

Aus dem  
Institut für Anatomie  
Direktor: Prof. Dr. med. J. Westermann  
Universität zu Lübeck

---

**Die kombinierte Thermochemotherapie  
als Therapieoption für das maligne  
Pleuramesotheliom in vivo**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

**Kathrin Riehemann**

aus Georgsmarienhütte

**Lübeck 2004**

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Eva-Maria Ehlers

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Lübeck den

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
Abkürzungsverzeichnis	5
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1 Das maligne Pleuramesotheliom	6
1.2 Hyperthermie	8
1.3 Chemotherapie	9
1.4 Ziel der Arbeit	10
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>11</b>
2.1 Versuchtiere	11
2.2 Experimentaltumor, Implantation und Anzucht	11
2.3 Narkose	12
2.4 Experimentalbedingungen	12
2.4.1 Versuchsgruppen	12
2.4.2 Kontrolle	13
2.4.3 Chemotherapie	13
2.4.4 Hyperthermie	14
2.4.5 Thermochemotherapie	16
2.5 Fixierung und Einbettung	16
2.6 Lichtmikroskopie	16
2.6.1 Routinefärbungen	17
2.6.2 Immunhistochemie	17
2.7 Transmissionselektronenmikroskopie	19
2.8 Intratumorale Sauerstoffpartialdruckmessung	20
2.9 Statistische Methoden	21
2.9.1 Tumorzellenkinetik	21
2.9.2 Computergestützte quantitative Auswertung der MIB-1 und Apoptag®-positiven Tumorzellen	21
2.9.3 Intratumorale pO <sub>2</sub> -Messungen	22
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
3.1 Tumorzellenkinetik	24
3.1.1 Gruppenvergleich (Diagramm 1)	24
3.1.2 KONTROLLE (Diagramm 2)	25
3.1.3 HYPERTHERMIE (Diagramm 3)	26
3.1.4 IFOSFAMID (Diagramm 4)	27
3.1.5 IFOSFAMID + HYPERTHERMIE (Diagramm 5)	28
3.1.6 CYCLOPHOSPHAMID (Diagramm 6)	30
3.1.7 CYCLOPHOSPHAMID + HYPERTHERMIE (Diagramm 7)	31

3.1.8	Beurteilung des Therapieerfolgs in Anlehnung an die WHO (Diagramm 8)	32
3.2	Lichtmikroskopie (Abbildungen 4 bis 20)	34
3.2.1	Histologische Routinefärbungen	34
3.2.2	Immunhistochemie	44
3.3	Transmissionselektronenmikroskopie (Abbildungen 21 bis 37)	47
3.4	Intratumorale pO <sub>2</sub> -Messung	65
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
4.1	Tumolvolumenkinetik, Morphologie, Sauerstoffpartialdruck	70
4.1.1	KONTROLLE	70
4.1.2	HYPERTHERMIE	72
4.1.3	IFOSFAMID	72
4.1.4	IFOSFAMID + HYPERTHERMIE	72
4.1.5	CYCLOPHOSPHAMID	74
4.1.6	CYCLOPHOSPHAMID + HYPERTHERMIE	74
4.2	Gruppenvergleich	75
<b>5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>91</b>
8.1	Statistische Auswertung	91
8.2	Danksagung	98
8.3	Lebenslauf	99
8.4	Publikationliste	100

## Abkürzungsverzeichnis

A. dm.	Aqua <b>d</b> emineralisata
Azan	<b>A</b> zokamin– <b>A</b> nilinblau–Färbung
Ca	<b>C</b> arcinom
CT	<b>C</b> hemotherapie
CYCLO	<b>C</b> yclophosphamid
DNA	<b>D</b> esoxyribonukleinsäure (Säure = <b>a</b> cid)
EPP	<b>E</b> xtrapleurale <b>P</b> neumektomie
HE	<b>H</b> ämalaun– <b>E</b> osin–Färbung
HT	<b>H</b> yperthermie
IFO	<b>I</b> fosfamid
IMIG	<b>I</b> nternational <b>M</b> esothelioma <b>I</b> nterest <b>G</b> roup
i.p.	<b>i</b> ntraperitoneal
i.v.	<b>i</b> ntravenös
KG	<b>K</b> örpergewicht
LM	<b>L</b> icht <b>m</b> ikroskopie
MPM	<b>M</b> alignes <b>P</b> leuramesotheliom
MW	<b>M</b> ittelwert
MRT	<b>M</b> agnetresonanztomographie
ODAS	<b>O</b> xygen <b>D</b> ata <b>A</b> cquisition <b>S</b> ystem
PBS	<b>P</b> hosphate <b>B</b> uffer <b>S</b> aline
PM	<b>P</b> leuramesotheliom
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
RPMI	Akronym des im <b>R</b> osewell <b>P</b> ark <b>M</b> emorial <b>I</b> nstitute entwickelten Zellkulturmediums
RNA	<b>R</b> ibonukleinsäure (Säure = <b>a</b> cid)
ROI	<b>R</b> egion <b>O</b> f <b>I</b> nterest
s.c.	<b>s</b> ubcutan
SMR	<b>S</b> oluble <b>M</b> esothelin- <b>R</b> elated <b>P</b> roteins
SPSS	<b>S</b> tatistical <b>P</b> rogramm for <b>S</b> ocial <b>S</b> ciences
TCT	<b>T</b> hermochemotherapie
TEM	<b>T</b> ransmissionselektronen <b>m</b> ikroskopie
TNM	<b>T</b> umor- <b>N</b> ode- <b>M</b> etastasis-Klassifikation
UICC	<b>U</b> nio <b>i</b> nternationalis <b>c</b> ontra <b>c</b> ancrum (Internationale Union gegen den Krebs)
UKSH	<b>U</b> niversitäts <b>k</b> linikum <b>S</b> chleswig <b>H</b> olstein
VATS	<b>V</b> ideoassistierte <b>T</b> horakoskopie
WHO	<b>W</b> orld <b>H</b> ealth <b>O</b> rganization
ZNS	<b>Z</b> entrales <b>N</b> ervensystem

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das maligne Pleuramesotheliom

Das Pleuramesotheliom ist eine tumoröse Erkrankung der serösen Häute der Lunge. Sie ist in der Mehrzahl der Fälle auf eine Asbestexposition zurückzuführen [47, 53, 101]. Betroffen sind in erster Linie Männer mit einem Alter über 50 Jahren, die beruflich mit diesem Baustoff in Berührung kamen. In 70 bis 90% der Fälle konnte eine Asbestexposition in der Arbeitsanamnese nachgewiesen werden. Es sind jedoch nicht nur Erkrankungen bei den Arbeitern, sondern auch bei deren Familienmitgliedern bekannt. So erkrankten in einigen Fällen die Ehefrauen, die beim Waschen regelmäßig Kontakt mit der Arbeitskleidung hatten [12, 68, 87, 88, 89].

Asbest ist im vergangenen Jahrhundert sowohl im industriellen als auch im privaten Bereich verarbeitet worden. Es war ein häufig verwendetes Material in der Schiffsindustrie, in Bergwerken, im Hoch- und Tiefbau, im Dachdeckergewerbe und bei der Instandhaltung von Zügen und Lokomotiven [14, 66, 74, 75, 76, 92]. Asbest ist ein faseriges Material, das je nach Form, Farbe und weiteren Eigenschaften in Untergruppen eingeteilt wird. Der mit Abstand am häufigsten verwendete Asbest heißt Chrysotil oder Weißasbest. Er besteht aus langen, zarten Magnesiumsilikatfasern. Eher nadelförmige Gestalt besitzen die Asbestarten Aktinolit, Amosit, Antophyllit, Tremolit und Krokydolith, auch Blauasbest. Der Blauasbest, ein Natriumeisensilikat, besitzt das höchste kanzerogene Potenzial [47, 63, 73]. Die Asbestfasern, die beim Arbeiten als Asbeststäube freigesetzt werden, gelangen per inhalationem in die Atemwege. Hier lagern sie sich ab oder werden phagozytiert. In den Mesothelzellen der Pleura und in Makrophagen bewirken sie die Bildung von freien Sauerstoffradikalen, sie interagieren mit der DNA, beeinträchtigen die Ausbildung des Spindelapparates in der Mitose, behindern die Anaphase [40, 46], aktivieren Onkogene [64, 65] und begünstigen somit die Kanzerogenese. Seit 1977 ist das Pleuramesotheliom eine anerkannte Berufskrankheit (Liste der Berufskrankheiten Nr. 4105, gemäß Berufskrankheiten-Verordnung vom 31.10.1997, BGBl I S.2623, zuletzt geändert am 05.09.2002, in Kraft getreten am 01.10.2002). Seit Anfang der 90er Jahre ist die Verarbeitung von Asbest gesetzlich verboten. Andere Faktoren, die neben dem Asbest für die Entstehung des Pleuramesothelioms verantwortlich gemacht werden, sind Viren (z.B. das SV-40 = Simian Virus 40) [43] und Röntgen- bzw. radioaktive Strahlung [3, 4, 62, 111].

Die lange Latenzzeit von mindestens 20, im Durchschnitt jedoch 35 bis 40 Jahren [63], ist Ursache für den erheblichen Anstieg der Inzidenz momentan und in der nahen Zukunft. Aktuelle Hochrechnungen zufolge ist eine Verdoppelung der Inzidenz bis 2030 zu erwarten [75]. Dies würde bedeuten, dass etwa eine Viertel Million Menschen europaweit in den nächsten 35 Jahren am Pleuramesotheliom erkranken werden.

Das Pleuramesotheliom ist bisweilen schwierig zu diagnostizieren. Klinisch äußert es sich erst im fortgeschrittenen Stadium durch eine Vielzahl unspezifischer Symptome. Die wichtigsten sind Thoraxschmerzen mit starker Dyspnoe und Pleuraergüsse [45, 47, 53, 97].

Das verdrängende Wachstum verursacht Dysphagien, Einschränkungen der Herzfunktion mit daraus resultierender Einflusstauung. Auch treten neurologische Symptome aufgrund der Lagebeziehung zur Wirbelsäule und den hier austretenden Nerven auf [1, 2, 5, 6, 111]. Zur Diagnosestellung bzw. -sicherung werden zytologische Untersuchungen des Pleurapunktats, die Thorakoskopie, die Computertomographie (CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) eingesetzt. Methode der Wahl ist heute die videoassistierte Thorakoskopie (VATS) [13, 47]. Weitergehende Nachweismethoden sind aber erforderlich.

Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt bei der überwiegenden Anzahl der Patienten 4 bis 12 Monate [47]. Das älteste und am häufigsten verwendete Staging-System ist die Einteilung nach Butchart [17]. Neben dieser gibt es mittlerweile andere, z. B. die Einteilung von Rusch und die der Internationalen Mesothelioma Interest Group (IMIG), die ähnlich der TNM-Klassifikation aufgebaut ist [13, 85, 98].

Histologisch werden drei Formen des Pleuramesothelioms unterschieden: der epitheliale, der mesenchymale und der gemischte bzw. biphasische Typ. Der epitheliale Typ liegt in ca. 50% der Fälle vor. Es werden runde bis kuboide, pleomorphe Zellen in zum Teil tubulären Anordnungen beschrieben [23]. Der mesenchymale Typ (16%) imponiert durch spindelförmige Zellen [23]. Der biphasische Typ (34%) weist sowohl die Merkmale des epithelialen als auch die des mesenchymalen Typs auf. Andere Differentialdiagnosen (z. B. das Adenokarzinom der Lunge) können lichtmikroskopisch nicht ausgeschlossen werden. Enzymatische Nachweistechiken sind nur wenig spezifisch. Spezifischer und sensibler für das humane maligne Pleuramesotheliom sind immunhistochemische Methoden [68], beispielsweise der Nachweis von Zytokeratin 5/6 [20] sowie der Marker MOC-31 und HBME-1 in Kombination [42]. Ein neuer und sehr vielversprechender Ansatz ist die Entwicklung eines Bluttests, durch den SMR (soluble mesothelin-related proteins) als sehr spezifische Marker für das Pleuramesotheliom im Serum nachgewiesen werden [84].

Zur Diagnosesicherung wird auch die Transmissionselektronenmikroskopie herangezogen, da bei Pleuramesotheliomzellen typischerweise lange, dünne und oft verzweigte Mikrovilli sowie eine große Anzahl Desmosomen und Tonofilamente vorkommen. Das Adenokarzinom hingegen weist genau diese Charakteristika nicht auf, hier sind die Mikrovilli eher kurz und plump [102, 110].

Als günstige Prognosekriterien haben sich u.a. ein guter Allgemeinzustand des Patienten, weniger als 5% Gewichtsverlust, ein histologisch epithelialer Typ, Alter unter 60 Jahre, weibliches Geschlecht, keine Asbestexposition in der Anamnese und ein vorhandener Pleuraerguss erwiesen. Neuerdings werden als weitere prognostische Faktoren diskutiert: der pH-Wert des Pleurapunktats [44], der MIB-1-Index als Proliferationsindex [9], DNA-Aneuploidien [50], die S-Phase-Fraktion [77] sowie die Dichte der intratumoralen Gefäßversorgung [57].

In der Literatur werden mediastinale Lymphknotenmetastasen in ca. 30% der Fälle beschrieben. Fernmetastasen treten selten und typischerweise erst im späteren Verlauf der Krankheit nach hämatogener Aussaat in der Leber, in der kontralateralen Lunge, im Gehirn

und im Skelett auf [1, 2, 5, 6, 111]. Relativ häufig wird die lokale Invasion des Tumors in die Lunge, in das Mediastinum, in die Thoraxwand und in das Diaphragma beobachtet.

Das Pleuramesotheliom ist gegenüber zahlreichen Therapieansätzen weitgehend therapieresistent. Eine erfolgreiche Standardtherapie existiert zur Zeit nicht.

Die chirurgische Therapie erweist sich bei noch geringer Tumorausbreitung am idealsten. Operative Optionen sind dann Pleurektomie, die radikale Extrapleurale Pneumektomie (EPP) mit Resektion der Pleura, der ipsilateralen Lunge, des Perikards und Teilen des Diaphragmas. Für eine derart radikale Operation sind jedoch nur wenige Patienten geeignet, da diese Therapie hohe Anforderungen an den Gesundheitszustand des Patienten stellt.

Neben operativen Methoden ist die Radiatio eine palliative Therapieoption, die meist nur adjuvant zu einer anderen Therapieform eingesetzt wird. Die Ausdehnung des Pleuramesothelioms erfordert häufig eine große Gesamtbestrahlungsfläche, so dass die Bestrahlungsmaxima für benachbarte Organe oft deutlich überschritten werden müssen [53, 120].

In zahlreichen Studien wurde die Wirksamkeit von systemisch oder intrapleural applizierten Zytostatika untersucht. Dabei konnten nur geringe Ansprechraten (bis maximal 40%) auf Einzel- und Kombinationstherapien verzeichnet werden. Als Einzeltherapien wurden Platinverbindungen und Alkylantien getestet, die aber nur eine geringe Wirksamkeit besaßen [58, 99]. Auch durch Kombinationstherapien konnten keine Ansprechraten über 50% erzielt werden [47].

Die aufgeführten Therapieverfahren erreichten zudem nur bedingte Erfolge. Die Arbeitsgruppe von Sugarbaker et al. kombinierte eine radikale EPP mit drei bis sechs Zyklen Cisplatin, Doxorubicin und Cyclophosphamid plus Radiatio und verzeichnete bei wenig fortgeschrittenem Erkrankungsstadium Erfolge [99, 100, 120]. Die mittlere Überlebenszeit konnte von durchschnittlich vier bis zwölf Monaten auf 19 Monate gesteigert werden [47]. Allerdings ist eine solche Therapie nicht für jeden Patienten geeignet, weil auch diese Therapieform hohe Anforderungen an den körperlichen Allgemeinzustand des Patienten stellt und deshalb ebenfalls nur für eine äußerst geringe Patientenpopulation in Frage kommt.

Da durch keine der aufgeführten Therapiemodalitäten Standardtherapien etabliert werden konnten, wird mit Nachdruck nach neuen Therapieansätzen gesucht. Im Fokus der Forschung befinden sich derzeit die Immuntherapie mit Interferonen und Interleukinen [47, 121], die photodynamische Therapie [24, 47] und die Gentherapie [47, 54, 95].

## **1.2 Hyperthermie**

Bereits in der Antike war die heilende Wirkung des Fiebers bekannt; schon in den Schriften des Hippokrates war hiervon zu lesen. Jedoch wurde die Wirkung der Hyperthermie auf Malignome erst seit Mitte des vergangenen Jahrhunderts systematisch untersucht [10, 51, 67, 78, 82, 91, 104].

Je nach Tumorlokalisation, Tumorausbreitung und Allgemeinzustand des Patienten kann die Hyperthermie als Lokal-, Regional- oder als Ganzkörperhyperthermie appliziert werden [82]. Sie erfolgt entweder durch elektromagnetische Strahlen, Mikrowellen oder hyperthermes Wasserbad. Neben diesen äußerlichen Applikationsformen können betroffene Körperhöhlen intraoperativ hypertherm gespült werden [18, 32, 81, 82, 83, 103, 118]. Auch die Hyperthermie im Rahmen einer extrakorporalen Zirkulation (Wärmeperfusion) wurde untersucht und kommt zu klinischer Anwendung. Heute wird eine Ganzkörperhyperthermie idealerweise durch den sogenannten Aquaterm®, einem röhrenförmigen Wärmestrahlungsgerät, appliziert. Der Patient wird in dieses Gerät hineingefahren; die Hyperthermie entsteht durch ein erhitztes Wasserbad, das sich in Röhren im Inneren des Aquaterms® befindet [81].

Thermobiologische Forschungen ergaben, dass Hyperthermie zwischen 42,5 und 45°C einen direkten zytotoxischen Effekt hat [49], der dem Dosis-Wirkungs-Prinzip unterliegt und bei allen Zelllinien einheitlich nachweisbar ist. Dieser zytotoxische Effekt entsteht durch Störungen der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese, Protein- und Membrandenaturierung, sowie durch gestörte Stoffwechselabläufe [26]. Die Ganzkörperhyperthermie ist mit den hohen Temperaturen aufgrund ihrer vielfältigen Nebenwirkungen, die vom protrahierten Schmerz bis zu Schockzuständen mit Organversagen reichen können, für den Patienten nicht zumutbar.

Von einer „milden Hyperthermie“ spricht man, wenn es sich um eine Erwärmung des Gewebes auf bis zu 42°C handelt. Bei dieser Form spielt der Einfluss auf die Tumorgefäße die entscheidende Rolle. Tumoren besitzen im Vergleich zu Normalgewebe häufig eine insuffiziente Gefäßarchitektur, die durch dünnwandige, nicht intakte, teils dilatierte, teils stenosierte Gefäße gekennzeichnet ist. Durch das für Neoplasien typische schnelle Wachstum wird die Tumoroxygenierung weiter verschlechtert, da das Wachstum der Gefäße nicht mit dem Tumorwachstum Schritt halten kann. Die Diffusionsstrecke wird länger, häufig finden sich arterio-venöse Shunts. Diese Mangelversorgung des Tumors durch ungleichmäßige Sauerstoff- und Nährstoffverteilung führt schließlich zu einer Gewebsazidose und -hypoxie mit nachfolgenden Nekrosen.

Die milde Überwärmung führt zu einer intratumoralen Gefäßdilataion, die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wird verbessert, die Stoffwechsellistung gesteigert. Wird diese milde Form mit einer Chemotherapie kombiniert, so kommt es durch die hyperthermieinduzierte Vasodilatation zu einer verstärkten Anflutung des Zytostatikums, das durch die ebenfalls hyperthermieinduzierte gesteigerte Stoffwechselrate verstärkt wirken kann.

### **1.3 Chemotherapie**

Für die kombinierte Thermochemotherapie muss ein Zytostatikum bestimmte Voraussetzungen erfüllen: Wirkungssteigerung durch Hyperthermie, Thermostabilität, geringe Kardio- und Nephrotoxizität sowie ein möglichst geringer Anstieg der Nebenwirkungen. Eine therapiefördernde Interaktion zwischen Hyperthermie und Chemotherapeutikum ist für Alkylantien, Platinverbindungen und Nitroharnstoffe erwiesen

[55, 103, 113, 114, 119]. In dieser Arbeit wurden die Alkylantien Ifosfamid und Cyclophosphamid untersucht.

Diese Zytostatika wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen im Rahmen einer Kombinationstherapie verwendet [7, 8, 30, 31, 55, 96, 112, 113, 114, 115, 117].

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Da sich das Pleuramesotheliom gegenüber Standardtherapien als unzugänglich erwies, wird anhaltend nach einem erfolgreichen Therapieansatz gesucht.

Die kombinierte Thermochemotherapie hat sich bei einigen ebenfalls standardtherapieresistenten Malignomen als eine aussichtsreiche Alternative erwiesen [30, 96, 113, 115, 116].

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung eines soliden Tumormodells der Zelllinie MSTO 211-H in der Nacktmaus.

Ferner sollte nicht nur die Wirksamkeit einer alleinigen Therapie mit den Zytostatika Ifosfamid und Cyclophosphamid untersucht, sondern auch die Effekte dieser alleinigen Chemotherapie mit einer kombinierten Thermochemotherapie beim Pleuramesotheliom verglichen werden. Es galt also zu klären, ob die bekannte Wirkungsverstärkung der Zytostatika durch Hyperthermie auch einen nachweisbaren Effekt auf das hier untersuchte solide Tumormodell des humanen Pleuramesothelioms hat. Daneben sollte überprüft werden, inwiefern sich mögliche Therapieeffekte morphologisch, das heißt licht- und transmissionselektronenmikroskopisch nachweisen lassen. Zusätzlich wurde der intratumorale Sauerstoffpartialdruck vor, während und nach Therapie gemessen, um eine mögliche Korrelation zwischen der Tumoroxygenierung und dem Therapieverlauf feststellen zu können.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Versuchtiere**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 36 weibliche, thymusaplastische NMRI-Nacktmäuse (Bornholdgard, Dänemark) mit einem Gewicht von 20 bis 39 g untersucht. Sie wurden in Makrolon-Käfigen (Typ 3, Grundfläche 820 cm<sup>2</sup>, Höhe 14 cm) bei einer Raumtemperatur von 25 °C und einer Laminar-Air-Flow-Anlage gehalten. Die Mäuse erhielten Futter („Standarddiät für Ratten und Mäuse®“ von Altromin) und Wasser ad libitum und wurden einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt.

### **2.2 Experimentaltumor, Implantation und Anzucht**

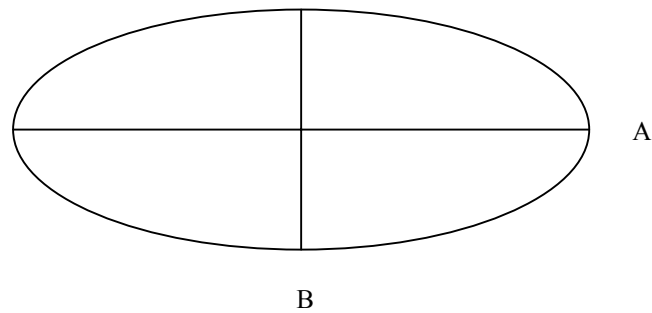
Die verwendete humane Tumorzelllinie MSTO 211-H stammt aus der Zellbank ATCC (American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, USA.

Histologisch lässt sich der Experimentaltumor dieser Zelllinie als biphasisches Mesotheliom der Pleura klassifizieren, bestehend aus einem epithelialen und einem mesenchymalen Anteil. Es handelt sich um Zellen eines menschlichen Primärtumors, die 1985 aus dem Pleuraerguss eines 62-jährigen männlichen Patienten kaukasischer Herkunft gewonnen wurden. Der Patient hatte vor Entnahme des Punktats keine Chemo- oder Strahlentherapie erhalten.

Zur Etablierung des Primärtumors wurde den Mäusen 200 µl einer Suspension mit insgesamt 10<sup>7</sup> Tumorzellen in serumfreiem Medium RPMI 1860 subcutan in den Nacken injiziert. Nach einer Wachstumszeit von vier bis sechs Wochen wurde der Tumor aus dem Nacken unter aseptischen Bedingungen entnommen; Binde- und Fettgewebe wurden entfernt.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Passage von 1 mm<sup>3</sup> großen Tumorwürfeln in die rechte Hinterpfote (subkutan) weiterer Nacktmäuse unter Ketanest®-Narkose (Kap. 2.3). Die Wunde wurde mit sterilen Pflasterstreifen verschlossen. Über einen Zeitraum von drei Tagen wurde prophylaktisch Ampicillin® (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) ins Trinkwasser gegeben. Bei jeder Passage wurde Gewebe für die mikroskopische Aufarbeitung entnommen. Hierdurch erfolgte eine stetige morphologische Kontrolle, um Dedifferenzierungstendenzen rechtzeitig erkennen zu können.

In einem Zeitraum von drei bis vier Wochen wuchsen die Tumore bis zu einem Volumen von ca. 150 mm<sup>3</sup>, berechnet nach der Formel für ellipsoide Körper:  $V = AB^2 \pi / 6$  mit A = längstem Durchmesser und B = kürzestem, senkrecht zu A stehendem Durchmesser (siehe Skizze 1). Während der Wachstumsphase wurden die Tiere unter den unter 2.1 genannten Bedingungen gehalten.



(Skizze 1)

Die Angehrate betrug 100%. Mit dieser Methode gelang die Etablierung eines reproduzierbaren und somit vergleichbaren soliden Tumormodells.

### 2.3 Narkose

Für die Passagen der Tumoren sowie für die Thermo- bzw. Thermochemotherapie wurden die Nacktmäuse narkotisiert. Die Narkose setzte sich wie folgt zusammen:

- 1ml Ketanest 50® (50 mg/ml) (10ml), Parke-Davis GmbH Berlin, Frankfurt, Deutschland
- 0,1ml Atropinsulfat- Lösung® (0,5 mg/ml), Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
- 0,25ml Rompun® 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland
- 5ml NaCl (0,9%)

Die Mäuse bekamen pro Gramm Körpergewicht 0,01 ml der Narkoselösung intraperitoneal injiziert.

### 2.4 Experimentalbedingungen

#### 2.4.1 Versuchsgruppen

Entsprechend ihrer Therapie wurden die tumortragenden Mäuse in sechs Gruppen à sechs Mäuse unterteilt.

**Gruppe 1: KONTROLLE:** Injektion physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) intravenös (i.v.)

**Gruppe 2: HYPERTHERMIE:** einstündige HT bei 41,5°C im 0,9% NaCl-Bad

**Gruppe 3: IFOSFAMID:** 200 mg/kgKG Ifosfamid (Holoxan®) in einer Konzentration von 1 mg/1 ml i.v.

**Gruppe 4: IFOSFAMID + HYPERTHERMIE:** 200 mg/kgKG Ifosfamid (Holoxan® 200 mg) in einer Konzentration von 1 mg/1 ml i.v. + einstündige

Hyperthermie bei 41,5°C im 0,9% NaCl-Bad

**Gruppe 5: CYCLOPHOSPHAMID:** 200 mg/kgKG Cyclophosphamid (Endoxan® 100 mg) in einer Konzentration von 1 mg/1 ml i.v.

**Gruppe 6: CYCLOPHOSPHAMID + HYPERTHERMIE:** 200 mg/kgKG Cyclophosphamid (Endoxan® 100 mg) in einer Konzentration von 1 mg/1 ml i.v. + einstündige Hyperthermie bei 41,5°C im 0,9% NaCl-Bad

#### 2.4.2 Kontrolle

Die Mäuse der Kontrollgruppe erhielten eine intravenöse Injektion mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl-Lösung). Die injizierte Menge wurde auf das Gewicht der Mäuse bezogen ermittelt.

#### 2.4.3 Chemotherapie

Die Chemotherapie bestand aus einer einmaligen Injektion entweder des Zytostatikums Ifosfamid (Holoxan® 200mg, ASTA Medica AWD GmbH, Frankfurt, Deutschland) oder Cyclophosphamid (Endoxan® 100 mg, ASTA Medica AWD GmbH, Frankfurt, Deutschland), jeweils mit einer Konzentration von 1 mg/1 ml in einer Dosierung von 200 mg/kg Körpergewicht intravenös in die Schwanzvene. Ifosfamid und Cyclophosphamid gehören zur Gruppe der alkylierenden Zytostatika, die, ursprünglich von Kampfgasen abgeleitet, hauptsächlich durch ihre kovalente Bindung an die DNA und den damit verbundenen Doppelstrangbrüchen sowie gestörten Reparaturvorgängen an der DNA wirken. Dies führt zu Störungen in der Transkription und Translation, so dass eine für den Zellstoffwechsel ausreichende Proteinsynthese nicht mehr stattfinden kann.

Ifosfamid ist ein Oxazaphosphorin, welches zunächst inaktiv vorliegt und erst über die Cytochrom-P-450-Oxidase in der Leber aktiviert wird. Es entsteht das aktive 4-OH-Ifosfamid, das in Ifosfamidmustard und Acrolein zerfällt [109].

Die antineoplastische Wirkung von Ifosfamid ist nicht nur auf das aktivierte 4-OH-Ifosfamid zurückzuführen, denn es entstehen durch weitere Abspaltungen Metaboliten, die auch eine zytostatische Wirkung besitzen, z.B. die Metaboliten 2- und 3-Dichloräthylifosfamid. Auch das durch Abspaltung entstehende Chloracetaldehyd ist zu erwähnen [11, 109], das neben seiner alkylierenden Wirkung und seiner Neuro- und Nephrotoxizität als auslösender Faktor für Gefäßspastmen angesehen wird.

Cyclophosphamid ist ein oxazaphosphorinsubstituiertes Stickstofflostderivat, das bevorzugt an der N<sub>7</sub>-Position des Guanins alkyliert und zunächst auch in inaktiver Form vorliegt. Seine Aktivierung erfolgt ebenfalls durch Oxidation über das Cytochrom-P450-abhängige, mikrosomale Enzymsystem der Leber zu 4-Hydroxycyclophosphamid (4-OHCP). Im Vergleich zu Ifosfamid erfolgt die Freisetzung der aktiven Metaboliten

jedoch wesentlich schneller. 4-OHCP wird zu Aldophosphamid tautomerisiert, welches wiederum in das eigentliche Alkylans Phosphoramidmustard und Acrolein zerfällt.

#### 2.4.4 Hyperthermie

Für die einstündige lokale Hyperthermie waren die Tiere unter Narkose (siehe Kap. 2.3) auf einer Plexiglashalterung fixiert. Die tumortragende Hinterpfote wurde in einem 41,5°C warmen und thermostatkontrollierten NaCl-Bad überwärmt. Erwärmung und Konstanthaltung des NaCl-Bades erfolgte durch einen Thermostatheizblock (Thermomix 1420®, Fa. Braun, Melsungen) und einem Glaswärmetauscher (Abb.1). Während der einstündigen Hyperthermie wurde die Temperatur des NaCl-Bades bei 41,5°C +/- 0,1°C konstant gehalten und die Temperatur im Tumor mit einer Mikrotemperatursonde kontrolliert (Abb.2).

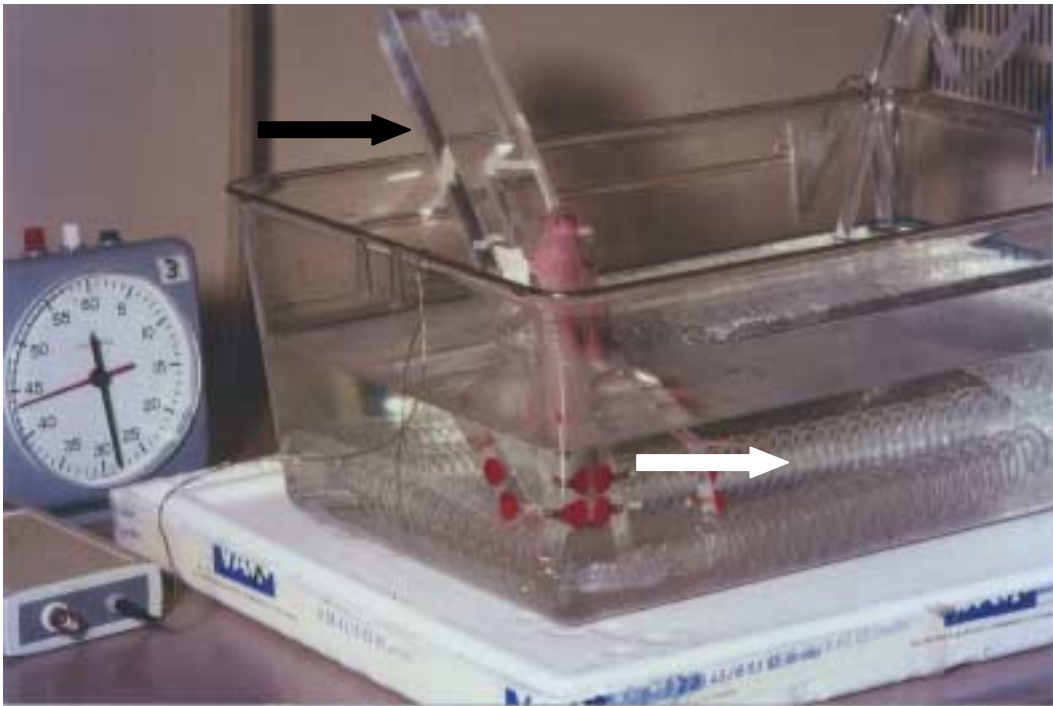


Abbildung 1: Plexiglashalterung (schwarzer Pfeil) für die Maus. Das 0,9%ige NaCl – Bad wird über einen Sekundärkreislauf mit Glaswärmetauscher (weißer Pfeil) erwärmt.

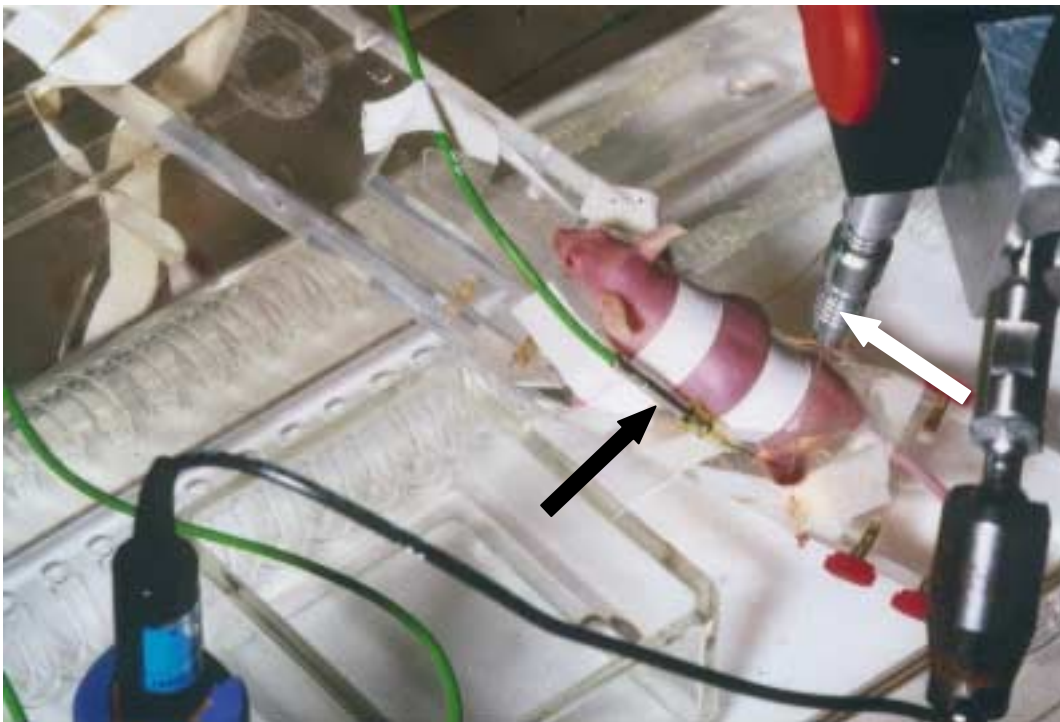


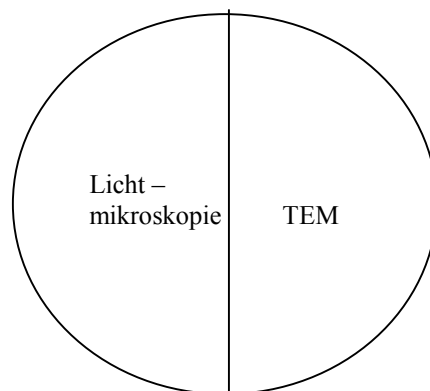
Abbildung 2: Sauerstoffmessapparatur mit pO<sub>2</sub>-Feinnadelsonde (weißer Pfeil) im Tumor und Temperatursonde (schwarzer Pfeil).

#### 2.4.5 Thermochemotherapie

Für die kombinierte Thermochemotherapie wurde den Tieren das jeweilige Zytostatikum intravenös verabreicht; nach einer Metabolisierungszeit von ca. zehn Minuten erfolgte die Narkotisierung (Kap. 2.3) und die einstündige Hyperthermie (Kap. 2.4.4)

#### 2.5 Fixierung und Einbettung

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 0,5 ml T61® (Hoechst Roussel Vet Vertriebs GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) getötet. Den Mäusen wurde neben den Tumoren auch Leber und Lunge entnommen, die auf eine mögliche Metastasierung histologisch und immunhistochemisch untersucht wurden. Außerdem wurden alle Tiere bei der Sektion auf eine eventuelle weitere makroskopisch sichtbare Metastasierung überprüft. Die entnommenen Tumoren wurden entsprechend der Skizze 2 in zwei repräsentative Würfel unterteilt und für die Licht- und die Transmissionselektronenmikroskopie wie folgt aufgearbeitet: Als Fixierlösung für die Lichtmikroskopie diente Bouinsche Lösung, für die Transmissionselektronenmikroskopie 2%iges Glutaraldehyd und 0,6%iges Paraformaldehyd in 0,06 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH 7,35) für 48 bis 72 h bei 4°C.



