

**Aus der Klinik für Strahlentherapie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Jürgen Dunst**

---

Hyperbare Sauerstofftherapie bei MX-1 und S117-Tumorengraften



**Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
-Medizinische Fakultät-  
vorgelegt von  
  
Tim Peter Cordes  
aus Rotenburg/Wümme**

**Lübeck 2008**

**1. Berichtstatter:**

**Prof. Dr. med. Jürgen Dunst**

**2. Berichtstatter:**

**Priv.-Doz. Dr. med. Christoper Altgassen**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**20.03.2009**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den**

**20.03.2009**

**gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach**

**-Dekan der Medizinischen Fakultät-**

## **Meinen Eltern**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.2 Wirkung von hyperbarem Sauerstoff.....	9
1.3 Bedeutung der Tumoroxygenierung.....	11
1.3.1 in der Strahlentherapie.....	11
1.3.2 in der Chemotherapie.....	12
1.4 Messverfahren des Sauerstoffpartialdruckes mit der Feinadel-Gewebe-pO <sub>2</sub> -Histographie	12
1.5 Tumormodell.....	12
1.6 Auswirkung der HBO auf das Gewebe .....	13
1.6.1 Zellzyklus und Proliferationsindex.....	13
1.6.2 Microvessel Density und Vascularian endothelien growth factor (VEGF) .....	14
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
2.1 Tumormodell.....	16
2.2 Versuchstiere .....	17
2.3 Die Druckkammer.....	18
2.4 Das pO <sub>2</sub> -Meßverfahren .....	20
2.4.1 Meßapertur [pO <sub>2</sub> – Histogramm 6650, Kimoc] .....	20
2.4.2 Das physikalische Messprinzip .....	20
2.4.3 Die Referenzelektrode.....	23
2.5 Tumolvolumenbestimmung.....	24
2.6 Versuchsaufbau .....	24
2.6.1 Hyperbare Sauerstoffbehandlung ( HBO ).....	24
2.6.2 Versuchsgruppen .....	26
2.6.3 Messverfahren.....	27
2.6.4 Versuchsprotokoll.....	28
2.6.5 Immunhistochemische Aufarbeitung .....	29
2.6.6 VEGF- Bestimmung .....	33
2.6.7 Datenverarbeitung.....	33
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1 Die einzelnen Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf.....	38
3.1.1 Die MX-1-Gruppen .....	38
3.1.2 Die S117-Gruppen .....	40
3.2 Relative Veränderungen des pO <sub>2</sub> und des Tumolvolumens.....	42
3.3 Proliferationsindex MX-1 .....	43
3.4 VEGF-Bestimmung im Serum MX-1 .....	44
3.5 Microvessel Density .....	45
3.6 Gruppenvergleich .....	46
3.7 Perzentilenvergleich.....	49
3.7.1 MX-1-Gruppen.....	50
3.7.2 S117-Gruppen.....	51
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>52</b>
4.1. Messung der Tumoroxygenierung .....	52
4.2. Fehlerquellen.....	52
4.3. Interpretation der Messungen des MX-1-Tumors .....	54
4.3.1 Oxygenierung.....	54
4.3.2 Einfluss der HBO auf das Tumolvolumen.....	55
4.3.3 Einfluss der HBO auf die Microvessel Density.....	56
4.3.4 Interpretation der pO <sub>2</sub> Perzentilen des MX-1 Tumors .....	58
4.4 Interpretation der Messung des S117-Tumors.....	59
4.4.1 Oxygenierung.....	59
4.4.2 Einfluss der HBO auf das Tumolvolumen.....	59
4.4.3 Interpretation der pO <sub>2</sub> Perzentilen des S117-Tumors .....	60
4.5. Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik.....	61
4.5.1. Hypoxie als Prognosefaktoren bei soliden Tumoren .....	61
4.5.2 Bedeutung der Ergebnisse für Strahlentherapie.....	61

<b>5. Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>7 Anhang</b> .....	<b>76</b>
7.1 Tierversuchsantrag.....	76
7.2 Reagenzien/ Präparate .....	76
7.3 Geräte /Programme (alphabetisch):.....	77
7.4 Arbeitsgruppe .....	77
7.5 Datenübersicht .....	78
<b>8. Danksagung</b> .....	<b>80</b>
<b>9. Lebenslauf</b> .....	<b>82</b>

## Abkürzungen

<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
<b>DMSO</b>	<b>Dimethylsulfoxid</b>
<b>°C</b>	<b>Grad Celsius</b>
<b>Hb</b>	<b>Hämoglobin</b>
<b>HBO</b>	<b>Hyperbare Oxygenation, Hyperbare Sauerstofftherapie</b>
<b>HE</b>	<b>Hämatoxylin-Eosin</b>
<b>KG</b>	<b>Körpergewicht</b>
<b>mmHg</b>	<b>Milimeter Quecksilbersäule</b>
<b>min</b>	<b>Minuten</b>
<b>MTP</b>	<b>Mikrotiterplatten</b>
<b>MW</b>	<b>Mittelwerte</b>
<b>nA</b>	<b>nano Ampère</b>
<b>µl</b>	<b>Mikroliter</b>
<b>OER</b>	<b>Oxygen Enhancement Ratio</b>
<b>pO<sub>2</sub></b>	<b>pressure Oxygen = Sauerstoffpartialdruck</b>

## 1. Einleitung

Solide Tumoren zeigen bezüglich ihres Mikromilieus auf zellulärer und molekularer Basis verschiedene Besonderheiten, die für die Tumorthherapie in den einzelnen Disziplinen der Medizin von großer Bedeutung sind. So wurden die unterschiedlichsten Therapiekonzepte entwickelt, die nun seit vielen Jahren zunehmend komplexer und fächerübergreifender werden. Beispiele hierfür sind sowohl die kombinierte Radiochemotherapie, als auch die Hyperthermie, sowie zahlreiche neue Studienprotokolle bei einer Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika. Die Chirurgie ist meist allein nicht in der Lage, diffus und infiltrativ wachsende Tumoren vollständig zu exzidieren. Stark metastasierende neoplastische Gewebe sind durch die multiple Streuung oft chirurgisch nicht mehr behandelbar. Mikrometastasen entgehen jeglicher chirurgischer Therapie. So müssen zusätzlich Chemotherapeutika und die Strahlentherapie zur Vor- und/oder Nachbehandlung eingesetzt werden. Sie sind in der Lage systemisch Neoplasien und nicht operative Tumoren, sowie Metastasen anzugreifen [Richter et al., 1996]. Das physiologische Milieu der Tumorgewebe hat einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit vieler nicht-chirurgischer Maßnahmen.

Ein besonderer Parameter, der auf die Wirksamkeit therapeutischer Maßnahmen einen großen Einfluss hat, ist der  $O_2$ -Partialdruck oder die Tumoroxygenierung. Die Sauerstoffsättigung des Tumorgewebes zeigt zum umliegenden Gewebe erhebliche Unterschiede. Man kann einen ausgeprägten Sauerstoffmangel innerhalb des Tumorzellverbandes feststellen, welcher seinerseits einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit von Strahlen- und Chemotherapie hat. Er beeinflusst nachhaltig sowohl das Wachstumsverhalten, als auch die Malignität und die Metastasierung. Diese Faktoren können die Prognose für Patienten stark beeinträchtigen [Koutcher et al., 1992, Martin et al., 1987, Stone et al., 1993].

### *1.1 Oxygenierung solide wachsender Tumoren*

Seit nunmehr über vier Jahrzehnten steht die Oxygenierung experimenteller Tumoren im Mittelpunkt vieler pathophysiologischer Untersuchungen [Vaupel, 1974]. Nach den klassischen Methoden der Messung von Verteilung des  $pO_2$  in Geweben mit sauerstoffsensitiven polarographisch arbeitenden Elektroden kamen zunehmend differenziertere Messverfahren zur Anwendung. Sie bieten die Möglichkeiten die räumliche Sauerstoffverteilung bis auf das zelluläre Niveau zu

beurteilen [Müller-Klieser et al., 1981,1983]. Die Messungen des  $pO_2$  mit der Feinnadel-Gewebe-Histographie ermöglicht eine räumliche Auflösung innerhalb des Gewebes von unter einem Millimeter. Somit kann mit diesem Verfahren ein interstitielles Sauerstoffprofil in hochauflösender Form hergestellt werden.

Die Oxygenierung solide wachsender experimenteller Tumoren ist in der Regel um ein Vielfaches schlechter, als der  $pO_2$  des umgebenden Gewebes ( $< 5$  mmHg). Neben diesen hypoxischen Arealen entstehen wachstumsbedingt anoxische Tumorpartien, also Areale in denen kein Sauerstoff nachzuweisen ist [Weiss et al., 1989, Eppendorf-Netheler GmbH, 1994]. Der normale Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) im Gewebe beträgt 25–65 mmHg. Dies wird als normoxisch bezeichnet. Als hypoxisch gilt ein  $pO_2 \leq 5$  mmHg [Vaupel et al., 1997]. Die Existenz solcher hypoxischen Areale im Tumorgewebe wurde schon 1955 über die histologische Photomikrographie von Thomlinson und Gray, 1955 am Bronchialcarcinom nachgewiesen.

Die Sauerstoffminderversorgung entsteht durch mehrere Faktoren, die sich in Form von Malignität und Wachstumsverhalten auf das Tumorgewebe auswirken. Diese unzureichende Sauerstoffversorgung in einigen Tumorarealen liegt in erster Linie an einem Ungleichgewicht des Sauerstoffbedarfs und der  $O_2$ -Versorgungssituation [Folkman, 1971, 1972]. Sie lässt auf eine dreidimensionale Anordnung der isobaren  $pO_2$  Areale schließen, welche Adolf Krogh schon 1919 mit Hilfe seines Konzeptes der dreidimensionalen Sauerstoffverteilung zeigte. Im Wesentlichen wird dies durch zwei Faktoren beeinflusst:

1. Ein  $pO_2$ -Abfall des Kapillarblutes, der aus der Sauerstoffabgabe an die Zellen in dem umgebend liegenden Gewebe entlang der Flussstrecke resultiert.
2. Ein  $pO_2$ -Abfall entlang der Diffusionsstrecke von der Kapillare zu den Zellen. Das Tumorwachstum ist hierbei durch die Diffusionsstrecke limitiert. Dies ist durch ein Modell des frühen avaskulären Tumorstadiums *in vitro* an Tumorsphäroiden gezeigt worden. In diesen kugelförmigen Aggregaten zeigt sich eine inhomogene  $pO_2$ -Verteilung mit einem sich nach zentral vermindertem Sauerstoffpartialdruck [Wilson et al., 1989; Durand, 1983].

Aufgrund der Wachstumsbedingungen in soliden Tumoren entspricht die Sauerstoffversorgung zumeist nicht dem Bedarf der schnell proliferierenden Zellen, so dass sich hypoxische Areale bilden [Müller-Klieser et al., 1983]. Daraus

resultierend verringert sich die Vaskularisierungsdichte, es vermehren sich mit fortschreitendem Tumorwachstum die mittleren Interkapillardistanzen, Kapillarlängen und Kapillardurchmesser. Durch die unzureichende Vaskularisation und damit verminderten  $pO_2$ , sind in erster Linie die Zellen betroffen, die weit von den Gefäßen entfernt liegen [Gabbert et al., 1983, Vaupel, 1977, 1979.] In einigen Studien konnte durch Markierung von hypoxischen bzw. anoxischen Tumorzellen in vivo die mikroregionale Verteilung der Oxygenierung innerhalb des Tumors untersucht werden. Hieraus ergab sich jedoch kein Nachweis über einen vom Tumorzentrum zur Peripherie hin ausgerichteten Oxygenierungsgradienten. Offenbar werden die Tumoren nicht alleine von der Peripherie versorgt, zumindest lässt sich keine reine Weg-Druckgradienten-Beziehung herstellen [Lord et al., 1993; Raleigh et al., 1996; van Geel et al., 1996].

Für die Umgebung der Kapillaren lässt sich jedoch aber wiederum eine Schichtung der Oxygenierungsgrade der Zellen nachweisen.

Trott, (1983) und Denekamp (1989) zeigten folgendes Schichtungsmodell auf:

- eine Schicht gut oxygenierter Zellen (normaler pH, normale Stoffwechsellage, Zellproliferation),
- eine Schicht chronisch hypoxischer Zellen (niedriger pH, reduzierter Stoffwechsel, keine Zellproliferation), eine Schicht nekrotischer Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Oxygenierung experimenteller solide wachsender Tumoren sehr viel schlechter ist, als sein gesundes umgebendes Gewebe. Ferner scheint keine strukturierte Anordnung von gut oxygeniertem, hypoxischen und anoxischen Gewebe feststellbar zu sein.

## 1.2 Wirkung von hyperbarem Sauerstoff

Ein Ungleichgewicht in der Sauerstoffversorgung von Tumorzellverbänden beeinflusst die Wirksamkeit verschiedener Therapiemöglichkeiten, besonders die Wirksamkeit einer Strahlentherapie, aber auch die von Chemotherapien können erheblich beeinflusst werden [Brizel et al., 1998, Hartmann et al., 1998, Höckel et al. 1998., Teicher et al., Alagoz et al., 1998, Kalns et al, Molls et al., 1998]. Um dieses Ungleichgewicht zwischen  $O_2$ -Verbrauch und Sauerstoffversorgung in den Tumorzellverbänden so zu korrigieren, dass daraus ein therapeutischer Nutzen resultiert, ist eine Erhöhung des  $O_2$ -Angebotes anzustreben. Dieses kann mittels einer hyperbaren Sauerstofftherapie (HBO) erreicht werden. Dieses geschieht zum Großteil über die Lunge und das Blut als Transportmedium. Hierbei ist zum

Ersten die Bindung des Sauerstoffs an das Hämoglobin als Träger relevant, zum Zweiten der physikalisch gelöste Sauerstoff, der sich proportional dem  $pO_2$  verhält. Der Sauerstoffgehalt ( $[O_2]$  in ml  $O_2$ /l Blut) des Blutes errechnet sich aus der Gleichung:

$$[O_2] = 1.39 \cdot [Hb] \cdot sO_2(pO_2) \cdot 10^{-2} + 0.0368 \cdot pO_2.$$

Hierbei ist 1.39 (in ml  $O_2$ /g Hb) die so genannte Hüfner-Zahl, die die chemische Bindungsfähigkeit von Sauerstoff an ein Gramm Hämoglobin beschreibt. Der  $sO_2(pO_2)$  (in %) stellt die  $O_2$ -Sättigung des Hämoglobins als Funktion des aktuellen  $pO_2$  ( $O_2$ -Bindungskurve des Hämoglobins) dar; 0.0368 (in ml  $O_2$ /l Blut/mmHg) ist der Bunsen-Löslichkeitskoeffizient für  $O_2$  im Blut und der  $pO_2$  (in mmHg) beschreibt den aktuellen  $O_2$ -Partialdruck.

Die einfachste Methode den aktuellen arteriellen  $pO_2$  zu erhöhen, ist die Gabe von 100%igem Sauerstoff als Atemgas. In ersten Versuchen [Cater et al., 1962, Kruuv et al., 1967, Müller-Klieser et al., 1983, Suit et al., 1972] stieg der arterielle  $pO_2$  auf etwa 500 mmHg an, dies entspricht nach der Gleichung einem Anstieg des arteriellen  $O_2$ -Gehalts um etwa 10% von ca. 200 ml  $O_2$ /l Blut bei Normoxie, auf 220 ml  $O_2$ /l Blut bei Sauerstoffatmung. Diese geringe Zunahme ist darauf zurückzuführen, dass bei Luftatmung ohnehin schon eine 97%ige Sättigung des Hämoglobins vorliegt. Da eine weitere Sättigung des Sauerstoffs fast nicht mehr möglich ist und ohnehin nur von geringem Nutzen wäre, ist die Verbesserung der physikalischen Lösung des Sauerstoffs im Blut nach dem Henry-Dalton-Gesetz eine weitere Möglichkeit. Es besagt, dass bei konstanter Temperatur die Menge des gelösten Gases in einer bestimmten Flüssigkeit direkt proportional zum Partialdruck des Gases und des Lösungskoeffizienten der Flüssigkeit ist.

Eine solche Verbesserung der physikalischen Lösung von Sauerstoff im Blut ist durch die Atmung von hyperbarem Sauerstoff zu erwarten. Zahlreiche experimentelle und klinische Studien haben dies schon an verschiedenen Tumormodellen gezeigt [Cater et al., 1962; Suit et al., 1972; Dische, 1983; Müller-Klieser et al., 1983; Rojas et al., 1987; Alagoz et al., 1995; Overgaard et al., 1996]. Die Daten zeigten, dass eine weitere Verbesserung des  $pO_2$  erreicht werden kann. Bei Patientenbehandlungen in der Druckkammern bei 1,5 atm Überdruck werden Werte von bis zu 2000 mmHg Sauerstoff erreicht. Drücke > 2 atm ergaben dann jedoch keinen deutlichen Zugewinn mehr [Müller-Klieser et al., 1983].

Für die Strahlentherapie ist die Oxygenierung von entscheidender Bedeutung [Koutcher et al., 1992; Martin et al., 1987; Moulder et al., 1984; Stone et al., 1993]. Schlecht durchblutete und hypoxische Gewebe sind nachweislich strahlenunempfindlicher [Mottram, 1936; Schwarz, 1909], was man an kapillarfernen hypoxischen Geweben, im Unterschied zu kapillarnahen Zellen, die durch ihre euoxischen Verhältnisse erheblich strahlensensibler sind, sehen kann.

### 1.3 Bedeutung der Tumoroxygenierung

#### 1.3.1 in der Strahlentherapie

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass die Oxygenierung eines soliden Tumors erheblichen Einfluss auf die Therapieerfolge der Strahlentherapie haben kann. Gray et al., zeigte 1956, dass der Sauerstoff direkt für eine Strahlensensibilisierung verantwortlich ist. Er konnte in Geweben mit einem  $pO_2$  um 15mmHg eine 2,5 bis 3fache höhere Strahlenwirkung, im Gegensatz zu hypoxischen bzw. anoxischen Geweben ( $O_2$ -Partialdruck zwischen 2,5 und 5mmHg), nachweisen [Gray LH et al., 1956].

Diese Verstärkung der Strahlenwirkung wird als OER (Oxygen Enhancement Ratio) bezeichnet und kann durch die so genannte „Alper-Formel“ berechnet werden [Kiefer, 1989].

$$OER(O_2) = \frac{m[O_2] + k}{[O_2] + k}$$

$[O_2]$  = Sauerstoffkonzentration

m = maximaler OER-Effekt

k = Konstante mit der Dimension Konzentration

Die Konstante k gibt an, wann der halbmaximale Effekt erreicht ist [Kiefer, 1989]. Die biologische Begründung für den Sauerstoffeffekt ergibt sich aus der Tatsache, dass Röntgenstrahlen kaum direkt, sondern überwiegend indirekt über Radikalbildung die DNA schädigen. Durch ionisierende Strahlung werden aus dem Sauerstoff freie Radikale gebildet, die eine Freisetzung von reaktionsfähigen Ionen verursachen. Auch Wasser zerfällt in seine ionisierte Form und bildet reaktive Moleküle. Diese Radikale greifen in Stoffwechselvorgänge ein und führen, vorausgesetzt beide DNA-Stränge sind betroffen, zu irreparablen Schäden an

dieser. Durch die Reaktion mit Sauerstoff zu Peroxyden, entsteht noch ein zusätzlicher strahlenverstärkender Effekt. Ein Sauerstoffmangel führt in hypoxischen Zellen zu einer Verlangsamung des Zellzyklus, was bis zu einem Eintritt in die G<sub>0</sub>-Phase führen kann. Da Zellen in diesen Zyklusphasen sehr strahlenunempfindlich sind, führt ein Anstieg des pO<sub>2</sub> indirekt zu einer Erhöhung der Strahlenwirkung in diesen Geweben.

### *1.3.2 in der Chemotherapie*

Seit nunmehr 20 Jahren werden nun auch in Verbindung mit der Chemotherapie erfolgversprechenden Hinweisen *in vitro* [Teicher et al., 1981] und *in vivo* [Teicher et al., 1990] in Kombination mit der HBO nachgegangen. So konnten Teicher et al., nachweisen, dass euoxisches Tumorgewebe (OER >2) besser auf einige Chemotherapeutika reagiert, als hypoxische oder anoxische Zellen (OER < 0.7).

### *1.4 Messverfahren des Sauerstoffpartialdruckes mit der Feinnadel-Gewebe-pO<sub>2</sub>-Histographie*

Seit vielen Jahren wird ein besonderes Augenmerk auf die Oxygenierung solide wachsender Tumoren in der Forschung gelegt. Lange Zeit diente die pO<sub>2</sub> Oberflächensondenmessung der Bestimmung des Gewebe-pO<sub>2</sub>. Hiermit konnten jedoch nur lokale und in oberflächlichen Tumorgebieten bestimmbare pO<sub>2</sub>-Werte gemessen werden. Eine Aussage über die Sauerstoffpartialdruckwerte im Verlauf durch den Tumor hindurch waren nicht möglich [Weiss et al., 1989]. Mit der Feinnadel pO<sub>2</sub>-Histographie steht uns nun seit mehreren Jahren ein Verfahren zur Verfügung, welches je nach Größe des Tumors, zwei- oder auch dreidimensionale pO<sub>2</sub>-Messdaten der interstitiellen Verhältnisse eines Tumors liefern können.

### *1.5 Tumormodell*

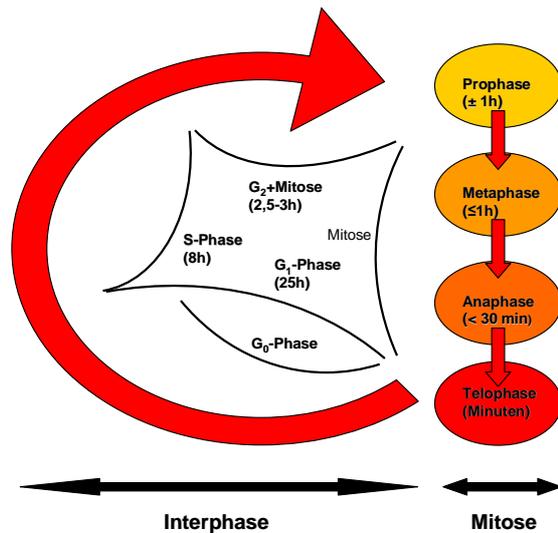
Menschliche Tumorenograften der Zelllinien MX-1 und S 117 auf Nacktmäusen transplantiert, sind etablierte Tumormodelle. Sie werden seit vielen Jahren in der onkologischen Forschung erfolgreich eingesetzt. Durch die Transplantation auf thymusaplastische Mäuse geben sie die Möglichkeit, Untersuchungen an menschlichem Gewebe *in vivo* durchzuführen. Dadurch lassen sich die Ergebnisse leichter auf den Menschen übertragen [Mondovi, 1987].

## 1.6 *Auswirkung der HBO auf das Gewebe*

### 1.6.1 *Zellzyklus und Proliferationsindex*

Zellen des menschlichen Körpers haben eine begrenzte Lebensdauer, sie werden nach einer bestimmten Zeit durch neue Zellen ersetzt. Dieses geschieht bei den meisten Zellen durch die so genannte Mitose. Die Lebensdauer und Teilungshäufigkeit der Zellen schwankt stark; so sind Zellen im Körper vorhanden, die sich selten teilen, wie zum Beispiel Herzmuskelzellen und Nervenzellen. Normalerweise besteht ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Zellteilung und Zelluntergang (steady state). Es kann jedoch auch zu einer vermehrten Neubildung von Zellen kommen, die bei z.B. der Wundheilung physiologisch ist, bei Tumorzellen jedoch das charakteristische unkontrollierte Wachstum zur Folge hat.

