

Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Ärztlicher Leiter: Herr Professor Dr. Reinhard Schneppenheim

Modulation der Zytotoxizität von oxyradikalbildenden Chemotherapeutika durch Einflussnahme auf das Glutathion-Reduktions-Oxidations-System mittels Buthioninsulfoxamid und/oder Ethacrynsäure

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Miriam Eilers

aus Hamburg

Hamburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Erttmann

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. A.R. Zander

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. W. Hampe

.....

Für Irmgard und Uwe Eilers!

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------|---|
| ABC-Transporter...: | Membranproteinklasse mit ATP-bindender Kasette (<u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette) |
| AML...: | akute myeloische Leukämie |
| APL...: | akute promyeloische Leukämie |
| As ₂ O ₃ ...: | Arsentrioxid |
| ATP...: | Adenosintriphosphat |
| ATRA...: | All- trans- Retinsäure |
| BSO...: | Buthioninsulfoxamid |
| C...: | Kohlenstoff |
| Ca...: | Karzinom |
| Cl...: | Chlor |
| CML...: | chronisch myeloische Leukämie |
| CO ₂ ...: | Kohlendioxid |
| D...: | Deutschland |
| DNA...: | Desoxynucleinacid |
| Dox...: | Doxorubicin |
| EA...: | Ethacrynsäure |
| EA + BSO...: | Ethacrynsäure mit Buthioninsulfoxamid kombiniert |
| EA-SG...: | EA-GSH-Konjugat |
| EDTA...: | Ethylendiamintetraessigsäure |
| γ-GCS...: | γ-Glutamyl-Cystein-Synthetase |
| GSH...: | Glutathion |
| GSSG...: | Glutathiondisulfid |
| GST...: | Glutathion-S-Transferase |
| HL-60-R...: | humane Leukämiezelllinie |
| ID50...: | inhibitorische Dosis 50% |
| INSS...: | International Neuroblastoma Staging System |
| LA-N-1...: | humane Neuroblastomzelllinie 1977 R. C. Seeger; Children's Hospital Los Angeles |
| LK...: | Lymphknoten |

| | |
|------------------------|---|
| MCF-7...: | humane Brusttumorzelllinie |
| MDA-MB-231...: | humane Brusttumorzelllinie |
| MG...: | Molekulargewicht |
| MR-Proteins...: | multi-resistant-protein |
| n...: | Anzahl |
| N...: | Stickstoff |
| NADP...: | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |
| NADH...: | reduzierte Form des Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotids |
| NADPH...: | reduzierte Form von NADP |
| N-MYC-Protoonkogen...: | neuroblastoma-myelocytomatosis gene |
| PBS...: | Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline) |
| PML...: | promyeloische Leukämie |
| RedOx (-System)...: | Reduktions-Oxidations (-System) |
| SW 480...: | Kolonkarzinomzelllinie |
| U...: | Units |
| U-937...: | humane Promonozytenzellen |
| V79...: | fibroblastische Lungentumorzelllinie |
| Zul.-Nr....: | Zulassungs-Nummer |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abkürzungsverzeichnis..... | i |
| Inhaltsverzeichnis | I |
| I Arbeitshypothese und Fragestellung..... | 4 |
| II Einleitung | 5 |
| 1 Einführung in das zu Grunde liegende Krankheitsbild..... | 5 |
| 2 Einführung in die Problematik..... | 7 |
| 3 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus der Zytostatika Doxorubicin, Cisplatin, Melphalan und Arsentrioxid..... | 9 |
| 3.1 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Doxorubicin..... | 9 |
| 3.2 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Cisplatin..... | 9 |
| 3.3 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Melphalan | 10 |
| 3.4 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Arsentrioxid..... | 10 |
| 4 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen die Zytostatika Doxorubicin, Cisplatin, Melphalan und Arsentrioxid..... | 12 |
| 4.1 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Doxorubicin | 12 |
| 4.2 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Cisplatin..... | 13 |
| 4.3 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Melphalan | 13 |
| 4.4 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Arsentrioxid..... | 14 |
| 5 Die Oxyradikalentgiftung durch Glutathion (GSH)..... | 15 |
| 6 Möglichkeiten der Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System | 16 |
| III Material | 21 |
| 1 Zelllinie | 21 |
| 2 Verwendete Medikamente | 21 |
| 2.1 Zytostatika..... | 21 |
| 2.2 Diuretika..... | 23 |
| 2.3 Chemosensitizer | 24 |
| 3 Geräte | 24 |
| 4 Reagenzien | 26 |
| 5 Herstellernachweis | 27 |
| IV Methoden | 29 |

| | | |
|------|---|----|
| 1 | Kultivierung der Zellen..... | 29 |
| 1.1 | Stammkultur..... | 29 |
| 1.2 | Zellen für die Experimente..... | 30 |
| 2 | Experimente | 30 |
| 2.1 | Dosis- Wirkungskurven | 30 |
| 2.2 | Proliferationsassays mit Zytostatika unter dem Einfluss von Buthioninsulfoxamid (BSO) | 32 |
| 2.3 | Proliferationsassays mit Zytostatika unter dem Einfluss von Ethacrynsäure (EA)..... | 32 |
| 2.4 | Proliferationsassays mit Zytostatika unter dem Einfluss der Kombination von Ethacrynsäure mit Buthioninsulfoxamid (EA + BSO)..... | 33 |
| 3 | Auswertung | 33 |
| V | Ergebnisse | 35 |
| 1 | Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin..... | 35 |
| 2 | Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin..... | 36 |
| 3 | Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Doxorubicin | 37 |
| 4 | Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin..... | 38 |
| 5 | Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin | 39 |
| 6 | Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Cisplatin | 40 |
| 7 | Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Melphalan | 41 |
| 8 | Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Melphalan..... | 42 |
| 9 | Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Melphalan..... | 43 |
| 10 | Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid..... | 44 |
| 11 | Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid..... | 45 |
| 12 | Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Arsentrioxid | 46 |
| 13 | Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse | 47 |
| 13.1 | ... einer kombinierten Gabe mit BSO..... | 47 |
| 13.2 | ... einer kombinierten Gabe mit EA | 48 |

| | |
|--|----|
| 13.3 ... einer kombinierten Gabe von BSO + EA..... | 49 |
| VI Diskussion..... | 50 |
| 1 Diskussion der eigenen Ergebnisse..... | 50 |
| 1.1 Ergebnisse für Doxorubicin | 50 |
| 1.2 Ergebnisse für Cisplatin | 53 |
| 1.3 Ergebnisse für Melphalan | 55 |
| 1.4 Ergebnisse für Arsentrioxid | 57 |
| 2 Kritische Einordnung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen bezüglich der Fragestellung..... | 59 |
| VII Zusammenfassung..... | 63 |
| VIII Literaturverzeichnis | 64 |
| IX Anhang..... | 78 |
| 1 Abbildungen..... | 78 |
| Danksagung | 80 |
| Lebenslauf..... | 81 |
| Erklärung | 82 |

I Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Anlass für die vorliegende Untersuchung ist die Problematik der Resistenzbildung in der Behandlung des Neuroblastoms mit Zytostatika, die verantwortlich für die weiterhin unbefriedigende Prognose von Hochrisiko-Neuroblastomerkrankungen ist.

In dieser Arbeit liegt der Fokus auf einem Resistenzmechanismus, der im Zusammenhang mit dem Detoxifikationsvorgang durch das Glutathion (GSH) steht. Es hat sich gezeigt, dass Tumorzellen unter anderem über dieses GSH-System Oxyradikale entgiften. Abhängig von der Aktivität des GSH-Systems und dem damit zusammenhängenden Oxyradikalspiegel verhalten sich Tumorzellen mehr oder weniger resistent gegen viele Zytostatika (Xu et al. 1992).

Demzufolge ist es erstrebenswert durch pharmakologische Modulationen des GSH-Systems die Empfindlichkeit insbesondere von Tumorzellen gegenüber oxyradikalbildenden Zytostatika, wie sie in der Therapie des Neuroblastoms eingesetzt werden, zu steigern. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zytostatika Cisplatin, Doxorubicin (Dox), Melphalan und Arsentrioxid (As_2O_3) näher untersucht. Für diese vier Substanzen ist eine erhöhte Oxyradikalentgiftungskapazität des GSH-Reduktions-Oxidations- (RedOx-) Systems beschrieben. Zwei pharmakologisch eingeführte Substanzen, deren Ansatzpunkte eine Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System ermöglichen, sind das Buthioninsulfoxamid (BSO) und die Ethacrynsäure (EA). Bei BSO handelt es sich um einen Chemosensitizer bezüglich aller über GSH zu detoxifizierenden Substanzen. Die EA ist ein reversibler Inhibitor der Glutathion-S-Transferase (GST). Zusätzlich senkt es durch Verbrauch von Glutathion den GSH-Spiegel einer Zelle. Nach diesen Befunden stellen sich für uns bezüglich der Neuroblastomzelllinie LA-N-1 folgende Fragen:

1. Verstärkt die Koinkubation mit BSO die Wirksamkeit ausgewählter, oxyradikalbildender Zytostatika?
2. Verstärkt die Koinkubation mit EA die Wirksamkeit der unter 1. eingesetzten Zytostatika?
3. Verstärkt eine kombinierte Gabe von BSO + EA die Wirksamkeit dieser Zytostatika über das Ausmaß der möglichen Effekte unter 1. und 2. hinaus?

II Einleitung

1 Einführung in das zu Grunde liegende Krankheitsbild

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor mit embryonalem Ursprung vom peripheren sympathischen Nervensystem ausgehend. Primär betroffen ist das Nebennierenmark, der sympathische Grenzstrang und die Ganglien.

Die Inzidenz beträgt in Deutschland 1,2 pro 100.000 Kindern. In der Altersklasse der unter 1-Jährigen liegt sie mit 7,9 pro 100.000 am höchsten. Ab dem zweiten Lebensjahr beträgt die Inzidenz weniger als 2 pro 100.000 Kindern. Im Schulkindalter ist das Neuroblastom eine sehr seltene Erkrankung ($\leq 0,3/100.000$). Insgesamt ist es das dritthäufigste Malignom im Kindesalter. Jungen sind etwas häufiger betroffen als Mädchen.

Auf genetischer Ebene gibt es einige Auffälligkeiten, die eine prognostische Wertigkeit haben. Eine hohe Amplifikationsrate des N-MYC-Protoonkogens auf Chromosom zwei verschlechtert die Prognose des Patienten. Eine Imbalance am Chromosom 1p hat ebenfalls eine negative prognostische Bedeutung. Die Kombination einer Hyperdiploidie mit einer Diagnosestellung vor dem ersten Geburtstag hat demgegenüber eine gute Prognose.

Weitere Prognosefaktoren sind das klinische Stadium, der Metastasierungstyp und das Alter des Patienten. Die klinische Stadieneinteilung erfolgt nach dem „International Neuroblastoma Staging System“ (INSS):

Stadium (nach Brodeur et al. (1993))

1 Lokalisierter Tumor; Entfernung vollständig im Ganzen; mit oder ohne mikroskopische Residuen; ipsilaterale Lymphknoten (LK) mikroskopisch Tumorzell-negativ; anhaftende, entfernte LK dürfen positiv sein.

Oder Ein im Ganzen entfernter Mittellinientumor, Mittellinie ist hier definiert als Wirbelsäule; ohne ipsi- oder kontralateralem LK-Befall.

2A Lokalisierter Tumor; Entfernung unvollständig im Ganzen; ipsilateral nicht-anhaftende LK mikroskopisch Tumorzell-negativ.

2B Lokalisierter Tumor; mit oder ohne vollständige Excision im Ganzen; mit ipsilateral nicht-anhaftenden, Tumorzell-positiven LK; vergrößerte, kontralaterale LK mikroskopisch Tumorzell-negativ.

3 Unresezierbarer einseitiger Tumor; über die Mittellinie infiltrativ wachsend; mit oder ohne regionalem LK-Befall.

Oder Einseitig lokalisierter Tumor; Beteiligung kontralateraler regionaler LK.

Oder Mittellinientumor; nicht-resezierbare Infiltration oder LK-Beteiligung auf beiden Seiten.

4 Disseminierter Tumor in entfernte LK, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe;

4S Lokalisierter Primärtumor wie definiert in 1, 2A oder 2B; mit begrenzter Dissemination in Leber, Haut und Knochenmark; Patient jünger als ein Jahr alt.

Das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung hängt von der Neuroblastomlokalisierung, dem Erkrankungsstadium und Metastasierungstyp ab. Die Primärlokalisationen des Neuroblastoms sind am ehesten die Nebennieren oder auch der abdominelle sympathische Grenzstrang. Im Verlauf der Erkrankung kommt es somit häufig zu einer Zunahme des Bauchumfanges und Bauchschmerzen. Weiterhin häufig beschrieben werden Kopfschmerzen, Protrusio Bulbi und gelegentlich neurologische Syndrome wie unter anderem das Horner-Syndrom, die Querschnittslähmung oder auch Opsomyokloni.

Die Diagnosestellung erfolgt durch den Nachweis von Vanillinmandelsäure und Homovanillinsäure im Urin sowie einer typischen Lokalisation des Tumors in bildgebenden Verfahren wie die Sonographie, Szintigraphie, Computertomographie oder Kernspintomographie. 70 % der Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Metastasen. Insbesondere betroffen davon sind die langen Knochen, der knöcherne Schädel, das Knochenmark und die Leber.

Für die Therapieplanung ist das Alter des Kindes, die Tumorlokalisation und die Zytogenetik, wie zum Beispiel die N-MYC-Amplifikation oder 1p-Imbalanz, ausschlaggebend.

Im Stadium 1 und 2 reicht eine nicht-notwendigerweise radikale Operation als einzige therapeutische Maßnahme aus.

Neben der chirurgischen Behandlung spielt die Kombinationschemotherapie bei den höheren Tumorstadien eine herausragende Rolle. Dabei kommen in erster Linie Carboplatin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Dacarbacin, Doxorubicin, Etoposid, Ifosfamide, Melphalan, Topotecan, Vincristin und Vindesine zur Anwendung.

2 Einführung in die Problematik

Die 3-Jahres-Überlebensrate von Neuroblastom-Patienten hat sich laut deutschem Kinderkrebsregister insgesamt in den Jahren 1984 bis 2003 von 60 auf 83 % verbessert.

Die Anzahl der Langzeitüberlebenden höherer Erkrankungsstadien stieg jedoch in den letzten Jahrzehnten nicht nennenswert an (Matthay et al., 1999; Berthold et al., 2005; Flahaut et al., 2006). Behandelt werden diese Patienten derzeit mit einer Polychemotherapie unterschiedlicher Kombinationen der unter II.1 genannten Medikamente und autologer Knochenmarktransplantation. Für das Therapieversagen beim metastasierten Neuroblastom sind in der Regel Chemotherapieresistenzen verantwortlich. Die Verbesserung der derzeitigen Standardtherapie in der Behandlung von Hochrisiko-Patienten ist notwendig.

Ein möglicher Ansatzpunkt ist die medikamentöse Verhinderung einer Resistenzentwicklung.

Die Ursachen für Resistenzentstehungen können zahlreich sein. Auf zellulärer Ebene sind das unter anderem (K.D. Tew et al. (1998)):

- Zellmembranveränderungen
- Detoxifikationsmechanismen
- Reparaturmechanismen
- Veränderte Apoptosegene

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf eine mögliche Ursache der Resistenzentwicklung von Neuroblastomzellen, die im Zusammenhang mit einem verstärkten Detoxifikationsvorgang durch das Glutathion (GSH) steht. GSH ist eine intrazelluläre Substanz, die für die Entgiftung von Oxyradikalen verantwortlich ist.

An Leukämiezellen von Mäusen konnte festgestellt werden, dass zelluläre Resistenzen mindestens teilweise mit reduzierten Oxyradikalspiegeln zusammenhängen (Xu et al., 1992). Es hat sich gezeigt, dass Tumorzellen unter anderem über dieses GSH-System Oxyradikale entgiften. So verhielten sich Tumorzellen abhängig von der Aktivität des GSH-Systems mehr oder weniger resistent gegen viele Zytostatika (P. Calvert et al., 1998).

Um Einflussmöglichkeiten auf Resistenzentwicklungen im Bereich des GSH-RedOx-Systems indirekt untersuchen zu können, d.h. ohne direkte, intrazelluläre Messung des GSH-Spiegels, wählten wir Zytostatika, für deren Wirkmechanismus nach internationaler Studienlage die Oxyradikalbildung sowie die Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus eine entscheidende Rolle spielt (3.1 bis 4.4).

Die Medikamente sollten in der Therapie des Neuroblastoms einsetzbar sein.

3 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus der Zytostatika Doxorubicin, Cisplatin, Melphalan und Arsentrioxid

3.1 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Doxorubicin

Doxorubicin gehört zu den Standardmedikamenten in der Therapie des Neuroblastoms. Bereits Anfang der 80er Jahre konnte an kardialen Zellen gezeigt werden, dass Doxorubicin Oxyradikale durch seinen Metabolismus generiert. Dies führte zu peroxidativen Prozessen (Doroshov et al., 1983).

Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde an der MCF-7-Zelllinie festgestellt, dass Oxyradikale für die zytotoxischen Mechanismen von Doxorubicin eine Rolle spielen (Mimnaugh et al., 1989). An der U-937-Zelllinie konnte zudem beobachtet werden, dass Peroxidakkumulationen als Teil des Wirkmechanismus von Doxorubicin den Apoptosevorgang auslösen (Troyano et al. 2001). In Zellen der MDA-MB-231-Linie wurde eine erhöhte Doxorubicinaktivität nach Lipidperoxidation nachgewiesen. Dieser Effekt war durch Antioxidantien unterdrückbar (Germain et al., 1998).

Dass Antioxidantien direkt die Wirksamkeit von Doxorubicin abschwächen, konnte im gleichen Jahr für maligne Gliomzellen gezeigt werden (Roller et al. 1998).

Den Studien zu Folge spielt die Oxyradikalbildung für den Wirkmechanismus von Doxorubicin eine Rolle. Dieses ist z.B. durch antioxidative Maßnahmen beeinflussbar.

3.2 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Cisplatin

Cisplatin ist ein Medikament, das regelhaft in der Therapie des Neuroblastoms eingesetzt wird.

Die Cisplatinwirksamkeit hängt mit dem Anstieg intrazellulärer Oxyradikale zusammen. Cisplatin erhöht als Alkylanz die Konzentration von reaktiven Aldehyden in PML-Zellen signifikant. Die Folge sind oxidative Schäden u.a. an Proteinen (Previati et al. 2006). Bereits 1994 und 2003 konnte Cisplatin u.a. in Nierenzellen von Ratten als Produzent von intrazellulären Oxyradikalen ausgemacht werden (Masuda et al. 1994; Yos-

hida et al. 2003). Im Einklang mit diesen Studien wurde an der U-937-Zelllinie für Cisplatin gezeigt, dass Peroxidakkumulationen als Teil des Wirkmechanismus den Apoptosevorgang auslösen (Troyano et al. 2001).

In einer Arbeit von 2004 war die Generierung von Oxyradikalen nach Cisplatingabe in Lymphozyten und CML-Zellen unter anderem für DNA-Fragmentierungen verantwortlich. „Freie-Radikal-Fänger“ führten zu geringeren Fragmentierungsraten (Wozniak et al. 2004). An malignen Gliomzellen hat sich gezeigt, dass Antioxidantien die Wirksamkeit von Cisplatin abschwächen. Einen direkten Zusammenhang von Cisplatinwirkung und freien Radikalen konnte aber nicht festgestellt werden (Roller et al. 1998).

Die Studienlage zeigt, dass die Oxyradikalbildung zu den Wirkmechanismen von Cisplatin gehört. Dies ist durch eine antioxidative Modulation beeinflussbar.

3.3 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Melphalan

Melphalan gehört zu den Standardmedikamenten im Therapieschema des Neuroblastoms. Die Effektivität von Melphalan kann durch die Senkung des GSH-Levels gesteigert werden (Calvert et al. 1998). Die Konsequenz gesenkter GSH-Spiegel ist – wie bereits angeführt – der intrazelluläre Anstieg von Oxyradikalen (siehe auch Abb. B). Für den Wirkmechanismus von Melphalan spielen sie folglich eine Rolle.

Wie schon für Doxorubicin und Cisplatin zeigte sich bei Versuchen an der U-937-Zelllinie für Melphalan, dass Peroxidakkumulationen als Teil des Wirkmechanismus den Apoptosevorgang auslösen (Troyano et al. 2001).

3.4 Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus von Arsentrioxid

Im Gegensatz zu den ersten drei genannten Medikamenten ist Arsentrioxid derzeit kein Standardmedikament in der initialen Therapie des Neuroblastoms im Kindesalter.

Das Nebenwirkungsprofil von As_2O_3 im Kindesalter ist bislang unklar. Einige Studien liefern jedoch Hinweise:

As₂O₃ ist in Studien effizient und sicher gewesen. Unerwünschte Wirkungen traten selten, reversibel und selbstlimitierend auf (Soignet et al. 2006).

Unter der Therapie mit As₂O₃ kam es gegenüber Kontrollgruppen später zu Lymphozytosen und Splenomegalien (Recher et al. 2001).

