende Fragen sollen in dieser Dissertation geklärt werden:

1. Hat eine HBO Einfluß auf die Knochenmarktoxizität des Alkylanzes Ifosfamid bei dem in dieser Arbeit verwendeten Tiermodell?
2. Lassen sich anhand von Untersuchungen in der Kombinationstherapie von HBO mit Ifosfamid im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Ifosfamid bei menschlichen Mx1-Mammakarzinom oder dem S117-Weichteilsarkom Unterschiede im Wachstum der Tumore feststellen?
3. Lassen sich Unterschiede im Proliferationsindex von mit HBO behandeltem zu unbehandeltem Tumorgewebe feststellen, die darauf schließen lassen, ob Tumorzellen durch eine HBO aus der G₀-Ruhephase heraus möglicherweise wieder in den aktiven Zellzyklus bewegt werden könnten?
4. Profitieren die in diesem Tumormodell verwendeten Tumorzellen von einem vermehrten Sauerstoffangebot oder zeigen sie in Zellkulturversuchen unter Hypoxie weiterhin ein Wachstum als Folge einer möglichen Hypoxieadaptation?

II. Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Tumorzellen, Mx1 und S117

In den Experimenten wurden sowohl für die Tier als auch die Zellkulturversuche, zwei humane Mammakarzinom-Zellen des Typs Mx1 und humane Weichteilsarkom-Zellen des Typ S117 verwendet. Bei den Mx1-Zellen handelt es sich um Tumorzellen eines infiltrativ wachsenden ductalen Mammakarzinoms eines weiblichen Menschen im Alter von 40 Jahren, die ursprünglich vom National Cancer Institute aus Bethesda, USA stammen. Bezogen wurden die Mx1-Tumorzellen bei der Firma Cell Line Service, Heidelberg. Bei den S117-Zellen handelt es sich um Tumorzellen eines polymorphkernigen Weichteilsarkoms der Schilddrüse eines weiblichen Menschen im Alter von 47 Jahren (nicht publiziert, in vitro etabliert von H. Lührke, 1985). In der Zellkultur lassen sich die Zellen als subkonfluierende Monolayer bei einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % bei 5 % CO₂-Begasung kultivieren. Beide Zellarten lassen sich unter Bildung weicher solider Tumoren mit zentralen Nekrosen und hypoxischen Arealen auf Nacktmäuse transplantieren.

II.1.2.1 NMRI-Mäuse

An NMRI-Mäusen wurde die Myelotoxizität von Ifosfamid unter HBO mittels Blutbilduntersuchungen bestimmt. Ursprünglich stammen die Tiere vom Naval Research Institute in den USA. Die Tiere verfügen über ein intaktes Immunsystem und können im Labor unter normalen Umweltbedingungen gehalten werden. Jeweils 5 bis 7 Tiere teilen sich einen Käfig (Makrolon Gr. 2), bei einer angegebenen Raumtemperatur von 24 (+/-1) °C. Den Boden der Käfige bedeckte als Streu Altromin[®]-Sägemehl und Späne-Streu. Als Nahrungsquelle stand den Tieren Mäuse-Altromin[®]-Standard-Diät und Wasser ad libidum zur Verfügung. Eine Dunkelperiode für einen Tag-Nacht-Rhythmus wurde von 18:00 Uhr bis 6:00 Uhr eingehalten. Das Alter der Tiere bei Lieferung betrug 6 bis 8 Wochen. Alle verwendeten Tiere waren weiblich. Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden über die Firma Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld bezogen.

II.1.2.2 Nu/Nu-Nacktmäuse

Für die Tumorversuche wurden Nu/Nu-Nacktmäuse verwendet. Diese Mäuse eignen sich sehr gut zur Xenotransplantation von humanen Tumoren und zeichnen sich durch einen speziellen genetischen Defekt des zellulären Immunsystems aus. Es handelt sich um athymische Mäuse

mit fehlender T-Zellprägung. Körper- oder artfremde Zellen werden daher vom Immunsystem der Maus nur bedingt erkannt und abgestoßen. Aufgrund des zellulären Immundefektes müssen die Tiere in einer möglichst keimarmen Umgebung gehalten werden. Es wurden jeweils 5 bis 7 Tiere in einem autoklavierten Käfig (Makrolon Gr. 2) bei konstanter Raumtemperatur von 24 (+/-1) °C und bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 70 % in einem keimarmen Raum gehalten. Der Boden dieser Käfige war ebenfalls mit Altromin[®]-Sägemehl und Späne-Streu bedeckt. Als Nahrungsquelle stand den Tieren ebenfalls Mäuse-Altromin[®]-Standard-Diät und Wasser ad libidum zur Verfügung. Eine Dunkelperiode für einen Tag-Nacht-Rhythmus wurde von 18:00 Uhr bis 6:00 Uhr eingehalten. Das Alter der Tiere bei Lieferung betrug 6 bis 8 Wochen. Es wurden wieder ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Bezogen wurden die Nu/Nu-Nacktmäuse über die Firma Bommice, Bomholtgaard, Ry, Denmark.

II.1.3 Ifosfamid

Das in dieser Arbeit verwendete Ifosfamid war unter dem Namen Holoxan[®] 200 mg (ASTA Medica AWD GmbH, Frankfurt) im Handel erhältlich. Verwendet wurde es mit einer Dosierung von je 100 mg/kg Körpergewicht über 3 Tage oder einer Dosierung von 125 mg/kg/KG über 2 Tage.

II.1.4.1 Blutbildbestimmungen

Die Blutbildbestimmungen in dieser Arbeit erfolgten mit einem vollautomatischen Blutbildgerät der Firma Bayer Diagnostics GmbH (Leverkusen) mit dem Namen Advia[®]120 Hämatologie System. Dieses Gerät ist in der Lage Vollblutproben von einem Mindestvolumen von 155 µl pro Probe in Zellen differenziert nach Zelltyp entsprechend den herkömmlichen Zellen des Blutbildes zu messen. Weiter verfügt das Gerät über eine spezielle Maus-Tier-Software zur Messung von Zellen aus Tier-Blut. Mit dem Advia[®]120 Hämatologie System wurden Blutproben von NMRI-Mäusen gemessen.

II.1.5 Hyperbare Sauerstofftherapie in der Dräger-Druckkammer

Die Versuche mit Hyperbarem Sauerstoff wurden in einer Druckkammer der Firma Dräger[®], Lübeck, durchgeführt, die in der Abb. 3 dargestellt ist. Im Wesentlichen besteht die Kammer aus folgenden Grundelementen: einem faßförmigen Körper, einem Deckel mit Glasplatte als Sichtglas (**Abb. 4, (15)**), einem Einlassventil sowie einem Auslaßventil, einem mechanischen Druckmesser (**Abb. 4, (10)**), einem Auslasssystem zur Sauerstoffmessung (**Abb.4 (16)**) und

einem Heizsystem (**Abb. 4 (8)**) mit einem fixen Temperaturmesser sowie einem mobilen Temperaturmesser (**Abb. 4, (3, 4, 12)**).

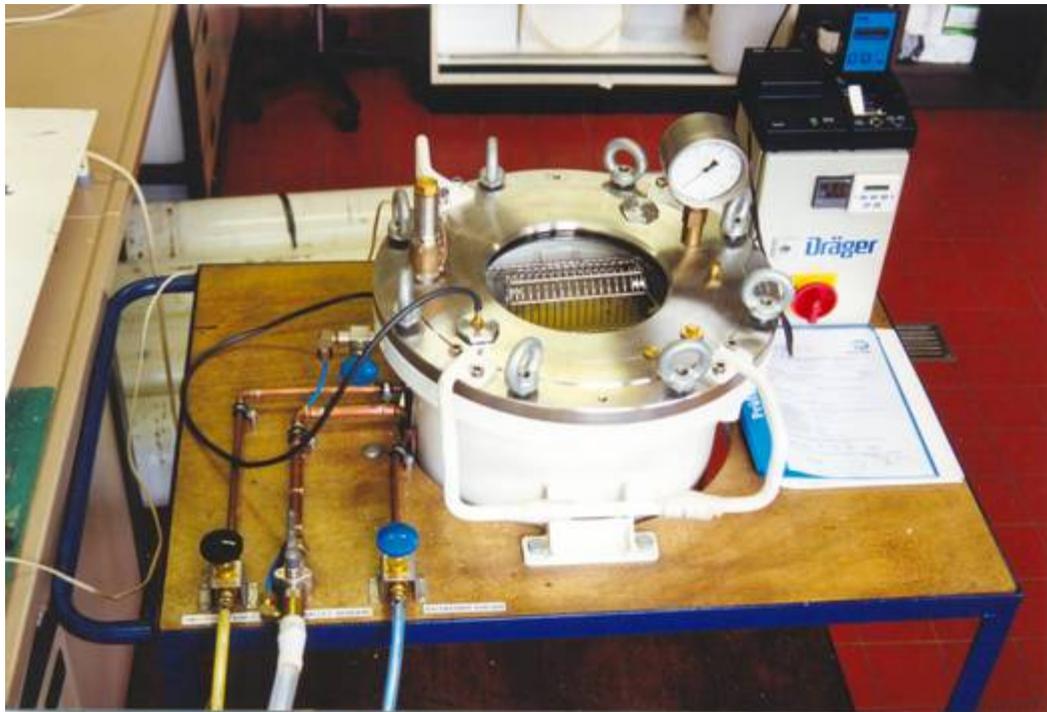


Abbildung 3: Druckkammer der Firma Dräger, (Benutzerblickwinkel)

Aufgebaut ist das Kammersystem auf einem rollengelagerten Wagen, auf dem sich weiter ein Digitalsystem zur Temperaturregulation, ein installiertes externes digitales Sauerstoff-Präzisionsmeßgerät (**Abb.4 (5)**) der Firma Dräger[®], Lübeck, sowie die Schlauchanschlüsse für Druckluft und Sauerstoff (**Abb.4 (16)**), eine Brauchgas-Ableitung in die Außenluft und ein Kabelsystem zur Stromversorgung befinden. Es wurden zur optimalen Temperaturfindung in der Kammer zwei weitere Temperaturmeßgeräte der Firma Dräger[®] verwendet. Diese waren Bestandteil der Druckkammer, wobei sich ein Temperaturmessfühler über dem Heizsystem und ein Temperaturmessfühler direkt am Boden des Aufenthaltgefäßes befanden, in dem die Versuchstiere während der Therapie weilten. Ein weiteres, rein mechanisches Kontroll-Thermometer befand sich am Behälterdeckel in der Kammer (**Abb.4 Nr. (13)**). Durch diese Kombination von Temperaturmeßsystemen wurde sichergestellt, daß die Temperatur in der Kammer gerade in unmittelbarer Nähe der Tiere exakt bei 37 °C lag. Skizzenhaft ist der Aufbau der Dräger-Druckkammer in der folgenden **Abb. 4** dargestellt:

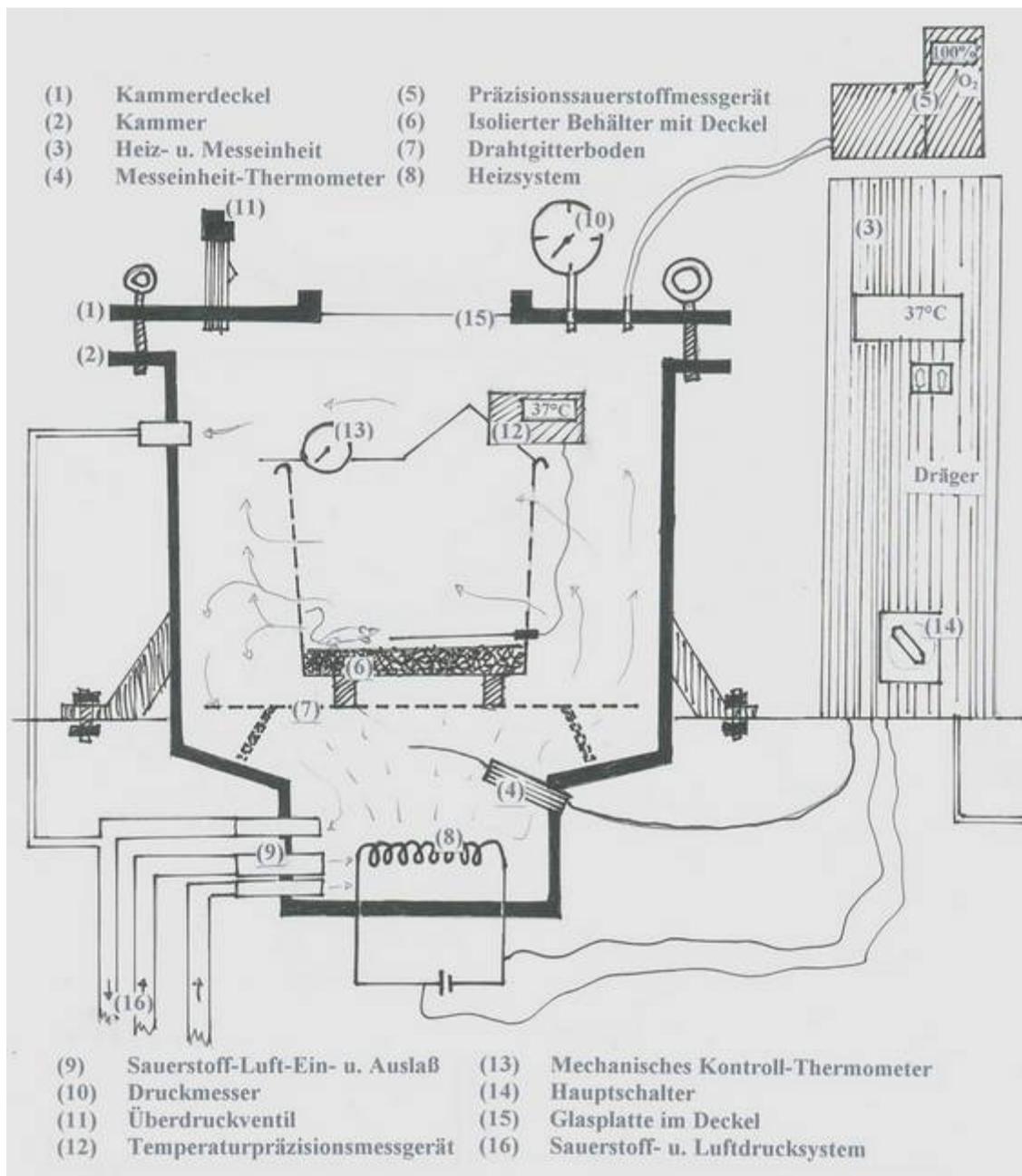


Abbildung 4 Skizze vom Druckkammeraufbau

II.2 Versuchsdurchführung

II.2.1 Hyperbare Sauerstofftherapie und Therapieschemata

Die HBO als medizinische Behandlungsmethode ist definiert als eine Therapie, bei der ein Patient bei einem Überdruck 100 Prozent Sauerstoff atmet (Kindwall und Goldmann 1995, Camporesi, 1996, Almeling und Weslau, 1996). Der therapeutisch genutzte Druckbereich liegt in vielen Schemata zwischen 0,5 bis 2,0 bar Überdruck. In dieser Arbeit wurde in allen Therapieschemata fortwährend ein Druck von 2,4 bar (240 kPa) verwendet. Für die HBO existiert eine Vielzahl an Versuchsschemata. Ein Therapieschema wurde allen weiteren Abwandlungen in dieser Arbeit zu Grunde gelegt. Es ist in der Internationalen Nomenklatur bekannt als Therapieschema TS 240-90 (**Abb. 5**) und in den „US Navy and Royal Navy diving treatment tables“ gelistet sowie mehrfach in wissenschaftlichen Arbeiten verwendet (Doll, 1965, Carl et al., 1998, Sminia et al., 2003).

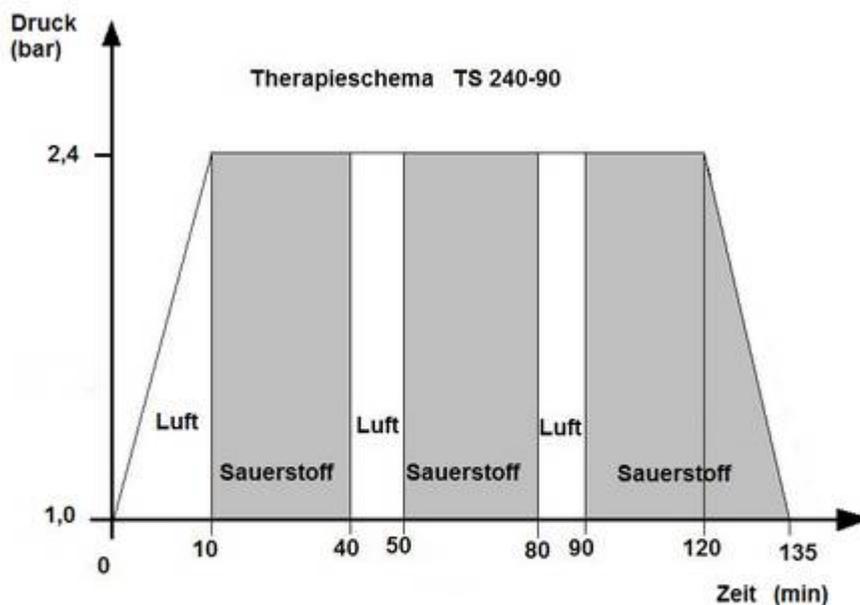


Abbildung 5 HBO-Schema TS 240-90

Das Therapieschema TS 240-90 beinhaltet, daß die HBO nach einer 10 minütigen Phase des Druckaufbaus und des Erreichens von 100 % Sauerstoff 3 x 30 min bei Überdruck mit zwei Sauerstoffpausen von jeweils 10 min bei einem konstanten Druck von 2,4 bar (240 kPa) gefahren wird. Anschließend ist eine Dekompressionszeit von 15 min bei Atmung von Sauerstoff nötig. Das Therapieschema TS 240-90 wurde sowohl im Original als auch in

erweiterter Form von 4 x 30 min HBO verwendet. Die Anwendung von 3 x 30 min HBO erfolgte über drei oder fünf Tage, die Anwendung von 4 x 30 min erfolgte nur über drei Tage.

II.2.2 Kammerbedienung und Anwendung der Therapie

Nach Einbringen der Versuchstiere in die Kammer wurde diese mit einem Schraubsystem am Deckel verschlossen. Der innere Behälter mit Gitterdeckel (**Abb. 4 (6)**) faßt maximal 8 Tiere gleichzeitig. Danach erfolgte eine Spülung mit Sauerstoff, bis ein pO_2 von über 95 % erreicht wurde. Hierzu ließ man den Sauerstoff über das zuvor erwähnte Einlaßventil in das Kammerinnere fließen. Das Auslaßventil mußte hierbei geöffnet sein. Der Anstieg der Sauerstoffkonzentration in der Kammer wurde auf dem Sauerstoffpräzisionsmessgerät, (Dräger[®], Lübeck) abgelesen. Beim Freisetzen von Sauerstoff aus Druckluftflaschen kühlt sich dieser sehr stark ab. Die Kammer mußte mindestens 30 Minuten zuvor beheizt werden, um eine genaue Temperatur zu erreichen und der Abkühlung beim Sauerstoff-Einlaß entgegen-zuwirken. Während der Versuchstage war das Heizsystem über 24 h eingeschaltet. Es befindet sich am Boden der Kammer, direkt neben dem Luft/Sauerstoff-Einlaß. Da die Kammer über einen doppelten Boden im unteren Kammerdrittel verfügt und sich der Temperaturmessfühler (**Abb. 4 (4)**) unterhalb des doppelten Bodens befindet, stellte die genaue Temperaturregelung beim Einlaß von Sauerstoff eine besondere Schwierigkeit dar. Daher existiert ein weiteres Temperaturmeßsystem (**Abb. 4 (12)**) mit einem Messfühler am Boden des sich in der Kammer befindenden Behälters. Zusätzlich war bei diesen Versuchen ein mechanisches Kontrollthermometer (**Abb. 4 (13)**) in der Kammer installiert. Bei der Bedienung der Kammer waren alle Temperaturmeßsysteme zu beachten. Bei geringen Differenzen war die Temperatur am Behälterboden direkt bei den Mäusen entscheidend. Schloß man nun nach dem Einspülen von Sauerstoff und dem Erreichen von mehr als 95 % Sauerstoff in der Kammer bei erreichten 37 °C das Ablaßventil, ließen sich hyperbare Versuchsbedingungen bei Körpertemperatur erreichen. Der Druck wurde am Kammerdeckel auf dem mechanischen Barometer (Dräger[®]) abgelesen, der Sauerstoffanteil am externen Sauerstoffpräzisionsmessgerät, die Temperatur am Kammerthermometer.

Zu Beginn der HBO wurde über 10 min ein Druck von 2,4 bar aufgebaut. Die 1. Phase von 30 min HBO begann, wenn der gewünschte Druck und ein Sauerstoffpartialdruck von über 95 Prozent vorlagen. Beendet wurde die erste Phase, indem bei konstantem Druck und konstanter Temperatur die Kammer mit Raumluft/Druckluft gespült wurde, bis der Sauerstoffpartialdruck etwa dem der natürlichen Umgebung von 21 % entsprach. Dieser Wert wurde

nach Erreichen für 10 min beibehalten. Anschließend wurde die Kammer wieder mit Sauerstoff gespült, bis wiederum der Sauerstoffpartialdruck bei über 95% und konstantem Druck von 2,4 bar lag und sich die 30 min Sauerstoffphase anschloß. Danach wurde erneut eine 10 minütige Sauerstoffpause eingelegt. Nach drei je 30 minütigen Sauerstoffphasen mit 2 je 10 minütigen Sauerstoffpausen ließ man den Druck über einen Zeitraum von 15 min langsam aus der Kammer entweichen (Dekompressionsphase).

II.2.3 Temperaturmeßversuche in der Kammer

Nachgewiesen ist eine Temperaturabhängigkeit der Wirkung von Chemotherapeutika, wie beispielsweise eine Verstärkung der Wirkung bei erhöhten Temperaturen im Sinne einer Hyperthermie (Westermann et al., 2003). Diese Wirkverstärkung ist unter anderem beim Ifosfamid nachgewiesen (Wiedemann et al., 1993). Es wurden zur Kontrolle rektale Messungen an Nu/Nu-Nacktmäusen (n=7) jeweils vor und nach der HBO mit dem Präzisions-Temperatur-Meßgerät der Druckkammer durchgeführt, um sicherzustellen, dass sich die Körpertemperatur der Versuchstiere durch die HBO nicht erhöht oder erniedrigt. Eine versehentliche Überwärmung der Mäuse und eine damit unerwünschte Wirkverstärkung des Ifosfamid sollte verhindert werden. Für dieses Meßverfahren gab es am Präzisions-Temperatur-Meßgerät selbst eine zusätzliche Messfunktion mit einem anschließbaren Messfühler. Zur Messung unter hyperbaren Sauerstoffbedingungen erfolgte in der Druckkammer die Therapie (2,4 bar Druck, 37 °C) nach beschriebenem Schema ohne Gabe des Ifosfamid bei 3 x 30 min 100 % Sauerstoff. Anschließend wurde nach der Dekompressionsphase und nach Entnahme der Tiere aus der Kammer direkt die Messung der Rektaltemperatur einmalig an sieben Mäusen vorgenommen und kein Unterschied festgestellt (siehe bitte Tabelle im Anhang).