Der Generationszyklus der Zelle beginnt und endet mit dem Abschluss der Zellteilung. Ein Generationszyklus gliedert sich in zwei Abschnitte: die Interphase und die anschließende Phase der Mitose und Zytokinese (Kern- und Zellteilung). Dass Tumorzellen eine veränderte mitotische Aktivität im Vergleich zu gesundem Gewebe aufweisen, zeigt sich klinisch durch das schnelle Wachstum der Tumore. Es gibt der Medizin jedoch die therapeutische Möglichkeit, die Zellen in der vulnerablen Phase der DNA-Synthese oder Proteinbiosynthese während der Mitose durch Zellgifte zu zerstören. Zellen die sich also in einer Art Ruhezustand oder G<sub>0</sub>-Phase, sprich sich nicht in der Mitose befinden, sind für Zellgifte auch nur schwer erreichbar. Dieses ist insbesondere der Fall, wenn die Gefäßversorgung und somit die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, bei schnell wachsenden Geweben nicht ausreicht. Diese Zellen sind nun für eine Chemotherapie schwer zugänglich. Eine Arbeitshypothese ist durch eine Erhöhung des physikalisch gelösten Sauerstoffs im Blut durch eine HBO die Tumorzellen aus der G<sub>0</sub>-Phase zur Mitose anzuregen und damit die Vulnerabilität zu erhöhen.



**Abbildung 1: Der Zellzyklus**

Dieser Nachweis soll mittels immunhistochemischer Färbung des Ki67 Antikörpers an Paraffinschnitten behandelter MX-1 Tumoren erbracht werden. Ki67 ist ein Kernmatrixprotein, das in der S- und G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus exprimiert wird, und zeigt den sogenannten Proliferationsindex.

Man weiß aus dem klinischen Alltag, dass menschliche Tumoren einer deutlich höheren Proliferationsrate unterliegen. Die Mechanismen des programmierten Zelltodes sind bei Tumorzellen größtenteils inaktiviert, so dass es zu unkontrolliertem Wachstum kommt. So werden Tumoren durch Ermittlung des Proliferationsindex klassifiziert [Vartanian und Weidner, 1994; Kamijo et al., 2000].

### 1.6.2 *Microvessel Density und Vascularian endothelien growth factor (VEGF)*

Um den Einfluß der HBO auf das Tumorgewebe zu ergründen, wurden auf dem Hintergrund der deutlichen Erhöhung des physikalisch gelösten Sauerstoffes und somit eine mögliche Erhöhung des Proliferationsindexes, die Annahme gestellt, dass die HBO einen Effekt auf die Gefäßneubildung im Tumorgewebe haben könnte. Dieser Nachweis soll einerseits anhand einer immunhistochemischen Färbung des Tumorgewebes mit einem Endothelantikörper CD31 erbracht werden, zum anderen mittels zahlreicher Botenstoffe, die die Gefäßneubildung fördern, vor allem dem VEGF [Gimbrone et al., 1972, Vartanian und Weidner, 1994; Kamijo et al., 2000].

### 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Oxygenierung des Tumorgewebes ist nachweislich ein wichtiger Faktor für die strahlentherapeutische Behandlung [Dische, 1991, 1989; Vaupel et al., 1990]. Für die Chemotherapie ist die HBO und deren Auswirkungen auf den Tumor- $pO_2$  ein bisher weniger erforschtes Gebiet, und es bleibt abzuwarten, ob für die beiden Zelllinien MX-1 und S117 ein geeignetes Chemotherapeutikum in Verbindung mit der hyperbaren Sauerstofftherapie effektiv ist. Es ist daher wichtig zu erfahren, wie sich die Sauerstoffpartialdücke ohne, während und 20 Minuten nach der Therapie verhalten. Neu erworbene Kenntnisse über den intratumoralen  $pO_2$  können bei der Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten oder Modifizierung bewährter Behandlungsschemata von Bedeutung sein [Füller et al., 1994; Stone et al., 1993, Becker et al., 2001].

In dieser Arbeit soll der  $pO_2$  in Verbindung mit der HBO an menschlichen Mammakarzinom- und Schilddrüsensarkomxenograften an der Nacktmaus bestimmt werden.

Auf folgende Fragen soll eine Antwort gefunden werden:

- Welchen Einfluß hat die HBO auf die Tumoroxygenierung?
- Wird der Sauerstoffpartialdruck signifikant erhöht und wie sehen die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien aus?
- Wie verhält sich der  $pO_2$  20 Minuten nach HBO? Ist eine mögliche  $pO_2$ -Erhöhung im Tumor nach 20 Minuten noch messbar? Wie unterschieden sich die beiden Zelllinien voneinander?
- Wie verhält sich der Sauerstoffpartialdruck bei zunehmendem Tumolvolumen?
- Hat die HBO Auswirkungen auf den Proliferationsindex?
- Verändern sich die Microvessel Density und der VEGF-Spiegel unter Therapie?

## 2. Material und Methoden

Die Versuche wurden von der Tierschutzkommission des Landes Schleswig-Holstein genehmigt.

### 2.1 Tumormodell

Bei den hier verwendeten Tumorzelllinien handelt es sich um das menschliche Mammakarzinom MX-1 und das Sarkom S 117. Die MX-1 Zelllinie stammt aus der Tumorbank des National Cancer Institute der USA (Bethesda; USA).

Bei der MX-1 Zelllinie handelt es sich um ein undifferenziertes invasiv, duktales, Östrogen- und Progesteronrezeptor negatives Mammakarzinom. Somit ist das Tumorgewebe unabhängig vom Hormonstatus des Wirtes und kann nach subkutaner Implantation einen Tumor ausbilden. Die Zelllinie stammt von einer 40 jährigen weiblichen kaukasischen Person. Diese Zelllinie ist eine Standardzelllinie für Transplantationen auf Nacktmäuse [Cereani et al., 1982, 1987, 1988].

Die S 117-Zelllinie besteht aus polymorphen Sarkomzellen der Schilddrüse einer weiblichen 47 jährigen Person ohne Tendenz Metastasen auszubilden. Die Zellen neigen gelegentlich zu Nekrosen. Diese Zelllinie ist eine ebenfalls eine Standardzelllinie für Transplantationen. (nicht publiziert, *in vitro* etabliert von Lührke, 1985).

Das Tumormaterial wurde als Zellsuspension vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg geliefert (DKFZ, Institut für Experimentelle Pathologie). Die Tumorzellsuspension wurde bei -70°C transportiert und gelagert. 10%iges Dimethylsulfoxid (DMSO) bewahrte die Zellen vor Gefrierschäden. Zur weiteren Verarbeitung wurde die Suspension in 37°C warmem Wasser unter ständigem Rühren aufgetaut. Dabei durfte die Probe, um die Zellen nicht zu schädigen, eine Temperatur von +4°C nicht überschreiten. Nach dem Auftauvorgang wurde das Gefrierschutzmittel DMSO ausgewaschen, damit es seine enzymschädigende Wirkung nicht entfalten konnte. Anschließend wurden 0,2 bis 0,3 ml der Zellsuspension subkutan in den Nacken einer sechs bis acht Wochen alten thymusaplastischen Nacktmaus injiziert. Innerhalb von 18 -25 Tagen bildete sich eine Tumormasse von ca. 200 mm<sup>3</sup>. Die Maus mit dem ausgebildeten Tumorgewebe wurde getötet und der Tumor unter sterilen Bedingungen

explantiert. In einer mit einem Medium (nach Hanks) gefüllten Petrischale wurden 1x1x1 mm große Tumorstücke zugeschnitten. Zwei bis drei dieser Tumorstückchen wurden zu Anzucht auf den Nacken einer Nacktmaus transplantiert. Zur Narkose der Maus wurde Rompun<sup>®</sup> (BayerVital, Leverkusen) und Nembutal<sup>®</sup> (Sanofi<sup>®</sup>) intraperitoneal appliziert. Hierfür wurden 1ml Nembutal<sup>®</sup> (Phenobarbital-Natrium) mit 9 ml isotonischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 und 1ml Rompun<sup>®</sup> 2 % mit ebenfalls 9 ml isotonischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10 versetzt und anschließend zu einer Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt. Die jeweiligen Maus wurden nach Desinfektion der Haut die Rompun<sup>®</sup>-Nembutal<sup>®</sup>-Lösung intraperitoneal injiziert. Die Injektionsmenge wurde nach dem Gewicht des jeweiligen Tieres errechnet (8 ml/kg KG Nembutal<sup>®</sup> sowie 8 ml/Kg KG Rompun<sup>®</sup> 2 %).

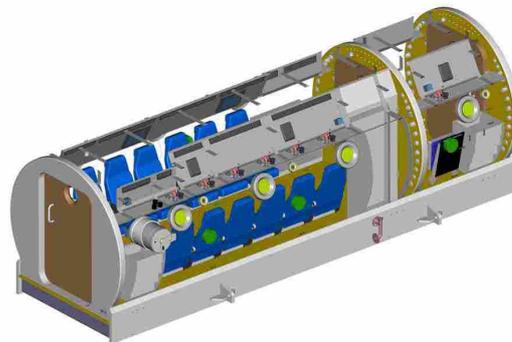
Im ventralen Bereich des Unterschenkels des rechten Hinterlaufs wurde ein kleiner Hautschnitt gesetzt, mit der Kiefernsonde eine Tasche zwischen der Haut und der Sehnenplatte gebildet und ein Tumorstück eingebracht. Die Wunde wurde mit einem Steri – Strip verschlossen [Roszinski et al., 1991; Wiedemann et al., 1992]. Die narkotisierten Tiere wurden bis zum Erwachen unter eine Wärmelampe gelegt. Über einen Zeitraum von drei Tagen wurde prophylaktisch Ampicillin<sup>®</sup> (Ratiopharm GmbH, Ulm Deutschland) ins Trinkwasser gegeben. In 95% Prozent wuchsen die Tumoren an und hatten zu Versuchsbeginn 18 Tage nach Transplantation ein Volumen von ca. 100 mm<sup>3</sup>.

## 2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weibliche, sechs bis acht Wochen alte, thymusaplastische Nacktmäuse (Stamm: Nu-nu) verwendet. Sie wurden in einer Laminar-flow - Anlage in Makrolon-Käfigen (Käfig-Typ 3; Grundfläche = 820 cm<sup>2</sup>, Höhe =14 cm) gehalten. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und pelletiertem Spezialfutter Mäuse-Altromin<sup>®</sup> Standarddiät. In dem keimarmen Raum wurde ein Tag-Nachtrhythmus von einer Zeitschaltuhr automatisch geregelt und betrug jeweils 12 Stunden, die Raumtemperatur lag bei 24° C und es herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 75%. Wegen der hohen Infektionsanfälligkeit der Tiere wurden die Käfige täglich ausgetauscht und mit frischem staubfreien Espenholzeinstreu der Firma Altromin<sup>®</sup> versehen.

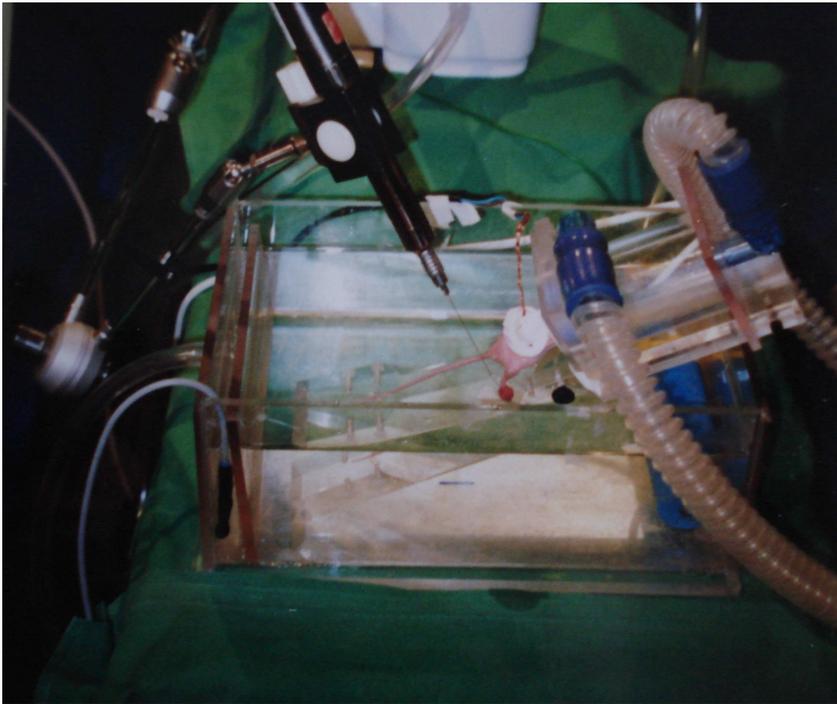
### 2.3 Die Druckkammer

Die hyperbare Sauerstofftherapie wurde bei den Messungen während der HBO in einer stationären Behandlungskammer der Firma Dräger® Modell Hyper5, die für zehn Personen ausgelegt ist, durchgeführt. Das Volumen der Druckkammer beträgt ca. 26.500 Liter mit einer maximalen Tauchtiefe von 50 Metern, entsprechend 5,0 bar (s. Abb 2.)[s Produktbeschreibung Dräger®]. In dieser Druckkammer wurden die Messungen während der HBO durchgeführt. Hierbei wurde die Druckkammer extern durch ausgebildetes Bedienpersonal gesteuert. Die versuchsdurchführende Person wurde vor Beginn der Versuchsreihe einer medizinischen Tauglichkeitsuntersuchung gemäß der Standards der Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin unterzogen [Richtlinie der Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin von 1998 e.V.].



**Abbildung 2: Druckkammer Hyper5 der Firma Dräger®Safety (Abbildungen mit freundlicher Genehmigung der Firma Dräger®Safety)**

Vor der Messung wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Dosis mit Nembutal® und Rompun®, wie oben beschrieben, narkotisiert, so dass die Messung des Sauerstoffpartialdruckes mit der Sonde intratumoralen durchgeführt werden konnte. Hierbei bekamen die Mäuse über eine eigens konstruierte Beatmungsmaske (s. Abb 3) 100% Sauerstoff gemäß Behandlungsprotokoll. Vor und nach der Messung wurden die Mäuse in einem Sauerstoffzelt mit 100%igem Sauerstoff versorgt.



**Abbildung 3: Beatmungsmaske und Wasserbad für die Maus mit Messapparatur**

Hierbei konnten durch Schraubstutzen die Kabelverbindungen des Mikromanipulators und der Gegenelektrode aus der Druckkammer herausgeführt werden und somit der  $pO_2$ -Histogramm für eine Messung unter HBO eingesetzt werden.

Die anderen Behandlungen wurden in einer experimentellen Druckkammer der Firma Dräger<sup>®</sup> mit einem Volumen von ca. 50 l durchgeführt. Auch hier war die Möglichkeit das umgebende Medium durch ein elektronisches Heizelement auf 37°C zu erwärmen. Durch eine Sauerstoffzuführung aus einer Sauerstoffflasche und eine Druckluftzuleitung gab es die Möglichkeit beliebig wechselnde Schemata der HBO durchzuführen. Mit einem Dräger<sup>®</sup> Sauerstoffmessgerät konnte man stets den exakten Sauerstoffpartialdruck ablesen.

## 2.4 Das $pO_2$ -Meßverfahren

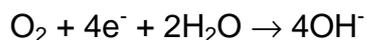
### 2.4.1 Meßapertur [ $pO_2$ – Histogramm 6650, Kimoc]

Zur Messung des Sauerstoffpartialdruckes diente das polarographische Messprinzip mit der Feinnadel- Sauerstoffelektrode mit dem  $pO_2$ -Histogramm 6650 der Firma Eppendorf. Der Histogramm besteht aus einem Sondenstromverstärker mit galvanischer Trennung des Messkreises von der Datenauswertungselektronik, einer Vorrichtung zur Kalibration der Messsonden, einem motorgetriebenen Mikromanipulator zum schrittweisen Vorschub der Sonde im Gewebe und einem integriertem PC zur Steuerung der Sondenkalibration und des Messvorganges, zur Speicherung der Kalibrationsdaten sowie zur Berechnung und Archivierung der ermittelten  $pO_2$ -Werte und deren Auswertung in einem Histogramm. Der Messkreis besteht aus einer  $pO_2$ -Feinnadelsonde, einer indifferenten Gegenelektrode (Kalomelektrode) einem Sondenstromverstärker und einem Strommessgerät. Die Messelektrode ist an einem Mikromanipulator angebracht, welcher in allen Ebenen des Raumes frei beweglich ist, was den Vorteil hat, den Tumor beliebig punktieren zu können. Die Sonde wird mit Hilfe des sogenannten „Pilgerschrittes“ durch das Gewebe geführt. Dadurch können mechanische Einflüsse auf Sondenschaft und Sondenspitze vermieden werden, zudem kann der Gewebe  $pO_2$  unabhängig von den Auswirkungen der Gewebeverdrängung an der Sondenspitze erfassen. Der vollzieht sich wie folgt: Die Sauerstoffsonde wird zunächst 700  $\mu m$  in unberührtes Gewebe vorgeschoben, anschließend ebenso schnell um 300  $\mu m$  zurückgezogen, wodurch sich ein effektiver Vorschub von 400  $\mu m$  ergibt. Die Gewebe-  $pO_2$ -Registrierung erfolgt während eines kurzen Stillstandes (1,5 Sekunden) und wird vom  $pO_2$ -Histogramm erfasst. Durch Vergleich der Messdaten lassen sich Artefakte auf dem Display schnell erkennen. Bei Auftreten von Artefakten sollte die Messung abgebrochen werden. Artefakte können durch fehlerhaftes Messen entstehen, zum Beispiel wenn die Sondenspitze den  $pO_2$  nicht mehr im Tumorgewebe, sondern außerhalb des Tumors misst.

### 2.4.2 Das physikalische Messprinzip

Der Sauerstoffpartialdruck des Tumorgewebes wird mit Hilfe einer Feinnadel- $O_2$ -Elektrode, die von Fleckenstein und Weiss [Weiss und Fleckenstein,

1989] entwickelt wurde, polarographisch gemessen. Hierzu dient eine membranbedeckte, glasisolierte Gold-Mikroelektrode mit einem Durchmesser von 12 µm. Ein Sondenmantel aus Federstahl verhindert ein Abbrechen in umgebendes Gewebe. Die Sonde hat an ihrer Spitze einen Durchmesser von 300 µm und ein Spitzenschliff um die Punktion eines Gewebes zu erleichtern. In die Schliffebene ist durch eine Ätzung ein Rezess eingearbeitet, der durch eine Teflon-Membran (FEP<sup>®</sup>, Du Pont) aufgefüllt ist. Die Membran ist durch ihre Durchlässigkeit für O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und OH<sup>-</sup>Ionen gekennzeichnet die für die Funktion der Messbiologie von Bedeutung ist. Die beschriebene Feinadelsonde wird mit einer Polarisationsspannung von 700 mV gegen eine indifferente Gegenelektrode (Anode) gespannt. Sauerstoff, der durch die Teflonmembran diffundiert, wird an der Kathodenoberfläche reduziert. Sauerstoff, Wasser und amperometrisch bestimmbare Elektronen werden in neutralem bis alkalischem Milieu über H<sub>2</sub>O zu Hydroxylionen umgesetzt [Havas, 1985].



Wird hingegen in Gewebe mit saurem pH-Wert der Sauerstoffpartialdruck ermittelt, läuft an der Sondenspitze eine Umsetzung von Sauerstoff, Wasserstoff und amperometrisch bestimmbaren Elektronen zu Wassermolekülen ab:



Bei ausreichender Polarisierung der Sonde ist an der Goldkathode der pO<sub>2</sub> gleich null. Bei einem positivem pO<sub>2</sub> entsteht ein Konzentrationsgefälle zwischen dem Gewebe und der Kathode. Die Größe des Konzentrationsgradienten ist vom pO<sub>2</sub> des Außenmediums und der Dicke der Membran abhängig. Die Diffusion von Sauerstoff durch die Membran zur Kathode führt durch die Reduktion von Sauerstoff zu einem messbaren Strom. Dieser messbare Strom mit einer Stärke von etwa 0.01 bis 2.00 nA ist proportional zum Sauerstoffpartialdruck im Gewebe. Um die Ermittlung realistischer Gewebe pO<sub>2</sub> –Werte zu ermöglichen, muss die Sonde über eine schnelle Einstellzeit verfügen. Das heißt, sie muss in kürzester Zeit

(innerhalb einer Sekunde) Sauerstoffpartialdruckänderungen wahrnehmen, so dass Einflüsse durch die Sonde nicht die Werte verfälschen.

Die Einstellzeit ( $T_{90}$ ) wird in einem Medium mit bekanntem Sauerstoffpartialdruck bestimmt und liegt bei unserer Feinnadelsonde bei 37,0° C unter 500 msec.  $T_{90}$  ist definiert als die Zeit in Sekunden, die die Meßsonde benötigt, bis sie 90% des bekannten Sauerstoffpartialdruckes angibt.

Da das Teflonmaterial aufquellen muss, sollte die Sonde eine halbe vor Beginn der Messung gewässert werden. Dadurch wird eine hinreichende Durchlässigkeit für  $H_2O$  und  $OH^-$  Ionen gewährleistet. Die Eichung des Sondenstroms erfolgt mittels Zweipunktkalibrierung, wobei die Sonde in ein Kammer eingeführt wird, welche mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt ist. Die Kammer ist dabei für jeweils vier Minuten sauerstofffrei (stickstoffgesättigt), bzw. sauerstoffhaltig. Die Kalibrierung erfasst sowohl den Luft- und Wasserdampfsättigungsdruck, als auch die Temperatur der Kalibrierungskammer und des Tumorgewebes, den Sondenstrom in  $O_2$ -freier,  $N_2$ -gesättigter Kalibrierungslösung, die differentielle Abhängigkeit des Sondenstroms vom  $O_2$ -Druck in der Kalibrierungskammer und die Temperaturabhängigkeit des  $O_2$ -abhängigen Sondenstromanteils. Der Kalibrierungsvorgang wird vor und nach jeder Messung wiederholt. Eine Nachkalibrierung der Sonden erfolgt nach der Untersuchung, diese berücksichtigt zusätzlich die zeitabhängigen Veränderungen (das Driften) des sauerstoffabhängigen und des nicht sauerstoffabhängigen Sondenstroms durch lineare Interpolation. Die technischen Daten der Sonde sind in Tabelle 1 auf der folgenden Seite aufgeführt.