Als Medikament im Rahmen von Chemotherapien scheint As₂O₃ nach Studienlage eine interessante Alternative zu den etablierten Medikamenten (siehe II.1) in der Behandlung des Neuroblastoms zu sein. Bereits 2001 wurde As₂O₃ als therapeutische Alternative bei Ovarial- und Zervixkarzinomzellen, die gegen Cisplatin resistent geworden waren, beschrieben (Du et al. 2001). Diese Arbeit berichtete zudem, dass unter As₂O₃ kein Effekt an Fibroblasten zu beobachten ist. Auch auf andere gesunde Zellen hat As₂O₃ nur einen geringen Einfluss. Das könnte möglicherweise das Risiko von Folgeschäden nach einer Chemotherapie senken. Diese scheinbar gute Verträglichkeit macht das Arsenitoxid insbesondere für die Therapie von Kindern interessant.

Ein weiterer Grund dieses Medikament in unsere Arbeit aufzunehmen ist, dass die internationale Studienlage das As₂O₃ im Falle von Chemotherapieresistenzen als vielversprechende Ergänzung erscheinen lässt. So wurde bereits 1999 von zwei Studien an APL-Patienten aus China bzw. den USA berichtet. 14 von 15 bzw. 11 von 12 Patienten kamen nach ATRA- und Chemotherapieresistenz unter Einsatz von As₂O₃ in eine hämatologische und zytogenetische Remission (Agis et al. 1999).

Ida- bzw. daunorubicin- und doxorubicinresistente AML-Zellen sind für As₂O₃ nicht kreuzresistent (Lehmann et al. 2001). Speziell an resistenten Neuroblastomzellen wurde beobachtet, dass eine Wirksamkeit von As₂O₃ in tolerablen Dosierungen von 2 bzw. 4 µmol/l erreicht wird (Karlsson et al. 2005).

As₂O₃ scheint im Rahmen der Resistenzentwicklung eine verträgliche Alternative bei nicht mehr wirkenden Chemotherapeutika zu sein.

Bezüglich der Oxyradikalbildung als Wirkmechanismus des As₂O₃ wurde der Oxyradikalgehalt von T-Zellen als „kritischer Parameter“ für die Toxizität von Arsenitoxid beschrieben (Hildemann et al. 1999). An humanen Zervixkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass As₂O₃ eine vermehrte Produktion von intrazellulären Oxyradikalen verursacht. Die Folge war die Caspase-3-Aktivierung mit DNA-Fragmentierung und morphologischer Apoptose (Woo et al. 2002). Dieses Ergebnis wurde für Zervix-Ca- und

Kolonkarzinomzellen bestätigt. In den Kolonkarzinomzellen zeigte sich, dass das As_2O_3 die SH-Gruppe des GSHs angreift. Resultat ist die intrazelluläre Überproduktion von Oxyradikalen (Chun et al. 2002; Nakagawa et al. 2002).

Für die Neuroblastomzelllinie LA-N-1 konnte bereits 2000 die Beobachtung gemacht werden, dass As_2O_3 zu einer Erhöhung der intrazellulären Oxyradikale führt (Øra et al. 2000).

Folglich scheint das Arsentrioxid in der Therapie von Kindern einsetzbar, wobei die Bildung von Oxyradikalen eine wichtige Rolle für den Wirkmechanismus des Medikamentes spielt.

4 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen die Zytostatika Doxorubicin, Cisplatin, Melphalan und Arsentrioxid

4.1 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Doxorubicin

In doxorubicinresistenten Brusttumorzellen werden Glutathion-Peroxidasen und -Transferasen übermäßig exprimiert. Insgesamt zeigen resistente Zellen eine Toleranzentwicklung gegen Superoxide (Mimnaugh et al. 1989).

Für die MCF-7-Linie konnte gezeigt werden, dass Resistenzen gegen Doxorubicin mit einem gesteigerten Oxyradikalabbau zusammenhängen (Sinha et al. 1990).

Zudem verändert eine vermehrte GST-Genexpression z.B. in Brustkarzinomzellen die Resistenzlage von Doxorubicin (Moskow et al. 1989; Nakagawa et al. 1990).

Eine erhöhte Kapazität für die Detoxifikation von Oxyradikalen in Form eines 2fachen Anstiegs der GSH-Peroxidase-Konzentration führt zu einer Doxorubicinresistenz von humanen Leukämiezellen (HL-60-R) (Raghu et al. 1993).

Die Aktivität des GSH-RedOx-Systems ist für das Outcome nach Doxorubicinbehandlung wichtig. Je geringer die Aktivität, desto effektiver ist das Medikament (Kauvar et al. 1998). Dass insbesondere die GST Einfluss auf die Wirksamkeit von Doxorubicin hat konnte in Versuchen an Kolon-Ca-Zellen nachgewiesen werden (Niitsu et al. 1998).

Nach Studienlage ist die hemmende Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System eine Möglichkeit die Wirksamkeit des Doxorubicins zu steigern.

4.2 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Cisplatin

Cisplatinresistente Ovarial-Ca-Zellen weisen im Vergleich zu sensiblen Zellen erhöhte GSH-Spiegel auf (Hamilton et al. 1985). In Ovarialkarzinomzellen zeigt sich, dass eine hohe Cisplatinresistenz mit einem deutlichen Anstieg der zellulären GSH-Synthese assoziiert ist (Godwin et al. 1992).

Der Schutz einer V79-Lungentumorzelle vor Alkylierung hängt direkt von der GST ab (Townsend et al. 1998). In Versuchen an Kolon-Ca-Zellen konnte nachgewiesen werden, dass die GST für die Wirksamkeit von Cisplatin wichtig ist (Niitsu et al. 1998). Das Ausmaß der Resistenz von Kolon- bzw. Ovarialkarzinomzellen gegen Cisplatin hängt direkt mit dem GSH-RedOx-System zusammen. So wurden in cisplatinresistenten Kolonkarzinomzellen erhöhte GST-Spiegel nachgewiesen (Goto et al. 1999).

Die Aktivität des GSH-RedOx-Systems scheint für das Outcome nach Cisplatintherapie relevant. Je geringer die Aktivität, desto effektiver ist das Medikament (Kauvar et al. 1998).

Gegensätzlich stellte sich in Arbeiten an Brustkarzinomzellen heraus, dass eine vermehrte GST-Genexpression die Resistenzlage alkylierender Medikamente nicht beeinflusst (Moskow et al. 1989; Nakagawa et al. 1990).

Die einschlägige Literatur liefert Hinweise, dass möglicherweise durch eine hemmende Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System die Wirksamkeit von Cisplatin moduliert werden kann.

4.3 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Melphalan

In melphalanresistenten Leukämiezellen lassen sich höhere GSH-Konzentrationen als in sensiblen Zellen nachweisen. Ein Absenken führt zu einer Resistenzaufhebung (Vistica

et al. 1970). Gleiches gilt für melphalanresistente Ovarial-Ca-Zellen. Auch in ihnen lassen sich höhere GSH- Spiegel im Vergleich zu sensiblen Zellen messen (Hamilton et al. 1985). Wie schon für Cisplatin festgestellt hängt der Schutz einer V79-Lungentumorzelle vor Alkylierung direkt von der GST ab (Townsend et al. 1998). Im Einklang mit diesem Ergebnis konnte in Versuchen an Kolon-Ca-Zellen nachgewiesen werden, dass die GST für die Wirksamkeit von Melphalan eine Rolle spielt (Niitsu et al. 1998).

Wie schon für Doxorubicin und Cisplatin festgestellt, gilt auch für Melphalan, dass die Aktivität des GSH-RedOx-Systems für das Outcome nach Melphalanbehandlung wichtig ist. Je geringer die Aktivität, desto effektiver ist das Medikament (Kauvar et al. 1998).

Gegensätzlich zu den zitierten Studien konnte in Brustkarzinomzellen festgestellt werden, dass eine vermehrte GST-Genexpression die Resistenzlage bezüglich alkylierender Medikamente nicht beeinflusst (Moskow et al. 1989; Nakagawa et al. 1990).

In der Zusammenschau ergeben sich Hinweise, dass durch eine, die Aktivität verringernde Modulation des GSH-RedOx-Systems die Wirksamkeit des Melphalans verbessert werden kann.

4.4 Oxyradikalentgiftung als Resistenzmechanismus gegen Arsenitoxid

Die As_2O_3 -induzierte Apoptoserate korreliert in Neuroblastomzellen invers mit dem intrazellulären GSH-Gehalt (Dai et al. 1999). Dementsprechend konnte in einer weiteren Studie in 7 von 10 Neuroblastomzelllinien mit $2 \mu\text{Mol } As_2O_3$ ein Apoptosevorgang ausgelöst werden. Die drei anderen Zelllinien besaßen die höchsten GSH-Spiegel (Akao et al. 1999). In As_2O_3 -resistenten Rattenleberepithelien konnte eine erhöhte Genexpression der GST festgestellt werden (Liu et al. 2001). Im Einklang mit diesen Studien lässt sich an Kolonkarzinomzellen beobachten, dass eine hohe Aktivität des GSH-RedOx-Systems vor Apoptose schützt (Nakagawa et al. 2002).

Die Studienlage lässt vermuten, dass die hemmende Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System die As₂O₃-Wirkung verstärken kann.

5 Die Oxyradikalentgiftung durch Glutathion (GSH)

Oxyradikale entstehen unter anderem bei der Verstoffwechslung von Medikamenten und zerstören Moleküle oxidativ. Die intrazelluläre Entgiftung von Oxyradikalen erfolgt hauptsächlich durch das GSH-RedOx-System (siehe Abb.: A). GSH ist ein Tripeptid, dessen Synthese enzymkatalysiert unter Verbrauch von zwei ATP-Molekülen stattfindet. Glycin, Glutamat und Cystein stellen die Ausgangssubstanzen dar. Die geschwindigkeitsbestimmenden sowie der Feedback-Hemmung zugängigen Stellen der Synthesekaskade sind die Cysteinkonzentration und die γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase (γ -GCS). Die Sulfhydrylgruppe bestimmt die Funktion des GSH. Sie ermöglicht unter anderem die o.g. Entgiftung von Oxyradikalen.

Für die Entgiftung eines Teils Wasserstoffperoxid als Oxyradikal werden zwei Teile Glutathion, das zu 98 % in reduzierter Form vorliegt, und die GSH-Peroxidase benötigt. Unter ihrer Einwirkung entstehen zwei Teile Wasser sowie ein Teil oxidiertes Glutathion (Glutathiondisulfid – GSSG). Das entstandene GSSG kann unter Verwendung von NADPH + H⁺, das aus dem Pentosephosphatweg stammt, und der Glutathiondisulfidreduktase (GSSG-Reduktase) regeneriert werden. Endprodukt und neuer Ausgangspunkt sind zwei Teile Glutathion und ein Teil NADP⁺, welches wieder in den Pentosephosphatweg eingeht. Läuft diese Entgiftung nicht ab, kommt es zu einer oxidativen Zerstörung von Molekülen und somit von Zellbestandteilen. Das GSH-RedOx-System schützt neben Enzymen, Proteinen und dem Hämoglobin insbesondere die DNA vor Oxyradikalen.

Das GSH-RedOx-System (siehe Abb.: A) als ein zellulärer Entgiftungsmechanismus von Oxyradikalen spielt auch für die Chemotherapieresistenzentwicklung eine wichtige Rolle.

Wie oben erwähnt konnte an Leukämiezellen von Mäusen gezeigt werden, dass zelluläre Resistenzen zumindest teilweise mit reduzierten Oxyradikalspiegeln zusammenhängen (Xu et al. 1992). Erhöhte GSH-Spiegel in humanen Leukämiezellen führen zu einer verstärkten Detoxifikation von freien Radikalen. Das Resultat ist eine Medikamentenresistenz zum Beispiel gegenüber Doxorubicin (Raghu et al. 1993).

Um den Faktor 3,3 erhöhte GSH-Konzentrationen und gesteigerte Glutathion-S-Transferase-(GST-)Aktivitäten führen zu 30fach cisplatinresistenteren Leukämie- und Hodentumorzellen (Gosland et al. 1996).

Hinzu kommt, dass die GST in Tumorzellen häufig von vornherein überexprimiert ist. Dies wurde für Ovarial-Ca- oder auch Basalzell-Ca-Zellen nachgewiesen (Strange et al. 1998). Übersichtsarbeiten zeigten, dass hohe GSH-Spiegel die Effektivität unter anderem von Cisplatin und Melphalan bis hin zu einer kompletten Resistenzentwicklung einschränken können (Calvert et al. und Chen et al. 1998).

Es konnte beobachtet werden, dass der Abbau von GSH in Kolonkarzinomzellen zu einem Anstieg der Wirksamkeit von Arsentrioxid führt. Eine hohe Aktivität des GSH-RedOx-Systems senkt hingegen dessen Zytotoxizität (Nakagawa et al. 2002).

Zuvor wurde bereits festgestellt, dass der Anstieg von GSH-Konjugaten, z.B. mit Arsen, in Rattenleberepithelzellen Anteil an einer erworbenen Toleranz hat (Liu et al. 2001).

Folglich kann ein aktives GSH-RedOx-System Zellen vor der Wirksamkeit von oxyradikalbildenden Medikamenten durch verstärkte Detoxifikation der Oxyradikale schützen. Eine mögliche Konsequenz ist aber die Entwicklung einer Resistenz gegen Chemotherapeutika mit hauptsächlich diesem Wirkmechanismus.

Somit könnte ein Ansatzpunkt für die Überwindung von Resistenzen die pharmakologische Modulation des GSH-Systems sein. Das Ziel wäre, die Empfindlichkeit, insbesondere von Tumorzellen gegenüber oxyradikalbildenden Zytostatika, wie sie in der Therapie des Neuroblastoms eingesetzt werden, zu steigern.

6 Möglichkeiten der Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System

Um Einfluss auf das GSH-RedOx-System nehmen zu können, ist es wichtig mögliche Ansatzpunkte für Medikamente innerhalb dieses Systems zu kennen.

Zwei pharmakologisch bereits eingeführte Substanzen, deren Ansatzpunkte eine Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System ermöglichen, sind das Buthioninsulfoxamid (BSO) und die Ethacrynsäure (EA).

6.1 Einfluss von BSO auf das GSH-RedOx-System

Bei BSO handelt es sich um einen Chemosensitizer bezüglich aller über GSH zu detoxifizierenden Substanzen. Es hemmt die γ -GCS spezifisch und kompetitiv, was zu einer Verminderung der GSH-Konzentration führt (Abb.: B).

Dieser Zusammenhang wurde in Studien der 80er-Jahre *in vitro* und *in vivo* gezeigt (P.A. Andrews et al., R.A. Kramer et al., S. Somfai- Relle et al., R.F. Ozols et al.).

In Versuchen an Melanomzellen bestätigten sich diese Beobachtungen. Unter Einwirkung von 10 μ Mol BSO wurde ein vollständiger Abfall des GSH-Spiegels innerhalb von 24 Stunden erreicht. Dieser Effekt hielt bis zur 72. Stunde an (J.P. Fruehauf et al. 1998). An Leberzellen zeigte sich, dass Sulfoxamide in der Lage sind, die intrazelluläre GSH-Konzentration effektiv zu senken. BSO war das am wenigsten toxische und spezifischste aller Analoga (Griffith et al. 1982).

Hinsichtlich der von uns eingesetzten Zytostatika konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden.

So ließen sich doxorubicinresistente HL-60-R-Leukämiezellen partiell durch die kombinierte Gabe von Doxorubicin mit BSO sensitivieren (Raghu et al. 1993). An doxorubicinresistenten Lungen-Ca-Zellen gelang es durch BSO-Vorbehandlung die Resistenz aufzuheben (Zaman et al. 1995).

Gegensätzlich zu diesen Beobachtungen zeigte sich an einer malignen Gliomzelllinie, dass eine BSO-vermittelte GSH-Depletion die Wirksamkeit von Doxorubicin nur gering verbessert (Roller et al. 1998). Dies könnte darauf hinweisen, dass Doxorubicin und Chemosensitizer in verschiedenen Zellsystemen durchaus unterschiedlich reagieren.

Auch an humanen Promonocytenzellen konnte kein zusätzlicher Effekt von BSO auf die Doxorubicinwirksamkeit festgestellt werden (Troyano et al. 2001).

Für Melphalan zeigte sich, dass in vivo in peripheren mononukleären Zellen nach kombinierter Gabe von Melphalan mit BSO z.T. GSH-Konzentrationsabfälle von bis zu 90 % zu beobachten sind (Gosland et al. 1996).

Eine Kombination von Melphalan bzw. Cisplatin mit BSO führte an humanen Melanomzellen zu einem synergistischen Effekt im Vergleich zur Einzelgabe nach 24stündiger Vorinkubation des BSOs (Fruehauf et al. 1998).

Auch an metastasierten Melanomzellen konnte ein Absinken des GSH-Spiegels unter Inkubation von Melphalan und BSO gemessen werden. Der Spiegelabfall war in den Tumorzellen stärker ausgeprägt als in gesunden Zellen (Chen et al. 1998).

Im Einklang damit wurde an humanen Promonocytenzellen gezeigt, dass die Kombination der Alkylantien Cisplatin und Melphalan mit BSO zu einem Anstieg ihrer Wirksamkeit führt. Eine verstärkte Peroxidakkumulation wurde beobachtet (Troyano et al. 2001).

Im Gegensatz zu diesen Studien konnte an einer Gliomzelllinie kein wirksamkeitssteigernder Effekt von BSO auf Cisplatin festgestellt werden (Roller et al. 1998). Dies könnte, wie für Doxorubicin oben angemerkt, darauf hinweisen, dass die Alkylantien und Chemosensitizer in verschiedenen Zellsystemen durchaus unterschiedlich reagieren.

Bezüglich des eingesetzten As_2O_3 konnte an Rattenleberzellen, die eine Toleranz gegenüber As_2O_3 entwickelt hatten, gezeigt werden, dass diese unter BSO-Exposition wieder sensibilisiert werden können. Zellulär kam es darunter zu einer verstärkten Arsenakkumulation (Liu et al. 2001).

An Kolonkarzinomzellen (SW 480) wurde beobachtet, dass vor As_2O_3 verabreichtes BSO zu einer Verbesserung der Apoptoserate führt (Nakagawa et al. 2002). Versuche mit Nierenzellkarzinomzellen, auf die As_2O_3 in klinisch anwendbaren Dosen keinen signifikant toxischen Einfluss hatte, erbrachten das Ergebnis, dass in Kombination mit BSO eine Wirkungssteigerung von bis zu 45 % zu erreichen ist. Ein deutlicher GSH-Spiegelabfall war unter der BSO-Einwirkung messbar (Wu et al. 2004).

Zwischen 1989 und 1996 wurde mittels klinischer Studien die gute Verträglichkeit des BSOs verifiziert. Übelkeit und Erbrechen waren die vorrangig zu beobachtenden Ne-

benwirkungen (Bailey et al. 1998). Das macht dieses Medikament klinisch gut einsetzbar.

Nach Studienlage scheint BSO im Falle der von uns eingesetzten Chemotherapeutika eine effiziente Möglichkeit zu sein, hemmend auf das GSH-RedOx-System einzuwirken.

6.2 Einfluss der EA auf das GSH- RedOx- System

Die EA ist ursprünglich ein Schleifendiuretikum. EA wird nach Aufnahme in eine Zelle spontan oder von der GSH-S-Transferase (GST) katalysiert mit GSH konjugiert.

Das EA-GSH-Konjugat (EA-SG) wird mittels des MR-Proteins, einem Mitglied der ABC-Transporter-Familie, aus der Zelle geschleust (Abb.: B).

Die Bindungsrate ist sehr hoch (Sato et al. 1995). Nur ca. 5 % wird intrazellulär anderweitig metabolisiert (Tirona 1999).

Diese hohe Affinität der EA zu der GST und die daraus resultierende sinkende Verfügbarkeit der GST für die Unterstützung der Detoxifikation anderer Substanzen, wie zum Beispiel Oxyradikalen, macht es als Modulator des GSH-RedOx-Systems interessant.

Die GST katalysiert jede nicht spontan ablaufende Konjugation elektrophiler Substanzen oder von Produkten oxidativen Stresses mit GSH.

Im Endeffekt handelt es sich bei der EA um einen reversiblen Inhibitor der GST. Zusätzlich senkt es durch Verbrauch den GSH-Spiegel einer Zelle.

Studien konnten in der Vergangenheit die Einflussnahme der EA auf die GST und deren Anteil an Resistenzentwicklungen verifizieren. Ein direkter Zusammenhang zwischen der EA und dem GSH-RedOx-System zeigte sich an Kolonkarzinomzellen. Waren diese gegen EA resistent geworden, ließen sich erhöhte GST- und GSH-Spiegel messen (K.D. Tew et al. 1998).

Bezüglich der von uns eingesetzten Zytostatika wurde ebenfalls 1998 von der wichtigen Rolle, die die GST bei der Resistenzbildung gegen Cisplatin und Melphalan aber auch gegen Doxorubicin spielt, berichtet. In einem Versuch an Kolonkarzinomzellen schützte ein hoher GST-Anteil vor der Zytotoxizität dieser Medikamente. Diese Ergebnisse bestätigten sich in Versuchen an Nacktmäusen (Y. Niitsu et al. 1998).