(Skizze 2)

#### 2.6 Lichtmikroskopie

Für die Lichtmikroskopie wurden die Präparate drei Tage lang in Bouin-Lösung fixiert, danach in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70% I, Ethanol 70% II, Ethanol 70% III, Ethanol 80%, Ethanol 90%, Ethanol 100% I, Ethanol 100% II, Ethanol 100% III) entwässert und schließlich zwei Tage lang in einem Paraffin-Alkohol-Gemisch und daraufhin jeweils einen Tag lang in frischem Paraffin gelagert. Erst danach wurden die Präparate in Paraffinblöcke gegossen. Es wurden 5-6 µm dicke Mikrotomschnitte (Autocut 2055®, Leica) angefertigt, auf Objektträger (Menzel Superfrost®) aufgezogen und im Brutschrank (Heraeus®) bei 60°C mindestens eine Stunde lang getrocknet.

### 2.6.1 Routinefärbungen

Die Schnitte wurden mit Hämalaun-Eosin (HE) und Azokarmin-Anilinblau (Azan) gefärbt. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Lichtmikroskop des Typs „Axiomat G41-190®“ der Firma Zeiss. Zur besseren Darstellung war bei einigen Abbildungen (Abb. 17, 19) eine Farbverschiebung bei der digitalen Verarbeitung erforderlich.

### 2.6.2 Immunhistochemie

Es wurden immunhistochemische Nachweise für den Proliferationsmarker MIB-1 und für apoptotische Zellen durch die TUNEL-Markierung durchgeführt.

#### MIB-1

Anfärbung proliferierender Zellen zum Aufschluss der proliferativen Potenz des Gewebes.

1. Entparaffinieren in Xylol, 3 x 5 min
2. Aceton 100%, 70% und 40% jeweils 4 min
3. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 2 x 1 min
4. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
5. Target Retrieval Solution® (DAKO Diagnostika, Hamburg) im Wasserbad auf 95°C erhitzen und die Schnitte für 30 min inkubieren
6. 20 min abkühlen lassen
7. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
8. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 2 x 1 min
9. Blockieren der endogenen Peroxydase mit 0,5%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O für 30 min
10. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 2 x 1 min
11. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
12. MIB-1 (DAKO Diagnostika, Hamburg), Verdünnung 1:100 mit AK-Verdünnung (DAKO Diagnostika, Hamburg) für 30 min
13. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
14. DAKO EnVision+™ Peroxidase 30 min
15. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
16. AEC+ (DAKO Diagnostika, Hamburg) für 10 min
17. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 2 x 5 min
18. Gegenfärben in Hämalaun für 15 sec
19. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.) für 5 min
20. Eindecken mit Aquatex

## TUNEL-Markierung (Apoptag®)

Doppelstrangbrüche der DNA können durch enzymatische Kopplung von chemisch markierten Nukleotiden an das freie 3'-OH-Ende immunhistochemisch dargestellt werden. Hierzu wurde der Apoptag®-Kit der Firma Serologicals Corporation (Norcross, Georgia, USA) verwendet.

1. Entparaffinieren in Xylol, 3 x 5 min
2. Wässern in Ethanol: 2 x 100% für 5 min, 1 x 95% für 3 min und 1 x 70% für 3 min
3. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 2 x 5 min  
Spülen mit PBS, 5 min
4. 0,5% Triton-X100/PBS, 10 sec (0,5 ml/100 ml PBS)
5. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
6. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 2 x 5 min
7. Blockieren der endogenen Peroxidase in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/PBS für 5 min
8. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
9. Vorsichtig überschüssige Flüssigkeit abtupfen und sofort 75 µl Equilibration Buffer für 10 sec auf die Probe geben
10. Überschüssige Flüssigkeit abtupfen und mit 50 µl TdT-Enzym für 1 h bei 37°C inkubieren (Verdünnung: 77 µl Reaction Buffer und 33 µl TdT-Enzym)
11. Flüssigkeit absaugen und die Schnitte in Stop/Wash Buffer für 10 min bei Raumtemperatur waschen
12. Spülen mit PBS, 3 x 5 min
13. Vorsichtig überschüssige Flüssigkeit entfernen und jeweils nach Größe des Schnittes Anti-Digoxigenin-Peroxidase auftragen und in der feuchten Kammer für 30 min inkubieren
14. Spülen mit PBS, 4 x 5 min
15. Farbentwicklung mit DAB (2,5 mg DAB, 50 µl 1 M Imidazol und 50 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 5 ml PBS durch Watte filtrieren) für 3 bis 6 min unter mikroskopischer Kontrolle
16. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 3 x 5 min
17. Gegenfärbung mit Methylgrün (2%(w:v) Methylgrün in 0,1 M Natriumacetat, pH 4,0), 10 sec
18. Spülen mit Aqua demineralisata (A.dm.), 2 x 5 min
19. in n-Butanol 10 mal tauchen, 1 x 30 sec
20. Entwässern in Xylol, 3 x 5 min
21. Eindecken mit Entellan® (Merck Eurolab, Hamburg)

Zur Auswertung der immunhistochemischen Befunde wurden die Präparate mit einem hochauflösenden Flachbettscanner (Agfa T2500®) bei einer Pixelkanten-Auflösung von 10,16 µm digitalisiert, was bedeutet, dass 10,16 x 10,16 µm<sup>2</sup> des Schnittes auf einem Pixel

abgebildet wurden. Diese Auflösung reichte aus, um die Tumorzellen mit ihren teilweise vergrößerten Kernen und Zytoplasmasäumen auf wenigen Pixeln zu digitalisieren. Die durchschnittliche Bildgröße lag bei 16 Megapixel, jedes Pixel wurde durch 256 Grauwerte kodiert. Die gescannten Bilder wurden im tiff-Format auf CD-Rom gespeichert und mit dem Bildanalyseprogramm „KS400®“ (Zeiss-Vision) ausgewertet. Durch dieses Programm wurde alles außer dem eigentlichen rundlichen Schnitt, der „Region of Interest“ (ROI), eliminiert, so dass die Analyse schnell durchführbar war. Im nächsten Schritt ist die ROI über die Grauintensitäten normalisiert worden. Tumoranteile, die eindeutig keine immunreaktiven Tumorzellen zeigten, wurden mit der sogenannten „grey value top hat transformation“, einem mathematisch-morphologischen Filter und Artefakte, wie z.B. Mikrofalten, mit einem binären Größenfilter entfernt. Die verbliebenen Teile waren immunreaktive Tumorzellen, deren Kontur mit einem Marr-Filter berechnet wurde. Ein solches Konturbild wurde mit dem Originalbild überlagert, so dass das Segmentierungsergebnis verifizierbar wurde. Die Resultate der Bildanalyse sind in eine Datenbank eingegeben und in ein Excel-Spreadsheet importiert worden. Es erfolgte eine Sortierung in einem Visual Basic Macro, so dass die Ergebnisse nun für die statistische Auswertung durch das Statistical Package for Social Sciences (SPSS) in geeigneter Form vorlagen.

## **2.7 Transmissionselektronenmikroskopie**

### Aufarbeitung der Präparate

1. Spülen mit Natrium-Cacodylatpuffer (0,2 M, pH 7,4), 3 x 10 min
2. Nachfixieren mit 2% Osmiumtetroxid in Natrium-Cacodylatpuffer (0,2 M, pH 7,4) für zwei h
3. Spülen mit 2,4% NaCl, 3 x 10 min
4. Spülen mit Natrium-Acetatpuffer (0,2 M, pH 5,0) für 5 min
5. Blockkontrastieren mit 1% Uranylacetat in Natrium-Acetatpuffer (0,2 M, pH 5,0) für 30 min bei Dunkelheit
6. Spülen mit Natrium-Acetatpuffer (0,2 M, pH 5,0), 2 x 5 min
7. Entwässern in einer aufsteigenden Alkoholreihe, Überführen in Propylenoxid und Einbettung in Durcopan

## Schnittgewinnung, Färbung und Kontrastierung

Die mit einem „Ultracut E®“ der Firma Leica hergestellten 50 bis 70 nm dicken Ultradünnschnitte wurden mit Bleicitrat kontrastiert und mit einem „Philips 400®“ Transmissionselektronenmikroskop bei 60 kV untersucht und ausgewertet.

### **2.8 Intratumorale Sauerstoffpartialdruckmessung**

Der intratumorale Sauerstoffpartialdruck wurde mit Hilfe des computerkompatiblen pO<sub>2</sub>-Histogramphen Kimoc-MUL (Institut für Physiologie der Universität zu Lübeck) (Abb.2) nach dem von Fleckenstein und Weiss etablierten Verfahren gemessen [38, 39, 79].

Die für die Messungen verwendeten polarographischen Feinnadelsonden bestehen aus einer glasisolierten Goldmikrokathode (Durchmesser 12 µm), die von einem Federstahlmantelrohr (Durchmesser 340 µm) zur Erhöhung der mechanischen Stabilität umgeben ist. Der kanülenartige Spitzenschliff der Ummantelung erleichtert die Punktion des Gewebes.

Der Histogramph besteht aus einem Sondenstromverstärker mit galvanischer Trennung des Messkreises von der Datenverarbeitungselektronik, einer Vorrichtung zur Kalibrierung der Messsonden, einem motorgetriebenen Mikromanipulator für die Sondensteuerung und einem Computer, der wiederum die Sondenkalibrierung und den Messvorgang steuert. Er speichert die Kalibrierungsdaten, berechnet mit Hilfe des Programms ODAS (Oxygen Data Acquisition System) die gemessenen pO<sub>2</sub>-Daten und gibt sie als pO<sub>2</sub>-Histogramm wieder.

Der Messkreis selbst besteht aus der pO<sub>2</sub>-Feinnadelsonde, einer indifferenten Gegenelektrode (Kalomelektrode), einem Sondenstromverstärker und einem Strommessgerät. Die pO<sub>2</sub>-Elektrode wird an einem Mikromanipulator, der in allen Richtungen des Raumes beweglich ist, befestigt (Abb.2). Diese Vorrichtung ermöglicht die Punktion des Tumors an beliebiger Stelle. Der Sondenvorschub innerhalb des Gewebes erfolgt im Pilgerschrittverfahren. Dabei wird die Sonde nach einem schnellen Vorwärtsschritt von 700 µm rasch 300 µm zurückgezogen. Diese Art der Sondenbewegung minimiert den mechanischen Druck auf die Sondenspitze, was zu einer Verfälschung der Messwerte führen würde. Außerdem wird durch die Messungen an der Kathode des Messkreises molekularer Sauerstoff umgesetzt, weshalb die Messsonde nach jeder einzelnen Messung in unberührtes Gewebe vorgeschoben werden muss, um Messverfälschungen zu vermeiden. Nach einer Ausgleichszeit, die es dem Sensor ermöglicht, sich auf den pO<sub>2</sub>-Druck einzustellen, wird der Messwert übernommen und der nächste Pilgerschritt vorgenommen. Durch Rotation der Sonde um die eigene Achse werden Werte aus verschiedenen Bezirken des Tumors ermittelt. Eine unmittelbare Messwertdarstellung auf dem Monitor ermöglicht das sofortige Erkennen eines Artefaktes und somit eine Wiederholung der Messung. Quellen für Artefakte sind beispielsweise Blutungen in den Stichkanal oder extratumorale Messungen.

Die intratumoralen pO<sub>2</sub>-Messungen erfolgen in Narkose; die Aufnahme eines pO<sub>2</sub>-Histogramms aus etwa 70 Messwerten dauert ca. drei Minuten.

Die Messungen wurden stets zu identischen Zeitpunkten durchgeführt: Vor der Hyperthermie bei 37°C (Messung 1 = Kontrollwert), zehn Minuten nach Hyperthermiebeginn (Messung 2), 40 Minuten nach Beginn der Hyperthermie (Messung 3), sowie zwei (Messung 4) und 24 (Messung 5) Stunden nach Hyperthermie. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe von Microsoft Excel in Diagrammen dargestellt und mit dem Programm SPSS (Statistical Package for Social Sciences) statistisch ausgewertet.

Die Experimente wurden aus technischen Gründen zunächst nur an den mit kombinierter Thermochemotherapie behandelten Tieren durchgeführt. Nach den eindrucksvollen Ergebnissen der Therapiegruppe IFO + HT wurde in einer zusätzlichen Therapiegruppe der Sauerstoffpartialdruck bei isolierter Gabe von IFO ohne Hyperthermie, also bei 37°C gemessen.

## 2.9 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm „Statistical Package for Social Sciences“ (SPSS). War die Auswertung durch zu geringe Stichprobenzahlen mit dem Computerprogramm nicht möglich, so wurde die Berechnung manuell durchgeführt und in den entsprechenden Tabellen nachgeschlagen [27, 41].

### 2.9.1 Tumolvolumenkinetik

Die Tumolvolumina sind normalverteilt; die Mittelwerte und auch die Standardabweichung können zur statistischen Analyse herangezogen werden.

Die Tumolvolumina wurden sowohl im Verlauf als auch zwischen den einzelnen Gruppen durch einfache Varianzanalyse mit Messwiederholung auf signifikante Verläufe der Tumolvolumenentwicklung getestet. Post-Hoc-Tests zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des Tukey-HSD-Tests und Einzelvergleiche zu bestimmten Zeitpunkten zwischen speziellen Gruppen mit Hilfe des t-Tests durchgeführt. Als signifikant (\*) wurde ein Unterschied mit  $P < 0,05$ , als hochsignifikant (\*\*) ein Unterschied  $< 0,005$  bezeichnet. Die Tabellen mit den statistischen Auswertungen befinden sich im Anhang.

### 2.9.2 Computergestützte quantitative Auswertung der MIB-1 und Apoptag®-positiven Tumorzellen

Die ermittelten Werte sind nicht normalverteilt. Es wurde für jeden Tumor der Median der immunreaktiven Zellen errechnet und für die weitere Auswertung der Rangtest verwendet. Die Verteilung der Mediane wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt; Einzelvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Auch bei dieser Auswertung wurden Differenzen mit  $P < 0,05$  als signifikant (\*) und Differenzen mit  $p < 0,005$  als hochsignifikant (\*\*) bezeichnet.

### 2.9.3 Intratumorale pO<sub>2</sub>-Messungen

Die pO<sub>2</sub>-Werte sind nicht normalverteilt. Aus diesem Grund wurde für jeden Tumor der Median des pO<sub>2</sub>-Wertes berechnet. Die weitere Auswertung erfolgte mit Rangtests. Der Vergleich zwischen den Gruppen durch unabhängige Stichproben wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test, Vergleiche des Verlaufs der pO<sub>2</sub>-Werte über die Zeit mit dem Friedman-Test (abhängige Stichproben) durchgeführt. Einzelvergleiche zwischen den Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test (unabhängige Stichproben), Einzelvergleiche zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten einer Gruppe mit dem Wilcoxon-Rangtest (abhängige Stichproben) errechnet. Auch bei den pO<sub>2</sub>-Werten wurde ein Unterschied von  $P < 0,05$  als signifikant (\*), ein Unterschied von  $P < 0,005$  als hochsignifikant (\*\*) bezeichnet. Die Tabellen mit den Ergebnissen der statistischen Auswertungen befinden sich im Anhang.

### 3 ERGEBNISSE

Auf den folgenden Diagrammen sind auf der x-Achse die Zeitpunkte der Tumorzvolumenmessungen in Wochen und auf der y-Achse die Tumorzvolumina in  $\text{mm}^3$  aufgeföhrt. Die Bezeichnungen auf der x-Achse bedeuten:

- V0: Messzeitpunkt unmittelbar vor der Therapie
- V1: Messzeitpunkt eine Woche nach Therapie
- V2: Messzeitpunkt zwei Wochen nach Therapie
- V3: Messzeitpunkt drei Wochen nach Therapie

In Fällen einer **Komplett-** oder **Partialremission** (siehe Kap. 3.1.8) wurde das Tumorzvolumen über den Zeitraum von drei Wochen hinaus beobachtet; darauf wird im Text des entsprechenden Diagramms hingewiesen.

In dem Übersichtsdiagramm (Diagramm 1) sind wegen einer besseren Übersichtlichkeit keine Streuwerte eingetragen, wohl aber in den nachfolgenden Diagrammen der einzelnen Gruppen (Diagramm 2-7). Um die Befunde der Gruppen besser miteinander vergleichen zu können, wurde eine einheitliche Skalierung der y-Achsen mit einem Maximalwert von  $1000 \text{ mm}^3$  festgelegt. In den Fällen, in denen das Tumorzvolumen über diesen Wert hinausgeht, wird darauf ausdrücklich im Text hingewiesen. Am rechten Rand der Diagramme befindet sich jeweils die Legende, in der zur Identifizierung der Mäuse der einzelnen Gruppen deren Nummern mit den zugehörigen farbigen Symbolen zu finden sind. Die Abkürzung MW steht für den Mittelwert einer Gruppe. Für eine exakte Befunddokumentation wurde anstelle der Standardabweichung als Streuwert die Tumorzvolumina aller zum Stichprobenumfang gehörenden Mäuse aufgetragen. Um eine bessere Übersichtlichkeit zu gewährleisten, wurden nur die Mittelwerte miteinander verbunden.

### 3.1 Tumorvolumenkinetik

#### 3.1.1 Gruppenvergleich (Diagramm 1)

Diagramm 1 zeigt einen vergleichenden Überblick über die Tumorvolumenkinetiken aller Therapiegruppen. Die deutlichsten Volumenverringerungen finden sich in den Gruppen IFO + HT und CYCLO + HT. Alle anderen Therapiegruppen zeigen insgesamt nur ein geringes Abweichen von der Kontrollgruppe.

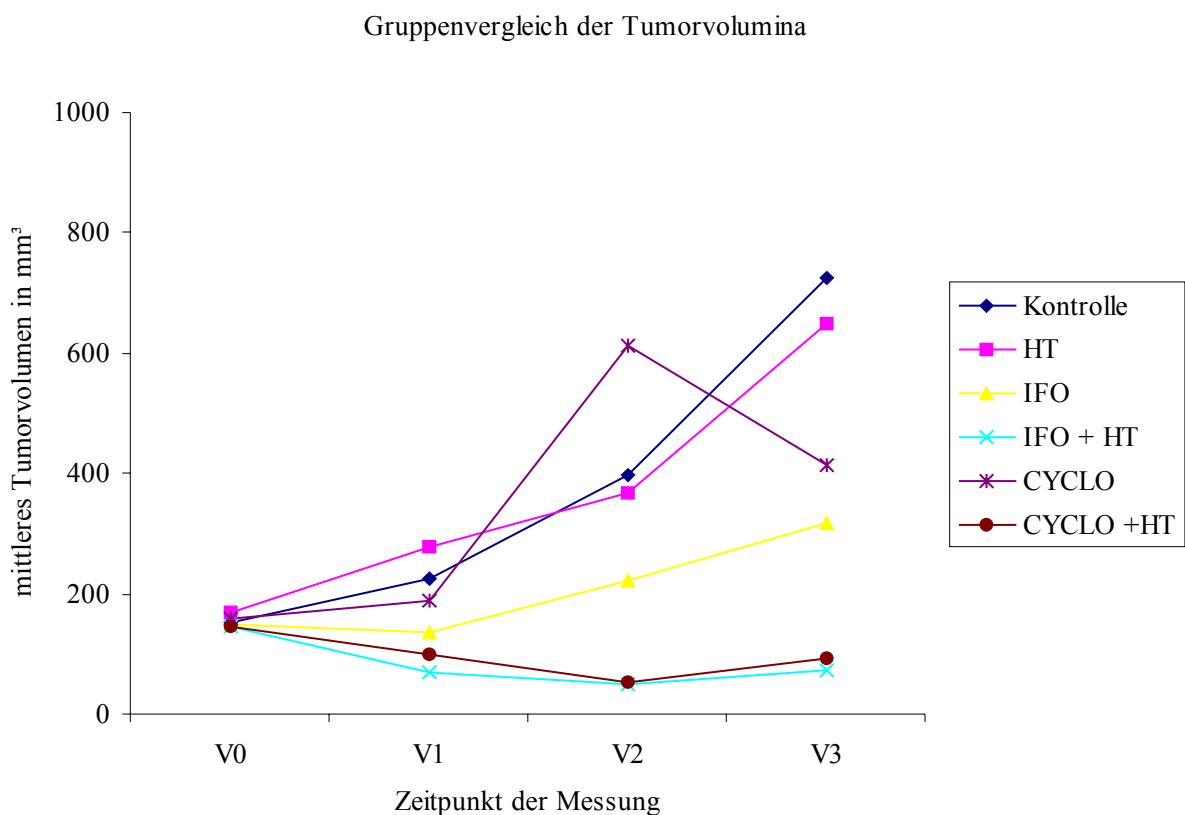


Diagramm 1: Übersicht des Tumorvolumenverlaufs aller Versuchsgruppen über einen Zeitraum von 3 Wochen im Vergleich. Die deutlichsten Volumenverringerungen zeigen die Gruppen IFO + HT und CYCLO + HT. Alle anderen Gruppen zeigen insgesamt nur ein geringes Abweichen von der Kontrollgruppe.

### 3.1.2 KONTROLLE (Diagramm 2)

Die Angehrate der Tumoren beträgt 99%, ihr Wachstum zeigt einen exponentiellen Verlauf. Der Mittelwert der Tumorumina beträgt vor der Therapie (V0) 154 mm<sup>3</sup>, nach einer Woche ist der Wert V1 = 224 mm<sup>3</sup>, nach zwei Wochen (V2) 399 mm<sup>3</sup> und nach drei Wochen (V3) 725 mm<sup>3</sup>. Dies entspricht einem Volumenzuwachs von plus 372%. Die Streuung der Werte vergrößert sich proportional zur Größe der Tumorumina. Zum Zeitpunkt V3 haben Maus Nr. 79 und Nr. 93 ein Tumorumen von 1224 bzw. 1488 mm<sup>3</sup> und fallen somit aus der Graphik heraus.

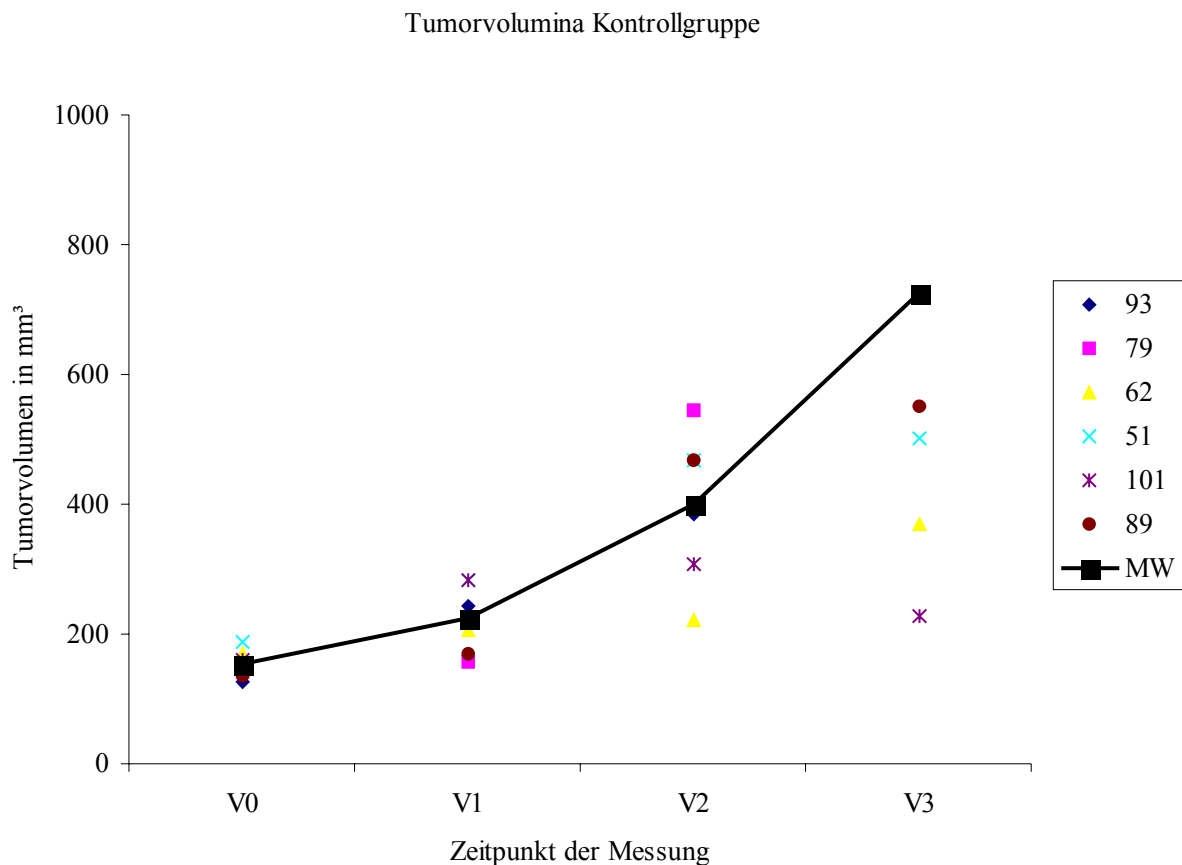


Diagramm 2: Entwicklung der Tumorumina in der Gruppe KONTROLLE. Das Diagramm zeigt einen exponentiellen Wachstumsverlauf der Tumoren.

### 3.1.3 HYPERTHERMIE (Diagramm 3)

Das mittlere Tumorstadium beträgt zum Zeitpunkt V0 168 mm<sup>3</sup>. Im weiteren Verlauf steigt der Mittelwert auf 279 mm<sup>3</sup> (V1), dann auf 367 mm<sup>3</sup> (V2) und erreicht zum Zeitpunkt V3 einen Wert von 648 mm<sup>3</sup>. Dies entspricht einem Zuwachs von plus 285%. Maus Nr. 134 hat nach drei Wochen ein Tumorstadium von 1681 mm<sup>3</sup> und fällt aus der Graphik heraus. Die Tumoren von Maus Nr. 136 und Nr. 139 weisen für zwei Wochen eine Volumenminderung ihres Tumors von bis zu 50% auf. Das Volumen dieser Tumoren stabilisiert sich jedoch in der dritten Woche (Nr. 139) bzw. tritt in ein erneutes Wachstum über (Nr. 136).

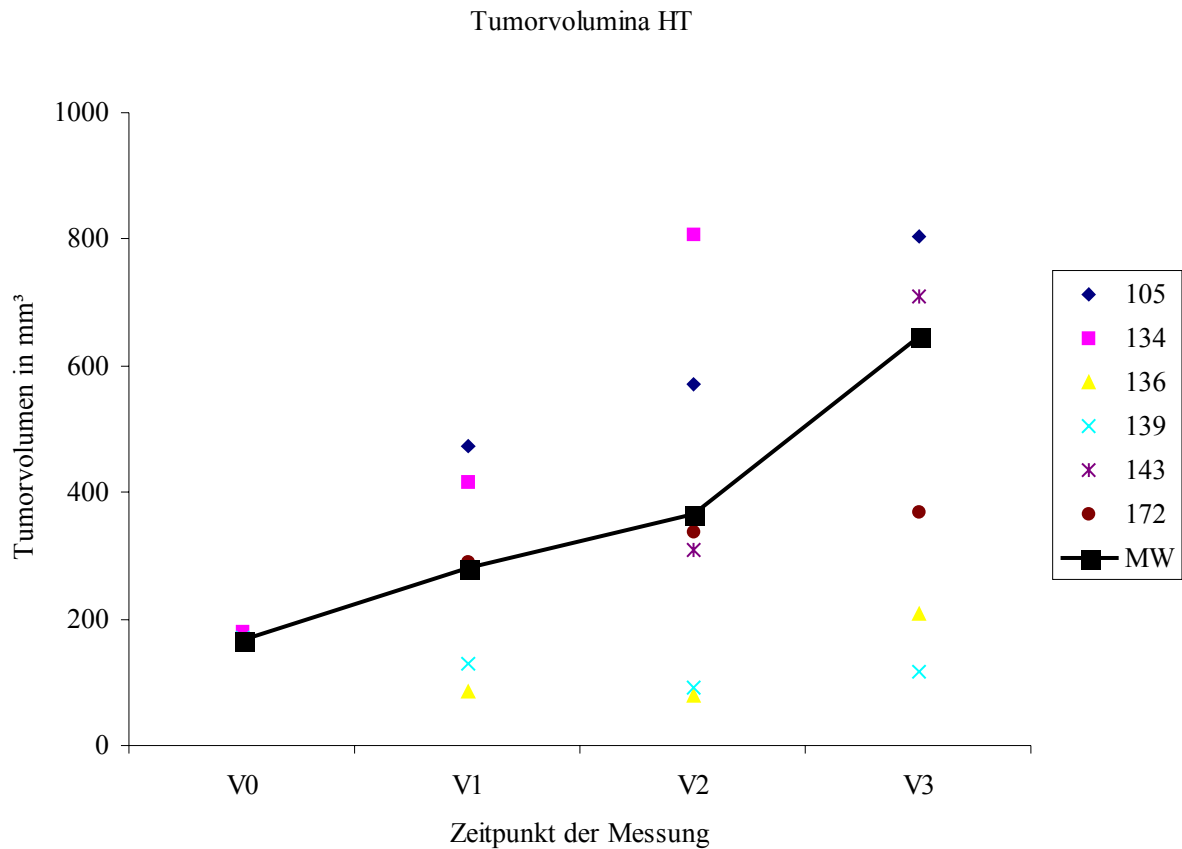


Diagramm 3: Entwicklung der Tumorvolumina in der HT-Gruppe.

### 3.1.4 IFOSFAMID (Diagramm 4)

In dieser Gruppe sinkt das mittlere Volumen von  $V_0 = 150 \text{ mm}^3$  auf  $V_1 = 135 \text{ mm}^3$  innerhalb der ersten Woche nach der Therapie. Nach zwei Wochen ist das mittlere Volumen der Tumore auf  $V_2 = 223 \text{ mm}^3$  und nach drei Wochen auf  $V_3 = 317 \text{ mm}^3$  entsprechend einem Zuwachs von 111% gestiegen. Zum Zeitpunkt V1 zeigen die Tumore (Nr. 30, 97, 107) eine deutliche Abnahme des Tumolvolumens um bis zu 50%. Zwei Tiere (Nr. 116, 124) haben eine stabile Tumorgröße, lediglich ein Tumor wächst progredient (Nr. 44). Nach zwei Wochen lassen alle Mäuse, außer Nr. 124, nach drei Wochen lassen sämtliche Mäuse wieder ein deutliches Wachstum erkennen.

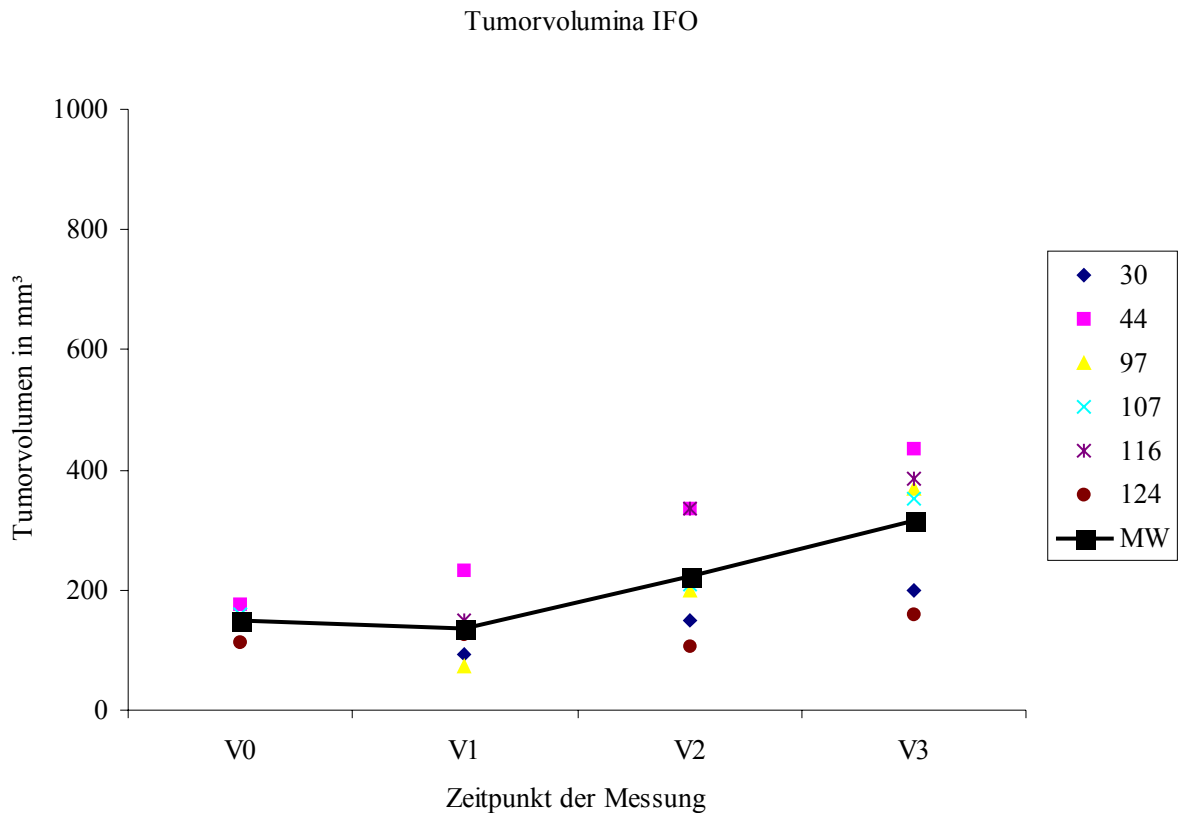


Diagramm 4: Entwicklung der Tumolvolumina in der IFO - Gruppe.

### 3.1.5 IFOSFAMID + HYPERTHERMIE (Diagramm 5)

Das mittlere Tumolvolumen sinkt innerhalb der ersten Woche nach Therapie von  $V_0 = 145 \text{ mm}^3$  auf  $V_1 = 69 \text{ mm}^3$  und nach zwei Wochen auf  $V_2 = 50 \text{ mm}^3$ .  $V_3$  zeigt nach drei Wochen einen Wert von  $74 \text{ mm}^3$ , was insgesamt einer Abnahme des Tumolvolumens von 49% entspricht. Nach einer Woche dokumentieren alle Tumore eine Abnahme ihres Tumolvolumens um maximal 70%. Nach zwei Wochen ist der Tumor der Maus Nr. 122 nicht mehr vorhanden, das Volumen der Tumore 123, 125, 128 und 148 hat sich weiter bis zu 90% verringert. Ein Tumor (Nr. 126) zeigt dagegen erneutes Wachstum. Nach drei Wochen sind drei der sechs Tumoren nicht mehr vorhanden (Nr. 122, 123, 125), die anderen drei zeigen ein erneutes Wachstum (Nr. 126, 128, 148). Um eine Komplettremission nach Definition der WHO diagnostizieren zu können (siehe Kap. 3.1.7), werden die tumorfreien Mäuse vom Zeitpunkt des Verschwindens des Tumors an für insgesamt 60 Tage weiterbeobachtet. Bei Maus Nr. 125 wächst der Tumor weiter und erreicht nach fünf Wochen ein Volumen von  $V_5 = 4,7 \text{ mm}^3$ , nach sechs Wochen ein Volumen  $V_6 = 8,2 \text{ mm}^3$ . Bei den Tieren 122 und 123 wird in dieser Zeitspanne kein neues Tumorwachstum beobachtet. Das makroskopische Bild einer Komplettremission ist in den Abbildungen 3a und 3b zu sehen.

Tumorzvolumina IFO + HT

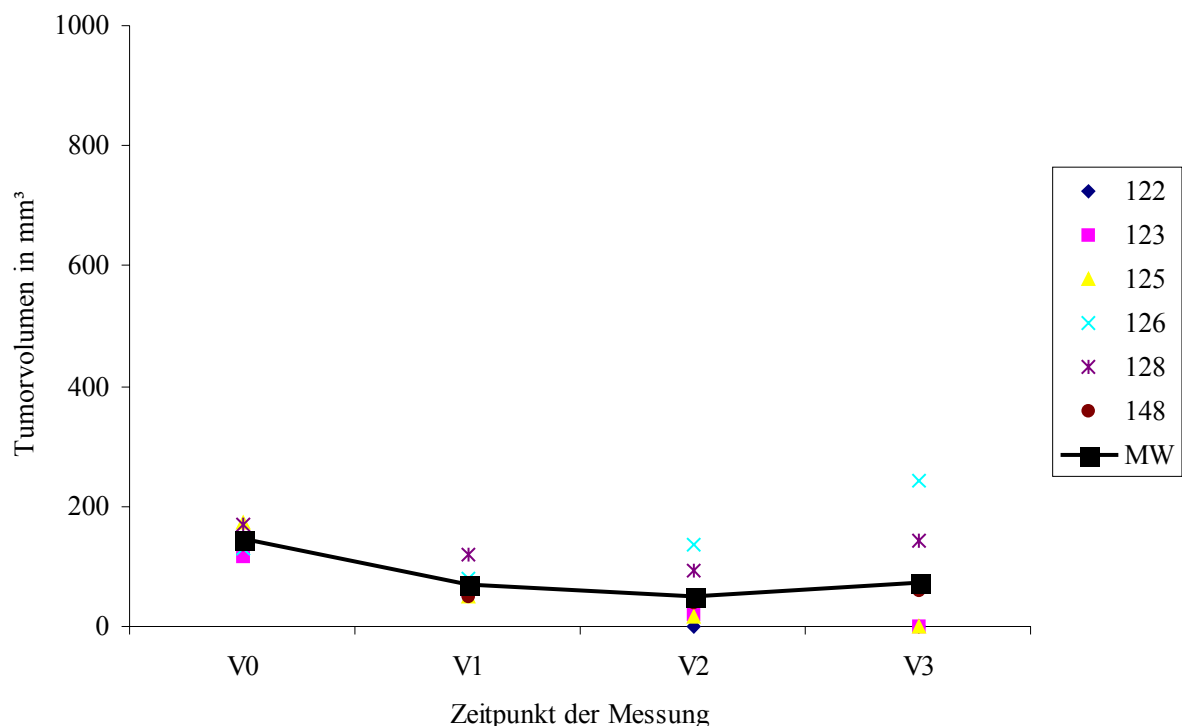


Diagramm 5: Entwicklung der Tumorzvolumina in der IFO + HT - Gruppe. Hier findet sich die größte Volumenreduktion.