Temperatur-Querempfindlichkeit	2,44 % / °C
Empfindlichkeit	6 ± 3.0 pA/mmHg
Stromverhältnis von O <sub>2</sub> -freier zu O <sub>2</sub> -gesättigter	< 10% vom Luftwert
Konvektionsabhängigkeit des Stromes	< 5%
Ansprechzeit auf pO <sub>2</sub> – Änderungen	< 500 ms ( T90 )
Stromdrift bei konstantem pO <sub>2</sub>	< 10% /h
pH Querempfindlichkeit	± 1% ( pH 6,5 - 9,5 )

**Tabelle 1: Technische Daten der Sonde in 0,9%iger NaCl-Lösung und mit einer Polarisation von -700 mV gegen eine Ag/AgCl-Referenzelektrode (Herstellerangaben)**

#### 2.4.3 Die Referenzelektrode

Für die Sauerstoffmessung wurden Kalomelektroden verwendet, die sich aus drei Bauelementen zusammensetzt: Ein dünner, von einem Kristallgemisch aus Quecksilberchlorid (Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) umgebener Silber- oder Platindraht. Der Draht ist mit einem Glasröhrchen umhüllt, welches mit einer drei molaren Kaliumchloridlösung aufgefüllt ist. Eine poröse Keramik verschließt das Glasröhrchen, durch die eine Verbindung zwischen der Fülllösung der Referenzelektrode und der Probelösung besteht. Die Polarisationsspannung der Referenzelektroden soll möglichst konstant und von der Konzentration der zu messenden Ionen oder Moleküle unabhängig sein.

## 2.5 Tumolvolumenbestimmung

Das Tumolvolumen wurde anhand der Hemiellipsoidformel ermittelt. Die größte Höhen-, Längen-, und Breitendurchmesser wurden mit einer herkömmlichen Messschieber gemessen. Bei der Höhenbestimmung mussten unter Berücksichtigung der Anatomie der Mäusepfote 2 mm vom gemessenen Wert abgezogen werden, da das Tumorgewebe exophytisch oberhalb des Fußskelettes und der Muskelsehnenplatte wuchs. Eine Ausbreitung in die Tiefe und eine Ummauerung der Pfote durch Tumorgewebe wurden nicht beobachtet. Im Folgenden die Hemiellipsoidformel mit der sich Tumolvolumina errechnen lassen:

$$Y = \frac{\pi \cdot l \cdot w \cdot h}{6}$$

### **Formel 3: Hemiellipsoidformel**

**l = Länge; w = Breite; h = Höhe**

## 2.6 Versuchsaufbau

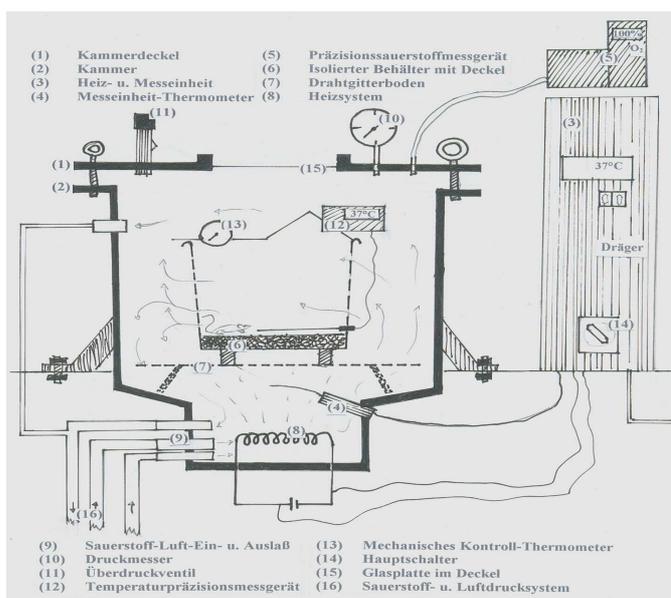
Für die einzelnen Therapiemodalitäten wurden Versuchsgruppen aus mindestens zehn Tieren angestrebt.

### 2.6.1 Hyperbare Sauerstoffbehandlung ( HBO )

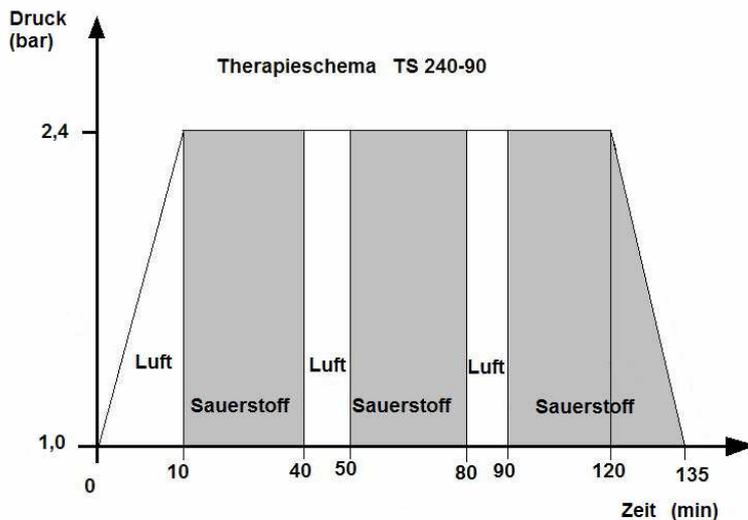
Im Mittelpunkt der Untersuchungen steht der Einfluss einer HBO auf die Tumoroxygenierung. Die Mäuse wurden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit der HBO behandelt und an Tag eins und fünf der pO<sub>2</sub> gemessen. Die Messungen während der HBO wurden in einer Patientendruckkammer der Firma Dräger® durchgeführt, so dass ausreichend Platz für den Versuchsaufbau gegeben war. Die Tiere bekommen nach dem Schema TS 240-90 während einer Therapie 3x30 Minuten 100% Sauerstoff bei einem Druck von 2,4 bar (dies entspricht 1,4 bar Überdruck) [Leitch et al., 1982]. Zwischen den Sauerstoffphasen wurde eine zehn minütige Sauerstoffpause eingehalten, um die Gefahr einer Sauerstofftoxizität zu vermeiden [De Martino et al, 1988]. Dieses ist einer der allgemein gebräuchlichen Zyklen einer HBO Behandlung (s. Abb. 5, Seite 26). Hierzu kamen die 15-minütige Kompressionsphase unter Luftatmung und die ebenfalls 15-minütige

Dekompressionsphase mit Atmung von 100%-igem Sauerstoff. Die Mäuse wurden während der 30-minütigen O<sub>2</sub>-Phasen in einem Spezialkäfig in ein Sauerstoffzelt gestellt, damit die Atmung von 100%-igem Sauerstoff gewährleistet werden konnte. Die O<sub>2</sub>-Zufuhr wurde durch ein manuell bedienbares Ventil und durch die automatische Kammersteuerung geregelt. Während der Messung wurde die narkotisierte Maus mit einer speziell entwickelten und regelbaren Beatmungskammer mit reinem Sauerstoff beatmet, so dass auch während der pO<sub>2</sub>-Messung die HBO Behandlung der Maus weitergeführt werden konnte und die sonst in der Kammer herrschende Druckluft keine Verfälschung der Daten verursachen konnte. Der auf der rechten Hinterpfote wachsende Tumor wurde in ein Wasserbad von 37°C eingetaucht, um somit eine auf den Menschen übertragbare Temperatur sicherzustellen. Hierfür wurde ein durch einen Thermofühler überwachter und mit einer elektronisch geregelten Heizung versorgter Wasserkreislauf eingesetzt. Während einer Druckkammerfahrt konnten aufgrund des technischen Aufwandes nur maximal 5 Mäuse gemessen werden.

Die HBO-Behandlungen während denen keine pO<sub>2</sub>-Messungen vorgenommen wurden, fanden in der experimentellen Druckkammer statt (s. Abb. 4). Durch die technischen Möglichkeiten in der experimentellen Druckkammer waren wir in der Lage, die Fahrt einer Patientenkammer nachzuahmen. Auch hier wurden die zehnminütigen Sauerstoffpausen und die Kompressions- und Dekompressionszeiten eingehalten.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der experimentellen Druckkammer der Firma Dräger (nach Poll R, 2006)**



**Abbildung 5: HBO- Schema TS 240-90**

### 2.6.2 Versuchsgruppen

Bei der Arbeit sollten der Einfluss der hyperbaren Sauerstofftherapie auf Tumorenograften der Zelllinien MX-1 und S 117 untersucht werden. Hierbei wurde insbesondere das Verhalten des Sauerstoffpartialdruckes, die Zellproliferation sowie die Microvessel Density untersuchen:

- Welchen Einfluss hat die HBO auf den Sauerstoffpartialdruck des Tumorgewebes?
- Wie verhält sich das Tumolvolumen der mit HBO behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe?
- Verstärkt eine HBO das Tumorstadium signifikant oder verursacht es sogar eine Tumoregression

Ist die Oxygenierung der Tumoren 20 Minuten nach HBO ausreichend, um eine anschließende Strahlentherapie zu rechtfertigen?

Ist diese Methode der Sauerstoffmessung unter HBO in Verbindung mit diesen Tumormodellen geeignet, um weiterführende Experimente durchzuführen?

Bei der Therapieplanung und Aufstellung des Versuchsprotokolls wurden die in der Klinik üblichen Behandlungsschemata der HBO berücksichtigt.

Es wurden folgende Gruppen untersucht: Kontrollgruppen beider Zelllinien MX-1 und S117 ( $pO_2$ -Messung ohne HBO), HBO-Gruppen beider Zelllinien

(pO<sub>2</sub>-Messung während der 3x30 minütigen HBO) sowie HBO-Gruppen beider Zelllinien mit Messung des pO<sub>2</sub> 20 Minuten nach der HBO. Die immunhistochemischen Färbungen und die VEGF-Bestimmungen wurden am MX-1 Tumor in der Kontrollgruppe und der HBO-Gruppe durchgeführt.

### 2.6.3 Messverfahren

Zur Narkose wurde eine intraperitoneale Injektion mit einer Dosis von 16 ml pro kg Körpergewicht zu Beginn des Versuchs durchgeführt. Das Lösungsgemisch bestand aus Pentobarbital (2mg/ml) und Rompun® (1mg/ml) in physiologischer Kochsalzlösung, welche jeweils in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt wurden. Die narkotisierten Tiere wurden mit Klebestreifen auf einem speziellen Plexiglasträger fixiert, wobei sich die tumortragende Pfote und der Schwanz der Maus in einem auf 37°C erwärmten Wasserbad befanden. Die zu beatmenden Tiere die unter HBO untersucht wurden, wurden zusätzlich mit dem Köpfchen in eine Beatmungsmaske gelegt. Der Hals der Maus wurde mit einer Gummimanschette umgeben, um das Entweichen von O<sub>2</sub> und damit verbundene erhöhte Sauerstoffwerte in der Umgebungsluft der Druckkammer zu vermeiden. Die Referenzelektrode wurde auf den Rücken der Maus aufgeklebt, dann mit der pO<sub>2</sub>-Meßsonde der Tumor punktiert. Wegen der geringen Tumorgöße (Durchmesser von ca. 7 mm) wurde der Vorschub des Mikromanipulators von üblicherweise 700 µm auf 400 µm verkürzt. Dieses wurde in Anlehnung an frühere Arbeiten und aufgrund histologischer Untersuchungen [Schramm et al., 1990], die ergeben hatten, dass durch den Vorschub der Sonde bis zu einer Distanz von 70 µm vor der Sondenspitze eine Zone stark komprimierten Gewebes entsteht. Bis zu einer Entfernung von 200 µm ließen sich durch den Druck der Sonde verursachte leichte Kompressionseffekte feststellen, die mit zunehmender Entfernung abnahmen. Weiter entferntes Gewebe blieb histologisch unverändert. Je nach Größe des Tumors ließen sich bis zu 25 Messwerte innerhalb des Tumors ermitteln. Um die angestrebte Anzahl der Messwerte von mindestens n=60 zu erreichen, mussten mehrere Stichkanäle in einem Tumor durchmessen werden. Um zu häufiges Punktieren des Tumors zu vermeiden, wurde die um 45° im Gewebe gedreht, so dass die Messwerte im einem neuen Stichkanal gemessen werden konnten.

Während der Aufwachphase lagen die Tiere unter einer Infrarotlampe, mit der ein übermäßiges Auskühlen der Tiere vermieden werden sollte.

#### 2.6.4 Versuchsprotokoll

Die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff erstreckte sich über die ersten fünf Tage. Die  $pO_2$ -Messungen wurden an Tag eins und fünf, zusätzlich an Tag acht und zwölf durchgeführt. Weiterhin wurde vor jeder HBO das Gewicht bestimmt. Außerdem wurden an Tag eins und vier das Tumolvolumen ermittelt. Das Tumolvolumen wurde weiterhin an jedem ersten und vierten Tag der darauf folgenden Wochen bestimmt. Der Beobachtungszeitraum der Gruppen wurde insgesamt auf 28 Tage festgelegt. Bei einem Überschreiten des Tumolvolumens über  $1500 \text{ mm}^3$  wurden die Beobachtungen vorzeitig beendet. Da bei einigen Tieren dieses Volumen schon vorzeitig überschritten wurde, konnte nicht bei allen Tieren die 28-tägige Beobachtungszeit erreicht werden.

Bei der Gruppe II wurden die  $pO_2$ -Messungen während der HBO durchgeführt, in Gruppe III 20 Minuten nach Abschluss der Therapie.

In den Gruppen mit immunhistochemischer Färbungen mit den ki-67 und CD31-Antikörpern wurde nach Versuchsprotokoll die Behandlung der Tiere durchgeführt, unmittelbar nach Ende der hyperbaren Therapie wurden die Tumoren abgenommen und in 1%iger Formaldehydlösung fixiert.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über Therapie und Messtage.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tumolvolumenmessung	x			x				x				x
$pO_2$ -Messung	x				x			x				x
HBO	x	x	x	x	x							

**Tabelle 1: Tabelle der Einzelmessungen bezogen auf die verschiedenen Tage, MX-1 Tumor und S117 Tumor**

### 2.6.5 Immunhistochemische Aufarbeitung

Zur Evaluation des Wachstumsverhaltens sowie der Gefäßneubildung wurden an den einzelnen Versuchstagen laut Versuchsprotokoll, in den HBO-Gruppen direkt nach der hyperbaren Sauerstofftherapie, die Tumoren von den Tieren in Narkose entfernt. Hierzu wurde den Tieren mit einem Skalpell (Nr. 11) und einer Pinzette nach vorheriger Desinfektion mit Cutasept® der Tumor entfernt. Der entnommene Tumor wurde sofort in 1%iger Formalinlösung für 24 Stunden fixiert. Nach ausreichender Fixierung wurden die Präparate in Kunststoffeinbettkassetten in Paraffin eingebettet, in 5 µm Dünnschnitte geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Zur ki-67 Färbung wurde das Detektionskit K 5001 der Firma DAKOCytomation® Corp. verwendet. Für die CD31 Anfärbung wurde nach der CSA-Methode (Catalysed Signal Amplification) gearbeitet (Firma DPC Biermann). Beide Färbungen wurden mit dem Autostainer® der Firma DAKOCytomation® durchgeführt. Zunächst erfolgte das Entparaffinieren mit einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 100%, 96%, 96%, 70% für jeweils 2-3 Minuten) mit Xylol insgesamt dreimal. Anschließend wurde mit Millipore®-Lösung gespült. Zur Antigendemaskierung wurden die Objektträger mit Zitronensäurepuffer (pH 6,0) für 15 Minuten in der Mikrowelle bei 600 Watt erwärmt. Im bestückten Autostainer® erfolgte die Inkubation mit entweder dem ki-67 oder CD31 Primärantikörper in einer 1:100 Verdünnung mit Antibody Diluent. Bei Raumtemperatur wurde der ki-67 Antikörper für 25 Minuten inkubiert, der CD31 Antikörper für 60 Minuten und anschließend mit Waschpuffer gespült. Danach folgte die Inkubation mit einem biotinylierten Brückenantikörper für 10 Minuten für den ki-67 Antikörper, 25 Minuten beim CD31 Antikörper bei Raumtemperatur und anschließendes Spülen mit Waschpuffer. Es folgte die Blockierung der Peroxidase mittels Blockierungsreagenz für 5 Minuten und erneutes Spülen mit Waschpuffer. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Enzym-Konjugat (CM StrepHRP) für 10, bzw. 15 Minuten, danach Spülen mit Waschpuffer. Anschließend Färbung mit Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid als Chromogen-Substrat für zweimal 5 Minuten, danach Spülen mit Waschpuffer.

Nach diesen Vorgängen wurden bei der ki-67 Anfärbung die Präparate mit Mayer's Hämatoxylin für eine Minute gegengefärbt und 10 Minuten unter fließendem Wasser gespült.

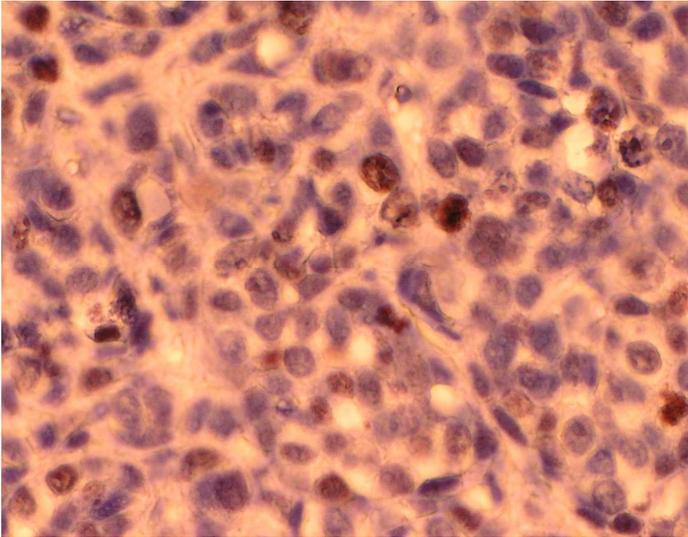
Bei der CD-31 Anfärbung schloss sich eine Verstärkungsreaktion mit biotinmarkiertem Tyramin an. Es folgte eine Inkubation Streptavidin-Peroxidasekonjugat für 15 Minuten und anschließende Färbung mit DAB-Substrat-Chromogen. Auch hier erfolgte eine abschließende Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Die Objektträger wurden mit Aquatex<sup>®</sup> und Omnilab<sup>®</sup>-Deckgläsern (24x40 mm) eingedeckelt.

Die Präparate wurden dann unter einem binokularen Olympus<sup>®</sup>-Mikroskop mit einer Vergrößerung von 10x40 mit einer Olympus<sup>®</sup>- Fotokamera digital abfotografiert. Hierzu wurden in der Übersichtsvergrößerung (ca. 40-fach) die so genannten „hotspots“ aufgesucht (d.h. Areale mit starker ki67 positiver Anfärbung), und mit einer Vergrößerung von 10x40 abfotografiert. Insgesamt wurden von jedem Tumor drei hotspots abfotografiert, diese dann 1,4-fach vergrößert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm Scion Image<sup>®</sup> der Scion<sup>®</sup> Corp., USA manuell ausgezählt. Die Auswertung erfolgte blind durch drei unterschiedliche Personen. Hierzu wurde eine Zählung der ki-67 positiven Zellen und der ki67 negativen Zellen vorgenommen, um den Proliferationsindex des Tumors zu bestimmen.

$$\text{Proliferationsindex in Prozent} = \frac{\text{Zahl der positiv gefärbten Zellen} \times 100}{\text{Gesamtzahl der Zellen}}$$

**Formel 4: Bestimmung des Proliferationsindexes.**



**Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung anti-Ki67 Histologie eines MX-1 Tumorschnittes, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Fotoaufnahme bei ca. 40 facher Vergrößerung)**

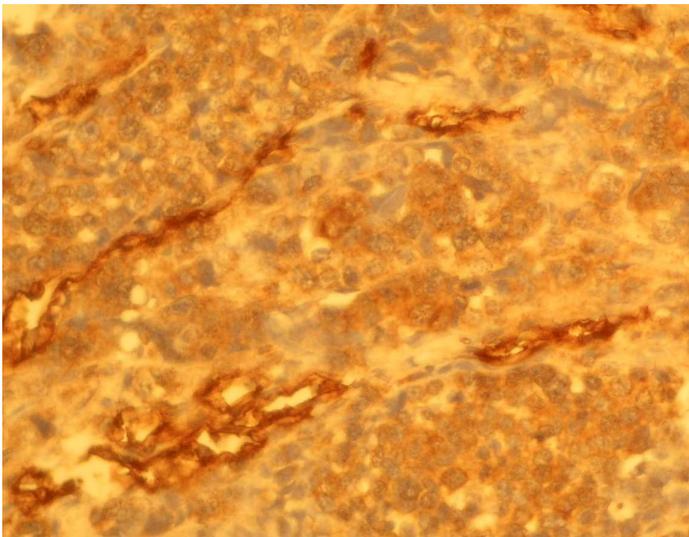
Für die CD31-Anfärbung wurde nach der CSA-Methode (Catalysed Signal Amplification) gearbeitet (Firma DPC Biermann). Durch den CD31-Antikörper ist es möglich, in den Gewebsschnitten Endothelzellen anzufärben. Der CD31 Antikörper ist ein Ratte-Anti-Maus-Antikörper (Primär-Antikörper, 1ml, Fa. DPC Biermann). Das CSA System beruht auf der so genannten ABC-Peroxidasetechnik (Avidin-Biotin-Complex), welche sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze macht. In unseren Versuchen das Streptavidin eingesetzt. Der monoklonale Primärantikörper bindet an das korrespondierende Antigen im Gewebsschnitt. Er wird von einem biotinmarkierten Sekundär- oder Brückenantikörper erkannt. Anschließend wird ein Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (HRP) hinzugegeben. Dieser Komplex bindet an das Biotin des Brückenantikörpers. Zur Verstärkung der Reaktion wird bei der CSA-Methode die Meerrettichperoxidase verwendet. Zum biotinylierten Tyramid wird die Peroxidase hinzugefügt, welche die Radikalreaktion katalysiert. In mehreren Schritten werden die Peroxidase- und Biotinmoleküle am Ort des Antigens gebunden, wodurch eine deutlichere Farbintensität und eine erhöhte Nachweisempfindlichkeit resultieren.

Für die Ermittlung der Microvessel Density wurden zunächst in einer 10x20 Vergrößerung die Hotspots des Tumors aufgesucht. Auch hier wurden drei

Aufnahmen pro Tumor durchgeführt. Die Auswertung erfolgte wie bei der Bestimmung des Proliferationsindex blind von drei unterschiedlichen Personen. Die CD31 positive Fläche wurde zur Bestimmung der Microvessel Density durch die Gesamtfläche des Bildes geteilt.

$$\text{Microvessel Density in Prozent} = \frac{A_{(\text{CD31})}}{A_{(\text{total})}}$$

**Formel 5: Bestimmung der Microvessel Density.**



**Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung anti-CD 31 Histologie eines MX-1 Tumorschnittes, Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Fotoaufnahme bei ca. 40 facher Vergrößerung) zur Ermittlung der Microvessel Density.**

### *2.6.6 VEGF- Bestimmung*

Zur VEGF-Bestimmung wurde retrobulbär mit einer heparinisierten Kapillare Blut abgenommen. Dieses wurde an den verschiedenen Versuchstagen gemäß Protokoll am MX-1 Tumor vorgenommen. Hierfür wurden die Mäuse wie oben beschrieben am jeweiligen Behandlungstag zunächst mit Sauerstoff therapiert bzw. die Kontrollgruppen ohne Sauerstofftherapie mit dem oben genannten Narkosegemisch (Nembutal und Rompun®) intraperitoneal narkotisiert. Circa 1 ml Vollblut der Mäuse wurde in einem Eppendorfgefäß bei 3000 Umdrehungen pro Minute für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum sofort bei -18°C tiefgefroren.

