

well, while methotrexate showed essentially no activity. For two tumours the reaction of the xenografts to methotrexate did not correlate with the chemotherapy results in the patients from whom the xenografts were derived. The patient tumours responded to treatment with this drug while the xenografts showed no sensitivity at all.

In chapter 5 it is shown that xenografts can be used for the study of resistance mechanisms. In this case methotrexate resistance was analysed and the results show that a lack of effect is probably not due to i) a plasma pharmacokinetic factor in the nude mouse and ii) overproduction of dihydrofolate reductase, the target enzyme of methotrexate.

In chapter 6 five drugs were analysed with clinical activity. Bleomycin was the most active drug (response in 4/9 lines), and 5-fluorouracil and cyclophosphamide were less active (moderate responses in respectively 4/7 and 4/6 lines). Methotrexate and cisplatin were minimally or not active. The inactivity of cisplatin as opposed to the results reported in chapter 4 is likely to be a dose related effect, since we were forced to use a lower dose in the latter experiments.

In chapter 7 the activity of some new drugs is reported. Platinum analogs such as carboplatin, spiroplatin and JM-40 were tested in platinum insensitive lines and no superior effect of the analogs as compared to cisplatin was observed. When tested in a single line, 5-aza-2'-deoxycytidine as well as 5'-deoxy-5-fluorouridine showed a better activity than conventional drugs, making these drugs of potential value for patients with head and neck cancer.

In chapter 8 conclusions are drawn about the potential of the model. Because of the low take rate and the long latency time the model is not suited for chemosensitivity testing in individual patients. Also, because of the high costs involved the nude mouse will never play an important role in the primary screening of new drugs. However the model is very likely to be of relevance in the secondary screening of new drugs. Testing has to be done in a panel of head and neck tumour lines, analogous to a disease oriented phase II clinical trial. When the question arises which drug is to be selected for trials in head and neck cancer patients, the model might show its value. Further studies must be awaited to draw definitive conclusions about the relevance of the model.

SAMENVATTING

Er is behoefte aan nieuwe cytostatica voor de behandeling van patiënten met een hoofd- halstumor. Naast een zo goed mogelijk antitumor effect is het gewenst dat nieuwe stoffen vooral minder bijwerkingen hebben dan de op dit moment gebruikte. Om erachter te komen of een nieuw cytostaticum actief is bij patiënten met een hoofd- halstumor, vindt altijd een klinische (zogenaamde fase II) studie plaats. Bij een dergelijke studie is het mogelijk dat groepen patiënten met een inactief middel behandeld worden. Zij worden dan onnodig blootgesteld aan toxische bijverschijnselen.

Dit onderzoek is gestart met de vraag of het mogelijk is een preklinisch model te ontwikkelen, waarvan de resultaten gebruikt zouden kunnen worden bij het selecteren van cytostatica voor een fase II studie bij patiënten met een hoofd- halstumor. Zo'n model zou dan moeten voorkomen, dat patiënten onnodig blootgesteld worden aan inactieve middelen. Wij besloten een in vivo model te kiezen waarbij de naakte thymusloze muis als gastheer fungeert voor humane hoofd- halstumoren. Door het ontbreken van de thymus heeft de naakte muis zeer weinig lymfocyten met T-cel kenmerken en deze immuundeficiëntie heeft tot gevolg dat de muis weefsel van andere species (xenotransplantaten), zoals ook menselijke tumoren accepteert. Deze immuundeficiëntie maakt het dier echter ook extreem gevoelig voor ziektekiemen; de muis moet dan ook in een omgeving zonder kans op infectie met pathogene microorganismen gehouden worden. Dit impliceert dat bakken, voer, water en alles wat verder met de muis in contact komt steriel moeten zijn. Het is duidelijk dat het houden van een naakte muizenkolonie een kostbare en tijdrovende zaak is.

