

**Der Einfluß von Metaboliten auf die Proliferation  
von  
Novikoff-Hepatoma Tumorzellen: eine *in vivo* Untersuchung an CD  
Ratten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ramin Ipaktchi  
aus Teheran

Gießen 2005

**Der Einfluß von Metaboliten auf die Proliferation  
von Novikoff-Hepatoma Tumorzellen: eine *in vivo* Untersuchung an  
CD Ratten**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ramin Ipaktchi  
aus Teheran

Gießen 2005

Aus dem Institut für Biochemie und Endokrinologie  
Prof. Dr. med. vet. Erich Eigenbrodt<sup>†</sup> und Prof. Dr. med. Wilhelm Schoner  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Justus-Liebig-Universität Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. W. Schoner  
Gutachter: Prof. Dr. med. A. Schulz

Tag der Disputation: 22.08.2005

**Prof. Dr. E. Eigenbrodt †**



## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	3
1.1. Transformation und Differenzierung von Zellen	3
1.2. Glykolyse	4
1.3. Glutaminolyse	8
1.4. Glutaminolyse und Malat-Aspartat-Shuttle	11
2. PROBLEMSTELLUNG	13
3. MATERIAL UND METHODEN	16
3.1. Material	16
3.1.1. Zellkultur	16
3.1.2. Zellkulturmedium	16
3.1.3. Verwendete Testsubstanzen	16
3.1.4. Versuchstiere	16
3.1.5. Verwendete Materialien für die Tierversuche	17
3.1.6. Verwendete Narkotika	17
3.1.7. Chirurgische Instrumente / Nahtmaterial	17
3.2. Methode	18
3.2.1. Kultivierung der Novikoff Zellen	18
3.2.2. In vitro Versuche	18
3.2.3. Narkose	19
3.2.4. Vermehrung der Novikoff Zellen in der CD Ratte für weitere Passagen	19
3.2.5. Versuchsvorbedingung	20
3.2.6. Technik der kontinuierlichen Perfusion	21
3.2.7. Zentralvenöser Katheter und Perfusion	22
3.3. Datensammlung	24
3.3.1. Versuchsdaten	24
3.3.2. Zytotoxizitätstest	24
3.4. Statistik	26
4. ERGEBNISSE	27
4.1. Ermittlung der nötigen Konzentrationsmenge der einzelnen Testsubstanzen	27
4.1.1. Allgemeine Vermerke zur Durchführung der Tierversuche	31
4.1.2. Komplikationen die während der Versuche auftraten	31
4.2. Auswertungen der einzelnen Gruppen	33
4.2.1. Ergebnisse der Kontrollgruppe mit NaCl-Lösung	33
4.2.2. Ergebnisse der Fructose 1-6-P <sub>2</sub> (FBP) Gruppe	34
4.2.3. Ergebnisse der Bernsteinsäuremonomethylester Gruppe	36
4.2.4. Ergebnisse der Cisplatin Gruppe	38
4.2.5. Ergebnisse der Aminoxyessigsäure-Hemihydrochlorid (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> * 1/2 HCl)	40
4.2.6. Ergebnisse der Glycerat-3-P Reihe	42
4.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse	45
4.3.1. Vergleich des Tumorstadiums (cm <sup>3</sup> ) der einzelnen Gruppe gegen die Kontrollgruppe (NaCl-Lösung)	45

4.3.2.	Vergleichende Untersuchung der Tumorumfänge (ml)	46
4.3.3.	Auswertung des Auftretens von Metastasen	48
4.4.	In vitro Untersuchungen des ZytoTox 96 <sup>®</sup> Test	50
5.	DISKUSSION	53
6.	ZUSAMMENFASSUNG	58
7.	SUMMARY	60
8.	LITERATURVERZEICHNIS	62
9.	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	70
10.	VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	72
11.	VERZEICHNIS DER TABELLEN	75
12.	ANHANG	75
12.1.	Tabelle I: Datensammlung Tumorverlauf in Tage (cm <sup>3</sup> ) 1-12, Gruppen: NaCl, Substanz A, Aminooxyessigsäure, Cisplatin	75
12.2.	Tabelle II: Ermitteltes Tumor- und Metastasenvolumen mittels Wassersäule (ml)	82
12.3.	Tabelle III: Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage	84
12.4.	Tabelle IV: Anfangs und Endgewicht der Versuchstiere in Gramm	99
12.5.	Tabelle V: Tägliche Infusionsmenge (ml)	101
12.6.	Tabelle VI: Auflistung der Ergebnisse des ZytoTox 96 Test	107
	ERKLÄRUNG	109
	DANKSAGUNG	110
	LEBENS LAUF	111

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Transformation und Differenzierung von Zellen

Seit einigen Jahrzehnten beschäftigt sich die Tumorforschung mit der Charakterisierung von Proteinen, die die Zellproliferation und Apoptose von Zellen steuern (Wagener 1999; Hanahan 2000). Entscheidende Impulse hat die molekulare Onkologie durch die Erforschung der Retroviren erhalten. Bereits 1970 vermutete man, dass das Rous-Sarkom-Virus ein Gen enthält, welches Zellen zur Transformation bringen kann (Duesberg 1970). 1977 konnte schliesslich dieses Gen identifiziert werden, wofür 1989 Bishop der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde (Weis 1977). Weitere wissenschaftliche Arbeiten belegten die Existenz von Genen, sog. Proto-Oncoproteine, Oncogenen (Duesberg 1985) und Tumorsuppressorgene. Ihre Funktion und Einfluss, insbesondere von *ras*, *A-Raf* und *pp60<sup>v-src</sup>* auf Proteinkinasen, ist in einschlägiger Literatur ausführlich beschrieben worden (Wagener 1999). Derzeit stellt sich die Frage, warum die gleichen Proteine und Onkoproteine einige Zelllinien zu Tumoren transformieren, andere aber zu weiteren Zellformen differenzieren (Wixler 1996).

Die Transformierung bzw. Differenzierung von Zellen wird durch Proteinkinasekaskaden reguliert, welche ihrerseits durch wachstumsstimulierende Faktoren, wie z.B. Insulin, PDGF (*platelet derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*) aktiviert werden können (Ushiro 1980; Yarden 1986; White 1996).

Gleichzeitig mit der Erarbeitung dieser molekularen Erkenntnisse wurde registriert, dass sich der Stoffwechsel der Zellen während der Transformation ändert. So nimmt z.B. die Geschwindigkeit und Ausmass der Glykolyse und der *Glutaminolyse* in den transformierten Zellen zu (Brand 1985; Eigenbrodt 1985; Brand 1986; Hugo 1992; Katz 1992; Dang 1997; Mazurek 1997; Mazurek 1997/a; Mazurek 1999; Mazurek 2001/a; Mazurek 2001/b). Der Begriff der Glutaminolyse beschreibt den Abbau von Glutamin zu Lactat und wurde in Anlehnung an den Begriff der Glykolyse eingeführt (McKeehan 1982; Eigenbrodt 1985). Anders als die Glykolyse, die sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen abläuft, findet die Glutaminolyse nur unter aeroben Bedingungen statt. Die Glutaminolyse ist mit dem



Citrat-Zyklus und der Atmungskette, welche in den Mitochondrien lokalisiert sind, verknüpft.

## 1.2. Glykolyse

Die Glykolyse (Abbildung 1) gehört zu den ältesten Stoffwechselwegen. Jede Zelle im Organismus der Säuger kann aus dem Abbau der Glucose Energie gewinnen. Ebenso wie sich die Morphologie der Zellen in den verschiedenen Organen unterscheidet, so unterscheiden sich auch die Art der Energiegewinnung und damit die Enzymausstattung der das Organ bildenden Zellen. Beispielsweise gewinnen Erythrozyten anaerob durch Glykolyse Energie. Ihnen fehlen Mitochondrien, die für den Weg der aeroben Glucose-Verstoffwechslung obligat sind. Unter aneroben Bedingungen werden aus einem Mol Glucose zwei Mol ATP gebildet. Aerob hingegen werden 38 Mol ATP gebildet. Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass Enzyme in Zellen, die an anaerobe Bedingungen adaptiert sind, andere Affinitäten und Wechselzahlen haben als in aeroben Zellen. Ebenso werden die Enzyme des Glucose-Stoffwechsels in Geweben mit der Fähigkeit zur Glucose-Neusynthese (Gluconeogenese) anders gebaut sein als Enzyme in Organen mit vorwiegenden Glucose-Abbau. Die Zelle adaptiert sich an derartige langfristigen Veränderungen durch die Hormon- bzw. Substrat-gesteuerte Expression von Isoenzymen. Isoenzyme führen die gleiche Reaktion aus, unterscheiden sich aber in ihrer Substrataffinität, Wechselzahl und natürlich Primärstruktur. An strategisch wichtigen Stoffwechselschritten wie Energiebarrieren, Stoffwechselverzweigungen und Einmündung von verschiedenen Abbauwegen in einen gemeinsamen Endweg wird der Stoffwechsel an sog. Schlüsselenzymen hormonell oder allosterisch reguliert. Für die Glykolyse sind 3 Schlüsselenzyme bekannt (Abb. 1) Es sind dies:

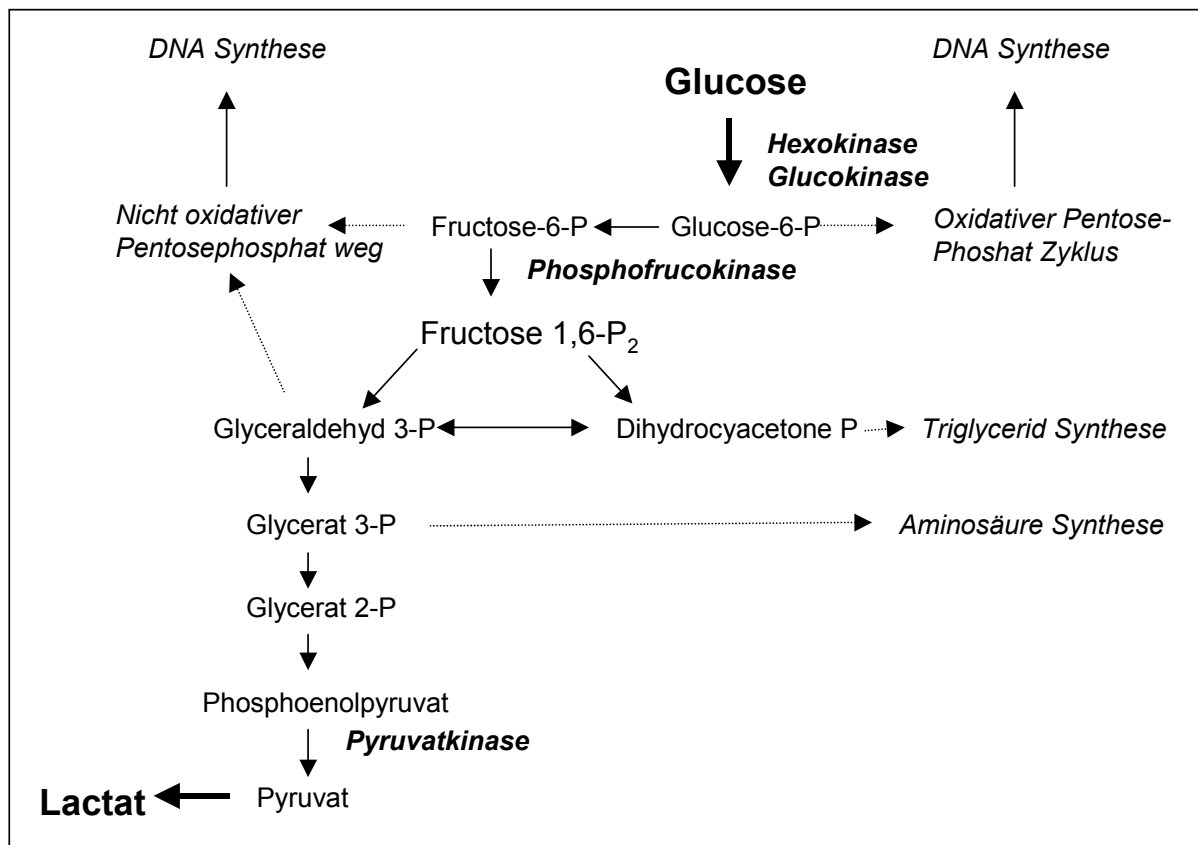
die Hexokinase bzw. Glucokinase (Leber-spezifisch),  
die Phosphofruktokinase und  
die Pyruvatkinase.

Jedes dieser Schlüsselenzyme der Glykolyse kann in Form von Isoenzymen vorliegen.

Die *Hexokinase* (E.C.2.7.1.1) kommt im Organismus in vier verschiedenen Isoenzymen vor (Typ I-IV). Es konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der Isoenzymform Typ II überdurchschnittlich in Tumorzellen vorhanden ist (Kikuchi 1972; Bennet 1978; Kraaijenhagen 1980). Weitere Untersuchungen konnten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der Hexokinase Typ II und der erhöhten Glykolyserate in Tumorzellen belegen (Bustamate 1977). Sie zeigen auch, dass anders als sonst üblich, diese Isoenzym-Form der Hexokinase nicht durch ihr Produkt des Glucose-6-Phosphats gehemmt wird.

Die *Phosphofruktokinase* (E.C.2.7.1.11) bildet in der gesamten Glykolyse den Flaschenhals des Glykolyse-Substratflusses. Das Enzym wird durch AMP und Fructose 2,6-P<sub>2</sub> allosterisch aktiviert. Dagegen hemmen ATP und Citrat das Enzym allosterisch. Die hemmende Wirkung hoher ATP Konzentrationen wird durch AMP und Fructose 1,6-P<sub>2</sub> aufgehoben (Uyeda 1981). Die AMP-Konzentration ist in Zellen dann hoch, wenn die Zellen unter Energiemangel leiden. Unter diesen Bedingungen sollte die Glykolyse vermehrt zur Energieversorgung beitragen können. Dagegen finden sich in ausreichend versorgten Zellen hohe Konzentrationen an ATP. Es ist unter diesen Bedingungen sinnvoll, die Glykolyse abzustellen. Dies geschieht durch allosterische Hemmung der Phosphofruktokinase durch ATP.

Die Phosphofruktokinase kommt ebenfalls in Isoenzymen vor. Die Isoenzyme unterscheidet sich in ihren Untereinheiten. Die Untereinheiten werden nach den Organen benannt, in denen sie exprimiert werden: Sie werden als Untereinheit M („muscle“), Untereinheit L („liver“), Untereinheit P („platelets“) (Kono 1974; Trasher 1981; Vora 1985/a) bezeichnet. In Leukämie-Zellen und anderen malignen Zelllinien zeigte die Arbeitsgruppe um Vora eine verstärkte Bildung der Untereinheiten L und P, bei gleichzeitig erhöhter Glykolyserate (Vora 1985/b).

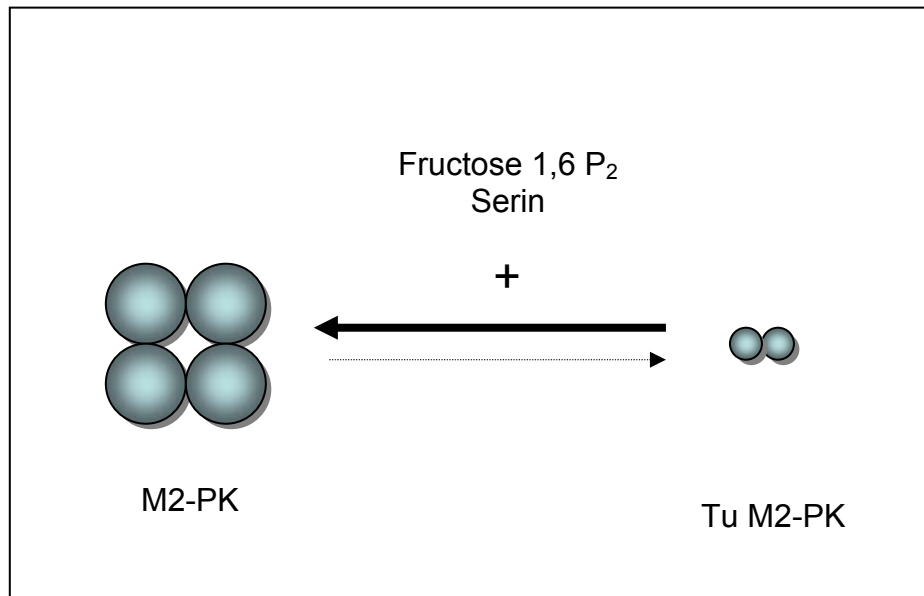


**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Glykolyse. (Die **Schlüsselenzyme** sind hervorgehoben)

Eine wichtige Regulationsfunktion besitzt die *Pyruvatkinase* (E.C.2.7.1.40). Sie kommt in vier verschiedenen Isoenzymformen vor. So findet man, dass in Erythrozyten die PK Typ R vorkommt. In der Niere und der Leber findet man den Typ L der Pyruvatkinase. Gehirn und Muskulatur exprimieren die PK Typ M<sub>1</sub>. Die Aktivität der Pyruvatkinase kann über eine Phosphorylierung des Proteines durch Proteinkinasen verändert werden. Daran sind Schlüsselproteine wie ras, A-Raf und pp60<sup>src</sup> beteiligt. Diese Wege sind ausführlich beschrieben worden (Wagener 1999).

In allen proliferierenden Zellen (malignen wie benignen) wird das PK-Isoenzym Typ M2 (M2-PK) exprimiert. Im Verlauf der Tumor-Transformation verschwinden die typischen gewebsspezifischen Isoenzyme der PK aus dem Gewebe. An seine Stelle tritt die M2-PK vor (Reinacher 1981; Eigenbrodt 1985; Reinacher 1986; Staal 1991; Brinck 1994; Hacker 1998; Steinberg 1999; Wechsel 1999).

Die 4 Untereinheiten der Pyruvatkinase Typ M2 sind in einem Assoziations-Dissoziationsgleichgewicht zwischen dimerer und tetramerer Form (Abb. 2). Dieses Gleichgewicht zwischen M2-PK-Dimer und M2-PK-Tetramer wird durch Metaboliten der Glykolyse und durch Aminosäuren beeinflusst.



**Abbildung 2:** Beeinflussung des Assoziations- Dissoziationsgleichgewicht zwischen M2-PK und Tumor (Tu) M2-PK durch Effektoren der Pyruvatkinase; FBP und Serin begünstigen die Tetramerisierung der M2-PK

In der Form des Tetramers, welches durch die Bindung von Fructose-1,6-bisphosphat oder die Aminosäure Serin an eine der Untereinheiten begünstigt wird, besitzt sie M2-PK eine hohe Affinität zu seinem Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP), wodurch die Glykolyse zu Pyruvat, bzw. Lactat beschleunigt wird. Als M2-PK-Dimer dagegen hat die Pyruvatkinase eine geringe Affinität zum Phosphoenolpyruvat (PEP) und ist folglich wenig aktiv. Nimmt die FBP Konzentration ab, so zerfällt die tetramere Form in ihre dimere Form (Eigenbrodt 1985; Eigenbrodt 1992; Brazill 1997; Mazurek 1997/a; Mazurek 1997/b; Durante 1999; Perez 2000). Da diese dimere Form der M2-PK in allen Tumorzellen vorherrscht, wird sie auch Tumor M2-PK bezeichnet (Eigenbrodt 1985; Persel 1988; Brinck 1994; Eigenbrodt 1994; Mazurek 1997/a; Mazurek 1997/b; Hacker 1998; Steinberg 1999; Wechsel 1999; Zwerschke 1999; Mazurek 2001/a; Mazurek 2001/b).

Die Tumor M2-PK wird von den transformierten Zellen ins Blut und den Stuhl abgegeben. Daher kann der Nachweis der Tumor M2-PK in Blut und Stuhl zur

Diagnose von Tumorerkrankungen und zur Verlaufskontrolle eingesetzt werden. So zeigten Arbeiten von (Schulze 2000), dass der Nachweis von Tumor M2-PK zur Diagnostik von gastrointestinalen Tumoren herangezogen werden kann. (Hardt 2004) konnten in ihrer Arbeit eine höhere Sensitivität zwischen dem Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms und dem Nachweis von Tumor M2-PK im Serum, verglichen mit dem FOBT (Fecal Occult Blood Test, Hämoccult-Test), zeigen. Auch kann die Tumor M2-PK als Verlaufsparemeter dienen. Andere Arbeiten zeigten einen positiven Nachweis von Tumor M2-PK und dem Vorliegen von anderen malignen Grunderkrankungen, wie Karzinome von Pankreas, Mamma und der Niere (Hugo 1992; Eigenbrodt 1997; Cerwenka 1999; Wechsel 1999; Lüftner 2000; Oremek 2000).

Die funktionelle Bedeutung der Tumor M2-PK im Stoffwechsel der Tumoren liegt darin, dass sie aufgrund ihrer geringen Affinität zum PEP den Glykolysefluss behindert. Dies führt zu einem Rückstau in der Glykolyse-Metaboliten oberhalb des Enzyms Pyruvatkinase. Dadurch werden phosphorylierte Glykolyse-Intermediate aber auch Aminosäuren vermehrt für die Synthese von Phospholipiden und den Aufbau von Nukleinsäuren bereitgestellt (Abb. 1) (Eigenbrodt 1980; Eigenbrodt 1983/b; Eigenbrodt 1985; Katz 1992; Mazurek 1997/a; Mazurek 1997/b; Mazurek 1999). Diese Stoffwechsel-Situation der Tumorzellen wird auch als *nucleogenic* bezeichnet.

### 1.3. Glutaminolyse

Transformierte Zellen weisen aufgrund ihrer Wachstums-orientierten Stoffwechsellage einen hohen Energiebedarf auf. Dieser Bedarf kann jedoch aufgrund der Hemmung der Pyruvatkinase in diesen Zellen nicht mehr ausreichend durch die Glykolyse gedeckt werden. Ende der siebziger Jahre zeigte sich, dass die Aminosäure Glutamin in allen Geweben in hoher Konzentration vorkommt und Fibroblasten in der Lage sind sie zu verstoffwechseln (Reitzer 1979). Maligne Zellen nutzen den Abbau des Glutamins als einen alternativen Weg, um ihren Bedarf an ATP abdecken zu können. Sie beziehen ihre notwendige Energie über die Schritte der Glutaminolyse. Diese Tatsache ist bei Tumorgrossen, die einen Durchmesser

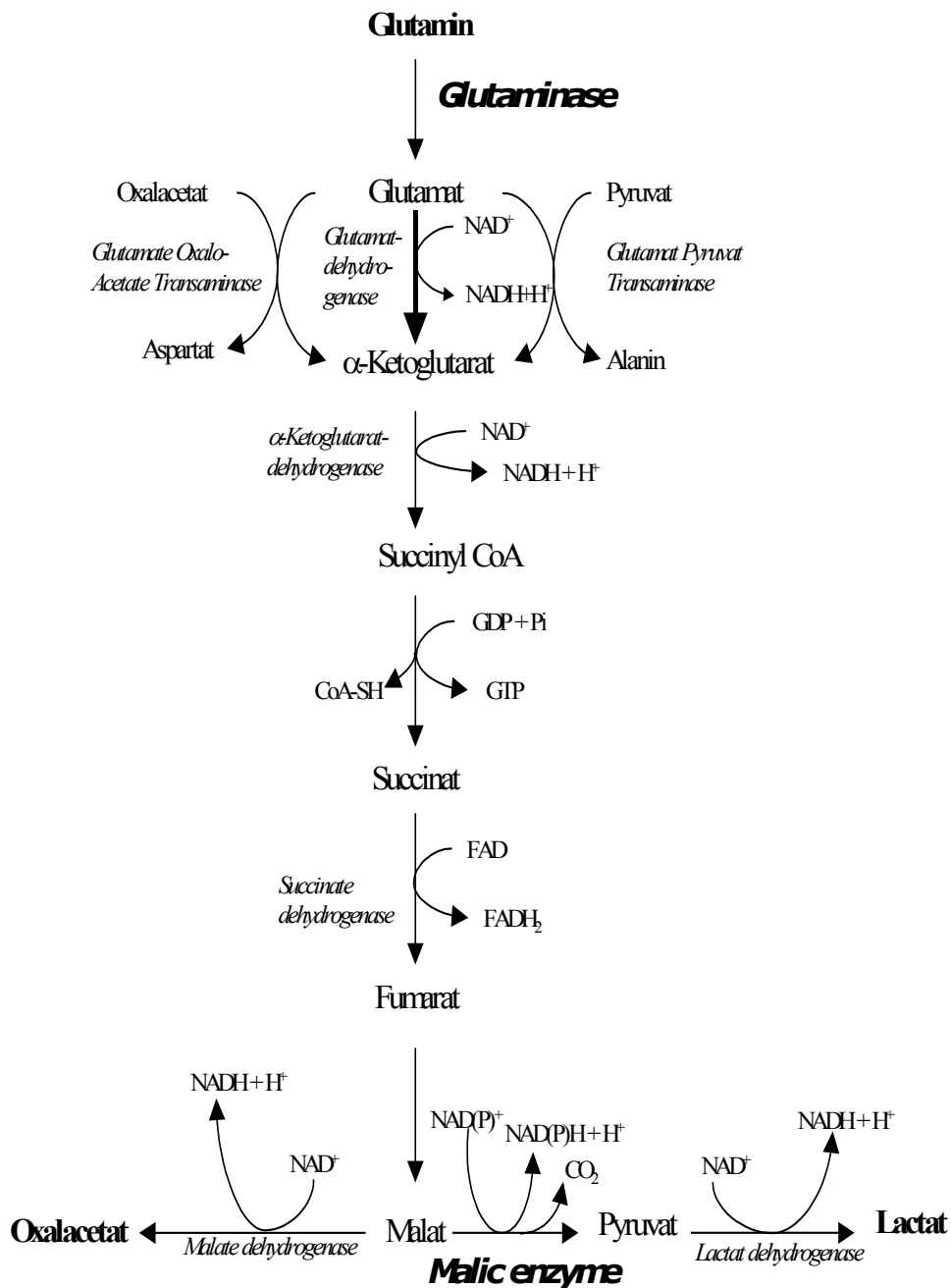
von bis zu zwei cm aufweisen gesichert (Eigenbrodt 1998). Auch bestätigte sich die Vermutung, dass maligne Zellen nicht nur vermehrt Lactat abgeben, sondern auch die Rate der Glutaminolyse ist signifikant erhöht (McKeehan 1982; Brand 1986; Goossens 1996; Mazurek 1997/a; Mazurek 1997/b; Zwerschke 1999; Mazurek 2001/a; Mazurek 2001/b). Bedingung hierfür stellt eine ausreichende Sauerstoffversorgung (Eigenbrodt 1998), da Glutaminolyse nur in Gegenwart von Sauerstoff stattfinden kann.