II.2.4 Toxizität von Ifosfamid unter Hyperbarer Sauerstofftherapie

Die Toxizität von Ifosfamid wurde an Hand der Myelosuppression mit Hilfe von Blutbilduntersuchungen an NMRI-Mäusen untersucht. Hierzu wurden die Tiere in vier Gruppen, „Ifosfamid“, „Ifosfamid + HBO“, „HBO“ und eine „Kontrolle“ zu je 8 Tieren (n=8) unterteilt. Therapiert wurde nach dem in **Abb. 5** erwähnten Therapie-Schema TS 240-90 von 3 x 30 min HBO über 3 Tage bei 2,4 bar und 37°C. Alle Tiere, inklusive die der Kontrollgruppe, wurden für die Dauer eines TS-240/90-Versuchszeitraumes von zwei Stunden und 15 min bei 37° C an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 in die Druckkammer gesetzt. Den Tieren aus allen Gruppen wurden an Tag 1, 3, 5, 8, 10, 12, und an Tag 15 Blut abgenommen. Die Blutentnahme erfolgte

jeweils morgens vor der Behandlung. Gemessen wurden die Blutproben der NMRI-Mäuse zur Untersuchung der Myelotoxizität des Ifosfamid unter HBO am Advia[®]120 Hämatologie System.

II.2.5.1 Blutabnahmen an NMRI-Mäusen

Die venösen Blutabnahme erfolgte während einer intraperitonealen Kurznarkose der NMRI-Mäuse. Mit einem Hämatokrit-Abnahme-Röhrchen von 20 µl wurde parabolbär, intraorbital unter einer leichten Drehbewegung eine Punktion des retro- bzw. peribulbären Venenplexus durchgeführt. Das gefüllte Röhrchen wurde in ein Eppendorf-Gefäß zu einer zuvor pipettierten Menge von 180 µl isotonischer Kochsalzlösung gegeben und durchmischt. Mittels des Advia[®]120 Hämatologie System wurde eine Blutbildanalyse durchgeführt. Das Ergebnis aus der Messung wurde mit dem Faktor 10 multipliziert, um den Verdünnungseffekt zu berücksichtigen.

II.2.5.2 Narkose der Versuchstiere

Die Narkose der Mäuse zur Blutabnahme, zur Transplantation oder der Injektion von Tumormaterial in den Nacken erfolgte über die intraperitoneale Gabe einer Kombination aus Rompun[®] (BayerVital, Leverkusen) und Nembutal[®] (Sanofi). Hierzu wurden 1ml Nembutal[®] (Phenobarbital-Natrium) mit 9 ml isotonischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 und 1ml Rompun[®] 2 % mit ebenfalls 9 ml isotonischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 versetzt und anschließend zu einer Lösung im Verhältnis 1:1 gemischt. Zur Betäubung der jeweiligen Maus injizierte man nach Desinfektion der Haut die Rompun[®]-Nembutal[®]-Lösung intraperitoneal. Die Injektionsmenge errechnet sich nach dem Gewicht des jeweiligen Tieres. So wurde bei jedem Tier von 20 g Körpergewicht 0,32 ml injiziert, dies entspricht 8 ml/kg KG Nembutal[®] sowie 8 ml/Kg KG Rompun[®] 2 % .

II.2.5.3 Intravenöse Injektion

Die intravenösen Injektion von Ifosfamid erfolgte über die Schwanzvenen der Tiere. Hierzu wurden die Tiere in einen eigens zu diesem Zweck entwickelten Röhrchen mit einem Kolben zur Fixierung gehalten, so dass lediglich der Schwanz des Tieres herausah und zur Injektion gut zugänglich war. Nun wurde nach Desinfektion mit Cutasept[®]-F (Bode Chemie Hamburg) eine der Schwanzvenen mit einer 22 G Kanüle distal punktiert, um das Ifosfamid intravenös zu verabreichen. Die Injektion hatte über einen Zeitraum von mindestens 1 min zu erfolgen.

II.2.6.1 Aufarbeitung von kryokonservierten Tumorzellen

Das verwendete Tumormaterial der Mx1-Zellen sowie der S117-Zellen befand sich tiefgefroren in flüssigem Stickstoff bei - 196 °C in Cryosafe-Röhrchen[®] mit Zusatz von cryo-safe[®]-I-Einfriermedium. Dieses Einfriermedium enthält Dimethylsulfoxid (DMSO), welches beim Gefrier- oder Auftauvorgang die Auskristallisation von intrazellulärem Wasser und damit Zellschäden verhindert. Nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff erfolgte das schnelle Auftauen der Zellen im Wasserbad bei 37 °C. In einer sterilen Labor-Bench wurde nun die Lösung mit dem Tumormaterial in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen pipettiert und mit 8 ml Medium (RMPI 1640) versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) gewaschen. Bei diesem Prozeß des Waschens diffundierte ein Teil des DMSO durch Verdünnung aus den Zellen heraus. Hiernach wurde in dem Falcon-Röhrchen[®] in einer Zentrifuge bei 1000 U/min ca. 3 bis 5 min lang der Überstand vom Zellpellet getrennt und verworfen. Das Zellpellet wurde erneut mit 8 ml Medium (RMPI 1640) ohne FKS gewaschen und nach erneuter Zentrifugierung über eine filterlose 14 G Perfusorkanüle in eine 1ml-Injektionspritze gezogen. Zur Implantation des aufbereiteten Tumorgewebes wurde eine Nu/Nu-Nacktmaus als Anzuchtstier narkotisiert und das Tumormaterial nach Desinfektion der Haut in das Unterhautgewebe in den Nackenbereich des Tieres injiziert. Prophylaktisch wurde über einen Zeitraum von drei Tagen Ampicillin[®] (Ratiopharm GmbH, Ulm Deutschland) ins Trinkwasser gegeben. Ein Tumorstadium war nach frühestens zwei, spätestens vier Wochen an der Maus sichtbar.

II.2.6.2 Transplantation, Lokalisation der Tumoren an Flanke oder Pfote

Das Tumolvolumen zur Explantation des Tumors am Anzuchtstier betrug mindestens 300 mm³ um genügend transplantationsfähiges Material zu gewinnen. Zur Explantation erfolgte die Tötung des Anzuchtstieres mittels einer überdosierten Ethernarkose (Diethylether der Firma Merck[®]) durch die Tierpfleger. Unter aseptischen Bedingungen wurden die Tumore durch einen Hautschnitt explantiert und auf einer sterilen Petrischale mit einem Skalpell in 1 mm³ große Tumorstückchen (kubusförmige Gewebeblöcke) zerteilt. Die kubusförmigen Tumorstückchen lagerten zum Schutz vor Austrocknung für wenige Minuten bis zur Implantation in 0,9 % Isotonischer Kochsalzlösung. Unter sterilen Bedingungen und nach Desinfektion der Haut am ventralen Hinterlauf der Nacktmaus mit Cutasept[®]-F (Bode Chemie Hamburg) erfolgte ein ca. 5 mm langer Hautschnitt und die stumpfe Präparation einer subcutanen Tasche mit einer Knopfsonde während einer intraperitonealen Rompun[®]-Nembutal[®]-Narkose. Nach der Präparation wurde ein je ein Tumorstückchen subcutan unter

die Haut implantiert. Der Schnitt wurde mit einem Steri-Strip verschlossen. Zur Implantation an der Flanke wurde analog verfahren. Die narkotisierten Tiere wurden bis zum Erwachen unter eine Wärmelampe gelegt. Über einen Zeitraum von drei Tagen wurde prophylaktisch Ampicillin® (Ratiopharm GmbH, Ulm Deutschland) ins Trinkwasser gegeben. Nach der Tumorimplantation wurden die Tiere über einen Zeitraum von 2 bis 4 Wochen regelmäßig im Abstand von 3 bis 4 Tagen beobachtet, das Wachstum eines Tumors an der Transplantationsstelle wurde über regelmäßige Größenmessungen dokumentiert. Begonnen wurde mit den Versuchen ca. 2 Wochen nach Implantation bei einem durchschnittlichen Tumolvolumen von 110 mm³. In dieser Arbeit wurden als Lokalisation zur Tumorpassage der Nacken der Maus und für die Versuche die Pfote oder die Flanke gewählt. Zurückgegriffen wurde hierbei auf zwei bereits etablierte Tumorlokalisationen an der Maus (Fenton et al., 2001, Ceriani 1987, Ceriani und Blank 1988, Alagoz et al., 1995, Marxsen et al., 2001). In den folgenden **Abb. 6** und **7** ist jeweils eine Maus mit einem Tumor an der Pfote oder an der Flanke fotografiert:



Abbildung 6 Narkotisierte NuNu-Nacktmaus mit Mx1-Tumor an der rechten hinteren Pfote (Tumolvolumen von ca. 200 mm³)



Abbildung 7 Narkotisierte NuNu-Nacktmaus mit Mx1- Tumor an der rechten hinteren Flanke (Tumorvolumen von ca. 250 mm³)

II.2.6.2 Bestimmung und Berechnung des Tumorvolumens

In Abständen von drei bis vier Tagen wurde nach der Tumor-Implantation das Gewicht der Maus mit einer Laborwaage (Sartorius[®]), sowie das Volumen der wachsenden Tumore mit einer Präzisionsschublehre gemessen und nach der Formel für ellipsoide Körper berechnet:

$$V = AB^2 \pi/6$$

A steht für den längsten, **B** für den kürzesten Durchmesser des Tumors, senkrecht zu **A** gemessen (**Abb. 8**).

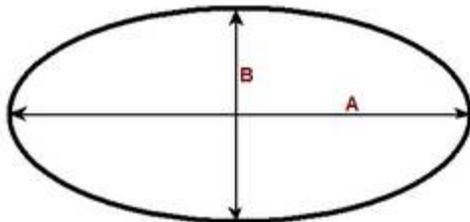


Abbildung 8 Skizze zur Berechnung des Tumorvolumens

Bei Überschreiten oder Unterschreiten, der Millimeterzahl während der Messungen um mehr als 0,5 mm wurde jeweils auf- oder abgerundet. Die Tiere wurden bei Überschreitung des Tumolvolumens (V) von 1300 mm^3 , bei Anfraß des Tumors oder bei Überschreiten eines Alters von 60 Tagen durch die Tierpfleger in einer überzogenen Ethernarkose (Diethylether, Merck[®]) getötet. Angefressene oder ulcerierte Tumore wurden für die Tumormessungen nicht verwendet.

II.2.7.1 Anfertigung der Tumorgewebeschnitte

Zur Gewinnung von Tumorgewebeschnitten in Paraffin wurden S117-Tumoren und Mx1-Tumoren auf die Pfote von Nu/Nu-Nacktmäuse ($n=14$) transplantiert. Das durchschnittliche Tumolvolumen der Pfortumore lag zu diesem Zeitpunkt bei ca. 200 mm^3 . Nach 1 bis 2 Tagen Lagerung im Formalin erfolgte ein Zuschneiden der Tumore und der Einschluß in Kunststoffeinbettkassetten. Durch einen weiteren Wasserentzug über 2 Tage mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe in Ethanol (Schritte: 1. 70%, 2. 96 %, 3. 96%, 4. 100%, 5. 100%) trat eine erwartete leichte Schrumpfung der Präparate ein. Nach einer anschließenden Inkubation über 8 Stunden in Xylol erfolgte eine Lagerung der Präparate für 20 h in reinem flüssigen Paraffin bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Durch das Aufbringen der Präparate auf die Kunststoffeinbettkassetten erhielt man nach dem Ausguß, Abkühlen und Erhärten des Paraffins definierte Blöcke. In diese Blöcke eingebettet konnte nach dem vollständigen Abkühlen und Erhärten des Paraffins mit der Erstellung der histologischen Schnitte mit einem Microtom (Autoscout 2055[®], Leica) begonnen werden. In einer Schichtdicke von 5 bis $6 \text{ }\mu\text{m}$ wurden Mikrotomschnitte angefertigt und auf Objektträger (Menzel Superfrost[®]) aufgezogen. Abschließend wurden diese über eine Stunde bei 60°C in einem Trockenschrank (Heraeus[®]) getrocknet.

II.2.7.2 Ki-67-Färbungen der Mikrotomschnitte mittels Immunhistochemie nach der Labelled-StreptAvidin-Biotin-Methode

Bei der Labelled-StreptAvidin-Biotin-Methode (LSAB) wird die Affinität von Avidin zu Biotin genutzt. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Verwendet wurde StreptAvidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii*. Nach Inkubation des Präparates mit einem Primär-Antikörper als ersten Schritt der Färbung wird als zweiter Schritt ein Brücken-Antikörper, der mit wasserlöslichem Biotin markiert ist, an den Primär-Antikörper gebunden. Im Gewebe befindliche Peroxydasen werden im nächsten Schritt durch ein Peroxydase-Blockierungsreagenz inaktiviert. Wird nun

ein mit Meerrettichperoxydase konjugiertes StreptAvidin hinzugegeben, geht dieses eine Bindung am Biotin des Brücken-Antikörpers im Sinne eines StreptAvidin-Biotin-Komplexes ein. Die konjugierte Meerrettichperoxydase fungiert als Enzym und lässt durch chromogene Substrate die hinzugegeben werden müssen, den Komplex durch Reaktion sichtbar werden. Dies geschieht jedoch nur dort in der Zelle, wo sich der Ki-67-Antikörper-Brückenantigen-Biotin-StreptAvidin-Meerrettichperoxydase-Komplex befindet. Für die beschriebenen Färbungen wurde der Autostainer[®] der Firma Dako Cytomation verwendet. Die getrockneten, in Paraffin gebetteten Histologien auf den Objektträgern wurden zur immunhistochemischen Ki-67-Färbung für 3 x 10 min zunächst in Xylol inkubiert. Für je 2 bis 3 min erfolgten in absteigender Alkoholreihe (Ethanol, 1. 100 %, 2. 100 %, 3. 96 %, 4. 96 %, 5. 70 %) weitere Inkubationen, abschließend eine Spülung mit Aqua bidest.. Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger in Plastik-Küvetten überführt und in einen Citronensäurepuffer pH = 6,0 für 15 min in einer Mikrowelle bei 750 bis 800 W erwärmt. Nach einer Abkühlung von 20 min konnten die Objektträger im Autostainer[®] (DAKO Cytomation) in eigens dafür vorgesehene „Racks“ eingespannt werden.

Als erster Schritt erfolgte die Inkubation mit einem Ki-67-Primär-Antikörper. Hierzu wurde die Ki-67-Antikörperlösung 1:100 mit Antibody-Diluent verdünnt, und anschließend mit 100 bis 150 µl hiervon pro Schnitt pipettiert und für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Spülung mit Wasch-Puffer. Als zweiter Schritt erfolgte nun eine Inkubation mit einem biotinylierten Brückenantikörper für 10 min bei Raumtemperatur. Dieser ist in einem Kit K 5001 (Autostainer[®]) gebrauchsfertig vorhanden. Wieder wurde anschließend mit Wasch-Puffer gespült. Als dritter Schritt erfolgte die Blockade der endogenen (im Präparat vorhandenen) Peroxydasen mit einem ebenfalls gebrauchsfertigen Peroxydase-Blockierungsreagenz bei Raumtemperatur für 5 min. Anschließend wurde wieder mit Wasch-Puffer gespült. Nun erfolgte als vierter Schritt die Inkubation mit Streptavidin (HRP-konjugierte-Peroxydase). Hierzu wurde ein Streptavidin-Enzym-Konjugat (Chem Mate Detectionskit Streptavidin-Biotin HRP/DAB, K5001) verwendet, welches ebenfalls gebrauchsfertig im zuvor erwähnten Kit 5001 erhältlich ist. Die Schnitte mussten hiermit für 10 min bei 24°C, entsprechend der Raumtemperatur, inkubiert werden. Es erfolgte wieder eine Spülung mit Wasch-Puffer. Als letzter Schritt erfolgte zur Sichtbarkeit eine Färbung mit DAB-Substrat-Chromogen. Der Peroxydase-Kit K 5001 enthielt ein Chromogen-Substrat aus Wasserstoffperoxid und Diaminobenzidin (DAB), um für 2 x 5 min bei Raumtemperatur die Schnitte zu inkubieren. Abschließend erfolgte eine Waschung mit Wasch-Puffer. Zur besseren Darstellung der Schnitte wurden diese abschließend mit Mayers Hämatoxylin-Eosin für 1 min

gegengefärbt und anschließend mit fließendem Wasser für 10 min gebläut. Abschließend erfolgte zur Konservierung eine Eindeckelung der Schnitte mit Aquatex und Omnilab-Deckgläsern (24mm x 40mm).

Die Immunhistochemischen Färbungen dieser Arbeit wurden mit dem Autostainer[®] der Firma Dako Cytomation GmbH (Hamburg) genormt. Bei diesem Gerät handelt es sich um einen Vollautomaten zum Anfärben histologischer Schnitte jeglicher Art. In der **Abb. 9** und **10** ist je ein Ergebnis der Färbungen dargestellt. Das DAB ruft als ein Chromogen im zu färbenden Gewebe eine bräunliche Färbereaktion hervor, welche auf den Schnitten je nach Anteil der vorhandenen Ki 67-Expression sichtbar ist:

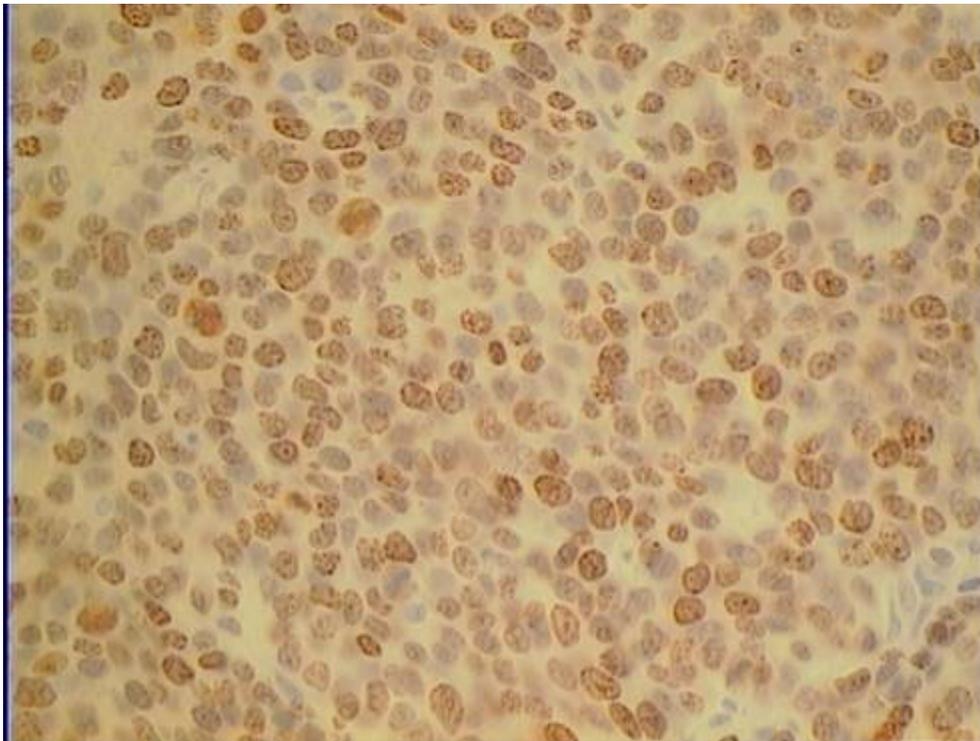


Abbildung 9 Immunhistochemisch anti-Ki-67-LSAB-gefärbte Histologie eines Mx1-TumorSchnittes, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin **ohne Markierungen** (Fotoaufnahme bei ca. 40 facher Vergrößerung)

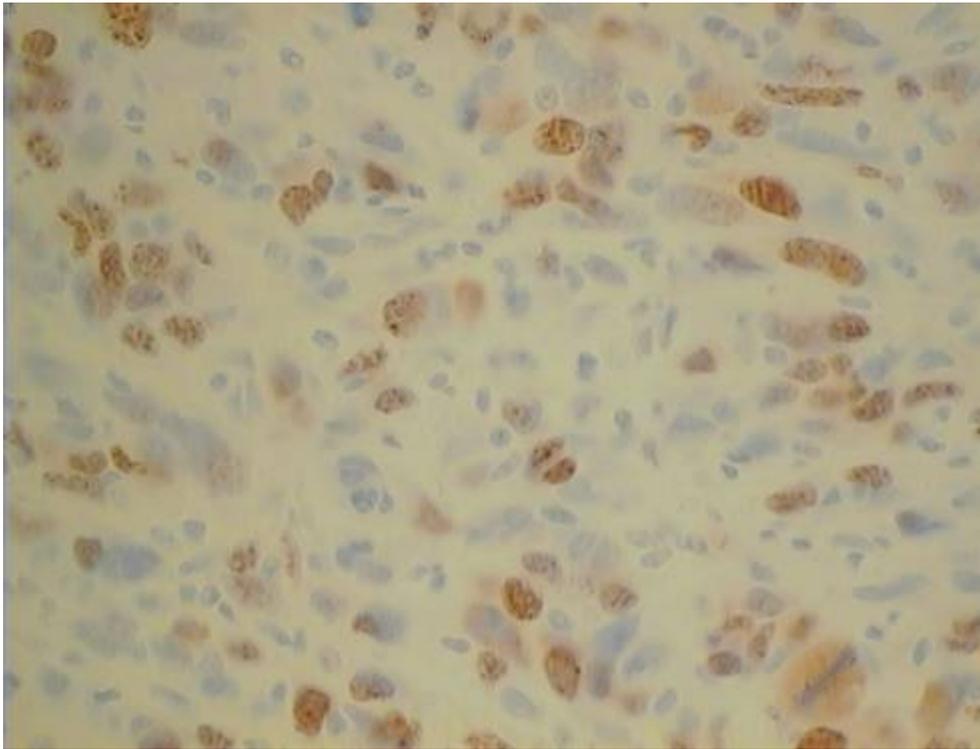


Abbildung 10 Immunhistochemisch anti-Ki-67-LSAB-gefärbte Histologie eines Mx1-Tumorschnittes, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin **ohne Markierungen** (Fotoaufnahme bei ca. 40 facher Vergrößerung)

II.2.7.3 Bilderfassung der Histologie auf einem digitalen Datenträger

Bei der Betrachtung der gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung wurden sogenannte „hot spots“ des jeweils betrachteten Tumors ausgewählt. Als solche kamen Areale ohne große Nekroseanteile mit intensiver Färbung in Frage. Die Betrachtung der Tumordünnschnitte erfolgte unter einem binokularen Olympus[®]-Mikroskop. Mit einem Computer-Programm (Camedia Master[®]) wurden die ausgewählten Bilder mittels einer Digital-Kamera (Olympus[®]) bei 40-facher Vergrößerung fotografiert und auf einem digitalen Datenträger gespeichert. Alle Areale wurden bei gleicher Vergrößerung und gleicher Helligkeit ausgewertet. Als nächstes wurde der Ausschnitt kopiert und die immunhistochemisch gefärbten Zellen, die sich deutlich braun darstellen, in einem Bildbearbeitungs-Programm (Scion-Image[®]) mit einem Zählpunkt markiert. Das Programm addiert die markierten Zellen und bildet die Anzahl oben rechts im Bild ab (Beispiel **Abb. 11** und **12**).