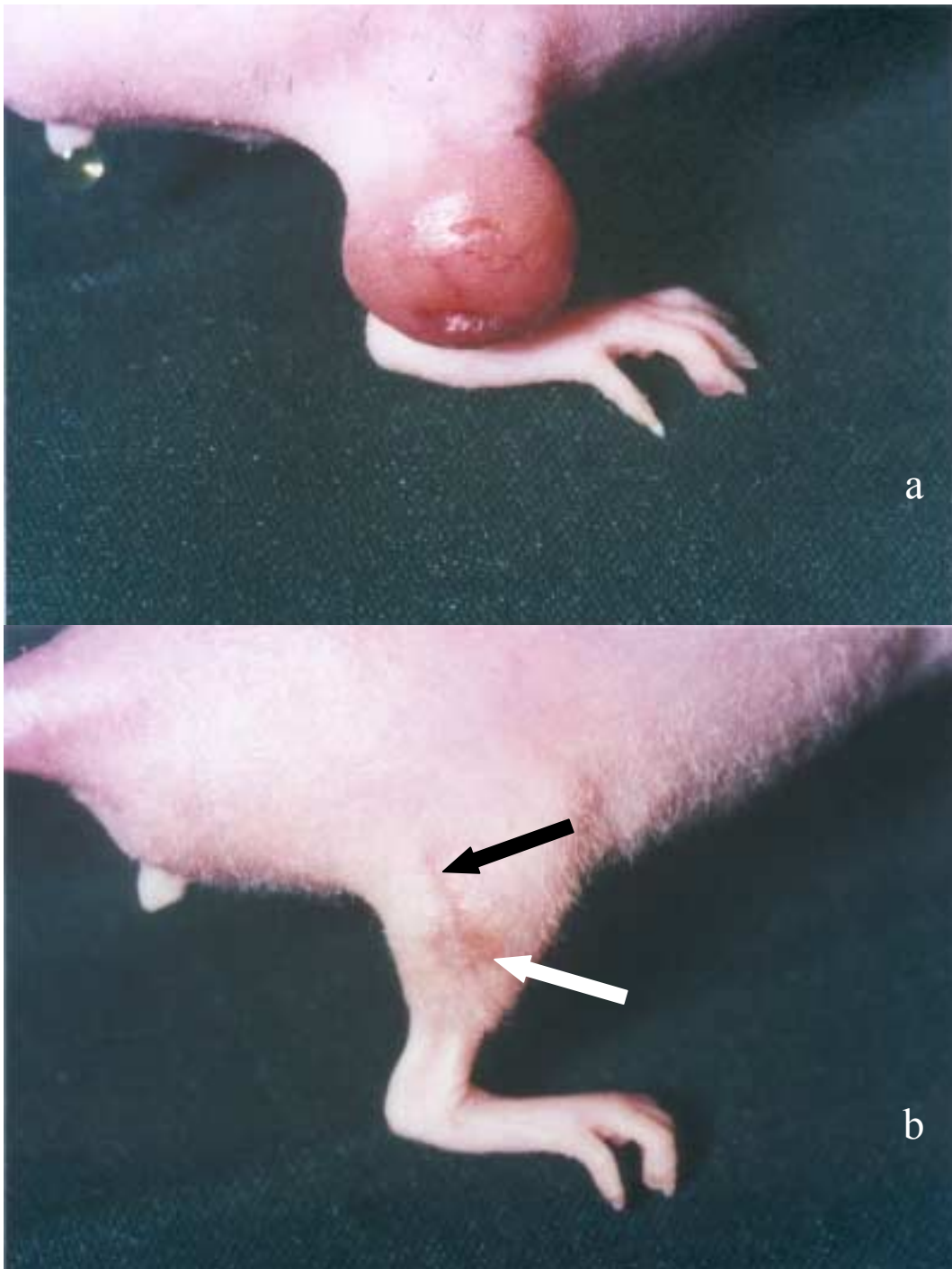


Abbildung 3a und b: Die Abbildung zeigt den tumortragender Hinterlauf der Maus vor (3a) und nach (3b) der kombinierten Thermochemotherapie mit Ifosfamid und 41,5°C. In Abbildung 3b ist nur noch die Transplantationsnarbe (schwarzer Pfeil) und eine Narbe an der Stelle zu sehen, an der vorher der Tumor lokalisiert war (weißer Pfeil). Die mikroskopische Untersuchung des Narbengewebes ergab keinen Hinweis auf Rest-Tumorgewebe.

### 3.1.6 CYCLOPHOSPHAMID (Diagramm 6)

Beginnend bei einem Ausgangsvolumen  $V_0 = 160 \text{ mm}^3$  steigt das mittlere Tumolvolumen auf  $V_1 = 190 \text{ mm}^3$  nach einer bzw. auf  $V_2 = 614 \text{ mm}^3$  nach zwei Wochen. Der Wert  $V_3$  beträgt nach drei Wochen  $415 \text{ mm}^3$ , insgesamt ein Zuwachs von 159%. Der erhebliche Anstieg des mittleren Tumolvolumens zum Zeitpunkt  $V_2$  ist durch das überproportionale Wachstum von Tumor Nr. 91 auf  $1539 \text{ mm}^3$  zu erklären. Dieser Wert fällt aus dem Diagramm heraus. Nach drei Wochen verringert sich jedoch das Volumen von Nr. 91 auf  $V_3 = 144 \text{ mm}^3$ . Nach einer Woche haben zwei Tumoren ein unverändertes Volumen (Nr. 54 und 70), zwei andere weisen ein progredientes Wachstum auf (Nr. 69 und 91). Nach zwei Wochen zeigen alle Tumoren ein progredientes Wachstum, nach drei Wochen wachsen die Tumoren 54, 56 und 69 weiter, das Volumen des Tumors Nr. 66 stagniert, die Tumoren Nr. 70 und 91 zeigen eine Abnahme ihres Volumens.

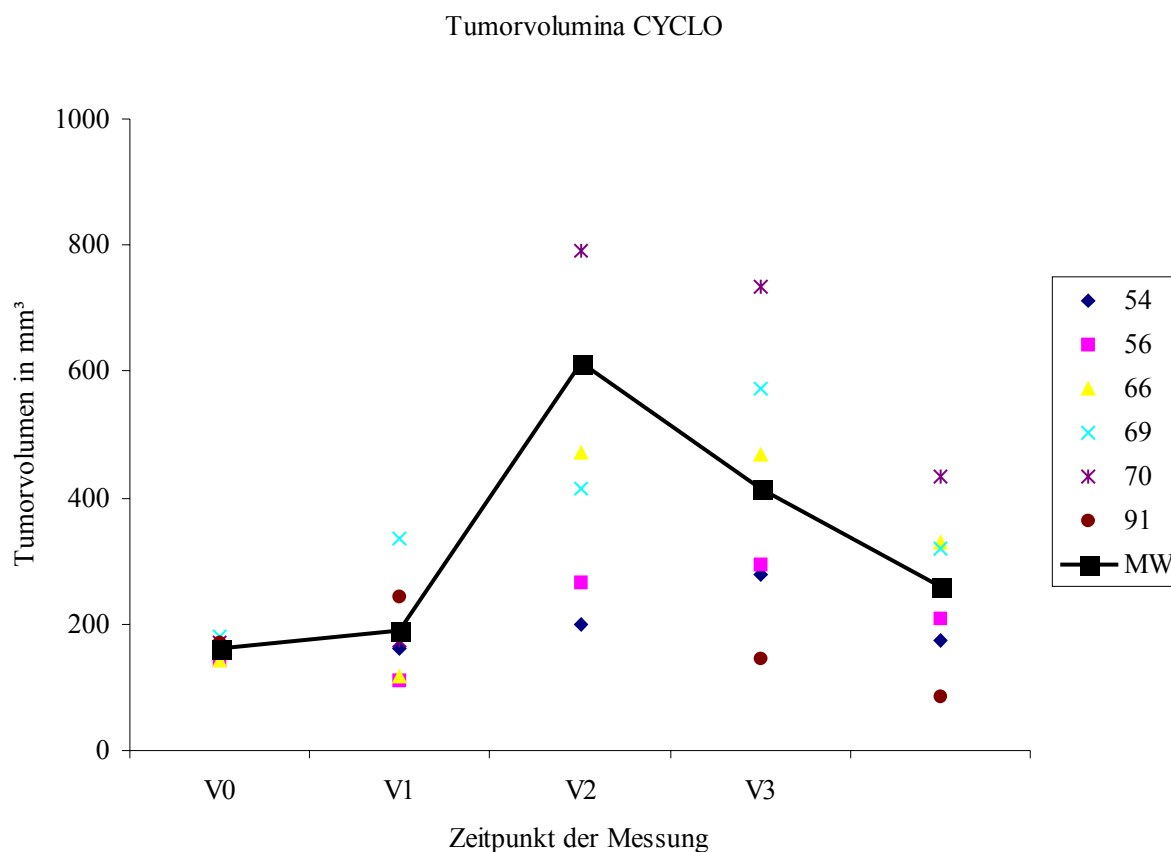


Diagramm 6: Entwicklung der Tumolvolumina in der CYCLO – Gruppe.

### 3.1.7 CYCLOPHOSPHAMID + HYPERTHERMIE (Diagramm 7)

Das mittlere Tumorumfang geht von einem Ausgangswert von  $V_0 = 146 \text{ mm}^3$  aus und sinkt nach einer Woche auf  $V_1 = 99 \text{ mm}^3$ . Nach zwei Wochen ist ein Wert von  $V_2 = 52 \text{ mm}^3$  erreicht, nach drei Wochen wird ein erneuter Anstieg auf  $V_3 = 92 \text{ mm}^3$  gemessen. Insgesamt entspricht dieses einer Verminderung des Tumorumfangs um 37%. Nach einer Woche zeigen alle Tiere dieser Gruppe, bis auf Nr. 151, eine deutliche Volumenreduktion bis maximal 50%. Nach zwei Wochen weisen alle Tumore, bis auf Nr. 151, eine weitere Reduktion bis zu Volumina kleiner oder gleich 20% des Ausgangswertes auf (Maus Nr. 133, 164 und 166). Zum Zeitpunkt  $V_3$ , d.h. nach drei Wochen, wachsen alle Tumoren erneut, wobei kein Tumor – mit Ausnahme von Tumor Nr. 151 – den Ausgangswert wieder erreicht.

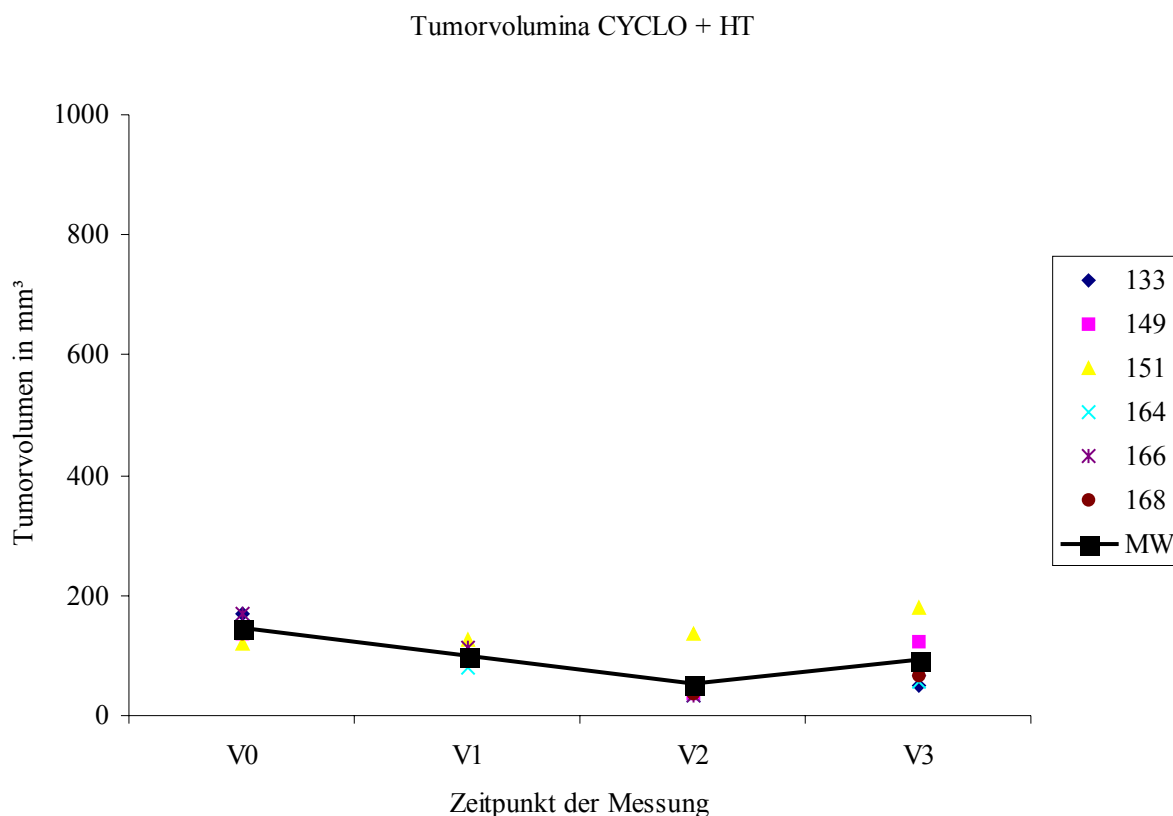


Diagramm 7: Entwicklung der Tumorumfänge in der CYCLO + HT – Gruppe. Diese Gruppe erreicht die zweitgrößte Volumenreduktion.

### 3.1.8 Beurteilung des Therapieerfolgs in Anlehnung an die WHO (Diagramm 8)

Hinsichtlich des Wachstumsverhaltens ihrer Tumoren wurden die Mäuse in Anlehnung an die Klassifizierung der WHO in folgende Gruppen eingeteilt, um den Therapieerfolg besser beurteilen zu können (Diagramm 8):

**Komplette Remission (CR):** Verschwinden aller nachweisbaren Tumorparameter, mindestens sechs Wochen nach Verschwinden des Tumors kein erneutes Tumorwachstum.

**Partielle Remission (PR):** Rückgang der Tumorausdehnung um mindestens 50% über eine Dauer von mindestens vier Wochen.

**No Change (NC):** Keine signifikante Änderung der Tumorausdehnung über mindestens vier Wochen, d.h. keine messbare Größenänderung, Abnahme um weniger als 50% oder Zunahme um weniger als 25%.

**Progress (PD):** Zunahme des Tumolvolumens um mehr als 25%.

Nur die mit einem Alkylans in Kombination mit einer Hyperthermie behandelten Gruppen zeigten Remissionen. Die erfolgreichste Therapie ist die kombinierte Thermochemotherapie IFO + HT. In dieser Gruppe weisen die Hälfte der Tiere nach drei Wochen **Komplettremissionen** auf, jeweils ein Tier zeigt eine **Partialremission**, **No Change** bzw. einen **Progress**.

In der mit CYCLO + HT behandelten Gruppe weisen die Hälfte der Tiere **Partialremissionen**, zwei Tiere **No Change**, ein Tier weist **Progress** auf. In den anderen Therapiegruppen ist keine langfristige Wachstumsbeeinflussung festzustellen. Hier findet sich in allen Fällen eine Tumorprogression, abgesehen von zwei Tieren mit **No Change** in der HT – Gruppe und einem Tier mit **No Change** in der CYCLO - Gruppe.

### Tumorprogression in Anlehnung an die WHO-Klassifikation

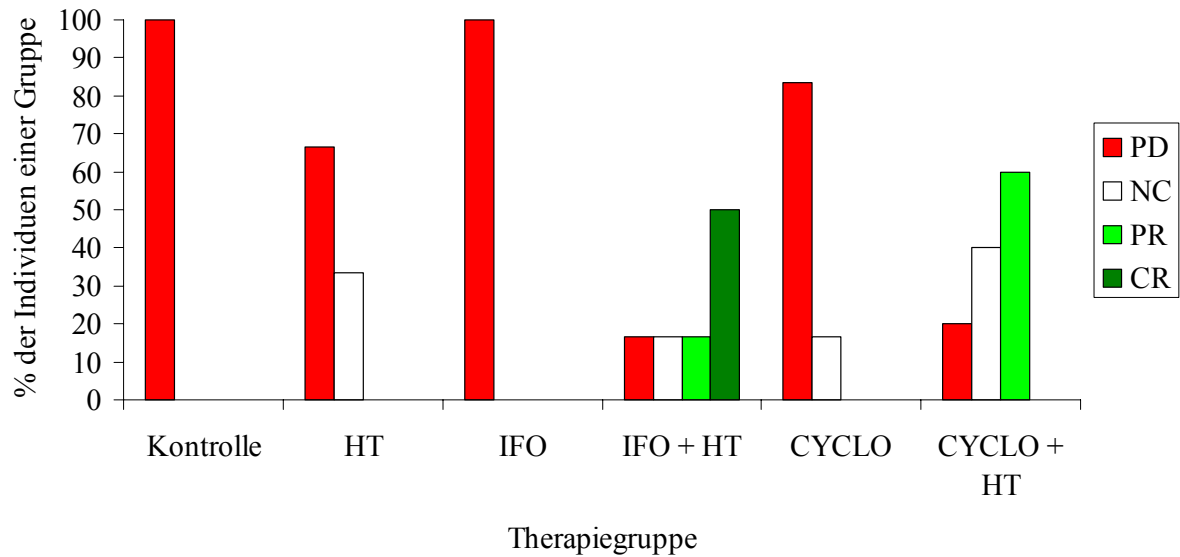


Diagramm 8: Der Therapieerfolg der verschiedenen Gruppen nach drei Wochen wurde in Anlehnung an die WHO-Klassifikation zur Beurteilung der Tumorprogression verglichen. Der prozentuale Anteil der unterschiedlichen Progressionsstadien ist auf der Y-Achse aufgetragen, die Gruppenzugehörigkeit auf der X-Achse. Die erfolgreichste Therapie ist die kombinierte Thermochemotherapie mit IFO + HT, gefolgt von der Gruppe CYCLO + HT.

## 3.2 Lichtmikroskopie (Abbildungen 4 bis 20)

### 3.2.1 Histologische Routinefärbungen

Die Lichtmikroskopie der Tumorgewebe zeigt in den Routinefärbungen Hämalaun-Eosin (HE) und Azokarmin-Anilin (Azan) die typischen Charakteristika eines biphasischen Pleuramesothelioms mit überwiegendem epithelialen Anteil und einer eindeutigen Grenze zwischen Tumorgewebe und Haut des Wirtes (Abb. 4). Nur in einzelnen Fällen wird eine Infiltration von Tumorzellen in die daruntergelegene Muskulatur beobachtet (Abb. 5). Eine frühzeitige Entstehung von zum Teil ausgedehnten Nekrosearealen im Zentrum des Tumors ist ein typisches Merkmal für die hier verwendete Zelllinie des Pleuramesothelioms. Hier kann ein Übergang von intaktem Tumorgewebe über Bezirke leicht geschädigter Zellen sowie Gebiete mit sehr stark defekten Zellen bis hin zu Arealen, in denen sich nur noch Zelltrümmer befinden, beobachtet werden (Abb. 6, 7). Vergleicht man das histologische Bild des Pleuramesothelioms mit lichtmikroskopischen Aufnahmen anderer Tumorentitäten, so fällt im ersteren eine äußerst schwach ausgeprägte Vaskularisierung auf.

Gefäße mit einem normalen Wandbau sind ausgesprochen selten. Ein Beispiel für ein solches Gefäß zeigt die Abbildung 8. Wenig nekrotisches Tumorgewebe liegt meist unmittelbar um ein solches intaktes Gefäß (Abb. 6-8). Erst in weiterer Entfernung, in der die Versorgung durch ein Gefäß nur noch unzureichend ist, wird das Tumorgewebe nekrotisch. Vereinzelt trifft man in der Tumorperipherie lakunenartige Erweiterungen, Zeichen einer Neoangiogenese (Abb. 10).

Die epitheloiden Anteile des biphasischen Pleuramesothelioms sind durch runde bis ovale Zellen mit großen Kernen und mehreren, meist atypisch geformten Nukleoli gekennzeichnet (Abb. 10, 11). Die Zellen liegen hier in einer äußerst spärlichen extrazellulären Matrix. Die Zellen des mesenchymalen Anteils dagegen sind schlank und spindelförmig, fischzugähnlich angeordnet und haben eher kleine, ovale Zellkerne. Diese Zellen sind von einem kräftigen Netz extrazellulärer Matrix umgeben (Abb. 12, 13). Nur vereinzelt findet man eine durch Bindegewebssepten entstehende Läppchengliederung des Tumors (Abb. 9).

Aufgrund der ohnehin frühzeitigen und spontanen Nekroseentstehung ist es schwierig, eine Aussage über therapiebedingte Zellschäden zu treffen. Die Abbildung 14 bietet eine Übersicht über die Morphologie aller Therapiegruppen. Ein spezifisches Bild lässt sich bei keiner Therapieform erkennen, denn neben großen, zentralen Nekrosen kommen auch Areale mit disseminierten, kleinen, mottenfraßähnlichen Nekrosen vor.

Lediglich für die Hyperthermiegruppe zeigt sich, allerdings nur etwa zwei Stunden nach der Therapie, als morphologisches Korrelat eine deutliche Hyperämie, erkennbar an der prallen Füllung der Gefäße mit Erythrozyten (Abb. 15, 16). Die wenig spezifische Morphologie der einzelnen Therapiegruppen dokumentieren die Abbildungen 17 bis 20.

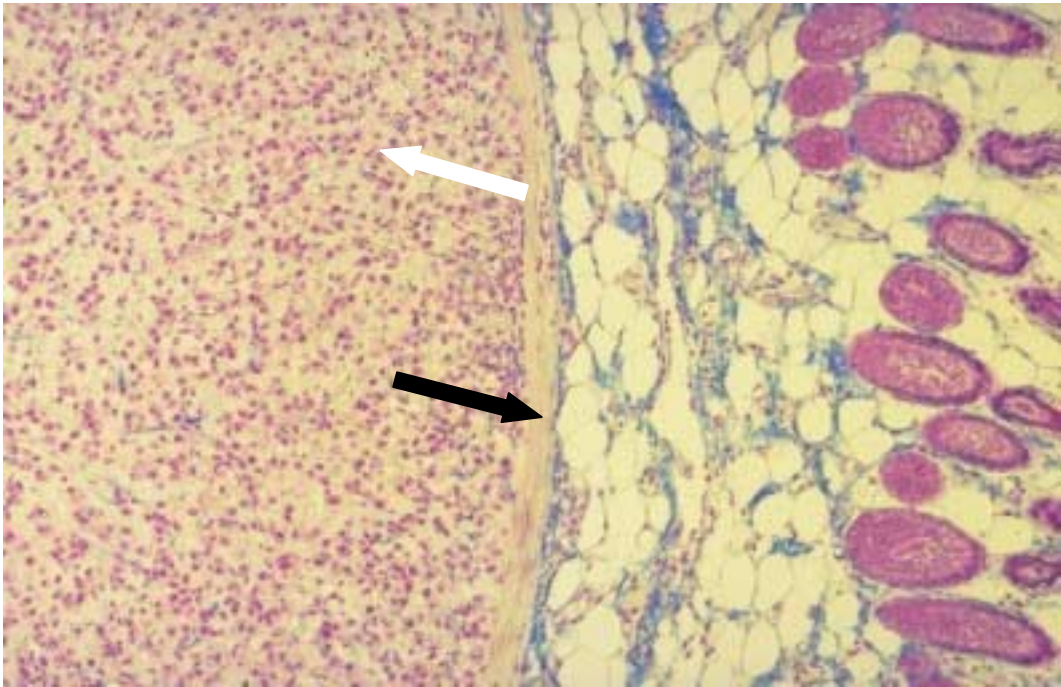


Abbildung 4: KONTROLLE. Das Tumorgewebe (weißer Pfeil) zeigt hier eine überwiegend epitheloide Differenzierung und ist deutlich von der Subkutis (schwarzer Pfeil) abgegrenzt. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X120.

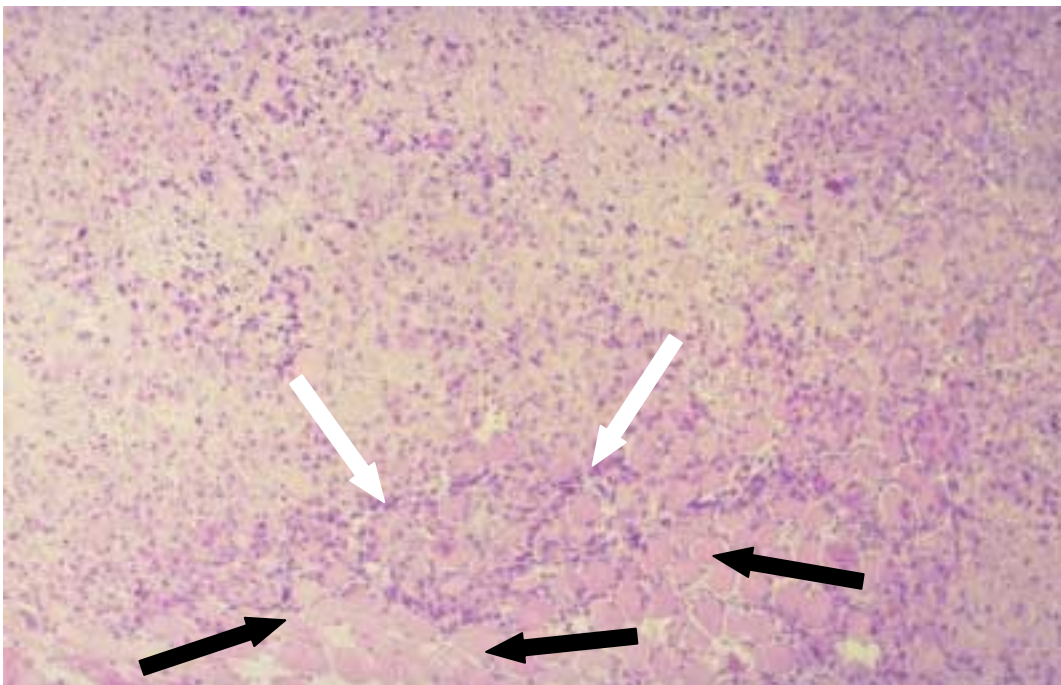


Abbildung 5: KONTROLLE. Das Tumorgewebe (weiße Pfeile) infiltriert die in der Tiefe des Hinterlaufes gelegene Extremitätenmuskulatur (schwarze Pfeile). Lichtmikroskopie, Färbung: HE, Vergrößerung X120.

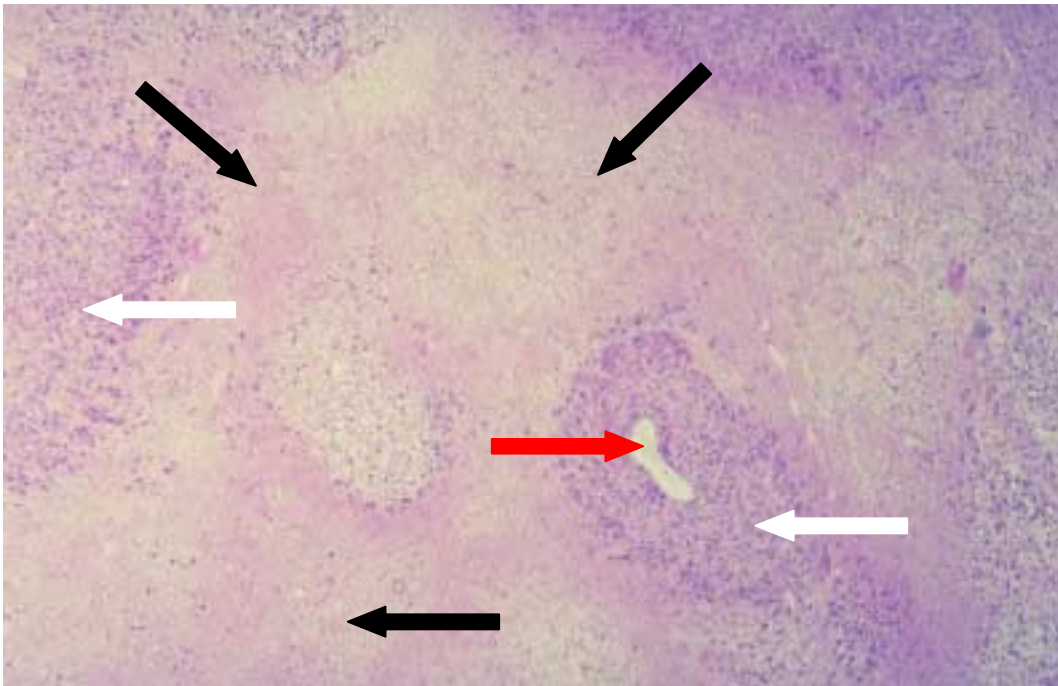


Abbildung 6: KONTROLLE. Intakte (weiße Pfeile) und nekrotische (schwarze Pfeile) Tumoreale wechseln sich landkartenartig ab. Inseln intakten Tumorgewebes sind meistens mit einem zentralen, die Zellinsel versorgenden Blutgefäß (roter Pfeil) versehen. Lichtmikroskopie, Färbung: HE, Vergrößerung X120.

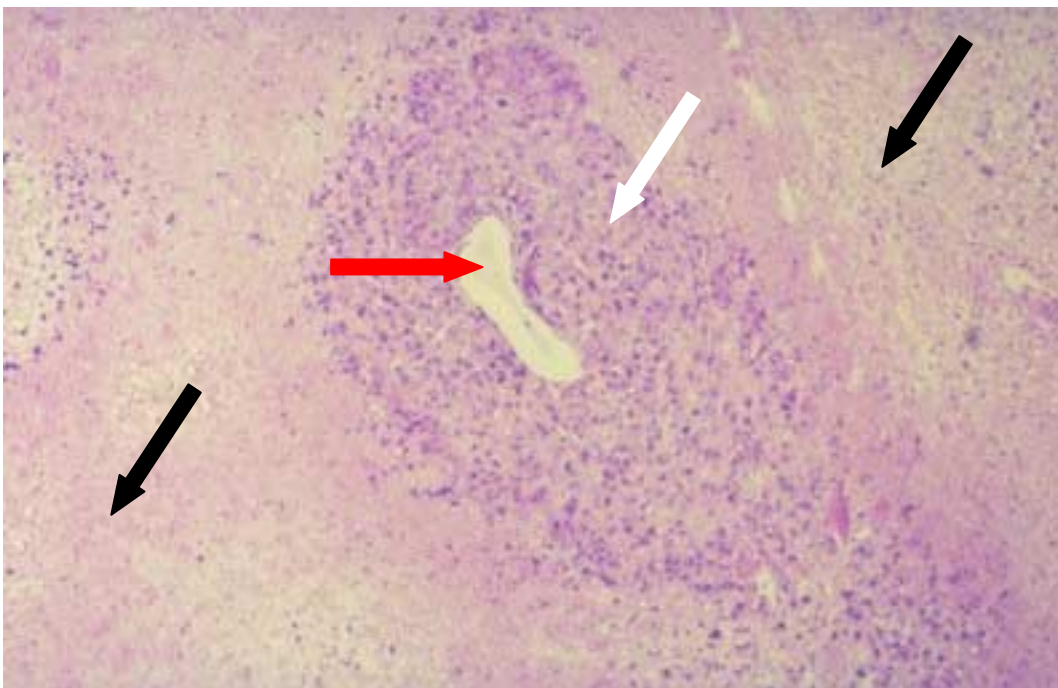


Abbildung 7: KONTROLLE. Ausschnitt aus Abb.6, Insel intakten Tumorgewebes (weißer Pfeil) mit zentralem Blutgefäß inmitten eines ausgedehnten Nekroseareals (schwarze Pfeile). Im Nekroseareal sind keine Zellen mehr erkennbar, es erscheint als amorphes, unstrukturiertes Gewebe. Das Gefäß im Zentrum des intakten Gewebes ist bei dieser Vergrößerung deutlich zu erkennen (roter Pfeil). Lichtmikroskopie, Färbung: HE, Vergrößerung X240.

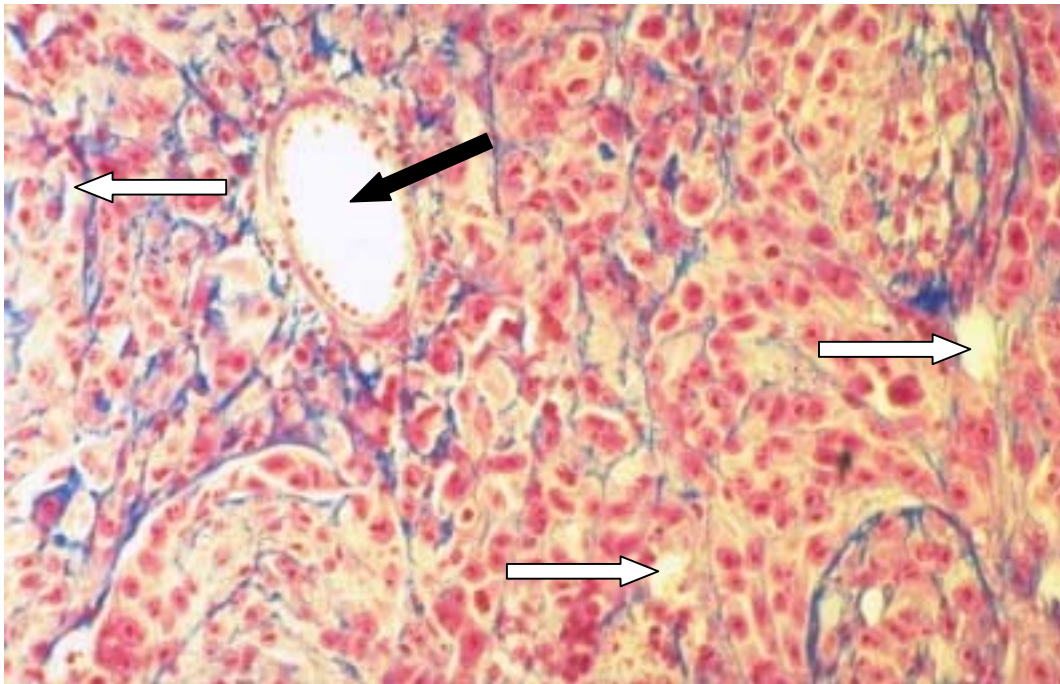


Abbildung 8: KONTROLLE. Große, intakte Gefäße wie diese Arteriole (schwarzer Pfeil) kommen selten im Tumorgewebe vor. Typischer sind dünnwandige, sinusoidale Gefäße (weiße Pfeile) mit erheblichen Kaliberschwankungen. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X240.

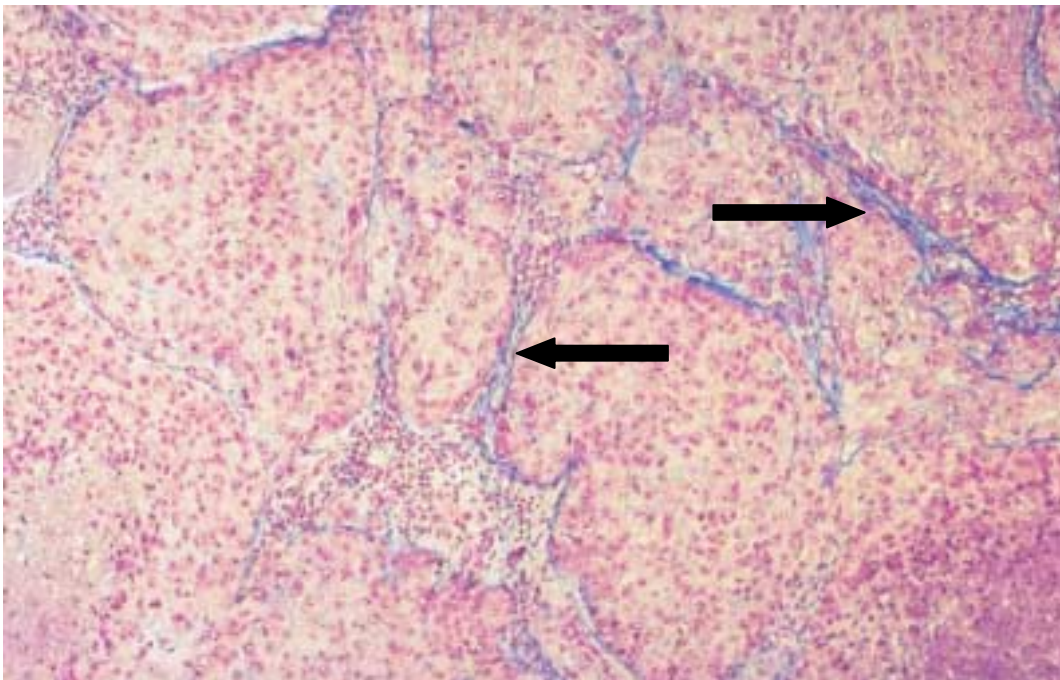


Abbildung 9: KONTROLLE. Gelegentlich ist das Tumorgewebe durch zarte Bindegewebszüge (schwarze Pfeile) in „Läppchen“ gegliedert. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X240.