An kleinzelligen Lungenkarzinomzellen zeigte sich, dass die kombinierte Gabe von EA und Doxorubicin an doxorubicinresistenten Zellen eine Verringerung der Ausschleusungsrate des Zytostatikums zur Folge hat. Die Wirksamkeit von Doxorubicin konnte so gesteigert werden (Awasthi et al. 1996).

Dass der zelluläre Schutz vor Alkylierung und damit vor Medikamenten wie Melphalan und Cisplatin in V79-Zellen direkt über die GST erfolgt, konnte 1998 gezeigt werden (Townsend et al. 1998). Im Einklang mit diesen Studien war in einer Versuchsreihe an Ovarial- bzw. Kolonkarzinomzellen der Grad der Cisplatintoxizität vom GST-Level abhängig. Je höher dieses Level, desto resistenter verhielten sich Zellen Cisplatin gegenüber. In Kombination mit EA konnte bei diesen Versuchen ein Absinken der GST-Spiegel in vitro und in vivo beobachtet werden. Das verstärkte die Cisplatinwirksamkeit (Goto et al. 1999). Für Melphalan konnte festgestellt werden, dass die EA in vitro und in vivo die Wirksamkeit unter anderem in Lungenkarzinomzellen steigern kann.

Die Cisplatinwirksamkeit ließ sich in diesen Zellen aber nicht beeinflussen (Gosland et al. 1996). Kongruent konnte an Ratten nachgewiesen werden, dass EA den zytotoxischen Effekt von Melphalan steigern kann (Mulder et al. 1997). Gegensätzlich hierzu aber im Einklang mit Gosland et al. in Bezug auf Cisplatin hatte die EA 1994 in einer anderen Studie an Brustkarzinomzellen keinen Einfluss auf die Wirksamkeit von Cisplatin und Melphalan gezeigt (Chen et al. 1994).

Dies könnte, wie auch für BSO oben angemerkt, darauf hinweisen, dass die Alkylantien und in diesem Fall die EA in verschiedenen Zellsystemen durchaus unterschiedlich reagieren.

Rattenleberzellen, die eine Toleranz gegenüber As_2O_3 entwickelt hatten, zeigten erhöhte GST-Expressionen. EA konnte die Zytotoxizität steigern (Liu et al. 2001).

Nach den zitierten Beobachtungen stellt sich für uns die Frage, ob BSO und die EA einzeln oder kombiniert in der Lage sind, die Empfindlichkeit von Zellen der LA-N-1-Linie gegen Oxyradikalbildner zu erhöhen und somit deren Wirksamkeit an diesen Zellen zu verbessern.

In der vorliegenden Arbeit soll diese Fragestellung für die Substanzen Doxorubicin, Cisplatin, Melphalan und Arsentrioxid an der LA-N-1-Zelllinie überprüft werden.

III Material

1 Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine humane Neuroblastomzelllinie genutzt. Es handelt sich dabei um die LA- N- 1- Linie. Erstmals in Kultur genommen wurde diese Zelllinie 1977 von R. C. Seeger im Children's Hospital in Los Angeles, USA.

Für diese Arbeit wurden uns die Zellen freundlicherweise von Herrn Guido Looft aus der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Erttmann aus der Universitätsklinik Eppendorf in Hamburg zur Verfügung gestellt.

2 Verwendete Medikamente

2.1 Zytostatika

2.1.1 Doxorubicin

– Anthracyclin-Derivat –

Hersteller: Pharmacia GmbH; Karlsruhe

Wirkmechanismus: Elektronenakzeptor (begünstigt Oxyradikalbildung)

DNA: interkalierend

Topoisomerase-II-Hemmung

Formel: $C_{27}H_{29}NO_{11}$

MG: 579 g/l

2.1.2 Cisplatin

– Platinkomplexverbindung; Zugehörigkeit: Alkylantien –

Hersteller: Hexal AG; Holzkirchen;

Wirkmechanismus: Oxyradikalbildung
DNA- Replikationshemmung

Formel: $\text{cis-Pt(II)(NH}_3)_2\text{Cl}_2$

MG: 300 g/l

2.1.3 Melphalan

– Stickstofflostverbindung; Zugehörigkeit: Alkylantien –

Hersteller: GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG; München;

Wirkmechanismus: Oxyradikalbildung
Alkylierung der Nukleinsäuren

Formel: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$

MG: 305 g/l

2.1.4 Arsentrioxid

– Arsenverbindung –

Hersteller: Cell Therapeutics, Inc.; Seattle, WA 98119

Wirkmechanismus: Oxyradikalbildung

Formel: As_2O_3

MG: 198 g/l

2.2 Diuretika

Ethacrynsäure

– Schleifendiuretikum –

Hersteller: Sigma-Aldrich
Steinheim, Deutschland

Wirkmechanismus: Reversible Hemmung des $\text{Na}^+ 2\text{Cl}^- \text{K}^+$ -Carrier im aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife von luminal;
reversibler Inhibitor der GST;
Reduktion des GSH-Spiegels

Wirkstoff: 2,3-Dichloro-4-(2-methylen-ebutyryl-) phenoxy-acetic-acid

Formel: $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{O}_4$

MG: 303 g/l

2.3 Chemosensitizer

Buthioninsulfoxamid

Hersteller: Sigma-Aldrich
Steinheim, Deutschland

Wirkstoff: Buthioninsulfoxamid

Wirkmechanismus: Hemmung der γ -GCS

Formel: $C_8H_{18}SO_3N_2$

MG: 222 g/l

3 Geräte

G1) Sterile Werkbank Class II, Type A/B 3 (Nuair Biological Safety Cabinets)

G2) Kühl-Gefrier-Kombination, KGE 3411 (Bosch)

G3) Begasungsbrutschrank B5060 EK- CO2 (Heraeus)

G4) Tisch-Zentrifuge Rotanta 96 R (Hettich)

G5) 96-Well-Platten Reader, Anthos htIII (Anthos)

G6) Mikroskop 47 30 50- 9901 (Zeiss)

G7) Aufsichtmikroskop Wilovert A (Hund)

| | |
|--|--------------------------|
| G8) Spektrophotometer | (Anthos) |
| G9) Whirler REAX 2000 | (Heidolph) |
| G10) Akku-Pipetos Classic | (Hirschmann Laborgeräte) |
| G11) Wasserbad | (GFL) |
| G12) Neubauer-Zählkammer | (Assistent) |
| G13) Zellkulturflaschen, Cellstar 175 cm ² , 650 ml | (Greiner Bio- One) |
| G14) Cryo Tube, Cellstar 1,8 ml | (Greiner Bio- One) |
| G15) PP-Test tubes, Cellstar 50 ml | (Greiner Bio- One) |
| G16) Conical Tube, Falcon Blue Max(tm) jr., 15 ml | (Becton Dickinson) |
| G17) 500 PP- Microcentrifuge tube, 1,5 ml | (Greiner Bio- One) |
| G18) Pipetten, Falcon 10 ml | (Becton Dickinson) |
| G19) Pipettenspitzen I, Biosphere Filter Tips 100/200/1000 µl | (Sarstedt) |
| G20) Pipettenspitzen II, Biopur, 2500 µl | (Eppendorf) |
| G21) 96-Well-Platten, Cellstar | (Greiner Bio- One) |
| G22) 6-Well-Platten, Nunclon Surface | (Nunc A/S) |

4 Reagenzien

| | |
|--|-------------------------|
| R1) RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin, 500 ml | (Gibco SCO) |
| R2) Fetales Kälberserum, 500 ml | (Gibco SCO) |
| R3) Penicillin-Streptomycin Solution, 100 ml (10000 U/ml Penicillin G und 10000 µg/ml Streptomycin in 0,85 %iger Saline) | (Gibco SCO) |
| R4) MEM- Natrium- Pyruvat (100 mMol), 100 ml | (Gibco SCO) |
| R5) Trypsin/ EDTA (0,5 g/L Trypsin und 0,2 g/L EDTA in PBS) | (PAA Laboratories GmbH) |
| R6) Stop Mix, 500 ml | (Promega) |
| R7) Dye Solution, 75 ml | (Promega) |
| R8) Aqua bidest | (UKE) |
| R9) Trypan blau (5 %ig) | (Gibco SCO) |
| R10) Waschlösung | (Gibco SCO) |

5 Herstellernachweis

| | |
|--|---|
| Anthos | Krefeld, Deutschland |
| Assistent | Sondheim, Deutschland |
| Becton Dickinson | Le Pont De Claix bzw. Meylan Cedex, Frankreich |
| Bosch | Stuttgart, Deutschland |
| CALBIOCHEM | Darmstadt, Deutschland |
| Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| GFL- Gesellschaft für Labortechnik mbH | Burgwedel, Deutschland |
| Gibco SCO | Paisley, Schottland |
| Greiner Bio- One | Frickenhausen, Deutschland |
| Heidolph | Schwabach, Deutschland |
| Heraeus | Hannover, Deutschland |
| Hettich | Tuttlingen, Deutschland |
| Hirschmann Laborgeräte | Eberstadt, Deutschland |
| Hund | Wetzlar, Deutschland |
| Nuaire Biological Safety Cabinets | Plymouth, USA |

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Nunc A/S | Roskilde, Dänemark |
| PAA Laboratories GmbH | Pasching, Österreich |
| Promega | Madison, USA |
| Sarstedt | Nümbrecht, Deutschland |
| Sigma- Aldrich | Steinheim, Deutschland |
| UKE | Hamburg, Deutschland |
| Zeiss | Jena, Deutschland |

IV Methoden

1 Kultivierung der Zellen

1.1 Stammkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Neuroblastomzelllinie genutzt. Es handelt sich dabei um die LA-N-1-Linie

(humanes Neuroblastom; 1977 R. C. Seeger; Children's Hospital Los Angeles).

Angezüchtet wurden die Zellen in 100 ml Medium (RPMI 1640 + L-Glutamine, + 1 % Penicillin-Streptomycin + 1 % Pyruvat + 10 % fetales Kälberserum) in Zellkulturflaschen.

Dort verblieben sie abwechselnd über 192 bzw. 144 Stunden in einem Begasungsbrutschrank (37 °C; 5 % CO₂), damit die Zellen am Flaschenboden anwachsen und sich vermehren konnten. Im Anschluss wurde der Überstand dekantiert, die am Flaschenboden angewachsenen Zellen mit 10 ml Waschlösung gewaschen und mit Hilfe von 5 ml Trypsin (5 %ig) abgelöst. Die so gelösten Zellen wurden einschließlich des Trypsins mit 10 ml Medium aufgenommen und bei 20 °C und einer Gravitationszahl von 130 bzw. 950 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit Medium aufgenommen und gefünfelt in 100 ml Medium weiterkultiviert.

Wenn die so gezüchteten Zellen die exponentielle Wachstumsphase erreichten, konnten sie für Versuche eingesetzt werden.

1.2 Zellen für die Experimente

War am Boden einer Zellkulturflasche ein dichter Zellteppich gewachsen, konnten diese Zellen abgeerntet und für Versuche eingesetzt werden.

Dafür wurde erneut zunächst der Überstand aus den Zellkulturflaschen dekantiert, der Flaschenboden mit 10 ml Waschlösung gewaschen und die Zellen mittels 5 ml Trypsin (5 %ig) gelöst, um im Anschluss in 10 ml Medium aufgenommen zu werden.

Aus dieser 15 ml umfassenden Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und in eine 1:10 Verdünnung mit TrypanBlau überführt. In einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellanzahl unter einem Mikroskop bei einer 125fachen Vergrößerung ausgezählt.

Der Rest der Suspension wurde unter oben genannten Bedingungen fünf Minuten lang zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mittels Medium auf die für die Versuche gewünschte Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml verdünnt.

2 Experimente

2.1 Dosis- Wirkungskurven

Um die mittleren inhibierend wirkenden Dosierungen der Zytostatika auf die LA-N-1-Zelllinie zu ermitteln, wurden Dosis-Wirkungskurven angefertigt. Wir wollten sowohl wirksamkeitshemmende als auch -steigernde Auswirkungen der eingesetzten Substanzen feststellen können.

Die Verdünnungen erfolgten mit RPMI 1640 Medium.

Der vorbereiteten Zellsuspension – 2×10^5 Zellen/ml – wurde die jeweils zu testende Konzentration an Zytostatika zugegeben und über 48 Stunden in einem Begasungsbrutschrank (37 °C; 5 % CO₂) inkubiert.

Beispielhaft sei die Dosis-Wirkungskurve von Doxorubicin an der LA-N-1-Zelllinie abgebildet (Abb. 1). Auf der y-Achse wurden die überlebenden Zellen in ganzen Zahlen aufgetragen. Der x-Achse ist die eingesetzte Doxorubicinkonzentration zugeordnet. Es wurden die überlebenden Zellen als Absolutwert in Abhängigkeit der eingesetzten Doxorubicinkonzentration aufgetragen.

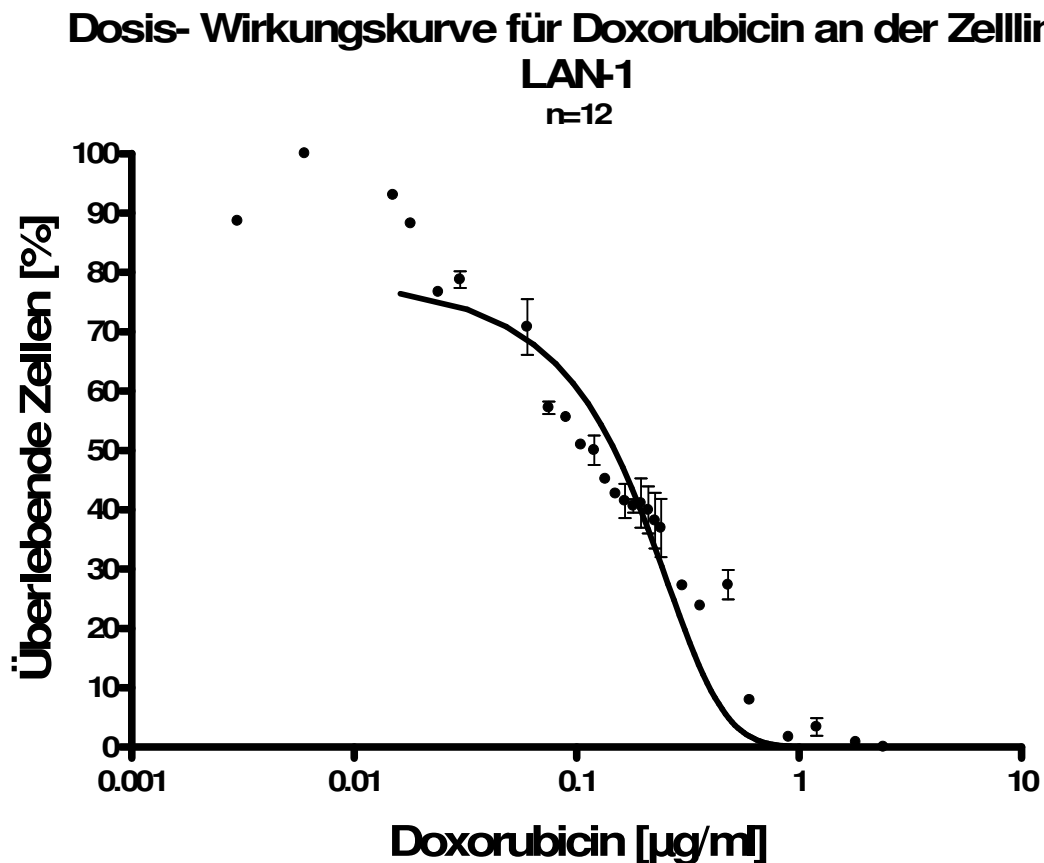


Abb.1: Die Inkubationszeit des Doxorubicins betrug 48 Stunden. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten +/- Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils $n = 4$. Angegeben sind die im Anschluss lebenden Zellen in Prozent auf der y-Achse. Die jeweils eingesetzte Doxorubicin- Konz. ist auf der x-Achse aufgetragen.

Aus diesem Graphen ergibt sich die inhibitorische Dosis 50 % – ID50 – von Doxorubicin. Die Versuche, die zu der dargestellten Dosis-Wirkungskurve für Doxorubicin führten, weisen insgesamt ein n von 12 auf. Es zeigten sich ID50-Schwankungen zwischen $0,12 \mu\text{g/ml}$ und $0,22 \mu\text{g/ml}$. Um im Rahmen der Versuche sowohl hemmende als auch steigernde Effekte sicher sehen zu können, entschieden wir uns dafür die Konzentration unterhalb der niedrigsten ermittelten ID50 zu wählen und setzten für die Versuche $0,09$

µg/ml ein. Im Falle von Cisplatin traf dies für 2490 ng/ml, von Melphalan für 0,12 mg/ml und von Arsentrioxid für 0,3 mg/l zu. Die zum Teil stark schwankende Prozentzahl der Zellen nach Inkubation mit dem jeweiligen Zytostatikum in unseren Versuchen an Zellkulturen deutete sich bereits bei der Erstellung der Dosis-Wirkungskurven an und schwächt die Reproduzierbarkeit.

2.2 Proliferationsassays mit Zytostatika unter dem Einfluss von Buthioninsulfoxamid (BSO)

Das BSO wurde mittels RPMI 1640 Medium auf die für den Versuch gewünschte Konzentration verdünnt.

Mit dieser Lösung wurde eine Zellsuspension von 2×10^5 Zellen/ml über vier Stunden im Begasungsbrutschrank (37 °C; 5 % CO₂) vorinkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Zytostatikums in einer zuvor definierten Konzentration. Die weitere Inkubationszeit betrug 44 Stunden.

2.3 Proliferationsassays mit Zytostatika unter dem Einfluss von Ethacrynsäure (EA)

Die Ethacrynsäure wurde mit RPMI 1640 Medium auf die zu untersuchenden Konzentrationen verdünnt.

Die Vorinkubationszeit der Ethacrynsäure mit der Zellsuspension (2×10^5 Zellen/ml) betrug eine Stunde.

Dieser Ansatz wurde im Anschluss für weitere 47 Stunden unter Zugabe einer definierten Zytostatikakonzentration inkubiert (37 °C; 5 % CO₂).

2.4 Proliferationsassays mit Zytostatika unter dem Einfluss der Kombination von Ethacrynsäure mit Buthioninsulfoxamid (EA + BSO)

Alle Verdünnungen auf die einzusetzenden Konzentrationen wurden mit RPMI 1640 Medium hergestellt.

Die oben genannten Vorinkubationszeiten wurden eingehalten. Den Zellsuspensionen (2×10^5 Zellen/ml) wurde zunächst das BSO zugegeben. Nach drei Stunden Vorinkubation erfolgte die Zugabe der Ethacrynsäure und eine weitere Stunde später die der Zytostatika. Im Anschluss wurden die entstandenen Ansätze 44 Stunden im Begasungsbrutschrank (37 °C ; 5% CO_2) inkubiert.

3 Auswertung

Für die Auswertung wurde das Produkt „CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay“ der Firma Promega verwendet. Allen auszuwertenden Ansätzen wurde eine darin enthaltene Lösung (Dye Solution) zugeführt, deren Inkubationszeit vier Stunden im Begasungsbrutschrank (37 °C ; 5% CO_2) betrug. Diese Dye Solution enthält eine Tetrazolium-Komponente, die von lebenden Zellen in ein Formazanprodukt überführt werden kann.

Im Anschluss wurde diese Reaktion durch Zugabe einer in dem Produkt enthaltenen „Stopplösung“ unterbrochen. Diesem Vorgang wurde zwei Stunden Zeit gegeben.

Die Formazankonzentration wurde direkt photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Formazankonzentration verhält sich proportional zu der Zahl der überlebenden Zellen.

Für die Berechnung einer Eichkurve wurden vier unterschiedlich konzentrierte Zellsuspensionen (2×10^6 Zellen/ml, 2×10^5 Zellen/ml, 2×10^4 Zellen/ml, 2×10^3 Zellen/ml) hergestellt. Jeder dieser Suspensionen konnte eine Absorption zugeordnet werden. Alle anschließend gemessenen Absorptionen wurden mittels der so entstandenen Kurve eingeordnet und einer ganzen Zahl überlebender Zellen zugeordnet (Abb. 2).