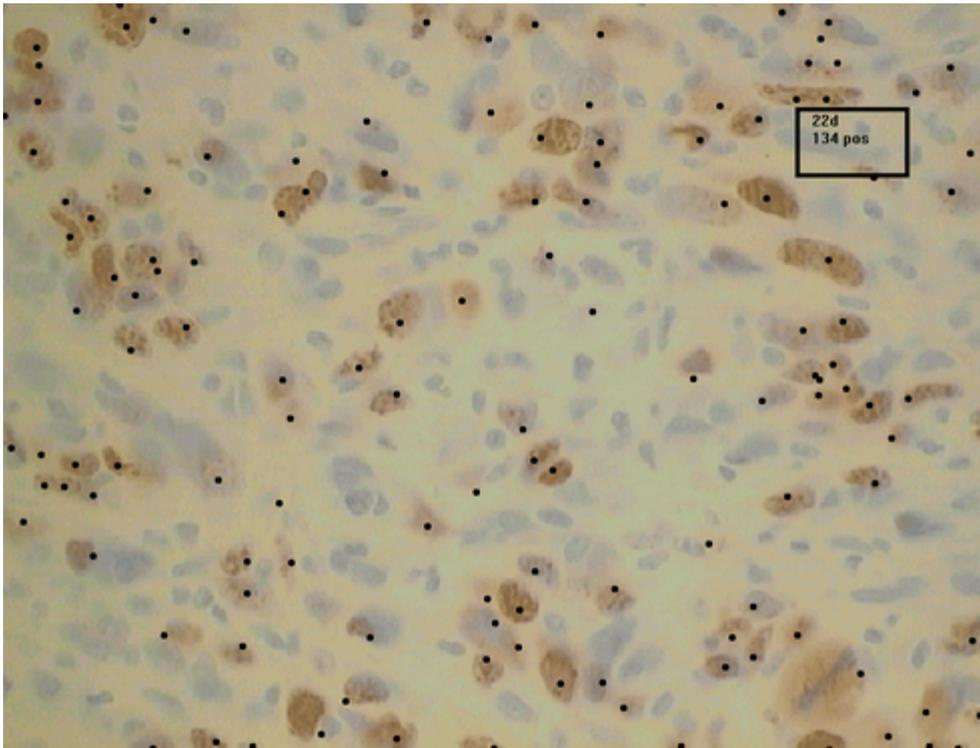


Abbildung 11 Immunhistochemisch anti-Ki-67-LSAB-gefärbte Histologie eines Mx1-Tumorschnittes, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin, **positiv markierte Zellen** (Fotoaufnahme bei ca. 40 facher Vergrößerung)

Weiter wurde eine Kopie des unbearbeiteten Ausschnittes zur Markierung der negativen, nicht immunhistochemisch gefärbten Zellen verwendet. Diese wurden wie zuvor beschrieben markiert. Die Anzahl wurde auch hier im Bild notiert und zur Ermittlung des Proliferationsindex verwendet (**Abb.12**).

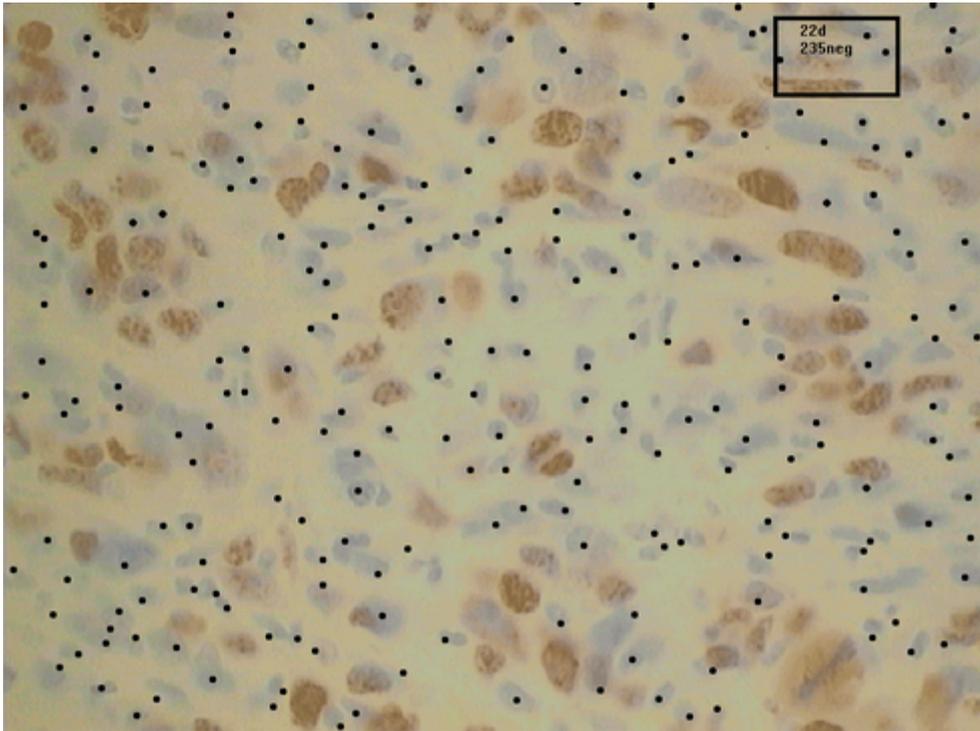


Abbildung 12 Immunhistochemisch anti-Ki-67-LSAB- gefärbte Histologie eines Mx1-Tumorschnittes, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin, **negativ markierte Zellen** (Fotoaufnahme bei ca. 40 facher Vergrößerung)

In der Berechnung des Proliferationsindex werden jeweils die positiv markierten oder die negativ markierten Zellen zur Gesamtzahl ins Verhältnis gesetzt. Es wurden zwei Bildausschnitten pro Tumor (n=14) auf diese Weise ausgewertet.

pos. Index = positive Zellen/ Gesamtzahl der Zellen

II.2. 8 Kristallviolett-Färbungen in der Zellkultur

Die Methode des Kristallviolett-Assays nach Kueng et al., kann zur Ermittlung der Zellmenge in einer Zellkultur verwendet werden (Kueng et al., 1989). Es handelt sich bei dem Kristallviolett um den Farbstoff N-hexamethylpararosanilin, der sich in den Nuclei von Zellen anlagern läßt. Über eine Waschung mit Essigsäure kann der Farbstoff aus den Zellkernen wieder herausgelöst werden und die entstehende Farblösung photometrisch gemessen werden. Die sich aus der Photometrie ergebenden Extinktionswerte korrelieren als Optische Dichte direkt mit der vorliegenden Zellzahl. Die Durchführung begann mit der Fixierung der Zellen

in der jeweiligen Kulturschale mit 150 µl 11% Glutaraldehyd für 15 min. Nach Entfernung des Überstandes und Waschung mit Aqua dest. wurden die Kulturschalen bei Raumtemperatur getrocknet und mit 1,25 ml 0,1%-Kristallviolett-Lösung versetzt für 20 min inkubiert. Danach erfolgte erneut eine Waschung mit Aqua dest. und wieder eine Trocknung. Jetzt wurden 1,25 ml 10%ige Essigsäure pro Schale pipettiert und die Zellen damit zum Platzen gebracht, so daß der in die Zellen aufgenommene Farbstoff freigesetzt wurde. Die bläuliche Farblösung wurde durch Schwenken der Schale gemischt und je 6 x 100 µl in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt, um diese bei 590 nm photometrisch (Eppendorf®-Photometer) zu messen.

II.2.9 Zellkultur, Wachstumsversuche in Hypoxie und Normoxie

Für die In-vitro-Versuche wurden spezielle PetriPerm®-Zellkulturschalen (Ø 35 mm; InVitro Systems & Services, Göttingen) mit gasdurchlässigem Folienboden verwendet. Die genaue Einstellung der Zellzahl der Suspension erfolgte mittels einer Zählkammer. Auf je 8 PetriPerm®-Zellkulturschalen wurden je 1 ml von einer auf 5×10^4 /ml eingestellten Zellsuspension mit je 1 ml RPMI 1640 Medium pipettiert. Es wurden vier der bereiteten Kulturschalen bei 1 % Sauerstoff unter hypoxischen Bedingungen und weitere 4 Schalen bei ca. 21 % Sauerstoff unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden Inkubation wurde jeweils pro Platte ein Kristallviolett-Assay durchgeführt.

III. Ergebnisse

III.1 Toxizitätsversuche mit Ifosfamid unter Hyperbarer Sauerstofftherapie an NMRI-Mäusen

Die Toxizität von Ifosfamid unter HBO wurde anhand der myelosuppressiven Wirkung auf das Knochenmark über regelmäßige Blutbilduntersuchungen an NMRI-Mäusen (n=8) untersucht. Therapiert wurde nach dem Therapieschema TS 240/90 über 3 Tage. Die Ifosfamidgabe erfolgte mit 100 mg/kg Kg pro Tag vor der jeweiligen HBO an Tag 1, Tag 2 und Tag 3. In der **Abb. 13** ist der Verlauf der Leukozyten dargestellt. Als Folge der Myelosuppression durch Ifosfamid wird in den Gruppen „Ifosfamid+HBO“ und „Ifosfamid“ ein Leukozytennadir am Tag 8 beobachtet; hierbei verhalten sich beide Gruppen ohne signifikante Unterschiede (p=0,4634 am Tag 8). Die zusätzliche Gabe von HBO ist hierauf ohne Einfluß. Die alleinige Applikation von HBO verändert die Leukozytenzahlen im Vergleich zur „Kontrolle“ nicht (p=0,8785 am Tag 8).

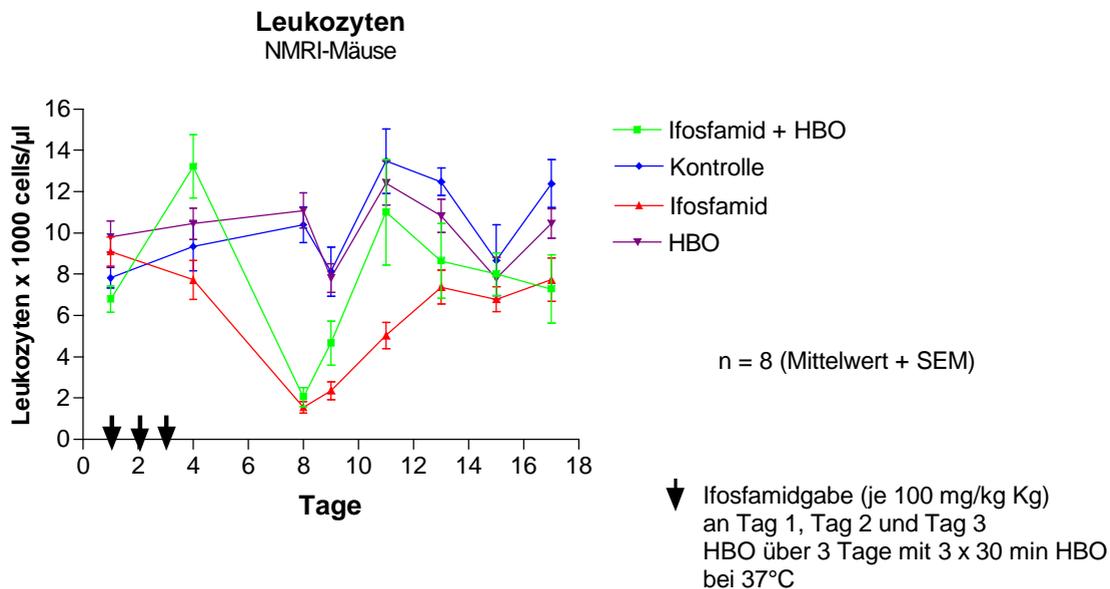


Abbildung 13 Blutbilduntersuchungen an NMRI-Mäusen, **Leukozyten**

Die Anzahl der Erythrozyten bei den Tieren, die eine Ifosfamidgabe erfahren haben, ist im Verlauf ebenfalls ohne große Unterschiede und ist in der **Abb. 14** dargestellt. Am Tag 11 findet sich bei diesen Gruppen ein Nadir, der gegenüber der Ausgangszellzahl statistisch signifikant ist ($p=0,002$ „Ifosfamid“ Tag 11 gegen Tag 1). Bei der nur mit HBO behandelten Gruppe ist kein Nadir erkennbar. Die nicht mit Ifosfamid behandelten Gruppen „HBO“ und „Kontrolle“ sind im Verlauf ohne signifikante Unterschiede. Nach 14 Tagen beginnt sich die Anzahl der Erythrozyten der einzelnen Gruppen wieder einander anzunähern. Am Tag 17 ist kein signifikanter Unterschied mehr zwischen allen vier Gruppen feststellbar ($p=0,2345$). Weiter fällt auf, daß die Anzahl der Erythrozyten aller Gruppen zum Tag 17 leicht abnimmt. Wahrscheinlich ist dies als Blutabnahmeeffekt bedingt. Der Nadir in der Gruppe „Ifosfamid“ tritt im Vergleich zu den Leukozyten bei den Erythrozyten 3 Tage später ein.

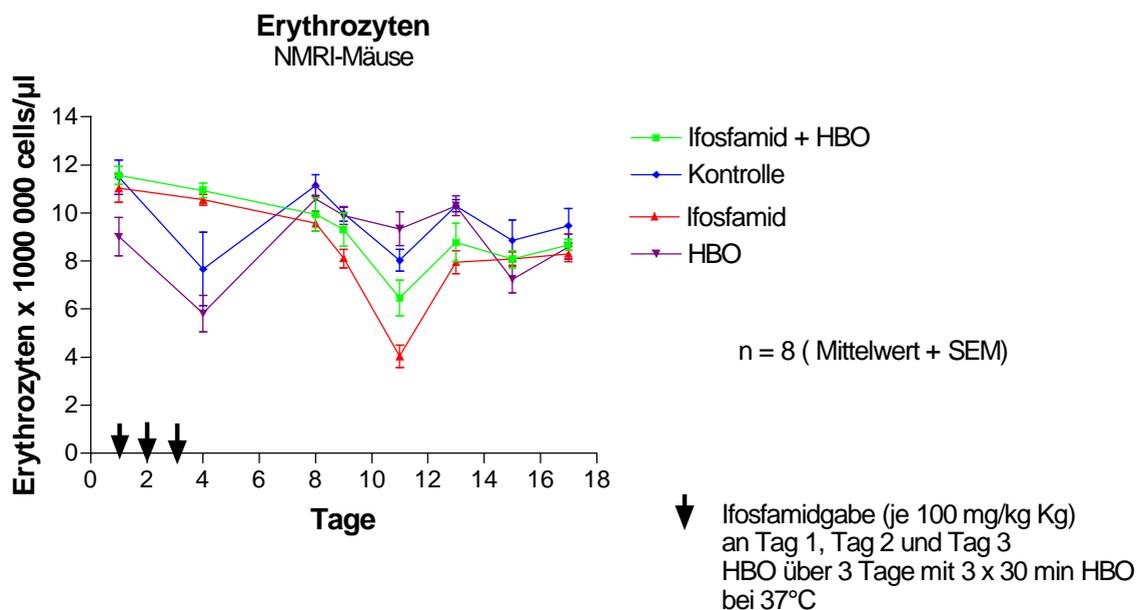


Abbildung 14 Blutbilduntersuchungen an NMRI-Mäusen, **Erythrozyten**

Bei den Thrombozyten (**Abb. 15**) führt Ifosfamid allein und in Kombination mit HBO zu einem Thrombozytenabfall mit Nadir am Tag 11 ($p=0,0002$ Ifosfamid Tag 11 gegenüber Tag 1). Anschließend kommt es zu einem überschießenden Wiederanstieg der Thrombozyten. Am Ende der Beobachtungsperiode am Tag 17 haben sich alle vier Behandlungsgruppen wieder angeglichen. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß anhand des Verlaufes der Zellzahlen

der Leukozyten und Thrombozyten die HBO mit oder ohne Ifosfamid auf die Myelosuppression keinen Einfluß hat.

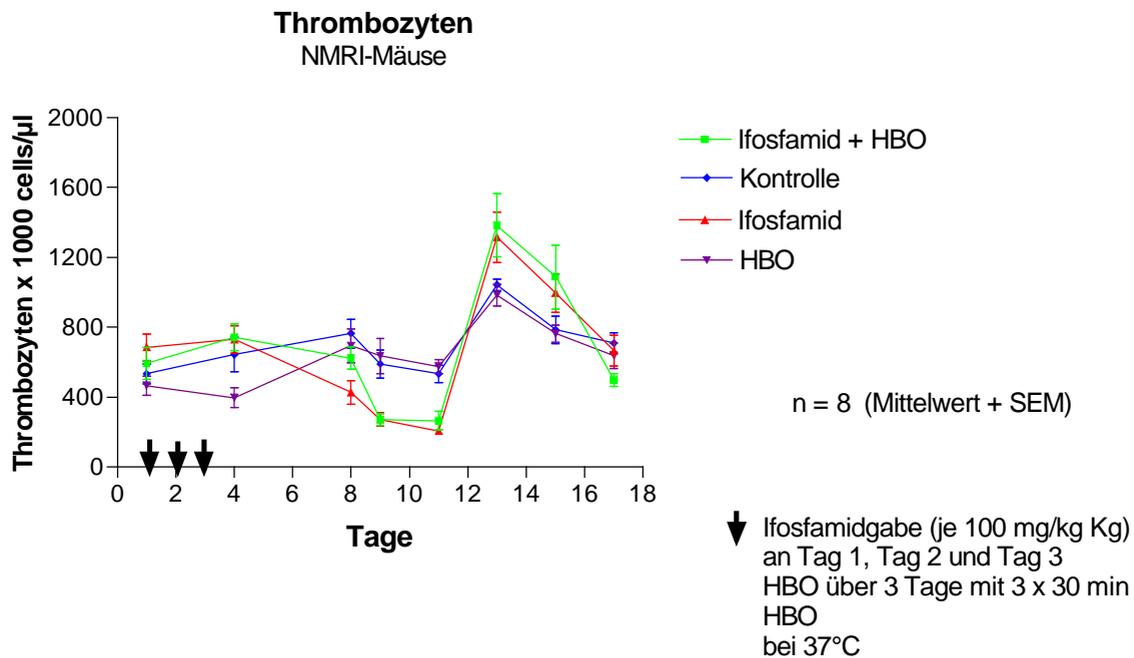


Abbildung 15 Blutbilduntersuchungen an NMRI-Mäusen, **Thrombozyten**

III.2.1 Versuche mit Ifosfamidgabe vor 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit Mx1-Tumoren

Die Wirkung von Ifosfamid unter HBO auf das Tumorwachstum wurde anhand von Volumenmessungen an Mx1-Tumoren an der Pfote auf Nu/Nu-Nacktmäusen untersucht. Therapiert wurde über 5 Tage nach dem Therapieschema TS 240/90 mit 125mg/kg KG Ifosfamid vor der HBO an Tag 4 und 5. Das durchschnittliche Tumolvolumen zum Therapiebeginn betrug 200 mm³. Therapiert wurde in vier Gruppen: „Ifosfamid“, „Ifosfamid+HBO“, „HBO“ und der Gruppe „Kontrolle“.

Das Wachstum der Mx1-Tumore, die 3 x 30 min Therapie erfahren haben, ist in der **Abb. 16** dargestellt. Anhand des Verlaufes der Tumorumfänge fällt eine Verteilung in zwei Gruppen auf: Die Gruppen „HBO“ und „Kontrolle“ liegen ohne signifikante Unterschiede mit fast identischem Verlauf bei Tumorumfängen bis auf 800 mm³ am Tag 28. Zu den mit Ifosfamid behandelten Gruppen findet jedoch ein signifikanter Unterschied (Tag 29 p=0,0286). Die Gruppen „Ifosfamid+HBO“ und „Ifosfamid“ verlaufen zu Beginn der Beobachtungsperiode

ebenfalls identisch. Ab Tag 17 beginnen sich die Tumolvolumina zu unterscheiden. Die nur mit Ifosfamid behandelten Tumore nehmen im Vergleich zu den mit der Kombination aus Ifosfamid und HBO behandelten Tumoren rasch an Volumen wieder zu. Statistisch erreicht der Unterschied zwar selbst am Tag 29 nicht die Signifikanzgrenze ($p=0,0635$), jedoch kommt es in der allein mit Ifosfamid behandelten Gruppe im Vergleich zur Kombinationsbehandlung von Ifosfamid mit HBO zu einem früheren Tumorprogress. Es kann hier von dem Trend gesprochen werden, daß die Kombination von Ifosfamid und HBO am Mx1-Tumor eine stärkere tumorsuppressive Wirkung zeigt als eine alleinige Ifosfamidtherapie (**Abb. 16**).

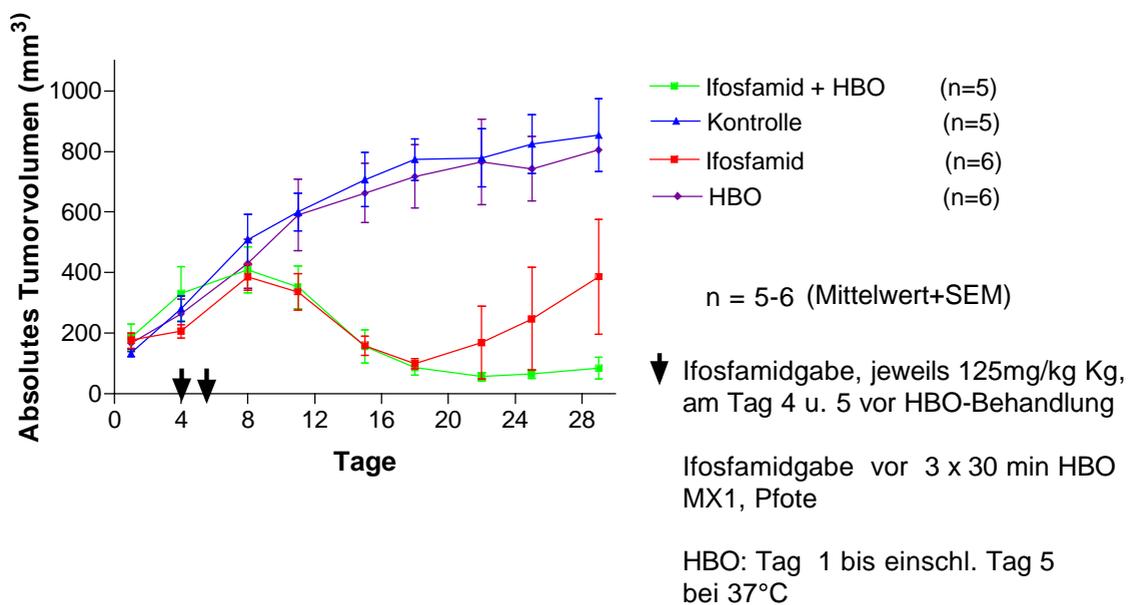


Abbildung 16 Messungen des Tumolvolumens, Mx1-Tumoren an der Pfote

III.2.2 Versuche mit Ifosfamidgabe während 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit Mx1-Tumoren

Mit Veränderung des Zeitpunktes der Ifosfamidgabe und des Sauerstoffes an Tag 4 und 5 wurde versucht den Zeitpunktes der maximalen Sauerstoffkonzentration zum Zeitpunkt der stärksten Ifosfamidmetabolitenspiegel zu optimieren. Therapiert wurde wieder über 5 Tage. Injiziert wurde nach 2 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie 125 mg/kg Kg Ifosfamid an Tag 4 und 5 mit anschließend erneuten 30 min HBO. Das durchschnittliche Tumolvolumen

betrug zum Therapiebeginn ca. 200 mm³. Es wurden erneut 4 Gruppen gebildet (**Abb. 17**). Die beiden Verläufe der Gruppen „HBO“ und „Kontrolle“ sind erneut ohne signifikante Unterschiede. In den Verläufen der Gruppe „Ifosfamid“ und der Gruppe „Ifosfamid+HBO“ sind geringe Unterschiede mit passager stärkerer Wachstumshemmung der Kombination des Ifosfamid mit HBO zu sehen. Die Unterschiede waren am Tag 15 am ausgeprägtesten und hier diesmal signifikant (p=0,015). Zum Ende der Beobachtungsperiode näherten sich die Verläufe jedoch wieder aneinander an. Am Tag 29 sind keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar (p=0,4286).