Die Schlüsselenzyme der Glutaminolyse sind:

Die Glutaminase und

Das „malic enzyme“ (Malat-Decarboxylase)

Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 4 wiedergegeben.



**Abbildung 3:** Übersicht über die an der Glutaminolyse beteiligten Enzyme und Metabolite. Die beiden Schlüsselenzyme **Glutaminase** und **Malic Enzyme** sind hervorgehoben.

Die Durchflussrate in der Glutaminolyse wird vorwiegend über die **Glutaminase** (E.C.3.5.1.2) sowie über das „malic enzyme“ (Malat-Decarboxylase, E.C.1.1.1.38-40) reguliert.

In den transformierten Zellen liegt ein Glutaminase-Isoenzym vor, welches durch Phosphat aktiviert wird. Zwischen der Proliferationsrate und dem Vorliegen dieses Isoenzym liegt eine direkte Proportionalität vor (Knox 1967).

Das „malic enzyme“ ist in den Mitochondrien lokalisiert und zeigt Schrittmacherfunktionen. Es verwendet sowohl  $\text{NAD}^+$ , als auch  $\text{NADP}^+$  für die oxidative Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat. Als allosterische Aktivatoren zählen Fumarat und Succinat. Inhibitorisch auf dieses Enzym wirkt ATP (Moreadith 1984/a; Moreadith 1984/b; Mitch 1998; Chang 2003).

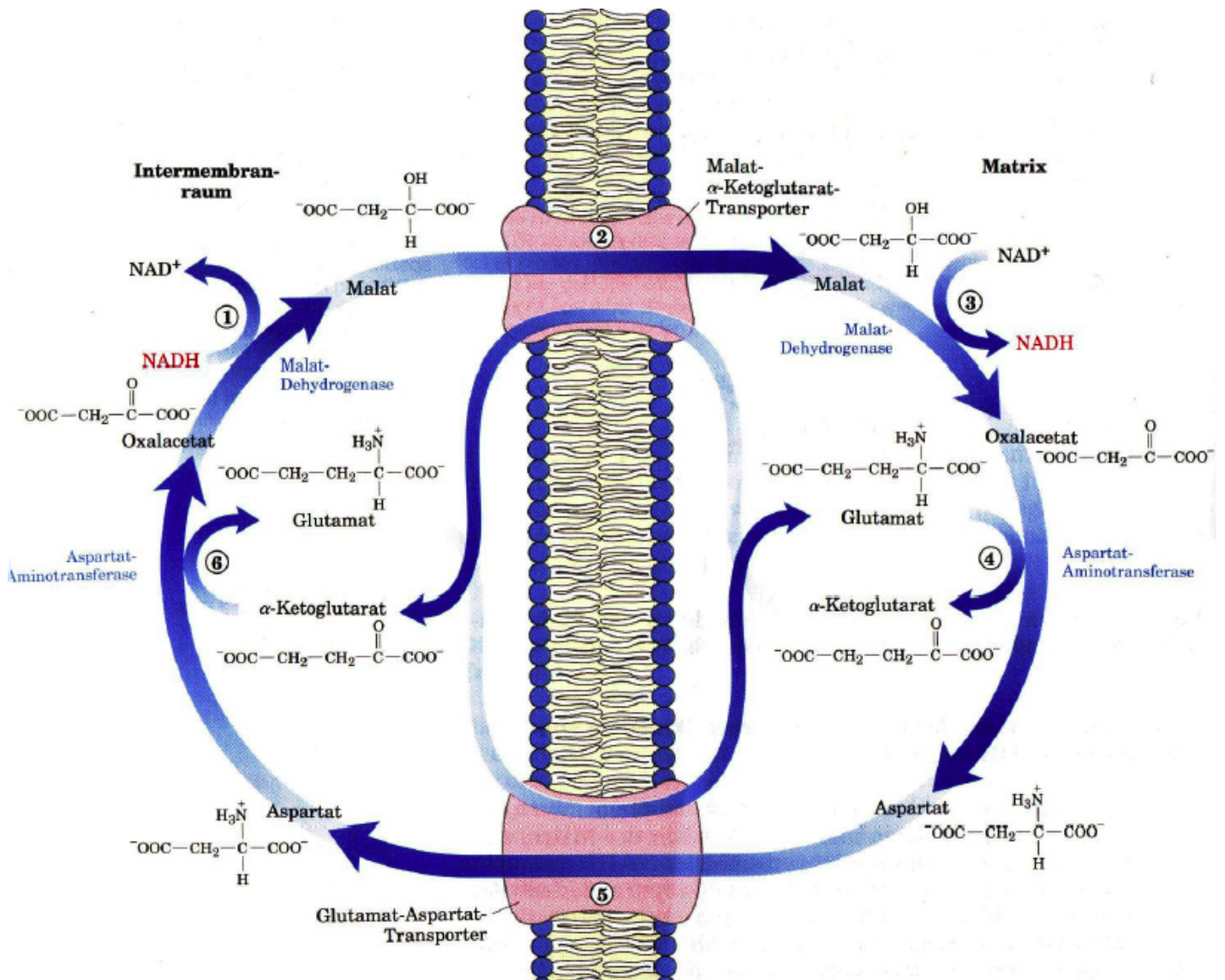
Daraus geht hervor, dass die Glutaminolyse eine wichtige Energiequelle in malignen Zellen bildet. So werden von einem Mol Glutamin ein Mol GTP und fünf Mol ATP insgesamt gebildet (Mazurek 1990; Hugo 1992).

#### 1.4. Glutaminolyse und Malat-Aspartat-Shuttle

Die Glutaminolyse ist über den Malat-Aspartat-Shuttle mit dem mitochondrialen Raum verbunden. Er dient dem Austausch der Zwischenprodukte zwischen den Mitochondrien und dem Cytosol und zugleich dem Transfer von Redox-Äquivalenten über die für  $\text{NADH} + \text{H}^+$  impermeable innere Mitochondrienmembran. (Greenhouse 1976; Moreadith 1984; Moreadith 1984/a). Nur das im Matrixraum der Mitochondrien vorhandene  $\text{NADH} + \text{H}^+$  kann als Substrat für die Atemkette in der inneren Mitochondrienmembran dienen und ATP über die oxidative Phosphorylierung bilden. Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, wird im Malat-Aspartat-Shuttle das Oxalacetat im Cytosol mit  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu Malat reduziert (Schritt 1). Malat passiert die innere Membran der Mitochondrien über den Malat-Ketoglutarat Transporter (Schritt 2) und reduziert im Schritt 3 das  $\text{NAD}^+$  zum  $\text{NADH} + \text{H}^+$  unter gleichzeitiger Bildung von Oxalacetat. Darauf folgend wird im Schritt 4 das Glutamat über das mitochondriale Isozym der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Aspartat-Aminotransferase) zu  $\alpha$ -Ketoglutarat transaminiert. Bei diesem Prozess wird gleichzeitig aus dem Oxalacetat die Aminosäure Aspartat gebildet. Diese passiert ihrerseits mithilfe des Glutamat-Aspartat-Transporters die innere Membran (Schritt 5) und gelangt so ins Cytosol. Daraus entsteht katalysiert durch das cytosolische Isozym Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (Aspartat-



Aminotransferase) im Schritt 6 erneut Oxalacetat, wobei  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Glutamat transaminiert wird.



**Abbildung 4:** Malat-Aspartate „Shuttle“, in Leber, Niere, Herz (Lehninger Biochemie, 3. Auflage, 2001)

## 2. PROBLEMSTELLUNG

Derzeit nutzt die Medizin die Erkenntnisse der hohen Teilungsraten der Tumor Zellen für kurative Massnahmen. So kommen für die Tumor Therapie neben der Entfernung des Tumors durch Operation eine Vielzahl von Chemotherapeutika und die Radiotherapie in Frage. Die beiden letztgenannten Möglichkeiten haben letztendlich ein ähnliches Ziel. Sie sollen durch unterschiedliche Mechanismen die Synthese der Tumor DNA beeinflussen und sollen dadurch die Proliferation der Tumorzellen unterbinden.

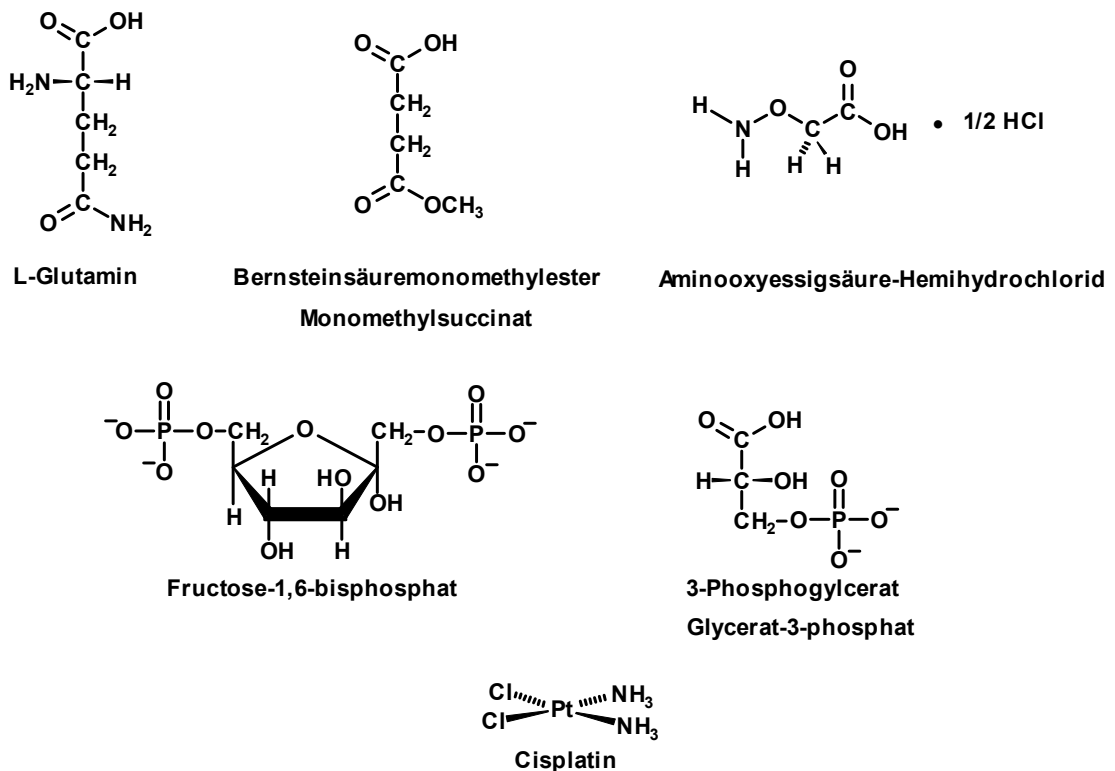
Da Tumoren nur bei entsprechender Energieversorgung wachsen können, stellt sich die Frage, ob es über die Veränderung ihres Stoffwechsels möglich ist die Proliferation der Tumorzellen zu beeinflussen.

Während der Tumorentstehung wird in den Tumorzellen immer der gleiche Stoffwechsel-Phänotyp ausgebildet. Im Rahmen dieser Umprogrammierung scheint die Dimerisierung der Pyruvatkinase und der daraus entstehende „relative Stop der Glykolyse“ eine wichtige Rolle zu spielen. Die durch den Anstau vermehrt anfallenden Intermediärprodukte werden über alternierende Wege zur Synthese von Nucleinsäuren, Aminosäuren und Triglyceriden weiter verwendet (s. Abbildung 1). Gleichzeitig wird der Energiebedarf der Zellen über die Glutaminolyse zumindest anfangs gedeckt (s. Abbildung 3). Es kommt in diesen Zellen zu einer deutlich erhöhten Glutaminolyserate, verglichen mit benigne proliferierende Zellen. Die folgende Arbeit soll die Frage untersuchen, ob aufgrund dieser zwei Erkenntnisse, die Tumorproliferation beeinflusst werden kann. Hierfür wurden verschiedene Substanzen sowohl in vitro, als auch in vivo getestet. Es sollte dabei untersucht werden, ob die in vitro gewonnen Erkenntnisse auf ein Tiermodell übertragen werden können.

Bekanntlich beeinflusst das Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) als ein Zwischenprodukt der Glykolyse die Tetramerisierung der M2-PK. Wird hierdurch eine Verschiebung der dimeren Form der Pyruvatkinase zu Gunsten der aktiven tetrameren Form erreicht, kann hier eine Stoffwechselsituation erreicht werden, welcher der von differenzierten proliferierenden Zellen gleicht. Proliferierende Zellen besitzen die Fähigkeit Glycerat-3-P (= 3-Phosphoglycerat) über einen alternierenden Stoffwechselweg in die nicht-essentielle Aminosäure Serin umzuwandeln. Serin

besitzt in höheren Konzentrationen ähnlich wie FBP die Fähigkeit die M2-PK aus der inaktiven dimeren Form in die aktive tetramere Struktur um zuwandeln.

Dagegen hemmt O-(Carboxymethyl)hydroxylamin-hemihydrochlorid (Aminooxyessigsäure) (Abbildung 5) direkt die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT). Da die Glutaminolyse ohne einen intakten Malate-Aspartat Shuttle zum stehen käme, und dieser wiederum über Transaminasen katalysiert wird, könnte eine Hemmung der GOT zu einem Abbruch der Glutaminolyse führen. Im günstigsten Fall könnten somit diese Zellen selektiv nicht weiter proliferieren.



**Abbildung 5:** Strukturen der in dieser Studie verwendeten Inhibitoren

In die Untersuchungen einbezogen wurden ausserdem die beiden synthetischen Produkte Bernsteinsäuremonomethylester und Cisplatin. Das Monomethylsuccinat wird als falsches Substrat ( $\alpha$ -Ketoverbindung) für den Aminierungsschritt durch Transaminasen angesehen, die dadurch gehemmt werden. Die Substanz kann daher möglicherweise die Glutaminolyse blockieren. Cisplatin ist

ein zugelassenes Chemotherapeutikum und bindet im Zellkern an die Nukleinsäure. Dort bewirkt es eine Verkürzung der Nukleinsäure und einen daraus folgenden Stabilitätsverlust der DNA-Helix.

Die Wirkung dieser Substanzen auf das Zellwachstum wurde *in vitro* und *in vivo* am Beispiel der Novikoff-Zelllinie untersucht. Als messbare Grössen sollten zum einen die Endgrösse der Tumoren mit und ohne Therapie mit einander verglichen werden. Als weiterer klinischer Parameter wurde die Zahl der aufgetretenen Metastasen berücksichtigt. Hierbei interessierte weniger die Grösse, als vielmehr die Anzahl von makroskopisch nachweisbaren Metastasen.

Des weiteren wollte ich wissen, ob durch die verschiedenen Infusionsmedien die zytotoxische Aktivität der Lymphozyten (NK) verändert wird und die Immunitätslage beeinflusst wird. Hierfür wurde der CytoTox 96<sup>®</sup> Test am Ende der Versuche verwendet. Hiermit konnte die Lyseaktivität der einzelnen Gruppen gemessen und gegen die nicht therapierte Gruppe verglichen werden.

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Zellkultur**

Novikoff-Hepatoma Zellen wurden in flüssigen Stickstoff vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg bezogen.

##### **3.1.2. Zellkulturmedium**

Als Kulturmedien wurden folgende Materialien verwendet: Novikoff Hepatoma Zellen in Ringer-Lösung (Fa. Pharmacia GmbH, Erlangen), FKS (fötales Kälberserum) (Fa. Greiner, Frinckenhausen), FCS Gold (PAA Laboratories, Cölbe), L-Glutamin (Fa. Gibco, Eggenstein), Nährmedium: DMEM ohne Pyruvat mit 4,5 g/l Glukose und Pyridoxine HCl (Fa. Gibco, Eggenstein), Waschlösung: HBSS HANK's BAL. SALT (ohne Calcium und Magnesium) (Fa. Gibco, Eggenstein), Antibiotikum: Penicillin / Streptomycin 10000 E/ml (Fa. Gibco, Eggenstein).

##### **3.1.3. Verwendete Testsubstanzen**

Fructose-1-6-bisphosphat, Bernsteinsäuremonomethylester (Monomethylsuccinat), Cisplatin, O-(Carboxymethyl)hydroxylamin-hemihydrochlorid (Aminooxyessigsäure), Glycerat-3-Phosphat (3-Phosphoglycerat), 0,9% NaCl welches für die Kontrolle verwendet wurde.

##### **3.1.4. Versuchstiere**

Für die Versuche wurden 35 Tage alte, 90-110 g schwere männliche adulte immunkompetente CD Ratten verwendet (Charles River WIGA GmbH, Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld). Vor Beginn der Versuchsreihen wurden die Tiere bei kontrollierter Temperatur von 20 °C, freiem Zugang zu Wasser und pelletierter Nahrung (Altramin, Labortierservice Lage-Lippe), an einen zwölfstündigem Tag/Nacht Zyklus gewöhnt. Die Unterbringungsart wurde für die gesamte

Versuchsdauer konstant gehalten. Die Gruppierung der Tiere erfolgte einfach randomisiert. Alle Tierversuche waren nach § 8 Absatz 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes durch die Ethikkommission genehmigt worden und wurden entsprechend den Empfehlungen der Tierärztlichen Vereinigung e.V. durchgeführt.

### **3.1.5. Verwendete Materialien für die Tierversuche**

Silikonschlauch (Silastic 0.012 inch x 0.025 inch, Dow Corning Corp., Midland, MI, USA), Polyethylenkatheter PE-10 und PE-20 (Clay Adams Corp., Parisippany, NJ, USA), 25 ml Perfusorspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), Perfusorpumpe, *Perfusor IV* (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), Säugling Ampu-Beutel (Aesculap, Tuttlingen)

### **3.1.6. Verwendete Narkotika**

*Forene*<sup>®</sup> (Isofluran, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden), *Rompun*<sup>®</sup> 2% (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen), *Ketamin Inresa* (Ketaminhydrochlorid, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg).

### **3.1.7. Chirurgische Instrumente / Nahtmaterial**

Es wurden handelsübliche Instrumente verwendet: zwei mikrochirurgische Pinzetten, ein mikrochirurgischer Nadelhalter, eine mikrochirurgische Schere, eine chirurgische Pinzette, eine kleine Gefässklemme, ein Nadelhalter, eine breite Schere, eine schmale Schere, vier Klemmen spitz und stumpf (Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen).

Als Hautnaht dienten 3/0 Vicryl Fäden; die Katheterfixation erfolgte mit 4/0 Prolene Fäden. Mikrochirurgische Gefässrevisionen bei Katheterwechsel erfolgten mit 7/0 bzw. 9/0 Prolene Fäden (Fa. Ethicon, Norderstedt). Alle mikrochirurgischen Eingriffe erfolgten unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (Fa. Zeiss, Oberkochen).

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Kultivierung der Novikoff Zellen**

Als Kulturmedium wurde eine Lösung von DMEM, 1% PenStrep., 2% Glutamin und 10% FKS verwendet. In 8 ml Medium wurden  $10^5$  Zellen aufgenommen. Nach 7-8 maliger Zellpassage in 50 ml Falcon Kulturflaschen (Fa. Greiner Labortechnik, C.A. Greiner u. Söhne GmbH & Co. KG, Wuppertaler Strasse 342, Solingen), wurde die Zellkultur im Brutschrank für 4 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre inkubiert. Der Kulturüberstand wurde hiernach entfernt und verworfen und die Zellen mit 1100 U/min zentrifugiert. Die Zellsuspension wurde mit Trypsin (2 ml 1% Trypsin-EDTA Lsg.) gelöst und wiederholt gewaschen und in frisches Medium aufgenommen. Die Zellen der Zellsuspension waren teiladhärent.

Zur Differenzierung vitaler und avitaler Zellen wurde die Zellsuspension 1:2 mit Trypanblau verdünnt und unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

### **3.2.2. In vitro Versuche**

Da bisher keinerlei Daten über die notwendigen Konzentrationen der zu testenden Substanzen in Tierversuchen vorlagen, erfolgten *in-vitro*-Vorversuche zur Ermittlung der notwendigen Konzentrationen.

$1 \times 10^5$  / 8 ml Novikoff Hepatoma Zellen wurden angesetzt. Zusätzlich wurde dem Medium in unterschiedlichen Konzentrationen die späteren Testsubstanzen beigefügt. Gleichzeitig wurden unter den gleichen Bedingungen Kontrollen mit 0,9% NaCl parallel mitgeführt. Nach 4-tägiger Inkubationszeit bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> pH 7-7,4 wurde die Zellzahl erneut bestimmt. Diese Vortestung erfolgte bei jeder Behandlungsgruppe viermal. Als Kontrollparameter wurde die Zellzahl, der Mittelwert, die Standardabweichung und die durchschnittliche Teilungsrate bestimmt. In den Kontrollgruppen wurde zweimal pro Gruppe und Probe die durchschnittliche Teilungsrate bestimmt. Die Datenauswertung ermöglichte diejenige Konzentration der Testsubstanzen zu ermitteln, bei der die Teilungsrate der Zellen Null betrug.

### 3.2.3. Narkose

Alle Narkosen erfolgten durch intramuskuläre (i.m.) Injektionsnarkose, unter dem Schutz einer kurzzeitigen Inhalationsnarkose. Als Inhalationsnarkotikum wurde *Forene*<sup>®</sup> (Isofluran, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) benutzt, die Injektionsnarkose bestand aus einem Gemisch von 0,5 ml *Rompun*<sup>®</sup> 2% (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) und 2 ml *Ketamin Inresa* (Ketaminhydrochlorid, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg). Gewichtsadaptiert wurden durchschnittlich 0,7 ml in den linken Glutealmuskel gespritzt.

Weiterhin wurden ebenfalls in den linken Glutealmuskel 0,5 ml eines Gemisches aus 1 ml Atropinsulfat (B. Braun 0,5 mg, Melsungen und 4 ml NaCl (Firma Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland) gespritzt. Das Atropin sollte das auftreten einer Tachykardie bzw. einer Hypertonie durch das zuvor gespritzten Ketamins verhindern.

### 3.2.4. Vermehrung der Novikoff Zellen in der CD-Ratte für weitere Passagen

Die vom DKFZ gelieferten Zellen wurden bei Ankunft gewaschen, um das DMSO-haltige Gefriermedium zu entfernen. Dabei wurde, wie folgt, vorgegangen: Die Zellen wurden in ein Falcon Röhrchen (Fa. Greiner Labortechnik, C.A. Greiner u. Söhne GmbH & Co. KG, Wuppertaler Strasse 342, Solingen) überführt. Die Zellsuspension wurde mit Hank's Balanced-Salt-Solution (HBSS) verdünnt und bei 1300 U/min für 5 Minuten zentrifugiert (*Minifuge T*, Fa. Heraeus GmbH, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das gewaschene Zell-Sediment in HBSS aufgenommen. Die Novikoff Zellen wurden anschliessend mit einer 2 ml Spritze intraperitoneal einer CD-Ratte appliziert.

Nach 7-8 Tagen sah man erwartungsgemäss bei den inokkulierten Ratten ein massiv aufgetriebenes Abdomen. Es erfolgte die Punktion und Entnahme von durchschnittlich 60 ml hämorrhagischen Aszites, im Anschluss hieran wurden die Tiere euthanasiert.

Der gewonnenen Aszites wurde entweder aliquotiert und tiefgefroren oder der Behandlungsgruppe i.m. injiziert. Im Detail erfolgte dies wie folgt:



Der zur Injektion bestimmte Aszites wurde für fünf Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert; anschliessend wurde die Zellsuspension mit HBSS in einem Falcon-Röhrchen bis zu einem definierten Zellenanteil von  $6 \times 10^6$  vitalen Zellen /ml verdünnt. Die Zellzahl wurde in der Neubauer Zählkammer mikroskopisch verifiziert, die Vitalität der Zellsuspension wurde mittels Trypanblaufärbung beurteilt.

Die aufgearbeitete und gezählte Zellsuspension wurde mit einer 1ml Insulinspritze der übrigen Tieren in den rechten Oberschenkel intramuskulär gespritzt. Hierfür wurden wie zuvor beschrieben mit Forene kurzernarkotisiert.

Der zur Aliquotierung bestimmte Aszites wurde 5 Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Das Zell-Sediment wurde anschliessend mit 50 ml Dulbecco's MEM (Gibco BRL, Eggenstein) gewaschen und erneut für fünf Minuten bei 1300 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet mit Dulbecco's MEM und 40% fötales Kälberserum (FKS) gemischt. 0,7ml der Suspension wurde in ein Nunc-Röhrchen mit 0,7 ml Einfriermedium überführt und luftdicht verschlossen. Das Einfriermedium, welches die intrazelluläre Flüssigkeit binden soll, bestand zu jeweils 40% Dulbecco's MEM (DMEM, 40% FKS und 20 DMSO).

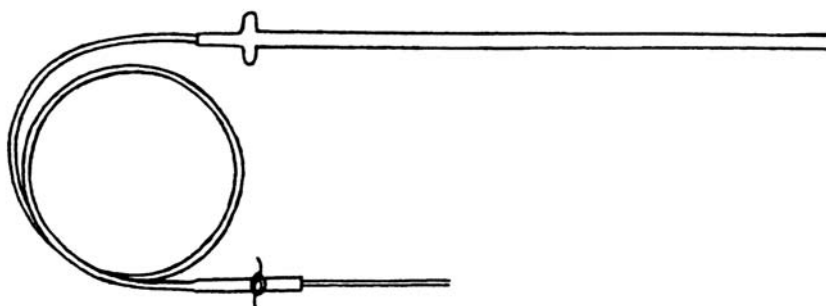
Die Präparate wurden nachfolgend für fünf Minuten bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  und anschliessend für zwölf Stunden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und hiernach in flüssigen Stickstoff überführt. Die Konservierung und Aufbereitung der Zelllinien erfolgte stets unter einer Laminar-Flow-Bank bei sterilen Kautelen.