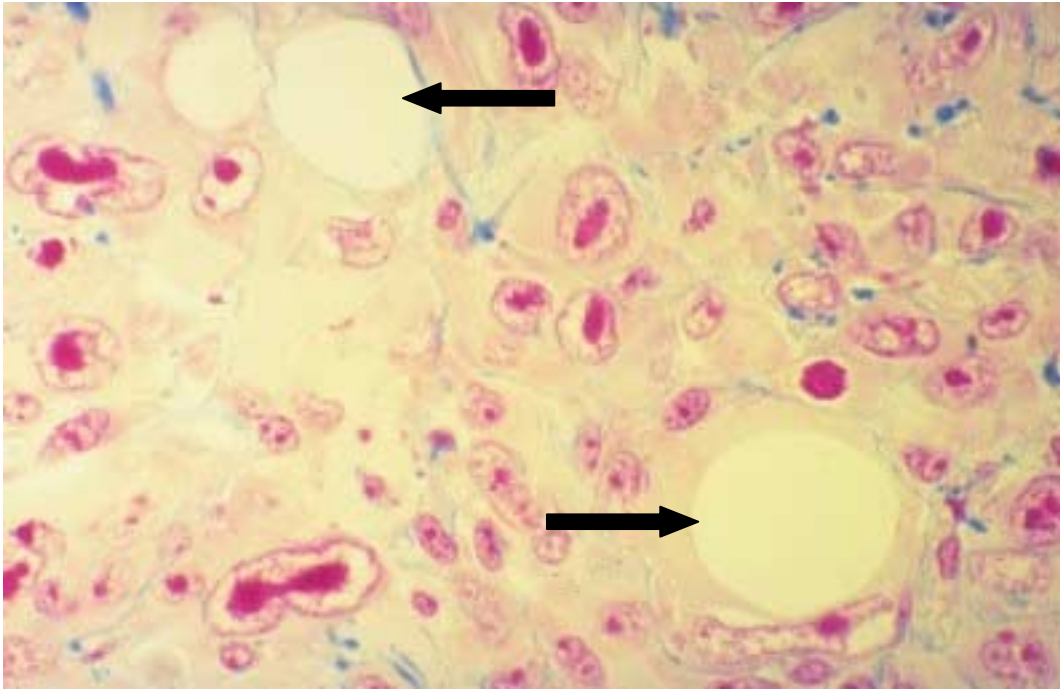


Abbildung 10: KONTROLLE. Areal epitheloider Tumorzellen mit Neoangiogenese (schwarze Pfeile). Einige Tumoreale sind durchsetzt von sich neu bildenden Blutgefäßen, die jedoch meistens einen unvollständigen Wandaufbau besitzen und die Nährstoffversorgung nicht unbedingt gewährleisten. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X780.

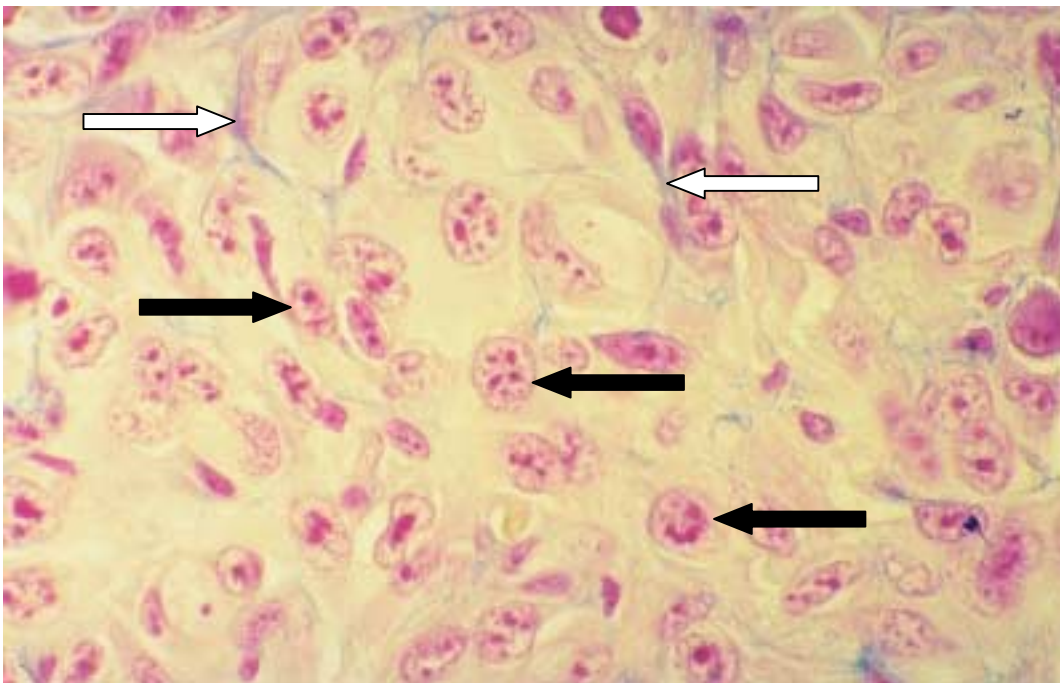


Abbildung 11: KONTROLLE. Areal epitheloider Tumorzellen. Dieser Zelltyp besitzt rundliche bis ovoide Zellkerne (schwarze Pfeile) mit mehreren, bisweilen atypisch geformten Nukleoli. Interzelluläre Bindegewebssepten (weiße Pfeile) oder eine Läppchengliederung sind in diesen Arealen sehr selten. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X780.

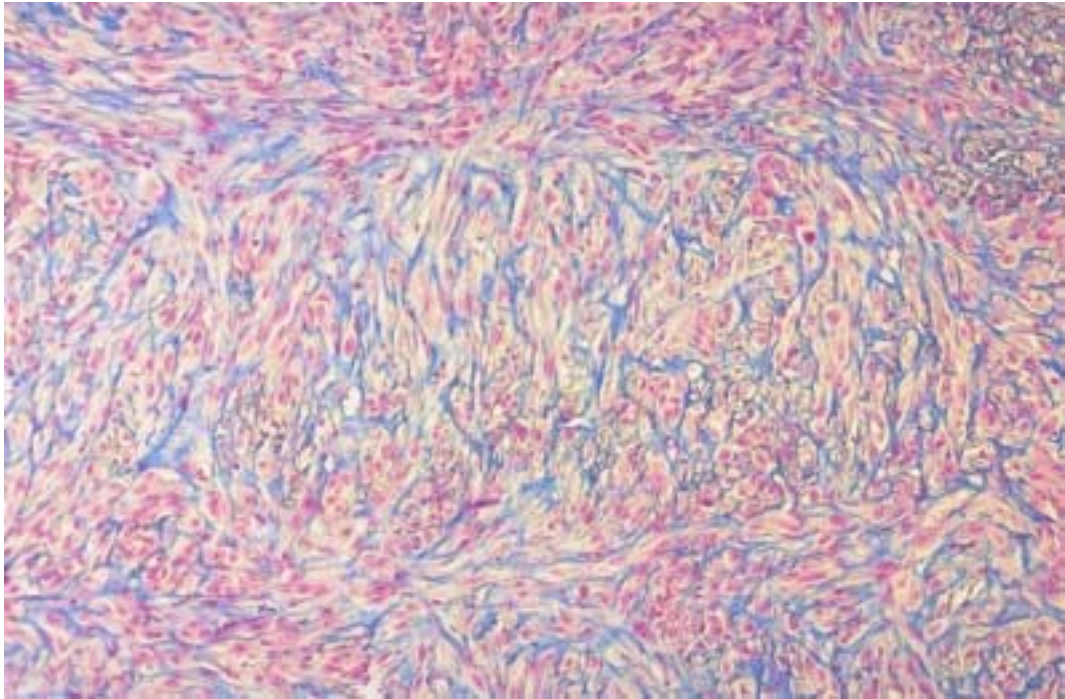


Abbildung 12: KONTROLLE. Areal mesenchymaler Zellen. Die bisweilen fischzugartige Anordnung der Tumorzellen inmitten einer gut ausgeprägten, faserigen Extrazellulärmatrix ist deutlich zu erkennen. Diese mesenchymalen Areale unterscheiden sich auch durch die Form ihrer Zellen von den epitheloiden Arealen. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X240.

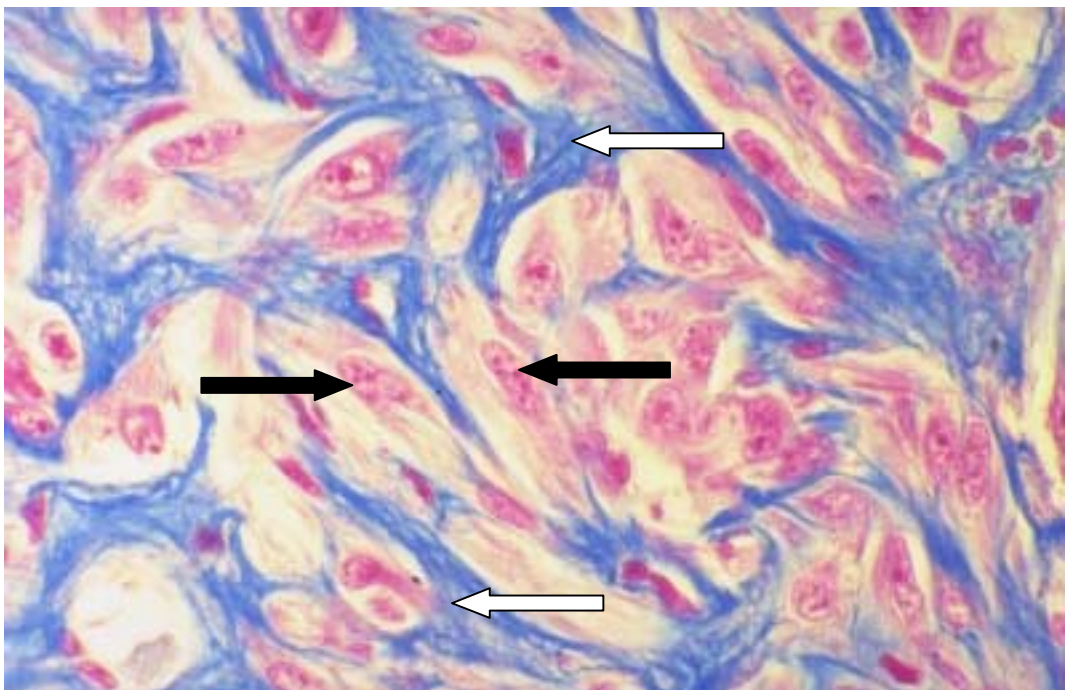


Abbildung 13: KONTROLLE. Areal mesenchymaler Zellen. Die Tumorzellen in mesenchymalen Arealen sind vorwiegend spindelförmig (schwarze Pfeile) und durch ein Netzwerk verzweigter Faserzüge voneinander abgegrenzt (weiße Pfeile). Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X780.

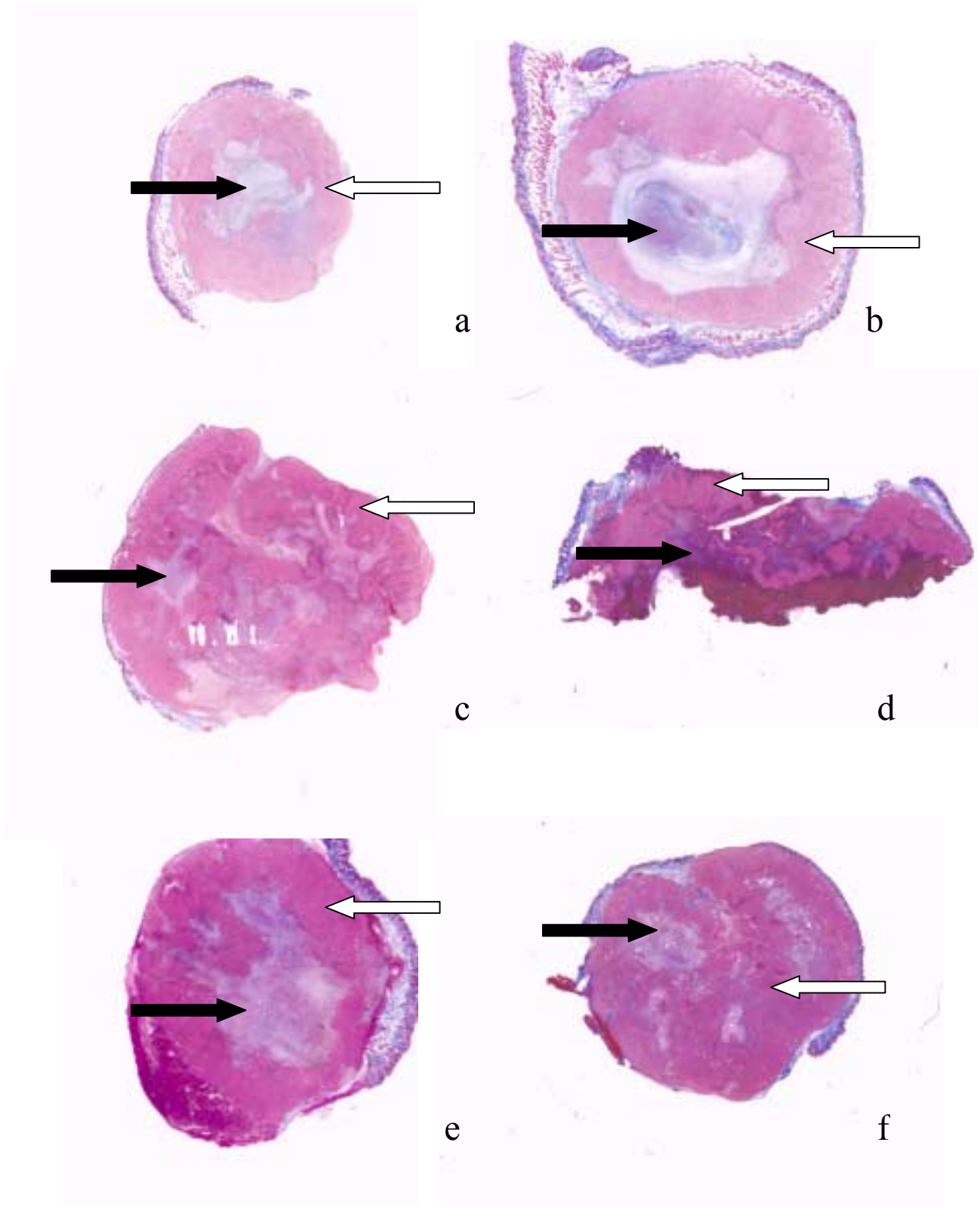


Abbildung 14: Übersicht über die unregelmäßige Verteilung von Nekrosearealen im Tumorgewebe. In der vorliegenden Färbung stellen sich intakte Tumorareale rot (weiße Pfeile) dar, während Nekroseareale bläulich-blaß (schwarze Pfeile) gefärbt sind. Man kann zwei verschiedene Nekrosemuster erkennen: 1) zentrale, große, flächige Nekrosen (a, b, e). 2) verzweigte, in die Peripherie hineinreichende kleinfleckige Nekrosen (c, d, f). Dazwischen existieren zahlreiche Übergangsformen. Die ausgewählten Tumoren entstammen unterschiedlichen Therapiegruppen, sie stellen aber keine für die Gruppe charakteristische Morphologie dar. Vielmehr ist die Verteilung der Nekroseareale unabhängig von Tumorgöße und Therapieform. (a) Kontrolle; (b) HT; (c) IFO; (d) IFO + HT; (e) CYCLO; (f) CYCLO + HT; Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X40.

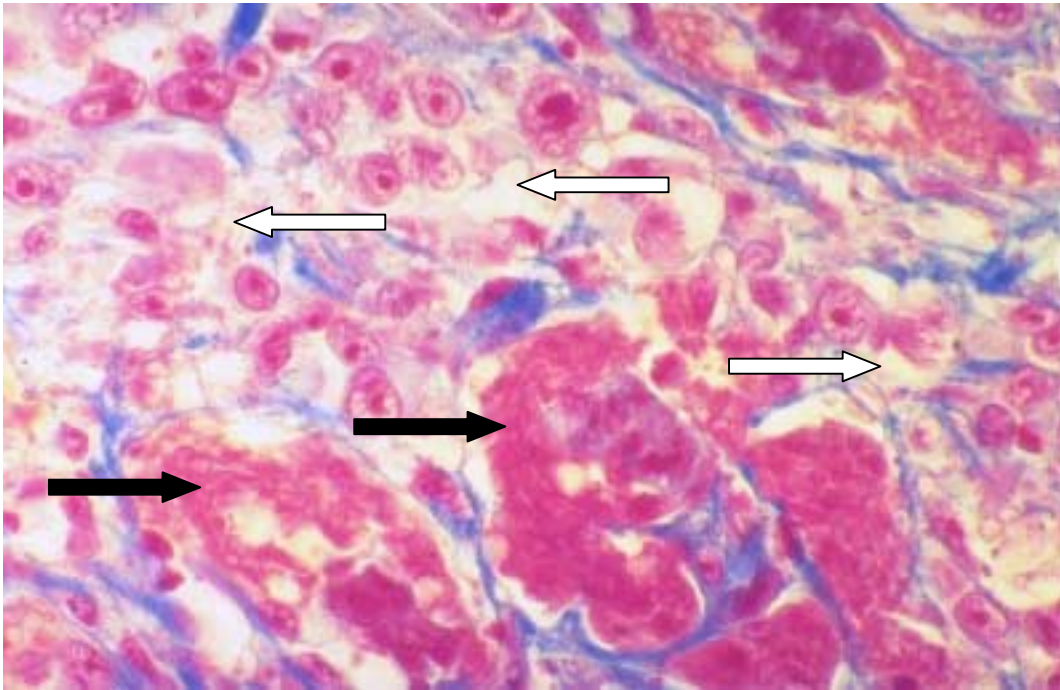


Abbildung 15: HT. Eine bis wenige Stunden nach der Hyperthermie zeigt sich eine deutliche Stauung der Blutgefäße (schwarze Pfeile) und zwischen den Zellen entsteht ein interstitielles Ödem (weiße Pfeile). Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X480.

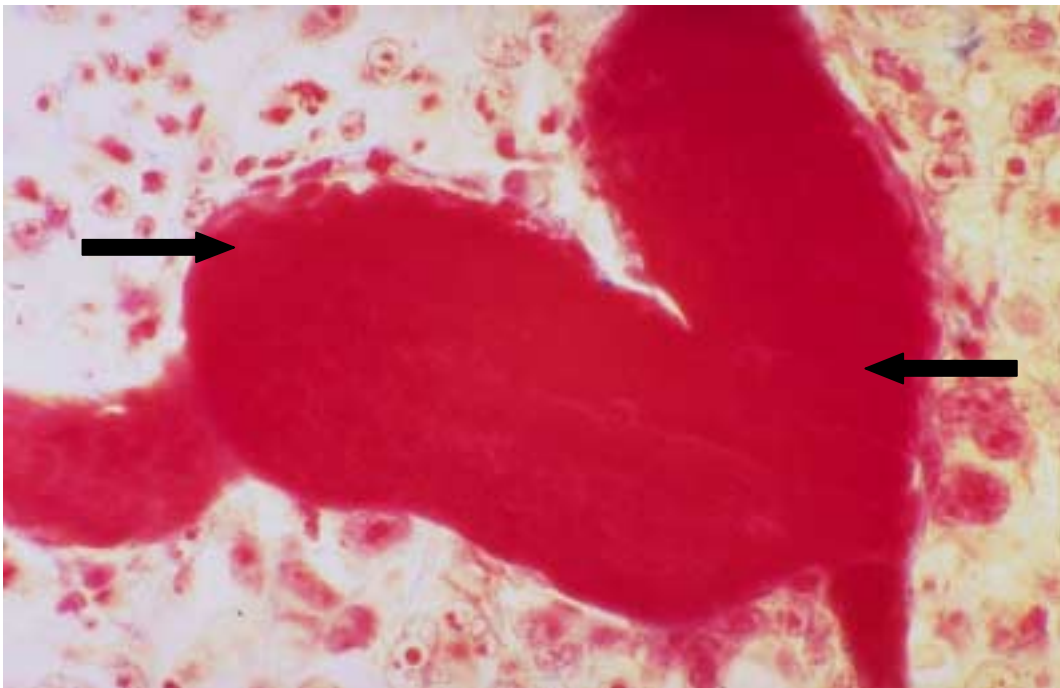


Abbildung 16: HT. Besonders stark gestautes Gefäß in der Tumorperipherie (schwarze Pfeile). Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X480.

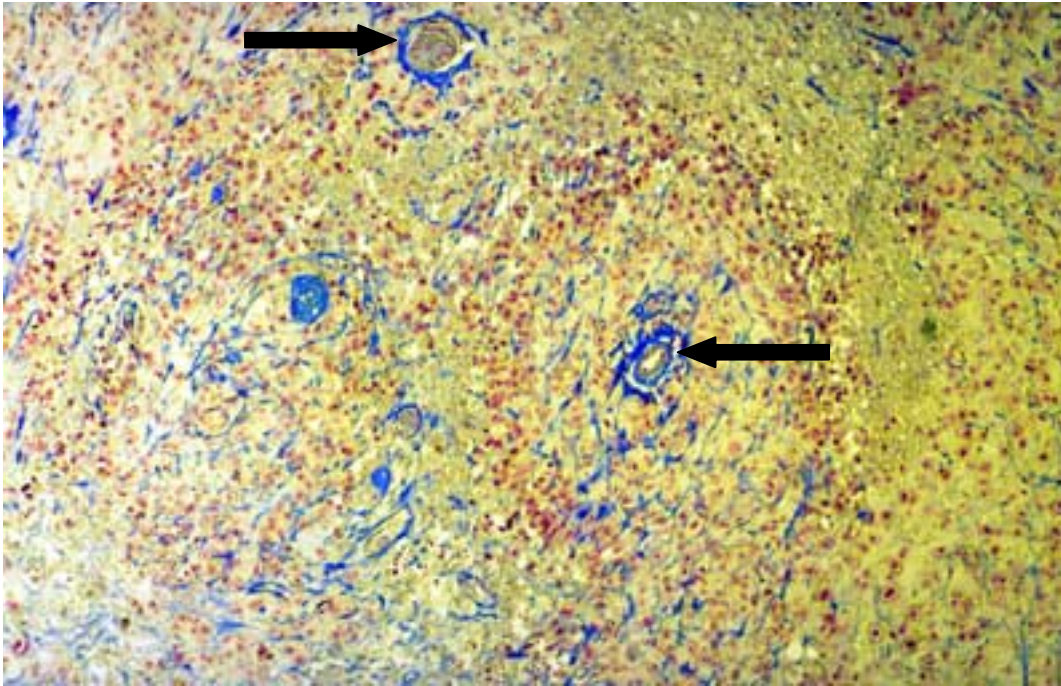


Abbildung 17: IFO. In einem überwiegend nekrotischen Bezirk finden sich nur vereinzelt intakte Tumorzellen. Außerdem sind Gefäße zu sehen (schwarze Pfeile). Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X120.

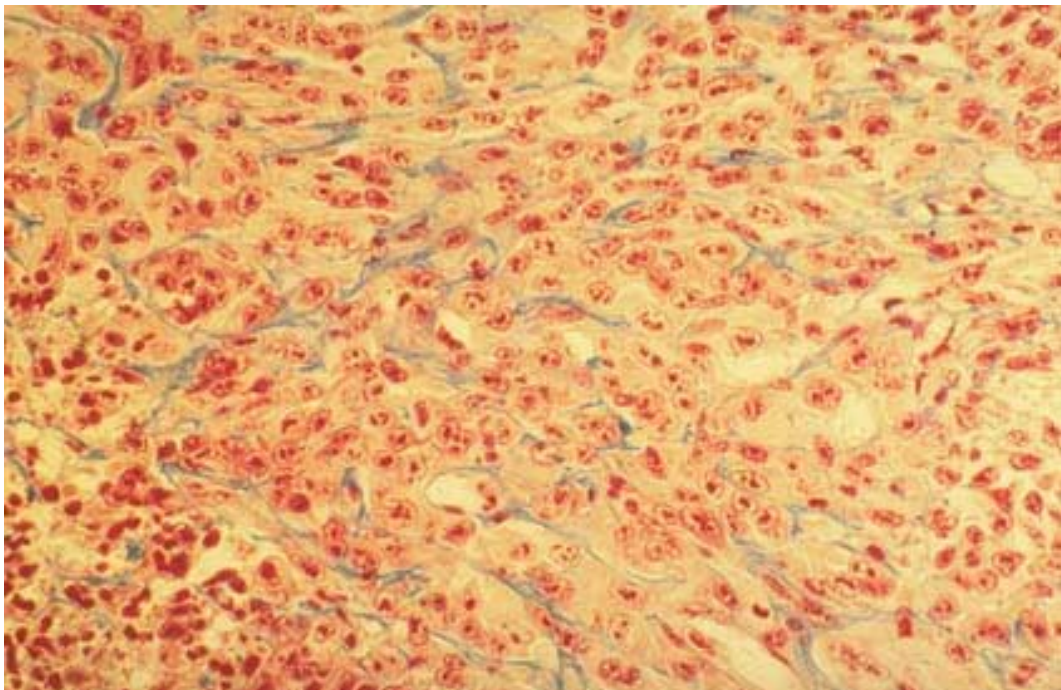


Abbildung 18: CYCLO. Aus dem epitheloiden Anteil eines Tumors. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X480.

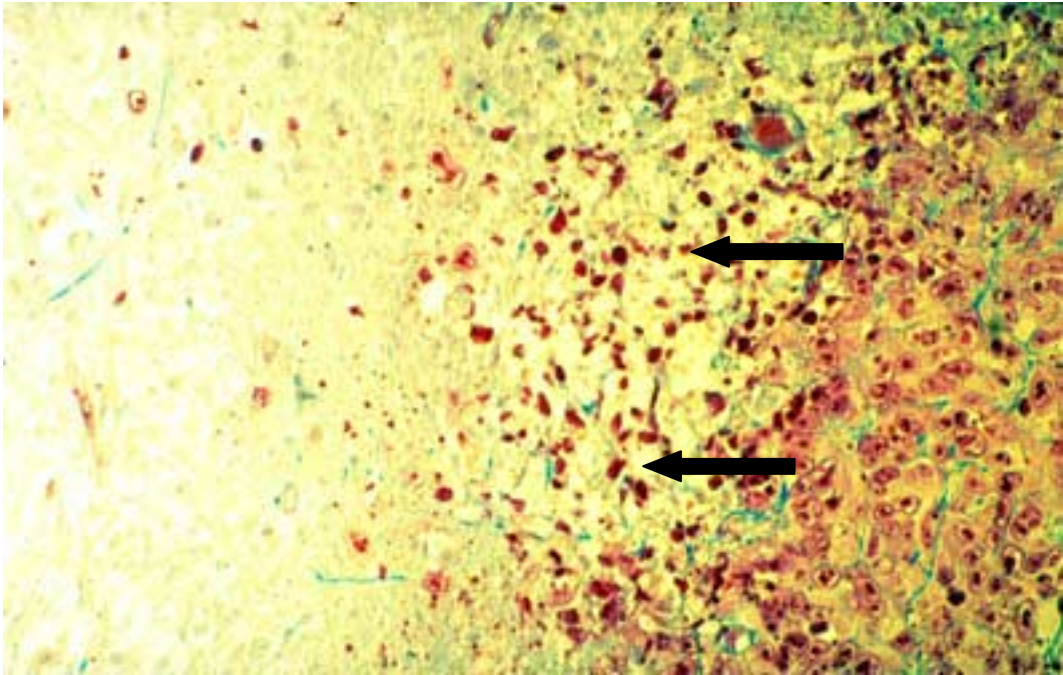


Abbildung 19: IFO + HT. Deutlich ist der Übergang (schwarze Pfeile) von intaktem Tumorgewebe zu einem nekrotischen Bezirk. Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X240.

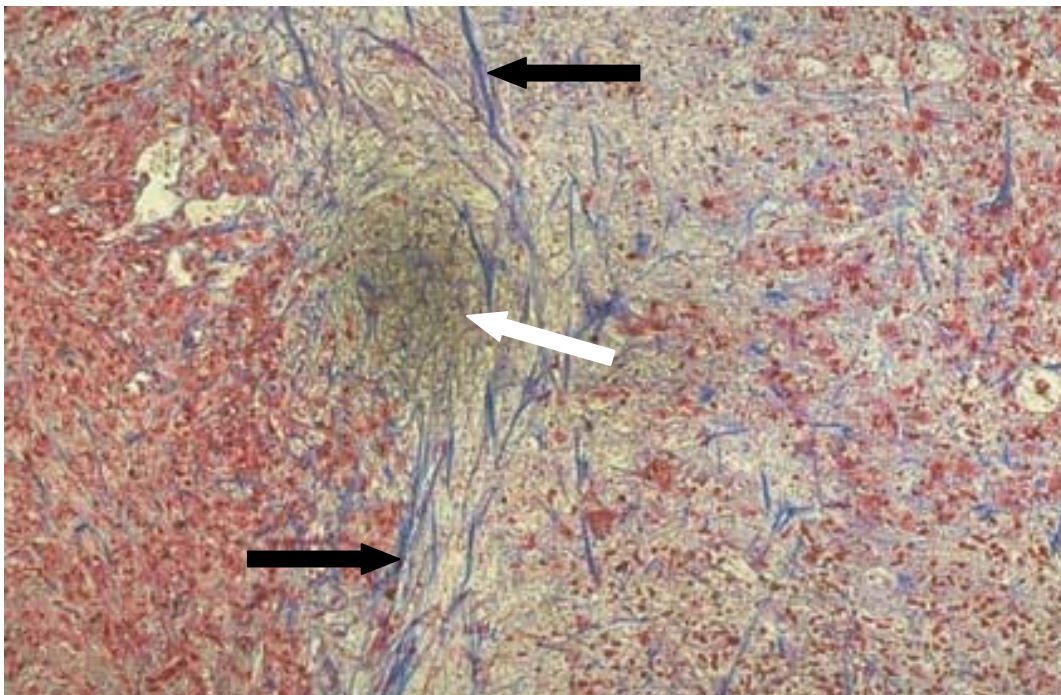


Abbildung 20: CYCLO + HT. Umgeben von bindegewebigen Faserzügen (schwarze Pfeile) sieht man eine verdichtete Nekrosezone (weißer Pfeil). Lichtmikroskopie, Färbung: Azan, Vergrößerung X120.

### 3.2.2 Immunhistochemie

Mit dieser Methode werden der Proliferationsmarker MIB-1 und apoptotische Zellen per TUNEL-Markierung immunhistochemisch nachgewiesen.

Die mediane Anzahl immunhistochemisch markierter Zellen pro  $\text{mm}^2$  wurde für jede Therapiegruppe aus jeweils sechs repräsentativen Paraffinschnitten pro Tier mittels computergestützter Auswertung ermittelt. In der IFO + HT – Gruppe stand aufgrund der **Komplettremissionen** nicht genügend Tumormaterial für eine statistische Auswertung zur Verfügung. Deshalb wurde der Effekt dieser Therapie in einer zusätzlichen Gruppe 24 h nach Therapiebeginn untersucht (IFO + HT 24).

Die computerassistierte Auswertung der beiden obengenannten Marker zeigt eine nicht parametrische Verteilung der Anzahl immunreaktiver Zellen. Aus diesem Grund wird die statistische Auswertung zur Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test vorgenommen. Die statistische Auswertung lässt keine signifikanten Aussagen über die relative Anzahl proliferierender bzw. apoptotischer Zellen pro Tumorfäche zwischen den Tumorguppen zu.

Die Aussagekraft dieser Untersuchung wird dadurch deutlich gemindert, dass die Nekroseareale klein und disseminiert, aber auch groß und flächenhaft auftreten. Es lässt sich nicht eindeutig beurteilen, ob die Nekrosen bereits vor der Therapie durch die mangelhafte Vaskularisation vorhanden waren oder ob sie erst durch die Therapie entstanden sind. Wie auch bei der Lichtmikroskopie lassen sich keine Aussagen über die einzelnen Therapiegruppen treffen.

Die Diagramme 9 und 10 zeigen die Mediane der Anzahl immunreaktiver Zellen pro  $\text{mm}^2$  Gewebe. Auf der X-Achse ist die Gruppenzugehörigkeit aufgetragen, auf der Y-Achse die mediane Anzahl immunreaktiver Zellen pro  $\text{mm}^2$  Tumorgewebe. Die eingetragenen Streuungswerte sind die Standardabweichungen.

**Anzahl proliferierender Zellen/mm<sup>2</sup> nach MIB-1-Markierung und  
Computer-gestützter Auswertung**

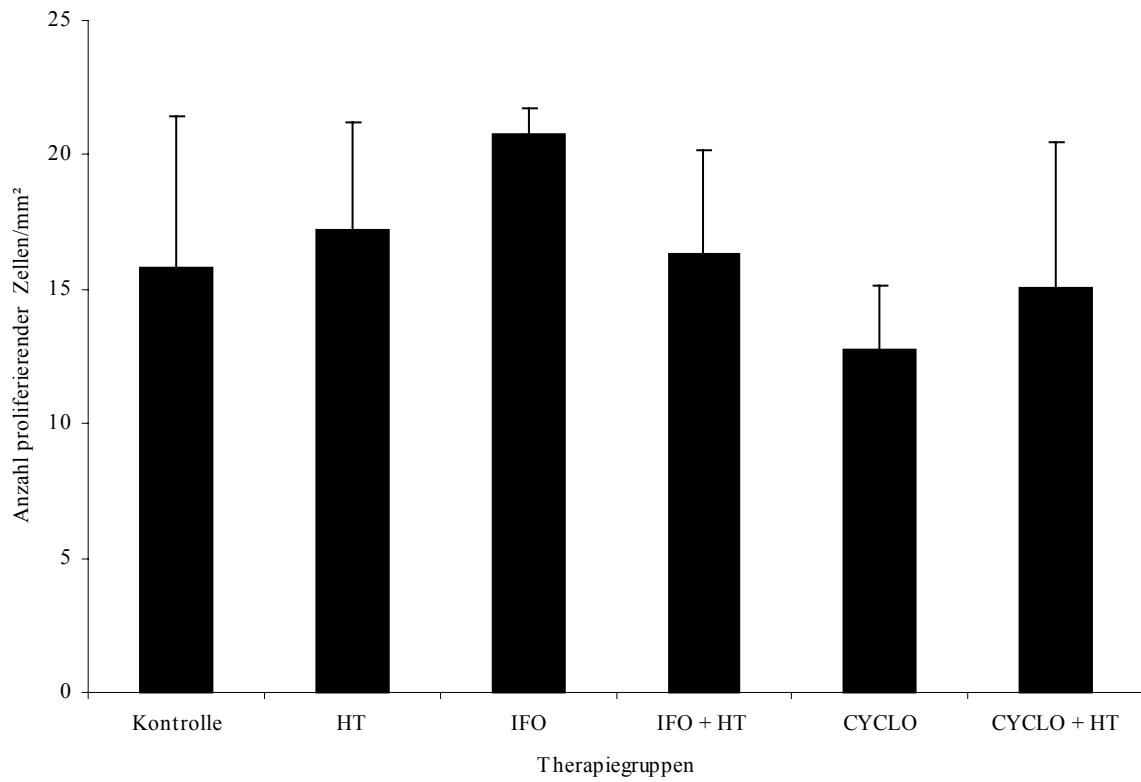


Diagramm 9: Es existieren **keine** statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen.

**Anzahl apoptotischer Zellen/mm<sup>2</sup> nach TUNEL-Markierung und Computergestützter Auswertung**

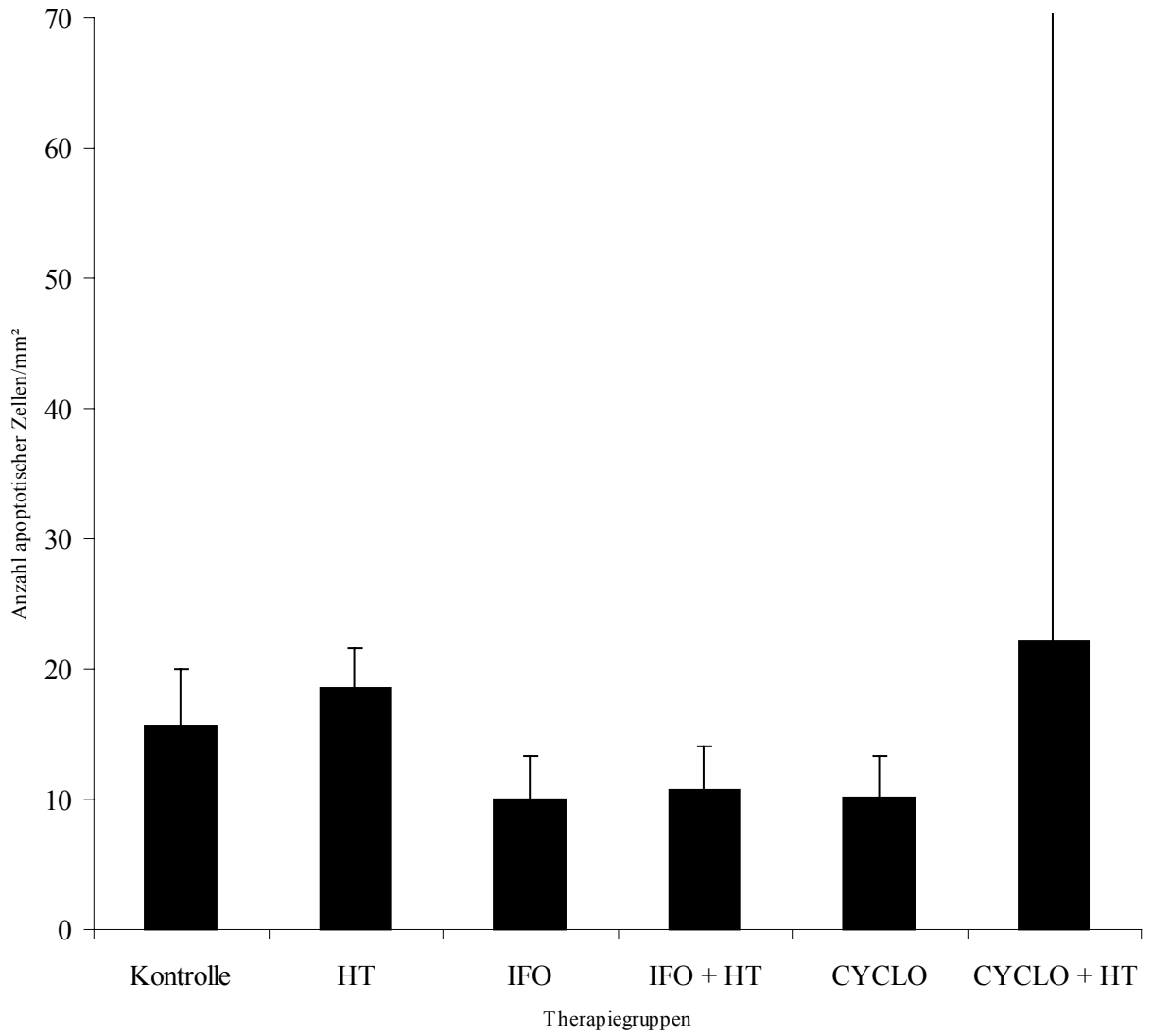


Diagramm 10: Es existieren **keine** signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen.