Zur Bestimmung der VEGF-Konzentration in den Serumproben wurde der Immunoassay „Quantikine®“ (Fa. R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) verwendet. Nach dem „Sandwich-Verfahren“ wird das Serum in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben, wobei die Kunststoffoberflächen der Vertiefungen mit Fab-Bindungsstellen monoklonaler VEGF-Antikörper überzogen sind. Diese Antikörper binden die in der Probe enthaltenen VEGF-Proteine. Nach Entfernen ungebundenen Materials durch Waschen wird gebundenes VEGF-Protein mit einem zweiten Antikörper inkubiert, an den das Enzym „Meerrettich-Peroxidase“ kovalent gekoppelt ist. Nach einem erneuten Waschvorgang wird ein farbloses Substrat, bestehend aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin in die Vertiefungen gegeben, wodurch über den Sekundärantikörper eine Farbreaktion hervorgerufen wird. Als Maß für die Substratumwandlung und damit für die VEGF-Konzentration des Mediums wird die optische Dichte der Farblösung herangezogen.

### *2.6.7 Datenverarbeitung*

Die während des Messvorganges registrierten pO<sub>2</sub>-Werte wurden von dem pO<sub>2</sub>-Histogrammen in ein Histogramm übertragen und die Daten auf einer Datendiskette abgespeichert.

Die Daten sind dann mit dem Programm pO<sub>2</sub>-Pool® von Eppendorf auf einen Microsoft Windows® gestützten Computer übertragen worden. Mit diesem Programm ist es möglich, die Daten einzelner Mäuse zu poolen, das heißt die Daten einzelner Mäuse miteinander zu kombinieren und sie in ein Microsoft EXCEL® Format zu konvertieren. Diese Daten wurden dann von Messartefakten befreit und mit den statistischen Programmen SPSS® und

Microsoft EXCEL 2003<sup>®</sup> ausgewertet. Zur Erstellung der Grafiken wurde das Programm Sigma-Plot<sup>®</sup> verwendet.

Die Beratung bei der statistischen Auswertung unserer Versuche wurde von Institut für Biometrie und Statistik durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

Aus anderen Arbeiten mit Messung des Sauerstoffpartialdruckes mittels  $pO_2$ -Histographie ist bekannt, dass die lokalen  $pO_2$ -Werte nicht im Sinne einer Gaußschen Glockenkurve normalverteilt sind. Die einzelnen Messwerte, die beim Vorschub der Sonde durch den Tumor ermittelt wurden, werden deshalb in definierten Bereichen (Klassen) als Histogramm dargestellt. Sie stellen die relative Häufigkeit der Messwerte dar. Bei der Auswertung der gewonnenen Messdaten wurde daher, wie allgemein üblich, nicht der arithmetische Mittelwert, sondern der Medianwert der Sauerstoffdrucke berechnet. Aus den so für jeden Tumor errechneten Medianwerten wurde der Median aller Tumoren einer Versuchsgruppe für den jeweiligen Versuchstag bestimmt. Diese Medianwerte wurden dann zum Vergleich der Versuchsgruppen herangezogen. Die im Weiteren genannten  $pO_2$ -Werte sind also immer Medianwerte.

Da die Tumorumfänge und die intratumoralen pH-Werte normalverteilt waren, wurde der arithmetische Mittelwert für die jeweiligen Versuchsgruppen berechnet und für die statistische Auswertung benutzt. Im Folgenden sind die untersuchten Versuchsgruppen aufgelistet. In Klammern sind die im Text verwendeten Abkürzungen für die einzelnen Gruppen angegeben (s. Tabelle 2 und 3).

1. Kontrollgruppe MX-1 (Ko S117)
2. Kontrollgruppe S117 (Ko MX-1)
3. Behandlungsgruppe MX-1 mit HBO und Messung während der Behandlung (HBO MX-1)
4. Behandlungsgruppe S117 mit HBO und Messung während der Behandlung (HBO S117)
5. Behandlungsgruppe MX-1 mit HBO und Messung 20 Minuten nach Behandlung (HBO+20 MX-1)
6. Behandlungsgruppe S117 mit HBO und Messung 20 Minuten nach Behandlung (HBO+20 S117)

In Tabelle 2 und 3 wird ein Überblick über die Versuchsergebnisse gegeben. Es sind die Medianwerte der Sauerstoffpartialdrucke ( $pO_2$  in mmHg) und die Mittelwerte der Tumervolumina (Tu.-Vol in  $mm^3$ ) dargestellt. Die Standardabweichungen sind jeweils der Einfachheit halber in Klammern unter den Werten dargestellt.

<b>Tag</b>	<b>Ko MX-1</b> <b>(n=11)</b>	<b>Ko S117</b> <b>(n=13)</b>	<b>HBO MX-1</b> <b>(n=14)</b>	<b>HBO S117</b> <b>(n=11)</b>	<b>HBO+20</b> <b>MX-1</b> <b>(n=13)</b>	<b>HBO+20</b> <b>S117</b> <b>(n=10)</b>
<b>1</b>	6,3 (2,1)	9,3 (6,7)	15,3 (10,3)	48,6 (20,7)	10,9 (13,5)	15,9 (8,5)
<b>5</b>	2,5 (3,5)	16,8 (7,1)	15,2 (13,3)	22,7 (6,2)	5,1 (10,1)	26,1 (17,5)
<b>8</b>	1,5 (9,7)	23,6 (10,9)	5,1 (3,0)	22,4 (17,4)	2,6 (8,5)	14,7 (12,0)
<b>12</b>	6,8 (7,1)	24,8 (13,3)	3,8 (2,4)	15,4 (8,7)	3,3 (3,2)	21,7 (14,3)

**Tabelle 2:  $pO_2$ -Medianwerte an den Tagen 1, 5, 8, und 12 für die einzelnen Versuchsgruppen. Der Sauerstoffpartialdruck ist in mmHg angegeben, die Standardabweichungen sind in Klammern aufgeführt.**

<b>Tag</b>	<b>Ko MX-1 (n=11)</b>	<b>Ko S117 (n=13)</b>	<b>HBO MX-1 (n=14)</b>	<b>HBO S117 (n=11)</b>	<b>HBO+20 MX-1 (n=13)</b>	<b>HBO+20 S117 (n=10)</b>
<b>1</b>	312 (102,1)	202 (166,3)	216 (47,8)	129 (43,2)	437 (267,0)	110 (32,1)
<b>5</b>	575 (151,8)	213 (68,1)	338,8 (67,3)	186 (70,5)	619 (383,5)	158 (57,5)
<b>8</b>	841 (301,4)	338 (124,5)	612 (189,7)	264 (118,3)	626 (281,1)	250 (68,2)
<b>12</b>	1046 (442,6)	429 (144,8)	503 (99,6)	378 (141,4)	693 (321,6)	344 (87,9)

**Tabelle 3: Mittelwerte der Tumervolumina an den Tagen 1, 5, 8, und 12 für die einzelnen Versuchsgruppen. Das Tumervolumen ist in mm<sup>3</sup> angegeben, die Standardabweichungen sind in Klammern aufgeführt.**

### 3.1 Die einzelnen Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf

#### 3.1.1 Die MX-1-Gruppen

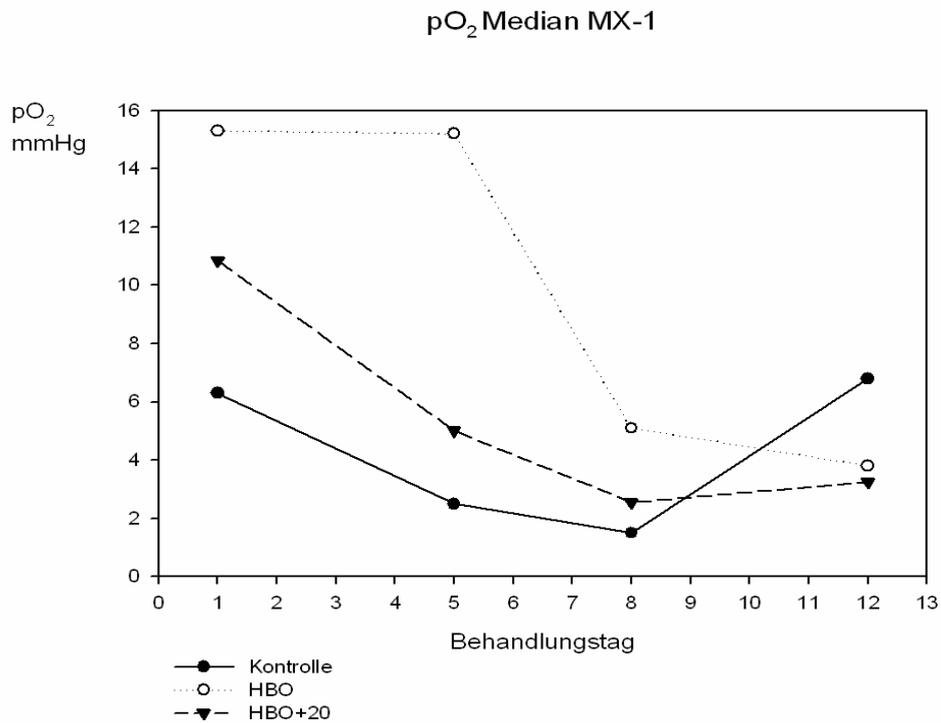


Abbildung 8: pO<sub>2</sub>-Medianwerte in mmHg der MX-1-Gruppen im Verlauf (Werte s. Tabelle 2)

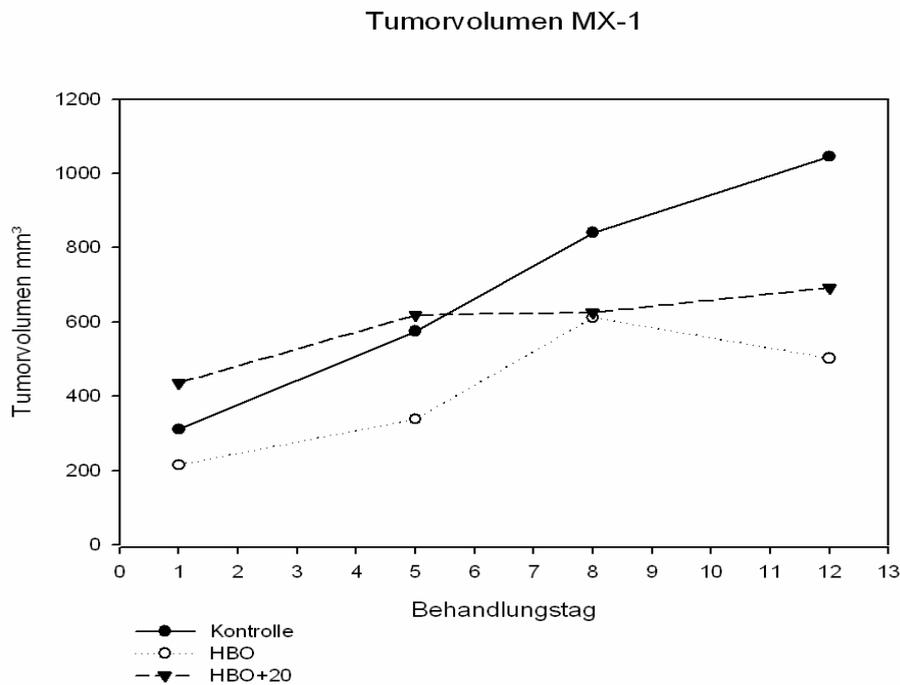


Abbildung 9: Tumorzvolumenmittelwerte in mm<sup>3</sup> der MX-1-Gruppen im Verlauf (Werte s. Tabelle 3)

#### Sauerstoffpartialdruck der MX-1-Kontrollgruppe (Abb. 8)

An Tag eins wurde in der MX-1-Kontrollgruppe ein Medianwert von 6,3 mmHg gemessen. An Tag fünf betrug der Median 2,5 mmHg, an Tag acht sank der Wert auf 1,5 mmHg und stieg am zwölften Tag auf 6,8 mmHg an.

#### Tumorzvolumen der MX-1-Kontrollgruppe (Abb. 9)

Der Mittelwert der Tumorzvolumina an Tag eins betrug 312 mm<sup>3</sup> und stieg im Verlauf bis zum fünften Tag auf 575 mm<sup>3</sup>. An Tag acht konnten wir im Mittel 841 mm<sup>3</sup> messen, an Tag zwölf erreichte er 1046 mm<sup>3</sup>. Der Wert der relativen Tumorzvolumenänderung an Tag zwölf bezogen auf Tag fünf betrug (T12/T05) 1,82.

#### Sauerstoffpartialdruck der MX-1-HBO-Gruppe (Abb. 8)

Am ersten Tag wurde in der MX-1 HBO-Gruppe ein Medianwert von 15,3 mmHg gemessen. An Tag 5 betrug er 15,2 mmHg, an Tag 8 fiel er auf 5,1 mmHg und stieg dann am Tag 12 wieder auf 3,8 mmHg an.

#### Tumorzvolumen der MX-1-HBO- Gruppe (Abb. 9)

Der Mittelwert an Tag eins betrug 215 mm<sup>3</sup> und stieg am fünften Tag auf 339 mm<sup>3</sup>. An Tag acht wurde im Mittel 612 mm<sup>3</sup> gemessen, wobei er an Tag zwölf auf 503 mm<sup>3</sup> abfiel. Die relative Tumorzvolumenänderung an Tag zwölf bezogen auf Tag fünf betrug (T12/T05) 1,2.

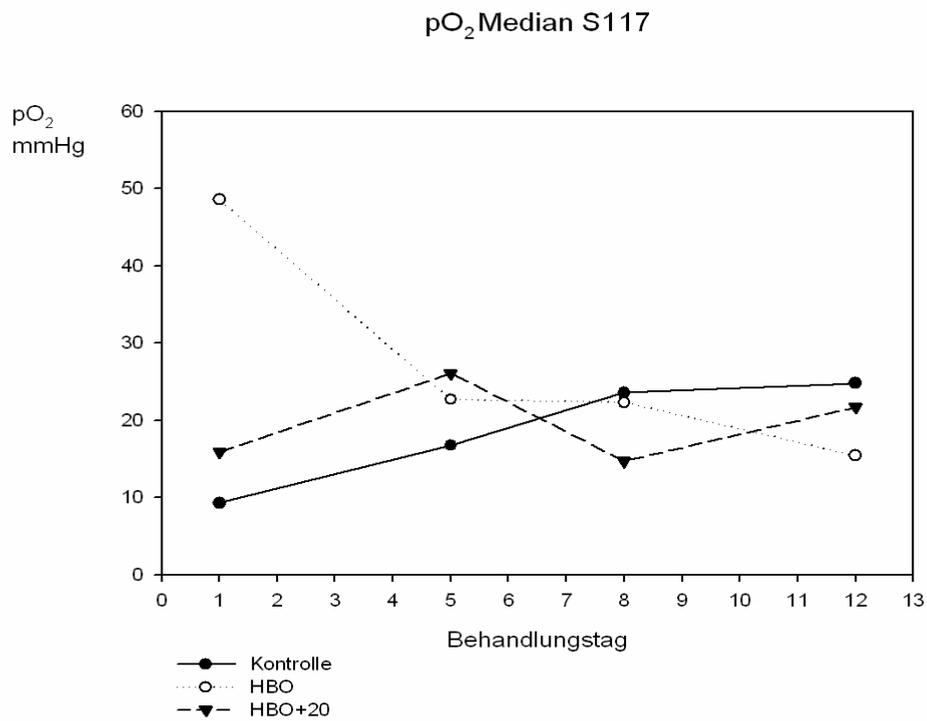
#### Sauerstoffpartialdruck der Gruppe MX-1-HBO+ 20 Minuten (Abb. 8)

An Tag eins betrug der Medianwert in der Gruppe MX-1 HBO+ 20 Minuten 10,9 mmHg. An Tag 5 war er 5,1 mmHg, an Tag 8 lag er etwas niedriger bei 2,6 mmHg und stieg leicht an Tag 12 auf 3,3 mmHg.

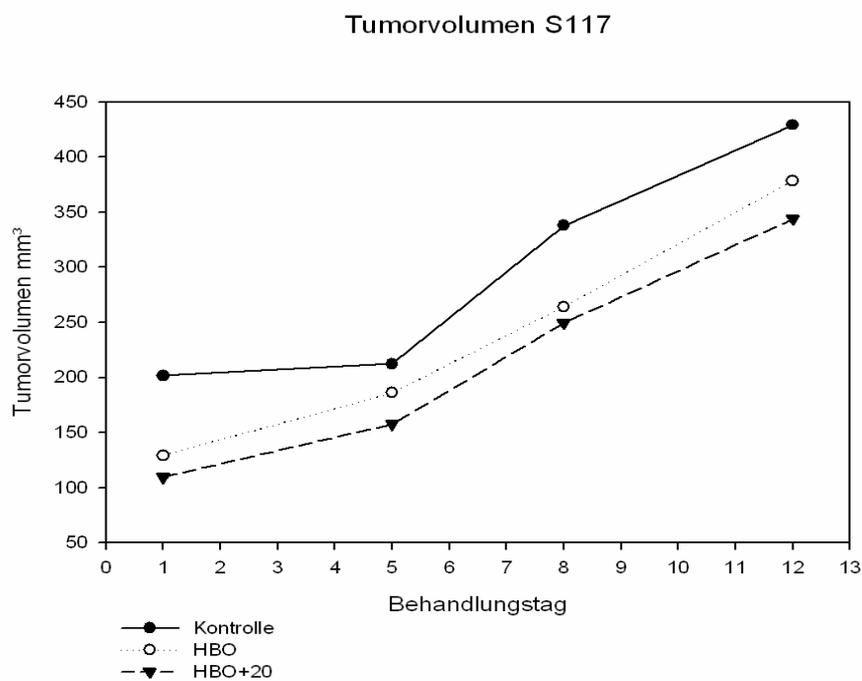
#### Tumorzvolumen der Gruppe MX-1-HBO+ 20 Minuten (Abb. 9)

An Tag eins wurden 437 mm<sup>3</sup> gemessen, am fünften Tag 619 mm<sup>3</sup>. An Tag acht war der Mittelwert 626 mm<sup>3</sup>, an Tag zwölf stieg er auf 692 mm<sup>3</sup>. Der Wert der relativen Tumorzvolumenänderung betrug hier (T12/T05) 1,6.

### 3.1.2 Die S117-Gruppen



**Abbildung 10: pO<sub>2</sub>-Medianwerte in mmHg der S117-Gruppen im Verlauf (Werte s. Tabelle 2)**



**Abbildung 11: Tumorzvolumenmittelwerte in mm<sup>3</sup> der S117-Gruppen im Verlauf (Werte s. Tabelle 3)**

Sauerstoffpartialdruck der S117-Kontrollgruppe (Abb. 10)

Zu Beginn wurde in der S117-Kontrollgruppe ein Medianwert von 9,3 mmHg gemessen. An Tag 5 stieg er auf 16,8 mmHg, an Tag 8 wurden 23,6 mmHg gemessen und stieg dann am Tag 12 auf 24,8 mmHg an.

Tumorzvolumen der S117-Kontrollgruppe (Abb. 11)

An Tag eins betrug der Mittelwert  $202 \text{ mm}^3$  und stieg am fünften Tag leicht auf  $213 \text{ mm}^3$ . An Tag acht haben wir im Mittel  $338 \text{ mm}^3$  gemessen, an Tag zwölf erreichte er  $429 \text{ mm}^3$ . Die relative Tumorzvolumenänderung an Tag zwölf bezogen auf Tag fünf betrug  $(T_{12}/T_{05}) 1,99$ .

Sauerstoffpartialdruck der S117-HBO-Gruppe (Abb. 10)

An Tag eins betrug der Medianwert in der S117-HBO-Gruppe 48,6 mmHg. An Tag 5 war er 22,7 mmHg, an Tag 8 fiel er etwas auf 22,4 mmHg und lag an Tag 12 bei 15,4 mmHg.

Tumorzvolumen der S117-HBO-Gruppe (Abb. 11)

An Tag eins wurden  $129 \text{ mm}^3$  gemessen, am fünften Tag  $186 \text{ mm}^3$ . An Tag acht war der Mittelwert  $264 \text{ mm}^3$ , an Tag zwölf stieg er auf  $378 \text{ mm}^3$ . Die relative Tumorzvolumenänderung betrug  $(T_{12}/T_{05}) 2,9$ .

Sauerstoffpartialdruck in der Gruppe-S117-HBO + 20 Minuten (Abb. 10)

Zu Beginn wurde in der Gruppe S117-HBO + 20 Minuten ein Medianwert von 15,9 mmHg gemessen. An Tag 5 stieg er auf 26,1 mmHg, an Tag 8 wurden 14,7 mmHg gemessen und stieg dann am Tag 12 auf 21,7 mmHg an.

Tumorzvolumen in der Gruppe S117-HBO + 20 Minuten (Abb. 11)

An Tag eins betrug der Mittelwert  $110 \text{ mm}^3$  und stieg am fünften Tag auf  $158 \text{ mm}^3$ . An Tag acht haben wir im Mittel  $250 \text{ mm}^3$  gemessen, an Tag zwölf erreichte er  $344 \text{ mm}^3$ . Die relative Tumorzvolumenänderung an Tag zwölf bezogen auf Tag fünf betrug  $(T_{12}/T_{05}) 3,13$ .

### 3.2 Relative Veränderungen des $pO_2$ und des Tumorzvolumens (Kontrolle=1)

$pO_2$

Tag	Kontrolle	MX-1 HBO	MX-1 HBO+20	S117 HBO	S117 HBO+20
1	1	2,4 (ns)	1,7(ns)	5,2 (***)	1,7 (ns)
5	1	6,8(***)	2(ns)	1,4 (ns)	1,6 (ns)
8	1	3,5 (ns)	3,2 (ns)	0,9 (ns)	0,6 (ns)
12	1	0,6 (ns)	0,3 (ns)	0,6 (ns)	0,9 (ns)

Tumorzvolumen

Tag	Kontrolle	MX-1 HBO	MX-1 HBO+20	S117 HBO	S117 HBO+20
1	1	0,7 (*)	1,4 (ns)	0,6 (ns)	0,5 (ns)
5	1	0,6 (**)	1,1 (ns)	0,9 (ns)	0,7 (ns)
8	1	0,7 (ns)	0,7 (ns)	0,8 (ns)	0,7 (ns)
12	1	0,5 (**)	0,7 (ns)	0,9 (ns)	0,8 (ns)

**Tabelle 4 und 5: Relative Veränderung des Sauerstoffpartialdruckes im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrolle wird gleich 1 gesetzt.**

**Erläuterung:**

# nicht gemessen

ns: nicht signifikant

\*: signifikant;  $p \leq 0,05$

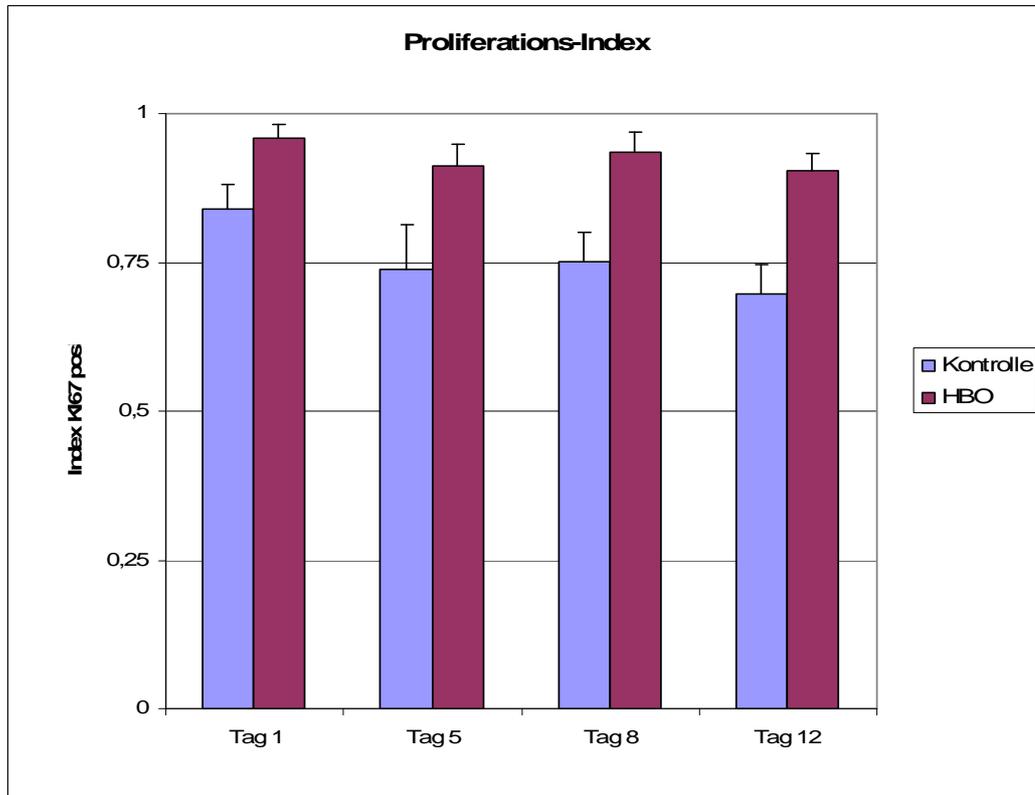
\*\* : hochsignifikant,  $p \leq 0,01$

\*\*\*: höchstsignifikant,  $p \leq 0,001$

In der Betrachtung der relativen Änderung der  $pO_2$ -Medianwerte zeigt sich, dass in der Behandlungsphase der  $pO_2$  gegenüber der Kontrolle in beiden Tumorentitäten sowohl an Tag 1 und 5 erhöht ist. Es kommt an den Tagen 8 und 12 bis auf eine Ausnahme an Tag 8 der MX-1-HBO+20-Gruppe zu einem Abfall der  $pO_2$ -Medianwerte im Vergleich zur Kontrolle (Tabelle 4).