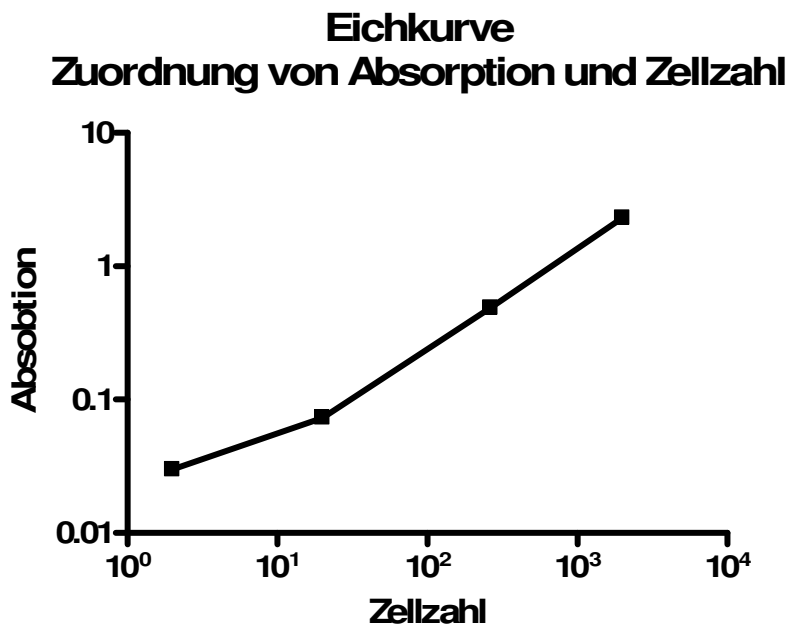


Abb.2: Diese Abbildung zeigt die resultierende Eichkurve. Auf der y-Achse ist die Absorption, auf der x-Achse die zuzuordnende Zellzahl in ganzen Zahlen aufgetragen.

Um zu einer Aussage über die Signifikanz der Ergebnisse zu kommen, war eine statistische Auswertung notwendig. Eingesetzt wurde hierfür das Excel-Programm von Microsoft, GraphPad Prism sowie die Bücher „Angewandte Statistik- Anwendung statistischer Methoden“ von L. Sachs aus dem Springer-Verlag und das „Lehrbuch Statistik – Einstieg und Vertiefung“ von R. Leonhart aus dem Hans Huber Verlag.

Dazu gehörte die Berechnung der Mittelwerte und ihrer Standardabweichung gleicher Ansätze. Die Berechnung der P-Werte erfolgte mittels des Student-T-Tests. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt.

V Ergebnisse

1 Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin

Die Auswirkungen des Chemosensitizers BSO auf die Wirksamkeit von Doxorubicin sollte untersucht werden. Eingesetzt wurden 0,09 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin. Das liegt knapp unterhalb des Bereiches der ID50. Kombiniert wurde Doxorubicin mit 0,88 bzw. 2,2 $\mu\text{g/ml}$ BSO.

Die Ergebnisse zeigen, dass die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin ($P < 0,001$) durch die Kombination mit BSO nicht weiter gesteigert werden kann ($P = 0,063$ für 0,88 $\mu\text{g/ml}$ bzw. $P = 0,461$ für 2,2 $\mu\text{g/ml}$) (siehe Abb.3).

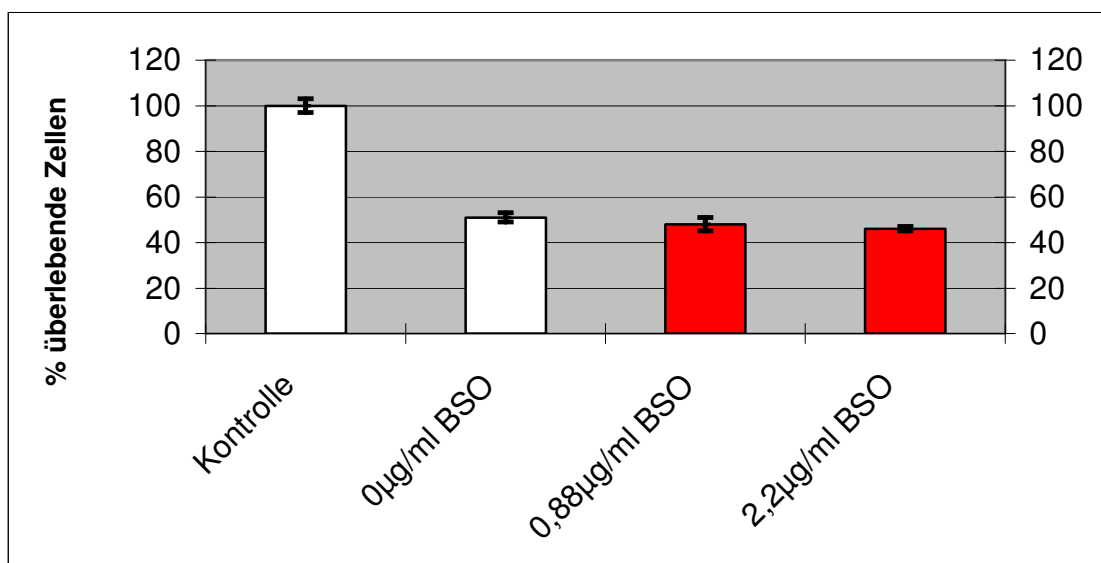


Abb.3: Die Konzentration der vier Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurden der dritte bzw. vierte Ansatz mit 0,88 bzw. 2,2 $\mu\text{g/ml}$ BSO über vier Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten, dritten und vierten Ansatzes mit 0,09 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin für weitere 44 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

2 Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin

Eingesetzt wurden 0,09 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin. Das liegt im Bereich der ID50.

Kombiniert wurde Doxorubicin mit 0,9 bzw. 9 $\mu\text{g/ml}$ EA. Der Einfluss von EA auf Doxorubicin sollte untersucht werden.

Aus der Versuchsreihe ergibt sich, dass der zytotoxische Effekt von Doxorubicin ($P = 0,001$) durch die Zugabe von 0,9 $\mu\text{g/ml}$ EA ($P = 0,057$) nicht signifikant gesteigert werden kann.

In Kombination mit 9 $\mu\text{g/ml}$ EA ($P = 0,001$) lässt sich die Wirksamkeit signifikant steigern (siehe Abb.4).

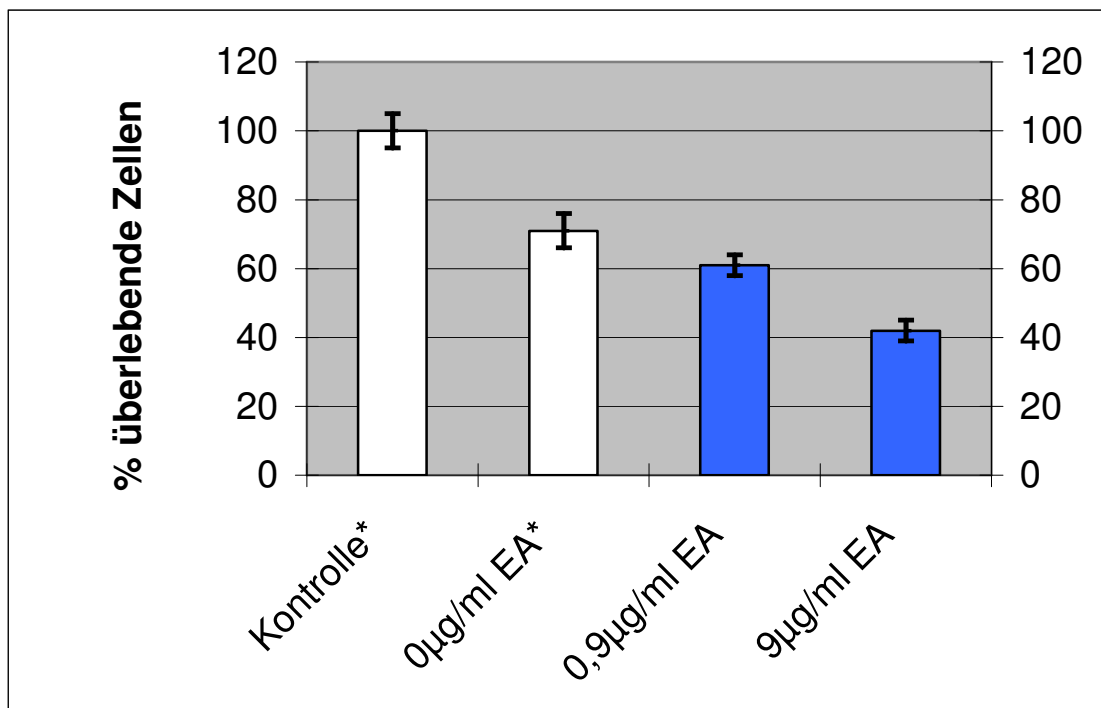


Abb.4: Die Konzentration der vier Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurden der dritte bzw. vierte Ansatz mit 0,9 bzw. 9 $\mu\text{g/ml}$ EA über eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten, dritten und vierten Ansatzes mit 0,09 $\mu\text{g/ml}$ Doxorubicin für weitere 47 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung aus $n = 8$ (*...: $n = 4$) Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

3 Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Doxorubicin

Der Einfluss einer Kombination von BSO und EA auf die Wirksamkeit von Doxorubicin sollte überprüft werden. Eingesetzt wurden 0,09 µg/ml Doxorubicin. Das liegt im Bereich der ID50. Zugegeben wurden 0, 3 bzw. 9 µg/ml EA in Kombination mit 0 bzw. 0,11 µg/ml BSO.

Der Einfluss von EA auf Doxorubicin (für 3 µg/ml: $P = 0,031$; nach 9 µg/ml Gabe: $P = 0,002$) lässt sich nicht durch die Zugabe von 0,11 µg/ml BSO signifikant modulieren. ($P = 0,227$ bzw. $P = 0,829$) (siehe Abb.5).

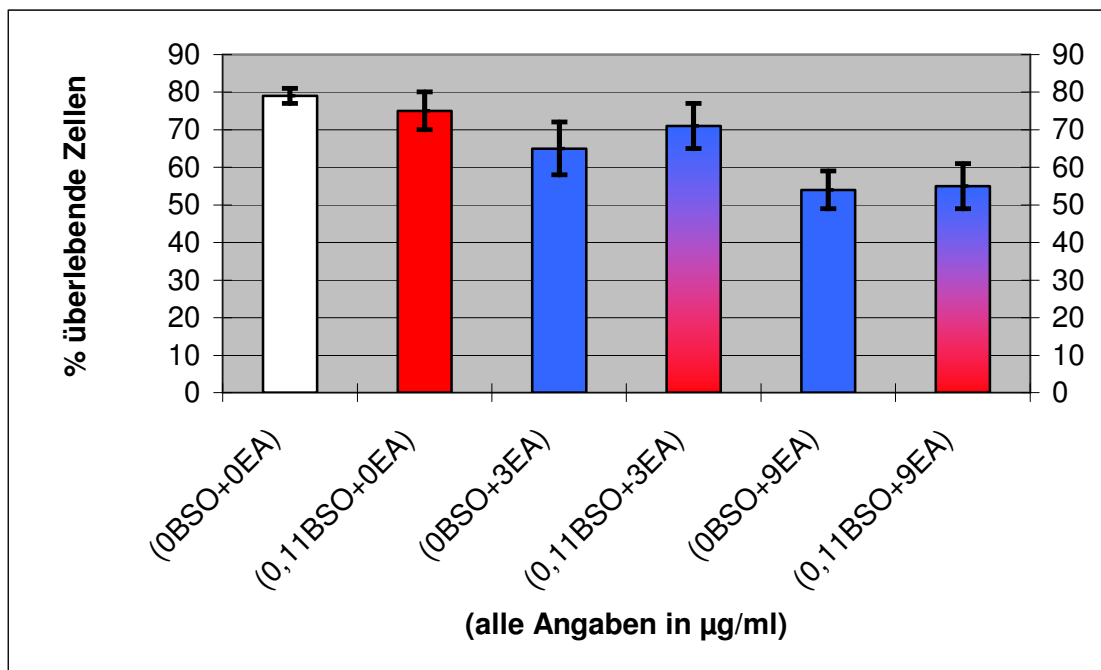


Abb.5: Die Konzentration der sechs Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. Dem zweiten, vierten und sechsten Ansatz wurden 0,11 µg/ml BSO zugeführt. Nach drei Stunden wurden die Ansätze drei und vier bzw. fünf und sechs mit 3 bzw. 9 µg/ml EA inkubiert. Eine weitere Stunde später erfolgte in allen Fällen die Koinkubation mit 0,09 µg/ml Doxorubicin für weitere 44 Stunden. Eine parallel gelaufene Kontrolle ohne Medikamentenzusatz wird hier aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm der Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebenden Zellzahlen in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (entspr. 100 %) an (y-Achse).

4 Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin

Die Auswirkungen des Chemosensitizers BSO auf die Wirksamkeit von Cisplatin sollte untersucht werden. Eingesetzt wurden 2500 ng/ml Cisplatin. Das liegt im Bereich der ID50. Kombiniert wurde Cisplatin mit 0,22 bzw. 2,2 µg/ml BSO.

Es zeigt sich, dass der zytotoxische Effekt von Cisplatin ($P = 0,005$) durch Zugabe von 0,22 µg/ml BSO gesteigert werden kann ($P = 0,023$). Diese Steigerung der Wirksamkeit ist durch die Kombination mit 2,2 µg/ml BSO nicht zu verstärken ($P = 0,262$) (siehe Abb.6).

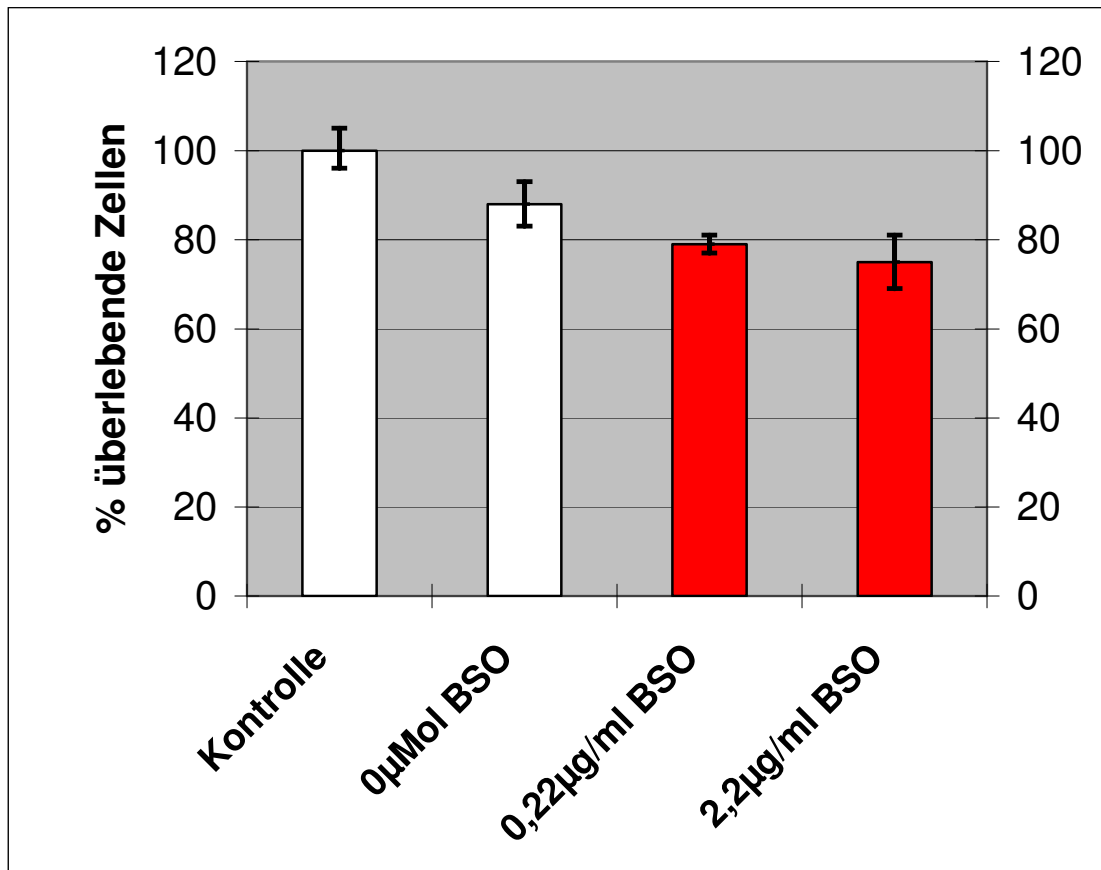


Abb.6: Die Konzentration der vier Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurden der dritte bzw. vierte Ansatz mit 0,22 bzw. 2,2 µg/ml BSO über vier Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten, dritten und vierten Ansatzes mit 2500 ng/ml Cisplatin für weitere 44 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten +/- Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

5 Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Cisplatin

Eingesetzt wurden 2500 ng/ml Cisplatin. Das liegt im Bereich der ID50. Kombiniert wurde Cisplatin mit 0,9 bzw. 9 $\mu\text{g/ml}$ EA. Der Einfluss von EA auf Cisplatin sollte untersucht werden.

Die Wirksamkeit von Cisplatin kann mit 9 $\mu\text{g/ml}$ EA signifikant gesteigert werden ($P = 0,025$). 0,9 $\mu\text{g/ml}$ EA reichen für diesen Effekt nicht aus ($P = 0,44$) (siehe Abb.7).

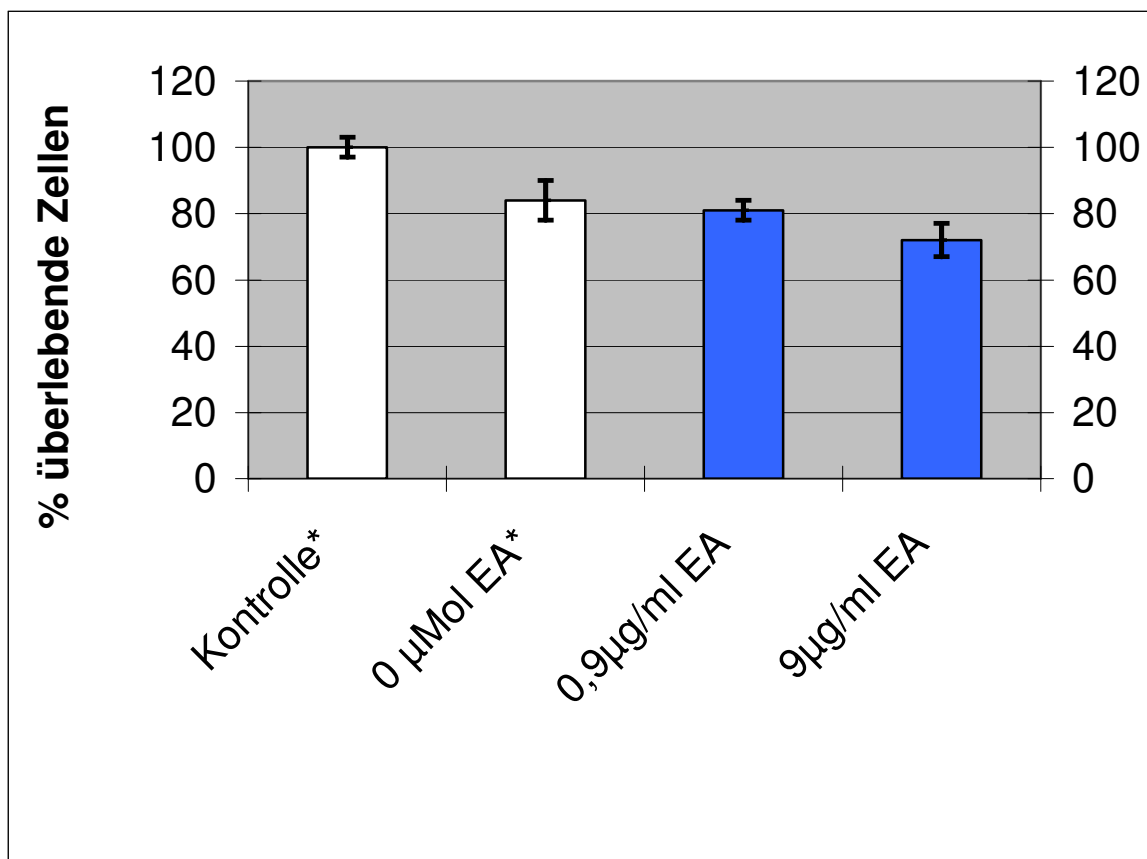


Abb.7: Die Konzentration der vier Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurden der dritte bzw. vierte Ansatz mit 0,9 bzw. 9 $\mu\text{g/ml}$ EA über eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten, dritten und vierten Ansatzes mit 2500 ng/ml Cisplatin für weitere 47 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung aus $n = 8$ (*...: $n = 4$) Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

6 Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Cisplatin

Der Einfluss einer Kombination von BSO und EA auf die Wirksamkeit von Cisplatin sollte überprüft werden. Eingesetzt wurden 2500 ng/ml Cisplatin. Das liegt im Bereich der ID50. Zugegeben wurden 0, 3 bzw. 9 µg/ml EA in Kombination mit 0 bzw. 0,11 µg/ml BSO.

Der unten abgebildete Graph zeigt, dass die zytotoxische Wirkung von Cisplatin auch in dieser Versuchsreihe nur durch die Zugabe von 9 µg/ml EA verstärkt ($P = 0,001$) werden kann. Dieser Effekt kann durch Kombination mit 0,11 µg/ml BSO nicht moduliert werden ($P = 0,146$) (siehe Abb.8).