### 3.3 Transmissionselektronenmikroskopie (Abbildungen 21 bis 37)

Durch die ultrastrukturelle Untersuchung der Tumoren konnten die lichtmikroskopisch erhobenen Befunde bestätigt und ergänzt werden. Es finden sich epitheloide (Abb. 21, 22) und mesenchymale (Abb. 23) Tumorareale. Die epitheloiden Anteile zeigen große polygonale Zellen mit einer deutlich verschobenen Kern-Plasma-Relation zugunsten eines runden Kernes mit lockerem Chromatin und mindestens einem Nukleolus (Abb. 21, 22). Einige Zellen befinden sich in der Mitose (Abb. 22). Die meisten Zellen haben einen spärlichen Organellenbestand, d.h. wenige Mitochondrien und ein schwach ausgebildetes endoplasmatisches Retikulum (Abb. 21). Vereinzelt finden sich indessen auch Tumorzellen mit mehreren Zellkernen (Abb. 22) und einem ausgeprägten Organellenbestand (Abb. 24). Diese Zellen enthalten Filamentbündel (Abb. 24), und zum Teil ragen verzweigte Mikrovilli in die extrazelluläre Matrix (Abb. 25). In den Tumorzellen des mesenchymalen Anteils sind spindelförmig ausgezogene Zellen in ein faseriges Netzwerk multilamellärer Basalmembranen eingebettet (Abb. 23). Wie bereits in der Lichtmikroskopie festgestellt, sind die Tumoren durch eine karge Vaskularisierung charakterisiert. Größere Gefäße sind eine Rarität, während kleinere oft sinusoidal erweitert sind (Abb. 26). Um die größeren Gefäße sind Inseln intakten Tumorgewebes gelegen (siehe auch Kap. 3.2: Lichtmikroskopie). Weiter peripher handelt es sich nur noch um Nekroseareale. Mit der Transmissionselektronenmikroskopie lassen sich mit noch größerer Präzision die unregelmäßige Gewebestruktur mit den vielzähligen Nekrosearealen auch in Kontrolltumoren erkennen. Die Zellen in den geschädigten Arealen gehen sowohl apoptotisch (Abb. 27) als auch nekrotisch zugrunde (Abb. 28, 29, 30, 31). Bereits die Übersicht ermöglicht ohne Quantifizierung die Aussage, dass der größte Teil der Zellen nekrotisch wird. Durch Apoptose zugrunde gegangene Zellen werden häufig von den benachbarten Zellen phagozytiert (Abb. 27). In den Übergangszonen von intaktem Tumorgewebe zu den Nekrosearealen sind alle Stadien der Koagulationsnekrose zu erkennen (Abb. 28). Hier liegen Zellen mit geschwollenen Mitochondrien und beginnender Chromatinkondensation (Abb. 28), meistens in der Nähe von stärker geschädigten Zellen, in denen sowohl Zellkern als auch Organellen einer Lyse anheimfallen (Abb. 28). Zellkerne und Zytoplasma anderer Zellen sind nur noch als Fragmente erhalten (Abb. 29). Neben abgekapselten Nekrosen (Abb. 30) lassen sich auch Bezirke flächenhafter Nekrosezonen mit kaum mehr erkennbaren Zellschatten ausmachen (Abb. 31).

Tatsächlich lassen sich auch ultrastrukturell nur schwer darstellbare Unterschiede zwischen den einzelnen Therapiegruppen ausmachen. Wie bereits lichtmikroskopisch festgestellt, sind auch ultrastrukturell die durch Hyperthermie merklich vergrößerten Interzellularräume und damit das interstitielle Ödem nachweisbar, wodurch die mikrovillären Zellfortsätze deutlich hervortreten (Abb. 32). Das interzelluläre Ödem geht zudem mit einem intrazellulärem Ödem einher (Abb. 32).

Soweit qualitativ beurteilbar, sind die mit einer Kombination aus Ifosfamid und Hyperthermie behandelte Tumoren am stärksten geschädigt (Abb. 34, 35). In allen

therapierten Tumoren finden sich neben stark geschädigten Arealen (Abb. 33, 37) auch Bezirke, in denen die Tumorzellen nur leicht geschädigt sind (Abb. 33, 36). Diese Zellen weisen lediglich eine leichte Schwellung der Mitochondrien und eine geringe degenerative Verfettung auf.

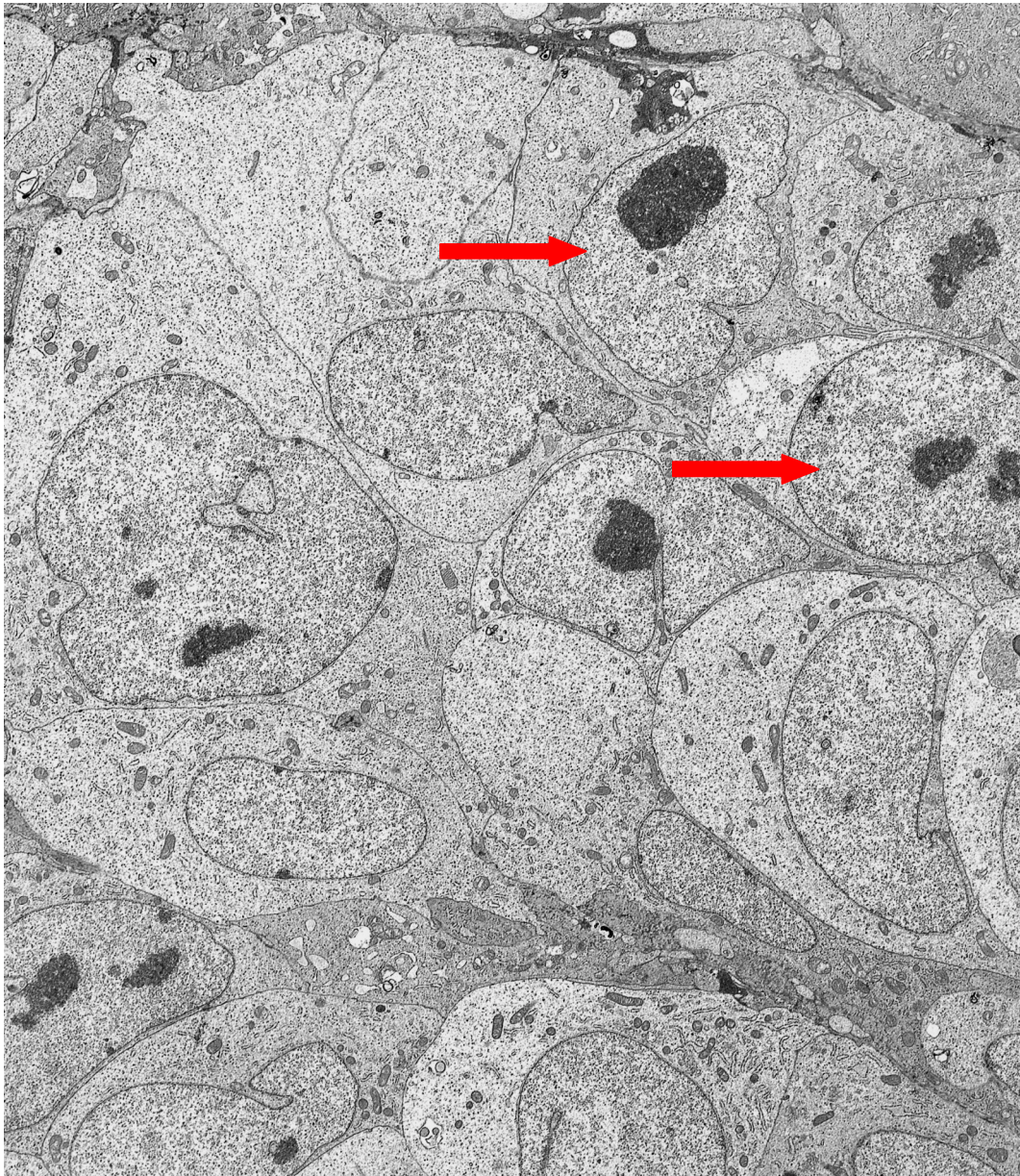


Abbildung 21: KONTROLLE. Areal epitheloider Zellen. Diese Abbildung zeigt deutlich die verschobene Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns. Die Zellkerne (rote Pfeile) enthalten meistens locker verteiltes Chromatin mit mehreren Nukleoli. Der Organellenbesatz der meisten Tumorzellen ist eher spärlich. TEM, Vergrößerung X3400.

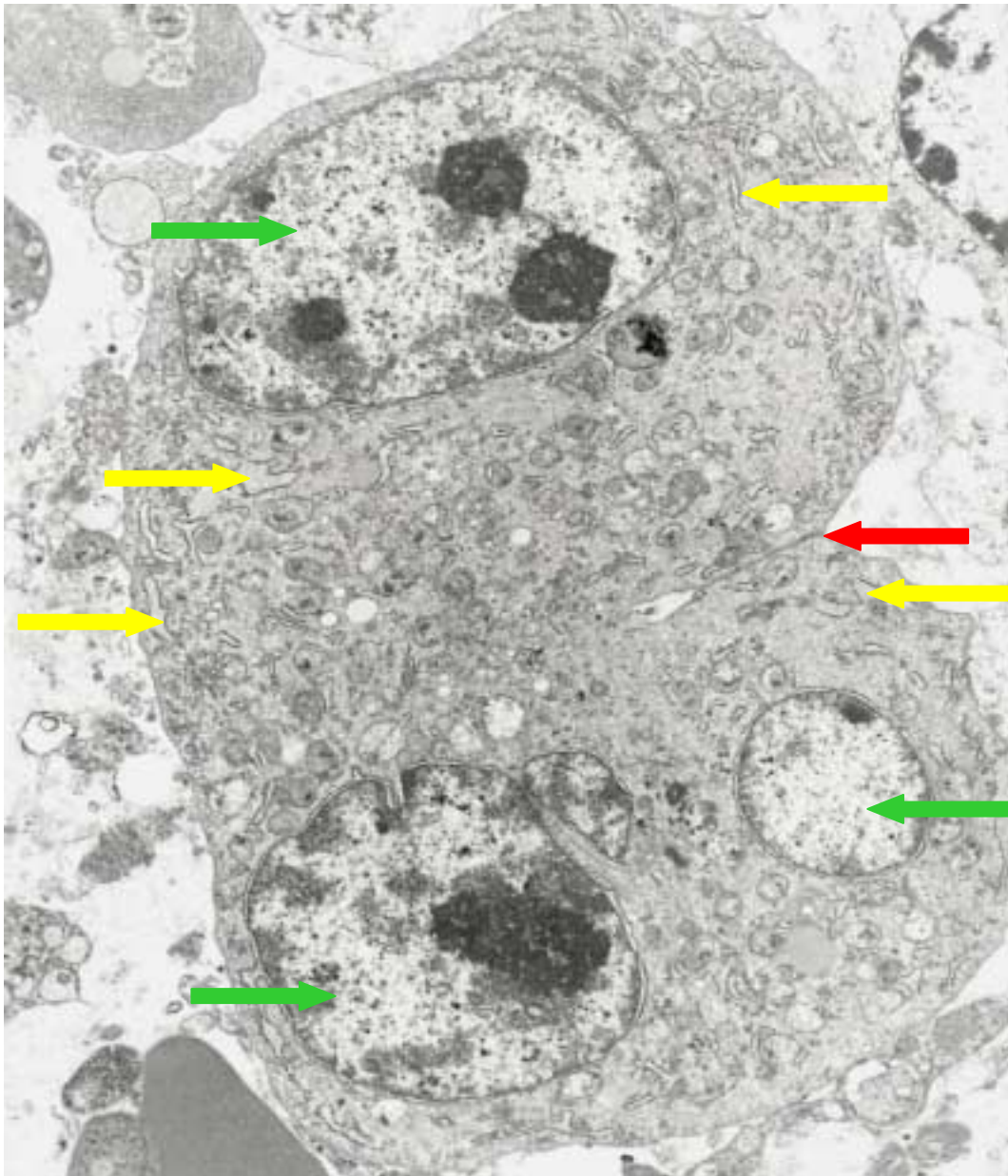


Abbildung 22: KONTROLLE. Mehrkernige epitheloide Tumorzelle mit mindestens drei Zellkernen (grüne Pfeile). Eine unvollständige Einschnürung zur Unterteilung der Zelle in zwei Tochterzellen ist sichtbar (roter Pfeil). Möglicherweise hat nach der Mitose eine unvollständige Trennung der Tochterzellen stattgefunden. Im Gegensatz zu den meisten Tumorzellen besitzt diese Zelle zahlreiche Mitochondrien, zum Teil aufgeweitete Zisternen des endoplasmatischen Retikulums (gelbe Pfeile) und Vakuolen. TEM, Vergrößerung X8700.

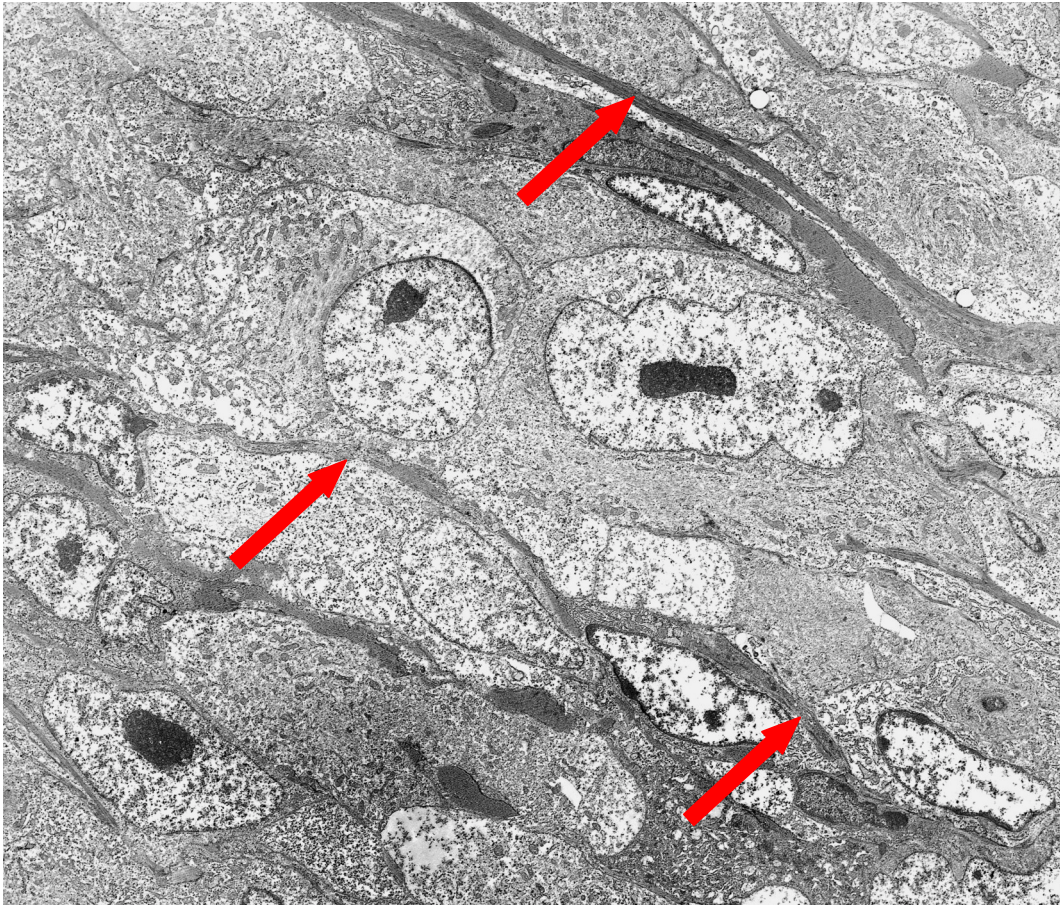


Abbildung 23: KONTROLLE. Areal vorwiegend mesenchymaler Tumorzellen, die in eine faserige Extrazellulärmatrix eingebettet sind, die elektronenmikroskopisch einer multilamellären Basalmembran entspricht (rote Pfeile). TEM, Vergrößerung X2300.

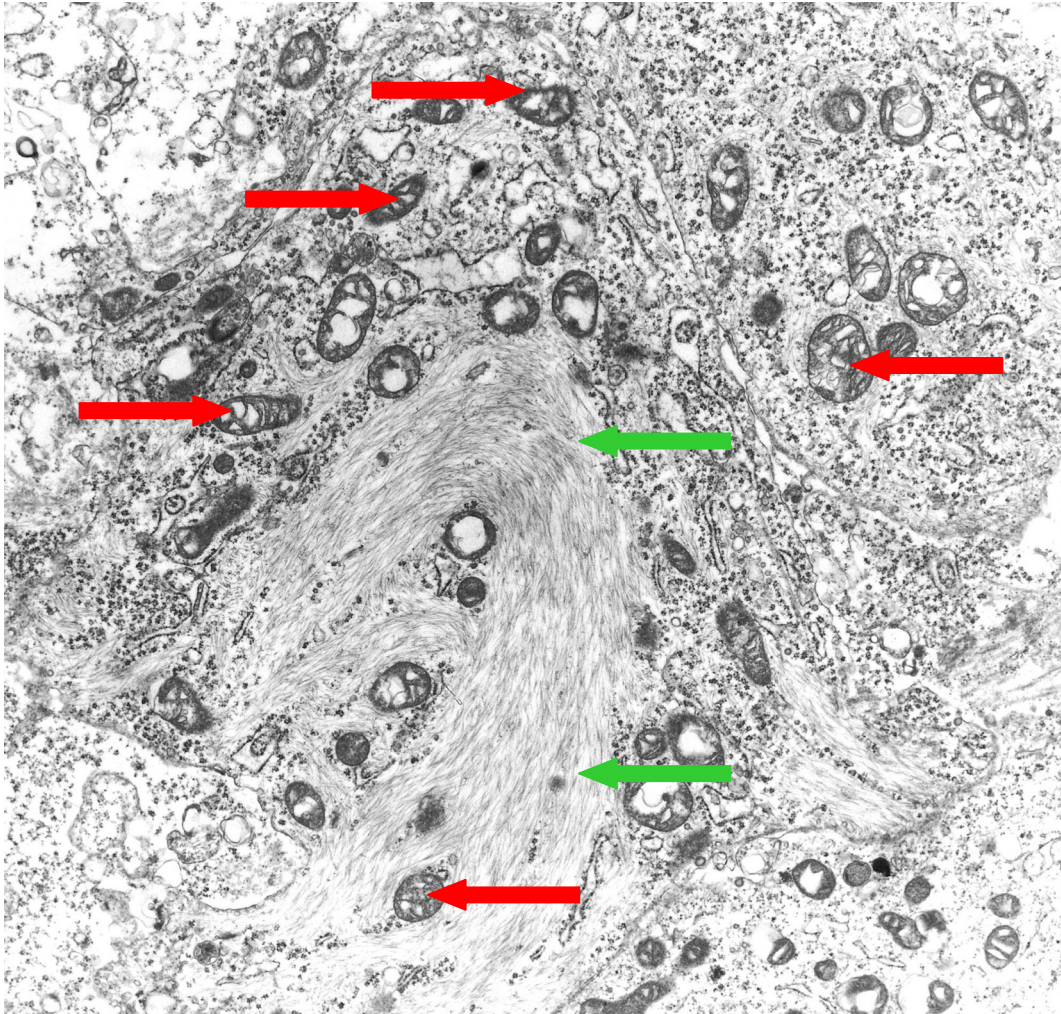


Abbildung 24: KONTROLLE. Ausschnitt aus einer Tumorzelle mit zahlreichen intrazellulären Filamenten (grüne Pfeile), die als diagnostisches Kriterium zur Abgrenzung des Pleuramesothelioms von anderen Tumorentitäten dienen können. Diese Zelle besitzt viele, allerdings geschädigte Mitochondrien (rote Pfeile). TEM, Vergrößerung X10200.

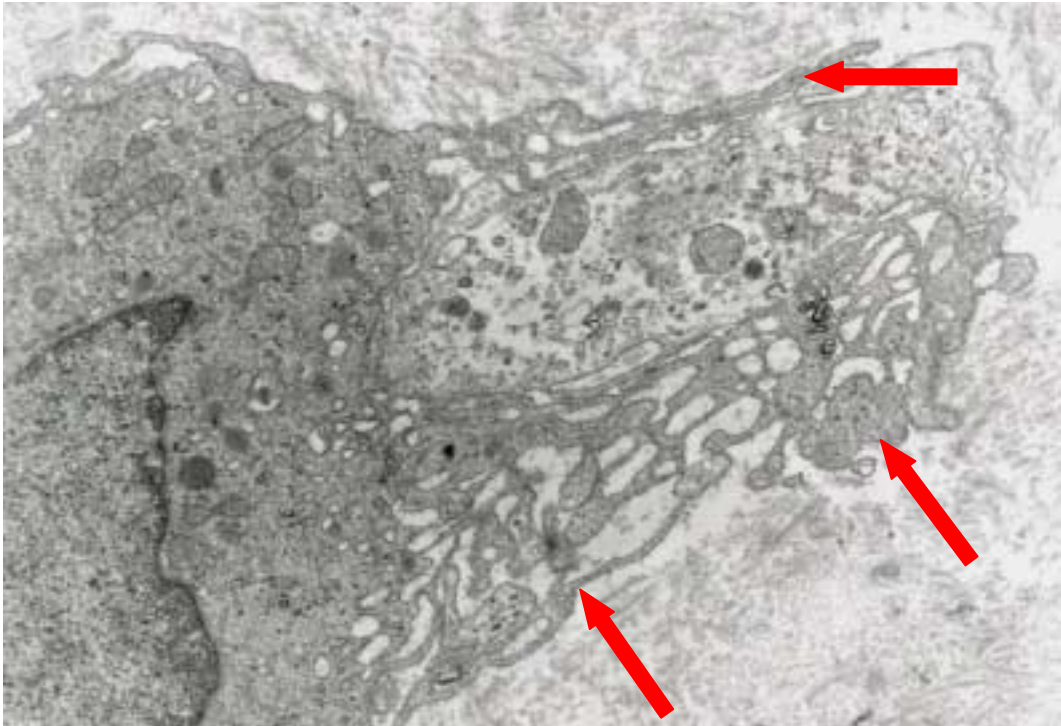


Abbildung 25: KONTROLLE. Mikrovillibesatz einer Tumorzelle. Die Existenz langer, auch verzweigter Mikrovilli ist ein differentialdiagnostisches Kriterium zur Sicherung der Diagnose Pleuramesotheliom. Zahlreiche Zellen wie diese besitzen besonders lange, mehrfach verzweigte und untereinander anastomosierende Fortsätze (rote Pfeile). TEM, Vergrößerung X14700.

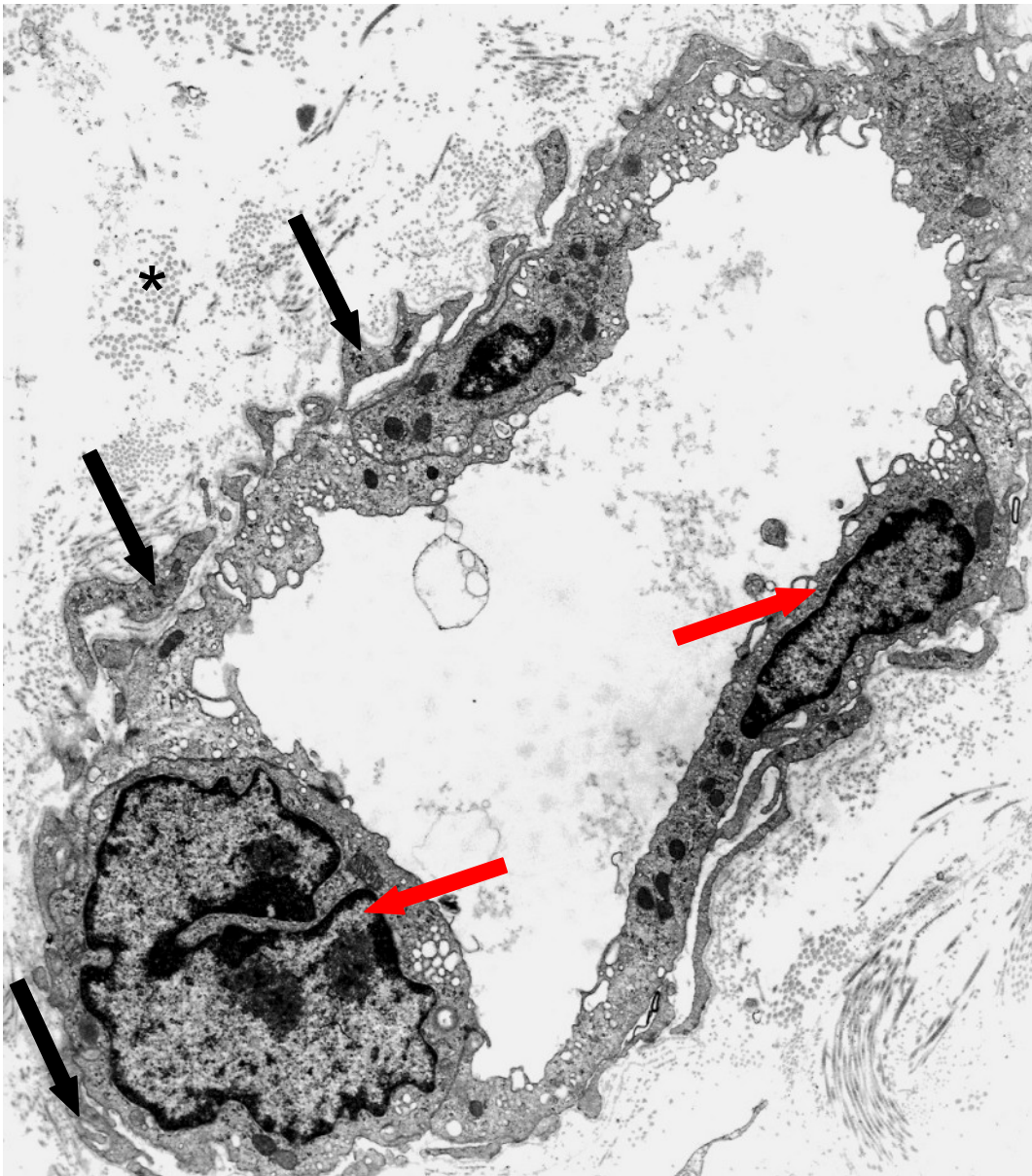


Abbildung 26: KONTROLLE. Sinusoidal erweiterte Kapillare. Endothelzellen (rote Pfeile) mit starker zytoplasmatischer Vesikelbildung. Perizytenfortsätze mit eigener Basallamina (schwarze Pfeile). Bei \* kollagene Fibrillenbündel. TEM, Vergrößerung X8600.

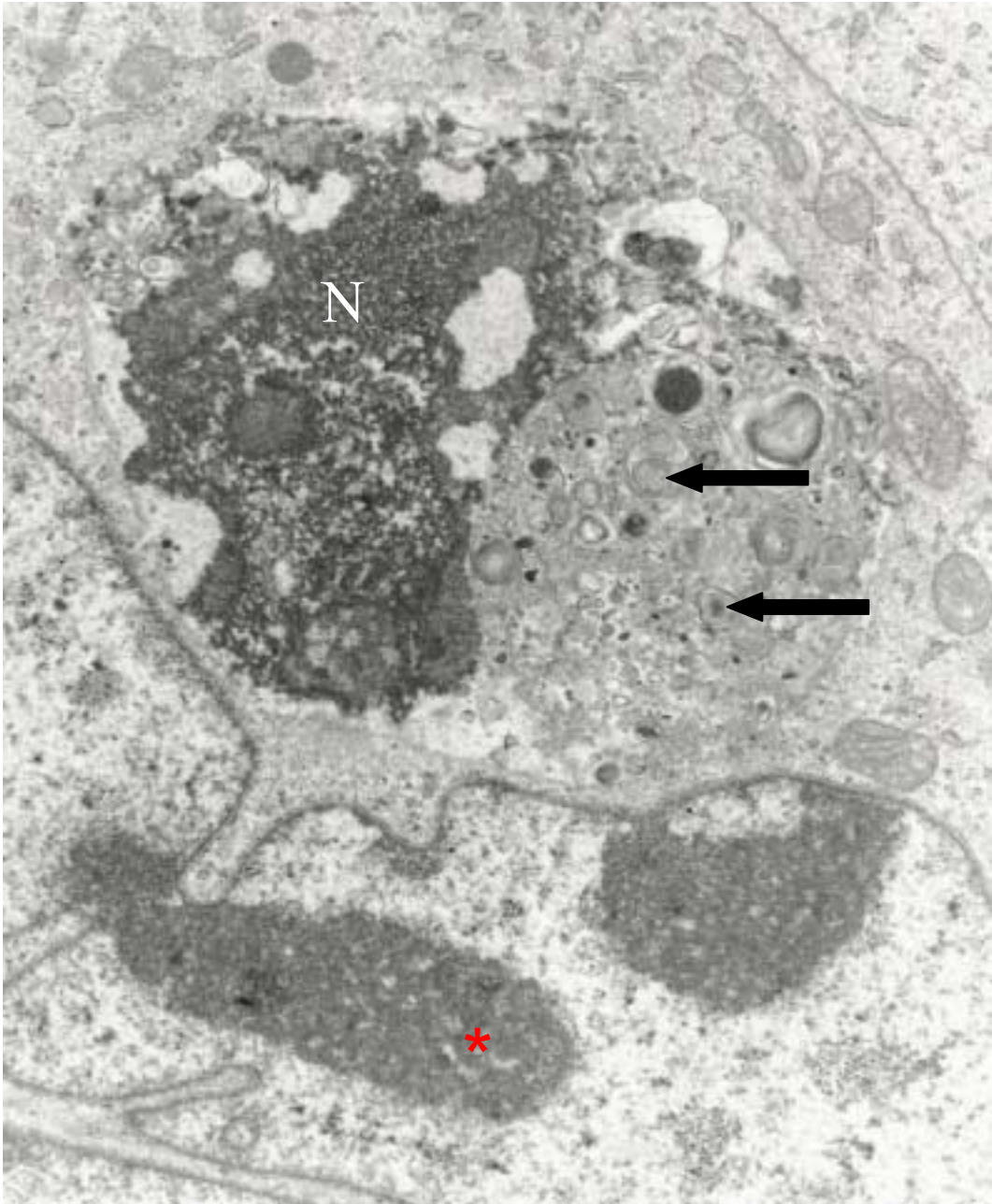


Abbildung 27: KONTROLLE. Phagozytierter apoptotischer Restkörper. Bei stärkerer Vergrößerung kann man die Reste des Zellkerns (N) und der Zellorganellen (schwarze Pfeile) erkennen. Zellkern der phagozytierenden Zelle (roter Stern). TEM, Vergrößerung X16400.

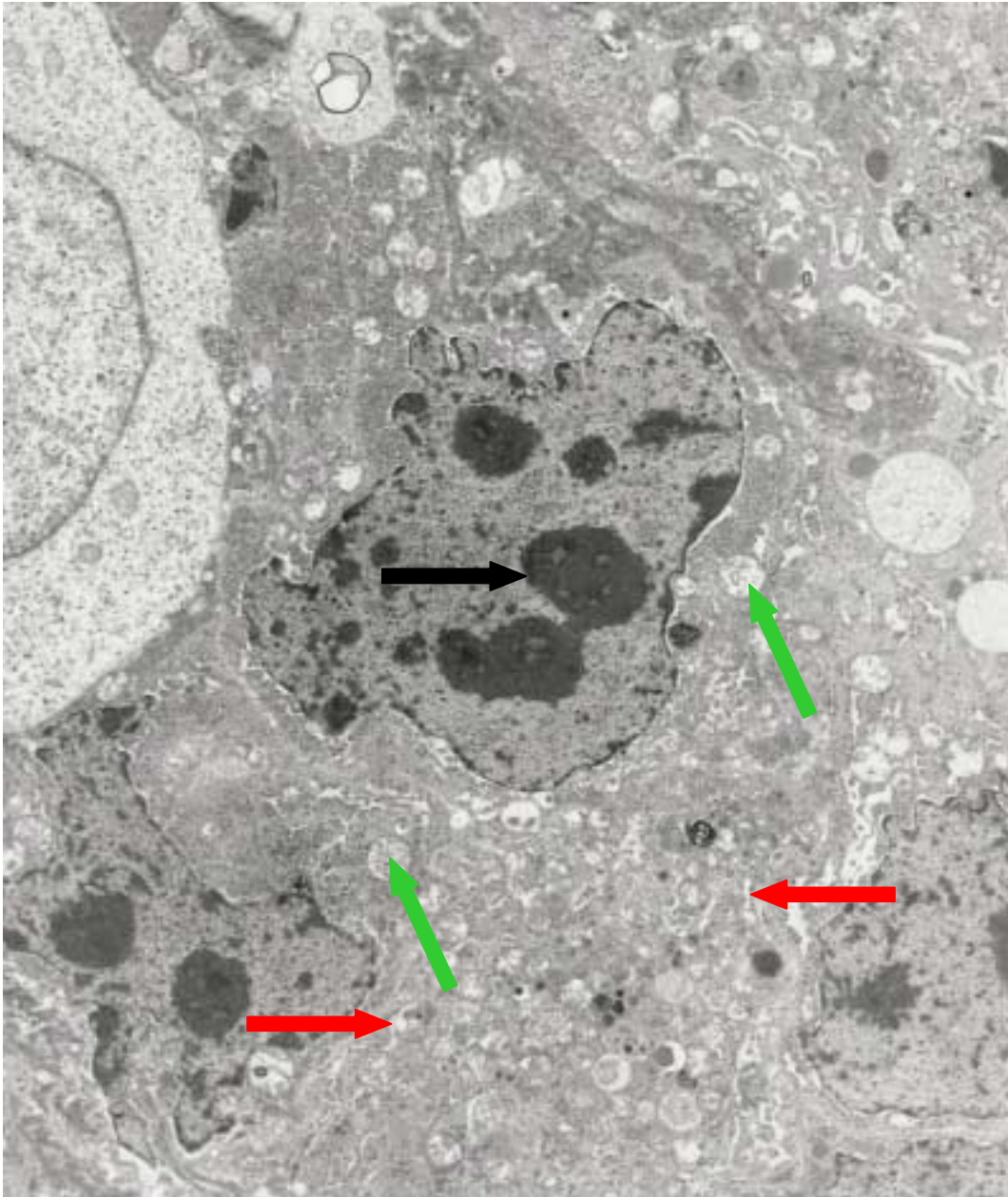


Abbildung 28: KONTROLLE. Beginnende Nekrose einer Tumorzelle. Zu Beginn des nekrotischen Zelluntergangs kondensiert das sonst lockere Chromatin im Zellkern (schwarzer Pfeil). Im Gegensatz zur Apoptose, bei der auch eine kernmembranständige Chromatinkondensation auftreten kann, zeigt diese Zelle nekrosotypische degenerative Zellveränderungen: Auflösung der Kern- und Zellmembran (rote Pfeile) und Schwellung der Mitochondrien (grüne Pfeile). In den Randgebieten dieser Abbildung sind Zellen in unterschiedlichen Nekrotestadien zu erkennen. TEM, Vergrößerung X5700.