In der Auswertung der Tumorzvolumina sieht man in den Therapiegruppen fast durchweg eine relative Verminderung der Volumina. In der Gruppe MX-1+20 Minuten zeigt sich eine leichte Zunahme der Volumina an den Behandlungstagen (Tabelle 5).

### 3.3 Proliferationsindex MX-1

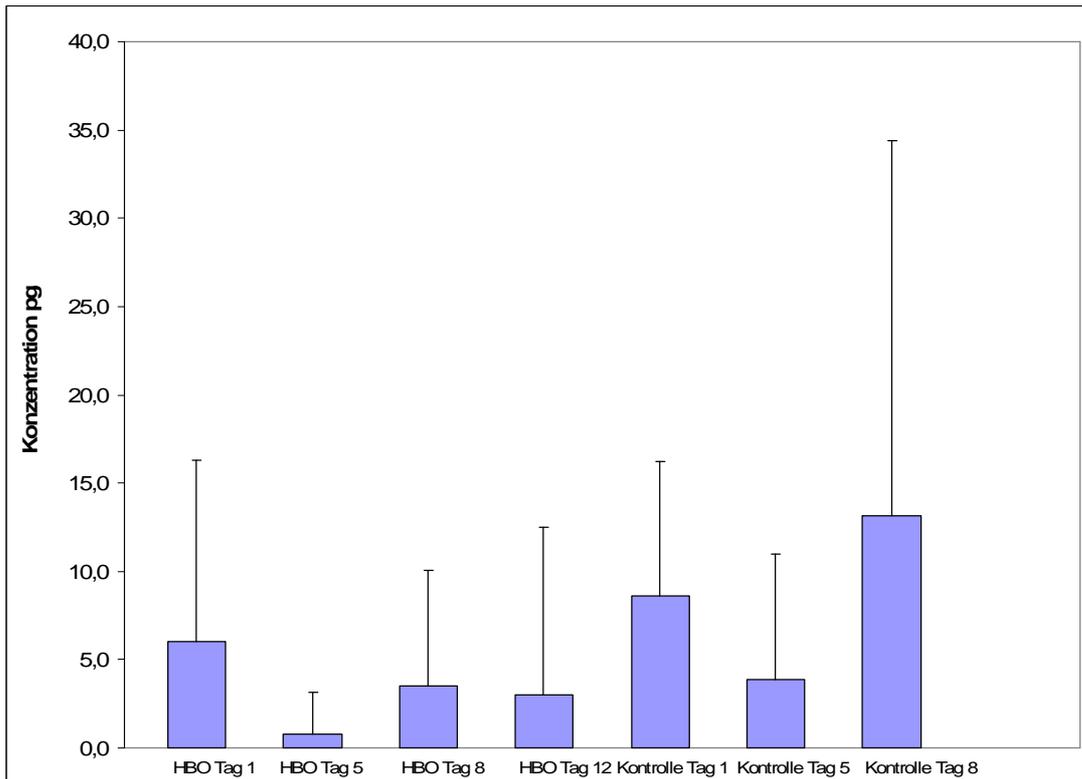


**Abbildung 12: Proliferationsindex des MX-1 Tumors**

Im Folgenden wird nur noch in eine Kontrollgruppe und eine HBO-Gruppe des MX-1 Tumors unterschieden. Die Versuche wurden nicht an der S117-Zelllinie durchgeführt. Der Proliferationsindex in der Kontrollgruppe hatte an Tag 1 einen Ausgangswert von 0,84. An Tag 5 fiel der Wert auf 0,74 und blieb an Tag 8 nahezu konstant bei 0,75. Eine Reduktion des Indexes auf 0,70 erfolgte an Tag 12. In der Gruppe mit hyperbarer Sauerstoffbehandlung entwickelte sich der Wert von ausgehend 0,97 an Tag 1 zu 0,91 an Tag 5. Der Proliferationsindex blieb an den Tagen 8 und 12 nahezu konstant bei 0,94 bzw. 0,90.

In der statistischen Auswertung zeigten sich mit hoher Signifikanz ( $p < 0,0001$ ) in allen Gruppen ein erhöhter Proliferationsindex in der Gruppe mit hyperbarer Sauerstofftherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe.

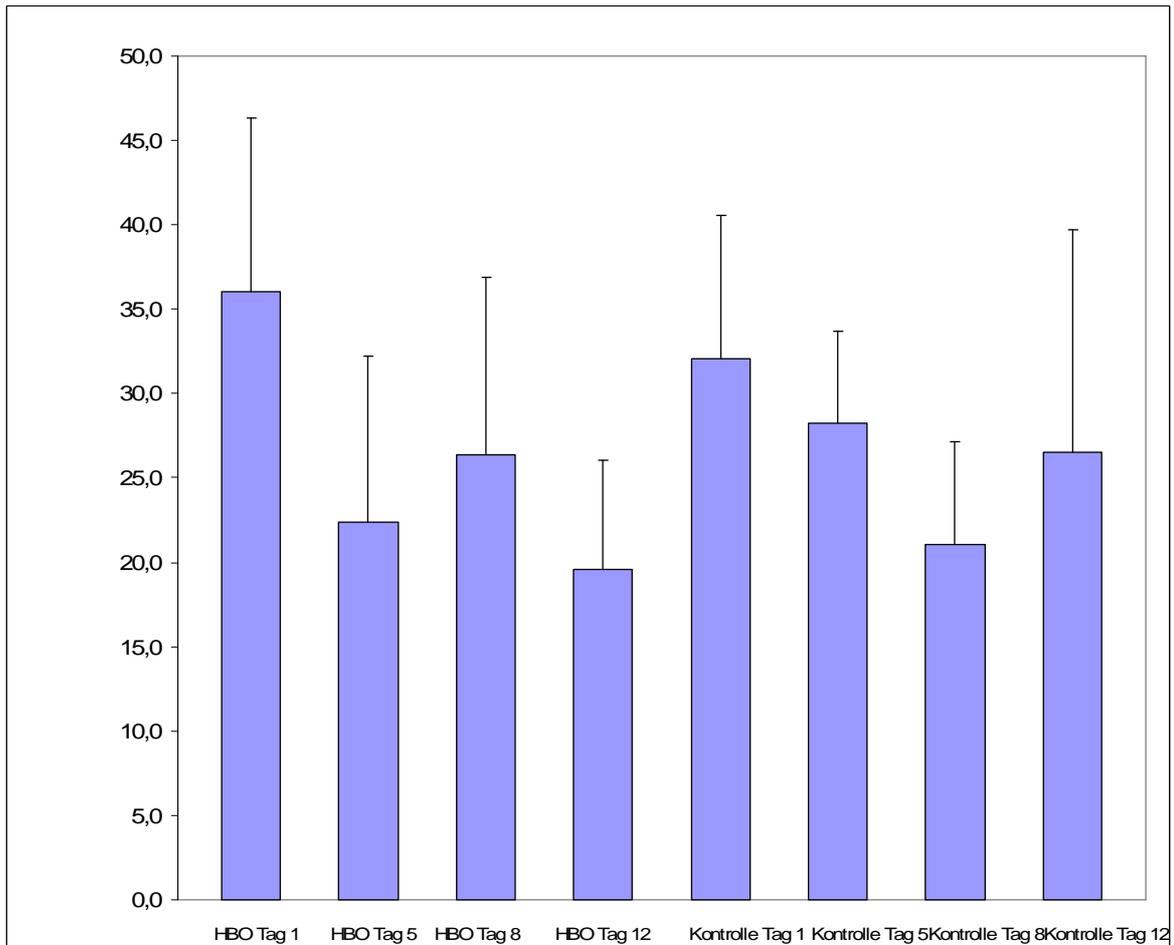
### 3.4 VEGF-Bestimmung im Serum MX-1



**Abbildung 13: VEGF-Bestimmung aus dem Serum beim MX-1 Tumor in pg/ml**

Die VEGF-Bestimmung im Serum ist in der oben gezeigten Abbildung aufgezeigt und als Konzentration im Serum in pg/ml angegeben. Insgesamt ist ein Trend der mit HBO behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ersichtlich. Alle Werte der HBO-Gruppen liegen unter denen der Kontrolle. An Tag 1 ist der absolute Wert bei 6,1 pg/ml im Vergleich zu 8,6 pg/ml in der Kontrolle. An Tag 5 fällt der Wert in der Therapiegruppe auf 0,8 pg/ml im Vergleich zu 3,9 pg/ml in der Kontrolle. Nach der Beendigung der HBO steigt der Wert des VEGF auf 3,5 pg/ml. In der Kontrolle dagegen aber auch und das deutlicher auf 13,1 pg/ml. An Tag 12 bleibt der Wert in der Therapiegruppe nahezu konstant bei 3,0 pg/ml. An Tag 12 konnte in der Kontrolle kein VEGF mehr nachgewiesen werden.

### 3.5 Microvessel Density



**Abbildung 14: Bestimmung der Microvessel Density, CD31 positive Zellen pro Gesichtsfeld**

In der oben gezeigten Abbildung ist die Microvessel Density der mit den CD31 Antikörpern angefärbten Tumorschnitte dargestellt. Der absolute Wert an Tag 1 ist in der Therapiegruppe 36. In der Kontrolle beträgt der Wert 32. Am fünften Tag der HBO-Therapie fällt die Gefäßdichte auf 22 ab, in der Kontrollgruppe auf 28. Während in der Therapiegruppe nach Beendigung der HBO die Gefäßdichte wieder ansteigt (26), fällt in der Kontrolle die Dichte weiter auf 21. Am letzten Messtag (Tag 12) fällt die Gefäßdichte in der HBO-Gruppe auf den niedrigsten Wert (20). In der Kontrolle steigt der Wert an Tag 12 noch mal an (27). Die Unterschiede sind signifikant.

### 3.6 Gruppenvergleich

Bei dem Gruppenvergleich soll untersucht werden, ob zwischen den einzelnen Therapieregimen signifikante Unterschiede beim Verlauf der Tumoroxygenierung und beim Tumolvolumen bestehen. Es konnten in der HBO-Gruppe beim MX-1 Tumor an Tag 5 für die HBO und an den Tagen 1, 5, 12 signifikante Unterschiede im Tumolvolumen gezeigt werden. Für den S117 Tumor zeigte sich an Tag 1 ein signifikanter Unterschied bei der HBO, jedoch keine Unterschiede im Tumorwachstum. Bei den Therapiegruppen HBO+20 Minuten zeigten sich sowohl bei den  $pO_2$ -Messungen, als auch bei den Tumolvolumenbestimmungen keine Signifikanzen. ´

Folgende Erläuterungen gelten für die Tabelle 6 und 7 auf den folgenden Seiten:

**ns: nicht signifikant**

**\*: signifikant;  $p \leq 0,05$**

**\*\* : hochsignifikant,  $p \leq 0,01$**

**\*\*\*: höchstsignifikant,  $p \leq 0,001$**

Tag 01								
	HBO MX-1		HBO S117		HBO+20 MX1		HBO+20 S117	
	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.-Vol.
Kontrolle	ns	*	***	ns	ns	ns	ns	Ns
Tag 05								
	HBO MX-1		HBO S117		HBO+20 MX1		HBO+20 S117	
	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.-Vol.
Kontrolle	***	**	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
Tag 08								
	HBO MX-1		HBO S117		HBO+20 MX1		HBO+20 S117	
	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.-Vol.
Kontrolle	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	Ns
Tag 12								
	HBO MX-1		HBO S117		HBO+20 MX1		HBO+20 S117	
	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.- Vol.	pO <sub>2</sub>	Tu.-Vol.
Kontrolle	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	Ns

**Tabelle 6: Gruppenvergleich der einzelnen Versuchsgruppen. Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurde der Mann-Whitney-Test für den nichtparametrischen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben auf dem p = 0,05 Level angewendet.**

	<b>MX1</b>			
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 8</b>	<b>Tag 12</b>
<b>Proliferationsindex Kontrolle</b>	0,84	0,74	0,75	0,7
<b>Proliferationsindex HBO</b>	0,97	0,91	0,94	0,9
P- Wert	***p<0.0001	***p<0.0001	***p<0.0001	***p<0.0001
	<b>MX1</b>			
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 8</b>	<b>Tag 12</b>
<b>Serum-VEGF Kontrolle</b>	8,6	3,9	13,1	nicht gemessen
<b>Serum-VEGF HBO</b>	6,1	0,8	3,5	3,0
P- Wert	ns p=0,2207	ns p=0,2692	ns p=0,496	nicht durchführbar
	<b>MX1</b>			
	<b>Tag 1</b>	<b>Tag 5</b>	<b>Tag 8</b>	<b>Tag 12</b>
<b>Microvessel Density Kontrolle</b>	32,1	28,3	21,1	26,6
<b>Microvessel Density HBO</b>	36,0	22,4	26,4	19,5
P- Wert	* p=0,0218	*** p=0,0009	* p=0,0353	ns p=0,107

**Tabelle 7: Gruppenvergleich des MX-1 Tumors bei der immunhistochemischen Auswertung. Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurde der Mann-Whitney-Test für den nichtparametrischen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben auf dem  $p = 0,05$  Level angewendet.**

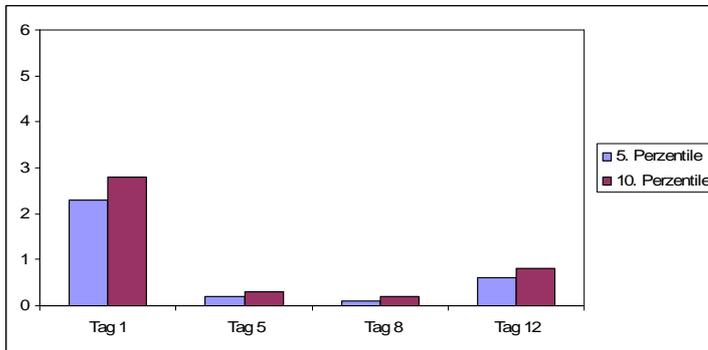
### 3.7 Perzentilenvergleich

Im Weiteren werden die fünfte und die zehnte Perzentile der einzelnen Versuchsgruppen in mmHg dargestellt. In dieser Auswertung sollen insbesondere der Unterschiede der Oxygenierung der wenig oxygenierten Tumorareale veranschaulicht werden, da diese für eine mögliche Therapie eine große Relevanz haben. Es konnte an den Tagen 1 und 5 eine bessere Oxygenierung in den MX-1 Therapiegruppen gezeigt werden. Die Oxygenierung der hypoxischen Areale an den Tagen 8 und 12 war im Vergleich dazu geringer. Verglichen mit der Kontrolle konnte an Tag 1 beim MX-1 Tumor keine Besserung der Oxygenierung erzielt werden. Auch 20 Minuten nach HBO war kein erhöhter Wert messbar. An Tag 5 schien eine deutliche Erhöhung der Sauerstoffversorgung der hypoxischen Areale in der HBO-Gruppe vorzuliegen. Dieser Effekt war jedoch 20 Minuten nach Therapie nicht mehr nachweisbar (siehe Abb. 15, 16, 17, Seite 50).

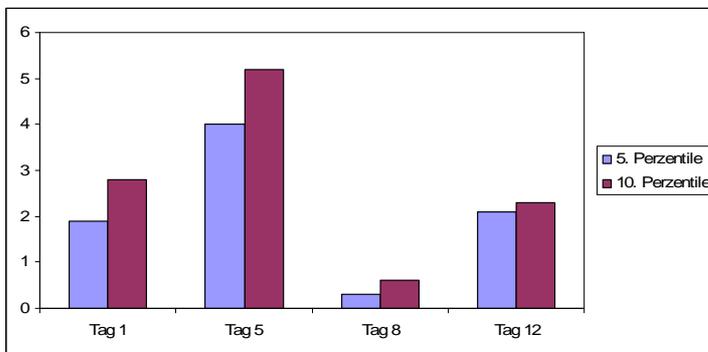
Gleiches gilt für die S117 Tumore. Ein Unterschied der Oxygenierung unter HBO im Vergleich zur Kontrolle war hier nicht nachweisbar. An den Tagen nach Therapie (Tag 8 und Tag 12) schien die Oxygenierung beim S117 Tumor sogar abzunehmen. Ein Effekt auf die Oxygenierung 20 Minuten nach Therapie war nicht nachweisbar (siehe Abb. 18, 19, 20, Seite 51).

### 3.7.1 MX-1-Gruppen

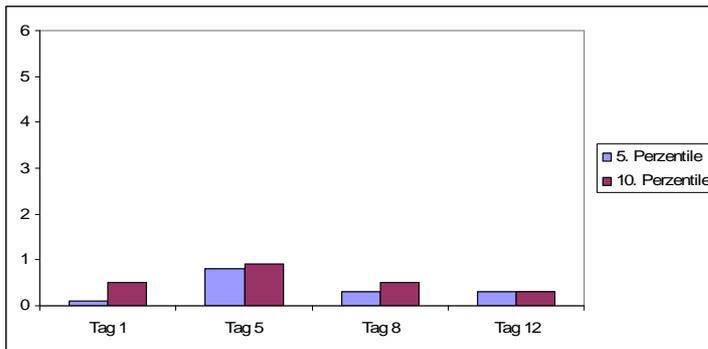
#### MX-1-Kontrolle



#### MX-1-HBO



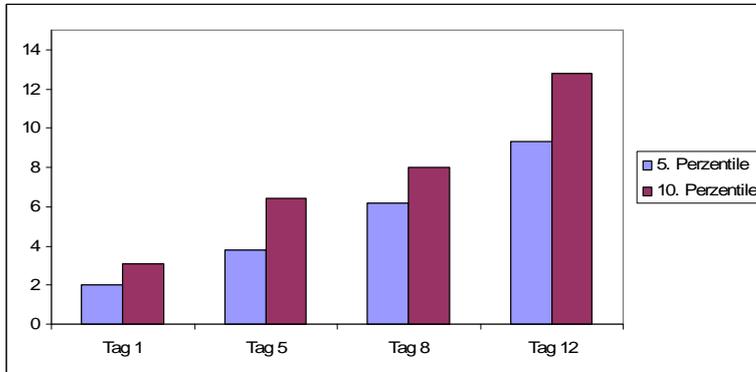
#### MX-1-HBO+20



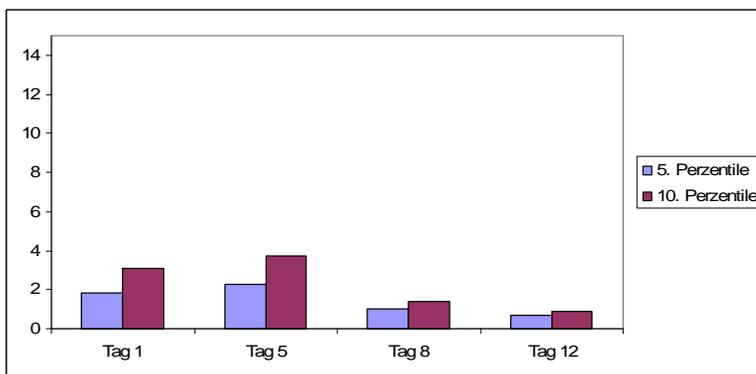
**Abbildung 15, 16, 17: Darstellung der 5. und 10. Perzentile des Sauerstoffpartialdruckes der MX-1-Gruppen an den verschiedenen Versuchstagen**

### 3.7.2 S117-Gruppen

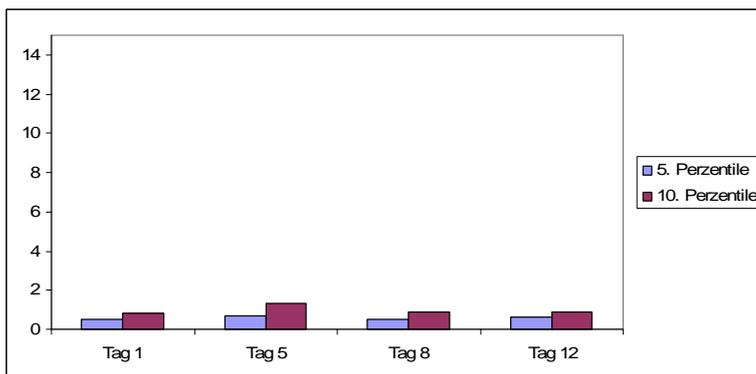
#### S117 Kontrolle



#### S117-HBO



#### S117- HBO+20



**Abbildung 18, 19, 20: Darstellung der 5. und 10. Perzentile des Sauerstoffpartialdruckes der S-117 Gruppen an den verschiedenen Versuchstagen**

## 4. Diskussion

### 4.1. *Messung der Tumoroxygenierung*

Für die Messung der  $pO_2$ -Verteilung in Geweben wurde die polarographische Messmethode verwendet. Die  $O_2$ -Verteilung in Tumoren hat in den letzten Jahren zunehmend an Relevanz gewonnen.

Um den Anforderungen einer  $pO_2$ -Messung in solidem Tumorgewebe nachzukommen erfolgte die Entwicklung von Elektroden, bei denen die Kathode in einen Stahlschaft einer Punktionsnadel integriert wurde [Fleckenstein et al., 1984, Weiss, 1986]. Das Messvolumen der Sonde ist laut theoretischen Berechnungen halbkugelförmig mit einem Durchmesser von 25 bis 50  $\mu m$  [Grunewald, 1973, Kessler et al., 1986]. Um mit diesem geringen Messvolumen die räumliche Heterogenität unserer Tumoren zu evaluieren, wurde mittels eines Manipulators, der die Nadel zunächst 700  $\mu m$  vorschiebt und wieder 300  $\mu m$  zurückzieht, der Tumor in 400  $\mu m$  Schritten durchwandert. Es konnten somit etwa 10-25 Messungen in einer Durchquerung erfolgen. Dieses Vorgehen wurde mehrmals wiederholt, um mindestens 80 Messwerte pro Tumor zu erhalten [Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH 1994, Vaupel et al., 1991].