### **3.2.5. Versuchsvorbedingung**

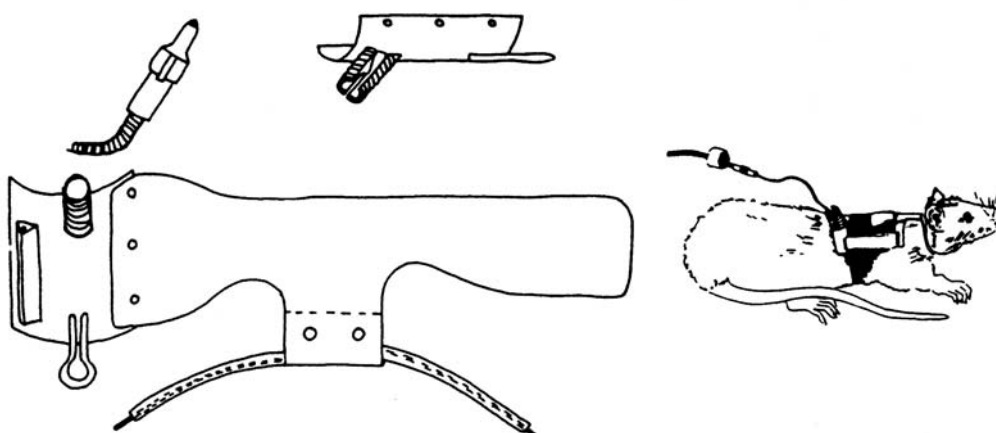
Von der Zeit der Impfung in den rechten Oberschenkel der Tiere ( $1 \times 10^6$  Zellen), bis zum Nachweis eines tastbaren Tumors vergingen im Schnitt 7 Tage. Als Versuchsvoraussetzung, wurde eine Tumorgrosse von  $1\text{ cm}^3$  gefordert, was alle Tiere erreichten. Die Grösse des Tumors wurde mit einer Schublehre gemessen. Hierbei wurde die Länge (L), die Breite (B) und die Tiefe (D) des Tumors bestimmt. Zur Verifizierung der Tumor-Identität erfolgte eine Punktionszytologie.

### 3.2.6. Technik der kontinuierlichen Perfusion

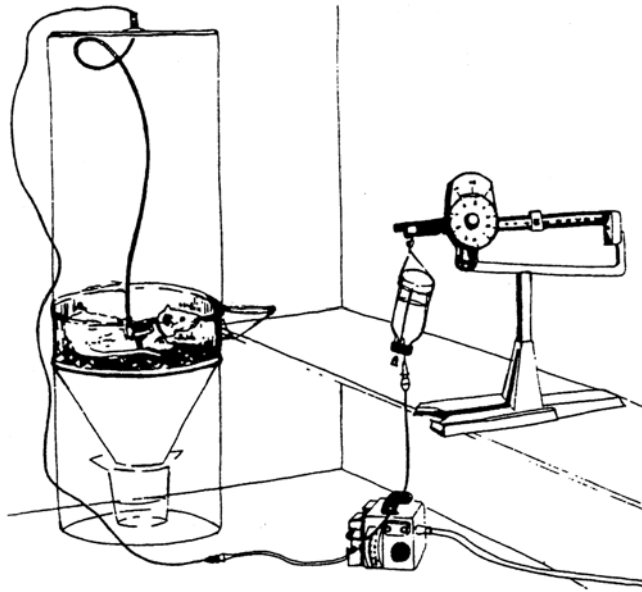
Der Katheter wurde in einer Operation wie folgt eingelegt; Nach queren supraclavikulärem Halsschnitt und Darstellung der V. jugularis interna erfolgte die Implantation eines zentralen Venenkatheters über Venotomie. Der Katheter wurde gegen Dislokation durch eine Seidenligatur gesichert. Der spiralförmige Katheteranteil (Abbildung 5) wurde im Unterhautgewebe versenkt. Das Katheterende wurde subkutan nach dorsal zwischen beiden Skapularblättern geführt und dort mittels eines Trokars transkutan ausgeleitet. Die Technik wurde modifiziert nach der der suprapubischen Blasenverweilkatheter-Einlage (Piechota 2003). Das Ende wurde hiernach durch einen Metallspiralschlauch, welches über einem Mieder (Abbildung 7) mit der Ratte befestigt war, an den Perfusor angeschlossen. Hierüber erfolgte die kontinuierliche Perfusion.



**Abbildung 6:** Schema des Zentralvenösen Katheters (Grimm 1995)



**Abbildung 7:** Schema des verwendeten Mieders (Grimm 1995)



**Abbildung 8:** Darstellung der kontinuierlichen Perfusion (Grimm 1995)

Die Abbildung 8 zeigt schematisch den Versuchsaufbau wie es bei Grimm beschrieben worden ist. Die Abbildung zeigt einen veralteten Perfusor, in der vorliegenden Arbeit wurde jedoch dieser Versuchsaufbau modifiziert und ein Perfusor Braun IV verwendet. Zudem wurden die Tiere nicht in einem Stoffwechselkäfig, sondern in einer offenen Plexiglasröhre gehalten. Deshalb konnten keine Ausscheidungsprodukte aufgefangen werden.

Die Narkosedauer betrug durchschnittlich 50 Minuten, die durchschnittliche operative Schnitt-Naht-Zeit 18 Minuten.

### **3.2.7. Zentralvenöser Katheter und Perfusion**

Ein Silikonschlauch (Silastic 0.012 inch x 0.025 inch, Dow Corning Corp., Midland, MI, USA) wurde auf das Ende eines 5 cm langen spiralförmigen Polyethylenkatheter PE-10 (Clay Adams Corp., Parisippany, NJ, USA) aufgeschoben. Das gegenüberliegende Stück wurde mit einem 100 cm langen Stück PE-20 verschmolzen, dessen Ende wiederum an eine 25 ml Perfusorspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) angeschlossen wurde. Die Perfusion erfolgte

mittels elektronisch gesteuerter Perfusorpumpe, *Perfusor IV* (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) mit einer Geschwindigkeit von 0,6 ml/h.

### 3.3. Datensammlung

#### 3.3.1. Versuchsdaten

Täglich wurde die Tumorgrosse mittels einer Schieblehre gemessen und dokumentiert. Hierzu wurde die aus der sonographischen Volumenberechnung bekannte Formel (Formel zur Berechnung eines Kugelvolumens):

$TU \text{ cm}^3 = \frac{\pi}{6} \cdot \text{Länge (L)} \cdot \text{Breite (B)} \cdot \text{Tiefe (D)}$  verwendet. Ebenfalls dokumentiert wurden Körpergewicht, Nahrungsaufnahme und Trinkverhalten. Im Durchschnitt dauerten die Versuche 9 Tage.

Bei Versuchsende wurden die Tiere euthanasiert und folgende Gewebeproben entnommen: Transaortal wurden 6-10 ml Blut entnommen und mit 1 ml Heparin (Liquemin<sup>®</sup>) vermischt. Gewebeproben von Lunge, Leber, Niere, Milz, sowie vom Tumor selbst wurden entnommen. Lagen makroskopisch sichtbare Metastasen vor, so wurden diese ebenfalls ausgeschnitten und ihre Lokalisation dokumentiert. Der Tumor wurde wie folgt entfernt. Nach einem 5 cm langen Hautschnitt erfolgte eine scharfe Präparation auf die Kapsel des Tumors. Der Kapsel folgend wurde der Tumor in toto wechselnd zwischen scharfer und stumpfer Präparation entfernt. Anschliessend wurde der Tumor sorgfältig auf Gewebereste überprüft und wenn vorhanden, diese entfernt.

Nach Exzision des Primärtumors und eventueller Metastasen erfolgte die Volumenendbestimmung mittels Volumenverdrängung in einer Wassersäule. Anschliessend wurde eine Biopsie aus dem Tumorgewebe entnommen. Die Proben wurden in 10 % Formalin fixiert und nach üblichen Histologieprotokollen mit Haematoxilin & Eosin (H&E) gefärbt. Hierbei färben sich Zellkerne, basophiles Zytoplasma und Kalk blau. Rot färben sich hingegen azidophiles Zytoplasma, Bindegewebe und Fibrin.

#### 3.3.2. Zytotoxizitätstest

Die natürlichen Killerzellen (NK), haben als Funktion, ihnen fremde Zellen - also Zellen mit einer fehlenden oder veränderten MHC Struktur, zu erkennen und zu eliminieren. Der Zytotoxizitätstest wurde mit CytoTox 96<sup>®</sup> (Promega Corporation, Madison, USA, <http://www.promega.com/tbs/tb163/tb163.html>) durchgeführt. Mit

dieser nicht radioaktiven Version des klassischen „Chrom-release-assay“ Test kann die Funktion der NK – Zellen getestet werden. Das Prinzip des Testes besteht darin, die Menge des Cytoplasma-Enzyms LDH zu messen, welches durch Zell-Lyse freigesetzt werden kann. Dies geschieht durch die Reduktion des Redoxharnstoffs Tetrazolium Salz (INT) zu einem roten Farbkomplex. Die Höhe der bei 490 nm spektrophotometrisch gelesenen Extinktion ist direkt proportional zur Menge lysierter Zellen.

Für die Lymphozytenisolierung zur Bestimmung der Anzahl an Effektorzellen bei Versuchsende der Ratte wurden durchschnittlich 8 ml Vollblut aus der Aorta entnommen und das Blut mit 1 ml Liquemin ungerinnbar gemacht. Das Heparinblut wurde anteilig zur Hälfte mit HBSS verdünnt. Vor Zentrifugation mit 1250 U/min für 30 Minuten wurde das Heparinblut / HBSS Gemisch jeweils zu gleichen Anteilen mit Lympholite<sup>®</sup> (Teil des CytoTox 96<sup>®</sup> Testes) überschichtet. Der sich während der Zentrifugation gebildete Lymphozytenring wurde in ein Falcon-Röhrchen abgesaugt, mit 50 ml HBSS verdünnt und für weitere zehn Minuten bei 1800 U/min zentrifugiert. Nach zweimaligen Waschen mit 10 ml HBSS und anschließender wiederholter Zentrifugation für 10 Minuten bei 1800 U/min wurde das resultierende Zellsediment in 2 ml Medium aufgenommen. Das Medium bestand aus 5% FKS, 2% Glutamin, 1% Pent Strept und DMEM ohne Glukose. Es erfolgte ein Vitalitätstest mittels Trypanblau, Zellzählung und Zelleinstellung auf  $5 \times 10^6$  /ml.

Zur Vorbereitung des *Targets – Adhärent*-Tests wurden am Vortag die Zellen aus der Zellkulturflasche trypinisiert und auf  $1 \times 10^6$  /10ml über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss bei 1800 U/min für zehn Minuten zentrifugiert und auf eine Konzentration von  $1 \times 10^5$  /ml eingestellt.

Für die Target – Suspension war es wichtig, dass die Zellen sich 1 – 2 mal geteilt hatten. Das hiess, die Novikoff Hepatoma Zelllinien wurden hierfür 2 – 3 Tage nach der letzten Passage verwendet. Sie wurden ebenfalls einmal abzentrifugiert und auf  $1 \times 10^5$  /ml Zellen eingestellt.

Es erfolgte eine Plattenaussaat in eine 96 Loch – Platte (Wells). Dabei wurden die Effektor – Zellen (Lymphozyten der therapierten Ratten) in verschiedenen Konzentrationen (50/1; 25/1; 12/1; 6/1; 3/1; 1,5/1) mit den Targetzellen gemischt. Dies ergab die Freisetzung von LDH unter in vitro Bedingungen (experimentellen Release). Unter den gleichen Bedingungen wurde ebenfalls Spontanrelease und

Totalrelease der Target Zellen bestimmt. Für den Spontanrelease wurden 100 µl Target Zellen  $1 \times 10^5$  und 100 µl Medium verwendet. Den Totalrelease, also 100 % Lyse wurde ähnlich bestimmt wie der Spontanrelease, jedoch unter Zugabe von 20 µl Triton<sup>®</sup>. Zur Volumenkontrolle wurde 200 µl Medium mit 20 µl Triton verwendet. Als Leerwert (Background) wurde 200 µl verwendet. Die Platte wurde für vier Minuten bei 1250 U/min zentrifugiert und anschliessend für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden pro Well 50 µl abgesaugt und in eine Mikrotiterplatte mit planem Boden gegeben (Fa. NUNC, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland). Die Reaktion wurde mit einer im Versuchsset mitgelieferten Stopplösung (1M Essigsäure) zum Stillstand gebracht und anschliessend bei 490 nm die Extinktion gemessen.

Für die Berechnung der Zytotoxizität ausgedrückt als Prozent der lysierten Zellen (Lyse-Index) wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{(\text{ER} - \text{Background}) - (\text{SR Lymphos} - \text{Background}) - (\text{SR Target} - \text{Background})}{(\text{TR Targets} - \text{VK}) - (\text{SR Targets} - \text{Background})}$$

Die Abkürzungen bedeuten: ER: Effektor Release, SR: Spontan Release, TR: Total Release, VK: Volumenkontrolle

### 3.4. Statistik

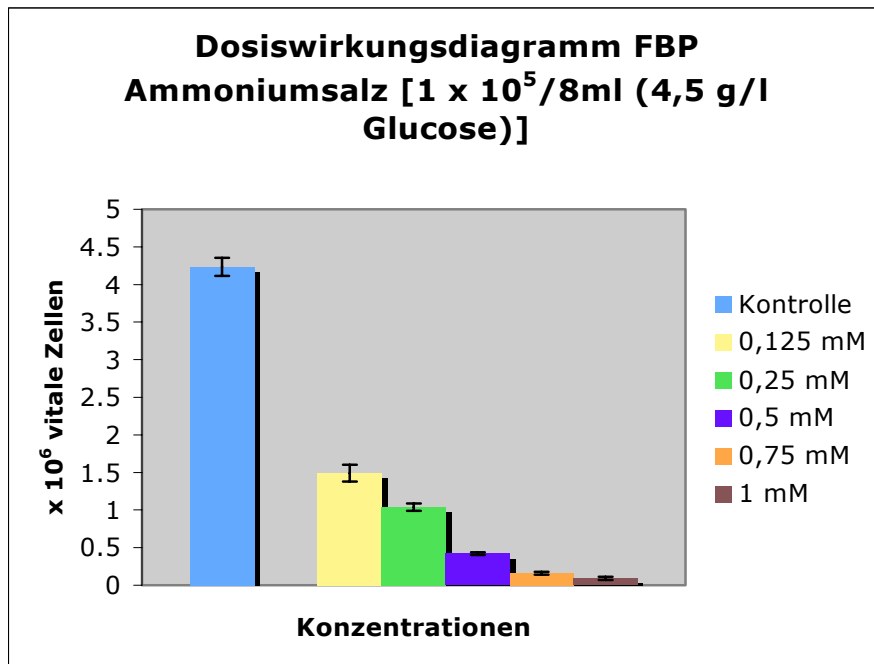
Die Tiere wurden einfach randomisiert. Jeder Gruppe wurde ein unbehandeltes Tier zugeordnet. Für die statistische Auswertung wurde unter Berücksichtigung der Normalverteilung der Student t-Test, ANOVA- und Tukey-Test verwendet. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Mann-Whitney Test und der Median-Test verwendet. Unterschiede waren statistisch signifikant, wenn  $p < 0,05$  war. Die Statistik wurde mit SPSS 11 für Mac OS X ([http://www.spss.com/spss\\_mac/](http://www.spss.com/spss_mac/)) berechnet. Für Rückfragen stellte sich Herr Dr. Hollenhorst, Abteilung Anwendung und Dokumentation, Hochschulrechenzentrum, JLU-Giessen, zur Verfügung.

## **4. ERGEBNISSE**

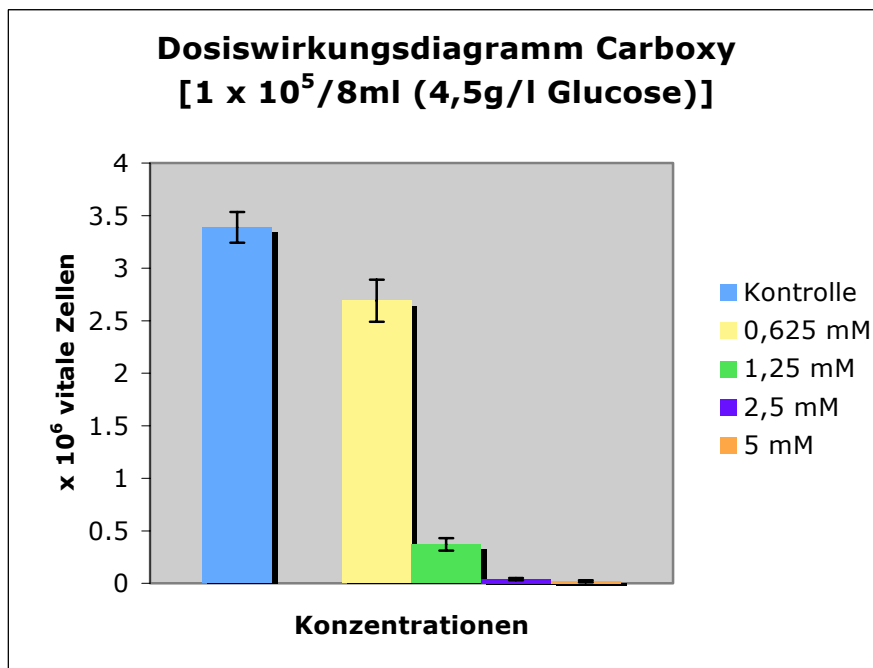
### **4.1. Ermittlung der nötigen Konzentrationsmenge der einzelnen Testsubstanzen**

In Vorversuchen wurden die geeigneten Konzentrationen der einzelnen Testsubstanzen an Novikoff Hepatoma Zellkulturen ermittelt, da die notwendigen Dosierungen nicht in der Literatur beschrieben waren. Als wirksam erschien die Konzentration der Substanzen, bei der kein Zellwachstum zu verzeichnen war, bzw. bei der Konzentration keine vitalen Zellen mehr nachweisbar waren. Die Abbildungen 9 - 13 zeigen die Dosiswirkungsdiagramme mit ihrer Standardabweichung. Zusätzlich wurde bei jedem Versuch eine Kontrollgruppe unter gleichen Bedingungen mitgetestet; jedoch wurde statt der Testsubstanz in gleicher Menge 2 ml 0,9 % NaCl-Lösung zugefügt. In den Test wurden  $1 \times 10^5$  / 8 ml Novikoff Hepatoma Zellen eingesetzt. Dem Medium, bestehend aus den Tumorzellen und 0,9% NaCl wurde die jeweilige Testsubstanz zugefügt. Die Abbildungen 9 -13 zeigen, dass bei steigender Konzentration der Testsubstanzen die Zahl der nachweisbaren vitalen Zellen nach vier Tagen bis unter die Nachweisgrenze sinkt.

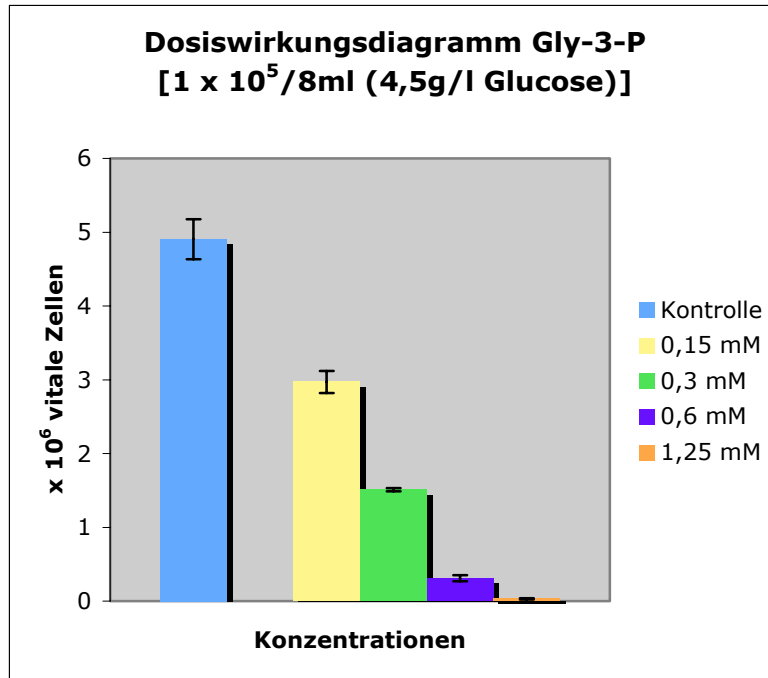




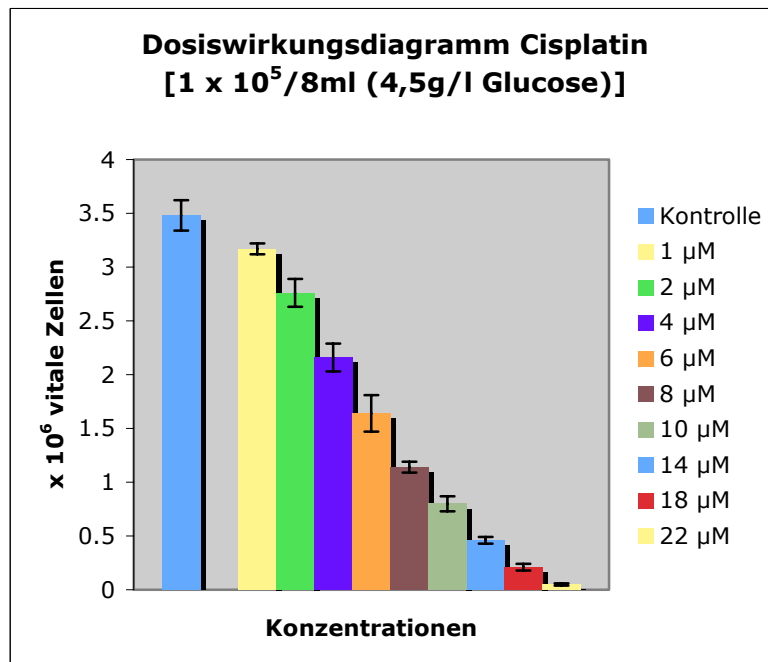
**Abbildung 9:** Konzentrationsermittlung für Fructose 1,6-P<sub>2</sub>



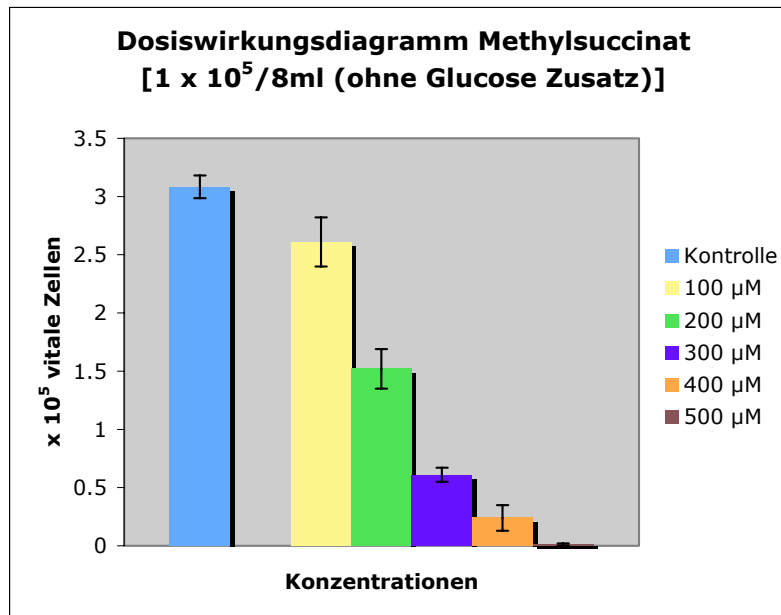
**Abbildung 10:** Konzentrationsermittlung für Aminoxyessigsäure (Carboxy)



**Abbildung 11:** Konzentrationsermittlung für Glycerat-3-P



**Abbildung 12:** Konzentrationsermittlung für Cisplatin



**Abbildung 13:** Konzentrationsermittlung für Bernsteinsäuremonomethylester (Methylsuccinat)

Die ermittelte Konzentration, bei welcher kein Zellwachstum mehr zu verzeichnen war, wurde auf die Tierversuche übertragen. Hierbei spielte der Metabolismus der Ratte eine unbekannt Rolle, welcher nicht bei der Umrechnung berücksichtigt werden konnte. Daher wurden die ermittelten Konzentrationen der einzelnen Substanzen (Fructose-1,6-bisphosphat = 1mM, Aminoxyacetat 5mM, 3-Phospho-Glycerat = 1,25 mM, Cisplatin 22 µM und Methylsuccinat 500 µM) individuell auf das Tiermodell übertragen.

#### 4.1.1. Allgemeine Vermerke zur Durchführung der Tierversuche

Während der Versuche bestätigte es sich, dass es sich bei der Novikoff-Hepatoma-Zelllinie um einen hochmalignen Tumor handelt. Nach der intramuskulären Impfung der Zellen kam es zu hundert Prozent zu einem manifesten Tumor. Die Intervallzeit zwischen der Impfung der Zellen und dem Nachweis eines Tumors im rechten Oberschenkel der Ratte betrug im Schnitt 5,5 Tage (n = 64 Tiere). Die kürzeste Intervallzeit betrug drei Tage, die längste acht Tage. Hierbei zeigte sich folgender Aspekt als äusserst relevant. Wurden die Zellen in einer Zellkultur passagiert, so verloren sie anscheinend nach mehreren Passagen ihre Malignität und

es kam nach der Impfung nicht zur Bildung eines Tumors, oder wenn sich ein Tumor gebildet hatte, zeigte er im weiteren Verlauf kein progredientes Wachstum. Dieses Erkenntnis wurde in Vorversuchen erlangt. Wurden jedoch die Zellen in den Ratten intraperitoneal passagiert, konnte dieser Effekt nicht verzeichnet werden, und es kam somit zu der oben genannten Erfolgsrate.