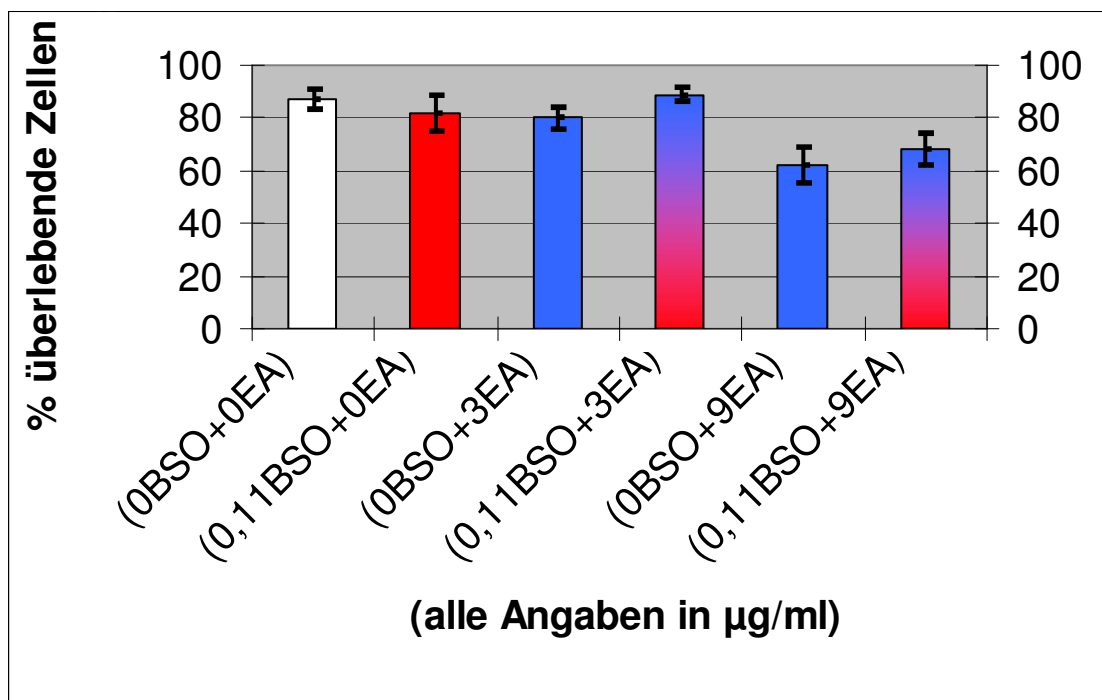


Abb.8: Die Konzentration der sechs Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. Dem zweiten, vierten und sechsten Ansatz wurden 0,11 µg/ml BSO zugeführt. Nach drei Stunden wurden die Ansätze drei und vier bzw. fünf und sechs mit 3 bzw. 9 µg/ml EA inkubiert. Eine weitere Stunde später erfolgte in allen Fällen die Koinkubation mit 2500 ng/ml Cisplatin für weitere 44 Stunden. Eine parallel gelaufene Kontrolle ohne Medikamentenzusatz wird hier aus Gründen der Übersicht nicht dargestellt. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm der Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebenden Zellzahlen in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (entspr. 100 %) an (y-Achse).

7 Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Melphalan

Die Auswirkungen des Chemosensitizers BSO auf die Wirksamkeit von Melphalan soll untersucht werden. Eingesetzt wurden 0,12 mg/ml Melphalan. Das liegt im Bereich der ID50. Kombiniert wurde Melphalan mit 0,22 bzw. 2,2 $\mu\text{g/ml}$ BSO.

Die Wirksamkeit von Melphalan ($P < 0,001$) kann durch die Kombination mit 0,22 $\mu\text{g/ml}$ BSO allenfalls grenzwertig signifikant verstärkt werden ($P = 0,04$). Dieser Effekt lässt sich durch die Konzentrationssteigerung auf 2,2 $\mu\text{g/ml}$ BSO deutlich steigern ($P = 0,006$) (siehe Abb.9).

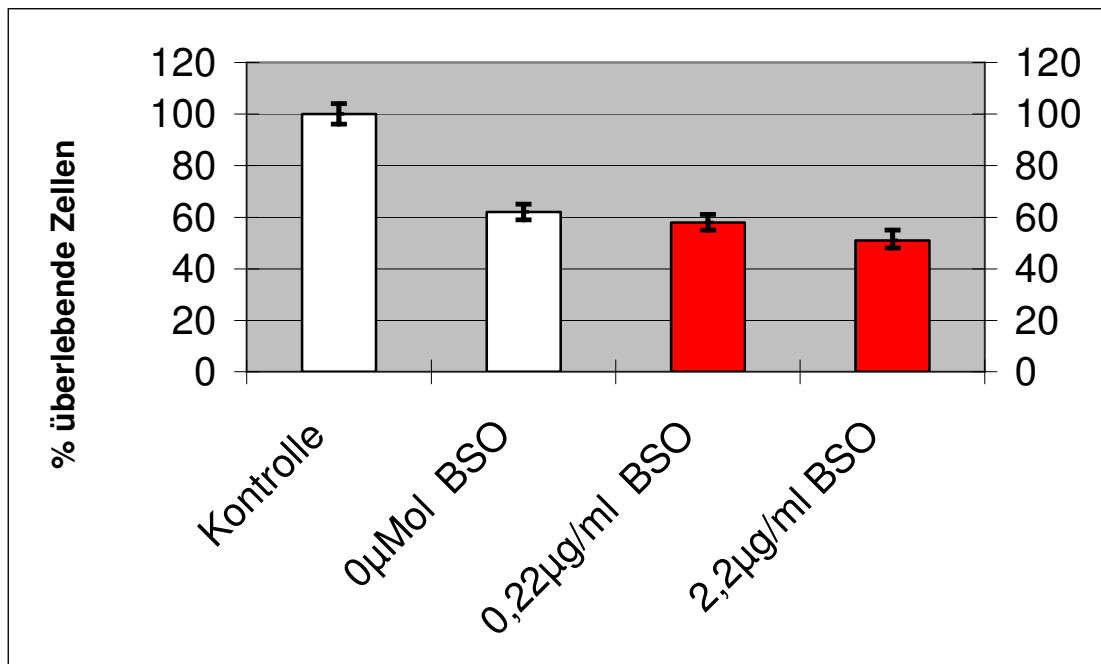


Abb.9: Die Konzentration der vier Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurden der dritte bzw. vierte Ansatz mit 0,22 bzw. 2,2 $\mu\text{g/ml}$ BSO über vier Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten, dritten und vierten Ansatzes mit 0,12 mg/ml Melphalan für weitere 44 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

8 Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Melphalan

Eingesetzt wurden 0,12 mg/ml Melphalan. Das liegt im Bereich der ID50. Kombiniert wurde Melphalan mit 0,15 bzw. 9 $\mu\text{g/ml}$ EA. Der Effekt von EA auf Melphalan sollte untersucht werden.

Die Wirksamkeit von Melphalan ($P < 0,001$) lässt sich unter Zugabe von 0,15 $\mu\text{g/ml}$ EA steigern ($P = 0,004$). Die Kombination mit 9 $\mu\text{g/ml}$ EA verstärkt diesen Effekt ($P < 0,001$) (siehe Abb.10).

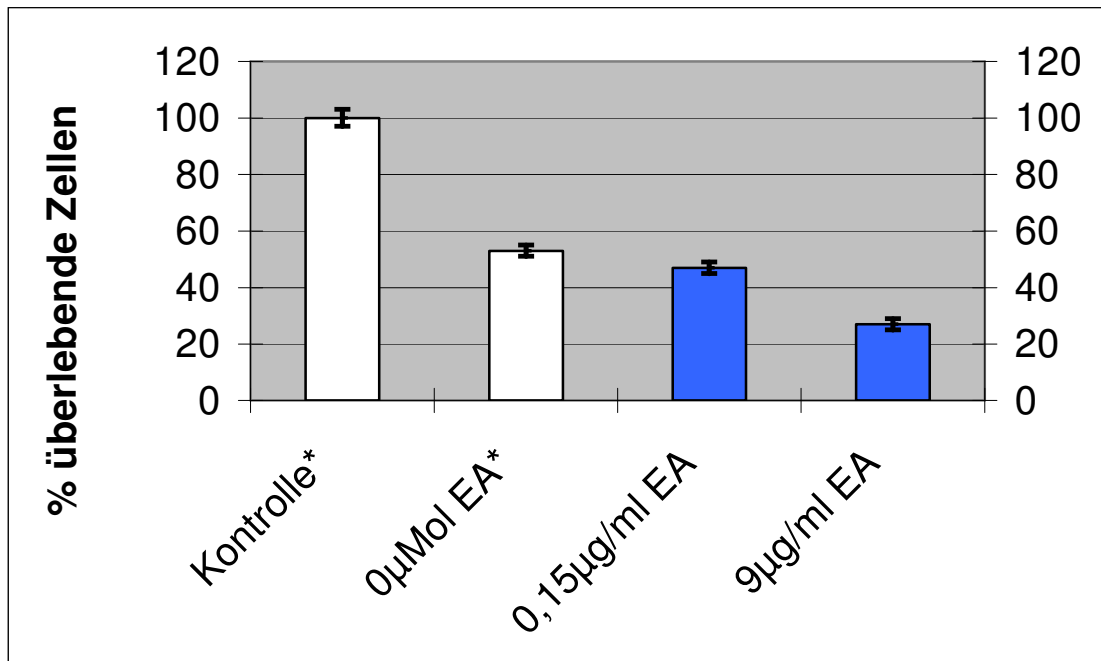


Abb.10: Die Konzentration der vier Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurden der dritte bzw. vierte Ansatz mit 0,15 bzw. 9 $\mu\text{g/ml}$ EA über eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten, dritten und vierten Ansatzes mit 0,12 mg/ml Melphalan für weitere 47 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung aus $n = 8$ (*...: $n = 4$) Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

9 Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Melphalan

Der verstärkende Effekt von EA und von BSO auf die Zytotoxizität von Melphalan konnte in den vorigen Versuchen gezeigt werden. Hier soll der Einfluss einer Kombination von BSO und EA auf die Wirksamkeit von Melphalan überprüft werden. Eingesetzt wurden 0,12 mg/ml Melphalan. Das liegt im Bereich der ID₅₀. Zugegeben wurden 0, 3 bzw. 9 µg/ml EA in Kombination mit 0 bzw. 0,11 µg/ml BSO.

Wie gezeigt, kann die Zytotoxizität von Melphalan unter Zugabe von 3 µg/ml EA gesteigert werden ($P < 0,001$). Kombiniert mit 0,11 µg/ml BSO wird dieser Effekt signifikant abgeschwächt ($P = 0,014$). Die Wirksamkeitssteigerung, die durch 9 µg/ml EA hervorgerufen wird ($P < 0,001$), bleibt von einer BSO- Zugabe unberührt ($P = 0,142$) (siehe Abb.11).

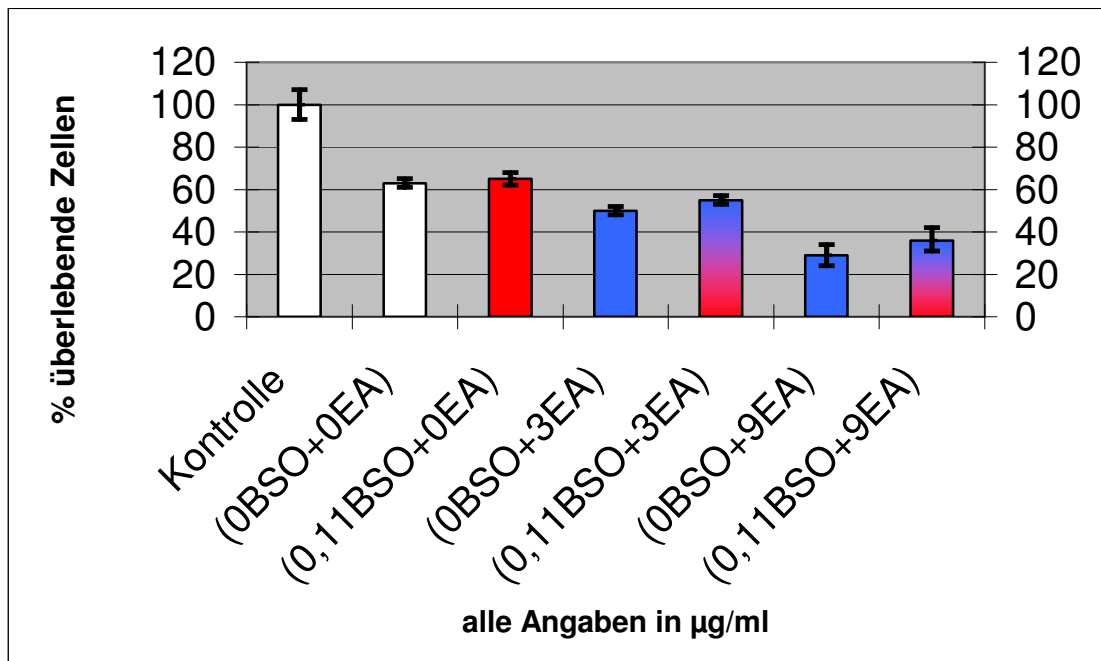


Abb.11: Die Konzentration der sieben Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. Dem dritten, fünften und siebten Ansatz wurden 0,11 µg/ml BSO zugeführt. Nach drei Stunden wurden die Ansätze vier und fünf bzw. sechs und sieben mit 3 bzw. 9 µg/ml EA inkubiert. Eine weitere Stunde später erfolgte mit Ausnahme des Kontrollansatzes die Koinkubation mit 0,12 mg/ml Melphalan für weitere 44 Stunden. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm der Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebenden Zellzahlen in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (entspr. 100 %) an (y-Achse).

10 Einfluss von BSO auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid

Die Auswirkungen des Chemosensitizers BSO auf die Wirksamkeit von Arsentrioxid soll untersucht werden. Eingesetzt wurden 0,4 mg/l Arsentrioxid. Das liegt im Bereich der ID50. Kombiniert wurde Arsentrioxid mit 0,22 bzw. 2,2 µg/ml BSO.

Arsentrioxid lässt sich in seiner Wirksamkeit ($P < 0,001$) durch Kombination mit 0,22 µg/ml BSO signifikant steigern ($P < 0,001$). Dieser Effekt verstärkt sich unter Zugabe von 2,2 µg/ml BSO nicht weiter ($P = 0,5$) (siehe Abb.12).

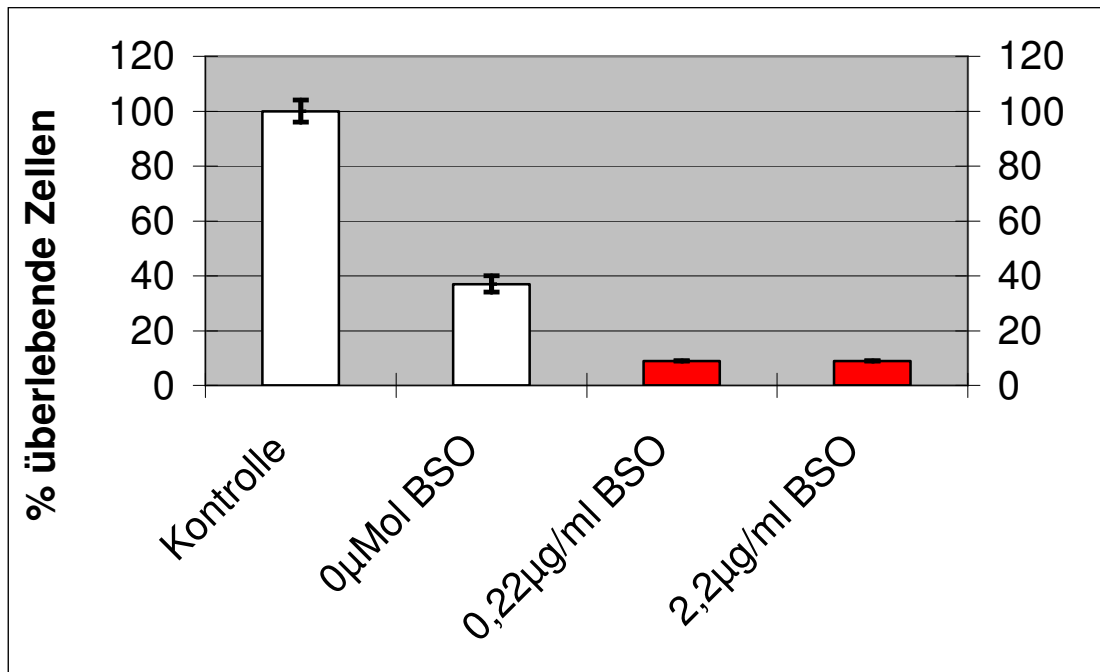


Abb.12: Die Konzentration der vier Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurde der dritte bzw. vierte Ansatz mit 0,22 bzw. 2,2 µg/ml BSO über vier Stunden inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten, dritten und vierten Ansatzes mit 0,4 mg/l Arsentrioxid für weitere 44 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten +/- Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

11 Einfluss von EA auf die zytotoxische Wirkung von Arsentrioxid

Eingesetzt wurden 0,3 mg/l Arsentrioxid. Das liegt im Bereich der ID50. Kombiniert wurde Arsentrioxid mit 0, 0,15, 1,5, 3 bzw. 9 $\mu\text{g/ml}$ EA. Der Effekt von EA auf Arsentrioxid sollte untersucht werden.

Die Wirkung von Arsentrioxid ($P < 0,001$) lässt sich weder mit 0,15 $\mu\text{g/ml}$ EA ($P = 0,094$) noch unter Zugabe von 1,5 $\mu\text{g/ml}$ EA ($P = 0,153$) modulieren. Ab einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ EA ist eine hemmende Wirkung auf die Zytotoxizität ($P = 0,018$) zu beobachten (siehe Abb.13).

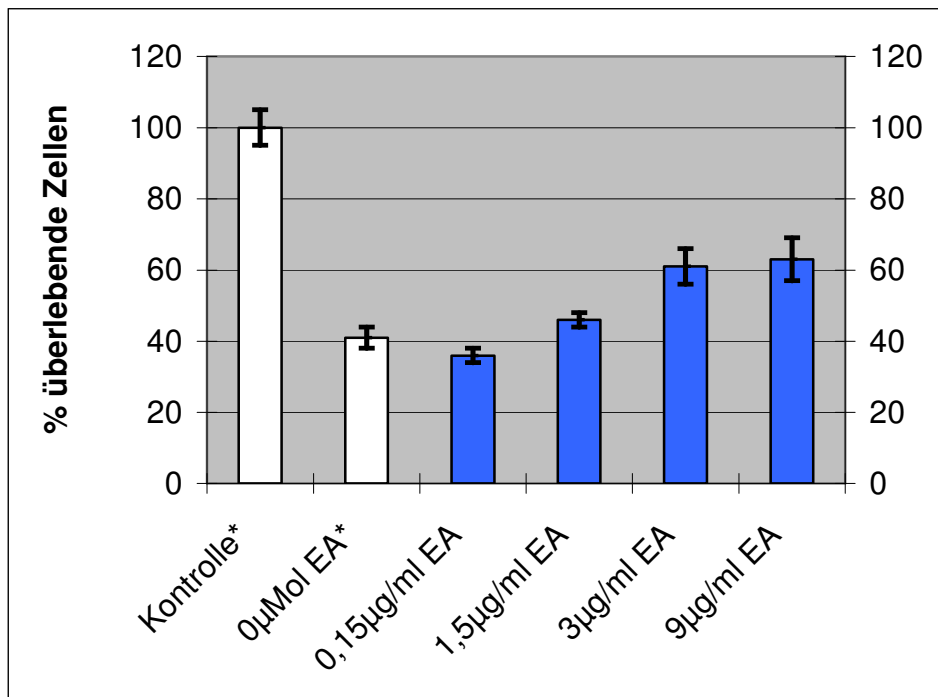


Abb.13: Die Konzentration der sechs Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. In einem ersten Schritt wurde der dritte Ansatz mit 0,15 $\mu\text{g/ml}$, der Vierte mit 1,5 $\mu\text{g/ml}$, der Fünfte mit 3 $\mu\text{g/ml}$ und der Sechste mit 9 $\mu\text{g/ml}$ EA über eine Stunde inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Koinkubation des zweiten bis sechsten Ansatzes mit 0,3 mg/l Arsentrioxid für weitere 47 Stunden. In der Kontrolle wuchsen die Zellen ohne Zusätze. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardabweichung aus $n = 16$ (*...: $n = 8$) Experimenten und geben die überlebende Zellzahl in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (100 %) an (y-Achse).

12 Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität von Arsentrioxid

Dieser Versuchsaufbau soll zeigen, ob der hemmende Einfluss von 3 bzw. 9 µg/ml EA auf die Zytotoxizität von Arsentrioxid durch die Zugabe von 0,11 µg/ml BSO aufgehoben werden kann. Eingesetzt wurden 0,3 mg/l Arsentrioxid. Das liegt im Bereich der ID50. Zugegeben wurden 3 bzw. 9 µg/ml EA in Kombination mit 0,11 µg/ml BSO.

In Kombination mit 0,11 µg/ml BSO zeigt sich eine starke Zytotoxizitätssteigerung ($P = 0,001$) von Arsentrioxid. Der zuvor gezeigte hemmende Einfluss von 3 µg/ml EA ($P = 0,021$) kann durch Zugabe von 0,11 µg/ml BSO aufgehoben werden ($P < 0,001$).