### 4.2. *Fehlerquellen*

Die polarographische  $pO_2$ -Messung gilt derzeit als Goldstandard in der Messung der Oxygenierung solider Tumore [Stone et al., 1993]. Das Messprinzip wird durch zahlreiche Faktoren beeinflusst. So hängt jeder Messvorgang von der Temperatur ab. Abweichungen von 1  $^{\circ}C$  verursachen eine Änderung der Messwerte von 2-4% [Fatt, 1969]. Außerdem kommt es mitunter zu einer Drift des Messsignals während eines Messvorgangs. Dieses ist durch Kalibrierungen zu minimieren [Kallinowski et al., 1990]. Außerdem besitzen polarographische  $pO_2$ -Elektroden nur eine begrenzte Lebensdauer. Dieses ist einerseits durch Beschädigung der  $O_2$ -permeablen Membran, mechanisch oder durch Proteinablagerung, andererseits durch Anlagerungen Sulfhydrylgruppen-haltiger Substanzen verursacht (z.B. Glutathion) [Vanderkooj et al., 1991]. Diese Beschädigungen können durch die Kalibrierung erkannt und die Elektrode ausgetauscht werden.

Eine weitere Fehlerquelle stellt der mechanische Druck während der Messung dar, der die  $O_2$ -Diffusionseigenschaften der Membran ändert. Druck der Elektrode auf Mikrogefäße kann die lokale  $O_2$ -Versorgung beeinflussen. Die mechanische

Druckentlastung muss somit vor jeder Messung überprüft werden. Zum einen durch den Rückzug der Sonde durch den Manipulator, zum anderen durch eine Überprüfung durch den Untersucher.

Die Messungen der  $pO_2$ -Werte während der HBO-Behandlung wurden durch den Untersucher in einer Behandlungskammer der Firma Dräger® durchgeführt. Da die Messungen einzeln nacheinander durchgeführt werden mussten, konnten die Messungen nur zu unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten durchgeführt werden. Um die Variable so gering wie möglich zu halten, wurden pro Versuchsgruppe nur vier bis fünf Tiere während einer Druckkammerfahrt gemessen.

Ein weiteres Problem der Ermittlung der  $pO_2$ -Werte, war die Narkose der Versuchstiere während der Messung. Der Einfluss durch z.B. Barbiturate kann zu einer Verschlechterung der Oxygenierung führen. Insbesondere Nebenwirkungen, wie Atemdepression können diese Parameter nachhaltig beeinflussen [Kellerher et al., 1995]. Ziel war es die Narkosezeit so kurz wie möglich zu gestalten, um durch länger anhaltende Narkosen eine Beeinflussung der Oxygenierung zu vermeiden. Ausserdem fiel ein schnelles Wachstum der Tumoren in den Therapiegruppen auf. In der MX-1 Therapiegruppe zeigte sich dieses am deutlichsten. Das Tumolvolumen verdoppelte sich fast von Tag 5 bis Tag 8. Obwohl nicht in allen behandelten Gruppen das Tumorstadium so schnell fortschritt, war es doch auffällig, dass diese Tumoren schneller und vermehrt zu Nekrosen neigten. Das Resultat war, dass entweder Tumorteile abfielen oder von den Mäusen abgefressen wurden. Somit war eine Bestimmung des Tumorstadiums ab dem 12. Tag insbesondere in den Therapiegruppen zum Teil nicht möglich. Mitunter führte dieses auch bei einigen Mäusen zu einer akuten Blutung, die zum Teil zum Tode der Maus führen konnte. Aus diesen Gründen war es nicht möglich konstante Gruppengrößen zu erhalten. Stark angefressene Tumoren konnten nicht in die Auswertung einbezogen.

Da in dieser Arbeit die Therapieerfolge nicht anhand der Tumorstadien gewertet wurden, wurden möglichst viele Mäuse in die Auswertung einbezogen. Ziel der  $pO_2$ -Messung war es in intaktem nicht nekrotischem Tumorgewebe zu messen. Sobald ein Tumor messbar erschien, das heißt mehrmals mit etwa 20 Pilgerschritten von der Messsonde durchwandert werden konnte, wurde ein Tumor in die Auswertung mit einbezogen.

Dieses spiegelte sich in den Tumorstadien an Tag 8 und 12 bei einigen Tumoren wider, das Volumen stieg aufgrund von abgestoßenen oder zerfallenden Nekrosen

nicht adäquat an. Somit war eine Weiterbestimmung der Tumorumfänge über den 12. Hinaus Tag in der Gesamtgruppe nicht mehr sinnvoll.

#### 4.3. *Interpretation der Messungen des MX-1-Tumors*

##### 4.3.1 *Oxygenierung*

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen des Sauerstoffpartialdruckes zeigen einen deutlichen Anstieg der Oxygenierung in den Tumoren während der HBO in den MX-1 Tumoren. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen, die Cater et al., [Cater et al 1962] bereits vor einigen Jahren bereits festgestellt hatten. Bei hyperbarer Hyperoxie nahm der  $pO_2$  überproportional gegenüber dem Luftdruck zu. Ähnliche Beobachtungen machten Gerweck et al., [Gerweck et al., 1995]. Unsere Ergebnisse zeigen bei den MX-1 Tumoren einen Anstieg des  $pO_2$ -Median (sog. „Grand Median“) um mehr als das 2,4-fache am ersten Tag nach HBO, verglichen zur Kontrollgruppe. 20 Minuten nach HBO können an Tag 1 auch noch deutlich erhöhte Medianwerte gemessen werden. Hier liegt der Faktor bei 1,7. Interessanterweise hatte der MX-1 Tumor zu Beginn an Tag 1 sowohl in der Therapiegruppe, als auch in der Kontrolle zunächst eine erhöhte Oxygenierung. An Tag 5 fielen in allen drei Gruppen die  $pO_2$  Werte weiter ab, gleiches wurde an Tag 8 beobachtet. An Tag 12 stieg die Oxygenierung in den Kontrollgruppen wieder an. Dieses könnte seine Begründung in einer stärkeren Neigung zu Nekrosen in den Therapiegruppen haben, da mit steigendem Tumorumfang eine deutliche Häufung von makroskopisch sichtbaren Nekrosen vorlag. Die Messungen wurden zwar in nicht nekrotischen Tumorebenen begonnen, die Auswahl der Ebenen konnte jedoch nur äußerlich durchgeführt werden, somit konnte bei der Durchwanderung des Tumors mit der Nadelelektrode nicht ausgeschlossen werden, dass sowohl in aktivem als auch nekrotischen Tumorgewebe gemessen wurde. Jedoch fiel auf, dass die Gruppe der mit HBO therapierten Tiere zu schnellerem Tumorumfang neigten. Das hatte einen höheren Nekroseanteil der Tumoren zur Folge, was sich letztendlich auch messbar in gegen Ende abnehmenden Tumorumfängen in der HBO-Gruppe, wie oben bereits erwähnt, widerspiegelte. In der Gruppe HBO+20 war der Wert der Tumorumfänge nicht rückläufig, sondern eher gleich bleibend. Dieses Phänomen ist auch durch die schon oben beschriebene Neigung zu Nekrosen begründet. Es wurde auch hier vermieden die Tumoren mit nekrotischen Anteilen oder regressiven Tumorumfängen aus der Auswertung zu nehmen, da weitestgehend vermieden wurde, die Nekrosen mit der Messsonde zu durchwandern.

Während der HBO an Tag 1 zeigte sich bei dem MX-1 Tumor im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Zunahme der Oxygenierung. An Tag 5 war in beiden Behandlungsgruppen ein Abfall des  $pO_2$  im Vergleich zu ersten Behandlungstag festzustellen, ebenso in der Kontrollgruppe. An Tag 8 (3 Tage nach Beendigung der HBO) fiel die Oxygenierung weiter in allen Gruppen ab. Die HBO schien bis zum Tag 8 die Sauerstoffversorgung im Gewebe nicht zu verbessern, im Gegenteil die Messwerte der Kontrollgruppe waren etwa doppelt so hoch. Ohne HBO war die physikalische Lösung des Sauerstoffs verständlicherweise deutlich vermindert. In der HBO-Gruppe wuchs der Tumor von Behandlungstag 5 bis Tag 8 deutlich. Er verdoppelte fast sein Volumen im Mittelwert von  $338,8 \text{ mm}^3$  auf  $612,4 \text{ mm}^3$ , was auch mit einem erhöhten Anteil von Nekrosen einherzugehen schien. Dieses wird unter anderem durch den abnehmenden Mittelwert des Volumens an Tag 12 deutlich. Auf das Tumolvolumen wird im Folgenden noch eingegangen.

#### *4.3.2 Einfluss der HBO auf das Tumolvolumen*

In der HBO-Gruppe wächst der Tumor von Behandlungstag 5 bis Tag 8 deutlich. Er verdoppelt fast sein Volumen im Mittelwert von  $338,8 \text{ mm}^3$  auf  $612,4 \text{ mm}^3$ , was auch mit einem erhöhten Anteil von Nekrosen zur Folge hat. Dieses wird unter anderem durch den abnehmenden Mittelwert des Volumens an Tag 12 deutlich. In der HBO Gruppe waren Nekrosen deutlich häufiger, was die Mäuse auch dazu verleitet den Tumor anzufressen. Dadurch erklärt sich auch der abnehmende Mittelwert des Tumolvolumens an Tag 12. Bei einem Großteil der Tumore in der HBO-Gruppe der MX-1 Zellen mussten wir an Tag 12 ein Abfallen oder Abfressen von Tumoranteilen feststellen. Die Mäuse wurden bei starken Nekrosen und Tumorblutungen aus der Auswertung spätestens nach dem 12. Tag genommen. Somit kann ein protektiver Effekt des hyperbaren Sauerstoffs auf das Gesamtüberleben der Mäuse nicht gemacht werden.

Die Kontrollgruppe der MX-1 Tumoren zeigt dieses nicht. Grund für die Nekroseneigung könnte durch eine Induktion des Tumorzellwachstums mit fehlender Neovaskularisation sein oder die toxische Wirkung durch z.B. Radikalbildung des hyperbaren Sauerstoffs selbst.

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Schönmeier et al., 2008 konnten keine Unterschiede des Tumolvolumens unter HBO bei Kopf-Hals-Tumoren finden.

Im Gegenteil stehen dazu Ergebnisse einer chinesischen Arbeitsgruppe, die an S-180 Sarkomen unter HBO eine erhöhte Nekroserate und einen abnehmendes Tumolvolumen nachweisen konnten. Interessanterweise führten die nachweisbaren freien Sauerstoffradikale nicht nur zur Minderung des Tumolvolumens, sondern auch zu einem verlängerten Überleben der Mäuse. [Lian et al., 1995]. Zusammenfassend scheint der hyperbare Sauerstoff durch seine Radikalbildung das Wachstum des Tumors durch Nekrosebildung zu beeinflussen. Aussagen über das Gesamtüberleben können nicht erbracht werden, waren aber auch nicht als primäre Fragestellung geplant.

#### *4.3.3 Einfluss der HBO auf die Microvessel Density, den VEGF-Spiegel und den Proliferationsindex*

Erklärungen für den Verlauf der  $pO_2$ -Werte sollen nun an Hand der Microvessel Density, der Bestimmung des Vascular endothelial growth factors (VEGF) und des Proliferationsindex diskutiert werden.

Lee et al., konnten an HUVEC-Zellen (human umbilical vein endothelial cells) nachweisen, dass sowohl auf mRNA Ebene als auch auf Proteinebene eine Induktion des VEGF zeit- und dosisabhängig durch eine HBO stattfindet [Lee et al., 2006]. Dieses wird auf eine Aktivierung des VEGF-Promotors und der erhöhten AP-1 Aktivität bei Abfall des  $pO_2$  am Ende einer HBO zurückgeführt.

Im Gegensatz dazu stehen unsere Ergebnisse, die jedoch nicht auf zellbiologischer Ebene, sondern quantitativ durch Messung des VEGF aus dem Mäuseserum gewonnen wurden.

In der Kontrollgruppe war an Tag 1 ein um etwa 25 % erhöhter Anteil an VEGF nachweisbar, an Tag 5 und Tag 8 sogar mehr als 3-mal soviel. An Tag 12 war in der Kontrollgruppe kein VEGF nachweisbar, was am ehesten auf einen Messfehler zurückzuführen ist. Shang et al., [Shang et al., 2005] haben in einem Versuch bei oralen Plattenepithelkarzinomen das VEGF in Abhängigkeit von verschiedenen Sauerstoffgehalten der Luft gemessen. Hierbei zeigte sich, dass bei Hypoxie (1%  $O_2$ ) sich das VEGF bis zu 2,9-fach erhöhte, verglichen zur Raumluft. Zusätzlich wurde die Microvessel-Density (MVD) bestimmt. Hier zeigte sich ein Ansteigen der Microvessel-Density mit ansteigendem VEGF.

Dieses deckt sich mit unseren Ergebnissen. An allen Messtagen war das VEGF verglichen mit der Kontrolle im Serum der Mäuse nach HBO vermindert. Die unterschiedlichen Mittelwerte an Tag 1 des VEGF mit 6 pg in der HBO-Gruppe

verglichen mit 8,6 pg schienen am ehesten mit der Heterogenität des Tumors zusammenzuhängen. Der Verlauf der Werte war in beiden Gruppen an den folgenden Messtagen ähnlich. An Tag 5 der HBO Gruppe war aber eine deutlichere Reduzierung auf ein sechstel von 6 pg auf 0,7 pg im Gegensatz zu einer Halbierung von 8,6 pg auf 3,9 pg zu beobachten. An Tag 8 kam es wieder zu einem deutlichen Anstieg in der HBO-Gruppe um ein 5-faches auf 3,5 pg im Gegensatz zu einer knapp 4-fachen Steigerung auf 13,2. Insgesamt zeigte sich also eine Inhibierung der VEGF-Produktion durch die HBO.

Diese Befunde bestätigen damit die aktuellen Modelle über die Pathophysiologie der Tumorphoxie. Hypoxie ist der stärkste Stimulus für die Hochregulierung von VEGF. Die Höhe des systemisch nachweisbaren VEGF müsste deshalb theoretisch von der absoluten Menge an hypoxischem Tumor abhängen, d.h. je mehr hypoxischer Tumor vorliegt und je stärker dort die hypoxie-induzierte Änderung der Genexpression ist, desto mehr VEGF müsste vorhanden sein und desto stärker müsste der Serumspiegel ansteigen. Die dazu erforderliche simultane Messung von Tumolvolumen, Hypoxiegrad und Serum-VEGF wurde in der Klinik bisher nur von einer Arbeitsgruppe durchgeführt. Dabei bestätigte sich eine signifikante Korrelation zwischen hypoxischem Tumolvolumen und VEGF-Serumspiegel [Becker et al., 2001, Dunst et al., 2001]. Die eigenen tierexperimentellen Daten passen zu diesen Befunden. Die Änderung der Oxygenierung war mit gegenläufigen Änderungen des Serum-VEGF-Spiegels verbunden. Dies ist somit ein indirekter Hinweis darauf, dass die unter HBO verbesserte Oxygenierung nicht nur die primär gut oxygenierten Areale im Tumor betrifft, sondern sich auch funktionell in den hypoxischen Tumoranteilen auswirkt.

Betrachtet man nun auf die MVD, dann zeigte sich, dass der Ausgangswert an Tag 1 in der HBO-Gruppe 36 counts betrug, im Gegensatz zu 32 counts in der Kontrollgruppe. Dieses hing am ehesten auch wieder mit der Heterogenität der Tumoren zusammen. Auch hier dürfte die erste HBO Behandlung noch keinen Einfluß auf die Gefäßdichte haben, da die Tumoren direkt nach der Behandlung entfernt wurden. An Tag 5 zeigte sich jedoch eine Umkehr. Die MVD war in der HBO-Gruppe bei 22 counts, im Gegensatz zu 28 counts in der Kontrolle, was mit den von Shang et al., beobachteten Ergebnissen wieder in Einklang zu bringen ist, ebenso mit dem gemessenen VEGF, welches an Tag 5 nach HBO relativ stark abgefiel. An Tag 8 war die MVD in der HBO-Gruppe mit 26 counts wiederum höher als in der Kontrolle mit 21 counts. Nun schien die höhere Gefäßdichte an Tag 8 mit einer ansteigenden

Konzentration von VEGF einher zu gehen (von 0,8 pg auf 3,0 pg, siehe auch Abb. 13). Der Proliferationsindex, der exemplarisch wie die Microvessel Density und das VEGF an dem MX-1 Tumor gemessen wurde, zeigte sich durchweg signifikant erhöht an allen Tagen in den mit HBO behandelten Tieren.

#### 4.3.4 Interpretation der $pO_2$ Perzentilen des MX-1 Tumors (Hypoxieareale)

Eine Ermittlung der 5. und 10. Perzentile des Sauerstoffpartialdruckes in mmHg erfolgte, um zu ermitteln, ob eine HBO zu einer besseren Oxygenierung der Hypoxieareale im Tumor führt.

Die Perzentilen der MX-1 Tumore an Tag 1 zeigten eine relativ gleichwertige Oxygenierung der hypoxischen Bereiche der HBO-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle. In der HBO+20 Gruppe kam es zu einem relativ starken Abfall der Oxygenierung auf das 0,04-fache auf der 5. Perzentile. An den Behandlungstagen 5 und 8 zeigten beide Gruppen deutlich erhöhte  $pO_2$  Werte bis zum 20-fachen an Tag 5 in auf der 5. Perzentile.

Eine Erklärung hierfür könnte eine Anpassung des Tumors in den hypoxischen Arealen mit einer besseren Oxygenierung nach 4 Tagen sein. Durch den VEGF-Spiegel lässt sich dieser Zusammenhang jedoch nicht erklären. Plausibel wäre ein Anstieg der Werte der 5. und 10. Perzentile durch eine bessere physikalische Lösung in den hypoxischen Arealen. Dieser konnte durch die erbrachten Daten in der HBO-Gruppe gezeigt werden, war aber 20 Minuten nach HBO nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der Gruppe Becker et al., 2002, die an Patienten einen erhöhten  $pO_2$  auch nach 5-25 Minuten nach Dekompression allerdings unter Atmung von normobarem Sauerstoff nachweisen konnten. Die Beatmung mit normobarem Sauerstoff ist aus technischen Gründen in unserem Versuch allerdings nicht durchgeführt worden. Diese könnte aber eine Verlängerung der physikalischen Lösung des Sauerstoffs im Gewebe nach HBO mit sich bringen. Auch eine aktuelle Publikation von Schönmeyr et al., 2008 zeigte eine Tendenz zur Verbesserung der Oxygenierung von hypoxischen Arealen bei Plattenepithelkarzinomen *in vitro*, eine statistische Signifikanz konnte allerdings nicht erreicht werden. Außerdem konnte keine Besserung der Microvessel Density und eine Erhöhung der Proliferationsrate gezeigt werden. Zusammenfassend scheint die HBO eine Anhebung des  $pO_2$  zur Folge zu haben, es konnte aber in unseren Versuchen eine signifikante Besserung der Tumoroxygenierung nur an Tag 1 beim S117 Tumor und an Tag 5 des MX-1 Tumors in der HBO Gruppe gezeigt werden. An den anderen

Tagen waren die  $pO_2$ -Werte unter HBO erhöht, wiesen aber keine Signifikanz auf. 20 Minuten nach HBO war ein Effekt in den Hypoxiearealen jedoch nicht nachweisbar.

#### *4.4 Interpretation der Messung des S117-Tumors*

##### *4.4.1 Oxygenierung*

Die Ergebnisse der einzelnen Messungen des Sauerstoffpartialdruckes zeigten auch hier einen deutlichen Anstieg der Oxygenierung in den Tumoren während der HBO. Insgesamt schien der S117 Tumor eine bessere Oxygenierung im Vergleich zu MX-1 Tumor aufzuweisen. Die Ergebnisse zeigten bei S117 Tumoren einen medianen Anstieg um mehr als das 5,2 fache am ersten Tag unter HBO. An Tag 5 betrug der Unterschied etwa 35 % zwischen der Kontrolle und der Therapiegruppe. An Tag 8 waren die Ergebnisse der beiden Gruppen vergleichbar, während an Tag 12 der  $pO_2$  der Kontrolle nahezu konstant blieb und in der HBO-Gruppe entgegen aller anderen Gruppen abfiel. Die  $pO_2$ -Werte der S117 HBO+20 Gruppe zeigten an den Behandlungstagen noch einen deutlich erhöhten Wert. An Tag 1 war der  $pO_2$  1,7-fach nach 20 Minuten erhöht, während der Wert an Tag 5 noch 1,6-fach erhöht war. An Tag 8 und Tag 12 waren die Werte im Vergleich zur Kontrolle niedriger. Hier war der  $pO_2$  wie auch bei den MX-1 Tumoren an Tag 12 wieder um 6 mmHg höher als an Tag 8. Es schien somit eine Erhöhung der physikalischen Lösung des Sauerstoffs im vorzuliegen.

Bei dem S117-Tumor wurden keine immunhistochemischen Auswertungen und VEGF-Messungen durchgeführt, somit ist eine Aussage diesbezüglich nicht zu treffen. In der Literatur sind Angaben zur Oxygenierung von S117 Sarkomen nicht angegeben. Insgesamt gesehen scheint die Oxygenierung im Schilddrüsensarkom durch eine HBO durchweg erhöht. An Tag 1 in der HBO-Gruppe konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden. Eine relative Erhöhung war in allen Behandlungsgruppen nachweisbar, wobei der Mechanismus nicht durch die Ergebnisse zu erklären ist. Eine erhöhte physikalische Lösung des Sauerstoffs ist unter HBO wahrscheinlich. Ein ähnliches Verhalten der VEGF, des Proliferationsindex und der MVD ist anzunehmen.

##### *4.4.2 Einfluss der HBO auf das Tumolvolumen*

Das Wachstumsverhalten der S117-Tumoren war in allen Gruppen sehr konstant. Das Volumen stieg vom Ausgangswert in allen Gruppen konstant an. Die Kurvenverläufe sind nahezu parallel. Eine toxische Wirkung des hyperbaren

Sauerstoffs, wie bei dem MX-1 Tumor mit Nekrosenentwicklung war nicht im gleichen Ausmaß nachweisbar. Die Beobachtung die Lian et al., 1995 an S-180 Sarkomen machte, konnte nicht nachgewiesen werden. In den Versuchen der Arbeitsgruppe zeigten sich vermehrt Nekrosen unter HBO.

Wie oben schon erwähnt fand auch keine immunhistochemische Aufarbeitung dieser Tumoren statt. Eine Induktion des Wachstums war ebenfalls nicht nachweisbar. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die HBO keinen nachweisbaren Einfluß auf das Tumorwachstum hatte.