Während der Versuche musste gelegentlich der Katheter gewechselt werden (n = 18). In den meisten Fällen lag eine Dislokation des Katheters vor. Fünfmal war der Katheter thrombotisch verschlossen. Während der Wechsel wurden die Tiere narkotisiert. Der Wechsel war als solches meist zeitaufwendiger, da die anatomischen Verhältnisse nicht mehr gegeben waren und das vorliegende Gewebe entzündlich verändert war. In einem Fall betrug die Zeit des Eingriffes 65 min. Komplikationen traten in zwei Fällen auf. In einem Fall wurde während des Eingriffes Luft in die Vena jugularis interna aspiriert, was letal für das Tier endete. Im zweiten Fall konnte der Katheter nicht an seiner ursprünglichen Stelle eingeführt werden; daher wurde die V. jugularis dextra verwendet. Bei diesem Tier zeigte sich postoperativ keine Auffälligkeiten.

Im Falle eines Katheterwechsels betrug die Unterbrechung der kontinuierlichen Infusion wenige Stunden. In einem Fall betrug sie jedoch 18 Stunden. Dieses Tier wurde ausgezeichnet und in die Statistik miteinbezogen.

#### **4.1.2. Komplikationen die während der Versuche auftraten**

Ein Problem stellte die Inhalationsnarkose mit Forene<sup>®</sup> dar. Die Tiere zeigten gelegentlich Atemdepressionen bis hin zur Apnoe. Dabei reichte meist eine einfache Herzmassage um den Zustand des Tieres zu stabilisieren. Gelegentlich musste ein handelsüblicher Ampu-Beutel, wie er für Säuglinge verwendet wird, zur Beatmung hinzugezogen werden.

Auch bei der intramuskulären Injektion der Anästhetika folgte gelegentlich unter Atropin Gabe, ein Herz- und Atemstillstand. Die Tiere konnten meist durch obige Massnahmen erfolgreich reanimiert werden. Die längste erfolgreiche Reanimation dauerte 10 Minuten. Diese Tiere wurden in der Statistik mitberücksichtigt. In n = 8 Fällen endete die Narkose bei Versuchsbeginn letal.

Insgesamt sind 14 Ratten im Verlauf des Versuches gestorben. Ein Tier wurde aufgrund seines sehr schlechten Allgemeinzustandes euthanasiert. Bei einem Tier

konnte pathologisch eine zentrale Lungenembolie der linken Lunge diagnostiziert werden. Zwei Tiere starben unter unklaren Umständen, am 3. und am 7. postoperativen Tag.

Besonders in der Kontrollgruppe kam es aufgrund der grossen Tumorumfänge zur Parese des rechten Hinterlaufes. In drei Fällen kam es zu einer Exulzeration des Tumors. Bei einem Tier in der Kontrollgruppe, zeigte sich am Tag des Versuchsendes bei der Gewebesicherung ein massiver obstruktiver Harnverhalt. Auch waren ödematöse Veränderungen des rechten Hinterlaufes keine Seltenheit. Sie traten in der Regel gegen Versuchsende auf und besonders bei einer ausgeprägten Grösse des Tumors.

Die Beurteilung des Allgemeinzustandes des Tieres erfolgte nach den Kriterien der Beschaffenheit des Fells, der Pulsfrequenz, Atemfrequenz, des Trink- und Essverhaltens und der Mobilität.

## 4.2. Auswertungen der einzelnen Gruppen

### 4.2.1. Ergebnisse der Kontrollgruppe mit NaCl-Lösung

Die Kontrollgruppe wurde kontinuierlich mit 0,9% NaCl-Lösung infundiert. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht der Mittelwerte und ihre Standardabweichungen der wesentlichen Daten, die im Versuch gesammelt wurden:

**Tabelle 1:** Übersicht der Daten der Kontrollgruppe (NaCl-Lösung) und ihre Mittelwerte und Standardabweichungen (SD)

	Mittelwert $\pm$ SD
Anzahl der Tiere	n = 10
Anzahl der verstorbenen Tiere während des Versuches	n = 2
Gewicht bei Infusionsbeginn	233 $\pm$ 20,52 g
Gewicht bei Infusionsende	247 $\pm$ 18.74 g
Infusionsdauer	7,4 $\pm$ 2,7 d
Infusionsmenge	62 $\pm$ 21,13 ml
errechnete Tumorumina 1. Tag cm <sup>3</sup>	0.83 $\pm$ 0,43 cm <sup>3</sup>
errechnete Tumorumina am letzten Tag cm <sup>3</sup>	21,2 $\pm$ 9,04 cm <sup>3</sup>
gemessene Tumorumina am letzten Tag ml	43,3 $\pm$ 12,85 ml
Anzahl der Tiere mit Metastasen	n = 6
mittlere Metastasenvolumina	4,8 $\pm$ 5,19 ml
verwendete Konzentration	0,9 %

Bei der Untersuchung zeigte sich in dieser Gruppe, dass bei sechs von neun Versuchstieren Metastase makroskopisch gesichert werden konnten. Die kleinste Metastase umfasste ein Volumen von 1 ml, die grösste 14 ml. Lokalisiert waren die Metastasen retroperitoneal meist im Bereich des kleinen Beckens iliakal. Eine Metastase fand man im Bereich des Truncus coeliacus (14 ml). Zwei Metastasen

fand man paraaortal unterhalb des Abganges der A. renalis (2 ml und 1 ml). Das kleinste gemessene Tumolvolumen betrug 21,8 ml und 58 ml umfasste der Grösste.

Während des Versuches ist ein Tier während des Katheterwechsels gestorben. Kurz nach der Narkoseeinleitung kam es zu einem Herzstillstand.

#### **4.2.2. Ergebnisse der Fructose 1-6-P<sub>2</sub> (FBP) Gruppe**

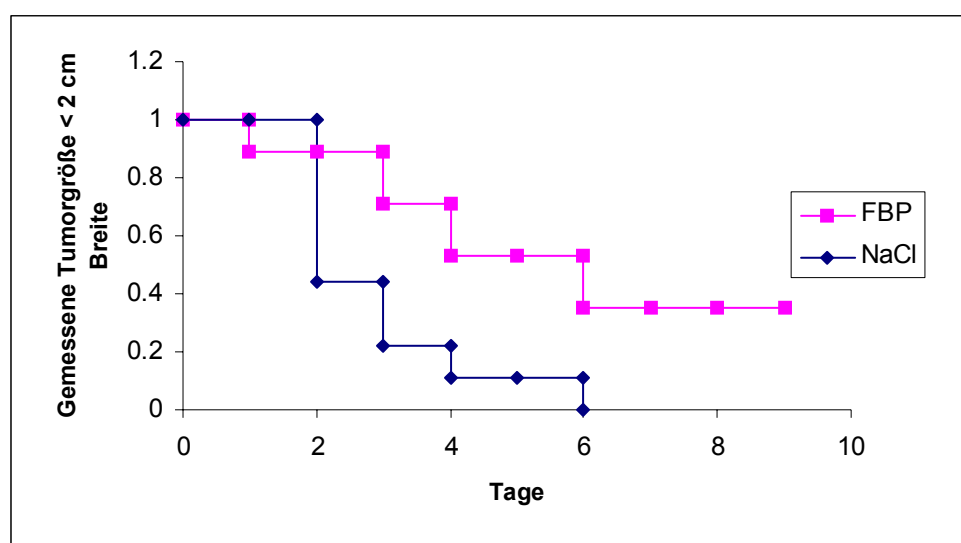
In dieser Testgruppe wurde eine 200 mmolare FBP-Stammlösung mit einer Ringerlösung im Verhältnis 1:6,7 verdünnt, und für die Versuche verwendet. Während der Versuche zeigte sich folgendes Bild: Ein Tier starb aus unerklärlichen Gründen am zweiten postoperativen Tag. Zwei Tiere sind während des Wechsels des Katheters gestorben. Bei einem anderen Tier konnte im Bereich der Iliakalgefäße eine Metastase mit einem Volumen von 1 ml gefunden werden. Insgesamt zeigten alle Tiere über den Versuchszeitraum einen relativ konstanten Gewichtsverlauf. Von den makroskopisch gemessenen Tumorumfängen in dieser Gruppe betrug das Volumen am Ende des Versuches maximal 42 ml, bei 2 Tieren konnte nach dem Versuch kein Tumor makroskopisch nachgewiesen werden.

Um die Grösse der Tumoren mit der Kontrollgruppe vergleichen zu können, wurde die Kaplan-Meier-Sterbetafel hierfür modifiziert. Es wurde die Breite des Tumors standardisiert und nur die Grössen berücksichtigt, welche eine Grösse von kleiner als zwei cm Breite aufwiesen (s. Tabelle 2).

Abbildung 14 zeigt den Verlauf der Tumorgrössen gegen die Tage aufgetragen. Daraus lässt sich folgendes Bild herleiten. Am vierten Tag zeigten fünfzig Prozent der mit FBP therapierten Gruppe Tumoren, die in ihrer Breite kleiner als zwei cm waren. Am neunten Tag waren in der therapierten Gruppe annähernd vierzig Prozent der Tumoren in ihrer Breite noch kleiner als zwei cm. Hingegen zeigt die Kontrollgruppe am sechsten Tag, dass hundert Prozent der Tumoren grösser oder gleich 2 cm Breite waren.

**Tabelle 2:** Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe FBP-Gruppe

Anzahl der Tiere	n = 10
Anzahl der verstorbenen Tiere während des Versuches	n = 4
Gewicht bei Infusionsbeginn	215,7 ± 25,41 g
Gewicht bei Infusionsende	213,3 ± 32,2 g
Infusionsdauer	8,7 ± 0,52 d
Infusionsmenge	68,2 ± 5,42 ml
errechnete Tumorumfänge 1. Tag cm <sup>3</sup>	1,0 ± 1,18 cm <sup>3</sup>
errechnete Tumorumfänge am letzten Tag cm <sup>3</sup>	9,4 ± 8,73 cm <sup>3</sup>
gemessene Tumorumfänge am letzten Tag ml	21,33 ± 17,48 ml
Anzahl der Tiere mit Metastasen	n = 1
mittleres Metastasenvolumen	n = 1 ml
verwendete Konzentration	29,8 mM

**Abbildung 14:** Gemessene Tumorgrößen (cm/Breite) im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der FBP Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.



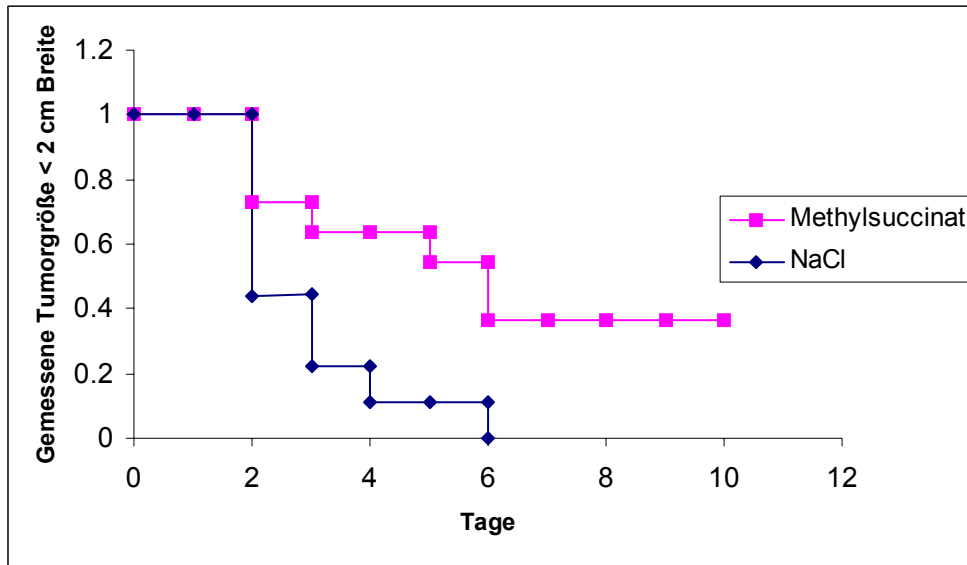
### 4.2.3. Ergebnisse der Bernsteinsäuremonomethylester Gruppe

Während der Versuchsreihe sind hier ebenfalls zwei Tiere gestorben. Ein Tier ist nach dem Katheterwechsel postoperativ verstorben. Das zweite Tier ist am siebten Tag postoperativ aus unklarer Ursache gestorben. In dieser Versuchsreihe fanden sich keine besonderen Auffälligkeiten, die Einfluss auf den Versuch hätten nehmen können. Die gefundenen Metastasen zeigten eine Grösse von 1 und 2 ml auf. Lokalisiert waren sie zum einen paraaortal und im Bereich der Iliakalgefässe. Die maximal gemessene Grösse betrug rund 48 ml (s. Tabelle 3), in einem Fall war markoskopisch kein Tumor mehr sichtbar gewesen.

In der nach Kaplan – Meier modifizierten Auswertung zeigte sich folgendes Bild. Am vierten Tag waren sechzig Prozent der Tumoren noch kleiner als 2 cm und am zehnten Tag noch vierzig Prozent kleiner als 2 cm (Abbildung 15).

**Tabelle 3:** Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Bernsteinsäuremonomethylester

Anzahl der Tiere	n = 11
Anzahl der verstorbenen Tiere während des Versuches	n = 2
Gewicht bei Infusionsbeginn	219,1 ± 10,22 g
Gewicht bei Infusionsende	226,0 ± 39,43 g
Infusionsdauer	9,11 ± 0,78 d
Infusionsmenge	74,44 ± 6,02 ml
errechnete Tumorumfänge 1. Tag cm <sup>3</sup>	1,14 ± 0,53 cm <sup>3</sup>
errechnete Tumorumfänge am letzten Tag cm <sup>3</sup>	12,77 ± 12,55 cm <sup>3</sup>
gemessene Tumorumfänge am letzten Tag ml	22,7 ± 16,67ml
Anzahl der Tiere mit Metastasen	n = 2
mittleres Metastasenvolumen	1,5 ± 0,71 ml
verwendete Konzentration	1 mM



**Abbildung 15:** Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Bernsteinsäuremonomethylester Gruppe (Methylsuccinat). Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.

#### 4.2.4. Ergebnisse der Cisplatin Gruppe

Der allgemeine Teil der Ergebnisse geht aus der Tabelle 4 hervor.

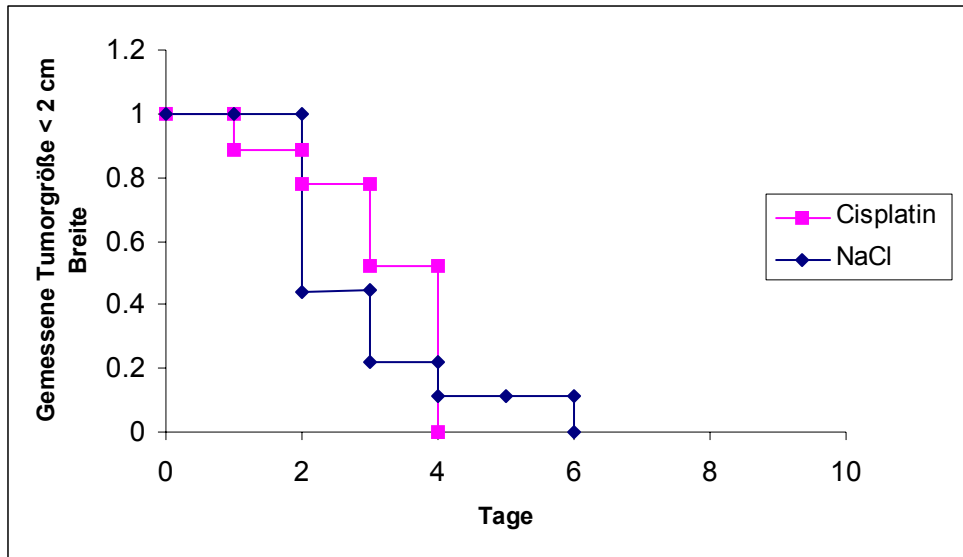
**Tabelle 4:** Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Cisplatin

Anzahl der Tiere	n = 9
Anzahl der verstorbenen Tiere während des Versuches	n = 1
Gewicht bei Infusionsbeginn	199,63 ± 18,08 g
Gewicht bei Infusionsende	228,5 ± 27,80 g
Infusionsdauer	8,63 ± 1,51 d
Infusionsmenge	68,50 ± 9,72 ml
errechnete Tumorumfänge 1. Tag cm <sup>3</sup>	0,86 ± 0,57 cm <sup>3</sup>
errechnete Tumorumfänge am letzten Tag cm <sup>3</sup>	15,85 ± 2,45 cm <sup>3</sup>
gemessene Tumorumfänge am letzten Tag ml	37,00 ± 7,17 ml
Anzahl der Tiere mit Metastasen	n = 3
mittleres Metastasenvolumen	4,00 ± 2,00 ml
verwendete Konzentration	5 µg

Der Verlauf dieser Gruppe verlief weitestgehend komplikationslos. Ein Tier verstarb am vierten postoperativen Tag im Rahmen der Narkoseeinleitung, um einen Katheterwechsel durchzuführen. Bei einem Tier ist der Tumor am vierten postoperativen Tag exulzeriert. Bei diesem Tier zeigten sich Metastasen zum einen im Oberbauch para-aortal (1 ml) und Metastasen im Bereich der Iliakalgefäße (4 ml). Ferner traten bei zwei anderen Tieren Metastasen im Bereich der Aorta, unterhalb der Abgänge der A. renalis, zu jeweils 7 ml und zu 6 ml auf. Die Tumorgröße betrug am letzten Tag minimal 32 ml und maximal 50 ml.

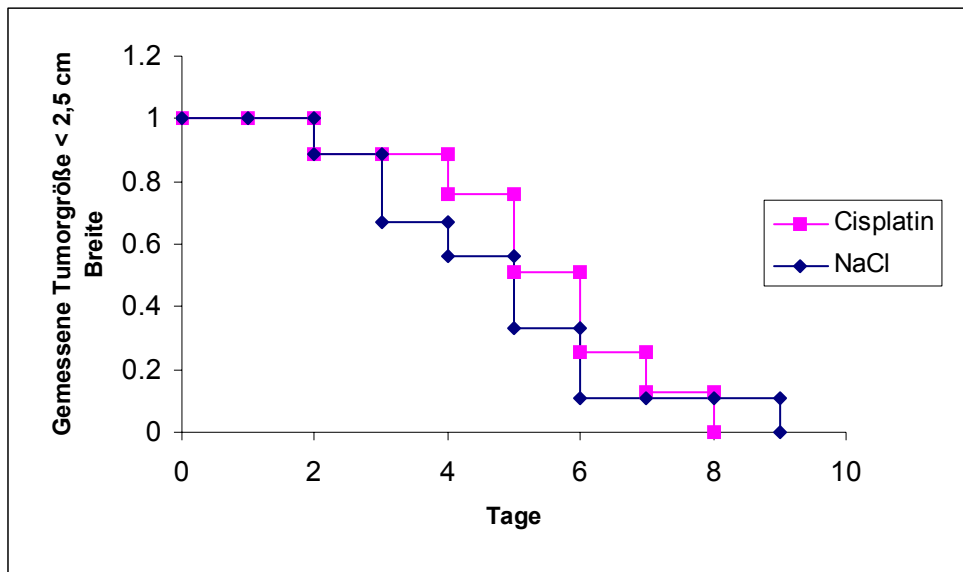
Trägt man die Werte der Tumorgößen nach Kaplan - Meier auf (Abbildung 16) und vergleicht sie mit der Kontrollgruppe, dann stellt man fest, dass der Verlauf zwischen beiden Gruppen annähernd gleich ist. Die Tiere, die mit Cisplatin behandelt

wurden, zeigten überraschenderweise schon am vierten Tag zu hundert Prozent eine Tumorgröße von grösser und gleich zwei cm in ihrer Breite. In der NaCl-Lösung Gruppe waren zehn Prozent der Tumoren an dem vierten Tag noch kleiner wie zwei cm.



**Abbildung 16:** Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Cisplatin Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.

Ändert man in der Auswertung in dieser Gruppe das Kriterium und berücksichtigt die Tumorgrößen, welche unter 2,5 cm liegen und trägt sie gegen die Kaplan – Meier Tafel auf, dann wird der parallele Verlauf der NaCl-Lösung Gruppe mit Cisplatin-Gruppe deutlicher (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Cisplatin Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2,5 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.

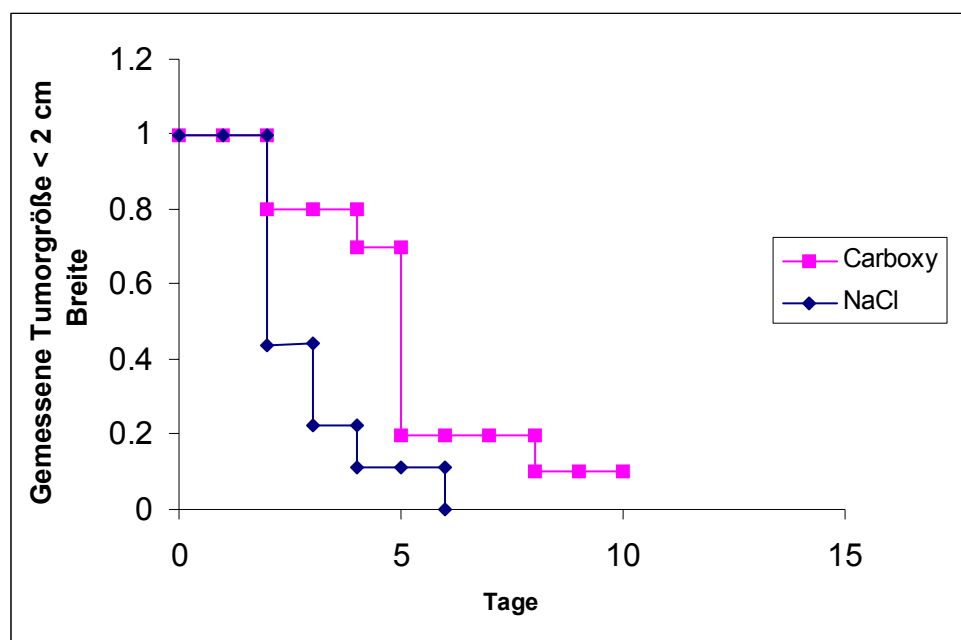
#### 4.2.5. Ergebnisse der Aminoxyessigsäure-Hemihydrochlorid ( $C_2H_5NO_3 \cdot \frac{1}{2} HCl$ )

In dieser Gruppe betrug das maximale Tumolvolumen 38 ml. Bei einem Tier konnte nach Therapie makroskopisch kein Tumor mehr nachgewiesen werden. Bei der Probensicherung fand sich bei einem Tier eine Metastase im Bereich der Iliakalgefäße mit einem Volumen von 1 ml. Ein Tier verstarb am sechsten Tag an einer zentralen linksseitigen Lungenembolie. Zu diesem Zeitpunkt besaß der Tumor eine Größe von rund  $12,6 \text{ cm}^3$ . Auffallend in dieser Gruppe war, dass verglichen mit den übrigen hier am wenigsten Komplikationen auftraten, wie z.B. Katheterwechsel. Zu keinem Zeitpunkt war in dieser Gruppe ein Tier in einem ausgeprägt schlechten Allgemeinzustand (s. Tabelle 5).

Die Abbildung 18 zeigt die Vergleichsverläufe zur Kontrollgruppe: Es zeigte sich, dass am vierten Tag noch achtzig Prozent der Tumoren kleiner als zwei cm breit waren. Am fünften Tag kam es jedoch zu einer explosionsartigen Vergrößerung der Tumoren, so dass am letzten Tag nur noch zehn Prozent der Tumoren kleiner als 2 cm breit waren.

**Tabelle 5:** Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Aminoxyessigsäure-Hemihydrochlorid

Anzahl der Tiere	n = 11
Anzahl der verstorbenen Tiere während des Versuches	n = 2
Gewicht bei Infusionsbeginn	204,10 ± 22,41 g
Gewicht bei Infusionsende	213,8 ± 36,74 g
Infusionsdauer	9,00 ± 0,71 d
Infusionsmenge	72,67 ± 7,48 ml
errechnete Tumorumfänge 1. Tag cm <sup>3</sup>	0,72 ± 0,31 cm <sup>3</sup>
errechnete Tumorumfänge am letzten Tag cm <sup>3</sup>	11,72 ± 6,25 cm <sup>3</sup>
gemessene Tumorumfänge am letzten Tag ml	27,89 ± 13,16 ml
Anzahl der Tiere mit Metastasen	n = 1
mittleres Metastasenvolumen	n = 1 ml
verwendete Konzentration	5 mM

**Abbildung 18:** Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Aminoxyessigsäure-Hemihydrochlorid (Carboxy) Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.

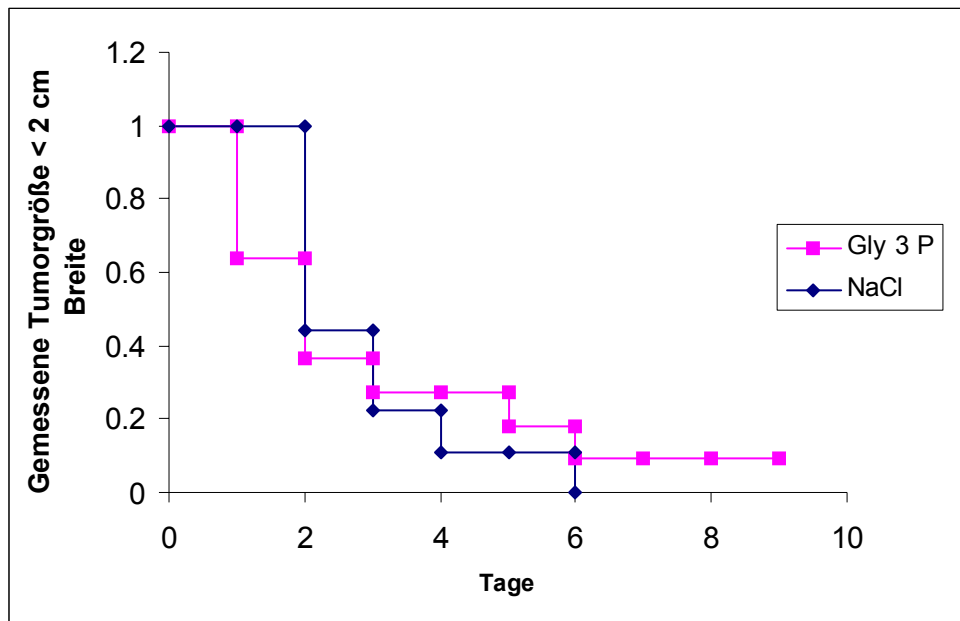
#### 4.2.6. Ergebnisse der Glycerat-3-P Reihe

Von den zwölf Tieren ist ein Tier beim Katheterwechsel gestorben. Bei einem Tier ist der Tumor exulzeriert. Die Tumorgrossen in  $\text{cm}^3$ , die jeweils am ersten und am letzten Tag gemessen wurden, können nur auf folgende Tiere übertragen werden: 3305, 3401, 3403 und 3703, da bei diesen Versuchen, wie auch in allen anderen Gruppen die Länge (L), die Breite (B) und die Tiefe (D) gemessen wurde. Bei den übrigen Tieren dieser Gruppe wurden nur die Länge und die Breite berücksichtigt. Die Versuche standen zu diesem Zeitpunkt noch am Anfang der Arbeit. Da für die Kaplan – Meier Tafel nur die Breite berücksichtigt wurde, konnten die Werte von allen Tieren für diese herangezogen werden (s. Tabelle 6).