Die Hemmung von 9 µg/ml EA auf Arsentrioxid kann durch die Kombination mit 0,11 µg/ml BSO umgekehrt werden ($P < 0,001$) (siehe Abb.14).

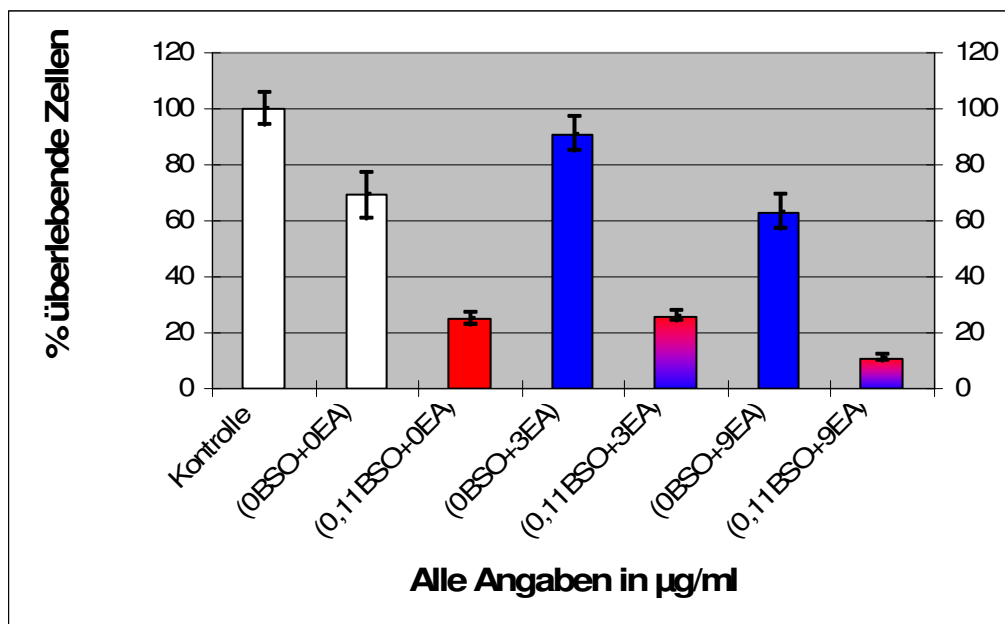


Abb. 14: Die Konzentration der sieben Ansätze betrug jeweils 2×10^5 LA-N-1-Zellen/ml. Dem dritten, fünften und siebten Ansatz wurden 0,11 µg/ml BSO zugeführt. Nach drei Stunden wurden die Ansätze vier und fünf bzw. sechs und sieben mit 3 bzw. 9 µg/ml EA inkubiert. Eine weitere Stunde später erfolgte in allen Ansätzen mit Ausnahme der Kontrolle die Koinkubation mit 0,3 mg/l Arsentrioxid für weitere 44 Stunden. Die Messwerte entsprechen den Mittelwerten \pm der Standardabweichung aus $n = 8$ Experimenten und geben die überlebenden Zellzahlen in Prozent im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen (entspr. 100 %) an (y-Achse).

13 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse ...

13.1 ... einer kombinierten Gabe mit BSO

| | 2,2 µg/ml BSO |
|-----------------|---------------|
| 1) DOXORUBICIN | 10% |
| 2) CISPLATIN | 108% |
| 3) MELPHALAN | 29% |
| 4) ARSENTRIOXID | 44% |

Tab. 1: Dieser Tabelle liegen die Daten der Abbildungen 3, 6, 9 und 12 zu Grunde, in welchen die Wirkung einer kombinierten Gabe mit BSO auf die Toxizität des eingesetzten Zytostatikums (1-4) dargestellt wurde. Die Prozentangaben zeigen den zusätzlichen zytotoxischen Effekt durch den Chemosensitizer bezogen auf die Wirkung des Zytostatikums ohne Chemosensitizer. Ausgewählt wurden die Messwerte nach Einsatz von 2,2 µg/ml BSO.

Rot...: Keine signifikante Steigerung der Zytostatika-Wirkung.

13.2 ... einer kombinierten Gabe mit EA

| | 9 µg/ml EA |
|------------------------|-------------------|
| 1) DOXORUBICIN | 100% |
| 2) CISPLATIN | 75% |
| 3) MELPHALAN | 55% |
| 4) ARSENTRIOXID | - 37% |

Tab. 2: Dieser Tabelle liegen die Daten der Abbildungen 4, 7, 10 und 13 zu Grunde, in welchen die Wirkung einer kombinierten Gabe mit EA auf die Toxizität des eingesetzten Zytostatikums (1-4) dargestellt wurde. Die Prozentangaben beziehen sich auf die zytotoxische Wirkung des Zytostatikums ohne EA. Ausgewählt wurden die Messwerte nach Einsatz von 9 µg/ml EA.

13.3 ... einer kombinierten Gabe von BSO + EA

| | a) BSO | b) EA | c) BSO + EA |
|-----------------|--------|------------------------------|--|
| 1) DOXORUBICIN | +19% | +119% | +114% ¹ |
| 2) CISPLATIN | +39% | +192% | +146% ¹ |
| 3) MELPHALAN | -5% | +92%(30µMol) +35%(10µMol) | +73% ¹ +22% ² |
| 4) ARSENTRIOXID | +142% | +19%(30µMol) -71%(10µMol) | +187% ² +139% ³ |

Tab. 3: Dieser Tabelle liegen die Daten der Abbildungen 5, 8, 11 und 14 zu Grunde, in welchen die Wirkung einer kombinierten Gabe von EA und BSO auf die Toxizität des eingesetzten Zytostatikums (1-4) dargestellt wurde. Die Prozentangaben beziehen sich auf die zytotoxische Wirkung des Zytostatikums ohne weitere Zugabe. a) bzw. b) stellt den wirksamkeitssteigernden Effekt von 0,11 µg/ml BSO bzw. 9 µg/ml EA dar. Unter c) wird zusammengefasst, ob der potentiell festgestellte, toxizitätssteigernde Effekt durch eine Koinkubation von BSO und EA weiter gesteigert werden kann. (Erläuterungen der Indices: siehe unten)

Rot...: Keine signifikante Steigerung der Zytostatika-Wirkung.

¹...: Nach kombinierter Gabe von BSO und EA signifikante Steigerung der Zytostatika-Wirkung gegenüber der BSO-Einzelgabe; kein signifikanter Effekt der EA auf die Zytostatika-Wirkung.

²...: Nach kombinierter Gabe von BSO und EA signifikante Steigerung/Hemmung der Zytostatika-Wirkung sowohl im Vergleich zu der BSO- als auch der EA-Einzelgabe.

³...: Nach kombinierter Gabe von BSO und EA signifikante Steigerung der Zytostatika-Wirkung gegenüber der EA-Einzelgabe; keine signifikante Steigerung des BSO-Einflusses auf die Zytostatika-Wirkung.

VI Diskussion

1 Diskussion der eigenen Ergebnisse

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob durch Kombination von oxyradikalbildenden Zytostatika mit Ethacrynsäure und/oder BSO deren Wirksamkeit an der Neuroblastomzelllinie LA-N-1 in vitro verbessert wird.

Der Wirkmechanismus von BSO und EA greift an zwei unterschiedlichen Stellen des GSH-RedOx-Systems an (siehe Abb. A und B, IX Anhang).

Wir erhoffen uns von der kombinierten Gabe von EA + BSO eine additive Verstärkung ihrer möglichen Einzeleffekte. Die BSO-induzierte GSH-Depletion wird bei einer kombinierten Gabe mit der GST-Inhibierung und dem GSH-Verbrauch der EA verknüpft.

Eine Studie von Fruehauf et al. von 1998 an humanen Melanomzellen deutet darauf hin, dass Wechselwirkungen zwischen GSH und der GST bestehen.

Es konnte gezeigt werden, dass sich GST-positive Tumorzellen BSO gegenüber resistenter als negative Kontrollen verhielten.

An Brustkarzinomzellen zeigte sich, dass eine Kombination von BSO + EA zu einer Potenzierung der Zytotoxizität von Melphalan führt (Chen et al. 1994, 1995).

1.1 Ergebnisse für Doxorubicin

1.1.1 Einfluss von BSO auf die Zytotoxizität von Doxorubicin

Die Toxizität von 0,09 µg/ml Doxorubicin war weder durch die zusätzliche Gabe von 0,22 noch von 2,2 µg/ml BSO weiter zu steigern.

Eine BSO-vermittelte GSH-Depletion verbesserte somit die Wirksamkeit von Doxorubicin an LA-N-1-Zellen nicht.

Dieses Ergebnis bestätigt für LA-N-1 die von Roller et al. 1998 und Troyano et al. 2001 gemachten Beobachtungen. Beide Studien konnten an malignen Gliomzellen bzw. hu-

manen Promonocytenzellen keinen steigernden Effekt von BSO auf die Doxorubicin-wirksamkeit feststellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die Effektivität von Doxorubicin im Falle der LA-N-1-Linie die Oxyradikalbildung und damit das GSH-RedOx-System nicht von entscheidender Wichtigkeit ist (siehe Abb.: 3).

Der Wirkmechanismus der Topoisomerase-II-Hemmung scheint wesentlicher als die oxidative DNA-Schädigung zu sein.

1.1.2 Einfluss der EA auf die Zytotoxizität von Doxorubicin

In unseren Versuchen konnte die Wirksamkeit von 0,09 µg/ml an LA-N-1-Zellen in kombinierter Gabe mit 9 µg/ml EA gesteigert werden.

Niedrigere EA-Konzentrationen zeigten keine signifikanten Veränderungen, es scheint also eine minimale Wirkkonzentration zu geben.

Die Beobachtung, dass die kombinierte Gabe von EA und Doxorubicin an doxorubicin-resistente, kleinzellige Lungenkarzinomzellen die Steigerung der Wirksamkeit von Doxorubicin zur Folge hat (Awasthi et al. 1996), können wir an dieser Neuroblastomzelllinie bestätigen. Die Wirksamkeit von Doxorubicin scheint durch die Kombination mit EA gesteigert werden zu können (siehe Abb.: 4).

Dieses Ergebnis widerspricht der unter 1.1.1 von uns aufgestellten Hypothese, dass die Wirksamkeit von Doxorubicin unabhängig vom GSH-RedOx-System ist.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die EA über andere Faktoren Einfluss auf die Medikamentenwirksamkeit nimmt. Denkbar wäre eine Milieubeeinflussung im Sinne eines Absinkens des pH-Wertes (Bittar et al. 1967). Der pH-Wert und sein Effekt auf die Wirksamkeit der Zytostatika ist in dieser Studie nicht untersucht worden.

1.1.3 Einfluss einer kombinierten Gabe von BSO + EA auf die Zytotoxizität von Doxorubicin

Der Einfluss der EA auf Doxorubicin kann durch die Zugabe von 0,11 µg/ml BSO nicht weiter modifiziert werden.

Doxorubicin profitiert nicht von einer Zweifach-Kombination (siehe Abb.: 5).

Für Dox steht dies im Einklang mit den von uns gemachten Beobachtungen (1.1.1). Es konnte festgestellt werden, dass die BSO-vermittelte Depletion des Glutathions lediglich einen geringen Einfluss auf die Zytotoxizität von Doxorubicin hat (Roller et al. 1996).

Dies bestätigt zudem unsere Annahme, dass der Effekt der EA in hohen Konzentrationen auf die Wirksamkeit von Doxorubicin nicht in Zusammenhang steht mit dem GSH-RedOx-System. Der beobachtete Effekt der EA bleibt von einer parallelen Einflussnahme durch BSO auf dieses System unberührt.

Kritisch angemerkt werden sollte, dass die in diesem Versuch eingesetzte BSO-Konzentration alleine keine signifikante Wirkungssteigerung von Doxorubicin bewirkt. 0,11 µg/ml setzten wir ein, da 0,22 µg/ml BSO auf As₂O₃ so ausgeprägte Effekte zeigte, dass dort ein potentieller zusätzlicher Effekt der EA nicht hätte erkannt werden können. Es sollten in allen Versuchsreihen identische BSO- bzw. EA-Konzentrationen eingesetzt werden. Die Versuche an As₂O₃ lieferten Hinweise, dass bereits der nicht signifikante Einfluss der EA in der Kombination mit BSO zusätzliche Effekte zeigte. Diese Beobachtung kann für BSO in Kombination mit EA und Doxorubicin nicht gemacht werden.

Um die Frage abschließend zu klären, ob BSO + EA die Wirksamkeit von Doxorubicin über die Einzeleffekte hinaus steigern kann, sollten weitere Studien mit höheren BSO-Konzentrationen vorgenommen werden.

1.2 Ergebnisse für Cisplatin

1.2.1 Einfluss von BSO auf die Zytotoxizität von Cisplatin

Die Wirkung von Cisplatin konnte durch die Kombination mit 0,22 µg/ml BSO signifikant gesteigert werden. Der Effekt beträgt für 2,2 µg/ml BSO zusätzliche 108% (siehe Abb.: 6, Tab. 1).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Studien von Fruehauf et al. (1998), Chen et al. (1994) und Troyano et al. (2001).

Das Ergebnis an einer Gliomzelllinie, dass kein wirksamkeitssteigernder Effekt von BSO auf Cisplatin festzustellen ist (Roller et al. 1998), bestätigt sich für die Zelllinie LA-N-1 nicht.

Oxyradikale scheinen im Wirkmechanismus des Cisplatins also eine Rolle zu spielen.

1.2.2 Einfluss der EA auf die Zytotoxizität von Cisplatin

Eine Wirkungssteigerung von Cisplatin durch eine Kombination mit EA ist bei einer EA-Konzentration von 9 µg/ml um zusätzliche 75% zu beobachten (siehe Abb.: 7, Tab. 2). Die GST hat diesen Beobachtungen zu Folge Einfluss auf die Eliminierung von Cisplatin. Hier scheint es eine minimale Wirkkonzentration zu geben, da im Ansatz mit 0,9 µg/ml EA noch kein signifikanter Effekt auf die Cisplatinwirksamkeit vorzuliegen scheint (Abb. 7).

Diese Ergebnisse bestätigen die zitierten Studien von Mulder et al. (1997) und Goto et al. (1999) für die Neuroblastomzelllinie LA-N-1. Eine Kombination mit EA konnte dort die Cisplatinwirksamkeit verstärken.

Die Beobachtung, dass die EA keine Effekte auf die Wirksamkeit von alkylierenden Medikamenten hat (Chen et al. 1994), kann für Cisplatin und die LA-N-1-Zelllinie nicht bestätigt werden.

1.2.3 Einfluss einer kombinierten Gabe von BSO + EA auf die Zytotoxizität von Cisplatin

An Brustkarzinomzellen ist gezeigt worden, dass eine Kombination von BSO + EA zu einer Potenzierung der Zytotoxizität von Melphalan führt (Chen et al. 1994, 1995).

Fruehauf et al. (1998), Gosland et al. (1996), Chen et al. (1994) und Troyano et al. (2001) beobachteten für Cisplatin und Melphalan nach Kombination mit BSO identische Effekte.

In Anbetracht dieser Studien erwarten wir nach einer Kombination von Cisplatin mit BSO + EA vergleichbare Effekte, wie sie nach der Kombination mit Melphalan gesehen worden sind. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch keine Potenzierung der Zytotoxizität von Cisplatin.

Der Einfluss der EA auf Cisplatin kann durch die Zugabe von 0,11 µg/ml BSO nicht weiter modifiziert werden. Der Einfluss von BSO und EA nach Einzelgabe ergänzt sich weder additiv noch synergistisch (siehe Abb.: 8, Tab. 3). An dieser Stelle sei auf bereits beschriebene Kritikpunkte aus den Versuchen mit Doxorubicin (1.1.3) verwiesen. Um die Frage der Wirksamkeit des kombinierten Einflusses von EA + BSO auf Cisplatin abschließend zu klären, ist möglicherweise der Einsatz höherer, nach alleiniger Gabe signifikanter BSO-Konzentrationen notwendig.

Sollten sich unsere Ergebnisse bestätigen, wäre ein möglicher Erklärungsansatz der von Gosland et al. 1996 beschriebene Unterschied in der Beeinflussung von Melphalan und Cisplatin durch die Kombination mit EA. Dort ließ sich die Wirksamkeit von Cisplatin im Gegensatz zu Melphalan nicht durch die EA beeinflussen. Auch bei uns ist erst im Grenzbereich der klinischen Einsetzbarkeit der EA von 9 µg/ml ein Einfluss auf die Cisplatinwirksamkeit zu erkennen. Der Wirkmechanismus von Melphalan wird in unseren Versuchen stärker negativ beeinflusst als das für Cisplatin der Fall ist. Möglicherweise beeinflussen sich das GSH- RedOx- System und die GST- katalysierte Entgiftung bei der Verstoffwechslung von Cisplatin weniger, als das für Melphalan der Fall ist.

1.3 Ergebnisse für Melphalan

1.3.1 Einfluss von BSO auf die Zytotoxizität von Melphalan

Die Zytotoxizität des Melphalans konnte unter Kombination mit 0,22 µg/ml BSO signifikant wenn auch geringgradig gesteigert werden.

Dieser Effekt verstärkt sich durch Dosissteigerung auf 2,2 µg/ml BSO. Bei der höheren BSO- Konzentration ist die Steigerungsrate 29 % gegenüber der Wirkungsrate von Melphalan alleine (siehe Abb.: 9).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Studien von Fruehauf et al. (1998), Gosland et al. (1996), Chen et al. (1998) und Troyano et al. (2001). BSO konnte dort über eine senkende Einflussnahme auf den GSH-Spiegel die Effektivität vom Melphalan steigern.

Oxyradikale spielen im Wirkmechanismus des Melphalans also eine Rolle. Die Steigerungsrate zeigt aber mit 29 % im Vergleich zu den Steigerungsraten anderer Zytostatika (Tab.: 1 und 3), dass der Einfluss des GSH- RedOx- Systems auf dessen Effektivität eher gering ist.

1.3.2 Einfluss der EA auf die Zytotoxizität von Melphalan

Die Effektivität von Melphalan an LA-N-1-Zellen lässt sich durch die kombinierte Gabe mit 0,15 µg/ml EA signifikant steigern.

Mit ansteigender EA-Konzentration auf maximal 9 µg/ml verstärkt sich dieser Effekt weiter bis zu einer Steigerung von 55 % (siehe Abb.: 10, Tab.: 2).

Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass EA den zytotoxischen Effekt von Melphalan an der LA-N-1- Neuroblastomzelllinie steigern kann (Mulder et al. 1997).

Die Beobachtungen, die EA habe keine Effekte auf die Wirksamkeit von alkylierenden Medikamenten (Chen et al. 1994), kann für Melphalan und die LA-N-1-Zelllinie nicht bestätigt werden.

Die GST scheint nach unseren Beobachtungen bedeutenden Einfluss auf die Eliminierung von Melphalan zu haben. Ihre Hemmung vermag die Melphalanwirksamkeit um bis zu 55 % zu steigern (Tab.: 2).

1.3.3 Einfluss einer kombinierten Gabe von BSO + EA auf die Zytotoxizität von Melphalan

Der wirksamkeitssteigernde Effekt von 3 µg/ml EA an Melphalan wird durch die Kombination mit 0,11 µg/ml BSO abgeschwächt.

Dieser hemmende Einfluss besteht bei höchsten EA-Konzentrationen (9 µg/ml) nicht mehr (siehe Abb.: 11, Tab.: 3). Die graphische Darstellung der Ergebnisse lässt vermuten, dass auch der Effekt von 9 µg/ml EA durch die Kombination mit 0,11 µg/ml BSO negativ beeinflusst wird. Möglicherweise führt hier die größere Standardabweichung zu der fehlenden Signifikanz. Weitere Versuche mit größeren Stichproben könnten diese Frage beantworten.

An der hier verwendeten Zelllinie bestätigen sich für Melphalan die von Chen et al. 1994 gemachten Beobachtungen an humanen Brustkarzinomzellen nicht. Die Wirksamkeit lässt sich durch die Kombination von BSO + EA nicht über den Effekt der EA-Einzelgabe hinaus steigern. Der Einfluss von BSO und der EA ergänzt sich weder additiv noch synergistisch.

Im Gegenteil: die Auswirkungen der EA auf die Effektivität von Melphalan werden bei gleichzeitiger Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System durch BSO geringer.

Auch hier legen die Ergebnisse nahe, dass noch weitere Versuche mit höheren BSO-Konzentrationen mit einer signifikanten Wirkungsdosis folgen sollten

Eine mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse wäre die Hypothese, dass sich das GSH-RedOx-System der GST-katalysierten Entgiftung durch Ausschleusung gegenüber dominant verhält.

Ist der wirksamkeitssteigernde Effekt durch die Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System mittels BSO geringer als der Effekt auf die GST durch die EA, senkt das das

Gesamtausmaß der Wirkungssteigerung. Die Einzeleffekte addieren sich nicht. Sie werden zu Ungunsten der EA-Auswirkungen zusammengefasst.

Möglicherweise spielt auch die geringe Selektivität der EA bezüglich der GST-Isoenzyme eine Rolle (Kauvar et al. 1998).

Entgegen der Erwartung eines synergistischen Effektes von BSO und EA ergibt sich ein wechselseitig hemmender Effekt der beiden Sensitizer an der LA-N-1-Zelle.