#### *4.4.3 Interpretation der $pO_2$ Perzentilen des S117-Tumors*

Die Perzentilen der S117 HBO Gruppe zeigten Werte von etwa 1,8 mmHg auf der 5. Perzentile und Werte von 2,3 mmHg. Im Vergleich dazu zeigte jedoch die Kontrollgruppe durchweg eine bessere Oxygenierung der hypoxischen Areale. Die Werte steigerten sich von sogar im Versuchsverlauf, so dass das Maximum an Behandlungstag 12 erreicht wurde (9,3 mmHg 5. Perzentile, 12,8 mmHg 10. Perzentile). Die Ergebnisse der Gruppe HBO+20 fielen deutlich niedriger aus. An Tag 1 lag die 5. Perzentile bei 0,5 mmHg, die 10. Perzentile bei 0,8 mmHg. Eine Erklärung für diese Ergebnisse lässt sich in der Literatur bei Sarkomen nicht finden. Es gibt derzeit keine Studie, die Ähnliches an Sarkomzelllinien nachweisen konnte. Am ehesten ist die Heterogenität der Tumoren für die Unterschiede der Ergebnisse verantwortlich. Nimmt man die HBO Gruppe für sich, so erscheint ein deutlicher Unterschied zwischen den Ergebnissen an Tag 1 mit HBO und Tag 8 nach Abschluss der HBO. Hier fielen die Werte nahezu auf die Hälfte des Ausgangswertes an Tag 1 (1,8 mmHg 5. Perzentile, 3,1 mmHg 10. Perzentile vs 1,0 mmHg 5. Perzentile, 1,4 mmHg 10. Perzentile). Andere Arbeitsgruppen konnten eine Minderung der hypoxischen Areale an z.B. an Plattenepithelkarzinomen des Halses feststellen [Schönmeyr BH et al., 2008]. Hier konnte wie auch beim oben beschriebenen MX-1 Tumor eine Verminderung der hypoxischen Areale nachgewiesen werden. Eine HBO schien bei dem S117 Tumor eine schlechtere Oxygenierung in hypoxischen Arealen zur Folge zu haben. Eine Erklärung ist aus den Ergebnissen nicht eindeutig ableitbar. Eine Aufarbeitung mittels Immunhistochemie könnte Aufschluss über das Proliferationsverhalten und die MVD geben. Eine stark erniedrigte MVD mit deutlich erniedrigtem VEGF wäre denkbar, die anscheinend verminderte physikalische Lösung von Sauerstoff und ausbleibende bessere Oxygenierung der hypoxischen Areale

könnten auf einen von Sauerstoff unabhängig wachsenden Tumor, welcher nicht zu Nekrosen neigt, hinweisen, was makroskopisch zutreffend war

#### *4.5. Bedeutung der Ergebnisse für die Klinik*

##### *4.5.1. Hypoxie als Prognosefaktoren bei soliden Tumoren*

In früheren Studien zeigten sich Hinweise, dass in verschiedenen humanen Tumoren Cervix uteri [Höckel et al., 1996], Kopf-Hals-Region [Brizel et al., 1998, Nordmark et al., 1996], Weichteilsarkome [Brizel et al., 1996, 1998], dass die Oxygenierung als unabhängiger Prognosefaktor zu werten ist. Bei Patienten mit hypoxischen Tumoren ist die Gesamtüberlebenszeit, bzw. das rezidivfreie Intervall verkürzt. Hierbei erwies sich die Tumoroxygenierung neben anderen Parametern, wie z.B. Grading oder Tumorgroße als unabhängiger Parameter.

Erklärungen für das aggressivere Wachstumsverhalten sind z.B. das geringer therapeutische Ansprechen von ionisierender Strahlung [Gray et al., 1953, Thomlinson et al., 1955]. Eine erhöhte Strahlensensibilität und günstigere Langzeitprognose lässt sich wohl auf besser oxygenierte Tumoren zurückführen [Brizel et al., 1996, 1998, Höckel, 1996, Nordmark et al., 1996]. Auch bei primär chirurgisch behandelten Tumoren zeigten Höckel et al, dass auch hier hypoxische Tumoren eine schlechtere Prognose aufwiesen. Ein möglicher Mechanismus könnte die Regulation hypoxieabhängiger Gene sein. Verschiedene Enzyme, wie z.B. Enzyme der Glykolyse oder Redox-Enzyme sowie Wachstumsfaktoren und Zytokine scheinen durch Sauerstoffmangel induziert zu werden.

Eine weitere Erklärung könnten die Ergebnisse von Graeber et al., 1996 sein. Hier zeigten sich Mutationen des p53-Genes, die einen Selektionsdruck auf Zellen in hypoxischen Arealen ausüben und sich somit aggressivere Zellklone durchsetzen könnten. Hypoxie hat also vielfältige Auswirkungen und kann indirekt Tumorbiologie und Therapieerfolg beeinflussen.

In einer Studie von Thews [Thews 1998] zeigte sich die räumliche Verteilung der  $pO_2$ -Werte, dass insbesondere in kleineren Tumoren ( $<800 \text{ mm}^3$ ) die Oxygenierung ausgeprägt heterogen ist. In größeren Tumoren ( $>800 \text{ mm}^3$ ) hingegen ist das Gewebe oft hypoxisch.

##### *4.5.2 Bedeutung der Ergebnisse für Strahlentherapie*

Die Strahlentherapie ist in der Behandlung solider Tumoren eine etablierte Behandlungsmethode, sowohl primär bei fortgeschrittenen inoperablen Tumoren,

aber auch in der neoadjuvanten und adjuvanten Situation. Um eine optimale Wirkung zu erzielen, muss man Tumorzellen in einer für Strahlen vulnerablen Phase erreichen. Die Sensibilität von Geweben auf Strahlen ist, wie zu Beginn erläutert, vom Sauerstoffgehalt abhängig [Gray et al., 1956]. Entscheidend sind in erster Linie die Effekte auf die DNA-Synthese, zum einen durch die toxische Sauerstoffwirkung selbst und die reine Strahlenwirkung, zum anderen durch eine Aktivierung von Zellen aus der  $G_0$  –Phase des Zellzyklus durch ein erhöhtes Sauerstoffangebot. Eine verbesserte Strahlenwirkung auf Oropharynxtumore und Zervixkarzinome durch eine HBO zeigte auch eine Cochrane Metaanalyse von Bennett et al., aus dem Oktober 2005. Hier zeigten die Ergebnisse eine Besserung der lokalen Kontrolle bei Oropharynxtumoren und eine Verlängerung des Lokalrezidiv freien Intervalls bei Oropharynxtumoren und Zervixkarzinomen [Bennett et al., 2005]

Die Sauerstoffsättigung in Geweben ist ein wichtiger prognostischer Faktor für die Radiosenstivität sowohl *in vitro* oder *in vivo* an Tiermodellen. [Moulder, J.E. 14, Rockwell et al., Kamijo et al., 1994]. Ein großes Problem im Alltag sind die Schwierigkeiten der Messung mit einer  $O_2$ -Nadelsonde in menschlichen Tumoren.

Die in dieser Studie gesammelten Daten hinsichtlich der Gefäßdichte (MVD) konnte keine eindeutige Korrelation zwischen einer HBO und der Microvessel-Density bei MX-1 Tumoren geben. Die zunächst erhöhte MVD an Tag 1 in der HBO-Gruppe, die einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufzeigte, war an Tag 5 zugunsten der Kontrolle verschoben. An den Tagen 8 und 12 zeigte sich Ähnliches. An Tag 8 mit einer Erhöhung der MVD zugunsten der HBO, an Tag 12 zugunsten der Kontrolle.

Eine Aussage aus diesen Ergebnissen lässt sich somit nicht eindeutig ableiten. Es scheint, dass eine HBO keinen Einfluss auf die MVD zu hat. Mögliche Gründe für dieses Ergebnis sind die zeitliche Nähe der einzelnen Messtage. In der Literatur sind keine Anhalte für die nötige Zeit zur Neubildung von Gefäßen angegeben. Die Arbeitsgruppen haben die MVD nur zu einem Zeitpunkt bestimmt. Ein zeitlicher Verlauf ist somit meist nicht dokumentiert. Die Tendenz der MVD ist sowohl in den HBO Gruppen, als auch in den Kontrollgruppen abnehmend, was wie in makroskopischer Begutachtung der Tumoren während der Versuche mit zunehmenden Nekrosen passen würde.

Die eigenen Daten könnten auch für eine Abnahme der primär erhöhten (chaotischen) Angiogenese durch HBO interpretiert werden. Carmeliet et al., 2000 [Carmeliet et al., 2000] hat ein Modell vorgestellt, nach dem eine überschießende Angiogenese als

Folge von Tumorhypoxie durch moderate anti-angiogene normalisiert wird, um die Durchblutung und Oxygenierung in Tumoren zu verbessern. Als Konsequenz dieses Modells müsste bei verbesserter Gewebeoxygenierung sekundär eine Herunterregulierung der Angiogenese (Abfall von VEGF) mit anschließender Normalisierung der Gefäßarchitektur erwartet werden. Klinische und tierexperimentelle Befunde stützen bisher diese Hypothese. Die eigenen Befunde zur Gefäßdichte und zum Verlauf des VEGF-Spiegels, wenngleich statistisch nicht signifikant, passen ebenfalls zu dieser Hypothese.

Die Bestimmung des Proliferationsindex ist wie die Bestimmung der MVD nur am MX-1 Tumor durchgeführt worden. Es zeigte sich an allen Tagen der Untersuchung ein signifikant erhöhter Proliferationsindex in der HBO Gruppe. Die hyperbare Sauerstofftherapie scheint somit eine direkte Auswirkung auf die Zellproliferation bei MX-1 Tumorenograften zu haben. Vergleiche zwischen benignen und malignen Mammatumoren von Vartanian et al., zeigten im Vergleich von Microvessel-Density und Endothelproliferation bis zu 45-fach erhöhte Werte bei den untersuchten Mammakarzinomen.

Die Frage, ob eine HBO per se das klinische Tumorwachstum fördert, ist in der Literatur sehr kontrovers beurteilt worden. Weder die eigenen Ergebnisse hinsichtlich des Tumolvolumens noch die Literaturdaten zeigen eine signifikante Beschleunigung des Tumorwachstums durch HBO. Andererseits kann ein nachteiliger Effekt durch HBO wegen der hier beobachteten erhöhten Proliferationsrate nicht ausgeschlossen werden. Deshalb ist anhand der eigenen Ergebnisse ein alleiniger Einsatz von HBO (ohne simultane zytotoxische Therapie) abzulehnen.

Eine Möglichkeit der Beurteilung ist die Korrelation von polarographisch gemessenen  $pO_2$ -Werten mit der Microvessel-Density in Tumoren.

Die in dieser Arbeit gesammelten Daten konnten eine negative Korrelation zwischen einer HBO und der Microvessel-Density bei MX-1 Tumorenograften geben. Die zunächst erhöhte MVD an Tag 1 in der HBO-Gruppe, der einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle aufzeigt, ist an Tag 5 zugunsten der Kontrolle verschoben. An den Tagen 8 und 12 zeigte sich Ähnliches. An Tag 8 mit einer Erhöhung der MVD zugunsten der HBO, an Tag 12 zugunsten der Kontrolle.

Eine Aussage aus diesen Ergebnissen lässt sich somit nicht eindeutig ableiten. Es scheint, dass eine hyperbare Sauerstofftherapie einen negativen Effekt auf die MVD zu haben. Mögliche Gründe für einen zunächst nicht nachweisbaren Effekt ist die

zeitliche Nähe der einzelnen Messtage. In der Literatur sind keine Anhalte für einen definierten Zeitraum zur Neubildung von Gefäßen angegeben. Verschiedene Arbeitsgruppen haben die MVD nur zu einem Zeitpunkt bestimmt [Kamijo et al., 2000, Vartanian et al., 1994]. Ein zeitlicher Verlauf ist somit meist nicht dokumentiert. Die Tendenz der MVD ist sowohl in den HBO Gruppen, als auch in den Kontrollgruppen abnehmend, was wie in makroskopischer Begutachtung der Tumoren während der Versuche mit zunehmenden Nekrosen passen würde.

Ergebnisse von Kamijo et al. 2000 zeigten die MVD als einen prediktiven Marker für die Radiosensibilität beim Plattenepithelkarzinoms des Larynx. In dieser Arbeit wurde nur ein Vergleich zwischen den mit HBO behandelten Gruppen und der Kontrolle des MX-1 Tumors gezogen. Aussagen zwischen dem MX-1 Tumor und dem S117 Tumor können nicht gemacht werden.

Eine HBO scheint die MVD in dem Untersuchungszeitraum von 12 Tagen zu beeinflussen. Eine Besserung der Radiosensitivität wird in erster Linie durch eine vermehrte physikalische Lösung des Sauerstoffs erreicht, nicht durch eine tumorinduzierte Neovaskularisation.

Die Bestimmung des Proliferationsindexes ist wie die Bestimmung der MVD nur am MX-1 Tumor durchgeführt worden. Es zeigte sich an allen Tagen der Untersuchung ein signifikant erhöhter Proliferationsindex in der HBO Gruppe. Die hyperbare Sauerstofftherapie scheint somit eine direkte Auswirkung auf die Zellproliferation bei MX-1 Tumorenograften zu haben. Vergleiche zwischen benignen und malignen Mammakarzinomen von Vartanian et al. 1994 zeigten im Vergleich von Microvessel-Density und Endothelproliferation bis zu 45-fach erhöhte Werte bei den untersuchten Mammakarzinomen.

Die signifikanten Unterschiede in der untersuchten Zelllinie sind an allen Untersuchungstagen nachweisbar.

Für die Strahlensensibilität in Karzinomen und Sarkomen sind in der Literatur einzelne Hinweise auf eine Kombination von Radiotherapie und einer hyperbaren Sauerstofftherapie zu finden. Eine Arbeitsgruppe aus Japan um Kunugita et al. 2001 fanden ein besseres Ansprechen einer Radiatio im Anschluß an eine HBO bei einer Plattenepithelkarzinomzelllinie (SCCVII). Sie kommen zu dem Schluss, dass eine Bestrahlung möglichst im Anschluss an die HBO stattfinden sollte, da die positiven Effekte nach 30 Minuten nach Dekompression nachließen [Kunugita et al., 2001].

Ein weiter zu untersuchender Faktor ist die Nebenwirkung bei einer Kombination beider Therapien, hier zeigte sich eine signifikante Steigerung der Nebenwirkungen,

wie zum Beispiel die Radionekrose. Bezogen auf die Ergebnisse dieser Arbeit, so gibt es derzeit keine relevanten Veröffentlichungen zur Therapie bei Mammakarzinom oder Sarkomen. Um die Wirkung einer HBO in Kombination mit einer Radiatio zu untersuchen, müssten in diesem vorliegenden Tumormodell weitere Versuche mit der Kombinationstherapie von HBO und Radiatio stattfinden

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine HBO die Tumorphysiologie beeinflussen und bestimmte, für den Erfolg einer Strahlentherapie wichtige Parameter ändern kann. In der Synopsis aller Befunde konnte durch wiederholte HBO in beiden Tumormodellen ein zum Teil signifikanter Anstieg des Gewebe-pO<sub>2</sub> im Tumor erreicht werden. Dies war verbunden mit einem Abfall des Serumspiegels von VEGF. Da VEGF durch Hypoxie induziert wird und der VEGF-Serumspiegel mit der Menge an hypoxischem Tumor korreliert, lässt dieser Befund indirekt darauf schließen, dass die durch HBO induzierte Verbesserung der Oxygenierung auch die primär hypoxischen Anteile im Tumor betrifft. Dieser Befund belegt damit, dass eine HBO zur Überwindung der hypoxie-bedingten Strahlenresistenz grundsätzlich geeignet sein kann. Diese Befunde sind neu und wurden bisher in der Literatur in dieser Form noch nicht beschrieben. Sie bieten eine weitere pathophysiologische Erklärung für die Wirksamkeit der HBO.

## 5. Zusammenfassung

Hypoxie in soliden Tumoren ist mit einer schlechten Prognose und schlechtem Ansprechen einer Strahlentherapie verbunden. Eine hyperbare Sauerstofftherapie (HBO) in Verbindung mit einer Radiatio könnte diese Situation für eine Behandlung verbessern. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine HBO die Tumorphysiologie beeinflussen und bestimmte, für den Erfolg einer Strahlentherapie wichtige Parameter ändern kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden Messungen des  $pO_2$  ohne, während und 20 Minuten nach HBO durchgeführt. Diese Messungen wurden an auf die Hinterpfote transplantierte thymusaplastische Nacktmäuse mit einem Mammakarzinom (MX-1) und einem Schilddrüsensarkom (S117) durchgeführt. Ausserdem wurden beim MX-1 Tumor eine immunhistochemische Auswertung durch Bestimmung des Proliferationsindex (ki-67) und der Microvessel Density (CD31) durchgeführt. Ferner fand eine Bestimmung des VEGF aus Serum der Mäuse statt.

Es wurden drei Gruppen, eine Kontrollgruppe (1) und 2 Therapiegruppen, entsprechend mit einer Messung des Sauerstoffpartialdruckes ( $pO_2$ ) unter HBO (2) und eine Gruppe mit Messung des  $pO_2$  20 Minuten nach HBO (3), untersucht. Der  $pO_2$  wurde mit einem Eppendorf-Histographen durch eine Elektrode im so genannten Pilgerschritt dreidimensional an transplantierten MX-1, bzw. S117 Tumoren gemessen. Die Messungen erfolgten an den Tagen 1, 5, 8 und 12, wobei an Tag 1-5 die HBO durchgeführt wurde. Außerdem erfolgte eine Bestimmung des Tumolvolumens. An Tag 1, 5, 8 und 12 wurden außerdem bei den MX-1 Tumoren die Bestimmung des Proliferationsindex mittels ki-67-Anfärbung, die Microvessel Density (MVD) mittels CD31-Anfärbung sowie die Messung von VEGF aus dem Serum der Mäuse durchgeführt.

Es konnte durchweg eine relative Erhöhung des medianen  $pO_2$  an den Behandlungstagen beider Tumorentitäten nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied konnte an Tag 5 des MX-1 Tumors sowie an Tag 1 des S117 Tumors unter HBO nachgewiesen werden. Eine Erhöhung des medianen  $pO_2$  20 Minuten nach HBO war in beiden Gruppen nachweisbar. Das Ergebnis erzielte aber keine Signifikanz. Des Weiteren führte die HBO zu einer Erhöhung des Proliferationsindex beim MX-1 Tumor. Außerdem schien die HBO eine Minderung der VEGF-Ausschüttung und eine Minderung der MVD zur Folge zu haben.

In der Synopsis aller Befunde konnte durch wiederholte HBO in beiden Tumormodellen ein zum Teil signifikanter Anstieg des Gewebe- $pO_2$  im Tumor erreicht

werden. Dies war verbunden mit einem Abfall des Serumspiegels von VEGF. Da VEGF durch Hypoxie induziert wird und der VEGF-Serumspiegel mit der Menge an hypoxischem Tumor korreliert, lässt dieser Befund indirekt darauf schließen, dass die durch HBO induzierte Verbesserung der Oxygenierung auch die primär hypoxischen Anteile im Tumor betrifft. Dieser Befund belegt damit, dass eine HBO zur Überwindung der hypoxie-bedingten Strahlenresistenz grundsätzlich geeignet sein kann. Diese Befunde sind neu und wurden an diesem Tumormodell bisher noch nicht beschrieben. Sie bieten eine weitere pathophysiologische Erklärung für die Wirksamkeit der HBO.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Alagoz T**, Buller RE, Anderson B, Terrell KL, Squatrito RC, Niemann TH, Tatman DJ, Jebson P. Evaluation of hyperbaric oxygen as a chemosensitizer in the treatment of epithelial ovarian cancer in xenografts in mice. *Cancer.*, 1;75(9):2313-22(1995).
2. **Asano T**, Kaneko E, Shinozaki S, Imai Y, Shibayama M, Chiba T, Ai M, Kawakami A, Asaoka H, Nakayama T, Mano Y, Shimokado K. Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs. *Circ J.*, 71(3):405-11 (2007).
3. **Becker A**, Stadler P, Krause U, Utzig D, Hänsgen G, Lautenschläger C, Rath FW, Molls M, Dunst J: Association between elevated serum VEGF and polarographically measured tumor hypoxia in head and neck carcinomas. *Strahlenther Onkol* 177, 182-188 (2001).
4. **Bennet MH**, Bennett MH, Feldmeier J, Smees R, Milross C. Hyperbaric oxygenation for tumour sensitisation to radiotherapy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4. Art. No.: CD005007. DOI: 10.1002/14651858.CD005007.pub2 (2005).
5. **Brizel DM**, Rosner G.L., Harrelson J., Prosnitz L.R., Dewhirst M.W.: Pretreatment oxygenation profiles of human soft tissue sarcomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 30, 635- 642 (1994).
6. **Brizel DM**, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Dodge RK, Charles HC, Samulski TV, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Radiation therapy and hyperthermia improve the oxygenation of human soft tissue sarcomas. *Cancer Res.* 1;56(23):5347-50 (1996).
7. **Brizel DM**, Sibley GS, Prosnitz LR, Scher RL, Dewhirst MW. Tumor hypoxia adversely affects the prognosis of carcinoma of the head and neck. *Int J Radiat Oncol. Biol. Phys.*, 1;38(2):285-9 (1997).
8. **Carmeliet P**, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* Sep 14;407(6801):249-57. (2000).
9. **Cater DB**, Schoeniger EL, Watkinson DA. Effects on oxygen tension of tumours of breathing oxygen at high pressures. *Lancet.*, 25;2:381-3 (1962).
10. **Ceriani RL**, Blank EW, Peterson JA. Experimental immunotherapy of human breast carcinomas implanted in nude mice with a mixture of

- monoclonal antibodies against human milk fat globule components. *Cancer Res.*, 15;47(2):532-40 (1987).
11. **Ceriani RL**, Sasaki M, Orthendahl D, Kaufman L. Localization of human breast tumors grafted in nude mice with a monoclonal antibody directed against a defined cell surface antigen of human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res. Treat.*, 12(2):177-89 (1988).
  12. **Denekamp J**: Physiological hypoxia and its influence on radiotherapy. In: Steel G.G, Adams G.E, Horwich A.(ed.): *The Biological Basis of Radiotherapy*, Second Edition. Chapter 9, Elsevier Science Publishers B, Basel, 115-139 (1981).
  13. **Dische S**: A review of hypoxic cell radiosensitization. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20, 147-152 (1991).
  14. **Dische S**: The clinical consequences of the oxygen effect. In: Steel G.G, Adams G.E, Horwich A.(ed.): *The Biological Basis of Radiotherapy*, Second Edition, Chapter 10, Elsevier Science Publishers B.V., 135-145 (1989).
  15. **De Martino G**, Ortolani O, Crescenzi G, Celentano L, Giorgetti D. Prevention and protection against oxygen free radical damage in hyperbaric oxygen therapy. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 64(1):69-76 (1988).
  16. **Dunst J**, Stadler P, Becker A, Kuhnt T, Lautenschlager C, Molls M, Haensgen G, Tumor hypoxia and systemic levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck cancers. *Strahlenther Onkol.*; 177(9):469-73 (2001).
  17. **Durand RE**. Radioprotection by WR- 2721 in vitro at low oxygen tensions: implications for its mechanisms of action. *Br. J. Cancer*, 47: 387- 392 (1983).
  18. **Druckkammer** Hyper5 Technische Daten der DrägerSafety AG&Co.KGaA, [www.draeger.com/ST/internet/pdf/Master/De/systems/PI\\_Hyper5\\_d.pdf](http://www.draeger.com/ST/internet/pdf/Master/De/systems/PI_Hyper5_d.pdf) (Tag des Zugriffs: 28.08.2008).
  19. **Eppendorf-Netheler-Hinz** GmbH. Eppendorf pO<sub>2</sub>-Histogramm, Bedienungsanleitung, Programmversion 2.5. Hamburg: Eppendorf-Netheler-Hinz, (1994).
  20. **Fatt I**: An ultramicro oxygen electrode. *J. Appl. Physiol.*, 19:326-9 (1964).
  21. **Folkman J**: Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186 (1971).