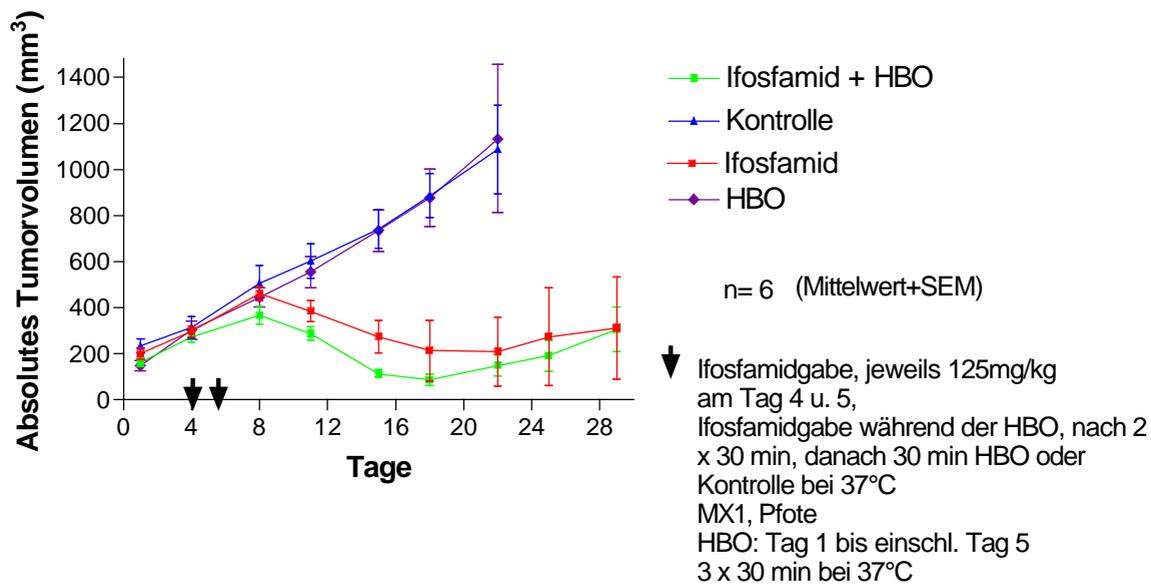


Abbildung 17 Messungen des Tumorvolumens Mx1-Tumoren an der Pfote

III.2.3 Versuche mit Ifosfamidgabe während 4 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit Mx1-Tumoren

Das Therapieschema TS 240/90 wurde auf 4 x 30 min HBO geändert um die Sauerstoffexposition zu verlängern. Der Therapiezeitraum wurde zur Lungenprotektion von 5 auf 3 Tage verkürzt. Die Ifosfamidgabe erfolgte mit 100 mg/kg Kg an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 nach 2 x 30 min mit anschließend weiteren 2 x 30 min HBO. In **Abb. 18** wurde das Tumorvolumen wieder gegen die Zeit dargestellt, diesmal wurden nur 3 Gruppen gebildet: Die Gruppe „Ifosfamid“ und die Gruppe „Ifosfamid+HBO“ sowie die Gruppe „Kontrolle“. Die Gruppe „HBO“ entfiel aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Anzahl der Tiere. Das durchschnittliche Tumorvolumen betrug zum Therapiebeginn ca. 300 mm³. Da die Tumore diesmal auf die Flanke der Tiere transplantiert waren, zeigten die Tumore der Gruppe „Kontrolle“ in diesem Versuch ein so starkes Wachstum, daß die Beobachtungsperiode dieser

Gruppe nach 18 Tagen abgebrochen werden musste. An der Flanke zeigten die Tumore ein vermehrtes Wachstumsverhalten, so das sie wesentlich schneller große Volumina erreichten. Bei den mit Ifosfamid behandelten Gruppen „Ifosfamid+HBO“ und „Ifosfamid“ wurde erst nach 39 Tagen ein Tumolvolumen von $>1200 \text{ mm}^3$ überschritten. Die Verläufe der Gruppen „Ifosfamid+HBO“ und „Ifosfamid“ sind mit einem Nadir am Tag 15 ohne signifikante Unterschiede.

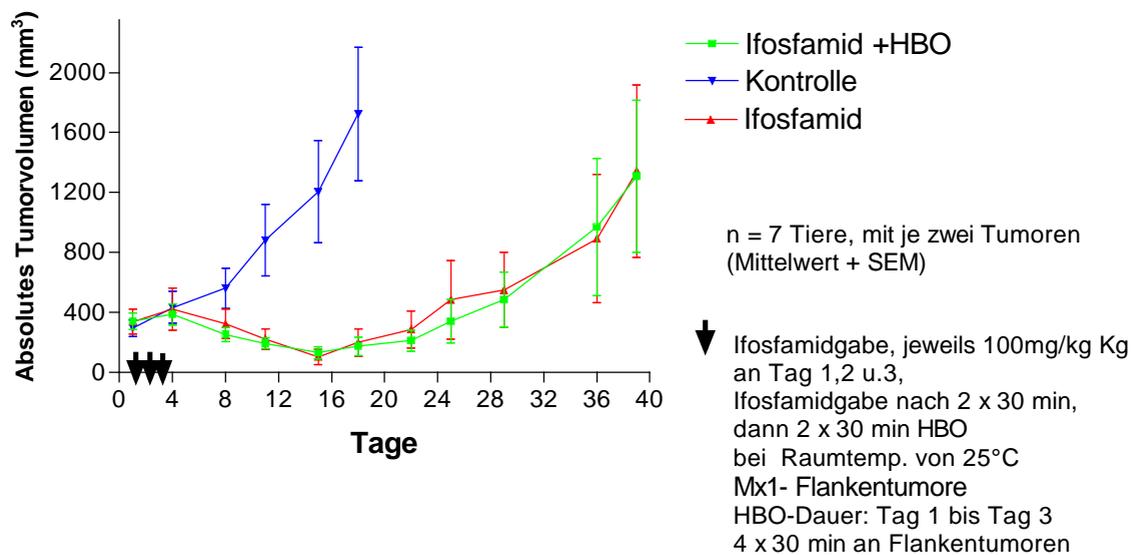


Abbildung 18 Messungen des Tumolvolumens, Mx1-Tumore an der Flanke

III.3.1 Versuche mit Ifosfamidgabe vor 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit S117-Tumoren wie unter III.2.1

Auch an S117-Tumoren wurde der Einfluß von Hyperbarer Sauerstofftherapie anhand des Tumorwachstums untersucht. Es wurde vorgegangen wie unter III.2.1 beschrieben. Therapiert wurde wieder über 5 Tage nach dem Therapieschema TS 240/90 mit je 125 mg/kg Kg Ifosfamid an Tag 4 und 5. Das durchschnittliche Tumolvolumen betrug zu Beginn ca. 200 mm³. In der **Abb. 19** ist zu ersehen, daß die Gruppe „HBO“ und die Gruppe „Kontrolle“ eine nahezu identischen Verlauf nahmen. Statistisch sind die geringen Abweichungen ohne Signifikanz. Die Tumore der Gruppen „Ifosfamid+HBO“ und „Ifosfamid“ zeigen ein deutlich vermindertes Volumen gegenüber den beiden anderen Beobachtungsgruppen („Ifosfamid+HBO“ gegen „Kontrolle“ p=0,0260 Tag 18). Die Kombination von Ifosfamid mit HBO zeigte die geringsten Tumorumfänge und schien auch hier eine stärkere Tumorsuppression zu bedingen als Ifosfamid alleine, jedoch ist der Unterschied der Gruppen „Ifosfamid“ und „Ifosfamid+HBO“ wieder ohne Signifikanz (p=0,4848 Tag 18).

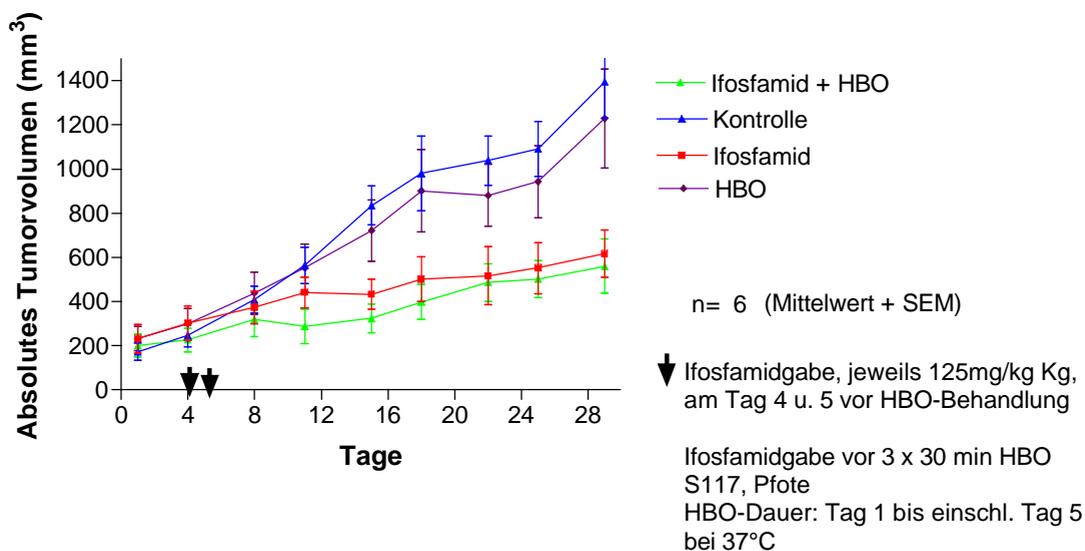


Abbildung 19 Messungen des Tumorumfanges, S117-Tumoren an der Pfote

III.3.2 Versuche mit Ifosfamidgabe während 3 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit S117-Tumoren wie unter III.2.2

Auch bei den S117-Tumoren wurde der Zeitpunkt der Ifosfamidgabe an Tag 4 und 5 zur Optimierung des Zeitpunktes des Wirkmaximums vom Ifosfamid und des Maximums der Sauerstoffradikalbildung verändert. Es wurde vorgegangen wie unter III.2.2 beschrieben. Das durchschnittliche Tumolvolumen lag zum Therapiebeginn bei 200 mm³. Therapiert wurde über 5 Tage mit je 125 mg/kg Kg Ifosfamid an Tag 4 und 5 (Abb. 20). Wegen sehr ausgeprägter Streuung in der Größe der Tumorumina wurde hier die Zahl der Versuchstiere in den Behandlungsgruppen „Ifosfamid+HBO“ und „Ifosfamid“ nahezu verdoppelt. Erkennbar ist, daß auch hier die Tumorumina der Behandlungsgruppe „Ifosfamid+HBO“ unter den Volumina der Gruppe „Ifosfamid“ liegen, wenn auch die Unterschiede hier die Signifikanzgrenze zwischen beiden Gruppen nicht erreichten (p=0,1178 Tag 18 und p=0,858 Tag 22).

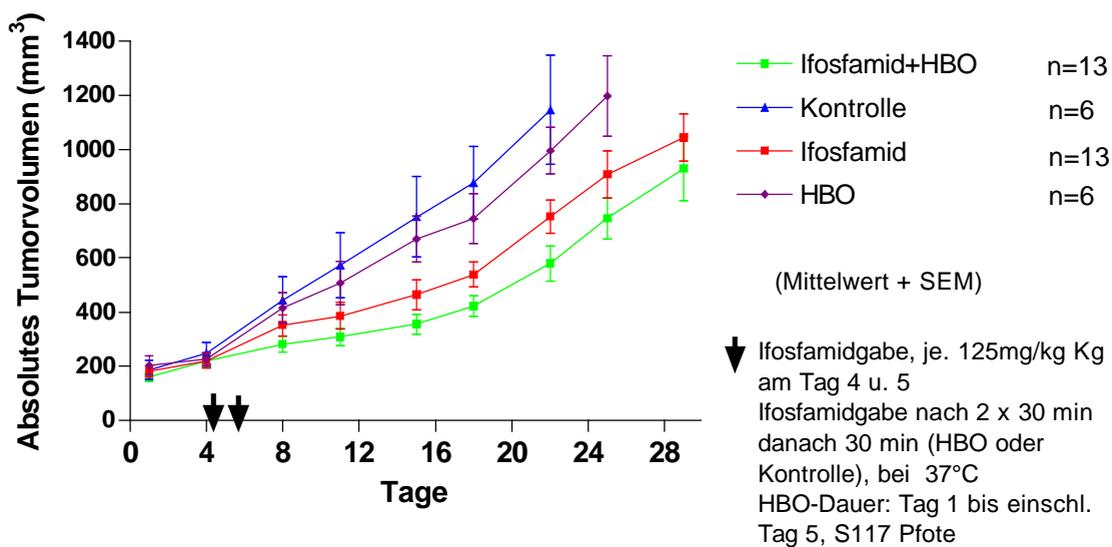


Abbildung 20 Messungen des Tumolvolumens, S117-Tumore an der Pfote

III.3.3 Versuche mit Ifosfamidgabe während 4 x 30 min Hyperbarer Sauerstofftherapie mit S117-Tumoren wie in III.2.3

Das Versuchsschema mit 4 x 30 min wurde wie bei den Mx1 auch bei den S117-Tumoren angewendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter III.2.3 beschrieben, die Tumore befinden sich an der Flanke und zeigten ein stärkeres Wachstumsverhalten, als an der Pfote, so daß sie wesentlich schneller große Volumina erreichten (**Abb. 21**). Das durchschnittliche Tumolvolumen lag zum Therapiebeginn bei 200 mm³. Die Ifosfamidgabe mit 100mg/kg KG erfolgte während 4 x 30 min HBO. Die Beobachtungsperiode musste wegen der geringeren Wirkung von Ifosfamid an S117-Tumoren als an Mx1-Tumoren früher als bei den vorherigen Versuchen wegen großer Tumolvolumina verkürzt werden, da sehr schnell zu große Tumolvolumina erreicht wurden. Auch bei diesem Versuch ließ sich ersehen, daß die Kombination von Ifosfamid mit HBO tendenziell stärker wirksam zu sein schien, als nur mit Ifosfamid alleine. Die nur mit Ifosfamid behandelten Tumore nahmen im Vergleich zu den mit der Kombination aus Ifosfamid und HBO behandelten Tumoren rasch an Volumen wieder zu. Statistisch waren die Unterschiede nicht signifikant (p=0,3142 Tag 18 und p=0,4482 Tag 22).

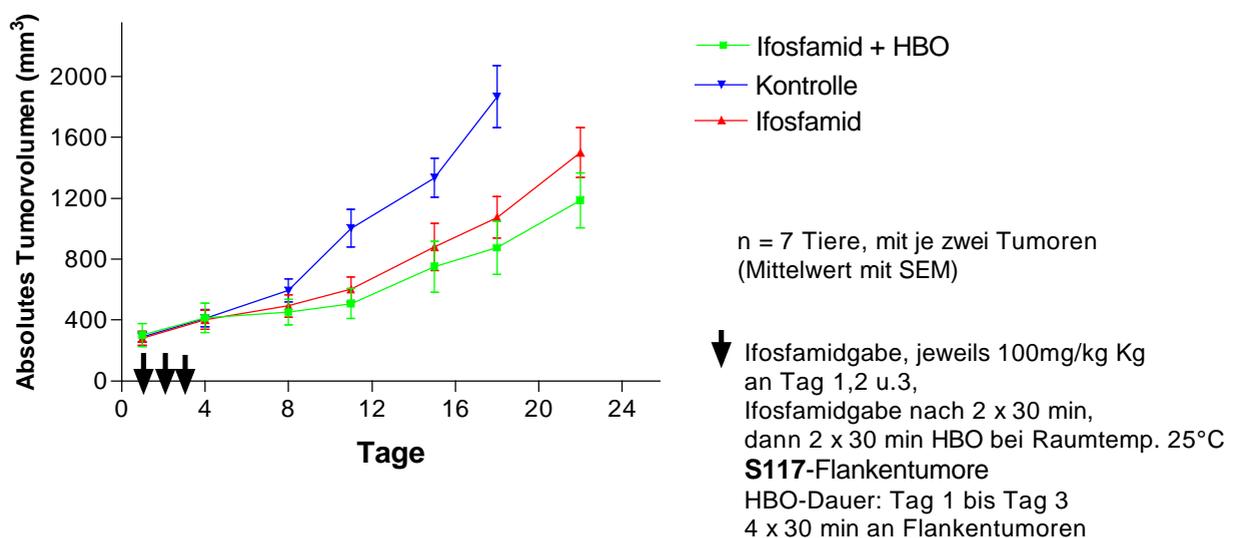


Abbildung 21 Messungen des Tumolvolumens, S117-Tumore an der Flanke

III.4 Einfluß der Hyperbaren Sauerstofftherapie auf die Proliferationsrate der Tumorzellen in der Immunhistochemischen Ki-67-Darstellung

Der Einfluß der HBO wurde an den Mx1- und S117-Tumoren über eine immunhistochemische Ki-67 Darstellung mittels LSAB-Methode geprüft. Gebildet wurden pro Tumorzelllinie je zwei Gruppen: „Mx1 HBO“ und „Mx1 Ko+37°C“ und „S117 HBO“ sowie „S117 Ko+37°C“. Es erfolgte keine Gabe von Ifosfamid, um den unmittelbaren Einfluß der HBO auf den Proliferationsindex zu prüfen. Therapiert wurde über 3 Tage nach dem auf 4 x 30 min abgewandelten Therapieschema TS 240/90. Das durchschnittliche Tumolvolumen zum Therapiebeginn lag bei 200 mm³. Nach der Tumorabnahme unmittelbar am 3. Therapietag erfolgte die Anfertigung und immunhistochemische Färbung histologischer Schnitte sowie die Ermittlung des Proliferationsindex der mit HBO behandelten Gewebe im Vergleich zu nicht behandeltem Gewebe. In der folgenden **Abb. 22** ist ein solcher histologischer Schnitt eines S117-Tumors abgebildet. Die Ki-67-positiv gefärbten Zellen erscheinen deutlich in einem bräunlichen Farbton, die nicht Ki-67-gefärbten Zellen erscheinen auf Grund der Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin in einem bläulich-violetten Farbton.

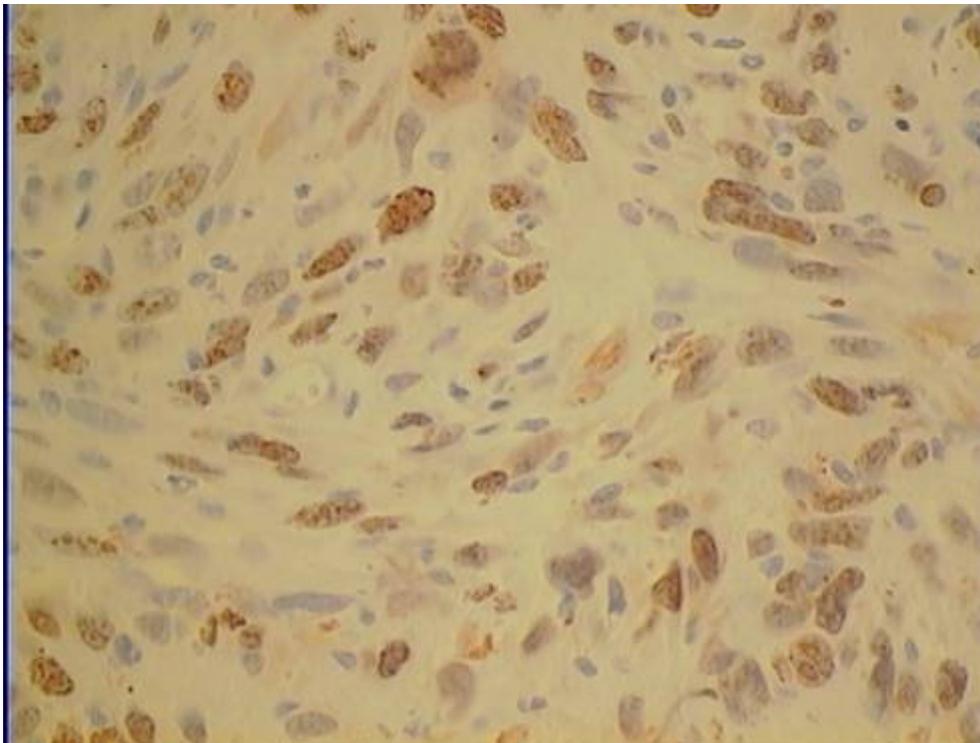


Abbildung 22 Immunhistochemisch anti-Ki-67-LSAB-gefärbte Histologie eines S117-Tumors, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin **ohne Markierungen** (Bildausschnitt bei ca. 40 facher Vergrößerung)

Die Bildausschnitte wurden durchnummeriert und die jeweilige Nummer im rechten oberen Bildrand zusammen mit der Anzahl der jeweils pro Bildausschnitt markierten Zellen notiert. Die folgende **Abb. 23** ist ein Bildausschnitt, in dem die Ki-67 positiv gefärbten, bräunlich erscheinenden S117-Tumorzellen mit jeweils einem schwarzen Punkt durch den Untersucher mittels Computerprogramm markiert sind. Bei diesem Bildausschnitt handelt es sich als Beispiel um den Ausschnitt Nr. 15b. Es wurden hier 142 positive Zellen gezählt.