Überraschenderweise zeigten sich in dieser Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe keine besonderen Unterschiede im Verlauf der Tumorgrossen. Der Verlauf deckt sich annähernd mit der Kontrollgruppe. Dies veranschaulicht die Abbildung 18. Daher wurde hier das Kriterium der Tumorgrosse auf eine Grösse von kleiner 2,5 cm erweitert (Abbildung 19). Dabei zeigte sich im Verlauf eine sprunghafte Grössenzunahme des Tumors am dritten Tag.

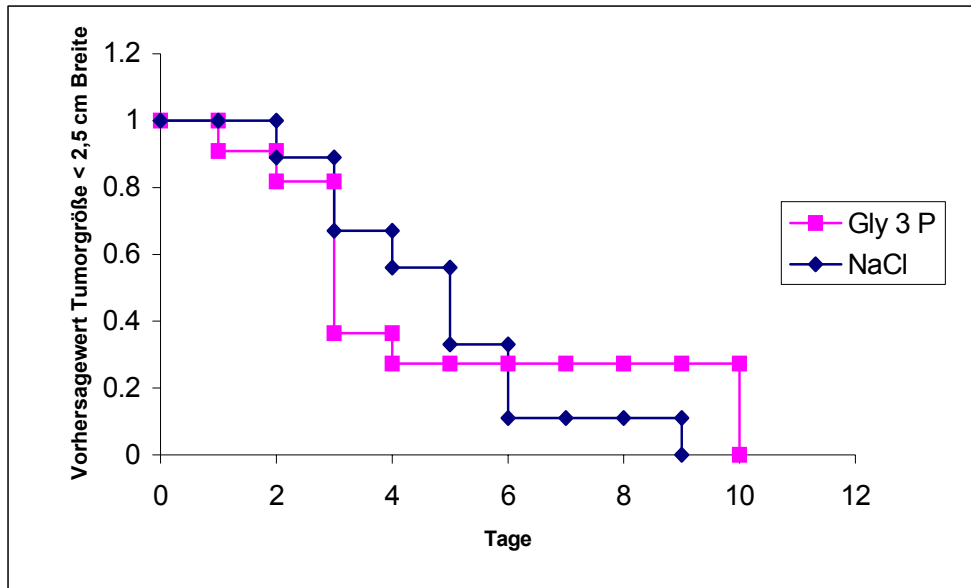
**Tabelle 6:** Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Glycerat-3-P Gruppe  
 (\* Berücksichtigt sind folgende Tiere: 3305, 3401, 3403, 3703)

Anzahl der Tiere	n = 13
Anzahl der verstorbenen Tiere während des Versuches	n = 3
Gewicht bei Infusionsbeginn	230,64 ± 15,56 g
Gewicht bei Infusionsende	248,30 ± 21,62 g
Infusionsdauer	8,50 ± 1,27 d
Infusionsmenge	68,30 ± 13,34 ml
errechnete Tumorumfänge 1. Tag cm <sup>3</sup>	0,92* ± 0,52* cm <sup>3</sup>
errechnete Tumorumfänge am letzten Tag cm <sup>3</sup>	20,93* ± 16,99* cm <sup>3</sup>
gemessene Tumorumfänge am letzten Tag ml	25,90 ± 17,65 ml
Anzahl der Tiere mit Metastasen	n = 1
Mittleres Metastasenvolumen	n = 5 ml
verwendete Konzentration	1,25 mM



**Abbildung 19:** Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Glycerat-3-P Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.



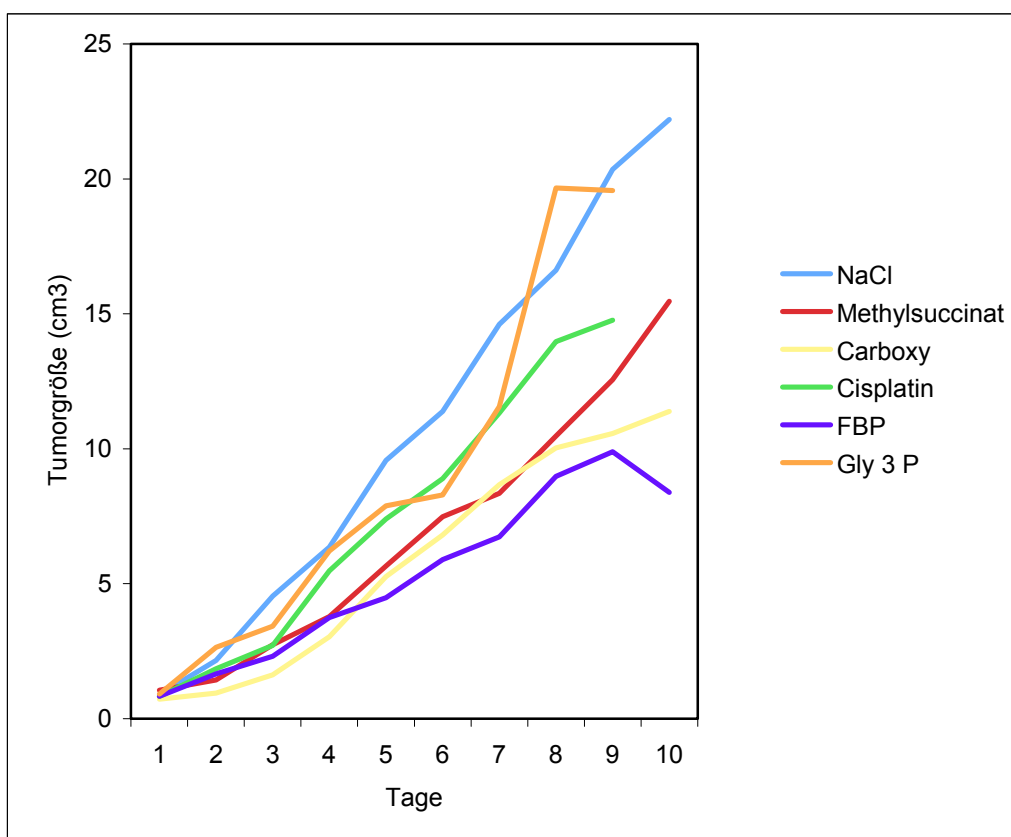


**Abbildung 20:** Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Glycerat-3-P Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2,5 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.

### 4.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse

#### 4.3.1. Vergleich des Tumorwachstums ( $\text{cm}^3$ ) der einzelnen Gruppe gegen die Kontrollgruppe (NaCl-Lösung)

In Abbildung 21 ist der Mittelwert der Tumorgrößen der jeweiligen Gruppen innerhalb der ersten 10 Tage dargestellt. Die Tumorgröße wurde mittels einer handelsüblichen Schublehre bestimmt und in  $\text{cm}^3$  berechnet. Die hierfür ermittelten Daten finden sich im Anhang (Tabelle I). Auf die Darstellung der Standardabweichung musste wegen der sonst eingeschränkten Übersicht verzichtet werden.



**Abbildung 21:** Mittelwerte der mittels einer Schublehre gemessenen und daraus errechneten Tumorumfänge ( $\text{cm}^3$ ) im rechten Gluteus-Muskel als Funktion der Zeit.

Die Abbildung 21 zeigt, dass zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe ein Unterschied im Verlauf der Größenzunahme der Tumoren besteht. So zeigt die Gruppe, die mit Fructose-1,6-bisphosphat behandelt wurde, im Vergleich zu der NaCl-Gruppe den deutlichsten Unterschied und einen weniger

progredienten Verlauf der Tumorgrösse. Dieser Unterschied ist nach dem Tukey Test für parametrische Daten signifikant zur Kontrolle. Die Signifikanzen für alle Substanzen ist in Tabelle 7 zusammengefasst. Als abhängige Variable wurde der Verlauf des Tumolvolumens ( $\text{cm}^3$ ) vom ersten bis zum letzten Tag gewählt. Sie wurde gegen die Kontrollgruppe getestet. Die Voraussetzung der Normalverteilung, wie sie für parametrische Test gefordert werden, waren unter dem Ausschluss eines Tieres der Gruppe, die mit Cisplatin behandelt wurde (Nr. 3905), gegeben. Zum Beweis der Normalverteilung wurde der Levenne Test angewendet. Dieser zeigte keine Signifikanz.

**Tabelle 7:** Statistische Auswertung nach Tukey

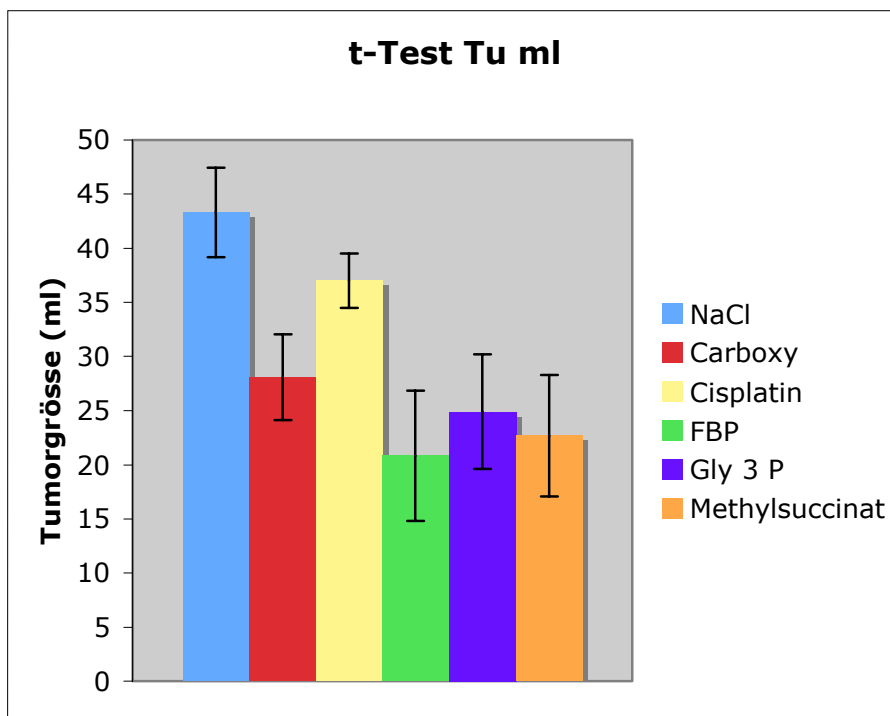
	Tukey Test
Aminooxyessigsäure	$p = 0,145$
Cisplatin	$p = 0,433$
FBP	$p = 0,044^*$
Gly-3-P	$p = 0,975$
Methylsuccinat	$p = 0,477$

Während bei den anderen Testsubstanzen statistisch kein signifikanter Einfluss auf das Wachstum des Novikoff Hepatomas zeigten, kann für FBP eine Verzögerung des Wachstums gezeigt werden. Vermutlich bewirkt es eine Aktivierung der Glykolyse durch einen Shift von der inaktiven dimeren Form der Pyruvatkinase zugunsten der aktiven tetrameren Form. Wenn dies so sein sollte, dann ist derzeit unklar, wie die Substanz die Plasmamembran durchdringen kann und dabei auch nicht dephosphoryliert wird.

#### 4.3.2. Vergleichende Untersuchung der Tumolvolumina (ml)

Im weiteren wurde untersucht, ob am Ende der Versuche ein behandlungsbedingter signifikanter Unterschied zwischen den Volumina der Tumoren vorliegt. Das Tumolvolumen wurde durch Wasserverdrängung gemessen.

Zur statistischen Auswertung wurde der Student t-Test verwendet. Die Bedingung einer Normalverteilung wurde mit dem Levene Test belegt. Die folgende Abbildung zeigt die Mittelwerte der Tumorendvolumina (ml) mit ihrer Standardabweichung. Hierbei fällt auf, dass Aminooxyessigsäure, FBP, Gly-3-P und Bernsteinsäuremonomethylester bei Versuchsende ein signifikant geringeres Tumolvolumen aufwiesen, als die Kontrollgruppe. Lediglich für Cisplatin ergab sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Die Tumorendvolumina nach Behandlung mit den verschiedenen Substanzen  $\pm$  SD werden in Abbildung 22 verglichen.



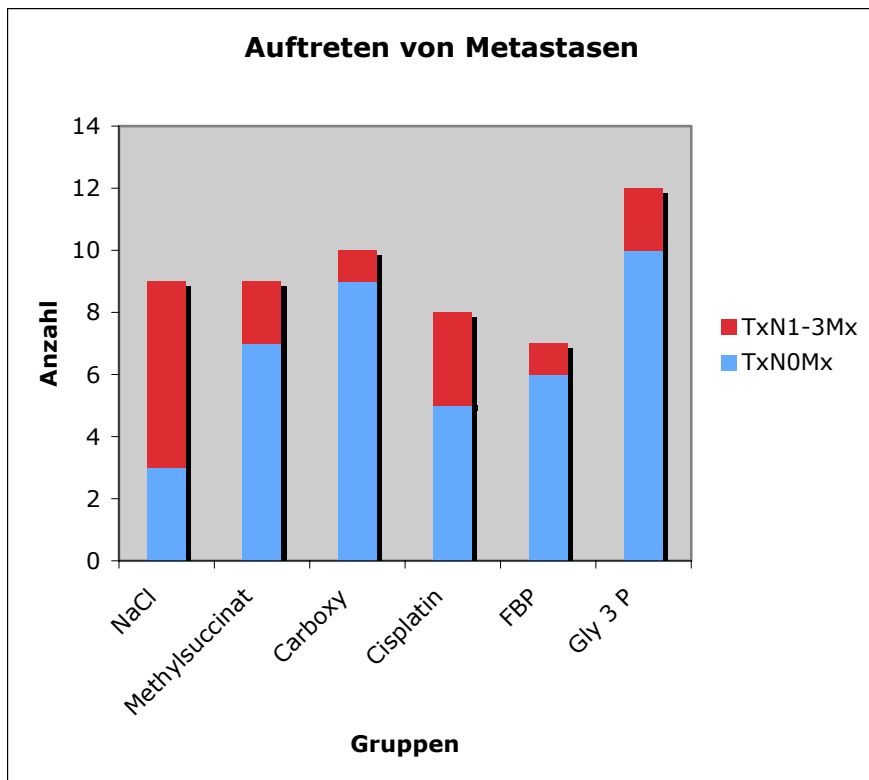
**Abbildung 22:** Tumorendvolumen (ml), gemessen mittels Wasser verdrängung.

*Aminooxyessigsäure (Carboxy):*  $p = 0,016$ , *Cisplatin:*  $p = 0,225$ , *Fructose-1,6-P<sub>2</sub> (FBP):*  $p = 0,007$ , *Glycerat-3-P:*  $p = 0,018$ , *Methylsuccinat:*  $p = 0,009$

### **4.3.3. Auswertung des Auftretens von Metastasen**

Im weiterem habe ich geprüft, ob in allen Gruppen Metastasen im Verlauf gleich häufig auftreten. Hierbei interessierte nicht der Aspekt der Grösse der aufgetretenen Metastasen, als vielmehr die Anzahl der nachweisbaren Zweittumoren. Mit Ausnahme von Cisplatin lagen in allen Gruppen keine Normalverteilung vor. Daher wurde hier der Mann-Whitney-Test für nicht parametrische Test angewendet. Für die Cisplatin Gruppe konnte der Student t-Test angewendet werden.

Die Abbildung 23 zeigt die Anzahl der Tumoren in jeder Behandlungsgruppe am Ende des Versuches. Hier wird zum einen die Anzahl der Tiere ohne und mit Metastasen (TxN0Mx bzw. TxN1-3Mx) mit Hilfe eines Balkendiagramm gezeigt.



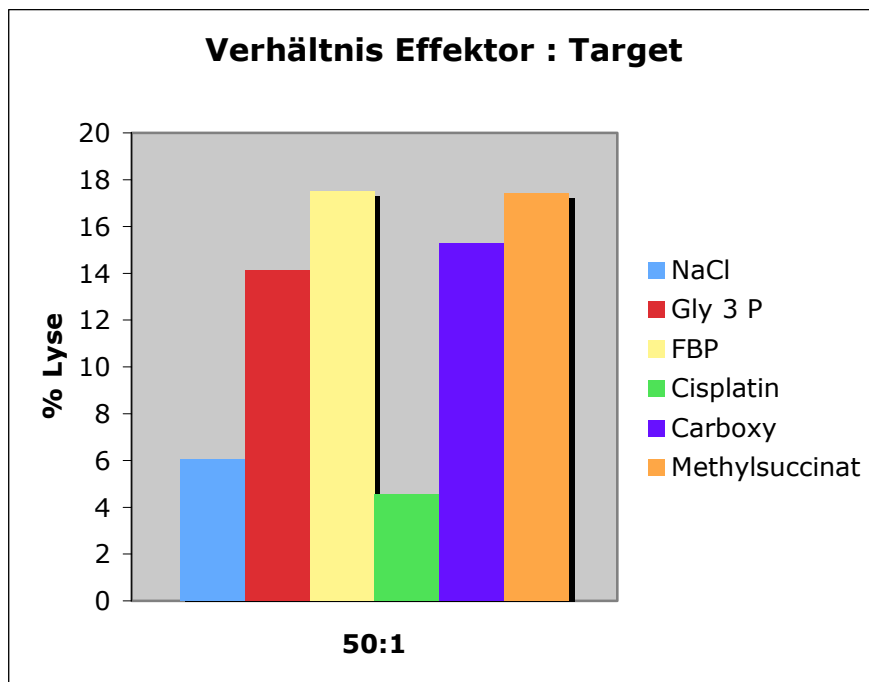
**Abbildung 23:** Anzahl der aufgetretenen Metastasen (rotmarkiert) in den einzelnen Gruppen.

*Methylsuccinat*  $p = 0,046$ , *Aminooxyessigsäure (Carboxy)*  $p = 0,009$ , *Cisplatin*  $p=0,36$ , *FBP*  $p = 0,03$ , *Gly-3-P*  $p = 0,042$

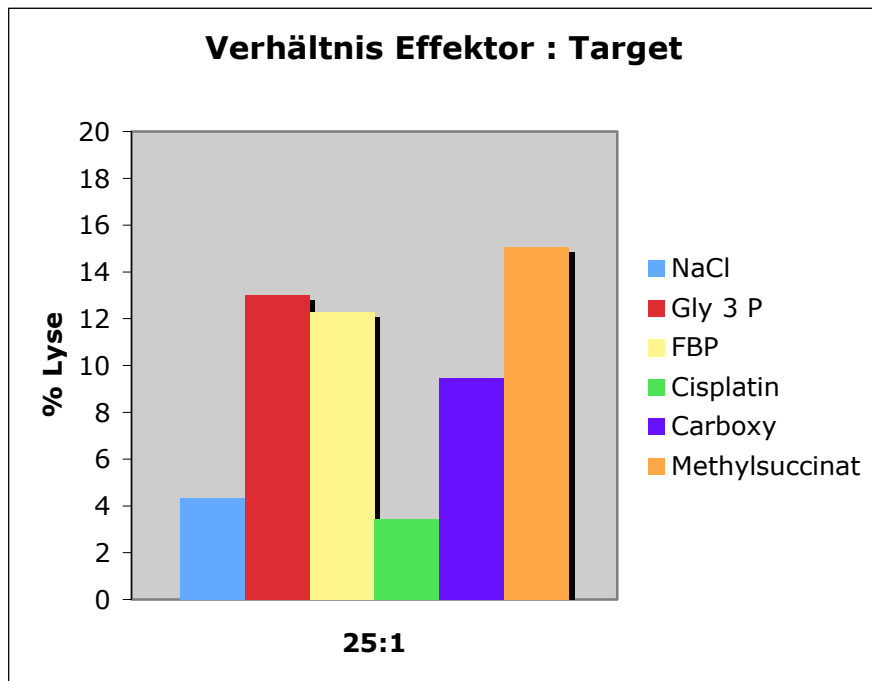
Es kann hierbei gezeigt werden, dass zwischen dem Auftreten von Metastasen und der Art der Therapie ebenfalls deutliche Unterschiede vorliegen. Mit Ausnahme der Cisplatin-Gruppe kommt es bei allen therapierten Gruppen zu einem geringen Auftreten von Metastasen.

#### 4.4. In vitro Untersuchungen des ZytoTox 96<sup>®</sup> Test

Mit diesem Test sollte geprüft werden, ob eine Beeinflussung des Immunsystems der Versuchstiere unter Therapie gezeigt werden kann und eine veränderte Reaktion der natürlichen Killerzellen auf Tumorzellen vorliegt. Hierfür wurde bei Versuchsende den Tieren 5-6 ml Blut entnommen und für den Zytotoxizitätstest verwendet. Die folgenden Abbildungen 23-25 zeigen die Ergebnisse der Zell-Lyse in Prozent bei unterschiedlichen Verhältnissen zwischen Effektor und Targetzellen.

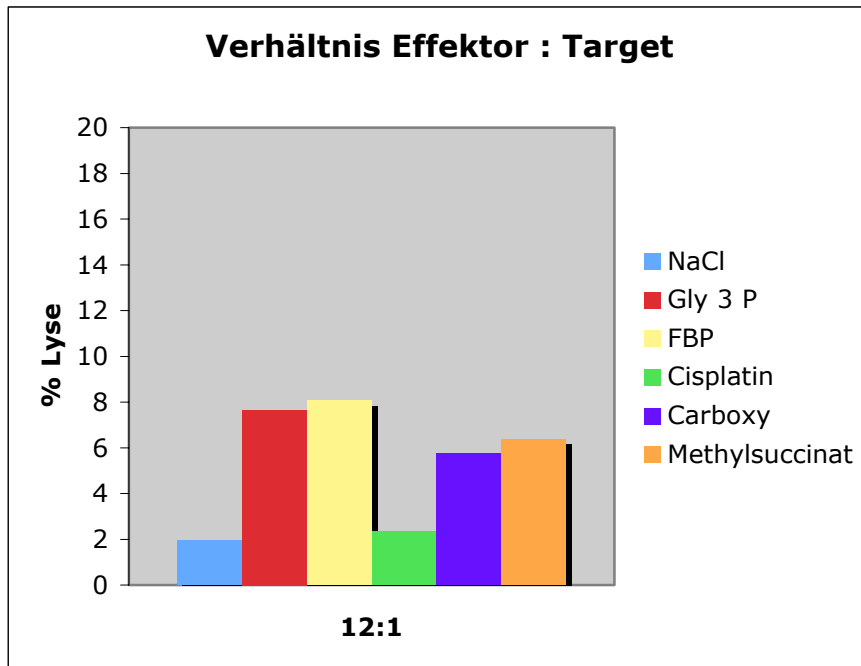


**Abbildung 24:** Aminoxyessigsäure (Carboxy)  $p = 0,001$ , Cisplatin  $p = 0,375$ , Glycerat-3-P  $p = 0,637$ , Methylsuccinat  $p = 0,103$ , FBP  $p = 0,027$



**Abbildung 25:** Aminoxyessigsäure (Carboxy)  $p = 0,004$ , Cisplatin  $p = 0,696$ , Glycerat-3-P  $p = 0,000$ , Methylsuccinat  $p = 0,103$ , FBP  $p = 0,000$





**Abbildung 26:** *Aminooxyessigsäure (Carboxy)*  $p = 0,002$ , *Cisplatin*  $p = 0,581$ , *Glycerat-3-P*  $p = 0,015$ , *Methylsuccinat*  $p = 0,103$ , *FBP*  $p = 0,006$

Aufgrund der z.T. unterschiedlich vorliegenden Ergebnisse kann nur für Aminooxyessigsäure und FBP eindeutig eine Signifikanz gezeigt werden. Sie zeigen eine immunmodulatorische Wirkung auf die Natürlichen Killerzellen (NK). Unter einer kontinuierlichen Perfusion mit beiden Substanzen werden diese NK im Organismus positiv beeinflusst und vermögen eine deutlich höhere Lyserate in Gegenwart von Novikoff Hepatoma Zellen zu zeigen. Für Cisplatin und Bernsteinsäuremonomethylester (Methylsuccinat) können keine immunmodulatorische Wirkung nachgewiesen werden. Aufgrund der wechselnden Signifikanzen in der Gruppe die mit Glycerat-3-P behandelt wurde, kann hier keine Aussage getroffen werden.

## 5. Diskussion

Von den im Rattenmodell getesteten Substanzen Aminooxyessigsäure, Bernsteinsäure-Monomethylester, Glycerat-3-P, Aminooxyessigsäure, Fructose-1,6-bisphosphat und Cisplatin zeigte bei Langzeitinfusion nur Fructose-1,6-bisphosphat eine Verzögerung des Wachstums des in den rechten Glutaeus maximus applizierten Tumors (Abb. 20). Die Infusion von Fructose-1,6-bisphosphat reduzierte zum einen die relative Grössenzunahme ( $\text{cm}^3$ ) des Tumors, zum anderen auch das absolute Tumolvolumen (ml) der Tumoren im rechten Glutaeus am Ende des Versuchs, als auch die Anzahl der Metastasen verglichen zur Kontrollgruppe (Abb. 21, Tabelle 8). Für Aminooxyessigsäure, Methylsuccinat und Glycerat-3-P zeigten sich am Ende der Versuche sowohl geringere Tumorendvolumina (ml), als auch ein geringeres Auftreten von Metastasen (Abbildung 22 und 23). Hingegen konnte nicht gezeigt werden, dass unter Gabe dieser Substanzen ein Unterschied in der relativen Grössenzunahme der Tumoren ( $\text{cm}^3$ ) im Verlauf nachweisbar ist. Eine Erklärung hierfür kann darin liegen, dass Tumoren bis zu einem Durchmesser von 2 cm ihre notwendige Energie über Schritte der Glutaminolyse beziehen (Eigenbrodt 1998). Aminooxyessigsäure und Methylsuccinat sind Metabolite, welche auf unterschiedliche Weise die Glutaminolyse hemmen. Liegt nun der Durchmesser der Tumoren darüber, scheinen sowohl Aminooxyessigsäure, als auch Methylsuccinat kaum einen Einfluss mehr auf die Progression des Tumors zu besitzen. Diese Interpretation lässt sich durch die statistische Auswertung des Auftretens von Metastasen unterstreichen. In beiden Gruppen treten statistisch gesichert geringer Metastasen auf. Hier scheinen beide Substanzen ihre Wirkung voll entfalten zu können, da es sich zu Beginn der Metastasenbildung um Tumordurchmesser kleiner als 2 cm im Durchmesser handelt.