1.4 Ergebnisse für Arsentrioxid

1.4.1 Einfluss von BSO auf die Zytotoxizität von Arsentrioxid

Der Effekt von 0,4 mg/l As_2O_3 an LA-N-1-Zellen ist durch eine Kombination mit BSO signifikant um bis zu 44 % zu steigern.

Das Ausmaß ist unabhängig von der BSO-Konzentration (siehe Abb.: 12).

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den zitierten Studien von Wu et al. (2004), Nakagawa et al. (2002) und Liu et al. (2001).

Eine BSO-vermittelte GSH-Depletion verbessert die Wirksamkeit von As_2O_3 an LA-N-1-Zellen. Das bestätigt die Annahme, dass die Bildung von Oxyradikalen ein wichtiger Wirkmechanismus von As_2O_3 ist.

1.4.2 Einfluss der EA auf die Zytotoxizität von Arsentrioxid

Die Kombination von As_2O_3 mit EA führt zu keiner Wirkungssteigerung.

EA-Konzentrationen ab 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ führen zu einer Hemmung der Wirksamkeit (Abb.: 13, Tab. 2). Die Beobachtung, dass EA die As_2O_3 -Wirkung verstärken kann (Liu et al. 2001), können wir für diese Neuroblastomzellen nicht bestätigen.

Die Durchführung weiterer Versuche ist insbesondere hinsichtlich der Frage notwendig, ob eine Dosierung von 9 $\mu\text{g/ml}$ EA die Wirksamkeit von As_2O_3 hemmt (Abb.: 13) oder unbeeinflusst (Abb.: 14) lässt. Hier kommen wir in unabhängigen Versuchen zu einem unterschiedlichen Ergebnis.

Unsere Beobachtungen lassen vermuten, dass die GST-katalysierte Entgiftung von As_2O_3 eine untergeordnete Rolle spielt. Deswegen haben niedrige EA-Konzentrationen keine Auswirkungen auf die Effektivität von As_2O_3 , während höhere Dosen sogar eine dosisabhängige Hemmung der zytotoxischen Wirkung zu haben scheinen (siehe Abb.: 13). Unsere Ausgangshypothese impliziert, dass die GST-Aktivität die Wirksamkeit von As_2O_3 reduziert. Wir beobachten aber das Gegenteil: As_2O_3 büßt an Effektivität ein, wenn wir die GST mittels hohen EA-Konzentrationen hemmen.

Die Tatsache, dass die Hemmung der Wirksamkeit in den Versuchsreihen, die in Abb. 14 dargestellt sind, bei einer EA-Konzentration von 9 $\mu\text{g/ml}$ nicht mehr signifikant ist kann ein Hinweis darauf sein, dass die EA insbesondere in einem Konzentrationsbereich um 3 $\mu\text{g/ml}$ herum das GSH-RedOx-System so aktivierend beeinflusst, dass das As_2O_3 besser eliminiert werden kann. Hier könnte die unter 1.1.2 bereits erwähnte mögliche pH-Wert-Verschiebung, die in dieser Studie nicht untersucht worden ist, eine Rolle spielen (Bittar et al. 1967). Dieser Prozess wäre dann sättigbar.

1.4.3 Einfluss einer kombinierten Gabe von BSO + EA auf die Zytotoxizität von Arsentrioxid

Die Wirksamkeit von Arsentrioxid an Neuroblastomzellen kann durch die kombinierte Gabe von 0,11 $\mu\text{g/ml}$ BSO und 9 $\mu\text{g/ml}$ EA über den Einfluss der Einzelgaben hinaus gesteigert werden. Die beobachtete Hemmung der Wirksamkeit von As_2O_3 durch die EA (Abb. 13) wird unter BSO-Zusatz aufgehoben und es kommt zu einer Steigerung (Abb. 14). Dieser Effekt übertrifft die einfache Summe der Einzeleffekte.

Hier bestätigt sich die Ausgangserwartung, dass BSO und die EA sich in Kombination einander verstärkend wirkungssteigernd auswirken können.

Wie u.a. in den Kombinationen mit Cisplatin und Melphalan beobachtet, gibt die Kombination mit BSO, und damit der Einfluss auf die GSH-Synthese, die Tendenz für die Auswirkungen einer EA + BSO-Zugabe an.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Wirkungsweise von As_2O_3 festhalten, dass

- i. die Bildung von Oxyradikalen ein wichtiger Wirkmechanismus von As_2O_3 zu sein scheint;
- ii. der hauptsächliche Entgiftungsweg des As_2O_3 eher nicht die GST-katalysierte Konjugation mit GSH ist;
- iii. As_2O_3 in seinem Wirkmechanismus von der GST sogar zu profitieren scheint.

2 Kritische Einordnung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen bezüglich der Fragestellung

Bei der Bewertung der Ergebnisse ist zu bedenken, dass die Anzahl der von uns durchgeführten Experimente mit einer geringen Stichprobe zwischen 4 und 16 die Durchführung weiterer in vitro-Studien zwecks Verifizierung notwendig macht. Eine Schwäche dieser Arbeit ist die zum Teil stark schwankende Prozentzahl der Zellen nach Inkubation mit den hier in konstanten Konzentrationen eingesetzten Zytostatika. Die breiteste Streuung zeigt das As_2O_3 mit Werten zwischen 37% und 69%. Ähnliches gilt für Doxorubicin (Werte zwischen 51% und 79%) und Melphalan (Werte zwischen 53% und 63%). Eine gute Reproduzierbarkeit bezüglich der überlebenden Zellzahl zeigten die Versuche mit Cisplatin. Dort lag die Schwankung zwischen 84% und 88%. Das Ziel Konzentrationen unterhalb der ID50 einzusetzen ist uns dennoch nur in zwei dargestellten Fällen (As_2O_3 + BSO bzw. + EA) nicht gelungen. Um unsere Ergebnisse zu verifizieren wäre das Erreichen konstanterer Zellzahlen erforderlich. Alleine über eine hohe Wiederholungsrate der ID50-Bestimmung scheint dies nicht erreichbar zu sein. Für Doxorubicin führten wir den Versuch insgesamt achtmal durch. Die bestimmte ID50 lag zwischen 0,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 0,22 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

In der Regel entstanden vier Messwerte einer Versuchsreihe an einem Versuchstag, was möglicherweise zu geringeren Standardabweichungen geführt haben könnte, als die schwankenden Zellzahlen vermuten lassen. Dies schränkt die Aussagekraft unserer Ergebnisse ein.

Die Durchführung weiterer Versuche ist insbesondere hinsichtlich der Frage notwendig, ob eine Dosierung von 9 $\mu\text{g/ml}$ EA die Wirksamkeit von As_2O_3 hemmt (Abb. 13) oder unbeeinflusst (Abb. 14) lässt. Hier kommen wir in unabhängigen Versuchen zu einem unterschiedlichen Ergebnis.

Zu Beginn dieser Arbeit stellte sich für uns die Frage, ob BSO und die EA einzeln oder kombiniert in der Lage sind, die Empfindlichkeit von Zellen der LA-N-1-Linie gegen Oxyradikalbildner zu erhöhen und somit deren Wirksamkeit an diesen Zellen zu verbessern. Untersucht worden sind die Substanzen Doxorubicin, Cisplatin, Melphalan und Arsentrioxid.

Schlussfolgernd ist festzuhalten, dass die Kombination der von uns getesteten Chemotherapeutika mit BSO an LA-N-1-Zellen die Wirksamkeit von Cisplatin, Melphalan und insbesondere As_2O_3 steigert.

Auf ihre Zytotoxizität hat die GSH-Konzentration einer Zelle Einfluss. Je niedriger sie ist, desto effektiver sind sie.

Die BSO-abhängige GSH-Depletion hat auf den Wirkmechanismus von Doxorubicin keine signifikanten Auswirkungen.

Die Kombination mit EA steigert die Effektivität von Doxorubicin, Melphalan und Cisplatin. Der Wirkmechanismus dieser Zytostatika wird anscheinend signifikant durch die GST beeinflusst.

Der Wirkmechanismus von Cisplatin und Melphalan wird sowohl von hohen intrazellulären GSH-Spiegeln als auch von einer hohen GST-Aktivität negativ beeinflusst.

Die Zytotoxizität von As_2O_3 wird durch Zugabe von EA abgeschwächt. Eine Erklärung wäre, dass die Wirksamkeit von As_2O_3 durch die GST verstärkt wird.

Möglicherweise ist für diesen auf biochemischer Ebene nur schwer zu erklärenden Effekt und für den Einfluss der EA auf das Doxorubicin, welches in den Versuchen mit BSO unbeeinflusst blieb und somit eher unabhängig vom GSH-RedOx-System wirkt, aber auch die Ansäuerung des Milieus durch die Ethacrynsäure verantwortlich (Bittar et al. 1967).

Die Löslichkeit der EA kann in den höchsten eingesetzten Konzentrationen in unseren Versuchen als grenzwertig bezeichnet werden, so dass postuliert werden könnte, dass aufgrund der hohen Sättigung der Reaktionslösung auch andere biochemische Parameter beeinflusst wurden, wie z.B. die Sekundär- und Tertiärstruktur der beteiligten Proteine und Enzyme und damit deren Reaktionseigenschaften. Eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes wäre ebenso denkbar.

Eine Verfärbung des Mediums war zu keiner Zeit beobachtbar. Eine pH-Wert-Messung hat im Rahmen dieser Arbeit nicht stattgefunden, was die Verifizierung unserer Hypothesen bezüglich eines Einflusses des pH-Wertes hier nicht möglich macht. Diesbezüglich sind weiterführende Studien notwendig.

Für die Untersuchung der Frage, ob sich die BSO- bzw. EA-Effekte nach Koinkubation addieren, entschieden wir uns nur 0,11 µg/ml BSO einzusetzen, da 0,22 µg/ml BSO auf As₂O₃ so ausgeprägte Effekte zeigte, dass dort ein potentieller zusätzlicher Effekt der EA nicht hätte erkannt werden können. Es sollten in allen Versuchsreihen identische BSO- bzw. EA-Konzentrationen eingesetzt werden. Zudem lieferten die Versuche mit As₂O₃ Hinweise, dass bereits die nicht signifikante Einflussnahme auf das GSH-RedOx-System z.B. per EA (9 µg/ml) für beobachtbare Effekte ausreicht (Tab.:1).

Unter BSO + EA zeigte sich kein signifikant steigender Effekt auf die Wirksamkeit von Doxorubicin, Cisplatin und Melphalan, der über das Ausmaß der Steigerung durch die EA hinausgeht.

Wird BSO in einer die As₂O₃-Wirkung signifikant steigernden Dosierung eingesetzt, so führt die parallele Inkubation mit 9 µg/ml EA zu einer Wirkungssteigerung von As₂O₃ über einen additiven Effekt der Einzelwirkungen hinaus.

Im Falle der Kombinationen von BSO + EA mit Doxorubicin, Cisplatin und Melphalan haben wir beobachtet, dass die Coinkubation mit der gewählten BSO-Dosierung im selbst nicht signifikant die Wirkung verstärkenden Bereich, die Auswirkungen einer EA-Inkubation nicht signifikant beeinflussen kann. Interessant wären weiterführende Versuche, in denen eine höhere Dosis von z.B. 0,22 µg/ml BSO in Kombination mit Doxorubicin, Cisplatin und Melphalan eingesetzt werden würden.

Eine biochemische Ursache dafür, dass sich möglicherweise der BSO-Einfluss bei Inkubation von BSO + EA dominant gegenüber dem EA-Einfluss verhält, was sich aus der Versuchsreihe mit As_2O_3 ebenso wie aus der Tendenz aller in Tab. 1 dargestellten Ergebnisse ableiten ließe, könnte die relative Instabilität der EA gegenüber Enzymen (z.B. der γ -glutamyl-Transpeptidase als Bestandteil des GSH-RedOx-Systems) sein (Burg et al. 2002).

Entscheidend könnten auch GST- Unterklassen sein (Hudson et al 1998), zu denen sich die EA nicht sehr selektiv verhält (Kauvar et al. 1998).

Möglicherweise ist die Affinität der EA zu den von ihr beeinflussbaren GST-Klassen in der LA-N-1-Zelllinie geringer, als die Affinität der hochselektiven BSO zur γ -GCS. Dass die GST und das BSO interagieren konnte 1998 gezeigt werden (Fruehauf et al. 1998).

Denkbar wäre somit auch eine Konkurrenz der EA und des BSOs um die GST, und daraus resultierend eine potentielle Verdrängung der EA von seinem Wirkort durch das BSO.

Eine mögliche Erklärung für die ausgeprägteren Auswirkungen sowohl von BSO als auch von der EA auf die Wirksamkeit von As_2O_3 im Vergleich zu den anderen getesteten Zytostatika könnte sein, dass die Oxyradikalbildung und die medikamentöse Einflussnahme darauf für den Wirkmechanismus von As_2O_3 die größte Rolle spielen. Dieses ist bei As_2O_3 als direktem Radikalbildner aufgrund der drei Sauerstoffatome nahe liegend.

Schlussfolgerungen bezüglich des klinischen Einsatzes können auf Grundlage dieser Studie an Zellkulturen noch nicht gezogen werden.

Hinzu kommt, dass in den vorliegenden Versuchsreihen die Tatsache unbeeinflussbar blieb, dass Resistenzlagen sich in vitro nicht immer wie in vivo verhalten. In vitro werden i.d.R. nur relativ niedrige Resistenzlevel (2- bis 30-fach) erreicht (Gosland et al. 1996). Folglich können im Labor sensibel gewordene Zelllinien in vivo resistent bleiben. Bezüglich der gemachten Aussagen sind weitere Studien zwecks Verifizierung notwendig.

VII Zusammenfassung

Die Resistenzbildung von Neuroblastomzellen gegen Oxiradikalbildende Zytostatika ist ein ungelöstes Problem und verantwortlich für die weiterhin unbefriedigende Prognose von Hochrisiko-Neuroblastomerkrankungen. Vor diesem Hintergrund war das Ziel dieser Arbeit, die Frage zu klären, ob BSO und EA in der Lage sind über die Modulation des GSH-GSSG-Redox-Systems die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegen Oxyradikalbildner zu erhöhen und somit deren Wirksamkeit *in-vitro* an der Neuroblastomzelllinie LA-N-1 zu verbessern.

Als oxyradikalbildende Zytostatika wurden Doxorubicin, Cisplatin, Melphalan und Arsen trioxid untersucht. Zusammenfassend ergaben sich folgende Befunde:

Die Kombination der von uns getesteten Chemotherapeutika mit BSO an LA-N-1-Zellen steigert die Wirksamkeit von Cisplatin, Melphalan und insbesondere As_2O_3 .

Die Kombination mit EA steigert die Effektivität von Doxorubicin, Melphalan und Cisplatin. Die Zytotoxizität von As_2O_3 wird durch Zugabe von EA abgeschwächt.

Die Inkubation mit BSO + EA verstärkt den Wirkmechanismus von As_2O_3 über einen addierenden Effekt der Einzelwirkungen hinaus.

Auf die Wirksamkeit von As_2O_3 als direktem Radikalbildner mit drei Sauerstoffatomen in der Verbindung haben sowohl BSO als auch EA ausgeprägtere Auswirkungen als auf die anderen getesteten Zytostatika.

Die *in-vitro*-Befunde an der Neuroblastomzelllinie LA-N-1 weisen auf eine Einsatzmöglichkeit von As_2O_3 alleine oder in Kombination mit BSO und EA zur Behandlung des Neuroblastoms hin.

Die erwiesene Wirksamkeit von Doxorubicin, Cisplatin und Melphalan in der Therapie des Neuroblastoms könnte durch die kombinierte Gabe mit EA profitieren, wenn auch nur im Grenzbereich hoher klinisch einsetzbarer EA-Konzentrationen. Hier betrug die maximale Wirkungssteigerung durch die kombinierte Gabe mit EA im Vergleich zur Einzelgabe bis zu 100 % für Doxorubicin, 75 % für Cisplatin und bis zu 55 % für Melphalan.

Aufgrund der erhobenen Befunde ergibt sich die Notwendigkeit für weitere *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen zur optimalen Anwendung von Arsen trioxid in der Behandlung des Neuroblastoms.

VIII Literaturverzeichnis

1. Agis H, Weltermann A, Mitterbauer G, Thalhammer R, Edelhäuser M, Seewann HL, Valent P, Lechner K, Fonatsch C, Geissler K (1999)
Successful treatment with arsenic trioxide of a patient with ATRA-resistant relapse of acute promyelocytic leukaemia. *Ann Hematol* 78: 329-332
2. Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K (1999)
Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro. *FEBS Letters* 455: 59-62
3. Anderson CP, Seeger RC, Satake N, Monforte-Munoz HL, Keshelava N, Bailey HH (2001)
Buthionine sulfoximine and myeloablative concentrations of melphalan overcome resistance in a melphalan-resistant neuroblastoma cell line. *J Pediatr Hematol Oncol* Nov. 23 (8): 500-505
4. Andrews PA, Murphy MP, Howell SB (1985)
Differential potentiation of alkylating and platinating agent cytotoxicity in human ovarian carcinoma cells by glutathione depletion. *Cancer Res* 45: 6250-6253
5. Ater JL Chapter 490.
In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB
Nelson Textbook of Pediatrics 17. Auflage
Philadelphia, Pa.: Saunders, c 2004
6. Au WY, Chim CS, Lie AKW, Liang R, Kwong YL (2002)
Combined arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia recurring from previous relapses successfully treated using arsenic trioxide.
British Journal of Haematology 117: 130-132

7. Awasthi S, Singhal SS, He N, Chaubey M, Zimniak P, Srivastava SK, Singh SV, Awasthi YC (1996) Modulation of doxorubicin cytotoxicity by ethacrynic acid. *Int J Cancer* 68: 333-339
8. Bailey HH (1998)
L-S, R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 239-254
9. Barchowsky A, Klei LR, Dudek EJ, Swartz HM, James PE (1999)
Stimulation of reactive oxygen, but not reactive nitrogen species, in vascular endothelial cells exposed to low levels of arsenite. *Free Radical Biology and Medicine* Vol. 27 (11-12): 1405-1412
10. Berthold F Prof. Dr.
Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
NB 2004 Trial Protocol
For Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma.
11. Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Herrmann J, Klingebiel T, Kremens B, Schilling FH, Schrappe M, Simon T, Hero B (2005)
Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 6: 649-658
12. Bittar EE, Dick DAT, Fry DJ (1967)
The action of ethacrynic acid on sodium efflux from single toad oocytes. *J Physiol* 196: 693-701
13. Boldogh I, Roy G, Lee M-S, Bacsı A, Hazra TK, Bhakat KK, Das GC, Mitra S (2003) Reduced DNA double strand breaks in chlorambucil resistant cells are related to high DNA-PKcs activity and low oxidative stress. *Toxicology* 193: 137-152

14. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F et al. (1993)
Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *J Clin Oncol* 11: 1466-1477

15. Burg D, Wielinga P, Zelcer N, Saeki T, Mulder GJ, Borst P (2002)
Inhibition of the multidrug resistance protein 1 (MRP 1) by peptidomimetic glutathione-conjugate analogs.
Molecular Pharmacology 62: 1160-1166

16. Calvert P, Yao K-S, Hamilton TC, O'Dwyer PJ (1998)
Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione.
Chemico-Biological Interactions 111-112: 213-224

17. Chen G, Waxman DJ (1994)
Role of cellular glutathione and glutathione S-transferase in the expression of alkylating agent cytotoxicity in human breast cancer cells.
Biochem Pharmacol Mar 15; 47 (6): 1079-1087

18. Chen G, Waxman DJ (1995)
Identification of glutathione S-transferase as a determinant of 4-hydroperoxycyclophosphamide resistance in human breast cancer cells.
Biochem Pharmacol May 26; 49 (11): 1691-1701

19. Chen X, Carystinos GD, Batist G (1998)
Potential for selective modulation of glutathione in cancer chemotherapy.
Chemico-Biological Interactions 111-112: 263-275

20. Chun Y-J, Park I-C, Park M-J, Woo S-H, Hong S-I, Chung HY, Kim T-H, Lee Y-S, Rhee C-H, Lee S-J (2002)
Enhancement of radiation response in human cervical cancer cells in vitro and in vivo by arsenic trioxide (As₂O₃). *FEBS Letters* 519: 195-200

21. Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing YK (1999)

Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system.

Blood 93: 268-277

22. Doroshow J (1983)

Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridylamino-metasulfon-n-anisidide and neocarzino-statin. Biochem Pharmacol 32: 2935-2939

23. Dreyer ZE, Fernbach DJ Chapter 99.2.

In: Principles and Practice of Pediatrics 2nd Edition

Frank A Oski et al.

J. B. Lippincott Company, Philadelphia 1994

24. Du Y-H, Ho PC (2001)

Arsenic compounds induce cytotoxicity and apoptosis in cisplatin-sensitive and -resistant gynecological cancer cell lines.