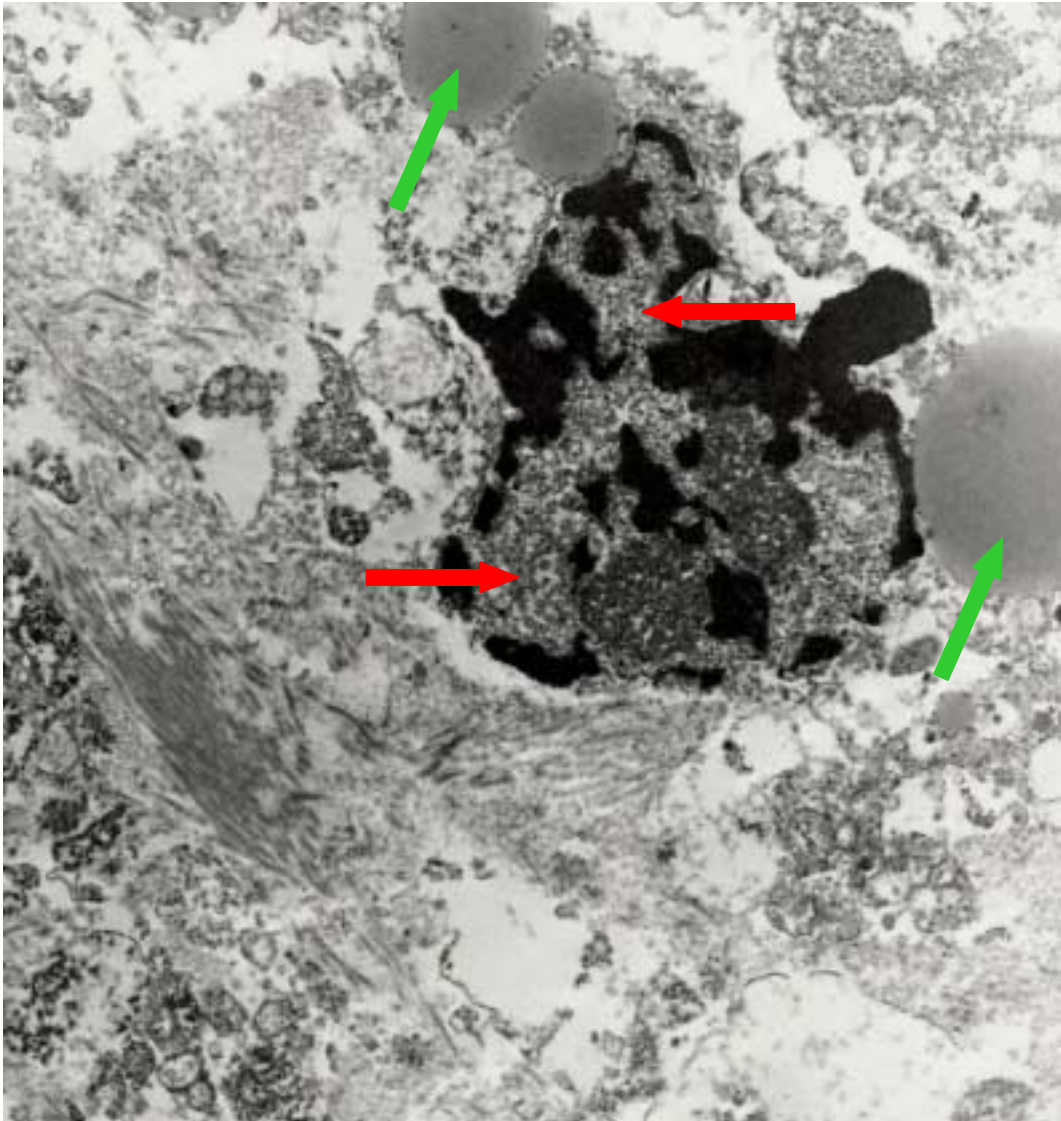


Abbildung 29: KONTROLLE. Spätes Nekrotestadium einer Tumorzelle. Die strukturelle Integrität der Zelle ist weitgehend aufgehoben. Der Zellkern ist nur noch als Schatten zu erkennen (rote Pfeile), die Zellgrenzen sind aufgehoben. Fetttropfen (grüne Pfeile). TEM, Vergrößerung X12300.

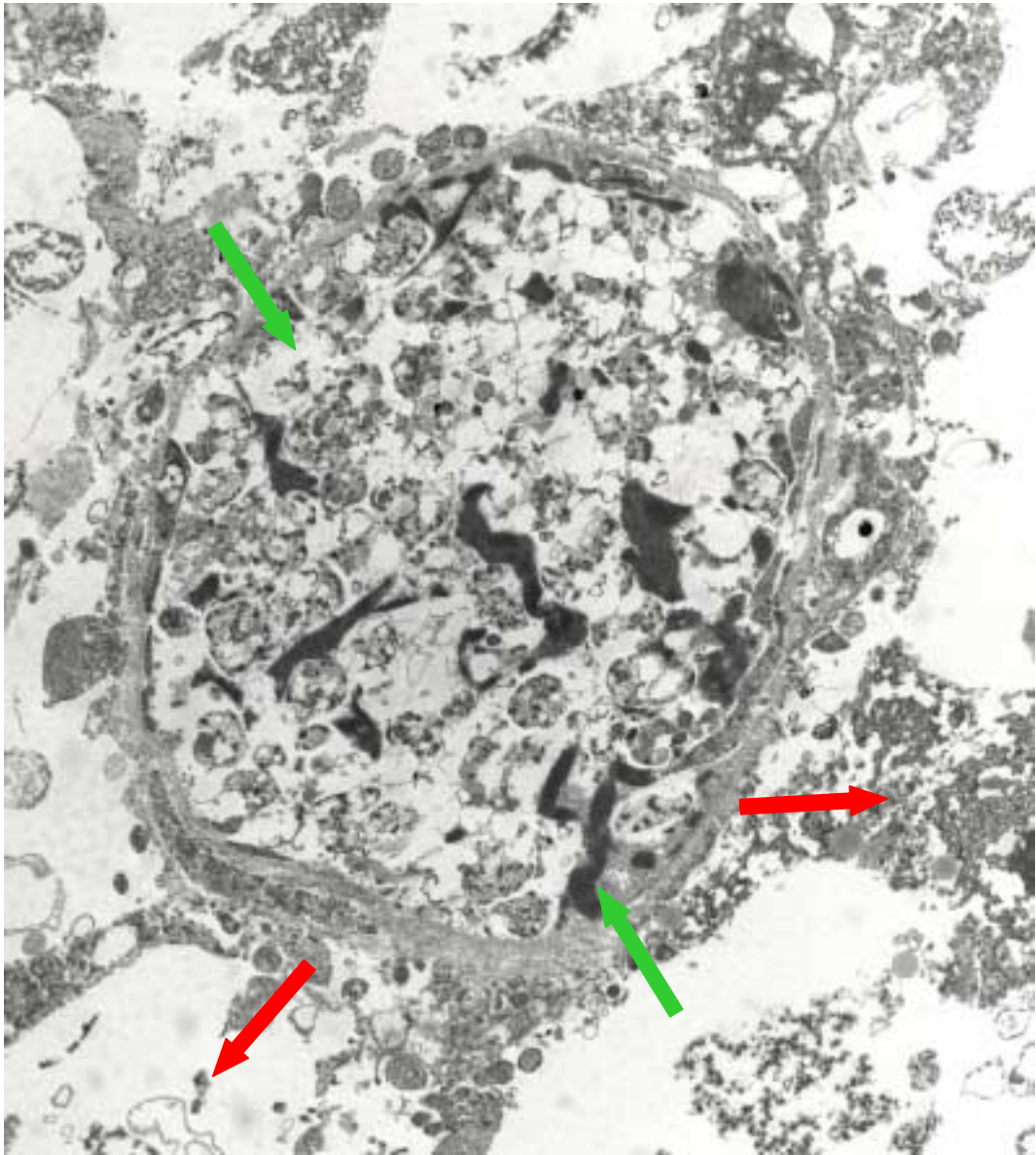


Abbildung 30: KONTROLLE. Abgekapseltes Nekroseareal. Neben diffusen, konfluierenden Nekrosearealen (rote Pfeile) entstehen auch umschriebene, abgekapselte Nekroseareale (grüne Pfeile). TEM, Vergrößerung X5900.

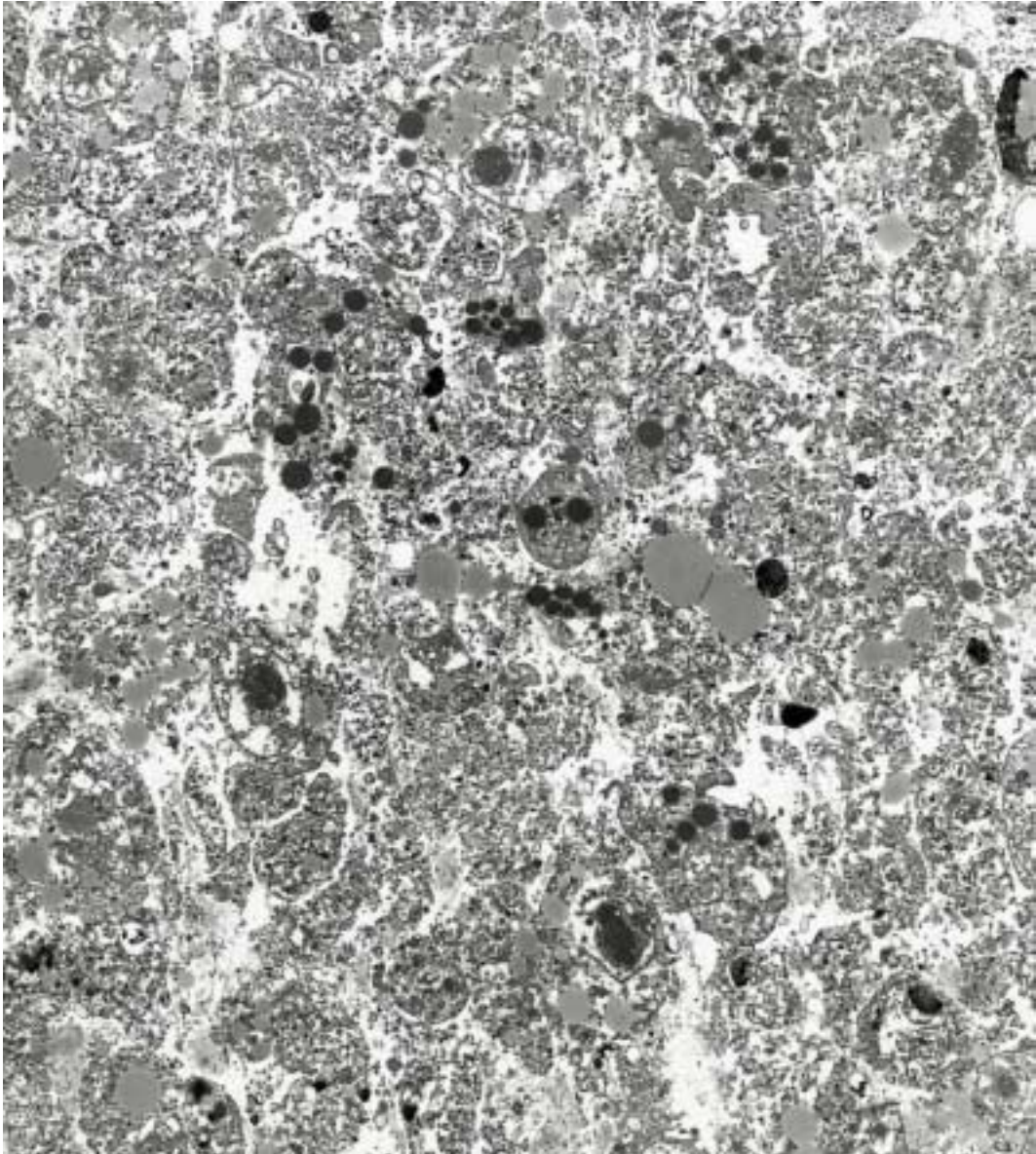


Abbildung 31: KONTROLLE. Diffuses Nekroseareal. Innerhalb dieser oft sehr großflächigen und verzweigten Gebiete lassen sich die Reste der Zellen kaum noch identifizieren, Zellgrenzen sind aufgehoben, und Kernschatten nur noch zu erahnen. TEM, Vergrößerung X2700.

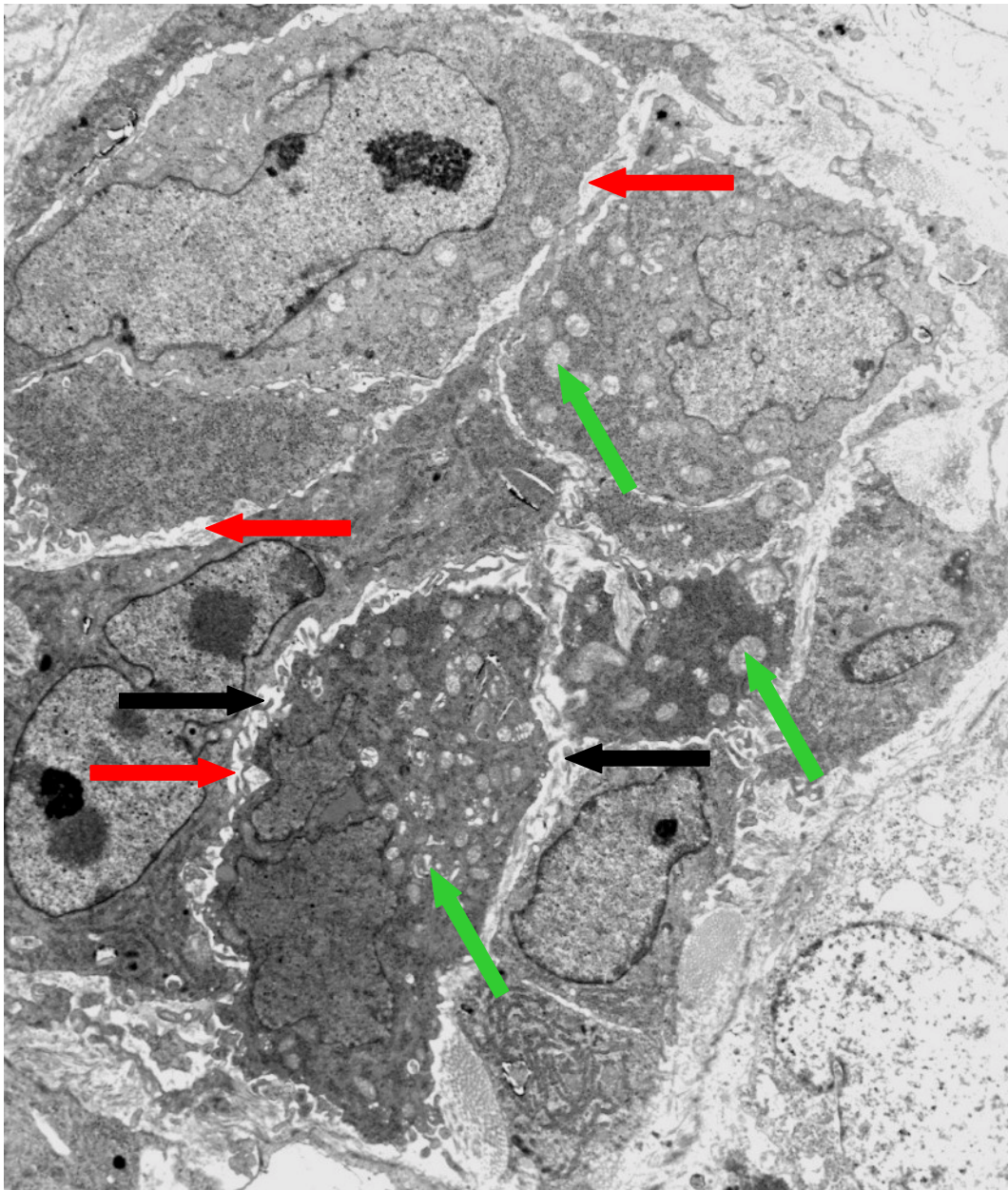


Abbildung 32: HT. Eine bis wenige Stunden nach der Hyperthermie bildet sich ein interstitielles Ödem aus. Die Interzellularräume vergrößern sich (rote Pfeile), so dass die dort verborgenen Mikrovilli (schwarze Pfeile) zum Vorschein kommen. Einige Tumorzellen zeigen Veränderungen im Sinne einer Mitochondrienschwellung (grüne Pfeile), andere Zellen sind unverändert. TEM, Vergrößerung X5400.

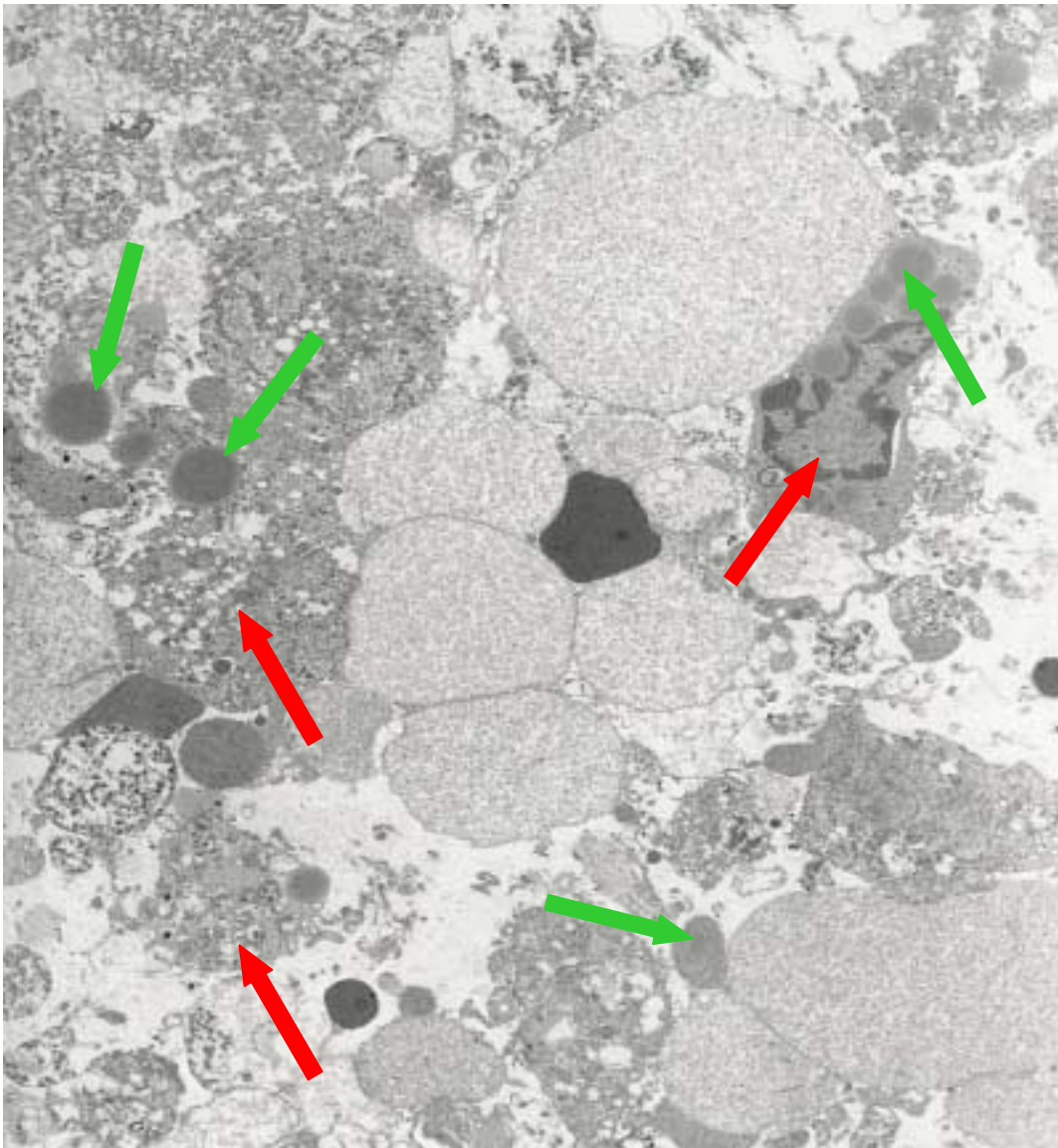


Abbildung 33: IFO. Die Abbildung zeigt zerstörte Zellen in unterschiedlichen Nekrotestadien (rote Pfeile) sowie Zeichen einer degenerativen Verfettung (grüne Pfeile). TEM, Vergrößerung X5700.

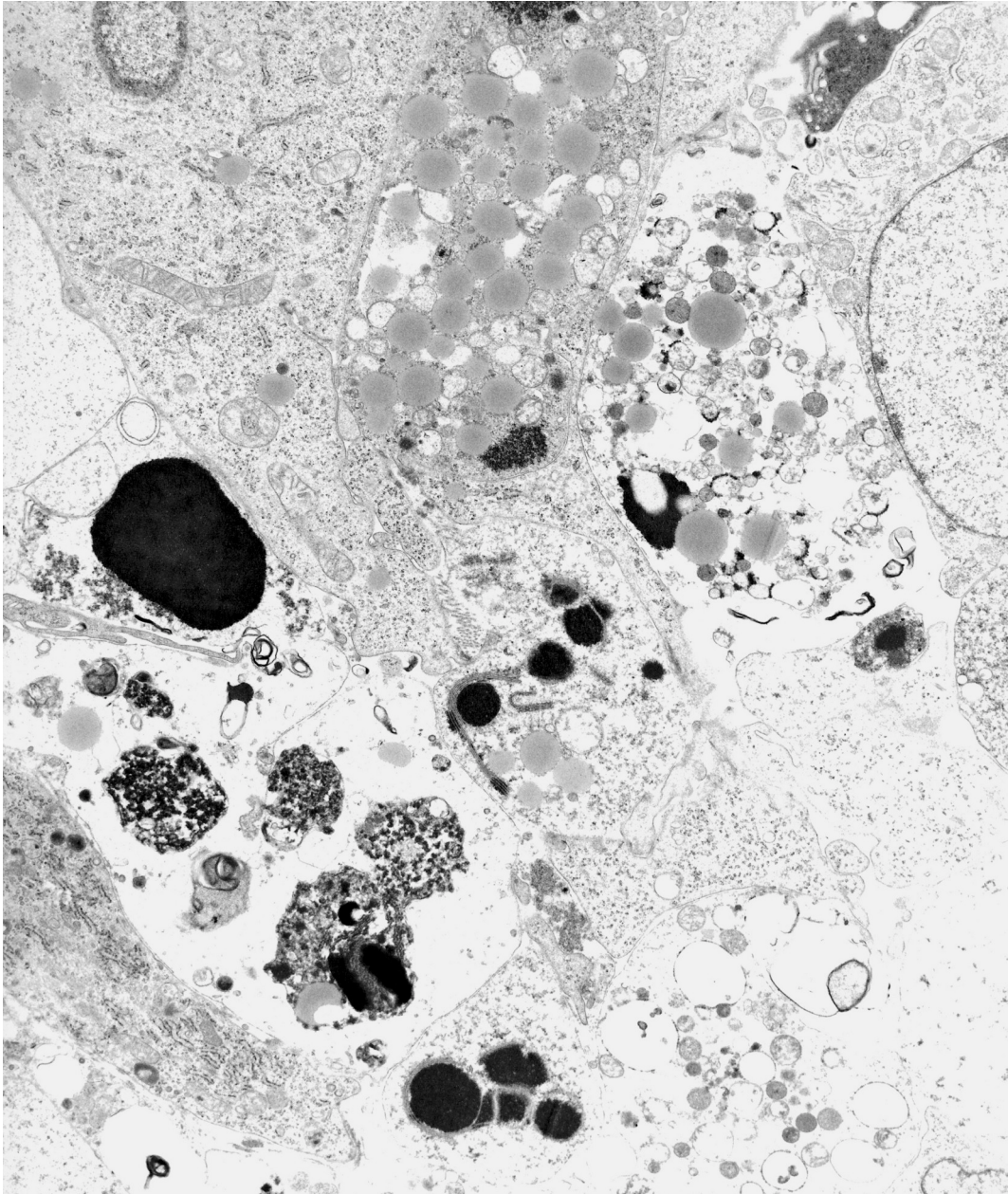


Abbildung 34: IFO + HT. Ausgedehntes, stark zerstörtes Tumorareal. Soweit transmissions-elektronenmikroskopisch beurteilbar, sind die durch die kombinierte Thermochemotherapie mit IFO + HT ausgelösten Schäden fulminanter ausgeprägt als in den anderen Gruppen. TEM, Vergrößerung X7200.

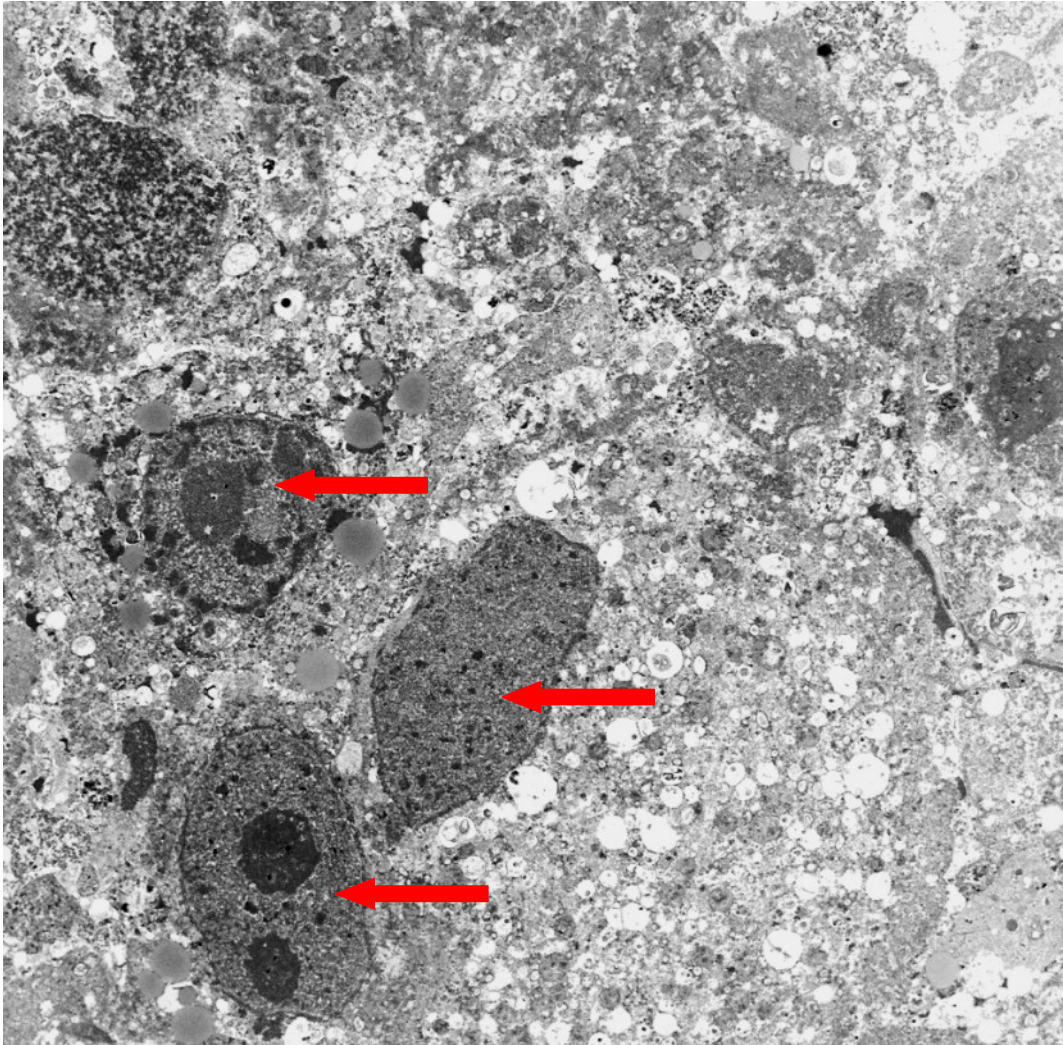


Abbildung 35: IFO + HT. Diffuse Nekrose. Außer drei noch als Schatten erkennbaren Tumorzellkernen (rote Pfeile) sind die Zellen vollständig aufgelöst. Weder Zellgrenzen noch Zellorganellen sind zu erkennen. TEM, Vergrößerung X5500.

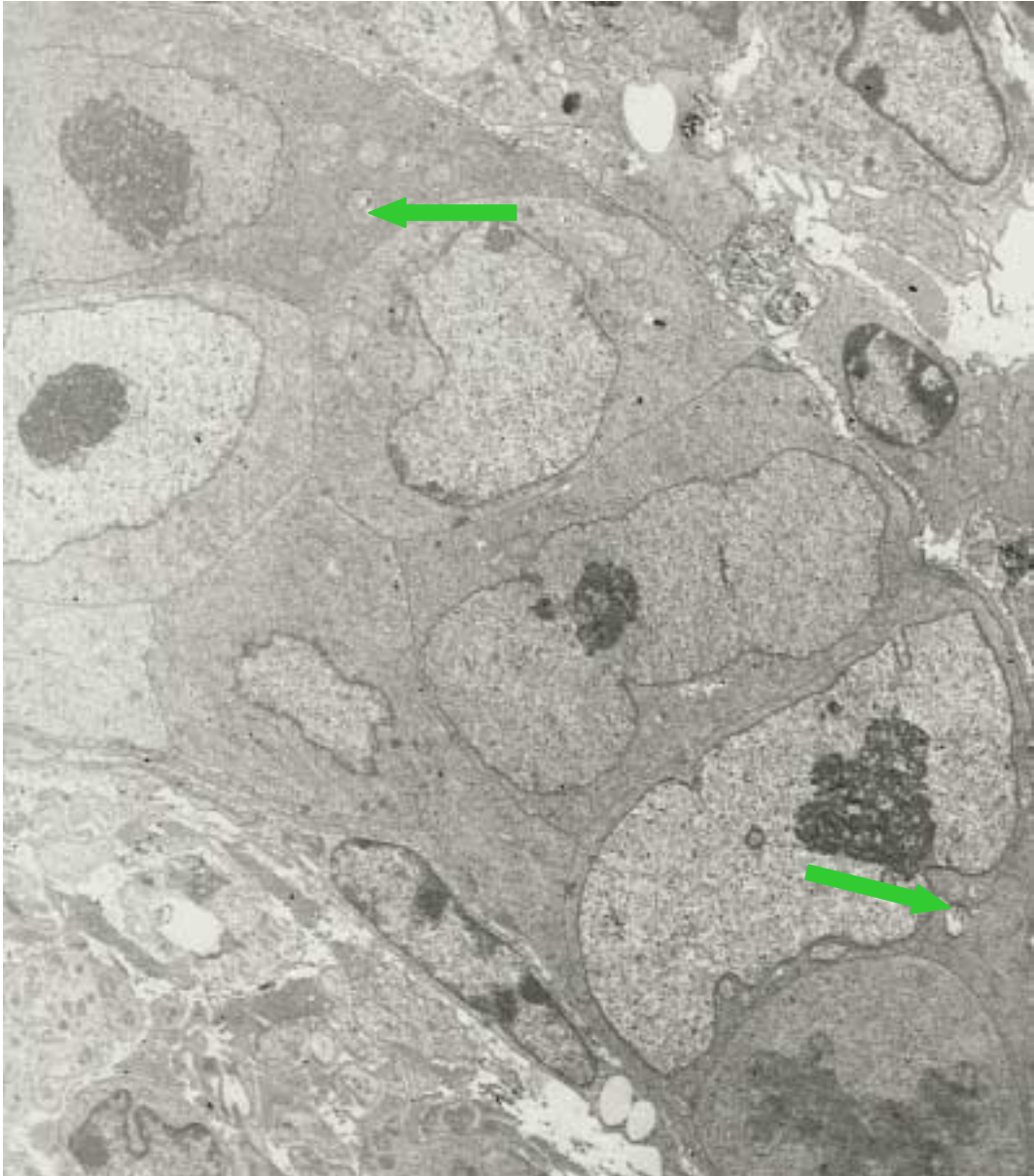


Abbildung 36: CYCLO. Intaktes Tumorzellareal nach Chemotherapie. Es zeigt sich allenfalls eine geringfügige Mitochondrienschwellung (grüne Pfeile). TEM, Vergrößerung X3400.

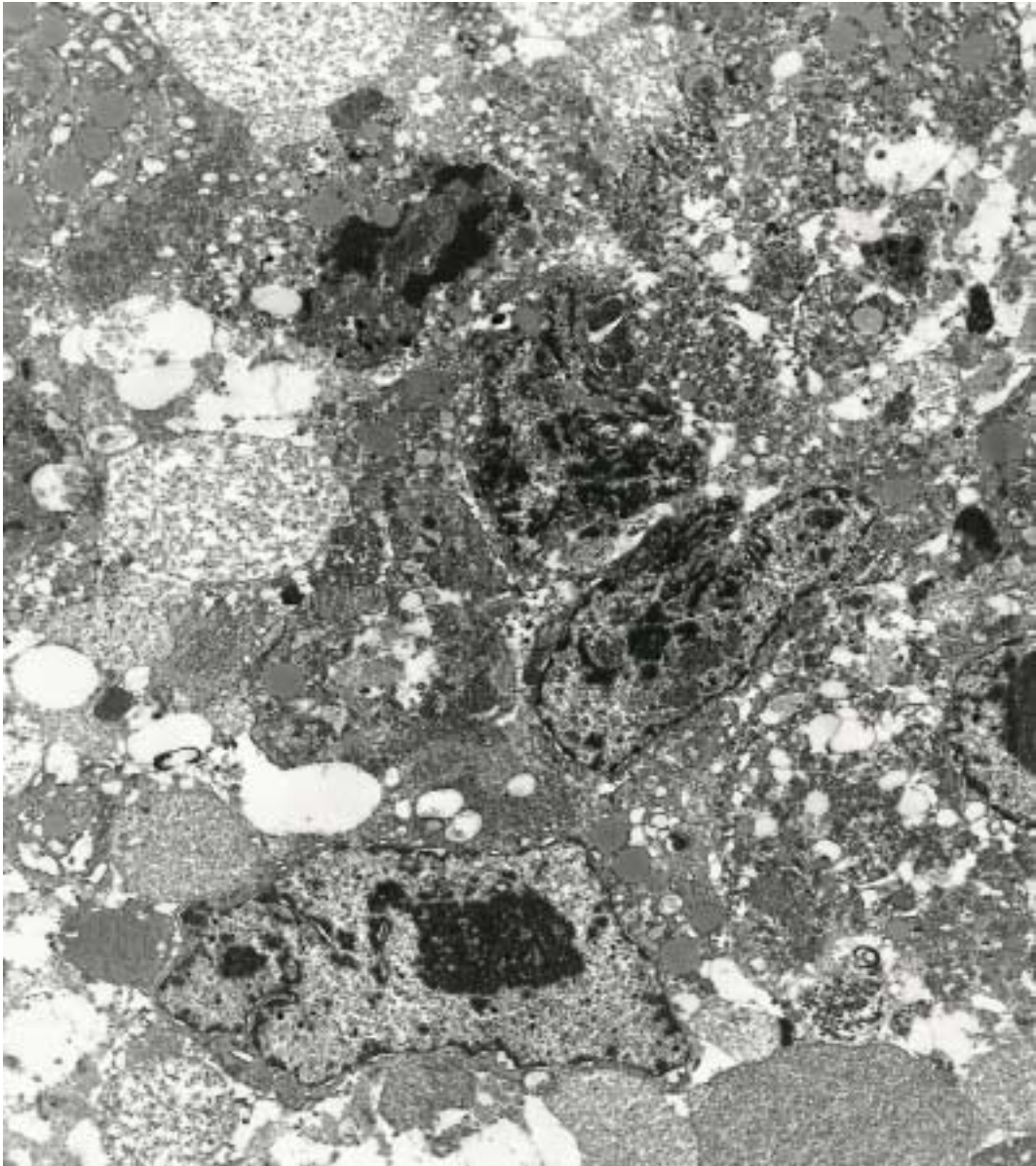


Abbildung 37: CYCLO + HT. Ausschnitt aus einem stark geschädigten Tumorgebiet dieser Therapiegruppe. TEM, Vergrößerung X5700.

### 3.4 Intratumorale pO<sub>2</sub>-Messung

Der intratumorale pO<sub>2</sub>-Wert wurde vor der Hyperthermie als Kontrollwert, zehn und 40 Minuten nach Hyperthermiebeginn zur Abschätzung der direkt durch die Hyperthermie bewirkten Veränderungen und jeweils zwei und 24 Stunden nach Beendigung der Hyperthermie zur Verlaufskontrolle gemessen.

Zunächst wurden die Sauerstoffpartialdruckmessungen nur in den Thermochemotherapiegruppen durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse der IFO + HT-Gruppe wurde der Sauerstoffpartialdruck in einer zusätzlichen Gruppe IFO-solo ohne Hyperthermie, also bei 37°C gemessen.

Der Vergleich der Gruppen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist in Diagramm 11 dargestellt. Es zeigen sich signifikante und hochsignifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu den Messzeitpunkten nach zehn und nach 40 Minuten sowie bei der Messung nach zwei Stunden. Einzelvergleiche zwischen den Gruppen ergeben folgende Ergebnisse (Tabellen mit der statistischen Auswertung befinden sich im Anhang):

Vor der Hyperthermie (pre-HT = Kontrollwert) liegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den pO<sub>2</sub>-Werten der einzelnen Gruppen vor.

Bei der Messung zehn Minuten nach Hyperthermiebeginn ist der pO<sub>2</sub>-Wert der IFO + HT-Gruppe und der IFO-solo-Gruppe signifikant niedriger als der pO<sub>2</sub>-Wert der Kontrollgruppe.

Zum Zeitpunkt 40 min nach Hyperthermiebeginn ist der pO<sub>2</sub>-Wert der IFO + HT-Gruppe signifikant geringer als die Werte der Kontrollgruppe, der HT-solo-Gruppe und der IFO-solo-Gruppe.

Der Vergleich der pO<sub>2</sub>-Werte innerhalb einer Gruppe im Zeitverlauf (Diagramm 12-15) zeigt nur für die Gruppe IFO + HT einen signifikanten Unterschied im Verlauf der Messungen (Diagramm 14).

