

4 Ergebnisse

4.1 *In-vitro*-Versuche

4.1.1 Einfluss von Aciclovir und Ganciclovir auf die Vitalität der Ratten-Kolonkarzinom-Zelllinie CC531 (MTT-Assay)

In den Versuch gelangten zwei Zelltypen: die transfizierten CC531-Zellen (CC531 / tk, gestrichelte Linien) und die nichttransfizierten (CC531). Die nachfolgenden Abb. E1-E6 zeigen die Ergebnisse jeweils nach 24 h, 48 h und 72 h unter GCV- und unter ACV-Behandlung. Der MTT-Test erfolgte in Doppelbestimmung, auf die Darstellung der (geringen) Standardabweichung wurde verzichtet. Nach Exposition der Zelllinien durch die Prodrugs in den Konzentrationen 0; 0,1; 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 µg / ml ergeben sich an den drei Messtagen Datenpunkte für typische Hemmkurven für das Zellwachstum. Dementsprechend wurden die Datenpunkte im Programm Prism 3.0 für eine nichtlineare (sigmoidale) Regression berechnet und dargestellt. Die Werte für die Exposition mit 500 µg / ml wurden bei dieser Darstellung nicht verwendet. Bei dieser Konzentration war fast ausschließlich eine bereits nachlassende zytotoxische Wirkung zu verzeichnen. Weiterhin ist anzumerken, dass diese Prodrugkonzentration *in-vivo* als Plasmakonzentration nicht zu erreichen ist.

Die Befunde an der Rattenkolonkarzinomzelllinie CC531 (Abb. E1-E3) lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Nur geringe Vitalitätsunterschiede zwischen transfizierten und nichttransfizierten Zellen waren nach Gabe der unterschiedlichen Prodrugs nachweisbar.
- In der Tendenz ist Ganciclovir das wirksamere Prodrug in Kombination mit der vorangegangenen Zelltransfektion. Nach 72-stündiger Exposition überleben nur etwa 25 % der Zellen (bezogen von unbehandelter Kontrolle). Dieser Trend ist auch schon nach 48-stündiger Exposition erkennbar.
- Mit zunehmender Expositionsdauer wirken die Prodrugs auch stärker zytotoxisch auf nichttransfizierte Zellen. Eine pH-Verschiebung als Ursache konnte ausgeschlossen werden. Der pH-Wert lag bei allen Verdünnungen im für die Zellen verträglichen Bereich.

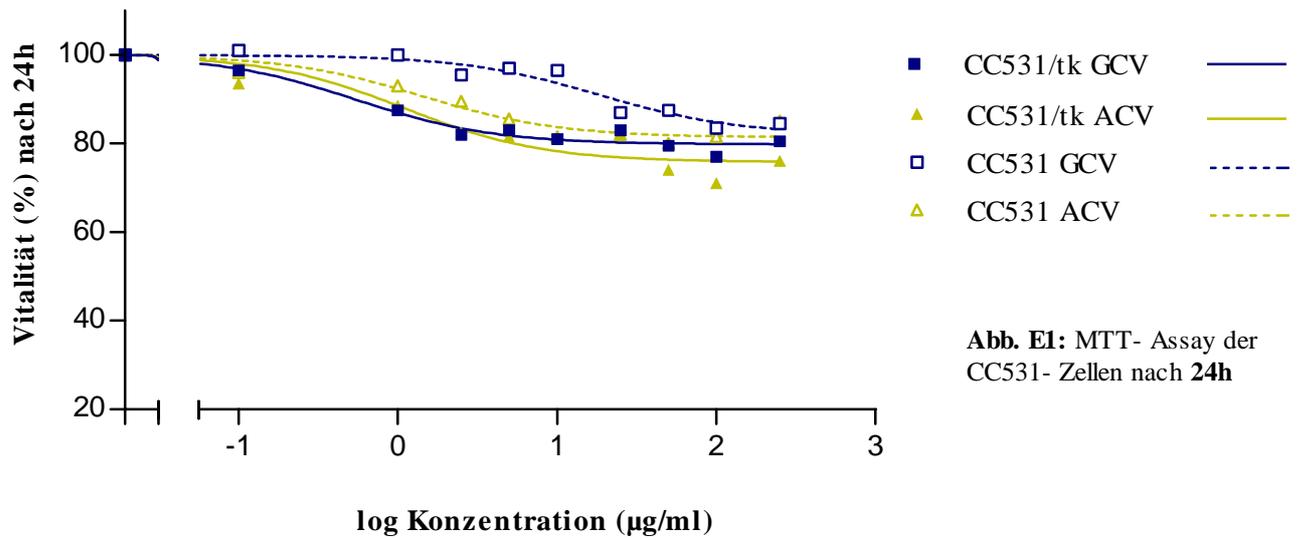


Abb. E1: MTT- Assay der CC531- Zellen nach **24h**

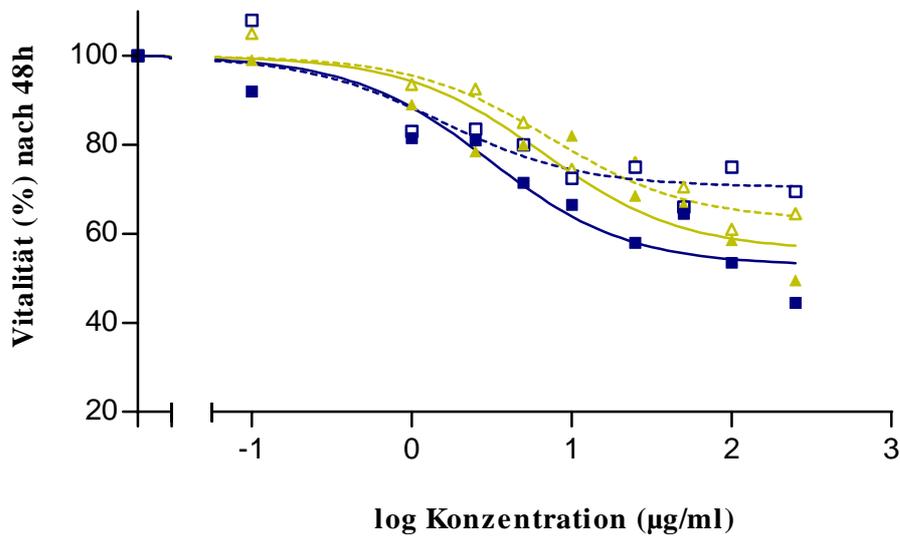


Abb. E2: MTT- Assay der CC531- Zellen nach **48h**

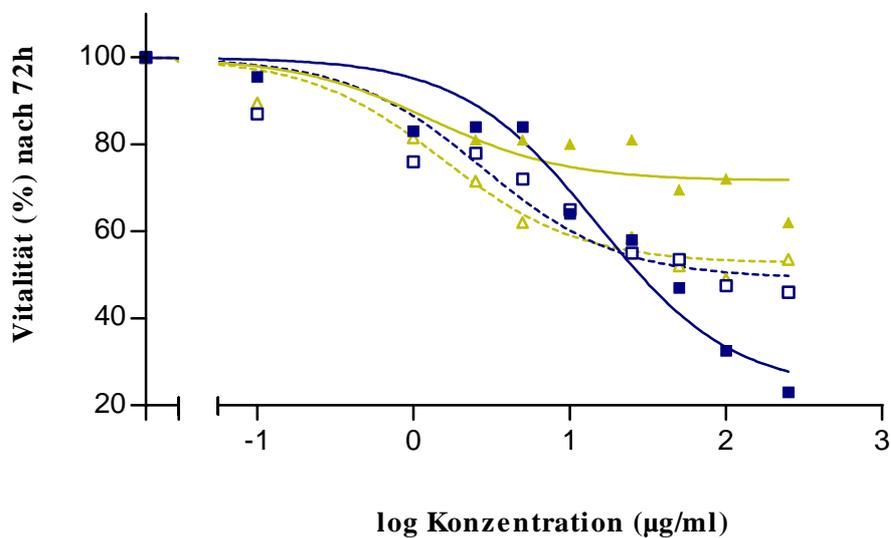


Abb. E3: MTT- Assay der CC531- Zellen nach **72h**

4.1.2 Einfluss von Aciclovir und Ganciclovir auf die Vitalität der Ratten-Glioblastom-Zelllinie F98 (MTT-Assay)

Analog wurden Ratten-Glioblastomzellen transfiziert (F98 / tk, gestrichelte Linien) und nichttransfiziert (F98) mit den unterschiedlichen Antiherpetika behandelt. Der MTT-Test führte zu folgenden Ergebnissen (vgl. Abb. E4-E6):