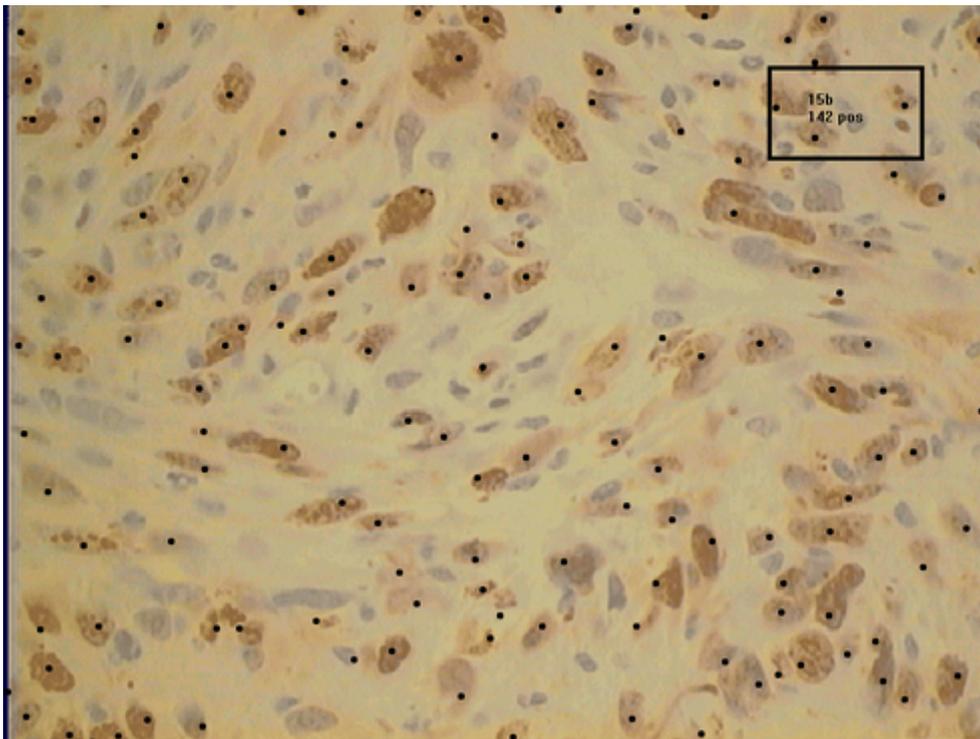


Abbildung 23 Immunhistochemisch anti-Ki-67-LSAB-gefärbte Histologie eines S117-Tumors, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Bildausschnitt bei ca. 40 facher Vergrößerung)
positiv markierte Zellen

Im folgenden Bildausschnitt (**Abb. 24**) sind jetzt die Ki-67 negativ gefärbten, bläulich-violett erscheinenden S117-Tumorzellen durch den Untersucher wieder mittels Computerprogramm mit einem schwarzen Punkt markiert. Bei diesem Bildausschnitt handelt es sich auch um den Ausschnitt Nr. 15b. Es wurden hier 109 negative Zellen gezählt.

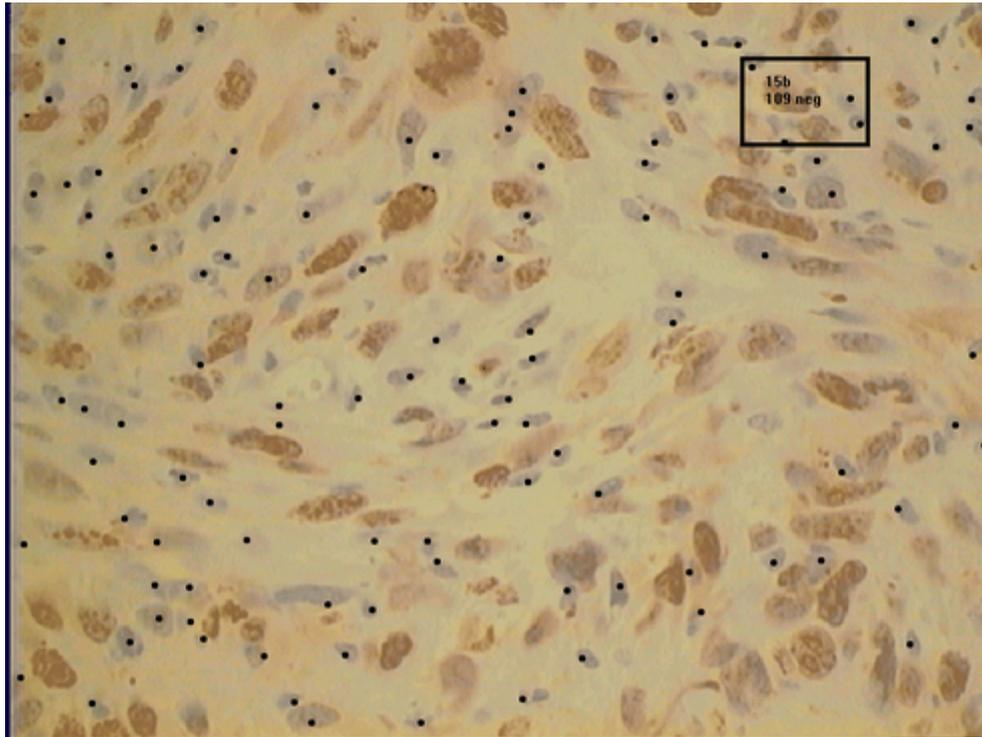


Abbildung 24 Immunhistochemisch anti-Ki-67-LSAB-gefärbte Histologie eines S117-Tumors, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Bildausschnitt bei ca. 40 facher Vergrößerung)
negativ markierte Zellen

Die Proliferationsrate pro Tumorzelllinie der jeweiligen Gruppen „Mx1 HBO“, „Mx1 Kontrolle“ und „S117 HBO“ sowie „S117 Kontrolle“ wurde in der folgenden **Abb. 25** dargestellt. Es ergaben sich bei den Mx1-Zellen in den Gruppen „Mx1 HBO“ und „Mx1 Kontrolle“ statistisch hochsignifikante Unterschiede im Proliferationsindex ($p=0,0001$) im Sinne einer Proliferationsvermehrung im Mx1-Tumorgewebe durch die HBO. Bei den S117-Zellen ergab sich keine signifikante Differenz ($p=0,4665$).

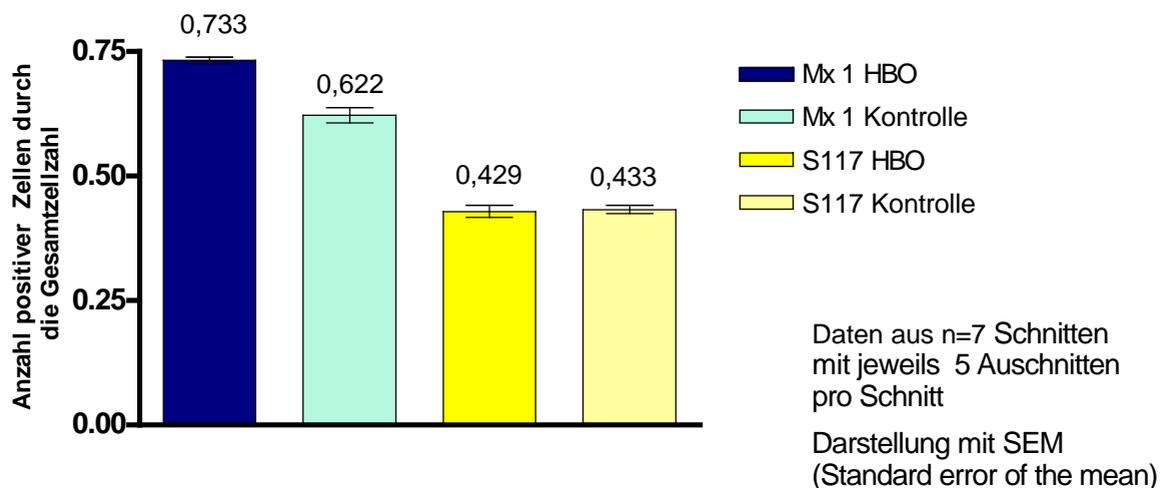


Abbildung 25 Histogramm des Proliferationsindex Mx1 und S117-Tumore nach 3 Tagen HBO und Kontrolle mit 4 x 30 min bei 37°C
Anzahl der positiven Zellen durch die Gesamtzellzahl

III.5 Zellkultur zur Prüfung einer Hypoxieadaptation der S117-Tumorzellen

Auf Grund der vorangegangenen Ergebnisse ergab sich die These, dass das Wachstum der verwendeten Zellen unabhängig von der Konzentration des Sauerstoff sein könnte. Daher wurde das Wachstum der S117-Tumorzellen in vitro unter Hypoxie überprüft. Die Inkubation der Tumorzellen erfolgte in speziellen Mikrotiterplatten mit gasdurchlässigen semipermeablen Membranböden unter 1% und unter 20 % Sauerstoffkonzentration im Brutschrank bei 5 % Kohlenstoffdioxid bei 37°C. Gemessen wurde mittels des Kristallviolett-Assay. Gebildet wurden zwei Gruppen: Die erste Gruppe der S117-Tumorzellen wurde bei 1% Sauerstoff gemessen. Die zweite Gruppe entsprach dem Zellwachstum bei normoxischen Bedingungen, etwa 20% Sauerstoff.

In der **Abb. 26** ist die optische Dichte gegen die Zeit histogrammisch dargestellt und zeigt das Zellwachstum von S117-Zellen im Verhältnis zur Sauerstoffkonzentration nach 24, 48 72 und 96 Stunden. Ein Wachstum der S117-Zellen erfolgte sowohl unter normoxischen Bedingungen als auch unter Hypoxie. Nach 24 h ist zunächst nur ein geringer Unterschied in der Anzahl der Zellen in Hypoxie gegenüber den Zellen in Normoxie ($p=0,9591$) zu sehen. Nach 48 h scheinen die Unterschiede größer, bei 96 h ergeben sich deutlichere Unterschiede. Diese sind statistisch jedoch nicht signifikant ($p=0,2345$ nach 72h und $p=0,234$ nach 96 h). Es findet auch nach 96 h trotz Mangels an Sauerstoff noch ein sichtbares Wachstum der S117-Zellen statt. Möglicherweise sind diese an eine Hypoxie adaptiert.

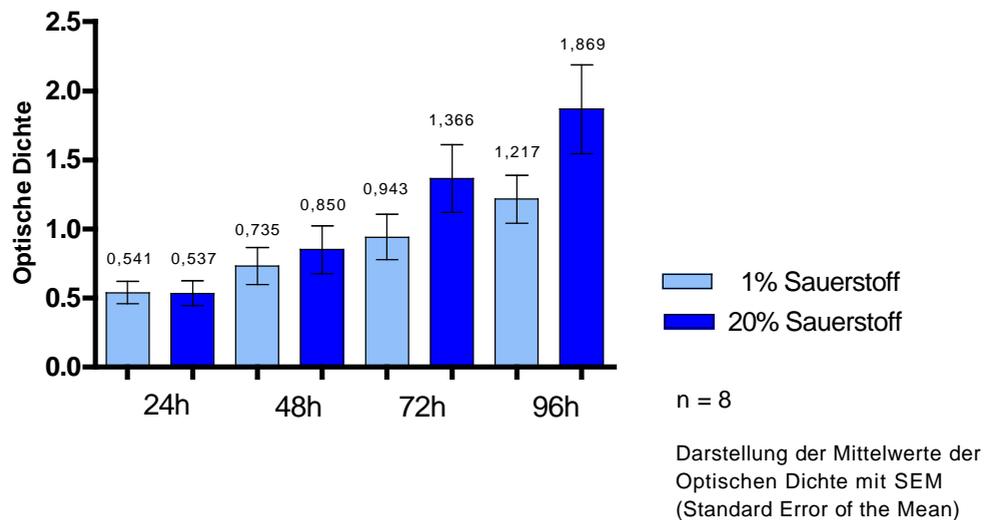


Abbildung 26 Auftrag der optischen Dichte gegen die Zeit, in Zellkulturplatten mit gasdurchlässigen, semipermeablen Membranböden (n=8, MTP, je 4 pro Gruppe) bis zu 96 h, Begasung bei 1% oder 20 % Sauerstoff bei 5% CO₂

IV. Diskussion

IV.1 Ergebnisse im Lichte der aktuellen Literatur

In der nichtoperativen Behandlung solider Tumore haben Alkylantien wie z.B. das Ifosfamid heute einen festen Stellenwert. Ein entscheidender Faktor für den Erfolg und deren therapeutische Wirkung ist die Sauerstoffversorgung und die Stoffwechselsituation im Tumorgewebe. Diese ist von verschiedensten Faktoren abhängig (Vaupel et al., 1997). Probleme stellen malnutritive, hypoxische Areale im Tumor dar. Hypoxische Areale entstehen, weil das Wachstum der Gefäßarchitektur von Tumoren mit dem Wachstum der Tumorzellen nicht Schritt halten kann. Schon ab einer Größe von 1-2 mm³ benötigen solide Tumore eine zusätzliche Gefäßversorgung um die Ausbildung von Hypoxien zu verhindern (Vaupel et al., 1997).

Das Volumen der behandelten Tumore in dieser Arbeit wurde zu Beginn der Behandlungen nach Literaturangaben von durchschnittlich 110 mm³ bis 300 mm³ gewählt. Innerhalb dieser Tumorgrößen und darüber hinaus ist sowohl beim Mammakarzinom als auch beim Weichteilsarkom das Vorkommen hypoxischer Areale beschrieben (Vaupel et al., 1991, Beinert et al., 1999, Fenton et al., 2001). Solche Areale können in allen soliden Tumorarten vorkommen. Verantwortlich hierfür ist eine chaotische Gefäßstruktur. Vaupel et al., beschrieben 1997, daß Tumorzellverbände neben Endothelzellen die Gefäßwände im Tumor auskleiden und u.a. ein erhöhtes thrombogenes Potential bedingen (Vaupel et al., 1997). Auch kurzzeitige Perfusionsunterbrechungen noch ungeklärter Ursache in Gefäßnähe können ursächlich für Hypoxien sein (Siemann et al., 1998). In einer Arbeit von Vujaskovic et al., aus dem Jahr 2000 wurden als mögliche Ursache der Tumorphoxie unter anderem Mikrothrombosen durch vaskuläre Schäden diskutiert, verursacht durch Temperatur- oder Druckeinwirkungen am Tumor. Anscheinend sind Tumorart, Höhe des umgebenden pO₂, Perfusion, sowie die Temperatur für die Ausbildung der Hypoxie ebenfalls entscheidend (Brizel et al., 1995, 1996). Abhängig von der jeweiligen Tumorentität konnte ebenfalls gezeigt werden, daß der jeweilige Anteil der hypoxischen Zellfraktion tumorspezifisch ist (Brizel et al., 1995, 1996). Es muß jedoch erwähnt werden, daß nach den Ergebnissen in der Arbeitsgruppe um Nordmark et al., 1994 auch innerhalb einer Tumorentität eine hohe Heterogenität der hypoxischen Fraktion existiert (Nordmark et al., 1994).

Tumorphoxie kann zwar das Spontanwachstum partiell verlangsamen, stellt aber ein großes Hindernis sowohl in der Strahlentherapie als auch für die meisten Zytostatika in der Tumorthherapie dar. Die große Heterogenität könnte die z.T. unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur zur Verbesserung der Tumoroxygenierung an Kopf-Hals-Tumoren mittels HBO

erklären (Fein et al., 1995, Schönmeyr et al., 2008). Auch Cardenas-Navai et al., wiesen 2004 am Fibrosarkom nach, daß die Sauerstoffverteilung im Tumor einer hohen Fluktuation unterliegen kann. Als direkte Einflußfaktoren machten sie Zeitdauer, Zeitpunkt sowie die Höhe des Sauerstoffpartialdruckes und die Temperatur verantwortlich. Im Jahr 1996 wies die Arbeitsgruppe um Graeber nach, daß maligne Zellen in Hypoxie eine Selektion zur verminderten Apoptosefähigkeit haben. Es kann zu Mutationen mit einem Defekt des Tumorsuppressorgens p53 kommen. Fällt dieses „Wächtergen“ als Gen der zentralen Steuerungen der Zellen zum Weg in den programmierten Selbsttod aus, werden durch eine größere genetische Heterogenität die Tumore therapieresistenter (Graeber et al., 1996). Die Hypoxie beschleunigt somit nachweislich den Prozeß einer malignen Transformation durch Erhöhung von DNA-Doppelstrangbrüchen, vermehrter Genamplifikation, und einem erhöhten Anteil an Deletionen und Transversionen. Das Potential zur Ausbildung von Metastasen oder lokalen Rezidiven in Zellen aus hypoxischen Arealen ist ebenfalls deutlich erhöht (Young et al., 1988, Reynolds et al., 1996, Russo et al., 1995). Die Hypoxie in Metastasen wurde in einer weiteren Studie von Brizel et al., 1996 an Weichteilsarkomen anhand von 22 Patienten mittels polarographischer Nadelelektroden bestimmt. Bei einer gemessenen Hypoxie in rezidivierenden Tumoren von einem medianen pO_2 von $< 7,5$ mmHg im Vergleich zu einem medianen pO_2 von 20 mmHg ließ sich bei den verwendeten Tumoren als Folge der Hypoxie und einer Hypoxieadaptation eine signifikant schlechtere Prognose ersehen. Die hypoxieadaptierten Tumore wiesen zudem ein deutlich schlechteres therapeutisches Ansprechen auf Therapien im Vergleich zu denen mit hohem Oxygenierungsgrad auf. Eine Ursache wird in der Nicht-Ausbildung des p53-Gens vermutet. An Kopf-Hals-Tumoren konnte 2005 in der Arbeitsgruppe um Nordmark ebenfalls nachgewiesen werden, daß Patienten mit schlecht oxygenierten Tumoren eine deutlich schlechtere Prognose hatten, als diejenigen mit guter Oxygenierung (Nordmark et al., 2005).

Die Verbesserung der Oxygenierung von hypoxischen Tumorarealen scheint daher insgesamt einen sinnvollen Therapieansatz darzustellen. Eine Möglichkeit der Verbesserung der Oxygenierung im hypoxischen Tumor ist die HBO. Der Einfluß von HBO mit Strahlentherapie wurde und wird in der Literatur intensiv untersucht. Den Einfluß von HBO in der Tumorthherapie in Kombination mit Ifosfamid galt es in dieser Arbeit zu prüfen. In der Kombination einer Strahlentherapie mit HBO existieren am Menschen bereits positive Ergebnisse (Ogawa et al., 2003, Ogawa et al., 2006). Schon im Jahr 1996 wurden in der Arbeitsgruppe um v. d. Kleij Patienten mit einem soliden Neuroblastom in einer über 6 Jahre

laufenden Studie mit HBO und Strahlentherapie behandelt. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug in der Gruppe der Kombination von HBO mit Strahlentherapie 3 Jahre, in der Vergleichsgruppe ohne HBO nur 15,4 Monate (v. d. Kleij et al., 1996). Beim Glioblastom sind ähnliche Erfolge in der Kombinationstherapie beschrieben (Kohshi et al., 1999, Kohshi et al., 2007). Als Begründung für den Therapieerfolg wird zum einen die Reoxygenierung hypoxischer Areale in Tumoren vermutet, die den Stoffwechsel der Zellen fördert, zum anderen geht man von einer erhöhten Bildung von Sauerstoffradikalen im Tumorgewebe aus, die nachweislich eine tumorzellschädigende Wirkung haben. Dies könnte bei der Kombination einer HBO mit Ifosfamid ebenfalls von Vorteil sein. In der Arbeitsgruppe um Teicher wurden 1988 Versuche mit Carbogen, Sauerstoff oder HBO in Kombination mit einer Strahlentherapie oder mit verschiedenen Alkylantien, wie z.B. dem Cyclophosphamid am Fibrosarkom in vivo und in vitro auf Mäuse-Xenograften durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, daß Tumorzellen durch Cyclophosphamid unter HBO signifikant besser eliminiert wurden als ohne HBO. Die Wirkung des Alkylanzes wurde in der Arbeit als gleichwertig zur Strahlentherapie beschrieben (Teicher et al., 1988). Allerdings wurde zeitgleich Fluosol-DA (Perfluordecalin und Perfluorotripropylamine) zur Verbesserung der Sauerstofftransportkapazität verwendet. Diese Substanz zeichnet sich als Chelator für Sauerstoff aus und wurde auf der Suche nach Blutersatztherapien experimentell am Tier angewandt (Dinkelmann und Northoff, 2003). Des weiteren wurden Carbogen oder die HBO über 3 bar z.T. über sechs Stunden appliziert, was unter international anerkannten Therapieschemata für den Menschen nicht ohne weiteres umsetzbar ist. In einer Arbeitsgruppe um Alagoz konnte 1995 am menschlichen Ovarialkarzinom in vivo ein signifikanter Unterschied im Ergebnis der Kombinationstherapie von HBO mit Cisplatin im Vergleich zu Cisplatin ohne HBO gezeigt werden. In einer weiteren Arbeit aus der Arbeitsgruppe um Granowitz aus dem Jahr 2005 konnte ebenfalls eine signifikante Verlängerung des antiproliferativen Effektes der Kombination von HBO mit einigen Chemotherapeutika wie Melphalane ($p < 0,05$), Gemcitabine ($p < 0,001$) und Paclitaxel ($p < 0,001$) an Mamma-Adeno-Karzinomzellen in vitro gezeigt werden. Als Ursache wird auch ein antiproliferativer Effekt der HBO auf maligne sowie gesunde Zellen diskutiert, der sich durch die Gabe von Chemotherapeutika verstärken läßt.

In dieser Arbeit gingen den eigentlichen Tumorversuchen zunächst Untersuchungen zur Toxizität von Ifosfamid mit HBO auf das Knochenmark der Versuchstiere voraus. Anhand der Blutbilduntersuchungen an NMRI-Mäusen konnte gezeigt werden, daß HBO die

Knochenmarktoxizität von Ifosfamid nicht verstärkt. Dieser Befund wurde in der Literatur noch nicht beschrieben. Die alleinige Applikation von HBO deprimierte die Anzahl der Leukozyten im Vergleich zur „Kontrolle“ nicht. Auffällig ist in allen Gruppen ein Leukozytenmaximum am Tag 11. Dieses ist am ehesten als reaktiv im Sinne einer passager überschießenden Rekonstitution der Hämatopoese zu betrachten. Denkbar ist auch, daß die Versuchstiere einen leichten Infekt durch die Blutabnahmen bekamen. Erstaunlicherweise tritt auch bei den Erythrozyten ein Nadir bei den mit Ifosfamid behandelten Gruppen am Tag 11 auf. Da dies wegen der langen Lebensdauer von Erythrozyten während der Beobachtungsperiode nicht zu erwarten wäre, ist der Grund auch hier nicht sicher zu klären. Ursächlich hierfür könnten die Blutabnahmen während der Beobachtungsperiode sein.