Cancer Chemotherapy Pharmacol 47: 481-490

25. Estler C-J

Pharmakologie und Toxikologie; 5. Auflage

Schattauer Verlag

26. Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Martinet D, Fattet S, Bourlout KB, Auderset K, Meier R, Schmutz NB, Delattre O, Joseph JM, Gross N (2006)

Molecular cytogenetic characterization of doxorubicin-resistant neuroblastoma cell lines: Evidence that acquired multidrug resistance results from a unique large amplification of the 7q21 region.

Genes Chromosomes Cancer May 45(5): 495-508

27. Fruehauf JP, Zonis S, Al-Bassam M, Kyshtoobayeva A, Dasgupta C,

Milovanovic T, Parker RJ, Buzaid AC (1998)

Melanin content and downregulation of glutathione S-transferase contribute to the action of L-buthionine-S-sulfoximine on human melanoma.

Chemico-Biological Interactions 111-112: 277-305

28. Fukutomi J, Fukuda A, Fukuda S, Hara M, Terada A, Yoshida M (2006)
Scavenging activity of indole compounds against cisplatin-induced reactive oxygen species. *Life Sciences* 80: 254-257
29. Germain E, Chajès V, Cognault S, Lhuillery C, Bougnoux P (1998)
Enhancement of Doxorubicin cytotoxicity by polyunsaturated fatty acids in the human breast tumor cell line MDA-MB-231: Relationship to lipid peroxidation. *International Journal of Cancer* 75: 578-583
30. German Childhood Cancer Registry
Annual Report 2005 (1980-2004)
Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz
31. Gesellschaft für Bildung und Technik mbH
Formeln und Tabellen 9. Auflage
Paetec 2001
32. Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, Anderson ME (1992)
High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis.
Proc Natl Acad Sci USA 89: 3070
33. Gosland M, Lum B, Schimmelpfennig J, Baker J, Doukas M (1996)
Insights into mechanisms of cisplatin resistance and potential for its clinical reversal. *Pharmacotherapy* 16 (1): 16-39

34. Goto H, Yang B, Petersen D, Pepper KA, Alfaro PA, Kohn DB, Reynolds CP (2003) Transduction of green fluorescent protein increased oxidative stress and enhanced sensitivity to cytotoxic drugs in neuroblastoma cell lines.
Mol Cancer Therapeutics 2: 911-917
35. Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T (1999)
Overexpression of glutathione S-transferase π enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells.
Free Rad Res Vol 31: 549-558
36. Griffith OW (1982)
Mechanism of action, metabolism and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis.
J Biol Chem 257: 13704-13712
37. Gutjahr P (2001) Kapitel 167.1.
In: Lentze MJ, Schaub J, Schulte FJ, Spranger J
Pädiatrie 1. Auflage Springer 2001
38. Hamilton TC, Winkler MA, Louis KG et al. (1985)
Augmentation of Adriamycin, melphalan and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and -sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion. Biochem Pharmacol 34: 2583-2586
39. Hildemann DA (1999)
Reactive oxygen species regulate activation-induced T-cell apoptosis.
Immunity 10: 735-744
40. <http://bloodjournal.hematologylibrary.org>
41. <http://de.wikipedia.org>
42. <http://www.gifte.de>

43. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de>
44. <http://www.vetpharm.uzh.ch>
45. Hudson CE, Kelly MM, Schwartz DA, Schofield DA, DeHaven JE, Schulte BA, Norris JS (1998) Glutathione S-transferase in hormonal carcinogenesis. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 343-350
46. Karlsson J, Edsjö A, Pålman S, Petterson HM (2005) Multidrug-resistant neuroblastoma cells are responsive to arsenic trioxide at both normoxia and hypoxia. *Mol Cancer Therapeutics* 4: 1128-1135
47. Karow T, Lang-Roth R
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2005
48. Kauvar LM, Morgan AS, Sanderson PE, Henner WD (1998) Glutathione based approaches to improving cancer treatment. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 225-238
49. Keller C, Ali-Osman F (1998) Translational inhibition of messenger RNA of the human pi class glutathione S-transferase by antisense oligodeoxyribonucleotides. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 307-323
50. Kovacic P, Osuna JA(Jr.) (2000) Mechanisms of anti-cancer agents: emphasis on oxidative stress and electron transfer. *Curr Pharm Des* 6(3): 277-309
51. Kramer RA, Greene D, Ahmad S, Vistica DT (1987) Chemosensitization of L-phenylalanine mustard by the thiol-modulating agent buthionine sulfoximine. *Cancer Res* 47: 1593-1597
52. Lacreata FP, Brennan JM, Nash SL, Comis RL, Tew KD, O'Dwyer PJ (1994)

Pharmakokinetics and Bioavailability study of Ethacrynic Acid as a modulator of drug resistance in patients with cancer.

The journal of pharmacology and experimental therapeutics 270: 1186-1191

53. Lazo JS, Kuo S-M, Woo ES, Pitt BR (1998)

The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs.

Chemico-Biological Interactions 111-112: 255-262

54. Lehmann S, Bengtzen S, Paul A, Christensson B, Paul C (2001)

Effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on leukemic cells from patients with non-M3 acute myelogenous leukemia: studies of cytotoxicity, apoptosis and the pattern of resistance. European Journal of Haematology 66: 357-364

55. Leonhart R

Lehrbuch Statistik – Einstieg und Vertiefung

Verlag Hans Huber 2004

56. Liu J, Chen H, Miller DS, Saavedra JE, Keefer LK, Johnson DR,

Klaassen CD, Waalkes MP (2001)

Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic.

Molecular Pharmacology 60: 302-309

57. Löffler G

Basiswissen Biochemie 4. Auflage

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

58. Löffler G, Petrides PE

Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage

Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York

59. Lüllmann H, Mohr K

Pharmakologie und Toxikologie 14. Auflage Thieme Verlag

60. Masuda H, Tanaka T, Takahama U (1994)
Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203 (2): 1175-1180
61. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC (1999)
Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group, *N Engl J Med* 341: 1165-1173
62. McManus MJ, Gilchrist GS Chapter 504
In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB
Nelson Textbook of Pediatrics 16. Auflage Philadelphia, Pa.: Saunders, c 2000
63. Mimnaugh EG, Dusre L, Atwell J, Myers CE (1989)
Differential oxygen radical susceptibility of adriamycin-sensitive and -resistant MCF-7 human breast tumor cells. *Cancer Research* 49: 8-15
64. Moscow JA, Townsend AJ, Cowan KH (1989)
Elevation of π class glutathione S-transferase activity in human breast cancer cells by transfection of the GST- π gene and effect on sensitivity to toxins. *Mol Pharmacol* 36: 22-28
65. Mulder GJ, Ouwerkerk-Mahadevan S (1997)
Modulation of glutathione conjugation in vivo: how to decrease glutathione conjugation in vivo or in intact cellular systems in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 105: 17-34
66. Nakagawa K, Saijo N, Tew KD (1990)
Glutathione S-transferase π as a determinant of drug resistance in transfectant cell lines. *J Biol Chem* 265: 4296-4301

67. Nakagawa Y, Akao Y, Morikawa H, Hirata I, Katsu K, Naoe T, Ohishi N, Yagi K (2002) Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. *Life Sciences* 70: 2253-2269
68. Niitsu Y, Takahashi Y, Ban N, Takayama T, Saito T, Katahira T, Umetsu Y, Nakajima T, Ohi M, Kuga T, Sakamaki S, Matsunaga T, Hirayama Y, Kuroda H, Homma H, Kato J, Kogawa K (1998)
A proof of glutathione S-transferase- π -related multidrug resistance by transfer of antisense gene to cancer cells and sense gene to bone marrow stem cell. *Chemico-Biological Interactions* 111-112: 325-332
69. Øra I, Bondesson L, Jönsson C, Ljungberg J, Pörn-Ares I, Garwicz S, Pählman S (2000) Arsenic Trioxide inhibits Neuroblastoma growth in vivo and promotes apoptotic cell death in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277: 179-185
70. Ozols RF, Louis KG, Plowman J et al. (1987)
Enhanced melphalan cytotoxicity in human ovarian cancer in vitro and in tumor bearing nude mice by buthionine sulfoximine depletion of glutathione. *Biochem Pharmacol* 36: 147-153
71. Previati M, Lanzoni I, Corbacella E, Magosso S, Guaran V, Martini A, Capitani S (2006) Cisplatin-induced apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Int J of Molecular Medicine* 18: 511-516
72. Raghu G, Pierre-Jerome M, Dordal MS, Simonian P, Bauer KD, Winter JN (1993)
P-Glycoprotein and alterations in the glutathione/glutathione-peroxidase cycle underlie doxorubicin resistance in HL-60-R, a subclone of the HL-60 human leukemia cell line. *Int J Cancer* 53: 804-811
73. Rao MV, Avani G (2004) Arsenic induced free radical toxicity in brain of mice.

- Indian J Exp Biol May 42 (5): 495-498
74. Récher C, Chopin M, Raffoux E, Pierron G, Poupon J, Sigaux F, Dombret H, Stern MH (2001) In vitro and in vivo effectiveness of arsenic trioxide against murine T-cell prolymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology* 117: 343-350
75. Robertson KA Chapter 135
In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB
Nelson Textbook of Pediatrics 16. Auflage Philadelphia, Pa.: Saunders, c 2000
76. Roller A, Weller M (1998)
Antioxidants specifically inhibit cisplatin cytotoxicity of human malignant glioma cells. *Anticancer Research* 18: 4493-4498
77. Sachs L
Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden 11. Auflage
Springer 2003
78. Sakurai T, Ochiai M, Kojima C, Ohta T, Sakurai MH, Takada NO, Qu W, Waalkes MP, Fujiwara K (2004)
Role of glutathione in dimethylarsinic acid-induced apoptosis.
Toxicology and Applied Pharmacology 198: 354-365
79. Satoh K (1995) The high non-enzymatic conjugation rates of some glutathione S-transferase (GST) substrates at high glutathione concentrations.
Carcinogenesis 16: 869-874
80. Seidegard J, Pero RW, Markowitz MM, Roush G, Miller DG, Beattie EJ (1990)
Isoenzyme(s) of glutathione transferase as a marker for the susceptibility to lung cancer: a follow up study. *Carcinogenesis* 11(1): 33-36
81. Sinha BK, Mimnaugh EG (1990)

Free radicals and anticancer drug resistance: oxygen free radicals in the mechanisms of drug cytotoxicity and resistance by certain tumors.

Free Radical Biology and Medicine Vol. 8: 567-581

82. Sitzmann FC

Duale Reihe Pädiatrie 3. Auflage 1995, 2007 Georg Thieme Verlag KG

83. Soignet SL (2006) Clinical experience of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukaemia. Memorial Sloan Kettering Cancer Center and Department of Medicine, and the Joan and Sanford Weill Medical College of Cornell University, New York, New York, USA

84. Somfai-Relle S, Suzukake K, Vistica DT (1984)

Reduction in cellular glutathione by buthionine sulfoximine and sensitization of murine tumor cells resistant to L-phenylalanine mustard.

Biochem Pharmacol 33: 485-490

85. Strange RC, Lear JT, Fryer AA (1998)

Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancer.

Chemico-Biological Interactions 111-112: 351-364

86. Suzukake K, Petro BJ, Vistica DT (1983)

Dechlorination of L-phenylalanine mustard by sensitive and resistant tumor cells and its relationship to intracellular glutathione content.

Biochem Pharmacol 32(1): 165-167

87. Technical Bulletin No. 112

CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay

Promega

88. Tew KD, O'Brien M, Laing NM, Shen H (1998)

Coordinate changes in expression of protective genes in drug-resistant cells.

Chemico-Biological Interactions 111-112: 199-211

89. Tirona RG, Pang KS (1999) Bimolecular glutathione conjugation kinetics of ethacrynic acid in rat liver: in vitro and perfusion studies.
The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 290: 1230-1241
90. Townsend AJ, Fields WR, Haynes RL, Doss AJ, Li Y, Doehmer J, Morrow CS (1998) Chemoprotective functions of glutathione S-transferases in cell lines induced to express specific isozymes by stable transfection.
Chemico-Biological Interactions 111-112: 389-407
91. Troyano A, Fernandez C, Sanco P, DeBlas E, Aller P (2001)
Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation.
Journal of Biol Chem 276: 47107-47115
92. Woo SH, Park I-C, Park M-J, Lee H-C, Lee S-J, Chun Y-J, Lee S-H, Hong S-I, Rhee CH (2002) Arsenic trioxide induces apoptosis through a reactive oxygen species-dependent pathway and loss of mitochondrial membrane potential in HeLa cells. International Journal of Oncology 21: 57-63
93. Wozniak K, Czechowska A, Blasiak J (2004)
Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571.
Chemico-Biological Interactions 147: 309-318
94. Wu XX, Ogawa O, Kakehi Y (2004)
Enhancement of arsenic trioxide-induced apoptosis in renal cell carcinoma cells by L-buthionine sulfoximine. International Journal of Oncology 24: 1489-1497
95. Xu BH, Singh SV (1992) Potentiation of mitomycin C cytotoxicity by glutathione depletion in a multi-drug resistant mouse leukemia cell line.
Cancer Letters 66: 49-53
96. Yoshida M, Fukumoto M, Kishimoto T, Yamamura Y, Shimizu H,

Sakai O (1993) Effects of zinc, selenium and calcium on the nephrotoxicity of cadmium in primary cultures of rat renal proximal epithelial cells.

Biological Trace Element Research 36: 219-227

97. Yoshida M, Fukuda A, Hara M, Terada A, Kitanaka Y, Owada S (2003)

Melatonin prevents the increase in hydroxyl radical-spin trap adduct formation caused by the addition of cisplatin in vitro. Life Sci 72: 1773-1780

98. Zaman GJR, Lankelma J, Tellingan van O, Beijnen J, Dekker H, Paulusma C, Oude Elferink RPJ, Baas F, Borst P (1995)

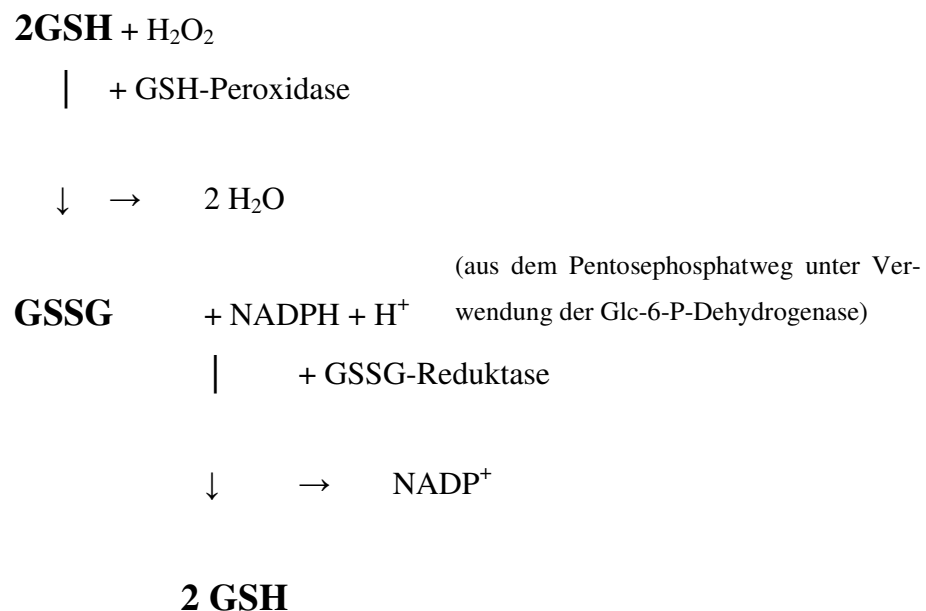
Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. Proc Natl Acad Sci USA 92: 7690-7694

IX Anhang

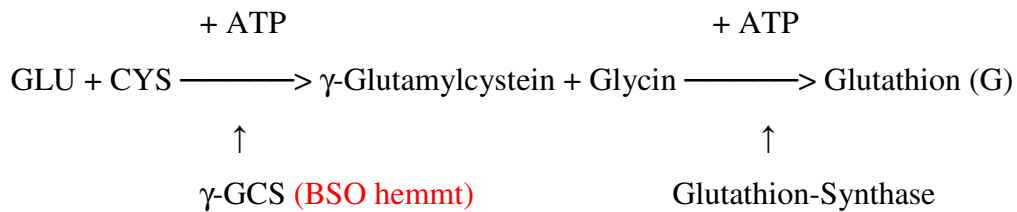
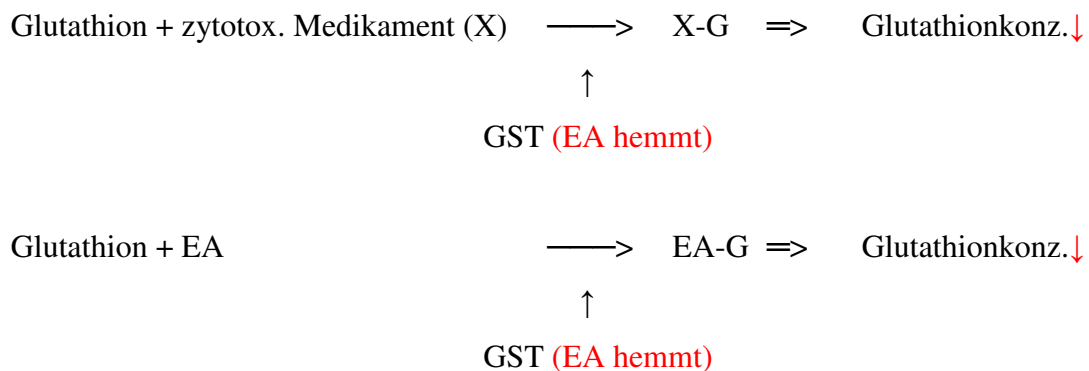
1 Abbildungen

Abbildung A:

GLUTATHION- REDOX- WEG



Für die Entgiftung eines Teils Wasserstoffperoxid werden zwei Teile Glutathion (GSH: 98 % des Glutathions liegen in reduzierter Form vor) und die GSH-Peroxidase benötigt. Unter ihrer Einwirkung entstehen zwei Teile Wasser sowie ein Teil oxidiertes Glutathion (GSSG: Glutathiondisulfid). Das entstandene GSSG kann unter Verwendung von NADPH + H⁺ (aus dem Pentosephosphatweg kommend) und der Glutathiondisulfidreduktase (GSSG-Reduktase) regeneriert werden. Endprodukt und neuer Ausgangspunkt sind zwei Teile Glutathion und ein Teil NADP⁺, welches wieder in den Pentosephosphatweg eingeht.

Abbildung BWIRKMECHANISMUS von BSOWIRKMECHANISMUS von EA

Glutathion ist ein Tripeptid, dessen Synthese enzymkatalysiert unter Verbrauch von zwei ATP (aus der Glykolyse kommend) abläuft. Glycin, Glutamat und Cystein sind die Ausgangssubstanzen. Die geschwindigkeitsbestimmenden sowie der Feedback-Hemmung zugänglichen Punkte sind die Cysteinkonzentration und die γ -GCS.

BSO hemmt die γ -GCS; EA senkt u.a. durch Verbrauch den GSH-Spiegel und ist reversibler Inhibitor der GST. Die GST katalysiert die Bindung von Abzubauenem an GSH. Das Konjugat wird ausgeschleust. Die Hemmung der GST und der Abfall des GSH-Spiegels führen zu einem intrazellulären Anstieg nicht abgebauter, toxischer (für die Zelle) Substanzen.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Erttmann für die Bereitstellung des Themas und seine Unterstützung bei der Gestaltung dieser Arbeit bedanken!

Ich möchte Herrn Guido Looft für die Betreuung und seine große Hilfsbereitschaft danken!

Vielen Dank auch an die Klinik und Poliklinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Bereitstellung aller für diese Arbeit notwendigen Materialien und Räumlichkeiten.

Vielen Dank für die freundliche Aufnahme in Ihr Team!

Ich möchte mich bei meinen Eltern bedanken! Ohne Euch hätte diese Arbeit nicht von mir geschrieben werden können.

Ich möchte Dr. Florian Albers für seine Anregungen und die investierte Zeit danken!

Vielen Dank an Uwe Eilers, Hilke Mellin und Prof. Dr. Dr. Hans-Karl Albers für die Anmerkungen und Korrekturarbeiten!

Lebenslauf

| | |
|-----------------------|--|
| Name | Miriam Eilers |
| Geburtstag und -ort | 28. Februar 1982 in Hamburg |
| Eltern | Irmgard Eilers, Erzieherin Uwe Eilers, Dipl. Rechtspfleger (FH) |
| Schulbildung | |
| 1988-1992 | Grundschule Altrahlstedt in Hamburg |
| 1992-2001 | Gymnasium Meiendorf in Hamburg |
| 21.06.2001 | Abitur |
| Studium | |
| 2001-2002 | Physik an der Universität in Hamburg |
| 2002-2008 | Humanmedizin am Universitäts-Krankenhaus-Eppendorf in Hamburg |
| September 2004 | Physikum |
| 2007-2008 | Praktisches Jahr in den Asklepios Kliniken Nord und Barmbek |
| Oktober 2008 | 2. Staatsexamen |
| Besondere Tätigkeiten | |
| 1998-1999 | Schulsprecherin |
| 1999-2001 | Mitglied der Schulkonferenz |

Erklärung

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem anderen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 01.02.2010