- Diese Tumorzelllinie reagiert empfindlicher auf das HSV-*tk*-Prodrug-System als die CC531. Zu den Messungen nach 48 h und 72 h zeigen die transfizierten Zellen eine ausgeprägte Reaktion auf die Prodrug-Behandlung.
- Bei diesen Tumorzellen erweist sich Ganciclovir nach vorangegangener Zelltransfektion als das wirksamere zytotoxische Agens. Diese Wirksamkeit beginnt im Gegensatz zu den CC531 schon bei geringeren Konzentrationen.
- Der zellabtötende Effekt ist nach 72-stündiger Exposition mit in hohen Konzentrationen auch auf nichttransfizierte Zellen stark ausgeprägt. Deutliche Unterschiede blieben in den mittleren und niedrigen Dosisbereichen der 72 h-Werte erhalten.

Aus dem *in-vitro*-Versuch ist ein deutlicher Trend bezüglich der Zytotoxizität zugunsten HSV-*tk*-transfizierter Tumorzellen und anschließender Ganciclovirbehandlung erkennbar. Die Testergebnisse sind reproduzierbar.

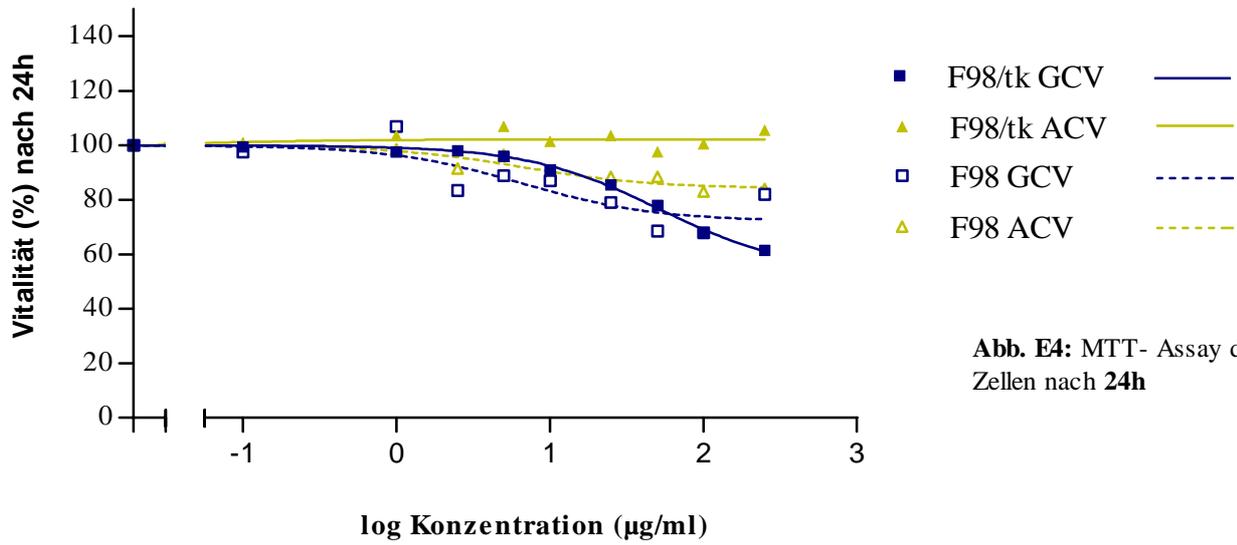


Abb. E4: MTT- Assay der F98-Zellen nach **24h**

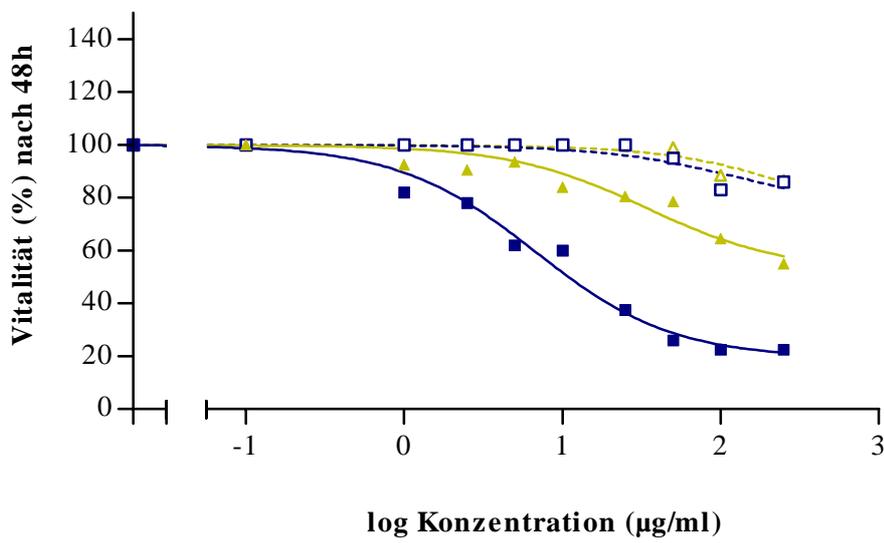


Abb. E5: MTT- Assay der F98-Zellen nach **48h**

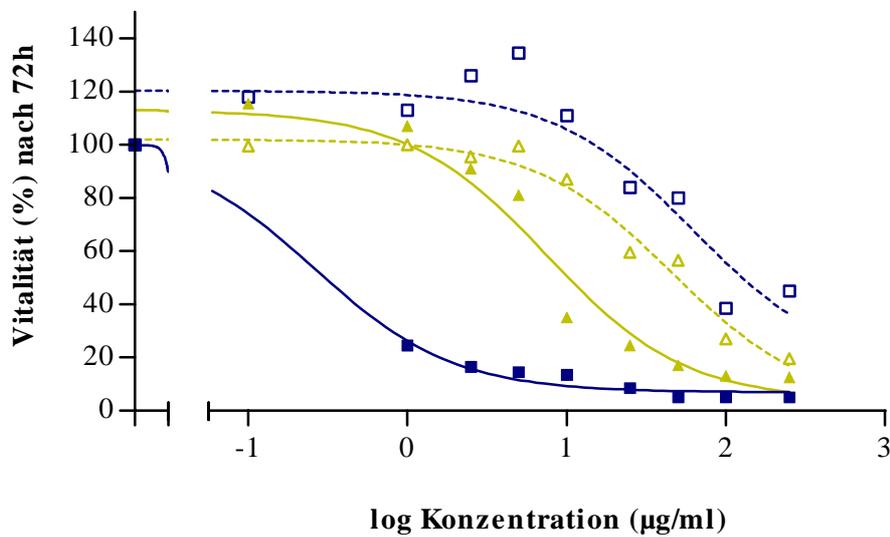


Abb. E6: MTT- Assay der F98-Zellen nach **72h**

4.2 Blutplasmawerte der Prodrugs

Plasmaspiegel stehen in direkter Beziehung zur klinischen Wirksamkeit (Effektivität oder auch Toxizität), korrelieren aber nicht zwingend mit der verabreichten medikamentösen Dosis. Aus diesem Grunde wurden in den Behandlungsgruppen die Plasmaspiegel der Prodrugs bestimmt.