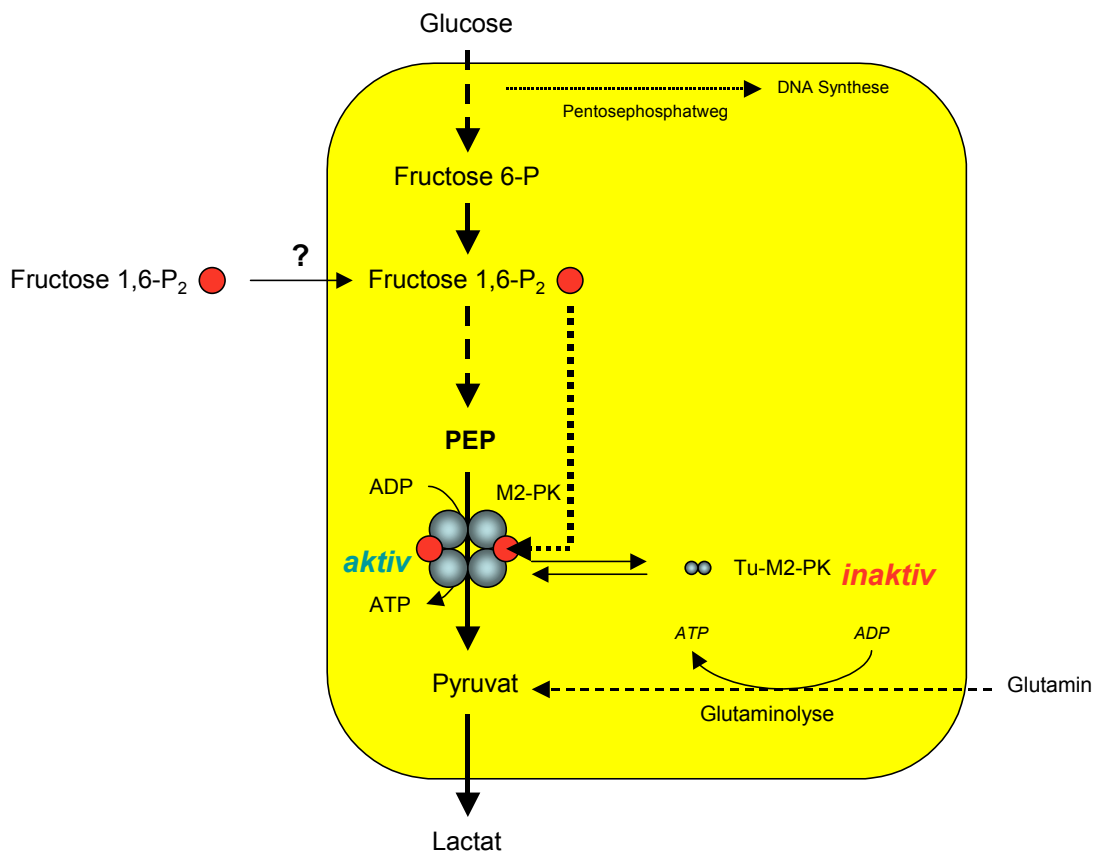
Für die Gruppe der Tiere die mit Cisplatin behandelt wurden konnte in keiner Untersuchung ein therapeutischer Effekt verzeichnet werden.

Fructose-1,6-bisphosphat ist ein allosterischer Aktivator des Glykolyse-Enzyms Pyruvatkinase (Eigenbrodt 1998). Der Glykolyse-Metabolit verschiebt durch seine Bindung an die allosterische Bindungsstelle der Pyruvatkinase und die dadurch induzierte Änderung der Faltungskonformation des Proteins das Gleichgewicht zwischen dimerer und tetramerer Form der Pyruvatkinase Typ M2 zugunsten der

tetrameren Form (Abb. 2) (Mazurek 2000/a). Letztere besitzt eine erhöhte Affinität zu seinem Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP). Aufgrund der so erhöhten Aktivität des Enzyms wird vermehrt Pyruvat gebildet. Das bedeutet auch, dass vermehrt Glucose abgebaut wird und all die Stoffwechselnebenwege, die in die Glycolyse einmünden, ebenfalls entleert werden. Es fehlen folglich Intermediärprodukte, welche unter anderem für die Synthese von Nucleinsäuren - und damit für die Zellvermehrung und das Wachstum - erforderlich sind (Abbildung 27). Dies würde erklären, weshalb die Proliferationsrate der malignen Zellen im günstigsten Fall gestoppt, jedoch zumindest gesenkt werden kann (Abbildung 21).

In dieser Arbeit kann dieser Sachverhalt indirekt belegt werden. Dass in den Versuchen ein statistisch geringeres Tumorwachstum unter FBP sich zeigte kann hierfür ein Beleg sein.

Die in Abbildung 27 gezeigte Interpretation der Wirkung der Infusion von Fructose-1,6-bisphosphat setzt voraus, dass der Metabolit aus dem Blut in die Tumorzellen aufgenommen wird. Es ist zwar bekannt, dass Fructose in Zellen aufgenommen wird, es ist aber unbekannt, ob das negativ geladene Fructose-1,6-bisphosphat die Zellmembran passieren kann und ob es hierfür einen Transporter gibt. Üblicherweise phosphorylieren die Zellen Zuckermoleküle, damit sie nach ihrer Resorption nicht wieder aus den Zellen ausgeschleust werden können. Insofern ist es verwunderlich, dass die Infusion von Fructose-1,6-bisphosphat einen Effekt auf das Tumorwachstum hat. Für die Infusion wurde eine 29,8 mM Fructose-1,6-bisphosphat-Lösung infundiert. Die Blutkonzentration ist unter Infusionsbedingungen nicht bekannt. Ein Großteil der Substanz dürfte jedoch durch Phosphatasen im Blut abgebaut werden. Es müsste somit überprüft werden, ob Fructose-Infusionen im gleichen Konzentrationsbereich zu ähnlichen Effekten auf das Tumorwachstum führen können. Es ist bekannt, dass Fructose die Glykolyse durch Aktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase stimulieren kann. Falls der Fructose-1,6-bisphosphat-Effekt auf das Tumorwachstum wirklich spezifisch ist, dann ergibt sich die Möglichkeit über eine chemische Modifikation des Moleküls, etwa durch Ersetzen der O-Esterphosphat-Bindung durch eine N-Phosphat-Bindung ein Analog des Fructose-1,6-bisphosphat zu synthetisieren, das gegen Phosphatasen resistent ist und vielleicht bei niedrigeren Konzentrationen tumorostatisch wirkt.



**Abbildung 27:** Rolle des Fructose-1,6-bisphosphat im Zusammenspiel der Glykolyse und der Glutaminolyse in benigne proliferierende Zellen (Metabolom). Unklar ist bislang, wie Fructose 1,6 P<sub>2</sub> die Zellmembran passiert (?)

Weiterhin kann mit dieser Arbeit gezeigt werden, dass FBP eine immunmodulatorische Wirkung auf die NK besitzt (Abb. 24-26)

Glycerat-3-P wird unter anderem im Organismus über 3-P-Hydroxypyruvat zu Serin metabolisiert. Für Serin kann ähnlich (wie für FBP) gezeigt werden, dass es das Gleichgewicht zwischen dimerer und tetramerer Konformation verschiebt (Abb. 2). Hierdurch wird die Affinität zu PEP gesteigert und die Glykolyse wird aktiviert.

Aminooxyessigsäure bewirkt eine Hemmung der GOT (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase) (Abbildungen 3 und 4). Somit kann schon am Anfang die Glutaminolyse gehemmt werden. Unter dem Gesichtspunkt, dass die Glutaminolyse

einen erheblichen Anteil zur ATP-Bereitstellung bei Tumoren unter einem Durchmesser von zwei cm nimmt (Eigenbrodt 1998), könnte die Gabe von Aminoxyessigsäure therapeutisch eine Rolle spielen zur Hemmung der weiteren Tumorprogression (Abbildung 26). Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen mit dieser Interpretation in Einklang. Für Aminoxyessigsäure kann gezeigt werden, dass die Endvolumina der Tumoren signifikant geringer sind, als die Kontrollgruppe. Auch konnte hierunter gezeigt werden, dass das Auftreten von Zweitumoren ebenfalls deutlich geringer ist. Für diese Stoffgruppe kann zudem auch eine immunmodulatorische Wirkung gezeigt werden.

Bernsteinsäuremonomethylester (Methylsuccinat) ist ein synthetisches Derivat des Glutamins. Es sollte sich durch kontinuierliche Perfusion ähnlich wie Glutamin ubiquitär im Gewebe anreichern. Jedoch kann es anders als das Glutamin nicht über die Glutaminolyse verstoffwechselt werden. Einzig im Vergleich der Tumorumfängen (ml) am Ende der Versuche zeigte sich in dieser Gruppe ein deutliches Ergebnis. Die Tumoren waren am Ende deutlich kleiner als in der nicht behandelten Gruppe. Ebenfalls zeigte sich ein signifikant geringeres Auftreten von Metastasen. Hingegen zeigte der Bernsteinsäuremonomethylester keine immunmodulatorische Wirkung auf die natürlichen Killerzellen.

*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] ist seit 1978 als Chemotherapeutikum unter dem Namen Cisplatin zugelassen. *Barnett Rosenberg* zeigte als erster in den sechziger Jahren den Einfluss von Platin auf die Zellteilung.

Derzeit stellen Cisplatin und seine verschiedenen Derivate eine Hauptgruppe für die Chemotherapie. Die Indikationen schließen das Bronchialkarzinom, Tumoren des Urogenitaltraktes und andere ein.

Cisplatin muss intravenös gegeben werden, da es bei oraler Aufnahme durch die Magensäure hydrolysiert wird und seine Wirkung verliert. Die Platin-Komplexe gelangen in den Zellkern, werden zu [Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)Cl]<sup>+</sup> hydrolysiert und binden schliesslich an die Nukleinsäure. Dies führt zu einer Verkürzung der DNA, die DNA-Helix wird teilweise aufgewunden. Die DNA verliert dabei ihre thermische Stabilität. Da maligne Zellen eine hohe Proliferationsrate gegenüber gesunden Zellen aufweisen und die Platin-Komplexe eine geringe Halbwertszeit haben, richtet sich ihre Wirkung vornehmlich gegen tumoröse Zellen. Dennoch zeigt auch Cisplatin auf

gesundes Gewebe Wirkung, was zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen kann und gelegentlich einen Therapieabbruch notwendig macht.

Wir konnten in keiner unserer Untersuchungen für Cisplatin den Nachweis einer Wirkung auf das Wachstum des Novikoff-Hepatomas nachweisen. Wir fanden auch keinen Einfluss auf die Natürlichen Killerzellen. Wie wir leider nachträglich feststellen mussten, lag dies an der zu geringen Dosierung (5µg) in allen unseren Experimenten

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Während der Tumorentstehung kommt es durch die Dimerisierung der Pyruvatkinase zu einem relativen Stop der Glykolyse. Gleichzeitig wird in diesen Zellen die Glutaminolyserate erhöht. Die Zielsetzung der vorliegenden Dissertation war es, in diesem Zusammenhang zu untersuchen, ob durch die kontinuierliche Perfusion mit Fructose-1,6-P<sub>2</sub> (FBP), Aminoxyessigsäure, Cisplatin, Glycerat-3-P bzw. Bernsteinsäuremonomethylester den Tumorstoffwechsel beeinflusst und das maligne Wachstum gehemmt wird. Bekanntlich hemmt Aminoxyessigsäure direkt die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Bernsteinsäuremonomethylester, ein synthetisches Analogon von Glutamin, interferiert mit der Glutaminolyse. Glycerat-3-P wird durch proliferierende Zellen in Serin umgewandelt. Serin und FBP haben ihrerseits die Fähigkeit die M2-PK aus der inaktiven dimeren Form in die aktive tetramere Struktur umzuwandeln. Cisplatin wurde als eine Vergleichssubstanz eingesetzt. Die Kontrollgruppe wurde mit NaCl perfundiert. Als Tumor-Zellmodell dienten mit Novikoff Hepatoma (NH) Zellen injizierte CD Ratten. Die Zellen wurden in zufällig gewählten Tieren intraperitoneal passagiert, und es wurden anschliessend jeweils  $1 \times 10^6$  NH-Zellen pro Ratte in den rechten *Glutaeus maximus* injiziert. Vorversuchen hatten gezeigt, dass in Zellkultur passagierte Zellen ihre Malignität verloren hatten.

Nach dem Auftreten von Tumoren wurden die Tiere randomisiert und für durchschnittlich 9-10 Tage über einen Jugularis-Katheter kontinuierlich mit den jeweiligen Substanzen perfundiert. Hierbei wurde täglich die Tumorgrosse mittels einer Schublehre gemessen und hieraus ihr Volumen (cm<sup>3</sup>) berechnet. Am Ende der Versuche wurde der Tumor herauspräpariert und mittels Wasserverdrängung ihr Volumen (ml) bestimmt und die Anzahl der Metastasen und ihr Volumen bestimmt. Zusätzlich wurde in einem weiteren Versuch aus den Blutproben der Tiere ermittelt, ob die verwendeten Substanzen eine immunmodulatorische Wirkung auf die natürlichen Killerzellen zeigten und ihre Aktivität beeinflussten. Hierfür wurde der Zyto Tox 96<sup>®</sup> Test verwendet.

Die Tiere, welche mit FBP behandelt wurden, zeigten im Verlauf ein geringeres Wachstum der Tumoren, ein geringeres Tumorendvolumen und es kam zu einer signifikant geringeren Metastasenbildung gegenüber den Kontrolltieren, die

mit NaCl perfundiert worden waren. Somit scheint FBP von allen übrigen hier untersuchten Substanzen am potentesten den Tumorstoffwechsel zu beeinflussen.

Für Aminoxyessigsäure, Bernsteinsäuremonomethylsäure und Glycerat-3-P konnte gezeigt werden, dass die Tumorendvolumina (ml) am Ende des Versuchs signifikant kleiner waren. Auch der geringere Nachweis von makroskopischen Metastasen zeigt, dass sie den Stoffwechsel der Novikoff Hepatoma beeinflussen.

Für Cisplatin zeigte unter der angewandten Dosierung (5 µg) keine Wirkung auf das Tumorwachstum.

Für FBP und Aminoxyessigsäure konnte zudem eine immunmodulatorische Wirkung auf die Natürlichen-Killerzellen (NK) nachgewiesen werden. Die NK zeigten im Zyto Tox 96<sup>®</sup> Test eine deutlich höhere Lyserate der Novikoff Zellen.



## 7. Summary

During tumorigenesis dimerization of pyruvate kinase can lead to a termination of glycolysis. This phenomenon is paralleled by a rise in cellular glutaminolysis. In this context, the aim of the presented study was to investigate whether a continuous perfusion with fructose 1,6-P<sub>2</sub> (FBP), aminooxyacetic acid, cisplatin, glycerat-3-P or "Bernsteinsäuremonomethylester" (BME) could alter tumor metabolism and inhibit malignant growth. It is known that aminooxyacetic acid has a direct inhibitory effect on glutamate-oxalacetate-transaminase(GOT). BME, a synthetic analogue to glutamine can interfere with glutaminolysis. Proliferating cells metabolize glycerat-3-P to serine. Serine and FBP in turn have the capacity to convert M<sub>2</sub>-PK from its inactive dimeric conformation to the active tetrameric form.

CD rats, inoculated with Novikoff Hepatoma (NH) cells served as tumor model. Cisplatin was used as a reference substance and saline as control. After intraperitoneal passage in randomized animals, a total of 1x10<sup>6</sup> NH cells having undergone prior peritoneal passage were injected into the right major gluteus muscle. In pretrials we had established that the cell culture passage of NH cells voided them the ability for malignant growth. After successful tumor inoculation, animals were randomly distributed to treatment groups receiving either a continuous perfusion of the respective trial substance via jugular catheterization for an average of 9-10 days or saline. During this time daily tumor measurements with a caliper were performed to calculate tumor volume. At the study endpoint, tumors were dissected, tumor volume was calculated measuring water displacement and the total number of visible metastasis was documented. Additionally, blood samples were taken to investigate possible immunomodulatory effects of the treatment substances on the activity of natural killer (NK) cells using the Zyto Tox 96<sup>®</sup> kit.

During the course of the continuous perfusion, animals receiving FBP showed a marked reduction of tumor growth and tumor volume at the study end point. Furthermore, a significant reduction of metastasis was seen in the FBP group compared to control animals receiving saline. Of the investigated substances, FBP was most potent in altering tumor metabolism. Additionally, it could be shown that aminooxyacetic acid, BME and glycerat-3-P were all able to significantly reduce

tumor volumes. These findings were paralleled by a reduction in total metastasis, confirming the hypothesis that the investigated substances were able to influence the Novikoff cell metabolism. Interestingly, cisplatin the standard reference substance, showed no effect on tumor growth in the applied dose (5 $\mu$ g). Both FBP and amino acetic acid had immunostimulatory effect on NK cells, augmenting the rate of Navikoff cell lysis mediated through NK cells in the Zyto Tox 96<sup>®</sup> test.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Bennet, M., Timperley, WR., Taylor, CB., Hill, AS. (1978). "Isoenzyme of hexokinase in the developing, normal and neoplastic human brain." Eur J Cancer(14): 189-193.

Brand, K. (1985). "Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation." Biochem J(228): 353-361.

Brand, K., Leipold, W., Lupp, P., Schoerner, C., Schulz, A. (1986). "Metabolic alterations associated with proliferation of mitogen-activated lymphocytes and of lymphoblastoid cell lines: Evaluation of glucose and glutamine metabolism." Immunobiol(173): 23-24.

Brazill, D., Thorner, J., Martin, GS. (1997). "Mck1, a member of the glycogen synthase kinase 3 family of protein kinases, is a negative regulator of pyruvate kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J. Bacteriol.(179): 4415-4418.

Brinck, U., Eigenbrodt, E., Oehmke, M., Mazurek, S., Fischer, G. (1994). "L- and M2-PK expression in renal cell carcinomas and their metastases." Virchow Archiv(424): 177-185.

Bustamante, E., Pederson, PL. (1977). "High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase." Proc Natl Sci(74): 3735-3739.

Cerwenka, H., Aigner, R., Bacher, H., Werkgartner, G., El-Shabrawi, A., Quehenberger, F., Mischinger, HJ. (1999). "Tu M2-PK (Pyruvate kinase type M2), Ca 19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions." Anticancer Res(19): 849-852.

Chang, G.-G., Tong, L. (2003). "Structure and function of malic enzyme, a new class of oxidative decarboxylase." Biochem(42): 12721-12733.

Dang, C., Lewis, BC., Dolde, C., Dang G., Shim, H. (1997). "Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis and apoptosis." J. Bioenerg. Biomembr.(29): 345-354.

Duesberg, P. (1985). "Activated proto-onc genes: sufficient or necessary for cancer?" Science **228**: 669-677.

Duesberg, P., Vogt, PK. (1970). "Differences between the ribonucleic acids transforming and nontransforming avian tumor viruses." Proc Natl Acad Sci(67): 1673.

Durante, P., Guenning, M-A., Darville, Ml., Hue, L., Rousseau, GG. (1999). "Apoptosis induced by growth factor withdrawal in fibroblasts overproducing fructose 2,6-bisphosphate." FEBS Lett **448**: 239-243.

Eigenbrodt, E. (1983/b). "Zur Bedeutung der Pyruvatkinase-Isoenzyme für die Steuerung des Kohlenhydrat- und Nukleinsäuresäurestoffwechsels." Habilitationsschrift im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Eigenbrodt, E., Basenau, D., Holthausen, S., Mazurek, S., Fischer, G. (1997). "Quantification of tumor type M2 pyruvate kinase (Tu M2-PK) in human carcinomas." Anticancer Res **17**: 3153-3156.

Eigenbrodt, E., Fister, P., Reinacher, M. (1985). New perspectives on carbohydrate metabolism in tumorcells. Regulation of carbohydrate metabolism. R. Beitner. Boca Raton, CRC Press. **2**: 141-179.

Eigenbrodt, E., Gebracht, U., Mazurek, S., Presek, P., Friis, RR. (1994). Carbohydrate metabolism and neoplasia: New perspective for diagnosis and therapy. Biochem and Molecular Aspects of Selected Cancers. T. P. a. T. Pretlow. San Diego, Academic Press Inc. **2**: 311-385.

Eigenbrodt, E., Glossmann, H. (1980). "Glycolysis - one of the keys to cancer?" Trends Pharmacol Sci **1**: 240-245.

Eigenbrodt, E., Kallinowski, F., Ott, M., Mazurek, S., Vaupel, P. (1998). "Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors." Anticancer Res: 3267-3274.

Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, RR. (1992). Double role of pyruvate kinase type M2 in expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells. Critical Reviews in Oncogenesis. M. Perucho, CRC-Press, Boca Raton. **3**: 91-115.

Goossens, V., Grooten, J., Fiers, W. (1996). "The oxidative metabolism of glutamine. A modulator of reductive oxygen intermediate-mediated cytotoxicity of tumor necrosis factor in L929 fibrosarcoma cells." J Biol Chem **271**: 192-196.

Greenhouse, W., Lehninger, AL. (1976). "Occurrence of the malate-aspartate-shuttle in various tumor types." Cancer Res **36**: 1392-1396.

Grimm, H. (1995). "Lipidvermittelte Modifikation der Immunantwort im experimentellen Tiermodell." Habilitationsschrift im Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen.

Hacker, H., Steinberg, P., Bannasch, P. (1998). "Pyruvate kinase isoenzyme shift from L-type to M2-type is a late event in hepatocarcinogenesis induced in rats by choline-deficient/DL-methionine-supplemented diet." Carcinogenesis **19**: 99-107.

Hanahan, D. a. W., R.A. (2000). "The hallmarks of cancer." Cell.

Hardt, P., Mazurek, S., Toepler, M., Schlierbach, P., Bretzel, RG., Eigenbrodt, E., Kloer, HU. (2004). "Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer." Br J Cancer **91**(5): 980-984.

Hugo, F., Mazurek, S., Zander, U., Eigenbrodt, E. (1992). "In vitro effect of extracellular AMP on MCF-7 breast cancer cells: Inhibition of glycolysis and cell proliferation." J Cell Physiol **153**: 539-549.

Katz, N., Immenschuh, S., Gerbracht, U., Eigenbrodt, E., Föllmann, W., Petzinger, E. (1992). "Hormone-sensitive carbohydrate metabolism in rat hepatocyte-hepatoma hybrid cells." Eur J Cell Biol **57**: 117-123.

Kikuchi, Y., Sato, S., Sugimura, T. (1972). "Hexokinase isoenzyme patterns of human uterine tumors." Cancer **30**: 444-447.

Knox, W., Tremblay, GC., Spanier, BB., Friedell, GH. (1967). "Glutaminase activities in normal and neoplastic tissues of the rat." Cancer Res **27**: 1456-1458.

Kono, N., Uyeda, K. (1974). "Chicken liver phosphofructokinase." J Biol Chem **249**: 1490-1496.

Kraaijenhagen, R., Rijksen, G., Staal, GEJ. (1980). "Hexokinase isoenzyme distribution and regulatory properties in lymphoid cells." Biochem Biophys Acta **631**: 402-441.

Lüftner, D., Mesterharm, J., Akrivakis, C. Geppert, R., Petrides, PE., Wernecke, KD., Possinger, K. (2000). "Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer." Anticancer Res **20**: 5077-5082.

Mazurek, S. (1990). "Einfluss von extrazellulärem Nukleotiden auf die Metabolit-Spiegel und Umsatzraten in human Adenokarzinom-Zellen." Diplomarbeit.

Mazurek, S., Boschek, CB., Eigenbrodt, E. (1997/a). "The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy." J Bioenerg Biomembr **29**: 315-330.

Mazurek, S., Eigenbrodt, E., Failing, K., Steinberg, S. (1999). "Alterations in the glycolytic and glutaminolytic pathways after malignant transformation of rat liver oval cells." J Cell Physiol **181**: 136-146.

Mazurek, S., Michel, A., Eigenbrodt, E. (1997). "Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rate." J Biol Chem **272**: 4941-4952.

Mazurek, S., Michel, A., Eigenbrodt, E. (1997/b). "Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rate." J Biol Chem **272**: 4941-4952.

Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P., Eigenbrodt, E. (2001). "Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7." Oncogenes **20**: 6891-6898.

Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P., Eigenbrodt, E. (2001/a). "Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic enzyme coomplex." Biochem J **356**: 247-256.

Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P., Eigenbrodt, E. (2001/b). "Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7." Oncogenes **20**: 6891-6898.

McKeehan, W. (1982). "Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation." Cell Biol Int Rep **6**: 635-649.

Metabolom "<http://www.metabolic-database.com>."

Mitch, M., Voegelé, R.T., Cowie, A., Osteras, M., Finan, T.M. (1998). "Chimeric structure of the NAD(P)<sup>1</sup>- and NADP<sup>1</sup>-dependent enzyme of *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*." J Biol Chem **271**: 9330-9336.

Moreadith, R., Lehninger A.L. (1984). "Purification, kinetic behavior, and regulation of NAD(P)<sup>+</sup> malic enzyme of tumor mitochondria." J Biol Chem **259**: 6222-6227.

Moreadith, R., Lehninger AL. (1984/a). "The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor cell mitochondria." J Biol Chem **259**: 6215-6221.