Bei den Thrombozyten ließ sich ebenfalls in allen Gruppen ein Nadir am Tag 11 darstellen ($p=0,0002$ Ifosfamid Tag 11 gegen Tag 1). Der Abfall der Thrombozyten kann wegen deren kurzer Lebensdauer als direkte Wirkung des Ifosfamid auf das Knochenmark interpretiert werden. Das Maximum am Tag 13 ist am ehesten reaktiv, im Sinne einer überschießenden Reaktion des hämatopoetischen Systems, wie sie z.T. auch beim Menschen in der Regeneration nach Gabe eines Chemotherapeutikums gesehen wird.

Die Ergebnisse dieser Dissertation deuteten bei den verwendeten Mx1- und S117-Tumoren mit und ohne Ifosfamid in den ersten drei Tagen zunächst an, daß die HBO keinen Einfluß auf die Wirkung von Ifosfamid hatte. Auch die Lage der Tumoren an Pfote oder Flanke der Nu/Nu-Nacktmäuse schien offenbar nicht entscheidend zu sein. Ab dem dritten Tag jedoch konnte in mehreren Änderungen des Therapieschemas TS240/90 auf bis zu 4 x 30 min HBO statt 3 x 30 min gezeigt werden, daß das Tumorstadium der mit einer Kombination von Ifosfamid mit HBO behandelten Tiere gegenüber den nur mit Ifosfamid behandelten Tieren sichtbare Unterschiede aufwies. Es konnte bei den Mx1-Tumoren eine passager stärkere Wachstumshemmung der mit HBO und Ifosfamid behandelten Tumore im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Ifosfamid gezeigt werden. Die Unterschiede waren am Tag 15 am ausgeprägtesten und hier sogar signifikant ($p=0,015$). Auch konnte der Trend beobachtet werden, daß die Kombination von HBO mit Ifosfamid eine verstärkte Tumorsuppression im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Ifosfamid zeigte. Bei den S117-Tumoren ließ sich ebenfalls in einigen Therapieschemata eine vermehrte Tumorsuppression in der Kombination von Ifosfamid mit HBO im Vergleich zur alleinigen Ifosfamidtherapie darstellen. Es war jedoch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der Kombination HBO mit Ifosfamid im Vergleich zu Ifosfamid zu sehen. Die Tumorgrößen näherten sich zum Ende

eines jeweiligen Untersuchungszeitraumes wieder derart aneinander an, daß auch langfristig kein Trend zu beobachten war. Möglicherweise lag dies an der geringen Anzahl an Tieren. Die Anzahl der Tiere (n=5-6) war in beiden Zelllinien sehr niedrig und der Beobachtungszeitraum mit max. 23 Tagen kurz. Tumore über diesen Zeitpunkt hinaus zeigten Defekte wie Anfratz oder Einrisse. In einer Arbeit von Teicher et al., im Jahr 1988 am FSa-II-Fibrosarkom mit Cyclophosphamid unter HBO wurden zwischen 7 und 21 Tiere verwendet und ein Beobachtungszeitraum von über 35 Tagen gewählt. Hier zeigte sich eine signifikante Verstärkung der Tumorsuppression durch das Cyclophosphamid mit HBO. Die Ergebnisse ähneln den Ergebnissen des Ifosfamid unter HBO am Mammakarzinom. Da es sich in dieser Arbeit von Teicher et al., ebenfalls wie beim S117-Tumor um ein Sarkom handelte, wären ähnliche Ergebnisse auch beim Ifosfamid am S 117 Weichteilsarkom unter HBO erwartet worden. Mögliche Ursachen für die Unterschiede zwischen den Ergebnissen wird die Tatsache sein, daß der Expositionszeitraum der HBO von 4 x 30 min unter 1,4 bar Überdruck in dieser Dissertation im Vergleich zu 6 Stunden HBO bei 3 bar in der Arbeit von Teicher et al., zu unterschiedlich ist. Zudem wurde in dieser Arbeit kein zusätzlicher Sauerstoffträger wie das Fluosol-DA intravenös injiziert. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit stellt eine genetische Veränderung und damit verbundene Resistenzbildung der verwendeten S117-Tumorzellen dar, wie sie in der Literatur beschrieben ist (Graeber et al., 1996, Reynolds et al., 1996). Cyclophosphamid und Ifosfamid gehören beide in die Gruppe der Alkylantien. Trotz gleicher Herkunft sind in der Literatur jedoch unterschiedliche Metabolite und Eigenschaften beschrieben.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Dissertation ist der durch Ki-67-Darstellungen geführte signifikant gesteigerte Proliferationsindex der Mx-1-Tumore zwischen den mit HBO behandelten Tumoren und den unbehandelten Tumoren. Dies läßt darauf schließen, daß der Anteil in der G₀-Ruhephase ruhender Zellen durch die HBO offenbar verringert wurde. HBO läßt offenbar Mx1-Mammacarcinienzellen aus der G₀-Ruhephase wieder vermehrt in den Zellzyklus eintreten. Diese These korreliert mit dem Ergebnis, daß sich beim Mammakarzinom durch die Kombination von HBO mit Ifosfamid der Trend einer vermehrten Tumorsuppression andeutet. Möglicherweise sind die Tumorzellen hierdurch angreifbarer für weitere Therapien.

Bei den S117-Tumoren findet sich im Proliferationsindex kein signifikanter Unterschied (p=0,4665). Ursächlich könnte der größere Anteil an hypoxischen Arealen in Mx1-Tumoren im Vergleich zu S117-Tumoren sein (Beinert et al., 1999). Je größer der Anteil an

hypoxischen Arealen pro Tumorentität ist, desto deutlicher konnte ein Ansprechen der Therapie in der Kombination einer HBO mit einer Strahlentherapie nachgewiesen werden (Kunugita et al., 2001). Eine weitere Ursache könnte in einer Hypoxieadaptation der verwendeten Tumorzellen liegen. Im Jahre 2001 konnte in einer Arbeit von Marxsen et al., an Tumorzellen nachgewiesen werden, daß sich diese im Verlauf von Zellkulturen selektieren und an eine Hypoxie adaptieren können. Erwähnenswert ist allerdings, daß es sich hierbei um Mx1-Zellen handelte, die über den langen Versuchszeitraum vermutlich durch Mutationen eine Hypoxieadaptation erfahren haben. Gerade Tumorzellen unterliegen einem erhöhten genetischen Wandel. Die Mutationsrate ist bei Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen deutlich erhöht. Hypoxie erhöht diese Mutationsrate noch zusätzlich (Young et al., 1988, Russo et al., 1995, Reynolds et al., 1996). Allerdings kann auch ein vermehrtes Sauerstoffangebot über einen längeren Zeitraum durch Sauerstoffradikalwirkungen ein mutagenes Potential bergen (Rothfuss et al., 1999).

Aus den Ergebnissen der Zellkulturversuche dieser Arbeit geht hervor, daß die verwendeten S117-Zellen auch in Hypoxie bei 1 % Sauerstoff ein Wachstum zeigten. Hypoxieresistente Zellen zeigen eine bessere Anpassung an einen Sauerstoffmangel. Haben die im S117-Tumor vorhandenen Zellen kein Wachstumsbenefit von einem erhöhten Sauerstoffangebot durch die HBO, findet offenbar keine Stoffwechselerhöhung und kein Eintritt aus der G₀-Ruhephase zurück in den Zellzyklus statt. Die Zellen wären möglicherweise nicht empfindlicher gegenüber Ifosfamid und dessen Metabolite. Beschrieben wurden in der Vergangenheit ähnliche Effekte von Dixon et al., aus dem Jahr 1978. Es konnte damals gezeigt werden, daß das Alkylanz Cyclophosphamid auf hypoxische Zellen in Tumoren, die auf Ratten transplantiert wurden, eine deutlich verminderte Wirkung aufwies. Somit wären sowohl die Ergebnisse der S117-Tumorbeobachtungen unter HBO, als auch der unveränderte Proliferationsindex anhand der S117-Tumore erklärbar. Bei Dixon et al., wurde die Hypoxieadaptation und damit eine vermehrte Resistenzbildung von Tumorzellen wie sie auch in der Arbeit von Reynolds et al., 1996 beschrieben wurde, als ursächlich betrachtet. Eine solche Hypoxieadaptation könnte die Ergebnisse von Tumorversuchen erheblich beeinflussen.

Weitere Faktoren einer möglichen Beeinflussung der Ergebnisse sind der Druck auf die Tumoren durch andere tumortragende Versuchstiere im selben Käfig. Einflüsse des Immunsystems der Nu/Nu-Nacktmäuse als Xenograften und Temperatureinflüsse müssen ebenfalls erwähnt werden. In der Arbeit von Vujaskovic et al., aus dem Jahr 2000 wurden als

mögliche Ursachen einer verstärkten Tumorphoxie Druck- oder Temperatureinwirkungen am Tumor diskutiert. Druck- oder Temperatureinwirkungen verursachten durch vaskuläre Schäden Mikrothrombosen und schlossen hinter den Thrombosen liegende Tumorareale von der Perfusion aus. Je mehr Versuchstiere sich einen Käfig teilten, desto größer war die Gefahr von Quetschungen an den Tumoren. Da das Fassungsvermögen der Druckkammer begrenzt war, wurden jeweils nur wenige Tiere therapiert, damit diese genügend Platz fanden und die Tumoren nicht während der Therapie versehentliche Quetschungen erfuhren. Druck, pO_2 , Temperatur sowie Einwirkungen auf die Tumore wurden somit in dieser Arbeit genormt. Auf Xenograften transplantierte Tumorzellen sind zudem immer einer Immunologischen Beeinflussung durch das Immunsystem der Wirtstiere ausgesetzt. Nu/Nu-Nacktmäuse sind hervorragend zur Transplantation von Xenograften geeignet. Eine fehlende T-Zellprägung bei den athymischen Mäusen macht es überhaupt nur möglich, daß körperfremde Zellen nur in geringem Maße erkannt und mit einer Immunantwort bedacht werden. Makrophagen und B-Lymphozyten als weitere Anteile des Immunsystem der Mäuse unterliegen keiner Funktionsstörung. Das jeweilige Immunsystem der Nacktmaus kann in geringem Maße Einfluß auf die Tumore im Sinne einer Zellektion nehmen. Dies ist seit langem bekannt (Tannock et al., 1968). Mit zunehmender Anzahl der Tierpassagen steigt in einem solchen Tiermodell die mögliche Bedeutung von Selektionsprozessen. Daher wurde die Passagezahl auf maximal 50 Transplantationen begrenzt.

Die Temperatur des Tumorgewebes ist ein weiterer wichtiger Faktor in der Therapie von soliden Tumoren. Die Versuchstemperatur in dieser Arbeit wurde mit $37,0^{\circ}C$ der Körpertemperatur des Menschen entsprechend angestrebt. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Temperatur im Tumor einen direkte Einfluß auf die Wirkung von Ifosfamid hat. Die alkylierende Wirkung des Stoffes ist in einem weiten Bereich linear temperaturabhängig. Über jenen Bereich hinaus wächst diese Abhängigkeit sogar exponentiell. Ein solcher Effekt wird auch in der heutigen Tumorthherapie am Menschen genutzt. Iatrogen angestrebte Temperaturen von über $37^{\circ}C$, z.B. bei über $42^{\circ}C$ der Körpertemperatur werden als Hyperthermie definiert (Roszinski et al., 1991, Wiedemann et al., 1993, Westermann et al., 2003, Schlag und Tunn, 2007). Die Arbeitsgruppe um Jones et al., zeigte im Jahre 2004, daß eine leichte Hyperthermie beim Mammakarzinom sogar einen positiven Einfluß auf eine Tumoroxygenierung haben kann. Begründet wurde dies mit einer leichten vasodilatatorischen Wirkung der Hyperthermie. In einer Arbeit der Arbeitsgruppe um Vujaskovic konnte aber auch gezeigt werden, dass eine Hyperthermie von über $43^{\circ}C$ Ursache für lokale Hypoxien im Tumorgewebe durch Förderung der Mikrothrombosenbildung sein

kann (Vujaskovic et al., 2000). Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen haben dies neben einer Verbesserung des Stoffwechsels der Tumorzellen ebenfalls zeigen können (Overgaard und Bichel 1977, Iwata et al., 1996, Song et al., 2001). Die Sicherung der konstanten Temperatur von genau 37 °C stellte im Versuchsaufbau zunächst ein großes Problem dar. Die Temperatur durfte keinesfalls überschritten werden, um nicht dem Effekt einer versehentlichen Hyperthermie zu erliegen, aber auch nicht unterschritten werden, um der Gefahr einer Minderperfusion durch eine kältebedingte Vasokonstriktion zu begegnen. Ein Problem in der Konstanz der Temperatur trat vor allem bei den Sauerstoffspülungen nach einer Frischluftpause ein, da der Sauerstoff aus Sauerstoffflaschen freigesetzt wird und sich das Gas beim Austritt aus den Flaschen wegen der Druckminderung von bis zu 200 bar auf 1,4 bar stark abkühlt. Dies sorgte zunächst für erhebliche Probleme einer reaktiven, überschießenden Temperaturregulation im Heizsystem der Kammer. Die Zieltemperatur von 37 °C wurde in Vorversuchen ohne Tiere in der Kammer zunächst mit Werten bis 46°C deutlich überschritten. Durch Änderungen an der Isolation und Modifikationen am Heizsystem der Druckkammer durch den Hersteller konnte die Temperatur konstant bei 37°C gehalten werden. Nach diesen Umbauten der Kammer konnten bei Messungen der Rektaltemperatur der Tiere keine Unterschiede hinsichtlich der Körperkerntemperatur mehr nachgewiesen werden (siehe Anhang).

Einige Autoren diskutieren als weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Tumoroxygenierung neben der HBO auch die Erhöhung der Sauerstoffbindungskapazität im Blut. Der Transport von Sauerstoff im menschlichen Körper erfolgt unter normoxischen Bedingungen im Blut überwiegend auf zwei Wegen: Zum einen durch an Hämoglobin gebundenen Sauerstoff, zum anderen durch physikalisch im Blut gelösten Sauerstoff. Mittels HBO ist die kurzfristige Erhöhung des physikalisch gelösten Anteils an Sauerstoff im Körper möglich. Auf längere Zeit gesehen kann aber die Höhe des Hämoglobins im Blut ebenfalls von Bedeutung für die Tumoroxygenierung sein. Vaupel et al., fanden 1991 heraus, daß das Auftreten hypoxischer Areale mit der Höhe des Hämoglobins im Blut korreliert (Vaupel et al., 1991). Einen direkten Zusammenhang zwischen Hb und Oxygenierungsstatus wies eine weitere Arbeitsgruppe um Vaupel 2001 an Patientinnen mit Cervixkarzinomen nach: Je geringer der Hb-Wert, desto größer war die hypoxische Fraktion und desto geringer der mediane pO_2 im Tumorgewebe (Vaupel et al., 2001). Erhöhungen des Hb mittels Bluttransfusionen oder mit rekombinantem Erythropoetin sind als Therapieergänzung beschrieben (Dunst 2004, Vaupel et al., 2005, Aapro et al., 2006). So wurde in einer Studie von Fein et al., 1995 bei 109 Patienten mit

Kehlkopfkarzinom retrospektiv der prätherapeutische Hämoglobinwert im Hinblick auf die Rezidivfreiheit nach einer Tumorthherapie untersucht. Die Wahrscheinlichkeit für eine zweijährige Rezidivfreiheit lag bei Patienten mit einem Hb von mehr als 13 g/dl mit 95 % deutlich höher als bei Patienten mit einem Hb von unter 13 g/dl mit 66 %. Zwar konnte in weiteren Studien der negative Einfluß einer Anämie bei einer Tumorthherapie wie z.B. der Strahlentherapie durch die Verstärkung der Tumorphoxie gezeigt werden (Dubray et al., 1996, Zhuang et al., 2000), allerdings ist die Erhöhung des Hb auf einen HB über 12 g/dl mittlerweile sehr kritisch zu betrachten und gilt heute von den Fachgesellschaften als obsolet. Eine Arbeitsgruppe um Henke et al., hat 2003 nachweisen können, daß der Anteil an Hämoglobin durch Erthropoetingabe erhöht werden kann, sich das Überleben der Patienten jedoch verschlechterte. Auch eine Arbeitsgruppe um Vaupel konnte 2006 belegen, daß Patienten von einer vermehrten Anhebung des Hb nicht profitieren (Vaupel et al., 2006). Es fanden sich auch 2007 deutliche Ergebnisse in der Literatur, daß die Erhöhung des Hb auf Werte über 12mg/dl mittels Erythropoetin oder Transfusionen das outcome der Patienten verschlechtert (Siegmond-Schulze 2007). Die Häufigkeit für Thrombosen und Lungenarterienembolien ist unter anderem signifikant erhöht. Der Hb bei den tumortragenden Versuchstieren dieser Arbeit wurde anhand der Höhe der Erythrozyten der NMRI-Mäuse aus den Vorversuchen bestimmt. Der Hb der Tiere wurde während der Versuche in dieser Dissertation nicht aktiv verändert. Eine Verbesserung der Tumoroxygenierung wurde ausschließlich mittels HBO erwirkt.

Eine Erhöhung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes wurde in der Vergangenheit auch mittels Chelatoren, wie dem in der Arbeit von Teicher et al., 1988 erwähnten Fluosol-DA erprobt. Eine Übersicht zu Versuchen der Blutersatztherapie zum Transport von Sauerstoff im Körper bietet die Arbeit von Dinkelmann und Northoff, 2003. Sauerstoffsensitizer wie z.B. das Misonidazol wurden in der Vergangenheit zur Verbesserung der Tumoroxygenierung ebenfalls eingesetzt (Clement et al., 1980, Tannock et al., 1980). Präklinisch wurde auch die Verbesserung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, durch Manipulation der intraerythrozytären 2-3-Bisphosphoglycerat-Konzentrationen, über pH-Verschiebungen oder andere Veränderungen der Sauerstoffbindungskurve erprobt. Diese Verfahren sind zusammengefasst von Siemann et al., 1998 beschrieben. Sie konnten wegen ihrer größtenteils hohen Zytotoxizität und den damit verbundenen starken Nebenwirkungen auf den menschlichen Organismus bislang keine dauerhaft klinischen Anwendungen finden.

Eine Verbesserung der Oxygenierung kann neben der HBO auch noch durch weitere Möglichkeiten erreicht werden, wie durch die Atmung von Carbogen unter hyperbaren Bedingungen (Brizel et al., 1995, 1997). Carbogen besteht zu 95 % aus Sauerstoff (O₂) und zu 5% aus Kohlenstoffdioxid (CO₂). Einige Arbeitsgruppen wiesen einen deutlich stärkeren Reoxygenierungseffekt bei Verwendung von hyperbarem Sauerstoff gegenüber hyperbarem Carbogen an Mammakarzinomen und Rhabdomyosarkomen im Tiermodell nach (Hartmann et al., 1998). Daher wurde in dieser Arbeit nur mit hyperbarem Sauerstoff und nicht mit Carbogen gearbeitet.

Sauerstoffkonzentrationen in Geweben lassen sich mit verschiedenen Methoden messen. In einer Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik I/Abteilung für Hämatologie/Onkologie und der Klinik für Strahlentherapie an der Universität zu Lübeck (siehe Anhang) wurde an den in dieser Arbeit beschriebenen Mx1 und S117-Tumoren mit der pO₂-Histographie der Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe gemessen. Die Ergebnisse werden im September 2008 als Posterbeitrag veröffentlicht (Cordes et al., 2008).

IV.2 Kombinationen von Hyperbarer Sauerstofftherapie in weiteren Therapieansätzen, Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluß von HBO auf Tumore, Ifosfamid und die Verbesserung der Tumorphoxie. Sie thematisiert nicht, daß einige Therapien die Hypoxie und Malnutrition von Tumoren auch nutzen, z.B. durch ein Aushungern der Tumore. Hypoxie induziert in Endothelzellen die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, so z.B. VEGF (Shweiki et al., 1995, Currie et al., 2004, Currie, 2005), das zur Ausbildung neuer Gefäßstrukturen und einer verbesserten Nutrition der Tumorzellen führt. Judah Folkman beschrieb ab Mitte der achtziger Jahre erstmals das Prinzip der Antiangiogenese (Folkman, 1985, Folkman und Klagsbrun 1987, Folkman und Ingber, 1992, Folkman, 2006). Dem Prinzip liegt die Tatsache zu Grunde, dass beim Wachstum solider Tumore die Gefäßarchitektur mit dem Wachstum der Tumorzellen nicht Schritt halten kann. Endothelzellen in hypoxischen Arealen schütten Wachstumsfaktoren, wie das VEGF aus, um eine Neoangiogenese in den Tumor zu ermöglichen. Durch einen monoklonalen Antikörper kann das VEGF unbrauchbar gemacht werden. Eine Folge ist die Hemmung der Neoangiogenese, welche durch eine dann zunehmende Minderperfusion die Tumore hypoxisch und nekrotisch werden läßt. Ein solches Medikament ist z.B. Bevacizumab

(Handelsname Avastin®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen), das seit Januar 2005 in Deutschland zugelassen ist. Ein weiteres Medikament ist das Thalidomid, das unter dem Namen Contergan® (Grünenthal, Stollberg, Aachen) ab 1957 zu schweren embryonalen Missbildungen am Menschen führte und 1961 weltweit vom Markt genommen wurde. Mittlerweile wird es zur Therapie des Multiplen Myeloms auch in Deutschland wieder eingesetzt (Dente, 2005). In ersten Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß ein Angiogenesehemmer wie das Bevacizumab in Kombination mit Chemotherapeutika wie dem Paclitaxel eine deutlich verbesserte Wirkung auf Mammakarzinomzellen zeigt, als Paclitaxel alleine (Link et al., 2007, Miller et al., 2007). Beeindruckend sind auch zwei Arbeiten von Curie et al., 2004 u. 2005 in denen ein Zusammenhang zwischen Hypoxie, Reaktion des VEGF unter der Therapie mit dem beim in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzten Medikamentes Tamoxifen® (Hexal AG, Holkirchen) gefunden wurde. Tamoxifen® kann die Expression von VEGF blocken, damit die Angiogenese negativ beeinflussen und somit auch eine Tumorphoxie fördern (Curie et al., 2004 u. 2005). VEGF kann unmittelbar durch Faktoren wie Tamoxifen oder Hypoxie beeinflusst werden (Brausero et al., 2000). In Anbetracht auch der Nachweise, daß die Hypoxie der Tumore in einigen Arbeiten eine schlechtere Prognose durch z.B. Erhöhung des Metastasierungspotentials herbeiführt (Brizel et al., 1996) scheint eine genaue Prüfung der Kombination verschiedener Therapieansätze sinnvoll zu sein. Die Arbeitshypothesen zeigen, daß die Tumoroxygenierung und die Tumorstoffwechselprozesse eine zentrale Rolle vieler Therapien spielen.