In hoofdstuk 2 wordt beschreven hoe het implanteren van tumoren plaats vond. Na ontvangst van een tumor van een patiënt, werd deze in stukjes gesneden en aan elke zijde van de muis subcutaan in de flank geïmplantéerd. In 26% van de 129 gevallen waarbij een tumor geïmplantéerd werd, sloeg de tumor aan: groei werd waargenomen. In ongeveer de helft van de gevallen waar groei gezien werd in de eerste (mens naar muis) passage, was het mogelijk de in de muis groeiende tumor steeds van de ene groep muizen over te zetten in een andere. Wanneer meer dan 4 van dergelijke passages

mogelijk waren met een bepaalde tumor, dan werd er gesproken van een tumorlijn. Er werden sterke aanwijzingen gevonden, dat slecht gedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen vaker in de eerste passage aanslaan dan de beter gedifferentieerde carcinomen. Ook lymfekliermetastasen leken vaker te groeien dan de primaire tumoren. In vier van de zes tumorlijnen nam de gemiddelde verdubbelingstijd van de tumoren af naarmate de tumor meer passages doorlopen had. Na vier tot zes passages stabiliseerde de groeisnelheid zich. Microscopisch onderzoek toonde aan dat de transplantaten qua histologie niet wezenlijk verschillen van de oorspronkelijke tumor; de differentiatiegraad van plaveiselcelcarcinomen veranderde niet. Metastasering, een kenmerk van maligniteit, kon in tumordragende muizen niet aangetoond worden.

Het feit, dat slechts een minderheid van de geïmplanteerde tumoren gaat groeien in de naakte muis was aanleiding voor een experiment, dat tot doel had d.m.v. extra onderdrukking van het immuunsysteem van de muis de groei van hoofd- hals tumoren te bevorderen. Wij konden aantonen dat cyclophosphamide 24 uur nadat het intraperitoneaal is toegediend een remmend effect heeft op de activiteit van natural killer cellen. Er zijn sterke aanwijzingen, dat dit type cellen betrokken is bij de afstoting van tumorweefsel. Cyclophosphamide 24 uur voor de transplantatie gegeven, veroorzaakte geen toename van het percentage hoofd- halstumoren dat aansloeg in de naakte muis. Bij ovarium tumoren werd verassenderwijs wel een positief effect op het aanslaan van de tumoren waargenomen.

In hoofdstuk 4 worden de resultaten besproken van de behandeling van tumordragende muizen met de drie cytostatica, die bij patiënten met hoofd- halstumoren het meest werkzaam zijn. Cisplatine en bleomycine bleken actieve stoffen te zijn in de meerderheid van de geteste tumorlijnen, terwijl methotrexaat geen of nauwelijks activiteit vertoonde in een 11-tal lijnen. Er konden tumorlijnen gemaakt worden van tumoren van 2 patiënten, die na de transplantatie behandeld werden met methotrexaat. De gevoeligheid van de tumor in de patiënt voor methotrexaat correleerde niet met de minimale activiteit van deze stof op de getransplanteerde tumoren.

Naast de studies naar het effect van cytostatica kan het model ook gebruikt worden voor het bestuderen van resistentie-mechanismen. In hoofdstuk 5 wordt aangetoond dat de ongevoeligheid voor methotrexaat van de getransplanteerde tumoren waarschijnlijk niet veroorzaakt wordt door i) een

verschil in farmacokinetiek van methotrexaat tussen mens en muis en ii) een overproductie van dihydrofolaat reductase, het doelwit enzym van methotrexate.

In hoofdstuk 6 worden de resultaten beschreven van vijf cytostatica waarvan bekend is dat ze in 20-40% van de patiënten antitumor activiteit vertonen. Bleomycine was het meest actief, met een goede werkzaamheid in vier van de negen lijnen, terwijl 5-fluorouracil en cyclophosphamide matig actief waren in respectievelijk vier van de zeven en vier van de zes lijnen. Methotrexaat en cisplatine waren nauwelijks of niet actief in een 10-tal lijnen. Het ontbreken van activiteit van cisplatine komt niet overeen met de resultaten zoals beschreven in hoofdstuk 4. Het is aannemelijk, dat dit verschil veroorzaakt wordt door het feit dat wij bij de in hoofdstuk 6 beschreven experimenten gedwongen waren de totale dosis cisplatine te verlagen.