Das Gesamtblutvolumen einer Ratte aus dieser Versuchsreihe betrug schätzungsweise 20 ml. Für die Konzentrationsbestimmungen wurden zwar mehrmals, aber insgesamt unter 10 % des Gesamtblutvolumens entnommen, um so Nebenwirkungen, wie hormonelle Gegenregulation und Stoffwechselstörungen (Mc Guill, 1989) und damit Verfälschung der Messwerte zu vermeiden. Auf der anderen Seite schränkt dies die Anzahl der Proben ein. Der Einfluss der Xylazin / Ketamin-Narkose auf diesen Versuchsverlauf wird als gering eingeschätzt, lediglich die Plasmapeaks könnten sich geringfügig verlagern.

Für das Valaciclovir erwies sich in Vorversuchen zum Erreichen höherer Plasmaspiegel eine direkte Applikation per Sonde in den Magen (unter kurzer Sedation) am effektivsten.

Für alle i.p. applizierten Prodrugs vollzog sich die Absorption rascher als die Elimination, ersichtlich aus der ausgeprägten Linksverschiebung der Maxima (vgl. Abb. E8, E9, E10).

4.2.1 Aciclovir bei verschiedenen Dosierungen / Medikationen

Zwischen den Werten der Einzeltiere bestehen starke Schwankungen, jedoch wurde allgemein ersichtlich (vgl. Abb. E7, E8 und E9):

Das oral verabreichte Valinsäureester des Aciclovir in Gruppe I zeigt erwartungsgemäß von allen Gruppen die niedrigsten Plasmawerte (vgl. Abb. E7 - gestrichelt dargestellt ist die nichtlineare Regression der Mittelwerte der Plasmakonzentrationen zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt). Die Resorption vollzieht sich nach und nach, höhere Plasmawerte werden erst später erreicht als bei den anderen Gruppen, dafür aber relativ lange konstant gehalten. Die höchsten gemessenen Konzentrationen entsprechen etwa dem erreichbaren maximalen Plasmapeak von 5 µg / ml beim Menschen, deshalb wurde auf eine weitere Gruppe unter anderer Dosierung verzichtet.

Höhere Plasmawerte wurden in Gruppe II (vgl. Abb. E8) und noch höhere in Gruppe III (vgl. Abb. E9) gemessen. Es ergibt sich jeweils ein deutlicher Peak noch vor 1 h post Applikation, jedoch ein rascher Abfall auf etwa 1/3 bis 1/2 dieses Wertes 2 h nach Applikation. Der zeitliche Verlauf entspricht einem exponentiellen Abfall, gestrichelt dargestellt wieder die Regression der Mittelwerte.

In Gruppe III verstarb ein Tier zu Beginn dieses terminalen Versuches während der Narkose. Aufgrund unzureichender Plasmaausbeute für die HPLC-Messung fehlen insgesamt sieben Einzelwerte bei verschiedenen Tieren .

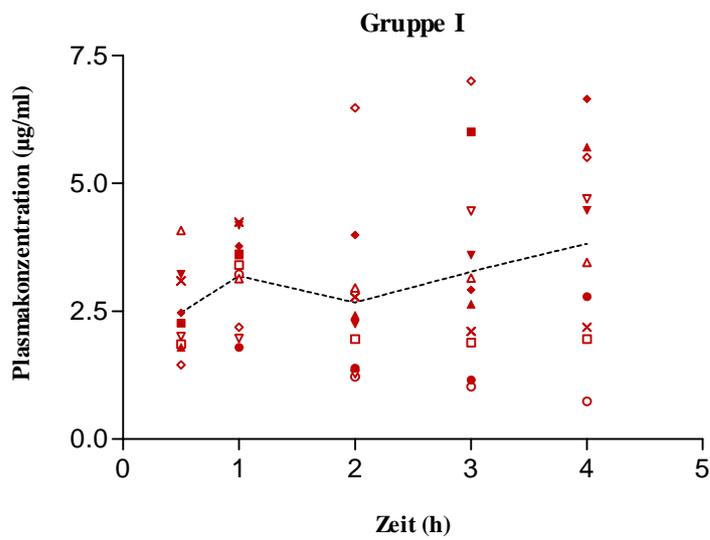


Abb. E7: Pharmakokinetik des ACV in Gruppe I nach oraler Applikation von 25 mg/kg VCV

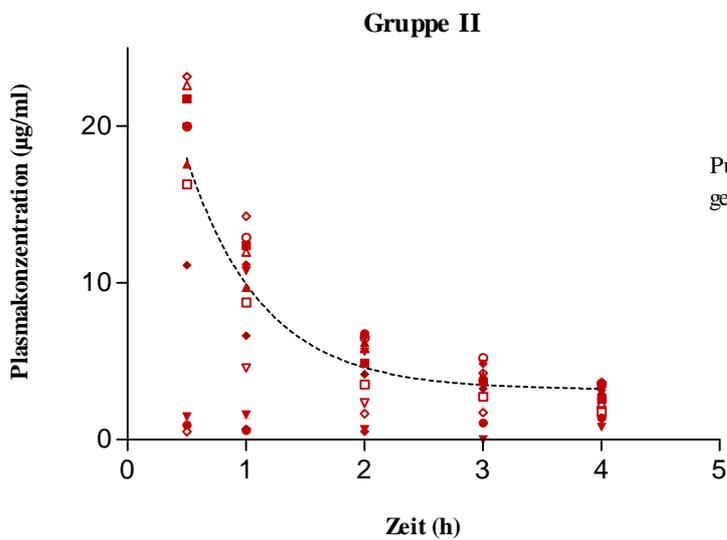


Abb. E8: Pharmakokinetik des ACV in Gruppe II nach i.p. Applikation von 25 mg/kg ACV

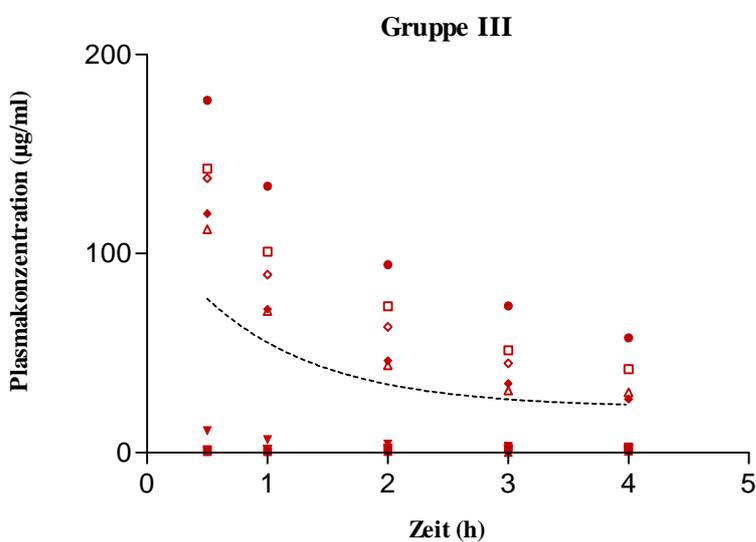


Abb. E9: Pharmakokinetik des ACV in Gruppe III nach i.p. Applikation von 100 mg/kg ACV

4.2.2 Ganciclovir

Das applizierte Ganciclovir erreicht die höchsten Plasmawerte aller verwendeten Prodrugs (vgl. Abb. E10), auch im Vergleich zum gleichdosierten Aciclovir. Wieder wurden die höchsten Werte innerhalb der ersten Stunde gemessen, gefolgt von einem raschen Absinken auf etwa die Hälfte dieser Werte 2 Stunden nach der Applikation. Die Pharmakokinetik entspricht wiederum einem exponentiellen Abfall, dargestellt für die Mittelwerte.