IV.3 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die Knochenmarkstoxizität von Ifosfamid durch HBO nicht beeinflusst wird. In der Kombination von Ifosfamid und HBO zeichnet sich bei beiden verwendeten Zelllinien eine geringe Wirkungsverstärkung im Vergleich zu den nur mit Ifosfamid behandelten Tumoren ab. Trotz der geringen Tierzahl gibt es bei den Mx-1-Tumoren den Trend einer stärkeren Tumorsuppression bei den mit HBO und Ifosfamid behandelten Tumore im Vergleich zu den nur mit Ifosfamid behandelten Tumoren (**Abb. 16**). Der Unterschied war einmalig sogar signifikant am Tag 15 (**Abb. 17**). Ähnliche Ergebnisse sind in der Literatur mit Cyclophosphamid an verschiedenen Tumoren gezeigt worden. Ein verstärktes Tumorwachstum konnte unter alleiniger Anwendung von HBO nicht beobachtet werden. Jedoch konnte in den Ergebnissen der immunhistochemischen Ki-67-Darstellungen eine signifikante Erhöhung des Proliferationsindex der mit HBO behandelten Mx-1-Tumore

im Vergleich zu den nicht mit HBO behandelten Tumoren dargestellt werden. Diese Veränderung bei den Mx-1-Tumoren läßt darauf schließen, daß durch die HBO vermehrt Zellen aus der G₀-Ruhephase wieder in den Zellzyklus eintreten. Bei den S117-Tumoren gab es keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsindex.

Durch Versuche in der Zellkultur konnte gezeigt werden, daß die verwendeten S117-Tumorzellen auch unter Hypoxie ein deutliches Wachstum zeigten, weshalb diese Zellen als hypoxieadaptiert anzusehen sind und nicht von einem vermehrten Sauerstoffangebot unter HBO profitieren. Möglicherweise hat die HBO deshalb bei den S117-Zellen keinen Einfluß auf den Zellzyklus und die Zellproliferation. Hieraus läßt sich schlußfolgern, daß zukünftig Ergebnisse der Laborforschung mit Sauerstoff oder HBO im Hinblick auf eine mögliche Hypoxieadaptation der verwendeten Zellen kritisch geprüft werden sollten.

V. Zusammenfassung

Maligne Tumore sind zusammengesetzt aus genetisch instabilen heterogenen Zellpopulationen innerhalb derer sich Areale unterschiedlichster Mikrozirkulation, Sauerstoffversorgung, Säure-Basen-Homöostase und Energiestoffwechselsituation in unmittelbarer Nachbarschaft finden. Normoxische Areale existieren neben hypoxischen Arealen. Die Hypoxien fördern die Resistenzbildung in Tumorzellen, diese gehen vermehrt in die G₀-Ruhephase über und sind für Chemotherapien oder Strahlentherapien fast unangreifbar. Mittels einer Hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) können hypoxische Areale in Tumoren reoxygeniert und sogar hyperoxygeniert werden. Die Kombination einer HBO mit einer Strahlentherapie hat bei einigen Tumoren, wie dem Glioblastom oder dem Neuroblastom am Menschen bereits zu deutlich verbesserten Therapieergebnissen geführt. In der Literatur finden sich Hinweise, daß dies bei einigen Tumorarten auch für die Therapie von HBO mit Alkylantien wie dem Ifosfamid gelten könnte.

In dieser Dissertation wurde *in vivo* die Wirkung von HBO mit Ifosfamid an zwei menschlichen Tumorzelllinien, dem Mx1-Mammkarzinom und dem S117-Weichteilsarkom auf Nu/Nu-Nacktmäusen untersucht. Vorangegangen waren den Tumorversuchen Toxizitätsversuche des Ifosfamid auf das Knochenmark von NMRI-Mäusen mit und ohne HBO. Es konnte in Vorversuchen gezeigt werden, daß die HBO in diesem Tiermodell ohne Einfluß auf das Knochenmark war. Auch in der Kombination von HBO mit Ifosfamid im Vergleich zur alleinigen Ifosfamidtherapie war keine verstärkte Knochenmarksdepression zu beobachten. Es ging jedoch aus den Ergebnissen der Tumorversuche hervor, daß die Kombination von HBO mit Ifosfamid im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Ifosfamid am Mx1-Tumor den deutlichen Trend einer passager stärkeren Wachstumshemmung mit einmalig sogar signifikantem Unterschied zeigte. Beim S117-Tumor konnte nur eine diskret verstärkte Tumorsuppression beobachtet werden. Es konnte weder ein Trend noch ein signifikanter Unterschied dargestellt werden.

Mittels immunhistochemischer Ki-67-Färbungen an Tumordünnschnitten wurde über den Proliferationsindex in mit HBO behandeltem Gewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Ursachen gesucht. Es fand sich ein signifikanter Unterschied beim Mx1-Tumor bei mit HBO behandeltem Gewebe im Vergleich zu nicht mit HBO behandeltem Gewebe ($p=0,0001$). In mit HBO behandeltem Mx1-Tumorgewebe befanden sich nach einer HBO signifikant mehr Tumorzellen im Zellzyklus als ohne HBO. Nach den Ergebnissen bezogen auf das Tumorstadium in dieser Dissertation bewirkt eine HBO kein verstärktes Tumorstadium. Offenbar ist es am Mammakarzinom jedoch gelungen Tumorzellen aus der G₀-Ruhephase

heraus wieder in den Zellzyklus eintreten zu lassen. Möglicherweise ist es somit möglich Mx1-Tumorzellen durch eine HBO wieder angreifbarer für Chemotherapien zu machen. Dies ließ sich am S117-Weichteilsarkom jedoch nicht darstellen. Eine mögliche Ursache für den unterschiedlichen Einfluß auf die Tumorzelllinien könnte in einer Hypoxieadaptation der S117-Tumorzellen im Vergleich zu den Mx-1Tumorzellen liegen, denn in anschließenden Zellkulturversuchen konnte nachgewiesen werden, daß die verwendeten S117-Tumorzellen auch unter Hypoxie bei 1 % Sauerstoff noch ein deutliches Wachstum zeigten und sich somit möglicherweise gar nicht von einer HBO beeinflussen lassen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen hoffen, ein besseres Verständnis für weitere Therapien solider Tumore zu entwickeln. Weitere Untersuchungen zur Reoxygenierung hypoxischer Tumorareale sind allerdings noch erforderlich, um die Voraussetzung für den Einsatz der HBO in Kombination mit Chemotherapien zu definieren.

VI. Literaturverzeichnis:

1. **Aapro M**, Coiffier B, Dunst J, Osterborg A, Burger H U (2006) Effect of treatment with epoetin beta on short-term tumour progression and survival in anaemic patients with cancer: A meta-analysis. *Br J Cancer*. Dec 4;95(11):1467-1473
2. **Alagoz T**, Buller R E, Anderson B, Terrell K L, Squatrito R C, Niemann Th H, Tatman D J, and Jebson P (1995) Evaluation of Hyperbaric Oxygenation as a chemosensitizer in the treatment of epithelial ovarian cancer in xenografts in mice. *Cancer* 75/9: 2313-2322
3. **Almeling M, Welslau W** (Hrsg.) (1996) Hyperbare Sauerstofftherapie -Qualitätsstandards, Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin (GTÜM) e. V., *Archimedes, Kiel* 2. Aufl.
4. **Becker A**, Kuhnt T, Liedtke H, Krivokuca A, Bloching M, Dunst J (2002) Oxygenation measurements in head and neck cancers during hyperbaric oxygenation. *Strahlenther Onkol*. Feb;178(2):105-108
5. **Beinert T**, Mergenthaler H-G, Sezer O, Löffel J, Bimder D, Oehm C, Werner T, Possinger K (1999) Hypoxie bei soliden Tumoren, *Dtsch med Wschr* 124, 534 – 540
6. **Beppu T**, Kamada K, Nakamura R, Oikawa H, Takeda M, Fukuda T, Arai H, Ogasawara K, Ogawa A (2003) A phase II study of radiotherapy after hyperbaric oxygenation combined with interferon-beta and nimustine hydrochloride to treat supratentorial malignant gliomas. *J Neurooncol* ; 61 (2): 161-170
7. **Börner K**, Kisro J, Brüggemann S K, Hagenah W, Peters S O, Wagner T (2000) Metabolism of Ifosfamide to Chloracetaldehyde contributes to Antitumor Activity in vivo, *Drug Metabol and Disposition*, Vol 28, (5) 573 – 576
8. **Brade W P**, Herdrich K, Varini M (1985) Ifosfamide-pharmacology, safety and therapeutic potential., *Cancer Treat Rev* 12, 1- 47
9. **Bramwell V H C**, Mouridsen H A T, Santoro B, Blackledge G, Somers R, Verwey J, Dombernowsky P, Onsrud M, Thomas D, Sylvester R (1987) Cyclophosphamid versus Ifosfamide. Final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcoma. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23; 311–321

10. **Brausero P**, Ben-Mahdi M, Mazucatelli J, Bloy C, Perrot-Applanat M (2000) Vascular endothelial growth factor is modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*; 279 (5): H 2033–2042
11. **Brizel D M**, Lin S, Johnson J L, Brooks J, Dewhirst M W, Piantadosi C A (1995) The mechanisms by which hyperbaric oxygen and carbogen improve tumor oxygenation. *Br J Cancer* 72; 1120–1124
12. **Brizel D M**, Scully S P, Harrelson J M, Layfield L J, Bean J M, Prosnitz L R, Dewhirst (1996) Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res.* 56(5): 941-943
13. **Brizel D M**, Hage W D, Dodge R K, Munley M T, Piantadosi C A, and Dewhirst M W (1997) Hyperbaric Oxygen improves tumor radiation response significantly more than Carbogen/Nicotinamide. *Radiation Res* 147; 715-720
14. **Brüggemann S**, Kisro J, Wagner T (1997) Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-Hydroxy-ifosfamide. *Cancer Res*; 57: 2676-268
15. **Brown D C**, Gatter K C (1990) Monoklonal antibody ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 17; 489–503
16. **Bubley G J**, Ogata G K, Dupuis N P, Teicher B A (1994) Detection of sequence-specific antitumor alkylating agent DNA damage from cells treated in culture and from a patient *Cancer Res.* (54) 6325 – 6329
17. **Camporesi E M** (1996) Hyperbaric Oxygen Therapie: A Committee Report. *Undersea and Hyperbaric Medical Society*, USA
18. **Cardenas-Navia L I**, Yu D, Braun R D, Brizel D M Secomb T W, Dewhirst M W (2004) Tumor-dependent kinetics of partial pressure of oxygen fluctuations during air and oxygen breathing *Cancer Res.* Sep 1;64 (17):6010-6017
19. **Carl U M**, Peusch-Dreyer D, Frieling T, Schmitt G, Hartmann KA. (1998) Treatment of radiation proctitis with hyperbaric oxygen: what is the optimal number of HBO treatments? *Strahlenther Onkol* 174 (9) 482-483, Review

20. **Ceriani R L**, Blank E W, Petersen J A (1987) Experimental immunotherapie of human breast carcinomas implanted in nude mice with a mixture of monoclonal antibodies against human milk fat globule components. *Cancer Res* Vol 47 (2) 532–540

21. **Ceriani R L**, Blank E W (1988) Experimental therapie of human breast tumors with labeled monoclonal antibodies prepared against the milk fat globule. *Cancer Res* Vol 48 (16) 4664–4672

22. **Clark J M, Fischer A B (1977)** Oxygen toxicity and extension of tolerance in oxygen therapie. In: Davis J C, Hunt T K, (eds.): *Hyperbaric oxygen therapie*. UHMS, Bethesda MD

23. **Clement J J**, Gorman M S, Wodzinsky I, Catane R, Johnson R K (1980) Enhancement of antitumor activity of alkylating agents by the radiation sensitizer misonidazole. *Cancer Res* 40: 4165-4172

24. **Cordes T**, Poll R, Dittmer C, Schulte R, Thill M, Diedrich K, Dunst J, Fischer D (2008) Messung der Oxygenierung von Mx1-Tumorxenograften unter Hyperbarer Sauerstofftherapie, 57. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), 16.- 19. September 2008, CCH-Hamburg

25. **Currie M J**, Hanrahan V, Gunningham S P, Morrin H R, Frampton C, Han C, Robinson B A, Fox S B (2004) Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomasin. *J Clin Pathol*.57 (8) 829-834

26. **Currie M J (2005)** Comment on the article: Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with hypoxia inducible factor (HIF-1alpha) and the HIF-1alpha target gene DEC1, but not lymph node metastasis in primary human breast carcinomasin *J Clin Pathol* 58 (3) 335

27. **Daruwalla J, Christophi C (2006)** Hyperbaric oxygen therapy for malignancy: a review. *World J Surg*. Dec; 30 (12) : 2112-2131

28. **DeCosse J J, Rogers L S (1966)** Influence of high-pressure oxygen an chemotherapie on the AMel4 hamster melanoma. *Cancer Res* 26 Part I, 287-292

29. **Dennog C**, Gedik C, Wood S, Speit G (1999) Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations in humans after hyperbaric oxygen treatment. *Mutat Res*, 17; 431 (2) 351-359
30. **Dente K** (2005) Ein Blick in die Zukunft. Was für und gegen Angiogenesehemmer als Hoffnungsträger der medikamentösen Krebsprävention spricht. *Deutsches Ärzteblatt* Jg. 102 (7) 339–340
31. **Dinkelmann S, Northoff H**, (2003) Artificial oxygen carriers -a critical analysis of current developments. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. Jan;38(1):47-54
32. **Dixon B**, Moore J V, Speakman H (1978) Radiobiological hypoxia of transplanted rat tumour and the effect of treatment with cyclophosphamide. *Eur J Cancer* 14: 1383-1387
33. **Dubray B**, Mosseri V, Brunin F, Jaulerry C, Poncet P, Rodriguez J, Brugere J, Point D, Giraud P, Cosset JM (1996) Anemia is associated with lower local-regional control and survival after radiation therapy for head and neck cancer: a prospective study. *Radiology* 201 (2) 553-558
34. **Duchrow M**, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad H-D, Gerdes J (1996) Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody ki-67. *Cell. Prolif* 29 1–10
35. **Dunst J** (2004) Management of anemia in patients undergoing curative radiotherapy. Erythropoietin, transfusions, or better nothing? *Strahlenther Onkol*. Nov; 180 (11):671-681
36. **Doll R E** (1965) Decompression sickness among U.S. NAVY operational divers: an estimate of incidence using air decompressing tables. Res Rep 4-64. Rep *US Navy Exp Diving Unit*. 1965 Feb 15;59:1-10
37. **Endl E, Gerdes J** (2000) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function *Exp Cell Res*, Jun 15; 257 (2): 231-237
38. **Fein D A**, Lee W R, Hanlon A L, Ridge J A, Langer CJ, Curran WJ Jr, Coia LR (1995) Pretreatment hemoglobin level influences local control and survival of T1-T2 squamous cell carcinomas of the glottic larynx. *J Clin Oncol* 3 (8) 2077-2083

39. **Fenton B M**, Lord E M, Paoni S F (2001) Intravascular HBO saturations, perfusion and hypoxia in spontaneous and transplanted tumor models. *Int J Cancer* Sep 1; 93 (5) 693-698
40. **Folkman J** (1985) Angiogenesis and its inhibitors. *Important Adv Oncol.* 42-62, Review
41. **Folkman J, Klagsbrun M** (1987) Angiogenic factors. *Science.* Jan 23, 235 (4787)442-447
Review
42. **Folkman J, Ingber D** (1992) Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol* Apr 3 (2) 89-96
Review
43. **Folkman J** (2006) Antiangiogenesis in cancer therapy-endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*, Mar 10; 312 (5) 594-607
44. **Gerdes J**, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal Antibody Ki-67. *J Immunology*, Vol 133, No 4, 1710–1715
45. **Gerdes J**, Li L, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad H-D (1991) Immunobiochemical and molekular biologic characterization of the cell proliferation-assoziated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138: 876-873
46. **Gimbrone M A Jr**, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J (1972) Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* Aug 1;136(2): 261-76
47. **Graeber T G**, Osmania C, Jacks T, Housman D E, Koch C J, Lowe S W, Giaccia A J (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumors. *Nature* 379, 88–91
48. **Granowitz E V**, Tonomura N, Benson R M, Katz D M, Band V, Makari-Judson G P, Osborne BA (2005) Hyperbaric oxygen inhibits benign and malignant human mammary epithelial cell proliferation. *Anticancer Res.* Nov-Dec; 25(6B): 3833-3842
49. **Gulden J, Einecke D** (2003) Zytostatika: Alkylantien. *Nachrichten aus der Onkologie.* *Cancer Care* 24, 16

50. **Hartmann K A**, Carl U M, Plugge D C, Schneider C J, and Sminia P (1998) Enhancement of radiosensitivity of rat rhabdomyosarcoma R1H with normobaric carbogen and hyperbaric oxygen (HBO) using conventionally fractionated irradiation. *Br J Radiology* 71; 433-437
51. **Henke M**, Laszig R, Rube C, Schäfer U, Haase K D, Schilcher B, Mose S, Beer K T, Burger U, Dougherty C, Frommhold H (2003) Erythropoietin to treat head neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial., *Lancet*, Oct. 18; 362 (9392): 1255-1260
52. **Höckel M**, Schlenger K, Mitze M, Schäffer U, Vaupel P (I) (1996) Hypoxia and radiation response in human tumors. *Semin in Radiat Oncology* 6/1 3-9
53. **Höckel M**, Schlenger K, Aral B, Mitze M (II) (1996) Association between tumor hypoxia and malignant progression in advanced cancer of the uterine cervix. *Cancer Res*; 56: 4509-4515
54. **Horn E P** Radke J, Rehberg-Klug B, Boemke G, Kox W J, Spies C, (2006) Hyperoxische Toxizität, HAI 2006 *Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung* -Hai II, 27-28
55. **Iwata K**, Shakil A, Hur W J, Makepeace CM, Griffin RJ, Song CW (1996) Tumor pO₂ can be increased markedly by mild hyperthermia. *Br J Cancer Suppl* 27, 217-221
56. **Jones E L**, Prosnitz L R, Dewhirst M W, Marcom P K, Hardenbergh P H, Marks L B, Brizel D M, Vujaskovic Z (2004) Thermochemoradiotherapy improves oxygenation in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*; 10 (13) : 4287-4293
57. **Kisro J**, Brüggemann S, Wagner T (1997) Mögliche Rolle des Ifosfamid-Metaboliten Chloracetaldehyd in der Tumorthherapie - Ein neues zytostatisches Target unabhängig vom Mitoseapparat der Zelle? *Focus MUL* 4, 251-255
58. **Kindwall E P**, **Goldmann R W** (1995) Oxygen toxicity. In Kindwall E P, Goldmann R W: Hyperbaric medical procedures, *St. Luke's Medical Center*, Milwaukee, Wisconsin, 8th rev. ed., 118-126
59. **Kueng W**, Silber E, Eppenberger U (1989) Quantifications of cellculture on 96-well plates, *Anal., Biochem.* (182) 16-19

60. **Kunugita N**, Kohshi K, Kinoshita Y, Katoh T, Abe H, Tosaki T, Kawamoto T, Norimura T (2001) Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models. *Cancer Lett.* Mar 26; 164 (2): 149-154
61. **Koch S**, Mayer F, Honecker F, Schittenhelm M, Bokemeyer C (2003) Efficacy of cytotoxic agents used in the treatment of testicular germ cell tumours under normoxic and hypoxic conditions in vitro. *Br J Cancer* Dec 1; 89 (11): 2133-2139
62. **Kohshi K**, Kinoshita Y, Imada H, Kunugita N, Abe H, Terashima H, Tokui N, Uemura S (1999) Effects of Radiotherapie after hyperbaric oxygenation on malignant gliomas, *Br J Cancer* 80 (1/2) 236–241
63. **Kohshi K**, Yamamoto H, Nakahara A, Katoh T, Takagi M (2007) Fractionated stereotactic radiotherapy using gamma unit after hyperbaric oxygenation on recurrent high-grade gliomas. *J Neurooncol.* May ; 82 (3): 297-303. Epub 2006 Nov 22
64. **Krementz E T**, **Knudsen L** (1961) The effect of increased oxygen tension on the tumoricidal effect of nitrogen mustard. *Surgery* 50, 266–273
65. **Lajhta L G** (1963) On the concept of the cell cycle. *J Cell Comp Physiol* (Suppl 1) 143–145
66. **Leather R P**, **Eckert C** (1963) Hyperbaric oxygenation and mechloreth amine effectiveness. *Arch Surg* 87, 144–147
67. **Link J S**, Waisman J R, Nguyen B, Jacobs C I (2007) Bevacizumab and albumin-bound paclitaxel treatment in metastatic breast cancer. *Clin Breast Cancer.* Oct;7(10):779-83
68. **Lopez F**, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau M R (1994) The labeling of proliferating cells by Ki-67 and MIB-1 antibodies depends on the binding of a nuclear protein to the DNA. *Exp Cell Res* 210, 145-153
69. **MacCallum D E**, Hall P A (1999) Biochemical characterization of ki-67 with the Identification of a Mitotic-Specific Form Associated with Hyperphosphorylation and Altered DNA Binding; *Exp Cell Res* 252, 186–198
70. **Marti C**, Kroner T, Remagen W, Berchtold W, Cserhati M, Varini M (1985) High-dose Ifosfamide in advanced osteosarcoma. *Cancer Treat Rep* 69, 115-117

71. **Marxsen J H**, Schmitt O, Metzen E, Jelkmann W, Hellwig-Bürgel T (2001) Vascular endothelial growth factor gene expression in the human breast cancer cell line Mx-1 is controlled by O₂ availability in vitro and in vivo. *Ann Anat* 183, 243–249
72. **Mayer R**, Hamilton-Farrell M R, van der Kleij A J, Schmutz J, Granstrom G, Sicko Z, Melamed Y, Carl U M, Hartmann K A, Jansen E C, Ditri L, Sminia P (2005) Hyperbaric oxygen and radiotherapy. *Strahlenther Onkol* 181 (2) 113-123, Review
73. **Miller K**, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez E A, Shenkier T, Cella D, Davidson N E (2007) Paclitaxel plus Bevacizumab versus Paclitaxel alone for metastatic breast cancer *The New Engl J Med* Vol 357: 2666-2676, N 26, Dec 27
74. **Molbo D M** (1967) What influence does HBO therapy have on nursing? *Chart.* Apr ; 64 (4): 107-9
75. **Nordsmark M**, Bentzen J, Overgaard J (1994) Measurement of human tumor oxygenation status by a polarographic needle electrode. An analysis of inter- and intratumor heterogeneity *Acta Oncol* 33 383 – 389
76. **Nordsmark M**, Bentzen S M, Rudat V, Brizel D, Lartigau E, Stadler P, Becker A, Adam M, Molls M, Dunst J, Terris DJ, Overgaard J (2005) Prognostic value of tumor oxygenation in 397 head and neck tumors after primary radiation therapy. An international multi-center study. *Radiother Oncol.* 2005 Oct;77(1):18-24. Epub 2005 Aug 10
77. **Ogawa K**, Yoshii Y, Inoue O, Toita T, Saito A, Kakinohana Y, Adachi G, Ishikawa Y, Kin S, Murayama S (2003) Prospective trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with chemotherapy for high-grade gliomas. *Radiother Oncol* 67 (1) 63-67
78. **Ogawa K**, Yoshii Y, Inoue O, Toita T, Saito A, Kakinohana Y, Adachi G, Iraha S, Tamaki W, Sugimoto K, Hyodo A, Murayama S (2006) Phase II trial of radiotherapy after hyperbaric oxygenation with chemotherapy for high-grade gliomas, *Br J Cancer* Oct 9;95(7):862-868. Epub 2006 Sep 5
79. **Overgaard J, Bichel P** (1977) The influence of hypoxia and acidity on the hyperthermic response of malignant cells in vitro. *Radiol* 123, 511-514