Moreadith, R., Lehninger AL. (1984/b). "Purification, kinetic behavior, and regulation of NAD(P)<sup>+</sup> malic enzyme of tumor mitochondria." J Biol Chem **259**: 6222-6227.

Oremek, G., Sapoutzis, N., Kramer, W., Bickeboeller, R., Jonas, D. (2000). "Value of tumor M2 (Tu M2-PK) in patients with renal carcinoma." Anticancer Res **20**: 5095-5098.

Perez, J., Roig, T., Manzano, A., Dalmau, M., Boada, J., Ventura, F., Rosa, JL., Bermudez, J., Bartons, R. (2000). "Overexpression of fructose 2,6-bisphosphonate decreases glycolysis and delays cell cycle progression." Am J Cell Physiol **279**: C1359-C1365.

Persel, P., Reinacher, M., Eigenbrodt, E. (1988). "Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus." FEBS Lett **242**: 194-198.

Piechota, H. J., Pannek, J. (2003). "Harnableitung." Der Urologe **42**: 1060-1069.

Reinacher, M., Eigenbrodt, E. (1981). "Immunohistological demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M2-PK) in tumors of chicken and rat." Virchow Arch B **37**: 79-88.

Reinacher, M., Eigenbrodt, E., Gerbracht, U., Zenk, G., Timmermann-Trosiener, I., Bentley, P., Waechter, F., Schulte-Hermann, R. (1986). "Pyruvate kinase isoenzyme an altered foci and carcinoma of rat liver." Carcinogenesis **7**: 1351-1357.

Reitzer, L., Wice, BM., Kennell, D. (1979). "Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells." J Biol Chem **254**: 1669-2676.

Schulze, G. (2000). "The tumor marker tumor M2-PK: An application in the diagnosis of gastrointestinal cancer." Anticancer Res **20**: 4961-4964.



Staal, G., Rijksen, G. (1991). Pyruvate kinase in selected human tumors. Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers. T. P. a. T. Pretlow. San Diego, Academic Press Inc. **1**: 313-337.

Steinberg, P., Klingelhoefter, A., Schaefer, A., Wuest, G., Weisse, Oesch, F., Eigenbrodt, E. (1999). "Expression of pyruvate kinase M2 in preneoplastic hepatic foci of N-nitrosomorpholine-treated rats." Virchow Arch **434**: 213-220.

Trasher, J., Cooper, MD., Dunaway, GA. (1981). "Developmental changes in heart and muscle phosphofructokinase isoenzyme." J Biol Chem **256**: 7844-7848.

Ushiro, H., Cohen, S. (1980). "Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes." J Biol Chem **255**: 8363-8365.

Uyeda, K., Furuya, E., Luby, LJ., (1981). "The effect of natural and synthetic D-Fructose 2,6-Bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructolinsases." J Biol Chem **256**: 8394-8399.

Vora, S., Hapler, JP., Knowles, DM. (1985/b). "Alterations in the activity and isoenzymic profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: Transformation- and progression-linked discriminants of malignancy." Cancer Res **45**: 2993-3001.

Vora, S., Oskam, R., Staal, GEJ. (1985/a). "Isoenzyme of phosphofructokinase in the rat." Biochem J **229**: 333-341.

Wagener, C. (1999). Molekulare Onkologie, Entstehung und Progression maligner Tumoren. Stuttgart, Thieme.

Wechsel, H., Petri, E., Bichler, KH., Feil, G. (1999). "Marker for renal cell carcinoma (RCC): The dimeric form of pyruvate kinase M2 (Tu M2-PK)." Anticancer Res **19**: 2583-2590.

Weis, S., Varmus, HE., Bishop, JM. (1977). "The size and genetic composition of virus-specific RNAs in the cytoplasm of cells producing avian sarcomaleucosis viruses." Cell **12**: 983.

White, M., Kahn, CR. (1996). "The insulin system." J Biol Chem **269**: 1-4.

Wixler, V., Smola, U., Schuler, U., Rapp, U. (1996). "Differential regulation of raf isoenzymes by growth versus differentiation inducing factors in PC 12 pheochromocytoma cells." FEBS Lett **385**: 131-137.

Yarden, Y., Escobedo, JA., Kuang, W-J., Yang-Feng, TL., Daniel, TO., Tremble, PM., Chen, EY., Ando, ME., Harkins, RN., Francke, U., Fried, VA., Ullrich, A., Williams, LT. (1986). "Structure of receptor for plated-derived growth factors helps define a family of closely related growth factor receptors." Nature **323**: 226-232.

Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E., Jansen-Duerr, P. (1999). "Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein." Proc Natl Acad Sci **96**: 1291-1296.

## 9. Verzeichnis der Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
cAMP	<i>cyclisches</i> Adenosin-3',5'-monophosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BME	Bernsteinsäuremonomethylester
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg
DMEM	“Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	“epidermal growth factor“
FBP	Fructose-1,6-diphosphat
FKS	fötales Kälberserum
FOBT	Hämocculttest
GDH	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Gly-3-P	Glycerat 3-phosphat
GIDH	Glutamatdehydrogenase
Gluc-6-P	Glucose-6-phosphatdehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	“Hank's Balanced-Salt-Solution“
HE	Haematoxilin & Eosin
HK	Hexokinase
Konz	Konzentration
LDH	Lactatdehydrogenase
Ldn	Laufende Nummer
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NH	Novikoff Hepatoma
NK	Natürliche Killerzellen

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
*	Signifikanz
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	“platelet derived growth factor“
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
PK	Pyruvatkinase
r	Korrelationskoeffizient
Methylsuccinat	Bernsteinsäuremonomethylester
ZT	Zytotoxizitätstest

## 10. Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abbildung 1: Schematische Darstellung der Glykolyse.	4
Abbildung 2: Beeinflussung des Assoziations- Dissoziationsgleichgewicht zwischen M2-PK und Tumor (Tu) M2-PK durch Effektoren der Pyruvatkinase.	5
Abbildung 3: Übersicht über die an der Glutaminolyse beteiligten Enzyme und Metabilte.	8
Abbildung 4: Malat-Aspartate „Shuttle“, in Leber, Niere, Herz.	10
Abbildung 5: Strukturen der in dieser Studie verwendeten Inhibitoren.	12
Abbildung 6: Schema des Zentralvenösen Katheters.	19
Abbildung 7: Schema des verwendeten Mieders.	19
Abbildung 8: Darstellung der kontinuierlichen Perfusion.	20
Abbildung 9: Konzentrationsermittlung für Fructose 1,6-P <sub>2</sub>	26
Abbildung 10: Konzentrationsermittlung für Aminoxyessigsäure (Carboxy)	26
Abbildung 11: Konzentrationsermittlung für Glycerat-3-P	27
Abbildung 12: Konzentrationsermittlung für Cisplatin	27
Abbildung 13: Konzentrationsermittlung für Bernsteinsäuremonomethylester (Methylsuccinat)	28
Abbildung 14: Gemessene Tumogrößen (cm/Breite) im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der FBP Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.	33
Abbildung 15: Gemessene Tumogröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Bernsteinsäuremonomethylester Gruppe (Methylsuccinat). Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.	35
Abbildung 16: Gemessene Tumogröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Cisplatin Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.	36

Abbildung 17: Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Cisplatin Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2,5 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.	38
Abbildung 18: Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Aminooxyessigsäure-Hemihydrochlorid (Carboxy) Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.	39
Abbildung 19: Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Glycerat-3-P Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.	41
Abbildung 20: Gemessene Tumorgröße (Breite [cm]) im Vergleich zwischen Kontrollgruppe und der Glycerat-3-P Gruppe. Anzahl der Tumoren kleiner als 2,5 cm aufgetragen gegen die Wachstumszeit.	42
Abbildung 21: Mittelwerte der mittels einer Schublehre gemessenen und daraus errechneten Tumolvolumina ( $\text{cm}^3$ ) im rechten Gluteus-Muskel als Funktion der Zeit.	43
Abbildung 22: Tumorendvolumen (ml), gemessen mittels Wasser- verdrängung.	45
Abbildung 23: Anzahl der aufgetretenen Metastasen in den einzelnen Gruppen.	47
Abbildung 24: Verhältnis Effektor : Target 50:1. Zytotoxizitätstest.	48
Abbildung 25: Verhältnis Effektor : Target 25:1. Zytotoxizitätstest.	49
Abbildung 26: Verhältnis Effektor : Target 12:1. Zytotoxizitätstest.	50
Abbildung 24: Rolle des Fructose-1,6-bisphosphat im Zusammenspiel der Glykolyse und der Glutaminolyse in benigne proliferierende Zellen.	53

**11. Verzeichnis der Tabellen**

	Seite
Tabelle 1: Übersicht der Daten der Kontrollgruppe (NaCl-Lösung) und ihre Mittelwerte und Standardabweichungen (SD)	31
Tabelle 2: Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe FBP-Gruppe	33
Tabelle 3: Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Bernsteinsäuremonomethylester Gruppe	34
Tabelle 4: Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Cisplatin	36
Tabelle 5: Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Amino-Oxyessigsäure-Hemihydrochlorid	39
Tabelle 6: Allgemeine Daten zur Versuchsgruppe mit Glycerat-3-P Gruppe	41
Tabelle 7: Statistische Auswertung nach Tukey	44

## 12. ANHANG

### 12.1. Tabelle I: Datensammlung Tumorverlauf in Tage (cm<sup>3</sup>) 1-12, Gruppen: NaCl, Methylsuccinat, Aminooxyessigsäure (Carboxy), Cisplatin

Ldn <sup>1</sup>	Novikoff	Therapie	Konz. <sup>2</sup>	TU 1d <sup>3</sup>	TU 2d
3204	3	NaCl	0,90%	0,9676	4,2412
3302	3	NaCl	0,90%	1,1435	3,4683
3402	3	NaCl	0,90%	0,9676	3,4024
3503	3	NaCl	0,90%	1,6493	2,4033
3603					
3705	3	NaCl	0,90%	0,2618	0,2618
3115	3	NaCl	0,90%	0,5027	1,021
3124	3	NaCl	0,90%	1,1435	1,0619
3134	3	NaCl	0,90%	0,4147	0,8985
3155	3	NaCl	0,90%	0,9802	2,6861
222	1	Methylsuccinat	1mM	1,3886	0,953
223	1	Methylsuccinat	1mM	1,0483	1,3823
224	1	Methylsuccinat	1mM	0,7488	0,6597
231	1	Methylsuccinat	1mM	1,9672	3,1416
232	1	Methylsuccinat	1mM	1,3708	1,9792
233	1	Methylsuccinat	1mM	0,6739	2,375
234	1	Methylsuccinat	1mM	1,7425	2,8352
3151	3	Methylsuccinat	1mM	0,9734	0,3817
3152	3	Methylsuccinat	1mM	0,3686	0,6032
3153	3	Methylsuccinat	1mM	0,9734	0,9476
3157	3	Methylsuccinat	1mM	0,3351	0,4712
3201	3	Carboxy	5 mM	0,9802	1,885
3405	3	Carboxy	5 mM	1,3341	2,2384
3601	3	Carboxy	5 mM		
3701	3	Carboxy	5 mM	0,622	0,8985
3122	3	Carboxy	5 mM	0,4241	1,0619
3131	3	Carboxy	5 mM	0,377	0,4147
3133	3	Carboxy	5 mM	0,9802	0,5445
3135	3	Carboxy	5 mM	0,4712	0,8168
3136	3	Carboxy	5 mM	0,4712	1,2095
3137	3	Carboxy	5 mM	0,8168	0,1508
3144	3	Carboxy	5 mM	0,76	0,2566
3904	3	Cisplatin	5 µg	2,1185	8,0927
3905	3	Cisplatin	5 µg	0,6336	1,6022
3906	3	Cisplatin	5 µg	0,8985	2,1363
3111	3	Cisplatin	5 µg	0,3665	0,5184
3112	3	Cisplatin	5 µg	0,7488	1,0483
3113	3	Cisplatin	5 µg	0,5184	0,6283
3114	3	Cisplatin	5 µg	0,4712	0,576

<sup>1</sup> Laufende Nummer

<sup>2</sup> Konzentration

<sup>3</sup> Tumorgröße am jeweiligen Tag



<b>Ldn</b>	<b>Novikoff</b>	<b>Therapie</b>	<b>Konz.</b>	<b>TU 1d</b>	<b>TU 2d</b>
3116	3	Cisplatin	5 µg	1,198	1,4137
3117	3	Cisplatin	5 µg	0,4712	0,6283

**Tabelle I (Fortsetzung):** Datensammlung Tumorverlauf in Tage (cm<sup>3</sup>) 1-12  
 Gruppen: NaCl, Methylsuccinat, Aminoxyessigsäure (Carboxy), Cisplatin

Ldn	TU 3d	TU 4d	TU 5d	TU 6d	TU 7d
3204	7,2571	12,3559	18,8831	19,1134	22,8708
3302	6,0476	10,5374	16,0347	15,8336	17,6762
3402	4,7124	8,9274	11,9632	15,132	17,1531
3503	5,2229	5,1459	7,2016	8,4299	9,7787
3603					
3705		0,8985	1,9352	3,2987	
3115	2,2431	6,6476	8,1812	9,5426	13,9393
3124	3,4558	4,5239	8,386	14,5435	14,5922
3134	2,8751	3,3647	6,589	8,6708	11,6804
3155	4,5239	4,8381	6,9366	7,854	9,2028
222	2,4573	2,716	0,9236	0,7147	0,2618
223	2,1489	2,43	2,1363	4,227	3,7574
224	0,3142	0	0	0	0
231	6,9115	9,1106	14,5435	18,1584	16,6211
232	4,8381	7,7409	10,6594	15,5509	15,0126
233	2,9908	5,5418	10,2646	12,1978	17,4924
234	5,9899	7,4786	13,4774	16,0347	18,7658
3151	1,131	1,5247	2,7143	5,2988	5,5638
3152	0,8063	1,7357	2,6389	2,8149	3,9584
3153	1,7907	2,0892	3,1667	4,3773	6,0476
3157	0,8168	1,2388	1,7593	2,884	4,3773
3201	6,0476	7,5267	15,0629	17,6762	19,6978
3405	4,1469	7,1995	11,8166	12,7235	15,5336
3601					
3701	0,3817	2,5468	3,5249	5,0265	9,852
3122	1,4158	2,507	5,7302	6,5973	9,163
3131	0,4147	0,6912	0,7487	1,0367	1,131
3133	1,0556	2,6808	5,7805	7,389	10,0196
3135	0,9503	3,0264	4,5365	6,5314	6,8612
3136	1,0367	2,1363	2,2054	4,8171	6,5974
3137	0,1759	0,0785	0	0	0
3144	0,5655	1,9792	3,2044	6,2622	7,8067
3904	9,475	11,3621	17,0065	17,5301	23,606
3905	3,4558	7,6529	8,5766	10,2625	10,673
3906	3,7207	7,188	8,4446	9,4902	10,6291
3111	0,576	0,9802	3,2044	4,3773	6,6235
3112	1,8473	5,8287	6,6235	8,1812	9,9107
3113	1,5247				
3114	1,2252	3,5626	4,8381	7,2257	9,0478
3116	1,5315	4,5239	5,0266	6,9366	9,1043
3117	1,0619	2,7143	5,4978	7,1471	11,0087

**Tabelle I (Fortsetzung):** Datensammlung Tumorverlauf in Tage (cm<sup>3</sup>) 1-12  
 Gruppen: NaCl, Methylsuccinat, Aminoxyessigsäure (Carboxy), Cisplatin

Ldn	TU 8 d	TU 9d	TU 10d	TU 11d	TU 12 d
3204	27,5288	29,908	30,9761		
3302	25,4176	37,2844	37,3321		
3402	20,7267	24,4102			
3503	11,427				
3603					
3705	7,854	6,3356	9,1106	8,0927	
3115	17,3584	18,0956			
3124	13,6052	19,957	21,7147		
3134	14,8807	14,4556	20,3743	20,1271	
3155	10,6877	12,3297	13,666	18,2212	
222	0				
223	4,5522	5,3229			
224	0	0	0	0	
231	27,1591	31,039	39,716		
232	15,5509	16,6049	15,4818		
233	17,593	16,0221	18,504		
234	18,1144	19,2182	20,5272		
3151	6,9246	7,5147	8,4949	8,1812	
3152					
3153					
3157	4,3773	4,7752	5,5292	7,2257	
3201	24,3735	24,7306	24,1039		
3405	18,2464	15,5985			
3601					
3701	8,1681	9,1106	11,0542		
3122	11,027	11,4511	12,2993	12,2993	
3131	1,6493	2,6808	10,1447		
3133	9,8698	10,1447			
3135	8,1409	11,8752	11,0542		
3136					
3137	0	0	0	0	
3144	8,8357	9,5295	11,0542		
3904	27,2774	14,4623			
3905	11,8166	14,4623			
3906	14,0743	14,5922			
3111	8,4299	12,2993	12,315	14,089	15,8336
3112	11,8752	16,1017			
3113					
3114	13,0627	14,0304			
3116	12,4658	15,6828			
3117	12,7549	16,5358	19,5281	22,3179	21,6204

**Tabelle I (Fortsetzung):** Datensammlung Tumorverlauf in Tage (cm<sup>3</sup>) 1-12

Gruppen: FBP, Glycerat-3-P

Ldn	Novikoff	Therapie	Konz.	TU 1d	TU 2d
3105	3	FBP	220mg/10ml		
3301	3	FBP	220mg/10ml	3,3379	6,3774
3303	3	FBP	220mg/10ml	0,6912	1,7593
3404	3	FBP	220mg/10ml	0,9676	3,9584
3501	3	FBP	220mg/10ml	0,8294	1,1435
3704	3	FBP	220mg/10ml	0,2618	0,2618
3141	3	FBP	220mg/10ml	0,4032	0,3686
3142	3	FBP	220mg/10ml	0,3299	0,2566
3143	3	FBP	220mg/10ml	0,3299	0,088
3145	3	FBP	220mg/10ml	0,2822	0,6912
3101	3	Gly 3 P	1,25mM		
3305	3	Gly 3 P	1,25mM	0,622	2,2431
3401	3	Gly 3 P	1,25mM	1,1504	2,7238
3403	3	Gly 3 P	1,25mM	1,5315	5,2779
3703	3	Gly 3 P	1,25mM	0,3665	0,3142
114	1	Gly 3 P	1,25mM		
121	1	Gly 3 P	1,25mM		
122	1	Gly 3 P	1,25mM		
124	1	Gly 3 P	1,25mM		
131	1	Gly 3 P	1,25mM		
132	1	Gly 3 P	1,25mM		
133	1	Gly 3 P	1,25mM		
134	1	Gly 3 P	1,25mM		

**Tabelle I (Fortsetzung):** Datensammlung Tumorverlauf in Tage (cm<sup>3</sup>) 1-12

Gruppen: FBP, Glycerat-3-P

Ldn	TU 3d	TU 4d	TU 5d	TU 6d	TU 7d
3105					
3301	8,8698	12,8805	10,5374	16,0347	18,1469
3303					
3404	4,2977	5,5292	8,6394	9,163	10,3908
3501	1,6336	2,706	4,8171	6,589	6,5754
3704	0	0	0	0	0
3141	0,6283				
3142					
3143	0,0942	0,0628	0,0393	0	0
3145	0,6912	1,3341	2,8751	3,5814	5,2779
3101					
3305	3,5605	8,1289	9,0321	12,0428	18,2212
3401	3,7605	9,0321	10,2919	12,5271	15,8619
3403	6,0214	7,3513	11,8438		
3703	0,3665	0,3665	0,3665	0,2932	0,6126
114					
121					
122					
124					
131					
132					
133					
134					

**Tabelle I (Fortsetzung):** Datensammlung Tumorverlauf in Tage (cm<sup>3</sup>) 1-12  
 Gruppen: FBP, Glycerat-3-P

Ldn	TU 8 d	TU 9d	TU 10d	TU 11d	TU 12 d
3105					
3301	23,4572	26,7035	22,1168		
3303					
3404	13,7837	15,3969			
3501	7,7754	7,6969			
3704	0	0	0		
3141					
3142					
3143	0	0	0		
3145	8,8488	9,5567	11,4354		
3101					
3305	22,3996	27,4732	31,4473		
3401	35,8016	30,0179			
3403					
3703	0,7854	1,2252	1,3352		
114					
121					
122					
124					
131					
132					
133					
134					

**12.2 Tabelle II:** Ermitteltes Tumor- und Metastasenvolumen mittels Wasserverdrängung (ml)

<b>Ldn</b>	<b>TU ml</b>	<b>Meta ml<sup>4</sup></b>
3204	58	8
3302	46	0
3402	40	0
3503	24	14
3603		
3705	24	3
3115	42	2
3124	48	1
3134	54	1
3155	54	0
222	0	0
223	5,5	0
224	0	0
231	48	2
232	34	0
233	30	1
234	30	0
3151	29	0
3152		
3153		
3157	28	0
3201	36	0
3405	36	0
3601	30	0
3701	28	0
3122	38	1
3131	12	0
3133	30	0
3135	35	0
3136		
3137	0	0
3144	36	0
3904	50	4
3905	32	2
3906	30	0
3111	36	0
3112	36	0
3113		
3114	32	0
3116	34	0
3117	46	6

---

<sup>4</sup> Metastasegrösse

**Tabelle II (Fortsetzung):** Ermitteltes Tumor- und Metastasenvolumen mittels Wasserverdrängung (ml)

<b>Ldn</b>	<b>TU ml</b>	<b>Meta ml</b>
3105	18	0
3301	42	0
3303		
3404	35	0
3501	22	0
3704	0	0
3141		
3142		
3143	1	0
3145	28	1
3101	0	0
3305	43	0
3401	40	0
3403		
3703	4	0
114	40	5
121	7	0
122	13	0
124	11	0
131	12	0
132	40	0
133	43	0
134	46	5



**12.3 Tabelle III:** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Länge 1d	Breite 1d	Tiefe 1d	Länge 2d	Breite 2d
3204	1,4	1,1	1,2	2,5	1,8
3302	1,4	1,2	1,3	2,3	1,8
3402	1,4	1,2	1,1	1,9	1,9
3503	1,5	1,5	1,4	1,8	1,7
3603					
3705	1	0,5	1	1	0,5
3115	1,2	0,8	1	1,3	1
3124	1,3	1,4	1,2	1,3	1,2
3134	0,8	1,1	0,9	1,2	1,1
3155	1,3	1,2	1,2	1,8	1,5
222	1,7	1,3	1,2	1,4	1
223	1,3	1,1	1,4	1,6	1,1
224	1,1	1	1,3	1,2	0,7
231	1,7	1,3	1,7	2	1,5
232	1,7	1,1	1,4	1,8	1,5
233	1,3	0,9	1,1	1,8	1,4
234	1,6	1,3	1,6	1,9	1,5
3151	1,3	1,1	1,3	0,9	0,9
3152	0,8	0,8	1,1	1,2	0,8
3153	1,3	1,1	1,3	1,2	1,1
3157	0,8	0,8	1	1	0,9
3201	1,3	1,2	1,2	1,6	1,5
3405	1,4	1,3	1,4	1,5	1,9
3601					
3701	1,2	0,9	1,1	1,3	1,2
3122	0,9	0,9	1	1,3	1,2
3131	0,8	0,9	1	0,8	0,9
3133	1,2	1,2	1,3	1	0,8
3135	1	0,9	1	1,2	1
3136	1	0,9	1	1,4	1,1
3137	1,2	1	1,3	0,6	0,8
3144	1	1	1,1	0,7	0,7
3904	1,7	1,7	1,4	2,8	2,3
3905	1	1,1	1,1	1,5	1,7
3906	1,3	1,1	1,2	1,7	1,5
3111	0,7	1	1	0,9	1
3112	1,1	1	1,3	1,4	1,1
3113	0,9	1	1,1	1	1
3114	0,9	1	1	1,1	1
3116	1,3	1,1	1,6	1,5	1,2
3117	0,9	1	1	1,2	1

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Tiefe 2d	Länge 3d	Breite 3d	Tiefe 3d	Länge 4d
3204	1,8	3	2,2	2,1	3,8
3302	1,6	2,5	2,2	2,1	3,5
3402	1,8	2	2,5	1,8	2,5
3503	1,5	2,5	2,1	1,9	2,6
3603					
3705	1				1,3
3115	1,5	1,7	1,4	1,8	2,3
3124	1,3	1,5	2,2	2	2,4
3134	1,3	1,7	1,7	1,9	1,8
3155	1,9	2	1,8	2,4	2,1
222	1,3	1,9	1,3	1,9	1,9
223	1,5	1,9	1,2	1,8	2,1
224	0	0,6	0	0	0
231	2	2,5	2,2	2,4	2,9
232	1,4	2,2	2	2,1	2,2
233	1,8	2,1	1,6	1,7	2,4
234	1,9	2,6	2	2,2	2,7
3151	0,9	1,2	1,2	1,5	1,4
3152	1,2	1,4	1	1,1	1,5
3153	1,4	1,2	1,5	1,9	1,4
3157	1	1,2	1	1,3	1,3
3201	1,5	2,2	2,5	2,1	2,5
3405	1,5	1,8	2,2	2	2,5
3601					
3701	1,1	0,9	0,9	0,9	1,9
3122	1,3	1,3	1,3	1,6	1,8
3131	1,1	0,8	0,9	1,1	1
3133	1,3	1,4	1,2	1,2	1,6
3135	1,3	1,1	1,1	1,5	1,7
3136	1,5	1,2	1,1	1,5	1,6
3137	0,6	0,7	0,6	0,8	0,5
3144	1	0,9	1	1,2	1,4
3904	2,4	2,9	2,6	2,4	3,1
3905	1,2	2,2	2	1,5	2,9
3906	1,6	2,2	1,9	1,7	2,6
3111	1,1	1	1	1,1	1,2
3112	1,3	1,8	1,4	1,4	2,2
3113	1,2	1,4	1,3	1,6	
3114	1	1,5	1,3	1,2	1,8
3116	1,5	1,5	1,3	1,5	2,4
3117	1,6	1,3	1,2	1,3	1,8