In hoofdstuk 7 worden de resultaten met nieuwe cytostatica beschreven. De activiteit van platinum-analoga, zoals carboplatin, spiroplatin en JM-40 werd onderzocht in tumorlijnen die ongevoelig waren voor cisplatine. Geen van deze nieuwe platinum-analoga vertoonde een beter antitumor effect dan cisplatine. 5-aza-2'-deoxycytidine en 5'-deoxy-5-fluorouridine bleken ieder in een tumorlijn actiever te zijn dan alle conventionele cytostatica. Deze resultaten geven aan dat deze twee stoffen mogelijk van waarde zijn bij patiënten met een hoofd-halstumor.

De waarde van het model wordt in hoofdstuk 8 besproken. Omdat het percentage tumoren, dat uiteindelijk uitgroeit tot een tumorlijn vrij klein is en het vrij lang duurt voordat een chemotherapie-experiment geëvalueerd kan worden, is het model niet of nauwelijks van waarde voor de behandeling van de individuele patiënt. Ook zal het model vanwege de hoge kosten nooit een rol gaan spelen bij het zogenaamde "primary" screenen d.w.z. het testen op antitumor activiteit van stoffen waarvan niets bekend is. Het model zal waarschijnlijk waardevol zijn voor het "secondary" screenen van cytostatica. Stoffen, welke door andere, goedkopere modellen als interessant bestempeld zijn of welke actief zijn bij andere tumortypen worden dan getest in een panel van hoofd- halstumorlijnen. De aldus verkregen resultaten kunnen betrokken worden bij de beslissing welke cytostatica getest moeten gaan worden in fase II studies bij patiënten met hoofd- halstumoren. Op dit moment zijn meer resultaten nodig om de definitieve

waarde van het naakte muizemodel voor het "secondary" screenen van nieuwe cytostatica te bepalen.

PUBLICATIONS

The following publications resulted from the studies described in this thesis.

1. Braakhuis BJM and Snow GB. Chemotherapy of human head and neck tumours transplanted in athymic nude mice (abstract). *Expl. Cell Biol.* 50: 340, 1982.
2. Braakhuis BJM, Schoevers EJ, Heinerman ECM, Sneeuwloper G and Snow GB. Chemotherapy of human head and neck cancer xenografts with three clinically active drugs: cis-platinum, bleomycin and methotrexate. *Br. J. Cancer* 48: 711-716, 1983.
3. Braakhuis BJM, Sneeuwloper G and Snow GB. Chemotherapy of human head and neck cancer xenografts in athymic nude mice (abstract). *Z. Versuchstierk.* 25: 203, 1983.
4. Braakhuis BJM, Sneeuwloper G and Snow GB. The establishment of human head and neck tumour xenografts (abstract). *Z. Versuchstierk.* 25: 203, 1983.
5. Braakhuis BJM, Heinerman ECM, Schoevers EJ and Snow GB. Minimal activity of methotrexate against human head and neck cancer xenografts in nude mice (abstract). 2nd European conference on clinical oncology and cancer nursing, Amsterdam, 1983.
6. Braakhuis BJM, Sneeuwloper G and Snow GB. Chemotherapy of human head and neck tumours transplanted in athymic nude mice. In: *Immune-deficient animals*. Ed. B.Sordat, p. 301-303, 1984. Karger, Basel.
7. Braakhuis BJM, Sneeuwloper G and Snow GB. The potential of the nude mice xenograft model for the study of head and neck cancer. *Arch. Otorhinolaryngol.* 239: 69-79, 1984.
8. Braakhuis BJM, Schoevers EJ, Heinerman ECM, Boerrigter GH and Snow GB. Unexpected minimal activity of methotrexate in human head and neck cancer xenografts (abstract). International conference on head and neck cancer, Baltimore, USA, 1984.
9. Braakhuis BJM and Snow GB. Nude mice model as a predictive assay in head and neck cancer. In: *Head and Neck Cancer*. Vol. 1. Eds: Chretien, P.B. et al. pp. 421-424, 1985. Decker, Philadelphia.