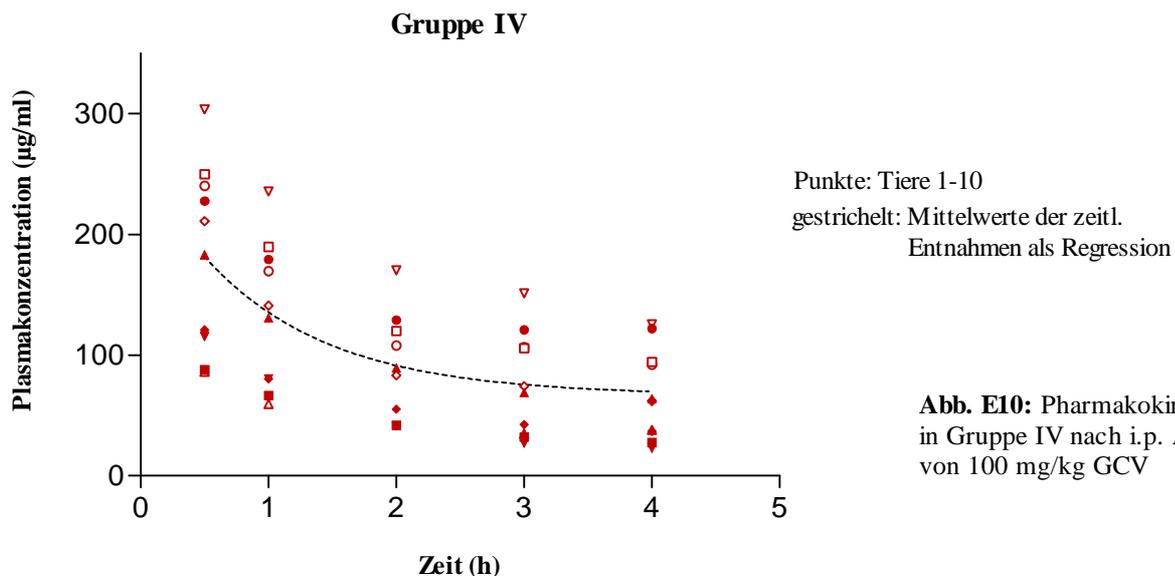


Abb. E10: Pharmakokinetik des GCV in Gruppe IV nach i.p. Applikation von 100 mg/kg GCV

4.2.3 Einfluss von Störfaktoren im chromatographischen System

Die verwendeten Narkotika Ketamin und Xylazin beeinflussten die Messungen durch störende Peaks im Chromatogramm nicht.

Die Ergebnisse zur Stabilität der Prodrugs bei beschriebener Lagerung des Plasmas vor HPLC-Messungen wurden berücksichtigt, d.h. alle Plasmaproben wurden direkt nach Entnahme unter -70 °C gelagert und gelangten innerhalb weniger Tage zur Messung per HPLC. Ein größerer Aktivitätsverlust der im Plasma befindlichen Nukleosidanaloga wurde auf diese Weise ausgeschlossen, dieser würde eher die GCV-enthaltenden Plasmaproben bei längerer Lagerung betreffen.

Das Homogenisat einer Tablette Valtrex[®] enthielt zu fast 100 % den Wirkstoff Valaciclovir.

4.3 Nachweis der Anreicherung der HSV-*tk* mittels PCR

Beide Graphen der Abb. E11 zeigen die bei der PCR entstehende Menge an Amplifikaten (y-Achse) in den einzelnen Organproben zum entsprechenden Zeitpunkt nach der Genapplikation, an welchem die Organproben entnommen wurden (x-Achse). Die einzelnen Messpunkte einer jeden Kurve wurden von jeweils einem Versuchstier gewonnen. Diese abgebildeten Punkte sind der Mittelwert von jeweils drei Messungen am PCR-Gerät. Auf die Darstellung einer Standardabweichung wurde verzichtet. Die Standardabweichung würde nur den geringen Meß- / Pipettierfehler der PCR-Meßmethodik widerspiegeln.

Zusätzlich wurden die Organe eines Tieres, das kein HSV-*tk*, sondern leere Liposomen intraarteriell erhielt, auf Vorhandensein von Amplifikaten überprüft, um so zufällige, für den verwendeten Primer ebenfalls passende genetische Sequenzen, beispielsweise die Reaktion mit der ubiquitären, zellulären Thymidinkinase, auszuschließen. Da in den Organen dieses Tieres keine Amplifikate gemessen werden konnten, können Methode und verwendete Primer spezifisch für erfolgreich transfizierte Gewebe betrachtet werden.

Aus der Abb. E11 - Graph A wird ersichtlich, dass die höchste Expression des HSV-*tk* in der Milz vorliegt. Es folgen Lebertumor und Leber (Graph B, Ordinate ausschnittsweise vergrößert und ohne Darstellung der Meßwerte für die Milz). Im Lebertumor wird ein Peak um den 2. Tag deutlich, am Tag 9 ist die Expression bereits sehr gering. Das gesunde Lebergewebe zeigt einen eher stetigen Abfall der Werte.

Lunge und Knochenmark exprimieren an verschiedenen Tagen ebenfalls noch leicht erhöhte Werte des therapeutischen Gen. Ab Tag 9 sind auch hier die Werte ebenso niedrig wie in allen anderen Geweben. Organschäden waren makroskopisch bei Sektion der Tiere an den genannten transfizierten Organen nicht erkennbar. Die Histologie des kotransfizierten gesunden Lebergewebes oder der Lunge zeigte ebenfalls keine Auffälligkeiten.

Gehirn, Herz, Lymphknoten (Ln. axillares), Dünndarm, Hoden und Niere enthalten sehr geringe oder keine nachweisbaren Mengen an exprimierter HSV-*tk*. Die Verläufe sind auch in der Vergrößerung Abb. E11 - Graph B überlagert. Eine weitere Trennung der Verläufe, z.B. mittels logarithmischer Darstellung ist möglich, aber eine weitere Unterscheidung ist irrelevant.