### Vergleich der pO<sub>2</sub>-Werte der unterschiedlichen Gruppen

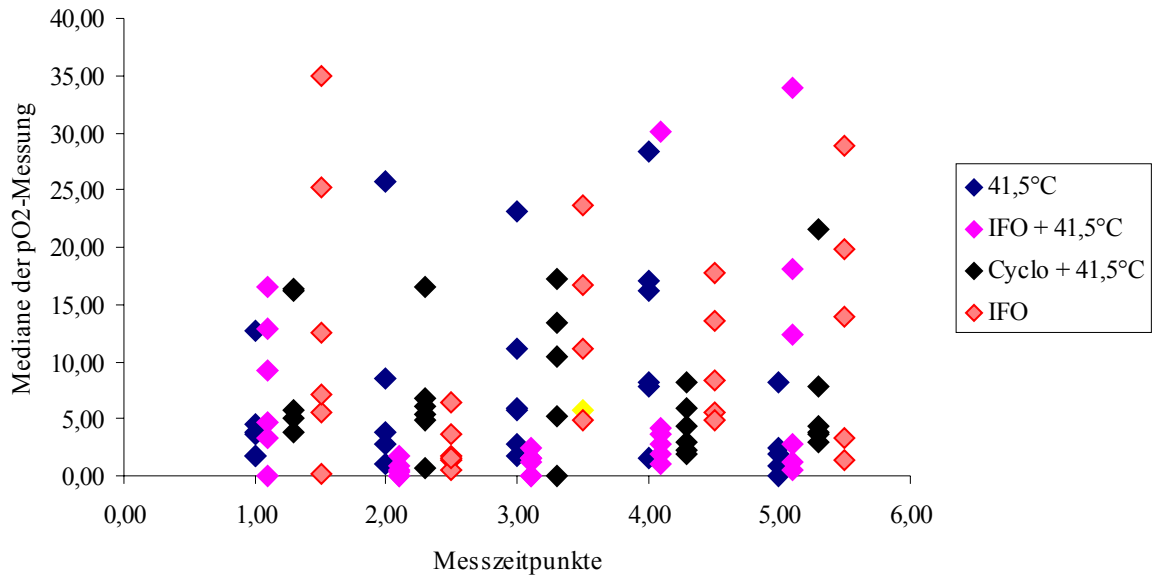


Diagramm 11: Vergleich der Sauerstoffpartialdrücke der verschiedenen Therapiegruppen zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während und nach der Therapie. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte aufgetragen: 1,00 = vor der Therapie

2,00 = 10 min nach Therapiebeginn

3,00 = 40 min nach Therapiebeginn

4,00 = 120 min nach Therapie

5,00 = 24 h nach Therapie

Die Auftragung der Messwerte ist der Übersichtlichkeit halber von Gruppe zu Gruppe um wenige Millimeter nach rechts versetzt, um die Gruppen voneinander differenzieren zu können.

Auf der y-Achse sind die Sauerstoffpartialdrücke der einzelnen Tiere einer Gruppe in mmHg aufgetragen.

Nur eine Gruppe zeigt signifikante Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks unter Therapie: Der Sauerstoffpartialdruck der mit IFO + HT therapierten Gruppe sinkt bereits nach 10 min signifikant von 7 mmHg auf 0,5 mmHg, bleibt bis 120 min nach Therapie deutlich unter 5 mmHg, um sich nach 24 h mit 7,5 mmHg in etwa auf den Ausgangswert einzustellen.

Diagramme 12 - 15: Vergleich der Sauerstoffpartialdrücke im Verlauf jeder einzelnen Therapiegruppe. Die Anordnung der Achsen und die Skalierung entspricht der Legende von Diagramm 11. Die Messwerte jedes einzelnen Tieres einer Gruppe sind als Punkte aufgetragen.

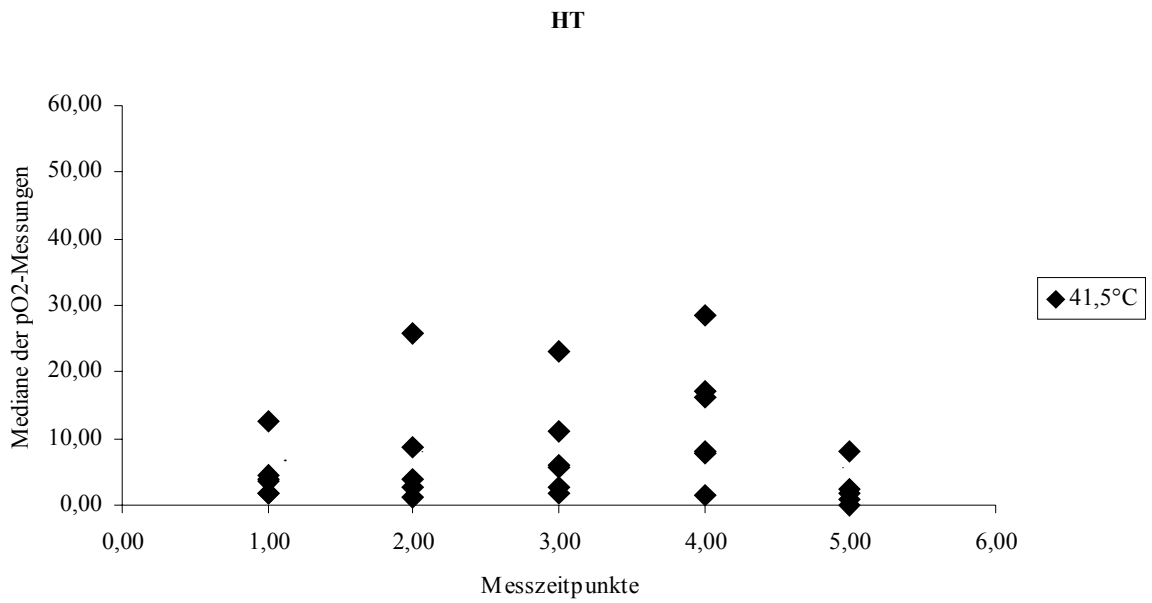


Diagramm 12: Vergleich der Sauerstoffpartialdrücke im Verlauf der HT-Gruppe. Es existieren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten.

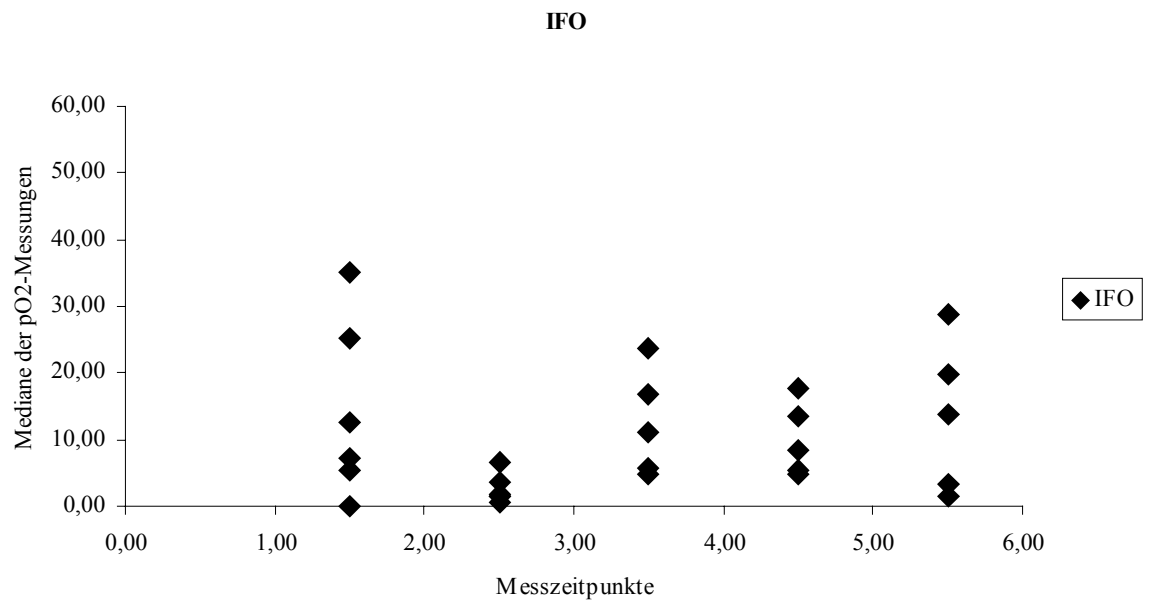


Diagramm 13: Vergleich der Sauerstoffpartialdrücke im Verlauf der IFO-Gruppe. Es existieren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten.

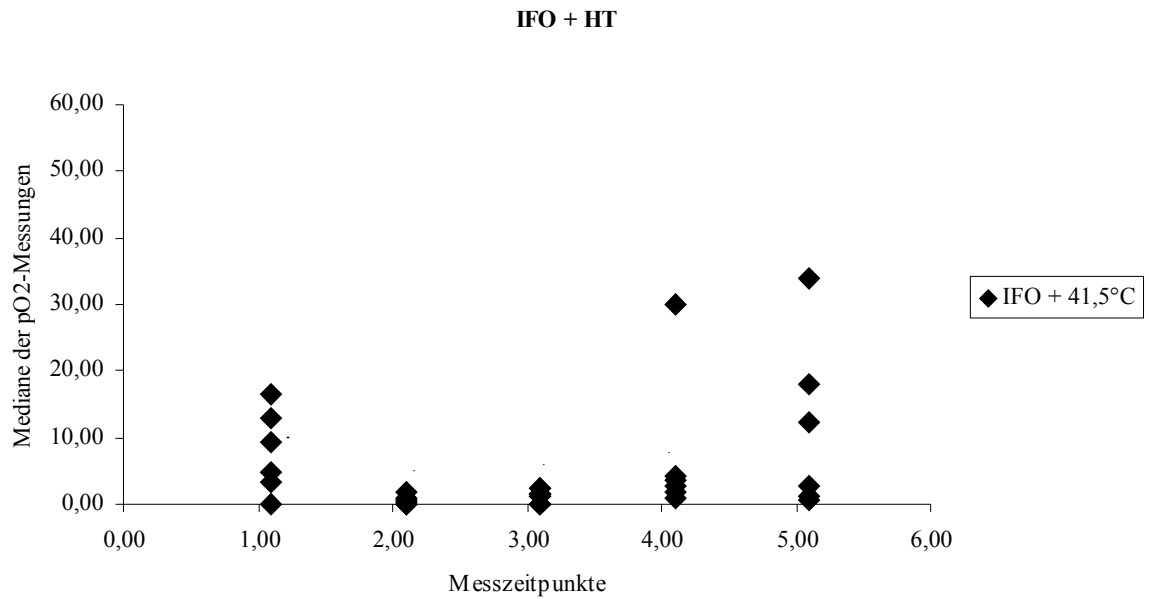


Diagramm 14: Vergleich der Sauerstoffpartialdrücke im Verlauf der IFO + HT-Gruppe. Der Sauerstoffpartialdruck sinkt bereits nach 10 min signifikant von 7 mmHg auf 0,5 mmHg und bleibt für 2 Stunden nach Therapie mit 1,4 mmHg und 3,2 mmHg deutlich und signifikant niedriger als vor der Therapie. Nach 24 h erholt sich der Sauerstoffpartialdruck und beträgt 7,5 mmHg, was etwa dem Ausgangswert entspricht. Dieser Anstieg ist signifikant.

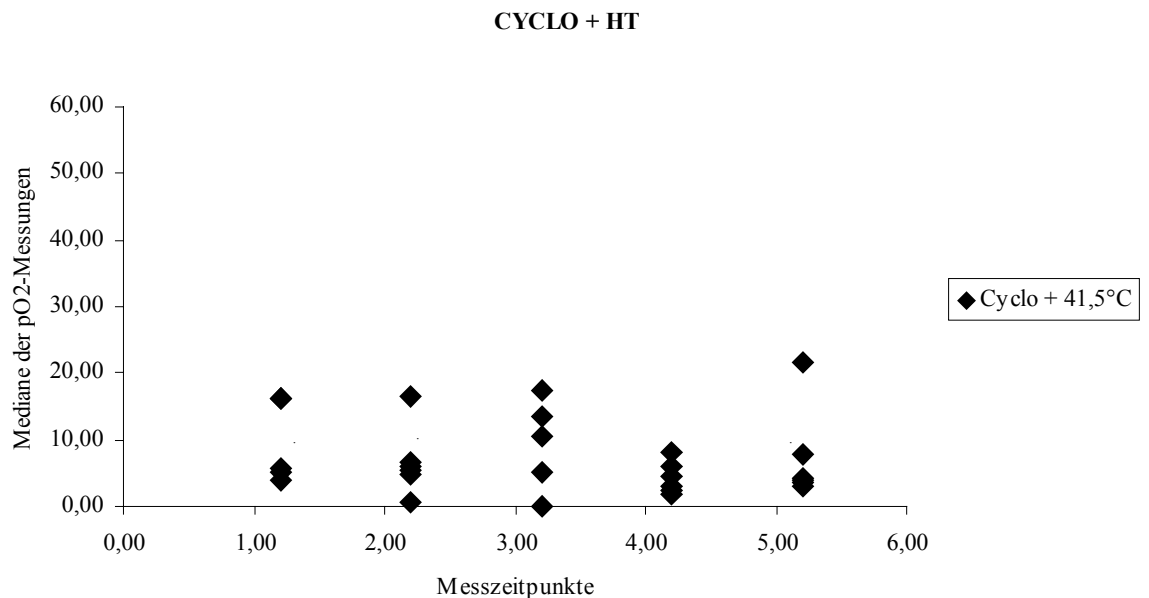


Diagramm 15: Vergleich der Sauerstoffpartialdrücke im Verlauf der CYCLO + HT-Gruppe. Es existieren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten.

## 4 DISKUSSION

Auch nach dem Verwendungsverbot von Asbest seit Anfang der 90er Jahre steigt die Inzidenz des malignen Pleuramesothelioms aufgrund seiner langen Latenzzeit stetig. Eine Standardtherapie konnte bis heute nicht etabliert werden. Gängige Malignomtherapien sind aus verschiedenen Gründen keine optimalen Therapielösungen: klinische Studien zeigten, dass der überwiegende Anteil der Pleuramesotheliome weder strahlen- noch chemosensibel ist. Eine chirurgische Intervention stellt wegen der hohen Anforderungen an den Allgemeinzustand des Patienten nur für wenige Betroffene eine Therapieoption dar. Neue Therapieansätze wie die Immuntherapie oder die photodynamische Therapie befinden sich erst im Stadium der klinischen Erprobung. Es handelt sich beim diffusen malignen Pleuramesotheliom also heute nach wie vor um eine Erkrankung mit infauster Prognose.

Die vorliegende Untersuchung sollte klären, ob die Kombination aus Chemotherapie und Hyperthermie *in vivo* am Nacktmausmodell ein für die klinische Anwendung empfehlenswerter Ansatz zur Therapie dieser Tumorentität ist. Untersucht wurde die Wirkung zweier Alkylantien auf das Pleuramesotheliom, für die eine Wirkungsverstärkung durch Hyperthermie bei anderen Malignomen bereits nachgewiesen werden konnte [33, 36, 37, 80, 82, 103, 117].

In einem ersten Schritt wurde ein solides Tumormodell der humanen Zelllinie MSTO 211-H in der Nacktmaus etabliert. Innerhalb weniger Wochen wuchsen die Tumoren subkutan und damit für die Therapie und die beobachtenden Untersuchungen leicht zugänglich heran. Im Nacktmausmodell können die Therapieeffekte an humanen Tumorzellen untersucht werden, außerdem lassen sich die Ergebnisse häufig gut mit klinischen Ergebnissen vergleichen.

Beachtet werden muss allerdings das im Vergleich zum Patienten schnelle Tumorwachstum im Nacktmausmodell sowie die Tatsache, dass die Vaskularisation [15] und das Abwehrsystems des Wirtes eine Rolle spielen.

Andererseits hätte eine Induktion des Pleuramesothelioms eine Asbestexposition der Maus und somit auch des Betreuers erfordert, was aus Sicherheitsgründen nicht vertretbar und zudem mit zu großen Unsicherheitsfaktoren behaftet gewesen wäre. Zudem wäre wegen der langen Latenzzeit bei einer Induktion eine zeitnahe Studie nicht möglich gewesen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die intratumorale Sauerstoffversorgung anderer Tumorentitäten durch eine Hyperthermie erheblich verbessert wird [49, 52, 70, 93], dass der Zellstoffwechsel angeregt wird und ein appliziertes Zytostatikum stärker wirken konnte. Aus diesem Grund wurden in dieser Studie nicht nur die längerfristigen Therapieeffekte der Thermochemotherapie auf den Tumor beobachtet, sondern auch der intratumorale Sauerstoffpartialdruck gemessen. Weiterhin sollten morphologische Untersuchungen die therapiebedingten Veränderungen auf tumoraler und zellulärer Ebene dokumentieren.

## 4.1 Tumolvolumenkinetik, Morphologie, Sauerstoffpartialdruck

### 4.1.1 KONTROLLE

Die Kontrolltumoren wuchsen exponentiell. Licht- und transmissionselektronenmikroskopisch ließen sich die typischen Merkmale des biphasischen Pleuramesothelioms nachweisen. Mikroskopisch fanden sich schon in der Kontrollgruppe unabhängig vom Tumolvolumen deutliche, oft mottenfraßähnliche Nekroseareale sowohl zentral als auch peripher. Tumoren anderer Entitäten wiesen erst ab deutlich höheren Volumina zentrale Nekrosen auf [79]. Eine mögliche Erklärung für die frühzeitige Entstehung der Nekroseareale bietet die im Vergleich zu anderen Tumorentitäten geringe Vaskularisierung. Hierfür spricht ebenfalls das Auftreten sogenannter „Gefäßinseln“, Areale intakten Tumorgewebes, die sich in unmittelbarer Nähe eines Gefäßes befanden und von peripheren Nekrosen umgeben waren. Die Diffusionsstrecke zu entfernterem Gewebe scheint zu lang, um eine ausreichende Versorgung dieser Bezirke zu gewährleisten.

Die morphologische Beurteilung der Therapieeffekte in den einzelnen Therapiegruppen war durch die bereits in der Kontrollgruppe vorhandenen Nekrosen erschwert.

Die MIB-1-Markierung sollte zeigen, wie viele Zellen proliferieren, da neben dem histologischen Subtyp auch der MIB-1-Index als Prognosekriterium für den Verlauf der Erkrankung zählt [9]. Ein hoher Anteil an MIB-1-positiven, also proliferierenden Zellen, spricht für einen ungünstigeren Krankheitsverlauf. Neben dem MIB-1-Nachweis wurden apoptotische Zellen per TUNEL-Markierung dargestellt.

Ebenso wie die lichtmikroskopische Beurteilung gestalteten sich die Auswertungen der immunhistochemischen Markierung von MIB-1 und der TUNEL-Markierung durch die unregelmäßige Tumormorphologie schwierig. In Vorversuchen wurde durch das Auszählen mehrerer Gesichtsfelder eine erhebliche Streuung durch den ständigen Übergang von intaktem Gewebe zu nekrotischem Gewebe festgestellt. Aus diesem Grund wurden mehrere histologische Schnitte aus verschiedenen Arealen eines Tumors mit einem hochauflösenden Scanner eingescannt, um eine möglichst große Tumorphäche zu analysieren. Nach Umwandlung in Graustufen wurden diese mit einem Computer ausgewertet (siehe Kap. 2.6.2). Auch innerhalb eines Tumors ergeben sich Schwankungen der relativen Anzahl immunreaktiver Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Die Analyse von sechs bis zehn Schnitten pro Tumor lässt keine signifikanten Aussagen über die relative Anzahl proliferierender bzw. apoptotischer Zellen zu.

Frühere experimentelle [79] und klinische Studien [48, 107] konnten zeigen, dass die Tumoroxygenierung einen wichtigen prognostischen Faktor bei einigen Malignomen (z.B. Zervixkarzinom, Weichteilsarkom und Plattenepithelkarzinom im Hals-Nasen-Ohren-Bereich) darstellt [79]. Die geringe Gefäßdichte und die starke Nekrotisierung der Tumoren ließen bereits eine mangelhafte Sauerstoffversorgung des Gewebes erwarten. In dieser Studie wurde der Sauerstoffpartialdruck gemessen, um zu klären, ob die

mangelhafte Sauerstoffversorgung des Gewebes für die weitestgehende Chemoresistenz des Pleuramesothelioms verantwortlich ist. Der mediane  $pO_2$ -Wert war mit 8,4 mmHg in der Kontrollgruppe niedrig. Die  $pO_2$ -Werte verschiedener Tumoren, gemessen zum gleichen Zeitpunkt, zeigten eine hohe Streubreite. Eine ähnlich hohe Streubreite fand sich auch beim Vergleich der während einer Messung innerhalb eines Tumors erhobenen Messwerte. Die Werte bewegten sich zwischen 0 mmHg und 60 mmHg. Viele Tumorentitäten wiesen im Vergleich zu normalem Gewebe eine verminderte Sauerstoffversorgung auf. Eine solche intratumorale Hypoxie, die sich auch bei dem hier untersuchten Pleuramesotheliom zeigt, hat im Wesentlichen zwei Ursachen: Erstens weist das Gefäßsystem in zahlreichen Tumoren strukturelle und funktionelle Veränderungen auf [28, 93]. Neben Gefäßen mit einem unregelmäßigen Verlauf finden sich sinusoidal erweiterte Kapillaren, bisweilen teilstenosierte, aber auch komplett verschlossene Gefäße. Im Verlauf dieser Gefäße kommt es zu einer Ab- bzw. Zunahme des Strömungswiderstandes mit den unausweichlichen Folgen wie Stase, Thrombusbildung und interstitielles Ödem durch den erhöhten Flüssigkeitsaustritt aus dem Gefäß. Ein solches interstitielles Ödem verlängert die Diffusionsstrecke und verschlechtert die Vaskularisation zusätzlich. Die Nekroseentstehung wird begünstigt. Die zweite Ursache für die Gewebshypoxie stellt das Ungleichgewicht zwischen Tumolvolumen auf der einen Seite und der Gefäßversorgung andererseits dar. Das rasche Tumorwachstum, dem die Neoangiogenese nicht folgen kann, sorgt für einen relativen Gefäßmangel ebenfalls mit einer Minderversorgung des Tumorgewebes [48, 94]. Eine solche geringe Vaskularisation im Vergleich zu Normalgewebe ist charakteristisch für viele Tumorentitäten [107].

Beide Faktoren verursachen eine Gewebshypoxie im Tumor. Es wird zwischen akut hypoxischen und chronisch hypoxischen Zellen unterschieden [48, 107]. Perfusionsstörungen, z.B. durch eine Thrombosierung, verursachen einen akut hypoxischen Zustand, während die Entstehung von chronisch hypoxischen Zellen durch die beschriebene Verlängerung der Diffusionsstrecke hervorgerufen wird. Durch die Hypoxie kann die Aggressivität einer Tumorzelle deutlich gesteigert werden: Die Zellen sind zunehmend dedifferenziert, ihre Apoptosebereitschaft nimmt ab [107], Veränderungen im Genom haben eine erhöhte Resistenz gegenüber Noxen zur Folge [48, 107]. Daraus resultiert ein aggressiveres Wachstum des Tumors mit einer gesteigerten Invasivität und einer höheren Neigung zur Metastasierung [16]. Neben einer vermehrten Aggressivität als Folge der Hypoxie haben Tumorzellen – bis zu einem gewissen Grad – die Fähigkeit, sich an vorliegende Gegebenheiten anzupassen. Eine solche Anpassung kann z.B. die Arretierung einer Zelle in der G1-Phase des Zellzyklus sein. Hierdurch wird die Empfindlichkeit für Chemotherapeutika und Radiatio erheblich verringert.

Die Morphologie der Tumoren bietet eine mögliche Erklärung für die intratumoral gemessenen, sehr unterschiedlichen  $pO_2$ -Werte. In der Peripherie des Tumors lagen relativ hohe Sauerstoffpartialdrücke vor. Hier ist die Vaskularisierung verhältnismäßig gut. Im Zentrum der Tumore fanden sich sowohl Areale mit morphologisch unauffälligem Tumorgewebe („Gefäßinseln“), als auch schlecht versorgte Bezirke mit Nekrosen.

Zwischen beiden befinden sich vielgestaltige Übergangsformen. Diese Irregularität erklärt die erheblichen Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb eines Tumors.

#### 4.1.2 HYPERTHERMIE

Die hyperthermierten Tumoren zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikant unterschiedliches Wachstum. Bei der mikroskopischen Untersuchung zum Zeitpunkt drei Wochen nach Therapie wurde eine der Kontrollgruppe ähnliche Morphologie gefunden.

Nur in den Tumoren, die kurz nach der Hyperthermie (60 und 120 min post HT) untersucht wurden, konnten deutliche Stauungen in den Blutgefäßen nachgewiesen werden [31]. Offenbar bewirkt die Hyperthermie lediglich passagere strukturelle Veränderungen, die jedoch keine Auswirkung auf das Tumorstadium haben.

Da Hyperthermie den Oxygenierungsgrad des Gewebes erhöhen kann [49, 52, 72, 93], sollte in dieser Studie untersucht werden, ob die Hyperthermie auch die Sauerstoffversorgung in unserem Tumormodell der Zelllinie MSTO 211-H verbessert. Die Hyperthermie bis zu einer Temperatur von 42°C wird in der Literatur als „milde Hyperthermie“ bezeichnet. Diese milde Hyperthermie führte in unserem Modell nicht zur Erhöhung der Sauerstoffversorgung, was im Kontrast zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen am Mammakarzinom [49], am Adenokarzinom der Ratte [90] und an HNO-Plattenepithelkarzinomen [79] steht. Bei diesen Tumorentitäten wurde eine gesteigerte Tumoroxygenierung durch milde Hyperthermie beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die oben genannten Karzinome primär eine bessere Vaskularisierung besitzen als unser Tumormodell. Wie bereits erwähnt, konnten 60 und 120 min post HT bei 41,5°C in der Peripherie stark durchblutete Gefäße ausgemacht werden [31]. Dieses gilt nicht für das nekrotische Zentrum. Hier ist die Vaskularisierung offenbar so ungenügend, dass auch durch Hyperthermie die Durchblutung nicht gesteigert werden kann.

#### 4.1.3 IFOSFAMID

In unserem soliden Tumormodell bewirkte die singuläre IFO-Therapie eine Stagnation des Tumorstadiums für eine Woche. Danach kam es zu einem erneuten Tumorstadium, so dass der Therapieeffekt von Ifosfamid nur als passager bezeichnet werden kann. Da bei Patienten mehrere Therapiezyklen durchgeführt werden, könnte das Therapieergebnis dadurch verbessert werden. Mikroskopisch ließ sich kein Unterschied zu den Tumoren der anderen Gruppen feststellen. Zehn Minuten nach Gabe von Ifosfamid sank der Sauerstoffpartialdruck im Tumor nicht signifikant von 10 mmHg auf 4 mmHg.

#### 4.1.4 IFOSFAMID + HYPERTHERMIE

Die Kombination aus Ifosfamid und Hyperthermie stellte sich als die effektivste Therapie heraus. Bei der Hälfte der Tiere konnte eine **Komplettremission** erreicht werden. Ein

Tumor zeigte eine **Partialremission**, ein weiterer **No Change**. Lediglich ein Tumor dieser Gruppe wuchs progredient. Die Wirkung von Ifosfamid beim humanen Pleuramesotheliom wird durch Hyperthermie verbessert.

Eine Wirkungsverstärkung bestimmter Zytostatika durch die gleichzeitige Applikation von Wärme war bereits Gegenstand zahlreicher Studien und konnte insbesondere für Alkylantien und Platinverbindungen nachgewiesen werden [55, 103, 119].

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Tumoren dieser Gruppe ergaben keinen Unterschied zu anderen Therapiegruppen. Ultrastrukturell gewinnt man den Eindruck, dass die Tumoren der mit IFO + HT behandelten Gruppe stärker geschädigt sind.

Bei der Beurteilung der Sauerstoffpartialdrücke zeigte sich nur in dieser Gruppe ein statistisch signifikanter Abfall des  $pO_2$ -Wertes bereits zehn Minuten nach Therapiebeginn (von 7 mmHg auf 0,5 mmHg). Im Verlauf der Hyperthermie blieb der  $pO_2$ -Wert mit 1,4 mmHg signifikant niedriger als vor der Therapie. Zwei Stunden nach Therapieende betrug der Sauerstoffpartialdruck mit 3,2 mmHg immer noch weniger als die Hälfte des Ausgangswertes (pre-HT). Der  $pO_2$ -Wert der letzten Messung 24 Stunden nach Hyperthermie war wieder so hoch wie vor Therapiebeginn (7,5 mmHg). Damit stellt sich die Frage, warum es nur in der Gruppe IFO + HT zu einem statistisch signifikanten Abfall des Sauerstoffpartialdrucks für ca. 120 Minuten kam und dieser  $pO_2$ -Wert nach 24 Stunden wieder auf seinen Ausgangswert anstieg. Für einen erniedrigten Sauerstoffpartialdruck gibt es zwei mögliche Gründe: Erstens könnte er herbeigeführt sein durch eine verminderte Sauerstoffzufuhr, zweitens durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch. Der gesteigerte Sauerstoffverbrauch bietet eine denkbare Erklärung für die während und kurz nach der Therapie erniedrigten  $pO_2$ -Werte im Tumor, ist aber als Ursache für die gemessenen Werte nicht sehr wahrscheinlich, da eine hyperthermiebedingte Stoffwechselsteigerung nicht nur bei der mit IFO + HT therapierten, sondern auch bei allen anderen mit Hyperthermie behandelten Gruppen nachweisbar sein müsste. Hieraus folgt, dass der verminderte Sauerstoffpartialdruck im Tumor bereits aus einer erniedrigten Sauerstoffzufuhr ins Gewebe resultiert. Dafür könnte eine zusätzliche Schädigung oder eine Konstriktion der ohnehin schon mangelhaft ausgebildeten und spärlich vorhandenen Blutgefäße durch die Kombination aus Ifosfamid und Hyperthermie verantwortlich sein. Schädigungen des Endothels intratumoraler Gefäße durch die Kombination aus Ifosfamid und Hyperthermie wurden bereits beim xenotransplantierten Mammakarzinom MX-1 nachgewiesen [96].

Eine solche additive Schädigung oder Vasospasmen, ausgelöst durch aktive Metaboliten des Ifosfamids (z.B. Acrolein und Chloracetaldehyd) [22], die durch die Hyperthermie vermehrt gebildet werden, verschlechtern die Tumoroxygenierung weiter. Der Anstieg des  $pO_2$ -Wertes nach Therapieende auf den Ausgangswert könnte Zeichen einer Endothelregeneration bzw. eines Nachlassens des Vasospasmus sein. In der Literatur wurde an einem Hamstermodell eines Zervixkarzinoms eine vorübergehende Vasokonstriktion mit nachfolgender Vasodilatation durch Hyperthermie bei 42°C beschrieben [29]. In unserem Modell wurde die Hyperthermie mit 41,5°C durchgeführt und statistisch signifikante Veränderungen des  $pO_2$ -Wertes ließen sich nur für die mit Ifosfamid und Hyperthermie behandelten Tumoren feststellen.

Die bisher verbreitete Ansicht, dass eine milde Überwärmung zwischen 39,5°C und 42°C die Tumoroxygenierung verbessert, fand sich in dieser Versuchsreihe nicht bestätigt. In der Therapiegruppe Hyperthermie bei 41,5°C kombiniert mit Ifosfamid wurde der intratumorale Sauerstoffpartialdruck beim humanen malignen Pleuramesotheliom nur kurzzeitig signifikant gesenkt.

#### 4.1.5 CYCLOPHOSPHAMID

Als weiteres Alkylans wurde in dieser Studie Cyclophosphamid untersucht, weil es im Vergleich zu Ifosfamid, dem verwandten Strukturanalogon, eine weniger nephrotoxische Alternative darstellt [109].

Im soliden Tumormodell war die alleinige Therapie mit Cyclophosphamid nur mäßig wirksam. Bei einem Teil der Tumoren wurde eine vorübergehende Abnahme des Tumolvolumens beobachtet, bei anderen Tumoren kam es zu einem Wachstumsstopp. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe stellten sich diese Veränderungen jedoch als nicht signifikant heraus. Auch morphologisch konnten keine Unterschiede zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Aussagen einer anderen Arbeitsgruppe überein, die Pleuramesotheliomxenograften an der Ratte mit Doxorubicin oder Cyclophosphamid therapierten und beide Zytostatika als inaktiv einstufen [59].

#### 4.1.6 CYCLOPHOSPHAMID + HYPERTHERMIE

Die Kombination aus Cyclophosphamid und Hyperthermie stellte sich als der zweitwirksamste Therapieansatz nach IFO + HT heraus. In dieser Gruppe kam es allerdings nur zu kurzzeitigen **Partialremissionen** bei der Hälfte der Tumoren, zwei Tumoren zeigen **No Change**, ein Tumor wuchs progredient. Nach drei Wochen zeigten alle Tumoren ein erneutes Wachstum, wenn auch das Ausgangsvolumen (pre-HT) nicht wieder erreicht wurde. Der Großteil der Tumoren (vier von sechs) sprach zumindest temporär auf die kombinierte Therapie aus Cyclophosphamid und Hyperthermie an. Überträgt man dieses Resultat auf die Klinik, so muss bedacht werden, dass Patienten in der Regel nicht einmalig eine Chemotherapie erhalten, sondern mehrere Therapiezyklen. Angesichts dieser Tatsache ist es durchaus möglich, dass die Zellen, die nach einem Therapiezyklus erneut proliferieren, durch einen nachfolgenden Thermochemotherapiezyklus abgetötet werden. Wegen der hohen Mortalität konnte ein solches Therapieschema jedoch nicht im Nacktmausmodell durchgeführt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Kombination von Cyclophosphamid mit Hyperthermie deutlich bessere Therapieerfolge als die alleinige Gabe von Cyclophosphamid erzielte. Eine solche Wirkungsverstärkung von Cyclophosphamid durch eine Überwärmung des Gewebes fand ebenfalls die Arbeitsgruppe um Coil im Melanom-Xenotransplantat in der Nacktmaus [21].

Abweichungen zur Kontrollgruppe konnten weder in der Morphologie noch in den Sauerstoffpartialdrücken gefunden werden.

## 4.2 Gruppenvergleich

Im Gruppenvergleich ließen sich **Komplettremissionen** nur für die Gruppe IFO + HT feststellen. Die Therapiegruppe CYCLO + HT bewirkte in der Mehrzahl der Tumoren **Partialremissionen**. Die erfolgreichste Therapie stellt somit IFO + HT dar. In dieser Gruppe gab es 50% **Komplettremissionen** und je 17% **Partialremissionen**, **No Change** bzw. **Progress**. Durch CYCLO + HT wurden 50% **Partialremissionen** und 34% **No Change** Verläufe erzielt. Ein Tumor (17%) zeigte **Progress**. Ein Zusammenhang zwischen Morphologie und Therapieerfolg konnte für keine Gruppe festgestellt werden. Die Tumoren aller Therapiegruppen zeigten eine Vielzahl zentraler und peripherer Nekrosen. Größe, Anzahl oder Anordnung der Nekrosen lassen keinen Rückschluss auf die angewandte Therapie zu (Abb. 14). Das Ausmaß möglicher therapieinduzierter Nekrosen lässt sich nicht abschätzen.

Ebenso wenig führt die MIB-1-Färbung und die TUNEL-Markierung zu einer statistisch signifikanten Aussage über die unterschiedliche Anzahl proliferierender und apoptotischer Zellen zwischen den verschiedenen Therapiegruppen.

Die gemessenen Sauerstoffpartialdrücke zeigten sowohl zwischen den Gruppen als auch innerhalb einer Gruppe starke Schwankungen, die durch Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen bei anderen Tumorentitäten bestätigt werden [48, 107].

Nur die Gruppe IFO + HT zeigte signifikante Veränderungen des  $pO_2$ -Verlaufs: Kurz nach Beginn der Hyperthermie fiel der  $pO_2$ -Wert signifikant ab. Als Begründung hierfür lässt sich die mangelhafte Perfusion im Tumor anführen, die durch die Kombination aus Hyperthermie und Ifosfamid bzw. seinen Metaboliten (z.B. Acrolein und Chloracetaldehyd) entsteht (siehe Kap. 2.4.3).

Conklin et al. zeigten in einer Untersuchung, dass der durch die Aktivierung von Ifosfamid entstehende Metabolit Acrolein für auftretende Vasospasmen verantwortlich sein kann [22]. Pharmakodynamisch ließe sich folgern, dass Ifosfamid durch die Hyperthermie vermehrt aktiviert würde, es entstünden mehr Metaboliten wie Acrolein, welches zu einem verstärkten Vasospasmus führe. Ein weiterer Metabolit ist das Chloracetaldehyd, das im Zusammenhang mit Hyperthermie neben einer Neurotoxizität auch spasmogene Wirkung hat. Die ohnehin schon insuffiziente Oxygenierung des Tumors würde zusätzlich verschlechtert, da die Vasokonstriktion die durch Überwärmung verursachte Perfusionssteigerung noch überträfe. Bei der Gruppe CYCLO + HT fehlt das Absinken des  $pO_2$ -Wertes durch die Hyperthermie. Da Acrolein auch ein Cyclo-Metabolit ist, ist der Grund für den fehlenden Sauerstoffabfall unklar. Möglicherweise entstehen weniger Metaboliten, so dass sich Vasospasmen und Perfusionssteigerung die Waage halten und sich die Tumorperfusion kaum ändert [34, 105, 106].

## 5 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK

Das humane maligne Pleuramesotheliom stellt eine außerordentlich therapieresistente Tumorerkrankung dar. Die vorliegende Studie untersuchte die Auswirkungen einer einmaligen Thermochemotherapie an einem xenotransplantierten soliden Tumormodell der Zelllinie MSTO 211-H. Die kombinierte Therapie, bestehend aus einmaliger Applikation von Ifosfamid bzw. Cyclophosphamid plus einer einstündigen Hyperthermie bei 41,5°C, zeigte sich als wirksam. Eine vorausgegangene Studie, die diesen Therapieansatz in vitro und mit den zusätzlichen Zytostatika Gemcitabin und Carboplatin untersuchte, zeigte, dass in vitro alle Medikamente zytotoxische Wirkung besaßen, in vivo jedoch nur die Medikamente Ifosfamid und Cyclophosphamid [30, 31]. Diese Tatsache verdeutlicht, wie wichtig die Vaskularisation eines Tumors ist: Sie ist für den Transport des Chemotherapeutikums entscheidend. Jedes Hindernis in der Strombahn, wie arterio-venöse Shunts oder Stenosen, verhindern eine optimale Anflutung und damit eine optimale Wirkung der Zytostatika. Nicht zu vernachlässigen ist die Anordnung der extrazellulären Matrix, die die Medikamentendiffusion behindern kann, sowie Veränderungen des Milieus mit einem geringen pH-Wert und einem erniedrigten pO<sub>2</sub>-Wert, der die Wirkung der Chemotherapeutika ebenfalls verändert.