80. **Overgaard J**, Horsman M R (1996) Modification of hypoxia-induced radioresistance in tumors by the use of oxygen an sensitizers. *Sem Radiat Oncol* 6, 10–21
81. **Petry E** (1923) Zurkenntnis der Bedingungen der biologischen Wirkung der Röntgenstrahlung. *Biochem Zeitschr* 135, 353-383
82. **Plafki C** (1997) Komplikationen der HBO-Therapie bei elektiven Indikationen. *Caisson*, 12, 116–122
83. **Reynolds T Y**, Rockwell S, Glazer P M (1996) Genetic instability induced by tumor micro-environment. *Cancer Res* 56, 5754 – 5757
84. **Roszinski S**, Wiedemann G, Jiang SZ, Baretton G, Wagner T, Weiss C (1991) Effects of hyperthermia and/or hyperglycemia on pH and pO₂ in well oxygenated xenotransplanted human sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* Jun 20 (6) 1273-1280
85. **Rothfuss A**, Stahl W, Radermacher P, Speit G (1999) Evaluation of mutagenic effect of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro *Environ Mol Mutagen*. 34 (4): 291-296
86. **Russo C A**, Weber T K, Volpe C M, Stoler D L, Petrelli N J, Rodriguez Bigas M, Burhans W C, Anderson G R (1995) An anoxia inducible endonuclease and enhance DNA breakage as contributors to genomic instability in cancer. *Cancer Res* 55, 1122–1128
87. **Santos O**, Pant K D, Blank E W and Ceriani R L(1992) 5-Iododeoxyuridine increases the efficacy of the radioimmunotherapy of human tumors growing in nude mice; *J Nucl Medicine*, Vol 33, Issue 8, 1530 – 1534
88. **Sayer H G, Höffken K** (2003) Hormon-Chemo- und Immuntherapie beim Mammacarcinom. Die beste Strategie für Ihre Patientin. *MMW-Fortschr. Med*, Nr.24, 569–571
89. **Sawhney N, Hall P A** (1992) Ki-67 structure, function and new antibodies. *J Pathol*, 168, 161–162
90. **Schlag P M, Tunn P-U** (2007) Isolierte hypertherme Extremitätenperfusion mit TNF- α und Melphalan; *Deutsches Ärzteblatt*, Jg.104, 33, 2009-2014

91. **Schlüter C**, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker M H G, Key G, Flad H-D, Gerdes J (1993) The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 123, 513-522
92. **Schmid P**, Possinger K (2000) Neue Therapiestrategien beim fortgeschrittenen Mammacarcinom. *MMW-Fortschr Med* Nr. 35, 654–655
93. **Schmitt O**, Schubert C, Feyerabend T, Hellwig-Burgel T, Weiss C, Kuhnel W (2002) Preferential topography of proteins regulating vascularization and apoptosis in a MX1 xenotransplant after treatment with hypoxia, hyperthermia, ifosfamide, and irradiation. *Am J Clin Oncol* 25 (4) 325-336
94. **Schneeweis A**, Thomssen Ch, Harbeck N, Bastert G (2003) Prognosefaktoren beim Mammacarcinom. Davon hängt der Therapieerfolg ab. *MMW-Fortschr.Med.* Nr. 24, 563-567
95. **Scholzen T, Gerdes J.** (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* Mar;182(3):311-22. Review
96. **Schönmeier B H**, Wong A K, Reid, V J, Gewalli F, Mehrara B J (2008) The effect of hyperbaric oxygen treatment on squamous cell cancer growth and tumor hypoxia *Ann Plast Surg* 2008 Jan;60(1):81-88
97. **Shewell J, Thompson S C** (1980) The effect of hyperbaric oxygen treatment on pulmonary metastasis in the C3H mouse. *Europ J Cancer*, Vol 16, 253–259
98. **Shweiki D**, Neeman M, Itin A, Keshet E (1995) Induction of vascular endothel growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: Implantation for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 768–772
99. **Siegmund-Schulze N** (2007) Neue Warnhinweise für Epo; Erhöhte kardiovaskuläre Risiken durch Erythropoetin (Epo) bei Hämoglobinzielwerten über 12 g/dl. Möglicherweise wird auch die Tumorprogression gefördert. *Deutsches Ärzteblatt*, Jg. 104, Dez., Heft 51-52, 3108
100. **Siemann D W**, Horsman M R, Chaplin D J (1998) Modifikation of Oxygen supply. In Molls M, Vaupel P (eds.) Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Berlin, Heidelberg, New York

101. **Sminia P**, van der Kleij AJ, Carl UM, Feldmeier JJ, Hartmann KA (2003) Prophylactic hyperbaric oxygen treatment and rat spinal cord reirradiation. *Cancer Lett.* 28, 191 (1) 59-65, Review
102. **Song C W**, Park H, Griffin R J (2001) Improvement of tumor oxygenation by mild hyperthermia. *Radiat Res* 155; 515-528
103. **Speit G**, Dennog C, Radermacher P, Rothfuss A (2002) Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 512 (2-3) 111-119, Review
104. **Strätling M, Schmucker P** (2002) The centennial of oxygen-therapy (1902-2002) - reassessing its history. **Part I:** "The long way of oxygen "-from its discovery to its implementation as a rational therapy in anaesthesia and emergency-medicine *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* Dec; 37 (12): 712-20
105. **Strätling M, Schmucker P** (2003) The centennial of oxygen-therapy (1902-2002) - reassessing its history. **Part II:** The contributions of the "Roth-Draeger anaesthesia apparatus" (1902) and other inventions of 100 years of Draeger-Medical-Technology (1902-2002) to the history of truly "therapeutic" application of oxygen. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* Jan; 38 (1): 4-13
106. **Suit H D**, Smith J J, Suchato C (1966) Effect of daily exposure to high pressure oxygen on tumor growth. *Am J Roentgenology*, Vol 97, 1019–1022
107. **Tannock I** (1968) The relationship between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor, *Br J Cancer* 22, 258–273
108. **Tannock I** (1980) The in vivo interaction of anti-cancer drugs with misonidazole or metronidazole: Cyclophosphamide and BCNU. *Br J Cancer* 42: 871-880
109. **Teicher B A**, Lazo J S, Sartorelli A C (1981) Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res*, 41, 37–81
110. **Teicher B A**, Herman T S, Holden S A, Cathcart K N S (1988) The effect of fluosol-DNA and oxygenation status on the activity of cyclophosphamide in vivo. *Cancer Chemother Pharmacol* 21(4):286-291

111. **Teicher B A**, Holde S A, Al-Achi A and Herman T S (1990) Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaIIIC Murine Fibrosarcoma. *Cancer Res* 50, 3339-3344
112. **Teicher B A**, Holden S A, Menon K, Hopkins R E, Gawryl M S (1993) Effect of hemoglobin solutions on the response of intracranial and subcutaneous 9L tumors to antitumor alkylating agents *Cancer Chemother Pharmacol* (33) 57–62
113. **Teicher B A** (1994) Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev.* Jun;13(2):139-168.
114. **Thomlinson R H, Gray L H** (1955) The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer.* Dec;9(4):539-49
115. **Untch M**, Jackisch C, Thomssen C, Nitz U, von Minckwitz G, Kaufmann M (2006) Übersichtsarbeit: Adjuvante Therapie mit Trastuzumab bei Mammakarzinompatientinnen *Deutsches Ärzteblatt.* Jg.103, 50, 2961 – 2965
116. **van de Kleij A J, Voute P A** (1996) Treatment of recurrent stage IV Neuroblastomas with ¹³¹I-MIBG and HBO. Six years follow-up; *Strahlenther Onkol 172 Suppl.II*; 28 – 29
117. **van Laak, U** (1993) Klinik, Pathophysiologie und Therapie von Decompressionserkrankungen *Ther Umschau* Bd. 50, 252-257
118. **Vaupel P**, Schlenger K, Knoop C, Höckel M (1991) Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂-tension measurement. *Cancer Res* 52, 3316– 322
119. **Vaupel P**, Thews O, Höckel M (1997) Durchblutung, Oxygenierung, pH-Verteilung und bioenergetischer Status maligner Tumoren, Charakterisierung und therapeutische Konsequenzen. *Arzneimittelther* 15.Jahrgang, 10, 319–327
120. **Vaupel P**, Kelleher D K, Höckel M (2001) Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Sem Oncol* 28, 29-35
121. **Vaupel P**, Harrison L (2004) Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response *Oncologist* (9Suppl 5) 4-9

122. **Vaupel P**, Dunst J, Engert A, Fandrey J, Feyer P, Freund M, Jelkmann W (2005) Effects of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) on tumor control in patients with cancer-induced anemia. *Onkologie*. Apr; 28 (4): 216-221. Epub 2005 Mar 31
123. **Vaupel P**, Mayer A, Höckel M (2006) Impact of hemoglobin levels on tumor oxygenation: the higher, the better? *Strahlenther Onkol*. Feb;182(2):63-71
124. **Verheijen R**, Kuijpers H J H, Schlingemann R O, Boehmer A L M, van Driel R, Brakenhoff G J, Rameakers F C S (I) (1989) Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. *J cell Science* 92, 123–130
125. **Verheijen R**, Kuijpers H J H, Schlingemann R O, Boehmer A L M, van Driel R, Brakenhoff G J, Rameakers F C S (II) (1989) Ki-67, Intracellular localisation during interphase. *J cell Science* 92, 531–540
126. **Vujaskovic Z**, Poulson J M, Gaskin A A, Thrall D E, Page R L, Charles H C, MacFall J R, Brizel D M, Meyer R E, Prescott D M, Samulski T V, Dewhirst M W (2000) Temperature-dependent changes in physiologic parameters of spontaneous canine soft tissue sarcomas after combined radiotherapy and hyperthermia treatment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46 (1) 179-185
127. **Wagner T** (1994) Ifosfamide clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 26, 439–456
128. **Warburg O** (1953) The reaction of ascites tumor cells to oxygen under high pressure *Arch Geschwulstforsch* 6 (1) 7-11
129. **Westermann A M**, Wiedemann G J, Jager E, Jager D, Katschinski D M, Knuth A, Vorde Sive Vording P Z, Van Dijk J D, Finet J, Neumann A, Longo W, Bakhshandeh A, Tiggelaar C L, Gillis W, Bailey H, Peters S O, Robins H I (2003) A Systemic Hyperthermia Oncologic Working Group trial., Ifosfamide, carboplatin, and etoposide combined with 41.8 degrees C whole-body hyperthermia for metastatic soft tissue sarcoma. *Oncology* 64 (4) 312-321
130. **Wiedemann G J**, Siemens H J, Mentzel M, Biersack A, Wössmann W, Knocks D, Weiss C and Wagner T (1993) Effects of temperature on therapeutic efficacy and pharmacokinetics of ifosfamide. *Cancer Res* 53, 4268–4272

131. **Wood J D (1980)** GABA and oxygen toxicity: a review. *Brain Res. Bull* 5, 777–780, Review
132. **Young S D, Marshall R S, Hill R P (1988)** Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9533–9537
133. **Zhuang D, Schenker N, Taylor J M, Mosseri V, Dubray B (2000)** Analysing the effects of anaemia on local recurrence of head and neck cancer when covariate values are missing. *Stat Med.* May 15; 19 (9) 1237-1249

VII. Anhänge

VII. Präparate/Herkunftsnachweise/Adressen/Tabellen

1. Tierversuchsantrag

Antrags-Nummer : **X 252-72241.122-4 (44-5/99)**
Antrag vom : 14.05.1999
Antragsteller: Prof. Dr. med. habil Th. Wagner

Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein
Fr. Dr. Irmer
Referat Tierschutz
Postfach 6209

24123 Kiel

2. Reagenzien/ Präparate/etc. (alphabetisch):

Ampicillin® ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm Deutschland
Antibody-Diluent, 250 ml, S2022,	DAKO Cytomation
Aqua dest.,	Apotheke
Aquatex Eindeckmedium,	108562, Merck
ChemMate Detectionskit Streptavidin-Biotin HRP/DAB,	Kaninchen/Maus, für 600 Tests, K 5001, DAKO Cytomation
Citronensäure-Monohydrat,	Nr. 1.00244.0500, Merck
Cutasept® -F,	BODE CHEMIE Hamburg
Cryosafe® -Röhrchen	Cryosafe®
Essigsäure 10%	Apotheke
Falcon® -Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Apotheke
Glutaraldehyd 11%	Apotheke
Holoxan®	ASTA Medica AWD GmbH
Ki 67 (Primär Antikörper, Kaninchen-Anti-Human), 1 ml, A-0047,	DAKO Cytomation
Mayer´s Hämatoxylin-Eosin, 2,5 l,	Apotheke
Menzel Superfrost® Millipore,	Apotheke
Nembutal®	Sanofi®
Omnilab-Deckgläser,	Firma Omnilab®
Peroxydase-Blockierungsreagenz,	S2023, DAKO Cytomation
PetriPerm-Zellkulturschalen,	Vivascience AG
Pipette, 10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Villiers-le-Bel/Frankreich
Präzisions-Temperatur-Meßgerät,	Dräger Medical AG & Co. KGaA, Lübeck
Rompun 2%	BayerVital, Leverkusen, D
RPMI-Medium ,	Cambrex Bioproducts
Steri-Strip,	3M Medica
Tamoxifen® ,	AstraZeneca GmbH
Xylol, 1l, 1.08681.1000,	Merck
Zellmedium RMPI 1640	GIBCO® tissue culture products

3. Geräte /Programme (alphabetisch):

Advia® 120 Hämatologie System	Firma Bayer®
Autoscout 2055®	Schlittenmikrotom der Firma Leica

Autostainer[®],
 Camedia Master[®]
 Eppendorf[®]-Photometer
 Graph pad prison^(C)
 Laborwaage
 Plattenreader MRX TC Revelation,
 Scion-Image[®]

Firma DAKO Cytomation
 Olympus Europa Holding GmbH
 Eppendorf Deutschland GmbH
 Graphpad Software, Inc. San Diego , CA. Zorn, C. 2003
 Sartorius AG,
 Dynex Technologies
 Scion Corporation

4. Statistik

Die gesamte Statistik der Arbeit wie auch die graphische Darstellungen wurden mit dem Computerprogramm Graph-Pad Prism für Windows, Version 4,0, April 3, 2003 der Firma Graph Pad Software Inc. durchgeführt (www.graphpad.com). Als statistischer Test wurde der **Mann Whitney-U-Test** angewendet.

5. Einzeltabelle Temperaturmessungen, rektal

Gemessen wurde die Temperatur an Nu/Nu- Nacktmäusen. Die Ergebnisse wurden gewonnen, indem zunächst vor der HBO die Messung der Rektaltemperatur erfolgte und diese mit den Daten einer Messung nach einer HBO verglichen wurden. Hierbei ergab sich keine signifikante Änderung der Temperatur (p=0,5350).

Maus	Messung vor 2 h HBO in Kammer bei 37°C	Messung nach 2 h HBO in Kammer bei 37°C
1	37,1	36,4
2	36,6	34,4
3	36,2	37,1
4	34,5	37,3
5	38,1	37,1
6	37,2	38,0
7	36,3	37,2
	Mittelwert: 36,571°C	Mittelwert: 36,785°C

Tabelle Temperaturmessung der Nu/Nu-Nacktmäuse (rektal)

6. Arbeitsgruppe „Hyperbare Sauerstofftherapie“ (Stand 1. Juli 2000)

Herr Prof. Dr. med. habil Th. Wagner
 Frau Dr. med. S. Brüggemann
 Herr Dr. med. C. Engels
 Herr R. M. Poll
 Frau M. C. Vollmert

Herr Prof. Dr. med. T. Feyerabend
 Herr Dr. med. R. Schulte
 Herr T. P. Cordes
 Frau B. Lilitakis

Herr Dr. med. Kieft

VIII. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H. L. Fehm als ehemaligem Direktor und Herrn Prof. H. Lehnert als jetzigem Direktor der Medizinischen Klinik I der Universität zu Lübeck danke ich für die Bereitstellung der Mittel in seiner Klinik.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. habil. Th. Wagner als Leiter der Abteilung Hämatologie/Onkologie der Medizinischen Klinik I des UK-SH Campus Lübeck für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung der Materialien, des Arbeitsplatzes, sowie für die Hinführung auf das wissenschaftliche Arbeiten und Denken und die sehr gute Betreuung.

Weiter möchte ich mich bei Frau Monica C. Vollmert bedanken, die mich als Medizinisch Technische Assistentin geduldig und zeitaufwendig in die verschiedensten Arbeitsmethoden eingearbeitet hat.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. J. Westermann, bei Herrn Prof. Dr. med. W. Jelkmann, sowie bei Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Bruch für die gute Zusammenarbeit der Institute bzw. der Kliniken mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. habil Th. Wagner u.a. für das Ermöglichen der Anfertigung der Tumorschnitte und das Ermöglichen der Hypoxieversuche.

Meinen Eltern möchte ich danken, für die Gewährleistung und kontinuierliche Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation sowie besonders meinem verstorbenen Vater für die Förderung des freien Willens zu diesem Studium und der Fertigstellung dieser Arbeit.

Danken möchte ich Herrn T. P. Cordes, als Kommilitonen, Kollegen, Freund und Mitglied in der gemeinsamen Arbeitsgruppe „Hyperbare Sauerstofftherapie“ für die vielen guten gemeinsamen Erinnerungen während der Forschungszeit. Seine Dissertation wird die Ergebnisse dieser Arbeit noch besser verdeutlichen und ergänzen. Weiter möchte ich all jenen danken, die mich zumindest zeitweise bei der Fertigstellung dieser Arbeit mit Anregungen und Ideen begleitet haben. Erwähnen möchte ich hier im Besonderen: Herrn Dr. med. J. Kisro, Frau Dr. med. S. Brüggemann, Herrn Dr. med. R. Schulte, Herrn Dr. med. J. Marxsen, Herrn Dr. med. C. Engels, Herrn Dr. med. T. Klink, Herrn Dr. med. A. Steffen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Jakobs als Leiter der Tierhaltung der Universität zu Lübeck sowie dessen Mitarbeitern für die regelmäßige Fütterung und Pflege der Tiere.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Ehefrau Nina Poll, sowie all meinen Freunden und/oder Kritikern für Ihren Glauben an mich.



IX. Lebenslauf

Name: Rainer Mario Poll

Geburtsdatum, -ort: 06.09.1975 in Papenburg/Ems

Anschrift: Hansestraße 106, 23558 Lübeck

Familie: verheiratet mit Nina Poll, geb. Christiansen, Ärztin

Vater: Manfred G. H. Poll† Diplom-Verwaltungswirt
Mutter: Anna M. Poll Fachkrankenschwester für Nephrologie
Brüder: Jörg M. Poll Rechtsanwalt
Michael F. Poll Examinierter Gesundheits- und Kranken-
pfleger, Geselle im Tischlerhandwerk

Schule: 1982 – 1986 Bethlehem-Schule Papenburg
1986 – 1988 Orientierungsstufe an der Michaelschule Papenburg
1988 – 1995 Gymnasium Papenburg
1995 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 07/95–06/96 Ausbildung zum Sanitätssoldaten im 9.Sanitätsbattalion 1
Hildesheim, anschließend Einsatz in der Orthopädie des
Bundeswehrkrankenhauses Bad Zwischenahn

Studium: 10/96 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Medizinischen Universität zu Lübeck

09/98 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
04/00 Erste Ärztliche Prüfung (1.Staatsexamen)
03/02 Zweite Ärztliche Prüfung (2.Staatsexamen)
06/03 Dritte Ärztliche Prüfung (3.Staatsexamen)

Promotion: 01/00 Beginn der Planung und Vorversuche der Dissertation bei
Prof. Dr. med. habil Th. Wagner

Famulaturen:
Deutschland: 02/99 - 03/99 Hämatologie / Onkologie, Medizinische Klinik I, Station 44c,
Medizinische Universität zu Lübeck
09/00 - 10/00 Hämatologie / Onkologie, Medizinische Klinik I, Poliklinik
Medizinische Universität zu Lübeck
03/01 - 04/01 Chirurgie, Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie
Medizinische Universität zu Lübeck

Ausland:	08/01 - 09/01	Plastische Chirurgie und Allgemeine Chirurgie, Klinik für Chirurgie / Universität Tartu/ Estland
	09/01 - 10/01	Traumatologie und Allgemeine Chirurgie, Hospital Loma Plata, Kolonia Menno / Chaco / Paraguay
Praktisches Jahr:	1. Tertial	Klinik für Kiefer- und Gesichtschirurgie, Medizinische Universität zu Lübeck (Wahlfach)
	2. Tertial	Innere Medizin, Ostholsteinklinik Eutin, Akademisches Lehr- krankenhaus der Medizinischen Universität zu Lübeck
	3. Tertial	Chirurgie, Ostholsteinklinik Eutin, Akademisches Lehr- krankenhaus der Medizinischen Universität zu Lübeck
Sonstiges:	1999 - 2001	Arbeit als studentische Extrawache bei der DRK-Schwesternschaft Lübeck e. V.
	06/1997	Wahl zum Vertreter der Studierendenschaft der Medizinischen Universität zu Lübeck für den Fachbereich Medizin, Wiederwahlen in den Jahren 1998 bis 2001
	06/01-06/03	Studentisches Mitglied im Konvent der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck
	06/01-06/03	Studentisches Mitglied im Promotionsausschuß der Universität zu Lübeck
	08/2001	Förderung durch die Universität Tartu für eine Famulatur in der Chirurgie, Klinik für Chirurgie/ Universität Tartu/ Estland
Berufliches:	07/03-12/03	Arzt im Praktikum in der Klinik für Hand–Brust– und Plastische Chirurgie im Klinikum Neustadt i. H., Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck
	01/04-09/04	Arzt im Praktikum in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im Klinikum Neustadt i. H., Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck
	seit 10/2004	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im Klinikum Neustadt i. H., Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck
	03/2005	Erwerb der Fachkunde Rettungsdienst, Einsatz als Notarzt im Kreis Ostholstein, Rettungswache Neustadt
	10/05 – 03/06	Stationsarzt der Interdisziplinären Intensivstation, Klinik für Innere Medizin im Klinikum Neustadt i. H., im Rahmen der Weiterbildung
	seit 05/2007	Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein -Campus Lübeck- und Mitglied der Medizinischen Fakultät
	05/2007	Erwerb der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Aus der Arbeit mit hervorgegangene Beiträge/Veröffentlichungen:

Cordes T, Poll R, Dittmer C, Schulte R, Thill M, Dietrich K, Dunst J, Fischer D **(2008)**
Messung der Oxygenierung von Mx1-Tumorenograften unter Hyperbarer Sauerstofftherapie
57. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG),
16. bis 19. September 2008, CCH-Hamburg, **Posterbeitrag**