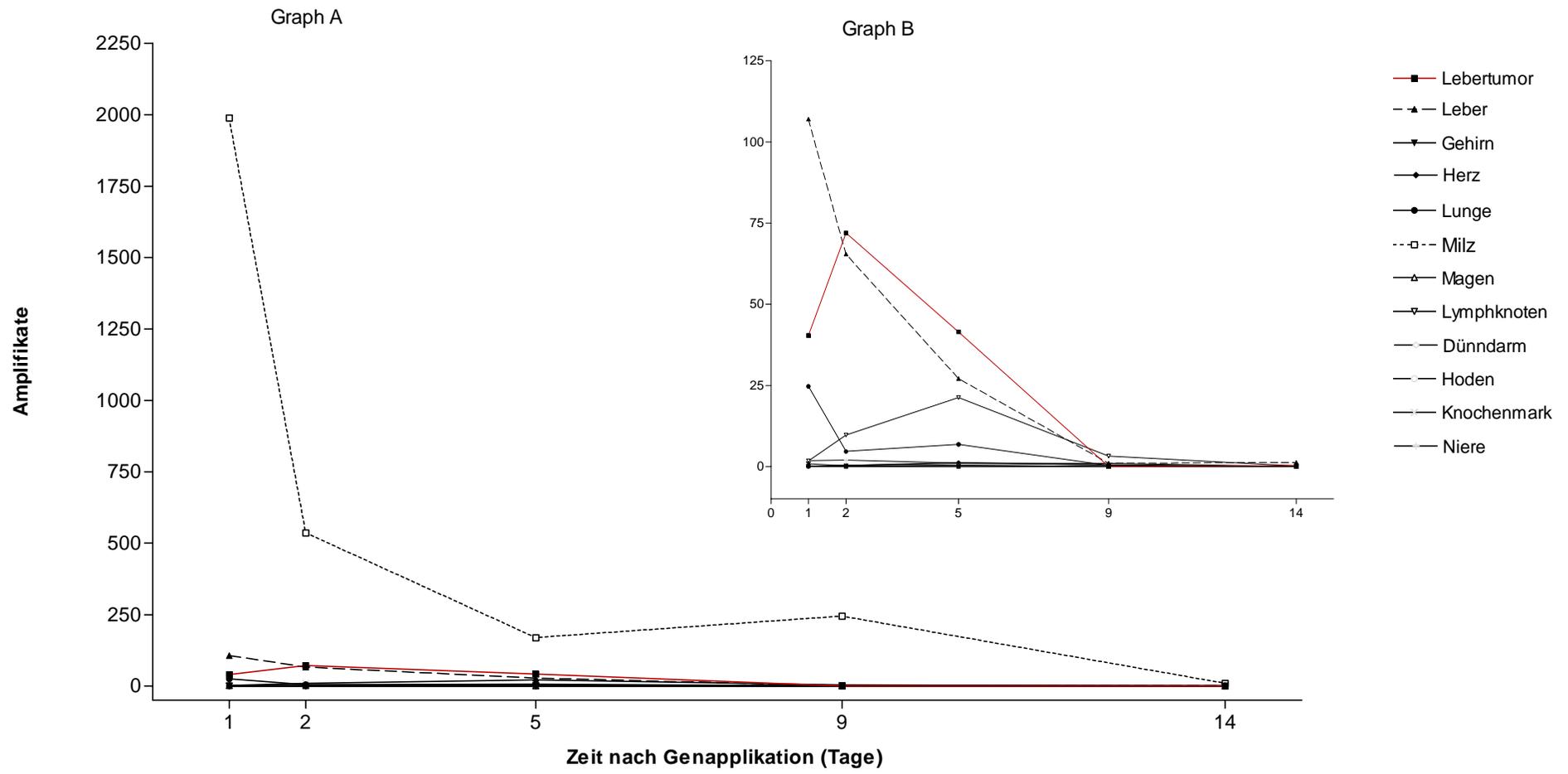


Abb. E11: Zeitlicher Verlauf der Genexpression in den einzelnen Organen, Nachweis mittels TaqMan-PCR

4.4 Tumorwachstum in den verschiedenen Tiergruppen

Zur Einschätzung der Behandlungseffizienz der genterapeutischen Strategie wurden am Tag 10, unmittelbar vor Behandlungsbeginn und am Tag 30 nach Behandlung die Tumorumfänge eines jeden Tieres mittels Sphäroidformel (vgl. Materialien- und Methodenteil) berechnet. Der Quotient der Messwerte zu beiden Zeitpunkten beschreibt den Faktor der Tumorumfangzunahme unter der Behandlung. Da sich schon am Tag 10 Unterschiede in der Tumorumfanggröße zeigten und damit wahrscheinlich auch in der Gefäßversorgung (vgl. Kap. 1.6), der Potenz zum schnelleren Wachstum und daraus resultierend der Empfindlichkeit zum genterapeutischen System, wurde dieser Parameter für die Auswertung verwendet.

Unter Vorbehalt wurden für die statistische Auswertung und Darstellung die Kontrolltiere in einer Kontrollgruppe zusammengefasst. Dieser Vorbehalt besteht deshalb, da die Kontrolltiere an vier verschiedenen Tagen inokuliert wurden und somit in dieser Hinsicht keine einheitliche Population darstellten. Bis auf diese Ausnahme wurden jedoch alle Kontrolltiere nach dem gleichen Schema behandelt.

Im fortschreitenden Versuchsverlauf war der Tumor bei einigen Tieren unterhalb des xiphoidalen Knorpels durch die Bauchdecke als leichte Verhärtung tastbar, aber nicht abgrenzbar. Schmerzäußerungen der Tiere bei der Palpation bestanden nicht. Postmortal wurde schon aus der makroskopisch-anatomischen Betrachtung ersichtlich, dass Gruppe IV mit GCV der effektivsten Behandlung ausgesetzt war. Bei zwei von zehn Tieren unter GCV-Behandlung zeigte sich sogar eine Verkleinerung des Tumorumfanges (Foto 2). Der Tumor erschien dann regelrecht eingeschmolzen.

Die histologischen Untersuchungen mit der HE-Färbung bestätigten ein Tumorwachstum bei allen Tieren. Die großflächigsten Tumornekrosen wurden in Gruppe III nachgewiesen.

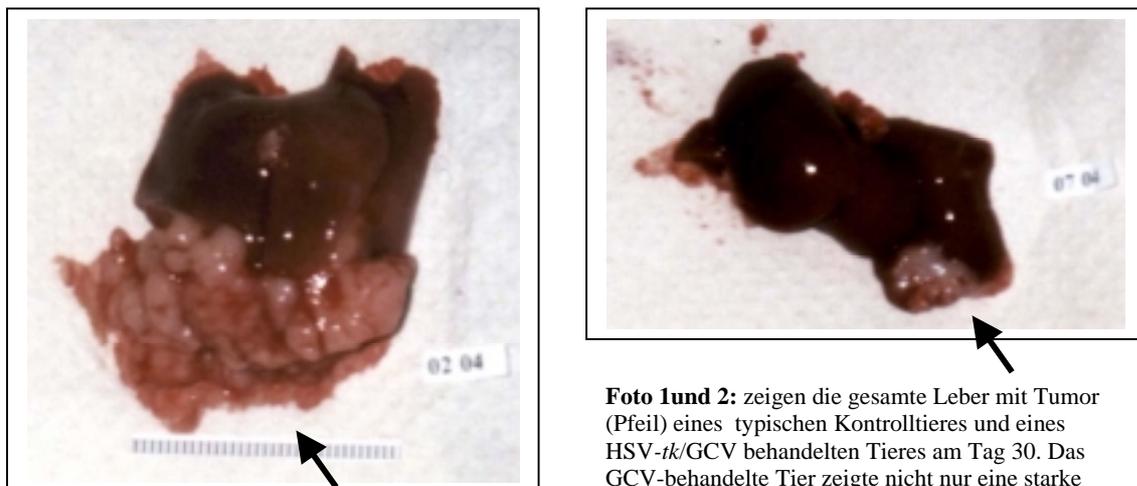


Foto 1 und 2: zeigen die gesamte Leber mit Tumor (Pfeil) eines typischen Kontrolltieres und eines HSV-*tk*/GCV behandelten Tieres am Tag 30. Das GCV-behandelte Tier zeigte nicht nur eine starke Wachstumshemmung des Tumors, sondern sogar eine leichte Regression.

Die Einzelwerte der Tumorumfänge und damit des Faktors der Tumorumfangzunahme zeigten innerhalb der Versuchsgruppen starke Schwankungen die zu einer hohen Standardabweichung führten. Die Einzelwerte, mit Ausnahme der Gruppe I, wiesen innerhalb der Versuchsgruppen eine Normalverteilung auf (vgl. Tab. E1). In Gruppe I wies ein Tier ein besonders starkes Tumorstadium auf. Die nachfolgende Abbildung E12 verdeutlicht eine Wachstumshemmung des Tumors in den Behandlungsgruppen im Gegensatz zur Gruppe der Kontrolltiere:

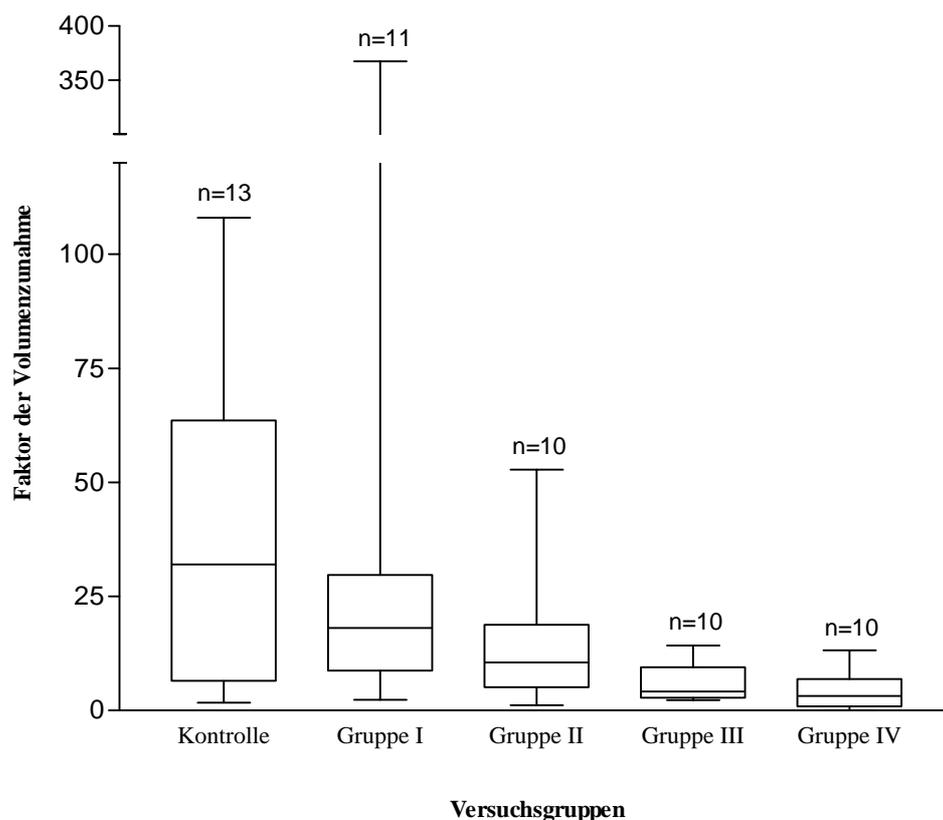


Abb. E12: Graphische Darstellung des Faktors der Tumorumfangzunahme in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen

Die statistische Auswertung (Tab. E2) der Einzelwerte ergab im nichtparametrischen Kruskal-Wallis Testverfahren extrem signifikante Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen den Versuchsgruppen. Der im Anschluss durchgeführte Mann-Whitney-Test zeigte hochsignifikante Unterschiede im Tumorstadium ($p < 0,01$) zwischen Gruppe III und IV, also den „Hochdosisbehandlungen“ mit ACV und GCV, jeweils gegenüber den Kontrolltieren. Bezüglich des Tumorstadiums unterschieden sich die anderen Gruppen nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Kontrolle	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
71,10	20,87	20,32	4,52	1,37
5,22	367,50	9,33	3,85	4,83
1,73	2,33	16,25	9,19	1,12
7,59	21,00	52,80	2,86	0,032
18,62	10,40	17,29	9,74	4,22
90,91	8,23	5,57	14,22	2,12
108,00	6,23	4,62	3,14	5,05
32,00	9,23	11,67	4,86	13,22
5,33	18,12	1,14	2,63	8,67
56,00	24,68	8,98	2,30	0,56
41,14	34,71			
40,64				
29,90				

Tabelle E1: Einzelwerte des Faktors der Tumorzunahme in den Versuchsgruppen

Parameter	Kontrolle	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
25 % Perzentile	6,46	8,73	5,10	2,75	0,84
Median	32,00	18,12	10,50	4,19	3,17
75 % Perzentile	63,55	29,70	18,81	9,47	6,86
Mittelwert	39,09	47,57	14,80	5,73	4,12
SD	34,13	106,5	14,65	3,98	4,15
SEM	9,47	32,12	4,63	1,26	1,31
Normalverteilung	ja	nein	Ja	ja	ja
P (nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis)	P = 0,0003				
P (vs. Kontrolle; Test nach Mann-Whitney)		0,3540	0,1004	0,0048	0,0011
Signifikanz		n.s.	n.s.	** (p < 0,01)	** (p < 0,01)

Tab. E2: Statistik zur Wertetabelle E1 und Abbildung 12, wobei

- n.s. - nicht signifikant; $p > 0,05$
- * - signifikant; p 0,01 bis 0,05
- ** - hochsignifikant; p 0,001 bis 0,01
- *** - extrem signifikant; $p < 0,001$

Die nachfolgende Auswertung der Tumorflächen erwies sich für dieses System als ungeeignet, sei aber erwähnt. Es war praktisch nicht möglich, subjektiv eine zentrale Fläche aus der Neoplasie als direkten Vergleich zu definieren. Mit dieser Messmethode bestätigt sich aber der Trend wie Abbildung E13 verdeutlicht.

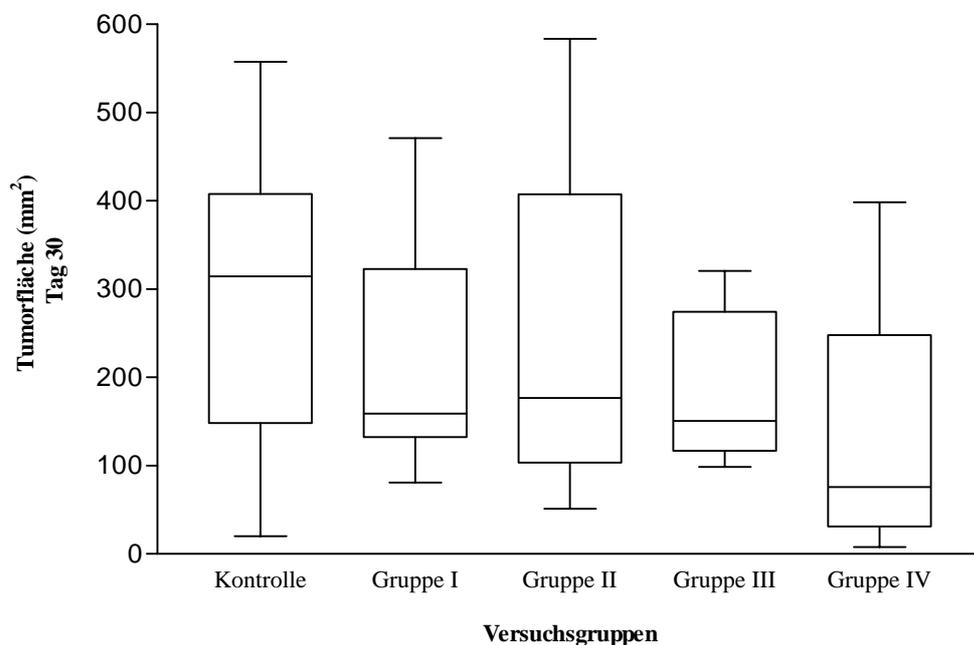


Abb. E13: Graphische Darstellung der Tumorflächen (mm²) in der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen am Versuchsende

Die Standardabweichungen sind zwar kleiner, ebenso aber auch die Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese Messmethode ist nur bedingt aussagekräftig. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) bleibt nur zwischen Kontrolle und Gruppe IV erhalten (Tab. E3):

Parameter	Kontrolle	Gruppen I	Gruppe II	Gruppe III	Gruppe IV
25 % Percentile	148,06	132,16	103,33	116,65	30,80
Median	314,54	158,97	176,74	150,64	75,81
75 % Percentile	407,89	322,93	407,53	274,17	247,76
Mittelwert	298,86	217,55	253,54	187,23	134,10
SD	164,32	123,37	176,44	79,78	126,98
SEM	45,58	37,20	55,79	25,23	40,15
Normalverteilung	ja	ja	ja	ja	ja
P (nichtparametrischer Test nach Kruskal-Wallis)	P = 0,0879				
P (vs. Kontrolle; nach Mann-Whitney)		0,1827	0,6869	0,0674	0,0277
Signifikanz		n.s.	n.s.	n.s.	*

Tab. E3 Statistik zur Abbildung 13, wobei Wichtung von p vgl. Tab. E2

Die Ergebnisse zur therapeutischen Effizienz zeigen folgende Abhängigkeit: Je höher die mittleren Plasmaspiegel der Prodrugs, umso geringer die Volumenzunahme des Tumors in den Behandlungsgruppen. Dies lässt vermuten, dass die Plasmakonzentration von maximal 5 µg/ml Aciclovir in Behandlungsgruppe I nicht ausreichend ist, um zumindest eine Hemmung des Tumorwachstums zu erreichen.