Während unserer Versuche am Tumormodell bestätigte sich die von vielen Arbeitsgruppen dokumentierte Therapieresistenz des malignen Pleuramesothelioms. Die alleinige Gabe der Chemotherapeutika Ifosfamid und Cyclophosphamid hatte nur eine vorübergehende schwache Wirkung. Bei der Kombination der Medikamente mit einer einstündigen Überwärmung bei 41,5°C zeigte sich eine signifikante Wirkungsverstärkung. Auf die Therapie mit IFO + HT sprachen 66% der Tumore an, 50% der Tumore wiesen eine sogar eine **Komplettremission** auf. Die Kombination aus IFO + HT stellte demnach die wirkungsvollste Therapie dar. Damit ist die kombinierte Therapie aus Ifosfamid plus Hyperthermie eine sinnvolle Alternative oder auch Ergänzung zu gängigen Therapien beim malignen Pleuramesotheliom. Auch Cyclophosphamid zeigte in der Kombination mit Hyperthermie eine Wirkungsverbesserung, so dass auch dieser Therapieansatz als Ergänzung für die ohnehin schon in der Klinik angewendeten Therapien in Erwägung gezogen werden sollte. In dieser Studie wurden nur die einzelnen Medikamente auf ihre Wirksamkeit beim malignen Pleuramesotheliom untersucht. Da andere Forschungsgruppen zeigen konnten, dass Kombinationstherapien mit mehreren Zytostatika beim Pleuramesotheliom effektiver waren als Monotherapien [19, 56, 61], wäre die Untersuchung einer solchen Kombinationstherapie ein weiterer wichtiger Forschungsansatz für die Therapie dieser Malignomerkrankung. Außerdem könnte die zusätzliche Kombination unserer hier untersuchten Thermochemotherapie mit Radiatio den Therapieerfolg noch weiter verstärken. Eine solche Verstärkung der Thermochemotherapie durch Radiatio konnte bereits für andere Tumorentitäten gezeigt werden [16, 25, 35, 69, 71, 79]. Neue Studien zeigten eine Wirksamkeit von Pemetrexed [60] bzw. Pemetrexed plus Cisplatin [86, 108] auf das Pleuramesotheliom, so dass diese Medikamente weitere Forschungsansätze bieten.

Die von uns untersuchte Therapie wurde in der I. Medizinischen Klinik des UKSH, Campus Lübeck, in einer klinischen Phase-2-Studie an 25 Patienten angewandt. 76% der Patienten profitierten von einer kombinierten Thermochemotherapie aus Ifosfamid + Carboplatin + Etoposid + einstündige Ganzkörperhyperthermie [8]. Durch diese Therapieform beträgt die mediane Überlebenszeit für die Studienpatienten 19 Monate nach Diagnosestellung, was angesichts der schlechten Prognose dieser Erkrankung ein großer Gewinn und Fortschritt ist. Eine klinische Phase-3-Studie, die die isolierte Chemotherapie mit der kombinierten Thermochemotherapie vergleichen soll, wird zurzeit durchgeführt.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Trotz des seit Jahren bestehenden Verwendungsverbotes von Asbest steigt die Inzidenz des malignen Pleuramesothelioms aufgrund seiner langen Latenzzeit (bis zu mehreren Jahrzehnten) kontinuierlich. Die Erkrankung endet innerhalb weniger Monate nach Diagnosestellung tödlich. Eine erfolgreiche Standardtherapie konnte trotz zahlreicher Untersuchungen bis heute nicht etabliert werden, die Prognose des MPM bleibt infaust.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich erstmals mit den Auswirkungen einer kombinierten Thermochemotherapie *in vivo* auf das humane maligne Pleuramesotheliom im Nacktmausmodell. An diesem Modell wurde die Wirkung der Zytostatika Ifosfamid und seines Analogons Cyclophosphamid und der Hyperthermie sowie eine mögliche Wirkungssteigerung dieser Medikamente durch Überwärmung untersucht. Beurteilt wurden das Tumorwachstum, die mikroskopische und ultrastrukturelle Morphologie, die Proliferations- bzw. die Apoptoserate sowie der Sauerstoffpartialdruck innerhalb des Tumors vor, während und nach der Therapie.

Die Monotherapie mit Ifosfamid und Cyclophosphamid war nur passager und schwach wirksam. Die Kombination des jeweiligen Medikaments mit einer einstündigen Hyperthermie bei 41,5°C, zeigte für beide Chemotherapeutika signifikante Wirkungsverstärkungen und dauerhafte Remissionen. Die besten Ergebnisse wurden durch die Therapie mit IFO + HT erzielt: 66% der Tumore sprachen auf diese Therapie an; in 50 % der Tumoren konnte eine dauerhafte **Komplettremission** erreicht werden.

Ein Zusammenhang zwischen Therapieerfolg und Morphologie ließ sich in keiner der untersuchten Gruppen feststellen. Sowohl in unbehandelten als auch in behandelten Tumoren existierten große zentrale und kleine disseminierte Nekrosen. Weder die Größe noch die Form der Nekrosen war charakteristisch für eine bestimmte Therapie. Die Auswertung der proliferierenden bzw. der apoptotischen Zellen, die mittels MIB-1 bzw. mittels TUNEL-Markierung dargestellt wurden, ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Therapiegruppen.

Das PM der Zelllinie MSTO 211-H zeigt eine besonders geringe Dichte morphologisch abnormer Gefäße, die am ehesten ursächlich für die ausgedehnten Nekroseareale sind. Im Gegensatz zu Ergebnissen bei anderen Tumorentitäten wurde die Sauerstoffversorgung durch Hyperthermie nicht verbessert, sondern sank sogar signifikant während der kombinierten Therapie mit Ifosfamid. Die wahrscheinlichste Erklärung ist, dass durch die Kombination mit Ifosfamid bzw. seinen Metaboliten die vorbestehende mangelhafte Tumorperfusion weiter verschlechtert wird. In den anderen Therapiegruppen veränderte sich die Tumoroxygenierung durch die Therapie nicht.

Die Kombination aus Hyperthermie plus Ifosfamid und die Kombination aus Hyperthermie und Cyclophosphamid stellt eine sinnvolle Alternative oder Ergänzung zu den gängigen Therapien beim humanen malignen Pleuramesotheliom dar. Eine Mehrfachkombination mehrerer Medikamente und Hyperthermie bzw. die mehrfache Wiederholung der TCT könnten den therapeutischen Effekt zusätzlich steigern.

In Anlehnung an die hier vorliegenden Experimente wurde die Thermochemotherapie beim malignen Pleuramesotheliom in einer klinischen Phase-2-Studie an einem Patientenkollektiv aus 25 Patienten untersucht. 76% der Patienten profitierten von einer kombinierten Thermochemotherapie mit den Medikamenten Ifosfamid, Carboplatin, Etoposid plus Ganzkörperhyperthermie mit einer Verlängerung ihrer medianen Überlebenszeit.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Antman KH (1981) Clinical presentation and natural history of benign and malignant mesothelioma. *Semin Oncol* 8:313-320
2. Antman KH (1989) Natural history and staging of malignant mesothelioma. *Chest* 96:93S-95S
3. Antman KH, Corson JM (1985) Benign and malignant pleural mesothelioma. *Clin Chest Med* 6:127-140
4. Antman KH, Corson JM, Li FP, Greenberger J, Sytkowski A, Henson DE, Weinstein L (1983) Malignant mesothelioma following radiation exposure. *J Clin Oncol.* 1:695-700
5. Antman KH, Osteen RT, Klegar KL, Amato DA, Pomfret EA, Larson DA, Corson JM (1985) Early peritoneal mesothelioma: a treatable malignancy. *Lancet* 2:977-981
6. Antman KH, Pomfret EA, Aisner J, MacIntyre J, Osteen RT, Greenberger JS (1983) Peritoneal mesothelioma: natural history and response to chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1:386-391
7. Bakhshandeh A, Bruns I, Eberhardt K, Wiedemann GJ (2000) [Chemotherapy in combination with whole-body hyperthermia in advanced malignant pleural mesothelioma]. *Dtsch Med Wochenschr* 125:317-319
8. Bakhshandeh A, Bruns I, Traynor A, Robins HI, Eberhardt K, Demedts A, Kaukel E, Koschel G, Gatzemeier U, Kohlmann T, Dahlhoff K, Ehlers EM, Gruber Y, Zumschlinge R, Hegewisch-Becker S, Peters SO, Wiedemann GJ (2003) Ifosfamide, carboplatin and etoposide combined with 41.8°C whole body hyperthermia for malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* 39:339-345
9. Beer TW, Buchanan R, Matthews AW, Stradling R, Pullinger N, Pethybridge RJ (1998) Prognosis in malignant mesothelioma related to MIB 1 proliferation index and histological subtype. *Hum Pathol* 29:246-251
10. Bisht KS, Uma DP (1996) Hyperthermia in cancer research: current status. *Indian J Exp Biol* 34 :1183-1189

11. Borner K, Kisro J, Bruggemann SK, Hagenah W, Peters SO, Wagner T (2000) Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity in vivo. *Drug Metab Dispos* 28:573-576
12. Bourdes V, Boffetta P, Pisani P (2000) Environmental exposure to asbestos and risk of pleural mesothelioma: review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 16:411-417
13. Boutin C, Rey F, Gouvernet J, Viallat JR, Astoul P, Ledoray V (1993) Thoracoscopy in pleural malignant mesothelioma: a prospective study of 188 consecutive patients. Part 2: Prognosis and staging. *Cancer* 72:394-404
14. Bradshaw L (2000) Malignant pleural mesothelioma. *Nurs Times* 96:Suppl-4
15. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW (1996) Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 56:941-943
16. Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Dodge RK, Charles HC, Samulski TV, Prosnitz LR, Dewhirst MW (1996) Radiation therapy and hyperthermia improve the oxygenation of human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 56:5347-5350
17. Butchart EG, Gibbs AR (1990) Pleural mesothelioma. *Curr Opin Oncol* 2:352-358
18. Carry PY, Brachet A, Gilly FN, Sayag AC, Petit PY, Rochette C, Mulsant P, Guibert B, Braillon G, Banssillon V (1993) A new device for the treatment of pleural malignancies: intrapleural chemohyperthermia preliminary report. *Oncology* 50:348-352
19. Chahinian AP, Norton L, Holland JF, Szrajter L, Hart RD (1984) Experimental and clinical activity of mitomycin C and cis-diamminedichloroplatinum in malignant mesothelioma. *Cancer Res* 44:1688-1692
20. Clover J, Oates J, Edwards C (1997) Anti-cytokeratin 5/6: a positive marker for epithelioid mesothelioma. *Histopathology* 31:140-143
21. Coil DR, Giovanella BC, Greeff PJ, Stehlin JS, Davis BR (1992) An experimental model for the study of thermochemotherapy in vivo. *Anticancer Res* 12:1363-1371
22. Conklin DJ, Boyce CL, Trent MB, Boor PJ (2001) Amine metabolism: a novel path to coronary artery vasospasm. *Toxicol Appl Pharmacol* 175:149-159

23. Corson JM (1997) Pathology of diffuse malignant pleural mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 9:347-355
24. Delaney TF, Glatstein E (1988) Photodynamic therapy of cancer. *Compr Ther* 14:43-55
25. Dewey WC (1984) Interaction of heat with radiation and chemotherapy. *Cancer Res* 44:4714s-4720s
26. Dewey WC, Holahan EV (1984) Hyperthermia—basic biology. *Prog Exp Tumor Res* 28:198-219
27. Diehl JM, Kohr HU (1987) *Durchführungsanleitung für statistische Tests*. 3. unveränd. Aufl., Beltz, Weinheim, Basel
28. Eddy HA (1980) Alterations in tumor microvasculature during hyperthermia. *Radiology* 137:515-521
29. Eddy HA, Chmielewski G (1982) Effect of hyperthermia, radiation and adriamycin combinations on tumor vascular function. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 8:1167-1175
30. Ehlers EM, Kühnel W, Wiedemann GJ (2002) Hyperthermia and mafosfamide in a human-derived malignant pleural mesothelioma cell line. *J Cancer Res Clin Oncol* 128:65-72
31. Ehlers EM (2003) *Kombinierte Thermochemotherapie als Therapieoption für das maligne Pleuramesotheliom in vitro und in vivo*. Med. Habil. Schr. Lübeck
32. Elias DM, Ouellet JF (2001) Intraperitoneal chemohyperthermia: rationale, technique, indications, and results. *Surg Oncol Clin N Am* 10:915-933
33. Falk MH, Issels RD (2001) Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia* 17:1-18
34. Feldmann HJ, Molls M, Vaupel P (1999) Blood flow and oxygenation status of human tumors. Clinical investigations. *Strahlenther Onkol* 175:1-9
35. Feyerabend T, Steeves R, Wiedemann GJ, Richter E, Robins HI (1997) Rationale and clinical status of local hyperthermia, radiation, and chemotherapy in locally advanced malignancies. *Anticancer Res* 17:2895-2897

36. Feyerabend T, Wiedemann GJ, Jager B, Vesely H, Mahlmann B, Richter E (2001) Local hyperthermia, radiation, and chemotherapy in recurrent breast cancer is feasible and effective except for inflammatory disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:1317-1325
37. Feyerabend T, Wiedemann GJ, Steeves R (2001) Advanced non-seminomatous germ cell cancer of the testis with brain metastases: feasibility of additional brain irradiation and whole body hyperthermia plus chemotherapy. *Oncol Rep* 8:219-223
38. Fleckenstein W, Jungblut JR, Suckfull M, Hoppe W, Weiss C (1988) [Oxygen pressure distributions in the center and periphery of malignant head-and-neck tumors]. *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 12:205-211
39. Fleckenstein W, Weiss C (1984) A comparison of Po<sub>2</sub> histograms from rabbit hind-limb muscles obtained by simultaneous measurements with hypodermic needle electrodes and with surface electrodes. *Adv Exp Med Biol* 169:447-455
40. Gibas Z, Li FP, Antman KH, Bernal S, Stahel R, Sandberg AA (1986) Chromosome changes in malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 20:191-201
41. Glantz SA (1998) *Biostatistik-EinFach für die Praxis*. 4. Aufl. McGraw Hill/Hauser, Frankfurt
42. González-Lois C, Ballestín C, Sotelo MT, López-Ríos F, García-Prats MD, Villena V (2001) Combined use of novel epithelial (MOC-31) and mesothelial (HBME-1) immunohistochemical markers for optimal first line diagnostic distinction between mesothelioma and metastatic carcinoma in pleura. *Histopathology* 38:528-534
43. Gordon GJ, Chen CJ, Jaklitsch MT, Richards WG, Sugarbaker DJ, Bueno R (2002) Detection and quantification of SV40 large T-antigen DNA in mesothelioma tissues and cell lines. *Oncol Rep* 9:631-634
44. Gottehrer A, Taryle DA, Reed CE, Sahn SA (1991) Pleural fluid analysis in malignant mesothelioma. Prognostic implications. *Chest* 100:1003-1006
45. Grondin SC, Sugarbaker DJ (1999) Malignant mesothelioma of the pleural space. *Oncology (Huntingt)* 13:919-926
46. Hesterberg TW, Barrett JC (1985) Induction by asbestos fibers of anaphase abnormalities: mechanism for aneuploidy induction and possibly carcinogenesis. *Carcinogenesis* 6:473-475

47. Ho L, Sugarbaker DJ, Skarin AT (2001) Malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat Res* 105:327-373
48. Hockel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93:266-276
49. Horsman MR, Overgaard J (1997) Can mild hyperthermia improve tumour oxygenation? *Int J Hyperthermia* 13:141-147
50. Isobe H, Sridhar KS, Doria R, Cohen F, Raub WA, Saldana M, Krishan A (1995) Prognostic significance of DNA aneuploidy in diffuse malignant mesothelioma. *Cytometry* 19:86-91
51. Issels RD (1993) Hyperthermia and thermochemotherapy. *Cancer Treat Res* 67:143-160
52. Iwata K, Shakil A, Hur WJ, Makepeace CM, Griffin RJ, Song CW (1996) Tumour pO<sub>2</sub> can be increased markedly by mild hyperthermia. *Br J Cancer Suppl* 27:S217-S221
53. Jaklitsch MT, Grondin SC, Sugarbaker DJ (2001) Treatment of malignant mesothelioma. *World J Surg* 25:210-217
54. Kaiser LR (1997) New therapies in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 9:383-390
55. Katschinski DM, Wiedemann GJ, Mentzel M, Mulkerin DL, Touhidi R, Robins HI (1997) Optimization of chemotherapy administration for clinical 41.8 degrees C whole body hyperthermia. *Cancer Lett* 115:195-199
56. Kindler HL, van Meerbeeck JP (2002) The role of gemcitabine in the treatment of malignant mesothelioma. *Semin Oncol* 29:70-76
57. Kumar-Singh S, Vermeulen PB, Weyler J, Segers K, Weyn B, Van Daele A, Dirix LY, Van Oosterom AT, Van Marck E (1997) Evaluation of tumour angiogenesis as a prognostic marker in malignant mesothelioma. *J Pathol* 182:211-216
58. Lee YC, Light RW, Musk AW (2000) Management of malignant pleural mesothelioma: a critical review. *Curr Opin Pulm Med* 6:267-274

59. Linden CJ (1990) Response to doxorubicin and cyclophosphamide of a human pleural mesothelioma clinically and as a xenograft in nude rats. *In Vivo* 4:55-59
60. Manegold C (2003) Pemetrexed (Alimta, MTA, multitargeted antifolate LY231514) for malignant pleural mesothelioma. *Semin Oncol* 30:32-36
61. McLaren BR, Robinson BW, Lake RA (2000) New chemotherapeutics in malignant mesothelioma: effects on cell growth and IL-6 production. *Cancer Chemother Pharmacol* 45:502-508
62. Mizuki M, Yukishige K, Abe Y, Tsuda T (1997) A case of malignant pleural mesothelioma following exposure to atomic radiation in Nagasaki. *Respirology* 2:201-205
63. Mossman BT, Gee JB (1989) Asbestos-related diseases. *N Engl J Med* 320:1721-1730
64. Mossman BT, Hansen K, Marsh JP, Brew ME, Hill S, Bergeron M, Petruska J (1989) Mechanisms of fibre-induced superoxide release from alveolar macrophages and induction of superoxide dismutase in the lungs of rats inhaling crocidolite. *IARC Sci Publ* 81-92
65. Mossman BT, Marsh JP (1989) Evidence supporting a role for active oxygen species in asbestos-induced toxicity and lung disease. *Environ Health Perspect* 81:91-94
66. Neumeister W, Gillissen A, Rasche K, Muller KM, Schultze-Werninghaus G (2001) [Pleural mesothelioma. I: History, epidemiology, clinical aspects (symptoms, diagnosis)]. *Med Klin* 96:722-729
67. Nielsen OS, Horsman M, Overgaard J (2001) A future for hyperthermia in cancer treatment? *Eur J Cancer* 37:1587-1589
68. Ordonez NG (1999) The immunohistochemical diagnosis of epithelial mesothelioma. *Hum Pathol* 30:313-323
69. Overgaard J (1981) Effect of hyperthermia on the hypoxic fraction in an experimental mammary carcinoma in vivo. *Br J Radiol* 54:245-249
70. Overgaard J, Bichel P (1977) The influence of hypoxia and acidity on the hyperthermic response of malignant cells in vitro. *Radiology* 123:511-514

71. Overgaard J, Gonzalez GD, Hulshof MC, Arcangeli G, Dahl O, Mella O, Bentzen SM (1996) Hyperthermia as an adjuvant to radiation therapy of recurrent or metastatic malignant melanoma. A multicentre randomized trial by the European Society for Hyperthermic Oncology. *Int J Hyperthermia* 12:3-20
72. Overgaard J, Grau C, Lindegaard JC, Horsman MR (1991) The potential of using hyperthermia to eliminate radioresistant hypoxic cells. *Radiother Oncol* 20 Suppl 1:113-116
73. Pass HI, Pogrebniak HW (1993) Malignant pleural mesothelioma. *Curr Probl Surg* 30:921-1012
74. Peto J (1980) The incidence of pleural mesothelioma in chrysotile asbestos textile workers. *IARC Sci Publ* 703-711
75. Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E (1999) The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 79:666-672
76. Piolatto G, Negri E, La Vecchia C, Pira E, Decarli A, Peto J (1990) An update of cancer mortality among chrysotile asbestos miners in Balangero, northern Italy. *Br J Ind Med* 47:810-814
77. Pyrhonen S, Laasonen A, Tammilehto L, Rautonen J, Anttila S, Mattson K, Holsti LR (1991) Diploid predominance and prognostic significance of S-phase cells in malignant mesothelioma. *Eur J Cancer* 27:197-200
78. Reinhold HS, Overgaard J (1990) Hyperthermia in clinical oncology. *Eur J Cancer* 26:915-916
79. Ressel A, Weiss C, Feyerabend T (2001) Tumor oxygenation after radiotherapy, chemotherapy, and/or hyperthermia predicts tumor free survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49:1119-1125
80. Robins HI (1995) Systemic Hyperthermia Oncological Working Group. 1<sup>st</sup> annual meeting, New York, N.Y., USA. June 7-8, 1994. *Oncology* 52:260-263
81. Robins HI, Cohen JD (1990) Radiant heat systemic hyperthermia clinical trials. *Adv Exp Med Biol* 267:189-196
82. Robins HI, Hugander A, Cohen JD (1989) Whole body hyperthermia in the treatment of neoplastic disease. *Radiol Clin North Am* 27:603-610

83. Robins HI, Steeves RA, Shecterle LM, Martin PA, Miller KA, Paliwal B, Neville AJ, Dennis WH (1984) Whole body hyperthermia (41-42 degrees C): a simple technique for unanesthetized mice. *Med Phys* 11:833-839
84. Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I (2003) Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 362:1612-1616
85. Rusch VW (1996) A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma from the International Mesothelioma Interest Group. *Lung Cancer* 14:1-12
86. Rusch VW (2003) Pemetrexed and cisplatin for malignant pleural mesothelioma: a new standard of care? *J Clin Oncol* 21:2629-2630
87. Schneider J, Grossgarten K, Woitowitz HJ (1995) [Fatal pleural mesothelioma diseases caused by familial household contacts with asbestos fiber dust]. *Pneumologie* 49:55-59
88. Schneider J, Straif K, Woitowitz HJ (1996) Pleural mesothelioma and household asbestos exposure. *Rev Environ Health* 11:65-70
89. Schneider J, Woitowitz HJ (1995) [Asbestos-related mesotheliomas in housewives from indoor air pollution]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 196:495-503
90. Shakil A, Osborn JL, Song CW (1999) Changes in oxygenation status and blood flow in a rat tumor model by mild temperature hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 43:859-865
91. Shimm DS, Gerweck LE (1984) Hyperthermia in the treatment of cancer. *Ann Intern Med* 100:757-759
92. Smith AH, Wright CC (1996) Chrysotile asbestos is the main cause of pleural mesothelioma *Am J Ind Med* 30:252-266
93. Song CW, Park H, Griffin RJ (2001) Improvement of tumor oxygenation by mild hyperthermia. *Radiat Res* 155:515-528
94. Song CW, Rhee JG, Levitt SH (1982) Effect of hyperthermia on hypoxic cell fraction in tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 8:851-856

95. Stermen DH, Kaiser LR, Albelda SM (1998) Gene therapy for malignant pleural mesothelioma. *Hematol Oncol Clin North Am* 12:553-568
96. Stobbe EM (1998) Effects of a combined thermochemotherapy on the xenotransplanted human mammary carcinoma MX-1. A light and transmission electron microscopic study. *Ann Anat* 180:253-260
97. Sugarbaker DJ (1997) Diffuse malignant pleural mesothelioma: introduction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 9:345-346
98. Sugarbaker DJ, Flores RM, Jaklitsch MT, Richards WG, Strauss GM, Corson JM, DeCamp MM, Jr., Swanson SJ, Bueno R, Lukanich JM, Baldini EH, Mentzer SJ (1999) Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 117:54-63
99. Sugarbaker DJ, Jaklitsch MT, Liptay MJ (1995) Mesothelioma and radical multimodality therapy: who benefits? *Chest* 107:345S-350S
100. Sugarbaker DJ, Norberto JJ (1998) Multimodality management of malignant pleural mesothelioma. *Chest* 113:61S-65S
101. Sugarbaker DJ, Strauss GM, Lynch TJ, Richards W, Mentzer SJ, Lee TH, Corson JM, Antman KH (1993) Node status has prognostic significance in the multimodality therapy of diffuse, malignant mesothelioma. *J Clin Oncol* 11:1172-1178
102. Suzuki Y, Kannerstein M (1976) Ultrastructure of human malignant diffuse mesothelioma. *Am J Pathol* 85:241-262
103. Takahashi I, Emi Y, Hasuda S, Kakeji Y, Maehara Y, Sugimachi K (2002) Clinical application of hyperthermia combined with anticancer drugs for the treatment of solid tumors. *Surgery* 131:S78-S84
104. Valdagni R, Amichetti M (1987) Clinical hyperthermia: five year's experience. *Strahlenther Onkol* 163:443-445
105. Vaupel P, Hockel M (2000) Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: characterization and therapeutic relevance. *Int J Oncol* 17:869-879

106. Vaupel P, Hoeckel M (1999) Predictive power of the tumor oxygenation status. *Adv Exp Med Biol* 471:533-539
107. Vaupel P, Kelleher DK, Hockel M (2001) Oxygen status of malignant tumors: pathogenesis of hypoxia and significance for tumor therapy. *Semin Oncol* 28:29-35
108. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P (2003) Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 21:2636-2644
109. Wagner T (1994) Ifosfamide Clinical Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 26:439-456
110. Wang NS (1973) Electron microscopy in the diagnosis of pleural mesotheliomas. *Cancer* 31:1046-1054
111. Weissmann LB, Antman KH (1989) Incidence, presentation and promising new treatments for malignant mesothelioma. *Oncology (Huntingt)* 3:67-72
112. Westermann AM, Wiedemann GJ, Jager E, Jager D, Katschinski DM, Knuth A, Vorde Sive Vording PZ, Van Dijk JD, Finet J, Neumann A, Longo W, Bakhshandeh A, Tiggelaar CL, Gillis W, Bailey H, Peters SO, Robins HI; Systemic Hyperthermia Oncologic Working Group (2003) A Systemic Hyperthermia Oncologic Working group trial. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide combined with 41.8 degree C whole-body hyperthermia for metastatic soft tissue sarcoma. *Oncology* 64:312-321
113. Wiedemann G, Roszinski S, Biersack A, Weiss C, Wagner T (1992) Local hyperthermia enhances cyclophosphamide, ifosfamide and cis-diamminedichloroplatinum cytotoxicity in human-derived breast carcinoma and sarcoma xenografts in nude mice. *J Cancer Res Clin Oncol* 118:129-135
114. Wiedemann GJ, Siemens HJ, Mentzel M, Biersack A, Wössmann W, Knocks D, Weiss C, Wagner T (1993) Effects of Temperature on the Therapeutic Efficacy and Pharmacokinetics of Ifosfamide. *Cancer Res* 53:4268-4272
115. Wiedemann GJ, d'Oleire F, Knop E, Eleftheriadis S, Bucsky P, Feddersen S, Klouche M, Geisler J, Mentzel M, Schmucker P (1994) Ifosfamide and carboplatin combined with 41.8 degrees C whole-body hyperthermia in patients with refractory sarcoma and malignant teratoma. *Cancer Res* 54:5346-5350

116. Wiedemann GJ, Robins HI, Gutsche S, Mentzel M, Deeken M, Katschinski DM, Eleftheriadis S, Crahe R, Weiss C, Storer B, Wagner T (1996) Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) combined with 41.8 degrees C whole body hyperthermia in patients with refractory sarcoma. *Eur J Cancer* 32A:888-892
117. Wiedemann GJ, Robins HI, Katschinski DM, Mentzel M, d'Oleire F, Kutz M, Wagner T (1997) Systemic hyperthermia and ICE chemotherapy for sarcoma patients: rationale and clinical status. *Anticancer Res* 17:2899-2902
118. Yellin A, Simansky DA, Paley M, Refaely Y (2001) Hyperthermic pleural perfusion with cisplatin: early clinical experience. *Cancer* 92:2197-2203
119. Zaffaroni N, Fiorentini G, De Giorgi U (2001) Hyperthermia and hypoxia: new developments in anticancer chemotherapy. *Eur J Surg Oncol* 27:340-342
120. Zellos LS, Sugarbaker DJ (2002) Multimodality treatment of diffuse malignant pleural mesothelioma. *Semin Oncol* 29:41-50
121. Zeng L, Buard A, Monnet I, Boutin C, Fleury J, Saint-Etienne L, Brochard P, Bignon J, Jaurand MC (1993) In vitro effects of recombinant human interferon gamma on human mesothelioma cell lines. *Int J Cancer* 55:515-520

## 8 ANHANG

### 8.1 Statistische Auswertung

**Tabelle 1** Statistische Analyse des Tumorzvolumens durch den Tukey-HSD Post-Hoc-Test zwischen den Therapiegruppen

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO	CYCLO + HT
Kontrolle				*		*
HT				*		
IFO						
IFO + HT						
CYCLO						
CYCLO + HT						

\* =  $P < 0,05$

\*\* =  $P < 0,005$

**Tabelle 2** Statistische Analyse des Tumorzvolumens durch den T-Test zwischen den Therapiegruppen eine Woche nach Therapiebeginn

V1

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO	CYCLO + HT
Kontrolle			*	**		**
HT						
IFO				*		*
IFO + HT						
CYCLO						
CYCLO + HT						

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 3** Statistische Analyse des Tumorzvolumens durch den T-Test zwischen den Therapiegruppen zwei Wochen nach Therapiebeginn

V2

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO	CYCLO + HT
Kontrolle			*	**		**
HT						
IFO				*		*
IFO + HT						
CYCLO						
CYCLO + HT						

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 4** Statistische Analyse des Tumorzvolumens durch den T-Test zwischen den Therapiegruppen drei Wochen nach Therapiebeginn

V3

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO	CYCLO + HT
Kontrolle				*		*
HT						
IFO				**		*
IFO + HT						
CYCLO						
CYCLO + HT						

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 5** Statistische Analyse des Sauerstoffpartialdrucks durch den Mann-Whitney-U-Test zwischen den Therapiegruppen vor Therapiebeginn – keine Signifikanzen

pre HT

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO + HT
Kontrolle					
HT					
IFO					
IFO + HT					
CYCLO + HT					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 6** Statistische Analyse des Sauerstoffpartialdrucks durch den Mann-Whitney-U-Test zwischen den Therapiegruppen 10 Minuten nach Beginn der Therapie

10min

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO + HT
Kontrolle				*	
HT					
IFO					
IFO + HT					
CYCLO + HT					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 7** Statistische Analyse des Sauerstoffpartialdrucks durch den Mann-Whitney-U-Test zwischen den Therapiegruppen 40 Minuten nach Therapiebeginn

40min

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO + HT
Kontrolle				*	
HT				*	
IFO				*	
IFO + HT					
CYCLO + HT					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 8** Statistische Analyse des Sauerstoffpartialdrucks durch den Mann-Whitney-U-Test zwischen den Therapiegruppen 120 Minuten nach Therapiebeginn – keine Signifikanzen

120min

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO + HT
Kontrolle					
HT					
IFO					
IFO + HT					
CYCLO + HT					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 9** Statistische Analyse des Sauerstoffpartialdrucks durch den Mann-Whitney-U-Test zwischen den Therapiegruppen 24 Stunden nach Therapiebeginn – keine Signifikanzen

24h

	Kontrolle	HT	IFO	IFO + HT	CYCLO + HT
Kontrolle					
HT					
IFO					
IFO + HT					
CYCLO + HT					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 10** Statistische Analyse des Verlaufs des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Test – keine Signifikanzen

HT

	Pre HT	10min	40min	120min	24h
Pre HT					
10min					
40min					
120min					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 11** Statistische Analyse des Verlaufs des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Test – keine Signifikanzen

IFO

	Pre HT	10min	40min	120min	24h
Pre HT					
10min					
40min					
120min					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 12** Statistische Analyse des Verlaufs des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Test

IFO + HT

	Pre HT	10min	40min	120min	24h
Pre HT		*	*		
10min				*	
40min				*	
120min					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

**Tabelle 13** Statistische Analyse des Verlaufs des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb einer Gruppe durch den Wilcoxon-Test – keine Signifikanzen

CYCLO + HT

	Pre HT	10min	40min	120min	24h
Pre HT					
10min					
40min					
120min					

\* = P < 0,05

\*\* = P < 0,005

## 8.2 Danksagung

Meinen herzlichen Dank möchte ich meiner Betreuerin und Doktormutter PD Dr. med. Eva-Maria Ehlers aussprechen. Sie hat von Anfang an alle Weichen für ein gutes Gelingen dieser Arbeit gestellt und stand mir sowohl bei den Experimenten als auch bei der Niederschrift unermüdlich zur Seite. Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Wolfgang Kühnel sei gedankt für die Möglichkeit, die Arbeit im Institut für Anatomie unter seiner Schirmherrschaft zu beginnen. Während der gesamten Zeit hat er mich unterstützt und verfolgt als Mentor aufmerksam jeden Schritt dieser Arbeit. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Westermann bedanken. Er ermöglichte mir das Fortführen und Fertigstellen meiner Arbeit als neuer Leiter des Instituts für Anatomie.

Tatkräftig unterstützt wurde ich von Frau Edith Behrens und Frau Marie-Luise Leppin. Pragmatisch und ohne Zögern widmeten sie diesem Mäuseprojekt ein großes Kontingent ihrer Zeit, Mühe und Geduld.

Ebenso engagiert erfolgte die gesamte mikroskopische Aufarbeitung durch Frau Hannelore Strauchmann und Frau Jutta Endler, die sich mit viel Ausdauer um die licht- bzw. transmissionselektronenmikroskopischen Präparate kümmerten.

Herrn PD Dr. med. Oliver Schmitt gebührt Dank für seine Hilfe bei der computerassistierten Auswertung der immunhistochemischen Nachweismethoden. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts bedanken, denn ich bin dort als Doktorandin sehr herzlich aufgenommen und von allen Seiten aufmunternd unterstützt worden.

Ein großes Dankeschön gilt Prof. Dr. med. Christoph Weiss und Frau Dr. med. Anke Ressel aus dem Institut für Physiologie. Sie überließen uns das Equipment für die Sauerstoffmessungen, führten uns in die Kunst des Messens ein und unterstützten die Auswertung der erhobenen Daten.

Auch Herrn Marek Zelazny und Herrn Jakobus Baxevanis aus der elektronischen Werkstatt sei gedankt. Sie waren jederzeit zur Stelle und halfen uns, wenn die kleinen Tücken der Technik uns verzweifeln ließen.

Nicht zu vergessen sind Herr Willi Jacobs und seine Mitarbeiter. Sie sorgten für die gute Pflege und Versorgung unserer Nacktmäuse.

### 8.3 Lebenslauf

**Name:** Kathrin Riehemann

**Anschrift:** Ruhleben 3  
23564 Lübeck  
0451/5820272  
riehemannk@web.de



**Geburtsdatum und –ort:**  
27. April 1979 in Georgsmarienhütte

**Familie:** Dr. Jürgen Riehemann, Facharzt für Orthopädie  
Ursula Riehemann, geb. Johannsmann, Lehrerin  
Jörg Riehemann, cand. med  
Anne Riehemann, stud. med

#### **Schulischer Werdegang:**

1985 bis 1989 – Pius Grundschule, Osnabrück  
1989 bis 1991 – Orientierungsstufe Kalkhügel, Osnabrück  
1991 bis 1995 – Graf Stauffenberg Gymnasium, Osnabrück  
1995 bis 1996 – Wellington High School, West Palm Beach, FL, USA  
1996 bis 1998 – Graf Stauffenberg Gymnasium, Osnabrück

**Studium:** seit 1998 - Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck  
Herbst 2000 - Physikum  
Herbst 2000 - Beginn der Promotion im Institut für Anatomie  
Frühjahr 2001 - Famulatur in einer internistischen Praxis in West Palm Beach, FL, USA  
Herbst 2001 - 1. Staatsexamen  
Frühjahr 2002 - Famulatur in der gynäkologisch und geburtshilflichen Abteilung des St. Georg Hospital, Georgsmarienhütte  
Herbst 2002 - Famulatur in der chirurgischen Ambulanz des UKSH, Campus Lübeck, sowie Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe in Galway, Irland  
Herbst 2003 - 2. Staatsexamen  
Herbst 2003 - Praktisches Jahr  
1. Terial: Chirurgie in der Sana Klinik GmbH, Lübeck  
2. Terial: Gynäkologie und Geburtshilfe im UKSH, Campus Lübeck und Ostholstein Kliniken Eutin  
3. Terial: Innere Medizin im Klinikum Neustadt/Holstein

#### 8.4 Publikationliste

- Riehemann K, Ehlers EM 2001  
„Xenotransplantation und Chemotherapie des humanen biphasischen Pleuramesothelioms MSTO-211H“  
Vortrag beim 11. Treffen der Ostseeanatomen in Lübeck, 2001
  
- Riehemann K, Ehlers EM, Kühnel W 2001  
„Hyperthermie verbessert die Wirksamkeit des alkylierenden Zytostatikums Ifosfamid auf das humane, xenotransplantierte Pleuramesotheliom MSTO-211H in vivo“  
Poster bei der 18. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg, 2001