22. **Folkman J**: Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* 175: 409-416 (1972).
23. **Füller J**, Feldmann HJ, Molls M, Sack H: Untersuchungen zum Sauerstoffpartialdruck im Tumorgewebe unter Radio- und Thermo-radiotherapie. *Strahlenther. Onkol.* 170., 453-460 (1994).
24. **Gabbert H**, Wagner R: Tumorzellproliferation und Tumurvaskularisation experimentell erzeugter Dickdarmkarzinome während früher Wachstumsphasen. In: Meßmer K., Hammersen F.: *Mikrozirkulation in Klinik und Forschung*, Karger, Basel, 91-106 (1983).
25. **Gimbrone M A Jr**, Leapman SB, Cotran RS, Folkman J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med.* Aug 1;136(2):261-76 (1972).
26. **Gerweck LE**, Hetzel FW. PO<sub>2</sub> in irradiated versus nonirradiated tumors of mice breathing oxygen at normal and elevated pressure. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 32(3):695-701(1995).
27. **Graeber TG**, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature.*, 4;379(6560):88-91(1996).
28. **Gray LH**, Conger AD, Ebert M, Horsney S, Scott OCA: The concentration of oxygen dissolved in tissue at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *Br. J. Radiol.* 26, 638-648 (1956).
29. **Grunewald WA**: How local is pO<sub>2</sub> measurement? In: Kessler M, Bruley DF, Clark LC, Lübbers DW, Silver IA, Strauss J (eds.): *Oxygen Supply*. München: Urban und Schwarzenberg, 160-163 (1973).
30. **van Geel IP**, Oppelaar H, Rijken PF, Bernsen HJ, Hagemeyer NE, van der Kogel AJ, Hodgkiss RJ, Stewart FA. Vascular perfusion and hypoxic areas in RIF-1 tumours after photodynamic therapy. *Br. J. Cancer.*, 73(3):288-93 (1996).
31. **Havas J**: Potentiometric measurements in biological systems. In: Havas J.: *Ion- and Molecule Selektive Elektrodes in Biological Systems.*, Springer, Berlin, 53-90/169-187 (1985).
32. **Hartmann KA**, Carl UM, Plugge DC, Schneider CJ, Sminia P. Enhancement of radiosensitivity of rat rhabdomyosarcoma R1H with normobaric carbogen and hyperbaric oxygen (HBO) using conventionally fractionated irradiation. *Br. J. Radiol.* 71(844):433-7 (1998).

33. **Höckel M**, Knoop C., Schlenger K., Vorndran B., Baußmann E., Mitze M., Knapstein P.G., Vaupel P.: Intratumoral pO<sub>2</sub> predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother. Oncol.* 26, 45-50 (1993).
34. **Höckel M**, Vorndran B, Schlenger K, Baußmann E, Knapstein PG: Tumor oxygenation: A new predictive parameter in locally advanced cancer of the uterine cervix. *Gynecologic. Oncol.*, 51, 141-149 (1993).
35. **Kallinowski F**, Zander R, Hoeckel M, Vaupel P. Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO<sub>2</sub>-histography. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 19(4):953-61(1990).
36. **Kalns J**, Krock L, Piepmeier E Jr. The effect of hyperbaric oxygen on growth and chemosensitivity of metastatic prostate cancer. *Anticancer Res.*, 18(1A):363-7(1998).
37. **Kamijo T**, Yokose T, Hasebe T, Yonou H, Sasaki S, Hayashi R, Ebihara S, Miyahara H, Hosoi H, Ochiai A. Potential role of microvessel density in predicting radiosensitivity of T1 and T2 stage laryngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 6(8):3159-65 (2000).
38. **Kiefer J**: *Biologische Strahlenwirkung*. Birkhäuser, Basel (1989).
39. **Kelleher DK**, Thews O, Vaupel PW. Oxygenation of rat tumors: Impact of duration of anesthesia and positioning of the tumor. In P.W. Vaupel, D.K. Kelleher, M. Günderoth (eds). *Tumor oxygenation*. Stuttgart: Fischer, 15-25, (1995).
40. **Kessler M**, Harrison DK, Höper J: Tissue oxygenation measurement techniques. In CH Baker, WL Nastuk (eds), *Microcirculatory Technology*. Orlando: Academic press, 391-425 (1986).
41. **Koutcher JA**, Alfieri AA, Devitt ML, Rhee JG, Kornblith AB, Mahmood U, Merchant ThE, Cowburn D: Quantitative changes in tumor metabolism, partial pressure of oxygen, and radiobiological oxygenation status postirradiation. *Cancer Res.* 52, 4620-4627 (1992).
42. **Krogh A**: The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *J. Physiol.* 52, 409-415 (1918/19).
43. **Kruuv J**, Inch WR, McCredie JA. Effects of breathing gases containing oxygen and carbon dioxide at 1 and 3 atmospheres pressure on blood flow and oxygenation of tumors. *Can J Physiol Pharmacol.*, 45(1):49-56 (1967).

44. **Kruuv JA**, Inch WR, McCredie JA. Blood flow and oxygenation of tumors in mice. 3. Effects of breathing amyl nitrite in oxygen on radiosensitivity of the C3H tumor. *Cancer.*,20(1):66-70(1967).
45. **Kunugita N**, Kohshi K, Kinoshita Y, Katoh T, Abe H, Tosaki T, Kawamoto T, Norimura, Radiotherapy after hyperbaric oxygenation improves radioresponse in experimental tumor models. , 26;164(2):149-54 (2001).
46. **Lee CC**, Chen SC, Tsai SC, Wang BW, Liu YC, Lee HM, Shyu KG. Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biomed. Sci.* (1):143-56 (2006).
47. **Lian QL**, Hang RC, Yan HF, Chen T, Ni GT, Lu HQ, Liu YY, Liu XQ. Effects of hyperbaric oxygen on S-180 sarcoma in mice. *Undersea. Hyperb. Med.*, 22(2):153-60 (1995).
48. **Lord EM**, Harwell L, Koch CJ. Detection of hypoxic cells by monoclonal antibody recognizing 2-nitroimidazole adducts. *Cancer Res.* Dec 1;53(23):5721-6 (1993).
49. **Leitch DR**, Barnard EE. Observations on no-stop and repetitive air and oxynitrogen diving. *Undersea Biomed Res.* Jun;9(2):113-29 (1982).
50. **Lord EM**, Harwell L, Koch CJ: Detection of hypoxic cells by monoclonal antibody recognizing 2-nitroimidazole adducts. *Cancer Res.*, 1;53(23):5721-6 (1993).
51. **Martin DF**, Porter EA, Rockwell S, Fischer JJ: Enhancement of tumor radiation response by the combination of a perfluorochemical emulsion and hyperbaric oxygen. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 13, 747-751 (1987).
52. **Mondovi B**: Heating tumours in small animals. In: Field S.B., Franconi C. (ed.): *Physics and Technology of Hyperthermia*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 634-635 (1987).
53. **Morishita R**, Nakamura S, Hayashi S, Taniyama Y, Moriguchi A, Nagano T, et al Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as cytokine supplement therapy. *Hypertension.* 33; 1379-1384 (1999).
54. **Mottram JC**: A factor of importance in the radiosensitivity of tumors. *Br. J. Radiol.* 9, 606-614 (1936).

55. **Moulder J.E**, Rockwell S: Hypoxic Fractions of Solid Tumors: Experimental techniques, methods of analysis, and survey of existing data. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 10, 695-712, (1984).
56. **Müller-Klieser W**, Vaupel P: Die Sauerstoffversorgung maligner Tumoren als kritischer Parameter der Therapie. In: Meßmer K., Hammersen F.: *Mikrozirkulation in Klinik und Forschung*, Karger, Basel, 91-106 (1983).
57. **Müller-Klieser W**, Vaupel P, Manz R, Schmidseider R: Intracapillary oxyhemoglobin saturation of malignant tumors in humans. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 7: 1397-1404 (1981).
58. **Nozue M**, Lee I, Yuan F, Teicher BA, Brizel DM, Dewhirst MW, Milross CG, Milas L, Song CW, Thomas CD, Guichard M, Evans SM, Koch CJ, Lord EM, Jain RK, Suit HD. Interlaboratory variation in oxygen tension measurement by Eppendorf "Histograph" and comparison with hypoxic marker. *J. Surg. Oncol.*, 66(1):30-8 (1997).
59. **Overgaard J**, Nielsen OS, Lindegaard JC: Biological basis for rational design of clinical treatment with combined hyperthermia and radiation. In: Field S.B.,
60. **Franconi C** (ed.): *Physics and Technology of Hyperthermia*. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 54-79 (1987).
61. **Raleigh JA**, Dewhirst MW, Thrall DE. Measuring Tumor Hypoxia. *Semin. Radiat. Oncol.*, 6(1):37-45 (1996).
62. **Richter E**, Feyerabend T: *Grundlagen der Strahlentherapie*. 1. Aufl., Springer, Berlin, 66-74 (1996).
63. **Richtlinie der Gesellschaft für Tauch- und Überdruckmedizin von 1998 e.V.**: <http://www.gtuem.org/208/Tauchtauglichkeit/Untersuchungsrichtlinien.html>, (Tag des Zugriffs: 28.08.2008).
64. **Rockwell S**, Hughes C.S., Kennedy K.A.: Effect of host age on microenvironmental heterogeneity and efficacy of combined modality therapy in solid tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20, 259-263 (1991).
65. **Rojas A**, Stewart FA, Smith KA, Soranson JA, Randhawa VS, Stratford MR, Denekamp J. Effect of anemia on tumor radiosensitivity under normo and hyperbaric conditions. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 13(11):1681-9 (1987).

66. **Roszinski S**, Wiedemann G., Jiang S.Z., Baretton G., Wagner Th., Weiss Ch.: Effects of hyperthermia and/or hyperglycemia on pH and pO<sub>2</sub> in well oxygenated xenotransplanted human sarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 20, 1273-1280 (1991).
67. **Schönmeyr BH**, Wong AK, Reid VJ, Gewalli F, Mehrara BJ. The effect of hyperbaric oxygen treatment on squamous cell cancer growth and tumor hypoxia. *Antioxid. Redox. Signal.*, 7(9-10):1377-87 (2008).
68. **Schwarz G**: Über Desensibilisierung gegenüber Röntgen- und Radiumstrahlen. *Münch. med. Wschr.* 56, 1217-1218 (1909).
69. **Shang ZJ**, Li ZB, Li JR.: VEGF is up-regulated by hypoxic stimulation and related to tumour angiogenesis and severity of disease in oral squamous cell carcinoma: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, 35(6):533-8 (2006).
70. **Stone HB**, Brown JM, Phillips TL, Sutherland RM: Oxygen in human tumors correlation between methods of measurement and response to therapy. *Radiat. Res.* 136, 422-434 (1993).
71. **Suit HD**, Marshall N, Woerner D. Oxygen, oxygen plus carbon dioxide, and radiation therapy of a mouse mammary carcinoma. *Cancer.* Nov;30(5):1154-8 (1972).
72. **Teicher BA**, Lazo JS, Sartorelli AC. Classification of antineoplastic agents by their selective toxicities toward oxygenated and hypoxic tumor cells. *Cancer Res.*, 41(1):73-81 (1981).
73. **Teicher BA**, Holden SA, al-Achi A, Herman TS. Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSa1C murine fibrosarcoma. *Cancer Res.*, 50(11):3339-44 (1990).
74. **Thomlinson RH**, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer.*, 9(4):539-49 (1955).
75. **Trott KR**: Die Besonderheiten der Tumorzirkulation für die Strahlentherapie. *Mikrozirkulation in malignen Tumoren.* 1. Aufl., Karger, Basel, 114-122 (1983).
76. **Trott KR**: Die hypoxische Tumorzelle in der Strahlentherapie. In: Lorenz R. (ed.), *Medizinische Physik*, Hüthig, Heidelberg, 241-260 (1977).

77. **Vanderkooi JM**, Erecinska M, Silver IA Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am. J. Physiol.*, 260 (6 Pt 1):C1131-50 (1991).
78. **Vartanian RK**, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 144(6):1188-94 (1994).
79. **Vaupel P**: Atemgaswechsel und Glucosestoffwechsel von Implantationstumoren (DS-Carcinosarkom) in vivo. Wiesbaden: Steiner, (1974).
80. **Vaupel P**: Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvasc. Res* 13, 399-408 (1977).
81. **Vaupel P**: Oxygen supply to malignant tumors. In: Peterson (ed): *Tumor Blood Circulation*. CRC Press, Boca Raton, 143-168 (1979).
82. **Vaupel P**, Kallinowski F, Okunieff P: Blood flow, oxygen consumption and tissue oxygenation of human tumors. In: Piper J. et al., (ed.): *Oxygen Transport to Tissue XII*. Plenum Press, New York, 895-905 (1990).
83. **Vaupel P**, Kelleher DK, Günderoth M (Hrsg.) *Tumor oxygenation*. Stuttgart: 1995 Fischer (1995).
84. **Wilson RE**, Keng PC, Sutherland RM. Drug resistance in Chinese hamster ovary cells during recovery from severe hypoxia. *J Natl Cancer Inst*; 81: 1235- 1240 (1989).
85. **Weiss C**, Fleckenstein W.: Local tissue pO<sub>2</sub> measurement with „thick“ needle probes. In: Thews G., Grote J. (ed.): *Funktionsanalyse biologischer Systeme: Aktuelle Probleme der Atmungs- und Kreislaufregulation*. Steiner Verlag, Stuttgart, 155-166 (1986).
86. **Weiss C**: Bed-side Gewebe-pO<sub>2</sub>-Histographie. In: Schütz R.-M., Hohlbach G. (ed.): *Neue diagnostische und therapeutische Verfahren in Angiologie und Gefäßchirurgie*. 1. Aufl., Graphische Werkstätten GmbH, Lübeck, 41-53 (1989).

## 7 Anhang

### 7.1. Tierversuchsantrag

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

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

24123 Kiel

### 7.2. Reagenzien/ Präparate/etc. (alphabetisch):

Ampicillin® ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm Deutschland
Antibody-Diluent, 250 ml, S2022,	DAKO Cytomation
Aqua dest.,	Apotheke
Aquatex Eindeckmedium, 50 ml, 108562,	Merck
Cutasept®-F,	BODE CHEMIE Hamburg
Cryosafe®-Röhrchen	Cryosafe®
Essigsäure 10%	Apotheke
Glutaraldehyd 11%	Apotheke
Ki 67 (Primär Antikörper, Kaninchen-Anti-Human)	DAKO Cytomation
CD31 (Ratte-Anti-Maus-Antikörper)	Fa. DPC Biermann)
VEGF Immunoassay „Quantikine®“	Fa. R&D Systems Inc., Minneapolis, USA
Nembutal®	Sanofi®
Omnilab-Deckgläser, 250 ml, S2023,	Firma Omnilab®
Präzisions-Temperatur-Meßgerät,	DAKO Cytomation
Rompun 2%	Dräger Medical AG & Co. KGaA, Lübeck
RPMI-Medium ,	BayerVital, Leverkusen, D
Steri-Strip,	Cambrex Bioproducts
Zellmedium RMPI 1640	3M Medica
	GIBCO® tissue culture products

### 7.3. Geräte /Programme (alphabetisch):

Autoscout 2055®,	Schlittenmikrotom der Firma Leica
Autostainer®,	Firma DAKO Cytomation
Camedia Master®	Olympus Europa Holding GmbH
Eppendorf®-Photometer	Eppendorf Deutschland GmbH
Graph pad prism(C)	Graphpad Software, Inc. San Diego , CA. Zorn, C. 2003
Laborwaage	Sartorius AG,
Plattenreader	MRX TC Revelation, Dynex Technologies
Scion-Image®	Scion Corporation
Dräger®Druckkammer Hyper5	Dräger Safety AG & Co. KGaA
Experimentelle Druckkammer	Dräger Safety AG & Co. KGaA
Eppendorf pO2Histograph	Firma Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

### 7.4. Arbeitsgruppe

Herr Prof. Dr. med. habil Th. Wagner

Frau Dr. med. S. Brüggemann

Herr Dr. med. C. Engels

Herr R. M. Poll

Frau M. C. Vollmert

Herr Prof. Dr. med. habil. J. Dunst

Herr Prof. Dr. med. habil. E. Richter

Herr Prof Dr. med. habil. T. Feyerabend

Herr Dr. med. R. Schulte

Herr T. P. Cordes

Frau B. Lilitakis

Herr Dr. med. Kieft

## 7.5. Datenübersicht

<b>MX1</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
medianer pO <sub>2</sub> , Kontrolle	6,3	2,5	1,5	6,8
medianer pO <sub>2</sub> , bei HBO	15,3	6,8	0,9	3,0
medianer pO <sub>2</sub> , 20min nach HBO	10,9	5,1	4,8	2,1
<b>MX1</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
Tumorvolumen, Kontrolle	312	575	841	1049
Tumorvolumen, HBO-Gruppe	216	339	612	503
Tumorvolumen, "20min nach HBO"-Gruppe	437	619	626	693
<b>MX1</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
Tumorvolumen, Kontrolle, relativ	1,00	1,84	2,70	3,36
Tumorvolumen, HBO-Gruppe, relativ	1,00	1,57	2,83	2,33
Tumorvolumen, "20min nach HBO"-Gruppe, relativ	1,00	1,42	1,43	1,59
<b>MX1</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
Proliferationsindex Kontrolle	0,84	0,74	0,75	0,7
Proliferationsindex HBO	0,97	0,91	0,94	0,9
P- Wert	***P<0.0001	***P<0.0001	***P<0.0001	***P<0.0001
<b>MX1</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
Serum-VEGF Kontrolle	8,6	3,9	13,1	nicht gemessen
Serum-VEGF HBO	6,1	0,8	3,5	3
P- Wert	ns p=0,2207	ns p=0,2692	ns p=0,496	nicht durchführbar
<b>MX1</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
Microvessel Density Kontrolle	32,1	28,3	21,1	26,6
Microvessel Density HBO	36,0	22,4	26,4	19,5
P- Wert	* p=0,0218	*** p=0,0009	* p=0,0353	ns p=0,107

<b>S117</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
medianer pO <sub>2</sub> , Kontrolle	9,3	16,8	23,6	24,8
medianer pO <sub>2</sub> , bei HBO	48,6	22,7	22,4	15,4
medianer pO <sub>2</sub> , 20min nach HBO	15,9	26,1	14,7	21,7
<b>S117</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
Tumorvolumen, Kontrolle	202	213	338	429
Tumorvolumen, HBO-Gruppe	129	186	264	378
Tumorvolumen, "20min nach HBO"-Gruppe	110	158	250	344
<b>S117</b>				
	Tag 1	Tag 5	Tag 8	Tag 12
Tumorvolumen, Kontrolle, relativ	1,00	1,05	1,67	2,12
Tumorvolumen, HBO-Gruppe, relativ	1,00	1,44	2,05	2,93
Tumorvolumen, "20min nach HBO"-Gruppe, relativ	1,00	1,44	2,27	3,13

## 8. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. habil. J. Dunst für die Unterstützung und kritische Begutachtung meiner Arbeit danken. Dieses gilt insbesondere für die Möglichkeit der Fortführung dieser Arbeit. Mein Dank gilt ihm außerdem dafür, dass er die Arbeit weiterhin kritisch begutachtet und die Ergebnisse mit mir diskutiert hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. habil. E. Richter und Prof. Dr. med. habil. T. Feyerabend für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit, sowie für die Bereitstellung der erforderlichen technischen Ausstattung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. R. Schulte für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit und die viele Zeit, die es in Anspruch genommen hat dieses aufwendige Projekt mit mir zu planen und nach einigen Vorversuchen umzusetzen. Dr. med. Schulte war mir als ständiger Ansprechpartner eine große Hilfe während der gesamten Zeit. Er hatte für alle Schwierigkeiten und Probleme immer ein offenes Ohr.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. med. habil. Th. Wagner danken, mit dessen Arbeitsgruppe ein stets reger Austausch und eine hervorragende Zusammenarbeit über die gesamte Zeit bestand und ohne ihn die Durchführung der Labormessungen und diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Ausserdem gilt mein Dank Prof. Dr. med. habil. H.P. Bruch für die Durchführung der Tumorschnitte in den Laboren der Klinik für Chirurgie.

Mein Dank gilt im Besonderen auch Frau M. Vollmert, die stets bei labor- und versuchstechnischen Fragen und Messungen zur Seite stand. Sie hat mich geduldig in die Arbeit an der Druckkammer sowie im Labor eingewiesen.

Ein weiterer wichtiger Beitrag wurde durch Herrn Dr. med. Kieft für diese Arbeit geleistet. Durch die Druckkammer in seiner Praxis war es uns erst möglich die Messungen unter HBO-Bedingungen durchzuführen. Die technische Unterstützung erfolgte durch Herrn Balzer. Beide standen jederzeit mit Rat in der ersten Versuchsphase zur Seite.

Ein weiterer Dank gilt auch der Universität zu Lübeck, die diese Arbeit im Rahmen einer Anschubförderung finanziell unterstützt hat.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Kommilitonen und Freund Hr. R. M. Poll bedanken. Wir haben in vielen Dingen kritisch und angeregt über die

Ergebnisse und die Durchführung der Arbeit diskutiert und uns gegenseitig unterstützt.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich stets gefördert und unterstützt und bei Problemen jeglicher Art an meiner Seite gestanden haben.

## 9. Lebenslauf

Name: Tim Peter Cordes

Geburtsdatum,-ort: 24. Februar 1976, Rotenburg/Wümme

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg: 1982 – 86 Besuch der Grundschule I in Schneverdingen

1986 – 88 Orientierungsstufe in Schneverdingen

1992 – 93 Akademisches Austauschjahr in den USA, mit Besuch der Bellevue High School. Bellevue, Washington

1986 – 95 Besuch des Gymnasium Soltau, Abschluss mit dem Abitur

Wehrdienst: 1995 – 96 Wehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr

Studium: von 1996 bis 2003 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck

Abschlüsse: 06 / 1995 Allgemeine Hochschulreife  
03 / 1999 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)  
04 / 2000 Erste Ärztliche Prüfung (1. Staats-examen)  
03 / 2002 Zweite Ärztliche Prüfung (2. Staats-examen)  
11/2003 Dritte Ärztliche Prüfung (3. Staats-examen)

Praktisches Jahr:

08/02-11/02 Medizinische Klinik II, Medizinischen Universität zu Lübeck, 1. Tertial

11/02-03/03 Klinik für Chirurgie, Krankenhaus Süd, Sana Kliniken Lübeck GmbH, 2. Tertial

03/03-07/03 Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Medizinische Universität zu Lübeck, 3. Tertial

Seit dem 01.01.2004 als Assistenzarzt in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. habil K. Diedrich beschäftigt.

## Kongressbeitrag

Poster auf dem 57. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hamburg 16.-19.09.2008

„Messung der Oxygenierung von MX 1-Tumorenograften unter hyperbarer Sauerstofftherapie“ Cordes T, Poll R, Dittmer C, Schulte R, Thill M, Diedrich K, Dunst J, Fischer D.