4.5 Auftreten von Lungenmetastasen

Zwischen den Tiergruppen bestanden signifikante Unterschiede ($p = 0,046$, nach Erstellen einer Kontingenztafel und Chi-Quadrat-Test) in der Häufigkeit des Auftretens von Lungenmetastasen. Diese waren bei der Sektion größtenteils schon makroskopisch sichtbar. Sie stellten sich makroskopisch als vereinzelt auftretende, kleine, helle Stippchen (max. 1mm im Durchmesser) im Lungenparenchym dar und waren schon in der Aufsicht erkennbar. Histologisch bestätigte sich der Metastasenbefall durch die routinemäßig mitgeführte HE-Färbung.

Die Metastasen waren unterschiedlich ausdifferenziert, von Zellansammlungen bis zur Ausbildung von schlauchförmigen Gebilden, die typisch für ein Adenokarzinom sind. Das Foto 3 zeigt eine mittelmäßig differenzierte Lungenmetastase eines Kontrolltieres.

In der Kontrollgruppe wiesen 8 (13) Tiere, in Gruppe I 7 (11), in Gruppe II 6 (10), in Gruppe III 3 (10) und in Gruppe IV 1 (10) Tiere Lungenmetastasen auf (vgl. Abb. E14).

Diese Daten belegen ein deutlich reduziertes Metastasenwachstum in den Hochdosisgruppen.

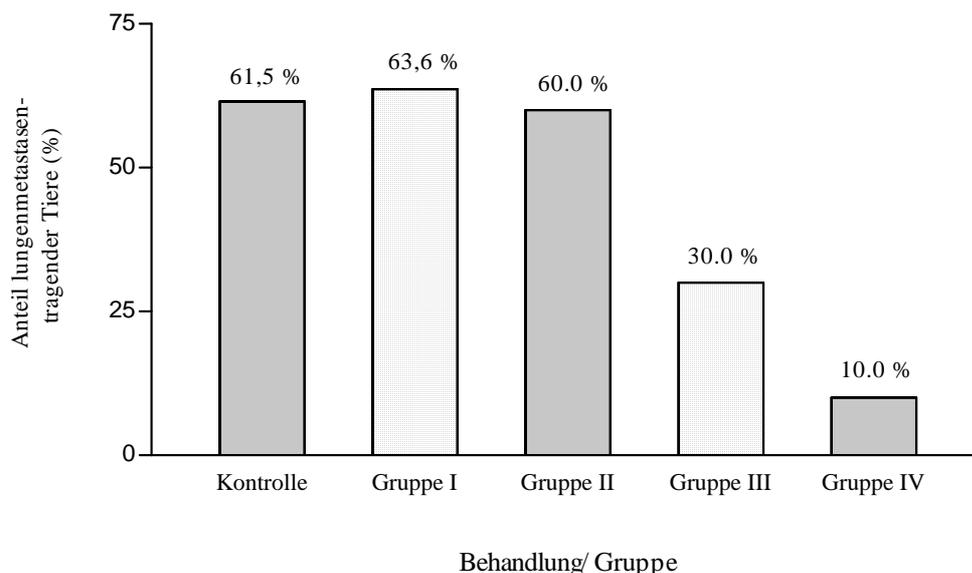


Abb. E14: Auftreten von Lungenmetastasen in den Versuchsgruppen

Die Häufigkeit des Auftretens der Lungenmetastasen korreliert mit der Tumorumfangzunahme: Je höher der betrachtete Median des Faktors der Volumenzunahme, umso häufiger treten die Lungenmetastasen auf.

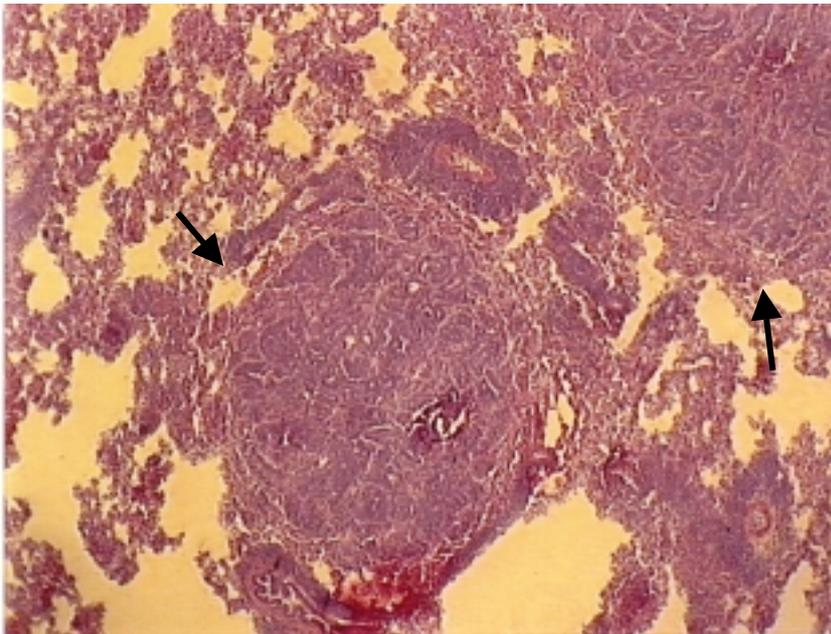


Foto 3: Typisches histologisches Bild eines Lungenmetastasenbefalls (HE, 40-fach), die Pfeile weisen auf die Metastasen

4.6 Allgemeinbefinden und Auftreten von Nebenwirkungen in den Behandlungsgruppen

Das Allgemeinbefinden der Tiere war während des Versuchsverlaufes in allen Gruppen als gut zu bewerten. Als ein Parameter zur Bewertung des Allgemeinbefindens wurden die Körpergewichte am Tag 0, Tag 10 und Tag 30 bestimmt. In den Tierversuch gelangten Tiere mit einem Gewicht zwischen 260 g und 326 g. Diese Schwankung berücksichtigend, wurden für jedes einzelne Tier die Gewichtsänderungen zwischen zwei Messzeitpunkten ermittelt und dargestellt. (vgl. Abb. E15 - der Ausgangswert ist jeweils gestrichelt dargestellt). Die Tiere der Kontrollgruppe wurden für diese Abbildung wieder zusammengefasst. Während des Zeitraumes 1, nach Tumorinokulation, nahmen fast alle Tiere aller Versuchsgruppen an Gewicht zu. Ein Einfluss des Eigengewichtes des wachsenden Tumors ist in diesem Zeitraum nicht ableitbar, wie eine Betrachtung der Einzelwerte zeigt. Mit etwa 0,1 cm³ Größe ist der Tumor zu klein, um durch Eigengewicht oder Stoffwechselveränderungen einen Einfluss auf das Allgemeinbefinden auszuüben.