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Breite 4d	Tiefe 4d	Länge 5d	Breite 5d	Tiefe 5d
3204	2,7	2,3	4,6	2,8	2,8
3302	2,5	2,3	3,2	2,9	3,3
3402	3,1	2,2	2,8	3,4	2,4
3503	2,1	1,8	2,6	2,3	2,3
3603					
3705	1,1	1,2	2,2	1,4	1,2
3115	2,3	2,4	2,5	2,5	2,5
3124	1,8	2	2,3	2,2	2,8
3134	1,7	2,1	2,2	2,2	2,6
3155	2	2,2	2,4	2,4	2,3
222	1,3	2,1	1,4	0,9	1,4
223	1,3	1,7	2	1,2	1,7
224	0	0	0	0	0
231	2,5	2,4	2,8	3,2	3,1
232	2,8	2,4	2,7	2,9	2,6
233	2,1	2,1	2,9	2,6	2,6
234	2,3	2,3	3	2,6	3,3
3151	1,3	1,6	1,8	1,6	1,8
3152	1,3	1,7	1,5	1,6	2,1
3153	1,5	1,9	1,8	1,6	2,1
3157	1,3	1,4	1,4	1,5	1,6
3201	2,5	2,3	3,2	2,9	3,1
3405	2,5	2,2	2,8	3,1	2,6
3601					
3701	1,6	1,6	2,2	1,8	1,7
3122	1,4	1,9	2,4	1,9	2,4
3131	1,2	1,1	1,1	1	1,3
3133	1,6	3	2,3	2	2,4
3135	1,7	2	1,9	1,9	2,4
3136	1,7	1,5	1,8	1,8	1,3
3137	0,5	0,6	0	0	0
3144	1,5	1,8	1,8	1,7	2
3904	2,8	2,5	3,5	2,9	3,2
3905	2,4	2,1	3	2,6	2,1
3906	2,4	2,2	2,8	2,4	2,4
3111	1,3	1,2	1,8	2	1,7
3112	2,2	2,3	2,2	2,3	2,5
3113					
3114	1,8	2,1	2	2,1	2,2
3116	1,8	2	2,4	2	2
3117	1,6	1,8	2,5	2,1	2

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Länge 6d	Breite 6d	Tiefe 6d	Länge 7d	Breite 7d
3204	5,2	2,7	2,6	5,2	3
3302	3,6	2,8	3	3,3	3,1
3402	3,4	3,4	2,5	3,5	3,6
3503	2,8	2,5	2,3	2,9	2,8
3603					
3705	2,1	1,5	2		
3115	2,7	2,5	2,7	2,9	2,7
3124	3,2	2,8	3,1	3,1	2,9
3134	2,3	2,4	3	2,6	2,6
3155	2,5	2,4	2,5	2,6	2,6
222	1,3	0,7	1,5	1,1	0,7
223	2,3	1,3	2,7	2,3	1,3
224	0	0	0	0	0
231	3,4	3	3,4	3,2	3,1
232	3	3	3,3	3,2	2,8
233	3,2	2,8	2,6	3,6	3,2
234	3,2	2,9	3,3	3,2	3,2
3151	2	2,3	2,2	2,3	2,2
3152	1,6	1,6	2,1	2	1,8
3153	2	1,9	2,2	2,2	2,1
3157	1,7	1,8	1,8	1,9	2
3201	3,3	3,3	3,1	3,3	3,8
3405	3	3	2,7	3,1	3,3
3601					
3701	2,4	2	2	2,8	2,4
3122	2,4	2,1	2,5	2,5	2,5
3131	1,1	1,2	1,5	1,2	1,2
3133	2,4	2,1	2,8	2,6	2,3
3135	2,2	2,1	2,7	2,4	2,1
3136	2,3	2	2	2,5	2,1
3137	0	0	0	0	0
3144	2,6	2,3	2	2,7	2,4
3904	3,6	3	3,1	3,9	3,4
3905	2,8	2,8	2,5	2,8	2,8
3906	2,9	2,5	2,5	2,9	2,8
3111	1,9	2,2	2	2,2	2,5
3112	2,5	2,5	2,5	2,6	2,6
3113					
3114	2,4	2,3	2,5	2,4	2,4
3116	2,4	2,4	2,3	2,8	2,3
3117	2,6	2,1	2,5	2,9	2,5

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Tiefe 7d	Länge 8d	Breite 8d	Tiefe 8d	Länge 9d
3204	2,8	5,3	3,2	3,1	5,6
3302	3,3	4,1	3,2	3,7	4,6
3402	2,6	3,5	3,9	2,9	3,7
3503	2,3	3,2	3,1	2,2	
3603					
3705		2,5	2,4	2,5	2,5
3115	3,4	3,2	2,8	3,7	3,2
3124	3,1	3,2	2,9	2,8	3,5
3134	3,3	2,9	2,8	3,5	2,9
3155	2,6	2,7	2,8	2,7	2,8
222	1,5	1	0,5	1	0
223	2,4	2,7	1,4	2,3	2,6
224	0	0	0	0	0
231	3,2	3,8	3,5	3,9	4
232	3,2	3,3	3	3	3,3
233	2,9	3,5	3,2	3	3,4
234	3,5	3,1	3,1	3,6	3,2
3151	2,1	2,5	2,3	2,3	2,6
3152	2,1				
3153	2,5				
3157	2,2	2	2,2	1,9	2
3201	3	3,5	3,8	3,5	3,6
3405	2,9	3,2	3,3	3,1	3,1
3601					
3701	2,8	2,5	2,4	2,6	2,9
3122	2,8	2,6	2,7	3	2,7
3131	1,5	1,4	1,5	1,5	1,6
3133	3,2	2,6	2,5	2,9	2,5
3135	2,6	2,6	2,3	2,6	2,8
3136	2,4				
3137	0	0	0	0	0
3144	2,3	2,7	2,5	2,5	2,8
3904	3,4	4,4	3,2	3,7	
3905	2,6	3,1	2,6	2,8	3,3
3906	2,5	3,2	3	2,8	3,1
3111	2,3	2,3	2,8	2,5	2,7
3112	2,8	2,7	2,8	3	3,1
3113					
3114	3	2,8	2,7	3,3	2,8
3116	2,7	3,1	2,4	3,2	3,2
3117	2,9	2,9	2,8	3	3,3

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Breite 9d	Tiefe 9d	Länge 10d	Breite 10d	Tiefe 10d
3204	3,4	3	5,8	3,4	3
3302	3,6	4,3	4,7	3,7	4,1
3402	4,2	3			
3503					
3603					
3705	2,2	2,2	2,9	2,5	2,4
3115	3	3,6			
3124	3,3	3,3	3,6	3,6	3,2
3134	2,8	3,4	3,2	3,2	3,8
3155	2,9	2,9	3	2,9	3
222	0	0			
223	1,7	2,3			
224	0	0	0	0	0
231	3,8	3,9	4,2	4,3	4,2
232	3,1	3,1	3,2	2,8	3,3
233	3	3	3,8	3	3,1
234	3,1	3,7	3,3	3,3	3,6
3151	2,3	2,4	2,6	2,6	2,4
3152					
3153					
3157	2,4	1,9	2,2	2,4	2
3201	4,1	3,2	3,1	4,5	3,3
3405	3,1				
3601					
3701	2,4	2,5	2,9	2,8	2,6
3122	2,7	3	2,9	2,7	3
3131	1,6	2	2,5	2,5	3,1
3133	2,5	3,1			
3135	2,7	3	2,6	2,8	2,9
3136					
3137	0	0	0	0	0
3144	2,5	2,6	2,9	2,8	2,6
3904					
3905	2,7	3,1			
3906	3,1	2,9			
3111	3	2,9	2,8	3	2,8
3112	3,1	3,2			
3113					
3114	2,9	3,3			
3116	2,6	3,6			
3117	2,9	3,3	3,6	2,8	3,7

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Länge 11d	Breite 11d	Tiefe 11d	Länge 12d	Breite 12d
3204					
3302					
3402					
3503					
3603					
3705	2,8	2,3	2,4		
3115					
3124					
3134	3,1	3,1	4		
3155	2,9	3	4		
222					
223					
224	0	0	0		
231					
232					
233					
234					
3151	2,5	2,5	2,5		
3152					
3153					
3157	2,5	2,4	2,3		
3201					
3405					
3601					
3701					
3122	2,9	2,7	3		
3131					
3133					
3135					
3136					
3137	0	0	0		
3144					
3904					
3905					
3906					
3111	2,8	3,1	3,1	2,8	3,6
3112					
3113					
3114					
3116					
3117	3,6	3,2	3,7	3,6	3,1

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

<b>Ldn</b>	<b>Tiefe 12</b>
3204	
3302	
3402	
3503	
3603	
3705	
3115	
3124	
3134	
3155	
222	
223	
224	
231	
232	
233	
234	
3151	
3152	
3153	
3157	
3201	
3405	
3601	
3701	
3122	
3131	
3133	
3135	
3136	
3137	
3144	
3904	
3905	
3906	
3111	3
3112	
3113	
3114	
3116	
3117	3,7



**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Länge 1d	Breite 1d	Tiefe 1d	Länge 2d	Breite 2d
3105					
3301	2,5	1,5	1,7	2,9	2
3303	1,2	1	1,1	1,6	1,5
3404	1,4	1,2	1,1	2,1	1,8
3501	1,2	1,2	1,1	1,4	1,3
3704	1	0,5	1	1	0,5
3141	0,7	1	1,1	0,8	0,8
3142	0,7	0,9	1	0,7	0,7
3143	0,7	0,9	1	0,6	0,7
3145	0,7	0,7	1,1	1,1	1
3101					
3305	1,2	1,1	0,9	1,7	1,8
3401	1,3	1,3	1,3	1,7	1,8
3403	1,5	1,5	1,3	2,4	2,1
3703	1	0,7	1	1	0,6
114					
121	1,3	1,2		2,1	1,9
122	1,3	1,2			
124	1,3	1,2		2,1	2
131	2,1	1,5		2,9	2,8
132		1,3		2,6	2
133	1,4	1,3			1,3
134	1,7	1,6		3,8	2,1

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Tiefe 2d	Länge 3d	Breite 3d	Tiefe 3d	Länge 4d
3105					
3301	2,1	3,5	2,2	2,2	4,1
3303	1,4				
3404	2	2,4	1,9	1,8	3
3501	1,2	1,5	1,6	1,3	1,9
3704	1	0	0	0	0
3141	1,1	1	1	1,2	
3142	1				
3143	0,4	0,6	0,6	0,5	0,4
3145	1,2	1,1	1	1,2	1,4
3101					
3305	1,4	1,7	2,5	1,6	2,5
3401	1,7	1,9	2,1	1,8	3
3403	2	2,5	2,3	2	2,7
3703	1	1	0,7	1	0,7
114					
121		1,9	1,4		2,1
122		2,4	2,1		2,3
124		2	1,7		1,6
131		2,9	2,8		3,1
132		2,8	2,4		2,8
133		2	1,5		2,9
134		4,1	2,1		4,2

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

<b>Ldn</b>	<b>Breite 4d</b>	<b>Tiefe 4d</b>	<b>Länge 5d</b>	<b>Breite 5d</b>	<b>Tiefe 5d</b>
3105					
3301	2,5	2,4	3,5	2,5	2,3
3303					
3404	2,2	1,6	3,3	2,5	2
3501	1,7	1,6	2,3	2	2
3704	0	0	0	0	0
3141					
3142					
3143	0,6	0,5	0,3	0,5	0,5
3145	1,4	1,3	1,7	1,7	1,9
3101					
3305	2,7	2,3	2,5	3	2,3
3401	2,5	2,3	2,8	2,7	2,6
3403	2,6	2	3	2,9	2,6
3703	0,7	0,7	1	0,7	1
114					
121	1,8		2,1	1,8	
122	2		3	2	
124	1,6		1,6	1,5	
131	2,7		2,7	2,2	
132	2,5		2,9	2,7	
133	2,8		3,2	2,9	
134	2,8		4,1	2,9	

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Länge 6d	Breite 6d	Tiefe 6d	Länge 7d	Breite 7d
3105					
3301	3,2	2,9	3,3	4,3	3,1
3303					
3404	3,5	2,5	2	3,5	2,7
3501	2,6	2,2	2,2	2,6	2,3
3704	0	0	0	0	0
3141					
3142					
3143	0	0	0	0	0
3145	1,8	1,9	2	2	2,1
3101					
3305	2,5	4	2,3	3	4
3401	2,9	3,3	2,5	3,3	3,4
3403					
3703	0,7	0,8	1	1,3	1
114					
121	2,4	2,3		2,1	1,8
122	2,8	2,5		3,1	2,3
124	1,9	1,7		1,9	2,1
131	2,8	2,5		2,7	2,7
132	3,1	3		3,5	3,4
133	3,5	3		4,6	3,1
134	4,1	2,8		5,2	3,2

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Tiefe 7d	Länge 8d	Breite 8d	Tiefe 8d	Länge 9d
3105					
3301	2,6	5	3,2	2,8	5
3303					
3404	2,1	3,9	2,7	2,5	3,9
3501	2,1	2,7	2,5	2,2	2,8
3704	0	0	0	0	0
3141					
3142					
3143	0	0	0	0	0
3145	2,4	2,6	2,5	2,6	2,6
3101					
3305	2,9	3,1	4,6	3	3
3401	2,7	4,2	4,4	3,7	4,2
3403					
3703	0,9	1,5	1	1	1,8
114					
121		2,2	2,1		
122		2,5	2,3		3,2
124		2,3	2,4		
131		3,3	2,9		3,2
132		4,5	3,6		5,1
133		4,6	3,1		4,5
134		5,2	3,7		5,7

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Breite 9d	Tiefe 9d	Länge 10d	Breite 10d	Tiefe 10d
3105					
3301	3,4	3	4,4	3	3,2
3303					
3404	2,9	2,6			
3501	2,5	2,1			
3704	0	0	0	0	0
3141					
3142					
3143	0	0	0	0	0
3145	2,7	2,6	3	2,8	2,6
3101					
3305	5,3	3,3	3,5	5,2	3,3
3401	3,5	3,9			
3403					
3703	1	1,3	1,7	1	1,5
114					
121					
122	2,5				
124					
131	2,5		2,6	2,4	
132	3,9		5,1	3,5	
133	3,3				
134	4,1				

**Tabelle III (Fortsetzung):** Tumorgrößenverläufe (cm) nach Länge, Breite, Tiefe und Tage (d)

Ldn	Länge 11d	Breite 11d	Tiefe 11d	Länge 12d	Breite 12d
3105					
3301					
3303					
3404					
3501					
3704					
3141					
3142					
3143					
3145					
3101					
3305					
3401					
3403					
3703					
114					
121					
122					
124					
131	2,5	2			
132	4,9	3,5		4,9	3,5
133					
134					

**12.4 Tabelle IV:** Anfangs- und Endgewicht der Versuchstiere in Gramm (g)

<b>Ldn</b>	<b>g Anfang</b>	<b>g Ende</b>
3204	218	250
3302	254	265
3402	241	260
3503	223	244
3603		
3705	185	203
3115	201	246
3124	230	264
3134	232	252
3155	224	240
222	212	213
223	239	265
224	207	254
231	213	244
232	210	238
233	227	243
234	216	214
3151	225	232
3152	227	
3153	194	
3157	223	131
3201	201	219
3405	258	290
3601		
3701	181	181
3122	193	205
3131	204	204
3133	211	237
3135	210	215
3136	185	
3137	184	173
3144	214	200
3904	229	280
3905	207	242
3906	185	196
3111	208	241
3112	190	239
3113	200	246
3114	195	214
3116	212	198
3117	171	218



**Tabelle IV (Fortsetzung):** Anfangs- und Endgewicht der Versuchstiere in Gramm (g)

<b>Ldn</b>	<b>g Anfang</b>	<b>g Ende</b>
3105		
3301	238	231
3303	245	
3404	241	240
3501	235	240
3704	185	174
3141	197	
3142	204	
3143	205	219
3145	190	170
3101		
3305	227	282
3401	244	252
3403	234	
3703	202	209
114		
121	223	228
122	259	241
124	248	265
131	234	238
132	222	238
133	222	265
134	222	265

**12.5. Tabelle V: Tägliche (d) Infusionsmenge (ml)**

<b>Ldn</b>	<b>Inf 1d</b>	<b>Inf 2d</b>	<b>Inf 3d</b>	<b>Inf 4d</b>	<b>Inf 5d</b>
3204	0	7	7	8	0
3302	0	7	8	7	7
3402	0	8	8	6	8
3503	0	9	11	3	7
3603					
3705	0	11	4	9	8
3115	0	7	7	7	9
3124	0	5	6	8	8
3134	0	8	5	0	0
3155	0	6	9	7	7
222	0	6	6	12	6
223	0	6	7	10	6
224	0	8	6	7	10
231	0	7	8	8	8
232	0	7	6	7	8
233	0	5	6	8	7
234	0	7	7	8	1
3151	0	1	8	7	8
3152	0	6	8	7	8
3153	0	1	0	7	8
3157	0	6	9	7	8
3201	0	7	7	7	8
3405	0	8	8	6	8
3601					
3701	0	8	9	8	11
3122	0	8	5	7	8
3131	0	8	7	8	5
3133	0	8	8	5	0
3135	0	7	7	5	5
3136	0	7	7	8	4
3137	0	8	8	5	9
3144	0	8	8	7	7
3904	0	7	7	7	6
3905	0	7	7	7	7
3906	0	7	8	8	8
3111	0	5	7	4	7
3112	0	7	7	5	7
3113	0	7	7		
3114	0	5	7	7	9
3116	0	5	7	7	8
3117	0	5	7	4	7

**Tabelle V (Fortsetzung):** Tägliche (d) Infusionsmenge (ml)

Ldn	Inf 6d	Inf 7d	Inf 8d	Inf 9d	Inf 10d
3204	0	0	0	0	0
3302	7	8	8	7	3
3402	7	8	7	3	
3503	8	7	4		
3603					
3705	11	4	6	8	7
3115	7	8	7	7	
3124	8	8	7	7	5
3134	0	0	0	0	0
3155	8	6	8	8	9
222	5	10	6	5	
223	7	10	6	7	
224	6	7	10	7	7
231	7	5	5	8	5
232	8	8	8	8	6
233	8	8	8	6	7
234	5	8	8	8	6
3151	8	6	8	8	9
3152	8	6			
3153	7	4			
3157	8	6	8	8	9
3201	6	7	7	8	4
3405	8	8	7	3	
3601					
3701	4	6	7	7	4
3122	8	8	8	8	7
3131	9	8	8	7	4
3133	8	9	7	4	
3135	9	8	8	7	4
3136	9	8			
3137	8	8	8	9	5
3144	7	7	7	7	6
3904	9	7	4		
3905	7	8	7	4	
3906	8	3	7	4	
3111	8	6	7	8	10
3112	7	8	7	6	
3113					
3114	7	8	7	7	
3116	7	8	7	7	
3117	8	6	7	8	10

**Tabelle V (Fortsetzung):** Tägliche (d) Infusionsmenge (ml)

<b>Ldn</b>	<b>Inf 11d</b>	<b>Inf 12d</b>
3204		
3302		
3402		
3503		
3603		
3705	4	
3115		
3124		
3134	0	
3155	6	
222		
223		
224	7	
231		
232		
233		
234		
3151	6	
3152		
3153		
3157	6	
3201		
3405		
3601		
3701		
3122	7	
3131		
3133		
3135		
3136		
3137	3	
3144		
3904		
3905		
3906		
3111	5	7
3112		
3113		
3114		
3116		
3117	4	7

**Tabelle V (Fortsetzung):** Tägliche (d) Infusionsmenge (ml)

<b>Ldn</b>	<b>Inf 1d</b>	<b>Inf 2d</b>	<b>Inf 3d</b>	<b>Inf 4d</b>	<b>Inf 5d</b>
3105					
3301	0	8	7	7	7
3303	0	8			
3404	0	8	9	8	8
3501	0	7	5	11	2
3704	0	4	8	8	11
3141	0	6	0		
3142	0	6			
3143	0	8	8	6	7
3145	0	6	0	8	7
3101					
3305	0	7	7	7	7
3401	0	8	8	4	2
3403	0	10	8	6	8
3703	0	8	8	11	4
114					
121	0	9	9	7	7
122	0	9	8	11	7
124	0	10	5	7	6
131	0	8	7	8	7
132	0	8	7	8	7
133	0	7	9	6	8
134	0	7	9	6	7

**Tabelle V (Fortsetzung):** Tägliche (d) Infusionsmenge (ml)

<b>Ldn</b>	<b>Inf 6d</b>	<b>Inf 7d</b>	<b>Inf 8d</b>	<b>Inf 9d</b>	<b>Inf 10d</b>
3105					
3301	7	7	8	8	3
3303					
3404	8	8	7	3	
3501	8	7	7	3	
3704	4	6	8	7	3
3141					
3142					
3143	7	7	7	7	6
3145	8	7	7	7	5
3101					
3305	7	7	8	8	3
3401	7	2	0	0	
3403					
3703	6	8	7	7	4
114					
121	7	5	5		
122	6	7	8	7	
124	7	8	7		
131	8	8	7	10	8
132	8	8	8	8	8
133	6	8	8	8	
134	5	8	8	7	

**Tabelle V (Fortsetzung):** Tägliche (d) Infusionsmenge (ml)

<b>Ldn</b>	<b>Inf 11d</b>	<b>Inf 12d</b>
3105		
3301		
3303		
3404		
3501		
3704		
3141		
3142		
3143		
3145		
3101		
3305		
3401		
3403		
3703		
114		
121		
122		
124		
131	7	
132	5	0
133		
134		

**12.6. Tabelle VI:** Auflistung der Ergebnisse des ZytoTox 96 Test

<b>Ldn</b>	<b>ZT 50/1</b>	<b>ZT 25/1</b>	<b>ZT 12/1</b>
3204	6,28	5,76	2,62
3302	9,33	3,56	0
3402	8	6,8	5,6
3503	4,19	3,26	0,93
3603			
3705	4,96	3,64	1,16
3115	4,14	3,71	2,71
3124	4,87	2,61	1,1
3134	2,94	1,39	0,77
3155			
222	29,02	19	3,86
223	37,28	44,77	22,31
224	5,62	1,47	0
231			
232			
233			
234			
3151	7,31	4,47	2,77
3152			
3153			
3157	7,91	5,53	2,96
3201	19,27	12,84	6,88
3405	12,8	8,8	7,6
3601			
3701	5,96	4,8	2,32
3122	17,9	14,76	3,78
3131	16,12	8,49	7,28
3133	14,04	6,93	6,06
3135			
3136			
3137			
3144	20,97	9,53	6,41
3904	0	0	0
3905	1,77	1,22	0,54
3906	5,96	4,74	3,4
3111	6,8	5,67	3,68
3112	5,28	3,42	2
3113			
3114	5,98	3,41	2,64
3116	6,26	5,98	5,15
3117	4,25	3,26	1,42



**Tabelle VI (Fortsetzung):** Auflistung der Ergebnisse des ZytoTox 96 Test

<b>Ldn</b>	<b>ZT 50/1</b>	<b>ZT 25/1</b>	<b>ZT 12/1</b>
3105	13,49	9,3	6,98
3301	20,67	9,13	5,77
3303			
3404	19,6	17,6	13,6
3501	7,91	6,05	3,72
3704	16,72	13,74	10,43
3141			
3142			
3143	26,69	17,96	7,8
3145			
3101	19,07	16,28	13,95
3305		9,62	2,88
3401			
3403			
3703	9,68	8,06	7
114	0	18,8	4,51
121	8,2	12,96	10,74
122	3,91	17,18	13,68
124	0	0	4,88
131	68,58	9,84	0,27
132			
133	13,72	17,26	7,3
134	4,2	20,13	11,28

**Erklärung:**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäss aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Giessen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ramin Ipaktchi

**Danksagung:**

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. E. Eigenbrodt (Institut für Biochemie und Endokrinologie JLU-Giessen, Fachbereich Veterinärmedizin) verpflichtet für die Überlassung des Themas, der Einführung in wissenschaftliche Arbeitsmethoden, sowie ausgiebiger und anregender Diskussionen. Sein unerwarteter und plötzlicher Tod ist ein grosser Verlust.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Schoner (Institut für Biochemie und Endokrinologie JLU-Giessen, Fachbereich Veterinärmedizin), der sich nach dem Tod von Prof. Eigenbrodt bereit erklärt hat, die weitere Betreuung der Arbeit zu übernehmen und der durch viele fruchtbare Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herzlich bedanke ich mich bei Frau PD Dr. S. Mazurek (Institut für Biochemie und Endokrinologie JLU-Giessen, Fachbereich Veterinärmedizin) für die kollegiale Betreuung, Beratung und Unterstützung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Schwemmler und dessen Nachfolger Herrn Prof. Dr. W. Padberg, Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-, Transplantations- und Kinderchirurgie JLU-Giessen danke ich für die Bereitstellung des chirurgischen Forschungslabors.

Herrn Prof. Dr. A. Schulz danke ich für die Bereitschaft das Korreferat für diese Dissertation zu übernehmen.

Weiterhin geht mein besonderer Dank an Frau Renate Plass, Frau Petra Freitag, Frau Sigrid Wilker und Frau Sandra Iffländer für ihre Geduld und Hilfe im Labor.

Ferner möchte ich Herrn Dr. M. Hollenhorst (Abteilung Anwendung und Dokumentation, Hochschulrechenzentrum, JLU-Giessen) danken für die Mühe meine statistischen Berechnungen zu überprüfen.

**Lebenslauf:****Persönliche Daten:**

Name: Ipaktchi  
Vorname: Ramin  
Geburtsdatum: 04.03.1977  
Geburtsort: Teheran / Iran  
Eltern: Gudrun Ipaktschi, geb. Ott, Buchhändlerin  
Prof. Dr. Junes Ipaktschi, Hochschullehrer

**Persönlicher Werdegang**

1983-1996: Schulausbildung in Heidelberg, Giessen und Berkeley / USA  
1996-1997: Wehrdienst, Bad Reichenhall  
1997-2003: Studium Humanmedizin in Giessen  
1999: Ärztliche Vorprüfung  
2001: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2001-2003: Doktorand (Institut für Biochemie und Endokrinologie, Justus-Liebig-Universität Giessen, Fachbereich Veterinärmedizin)  
2003: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
2003-2004: Praktisches Jahr (Bern, Giessen)  
2004: Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung  
Seit 07/2004: Assistenzarzt, Klinik für Viszerale und Transplantationschirurgie, Inselspital, Bern, Schweiz