Im Zeitraum 2, nach intraarterieller Genapplikation und Prodrugbehandlung, nahmen nur die Tiere der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe meist an Gewicht zu, im Gegensatz zu den Behandlungsgruppen. Betrachtet man die gegenläufige Tendenz der Gewichtsentwicklung in Kontrollgruppe und Behandlungsgruppe I bei vergleichbarem Tumorwachstum, so scheint das Tumorwachstum als Ursache im zweiten Zeitraum bestenfalls von untergeordneter Bedeutung. Die Ergebnisse weisen zusammen mit den Ergebnissen der Plasmaspiegel eindeutig auf einen Einfluss der Prodrugs auf die Gewichtsabnahme hin. Die Betrachtung der Gewichtsverläufe in allen Gruppen lässt daher darauf schließen, dass die

Hochdosisbehandlung mit 100 mg/kg Ganciclovir und die Hochdosisbehandlung mit 100 mg/kg Aciclovir die stärkste Belastung für den Organismus darstellt. Kein Tier verlor jedoch im Versuchszeitraum über 30 % seines Körpergewichtes, bedingt durch Tumorwachstum und Behandlung - ein Kriterium für eine vorzeitige Euthanasie nach internen Richtlinien des Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ). Die Werte lagen bei allen Tieren weit unterhalb dieses Kriteriums.

Es verstarben im Rahmen der Untersuchungen insgesamt fünf Tiere vorzeitig: zwei Tiere aus der Gruppe I, ein Tier aufgrund operativer Beschädigung des Gallenganges und ein Tier nach Narkoseeinleitung, ein Tier aus der Gruppe II mit postoperativer Nahtdehiszenz und ein Tier aus Gruppe III nach Narkoseeinleitung. Ein weiteres Tier aus Gruppe III verstarb während der terminalen Narkose für die Blutentnahmen.

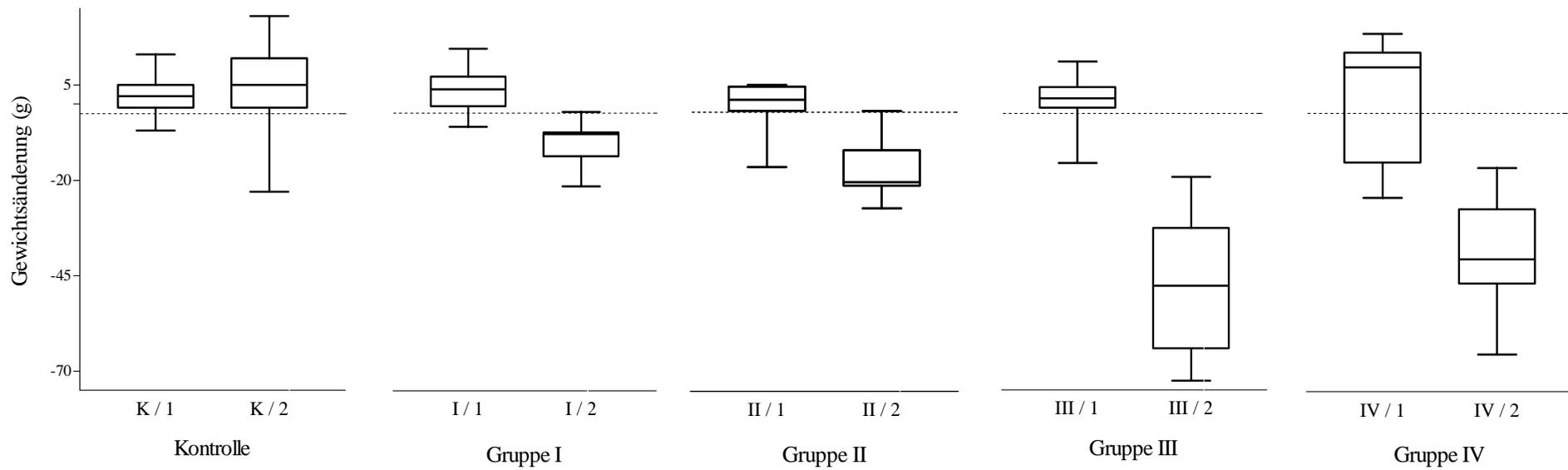


Abb. E15: Gewichtsänderungen der Tiere im Versuchsverlauf, je zwischen Tag 0 und 10 (Zeitraum 1) sowie Tag 10 und Tag 30 (Zeitraum 2)

Die Zahl der weißen Blutzellen (WBC) wurde als Maß für die Myelosuppressivität der Prodrugs, die in den beiden Hochdosisgruppen zu erwarten ist, ermittelt. Die Blutproben wurden nach der 14-tägigen Prodrugbehandlung entnommen. In der nachfolgenden Abbildung E16 ist im Mittel schon eine Erhöhung bei der Kontrollgruppe (Stichproben, daher gesondert dargestellt) zum gestrichelt dargestellten Normbereich erkennbar. Dies ist vermutlich als physiologische Reaktion des Körpers auf das Tumorwachstum, die Operationen und / oder der täglichen intraperitonealen Injektionen zu werten.

Die ebenso über dem Normbereich liegenden WBC-Werte aller ACV-behandelten Tiere unter 100 mg / kg aus Gruppe III unterschieden sich kaum von der Kontrollgruppe, aber hochsignifikant von der Gruppe IV, mit $p \cong 0,005$ (Vergleich der Mediane im Mann-Whitney-Test).

Die mit GCV-behandelten Tiere unter 100 mg / kg aus Gruppe IV zeigten einen Wert im Normbereich, der wahrscheinlich ein "Absinken" zurück in den Normbereich darstellt. Dieses Medikament ist daher in seiner Wirkung als suppressiv auf die Ausschüttung von Leukozyten einzustufen.

Die Tiere der hochdosierten GCV- und ACV-behandelten Gruppen zeigten im Mittel eine leichte Erhöhung der Thrombozytenzahl (Werte über 885×10^9 Zellen / l, nicht abgebildet). Die Werte dieser beiden Gruppen unterschieden sich zwar jeweils mit $p < 0,005$ hochsignifikant von denen der Kontrolltiere (Mann-Whitney), deren Werte lagen aber auch im oberen Bereich des ohnehin sehr breiten Referenzbereiches ($450 - 885 \times 10^9$ Zellen / l).

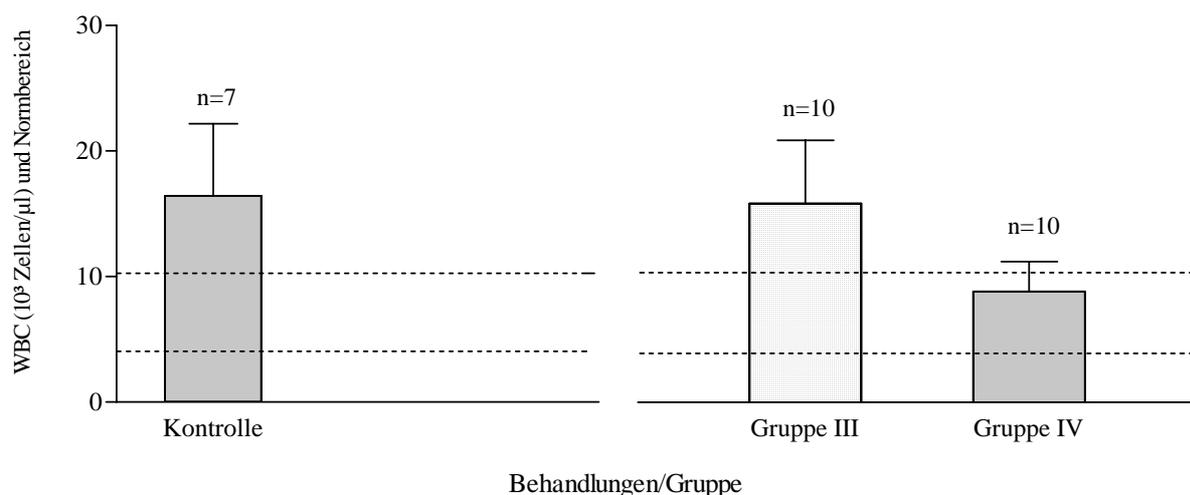


Abb. E16: Mittlere Zahl der weißen Blutkörperchen in Hochdosisgruppen und aus Stichproben der Kontrollgruppe (+/-SD), sowie Normbereich (gestrichelt)