

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Kinderheilkunde
- Pädiatrische Hämatologie/Onkologie -
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens -

**Untersuchungen zur Zytotoxizität
von Alkylanzien, Topoisomerasehemmstoffen und Ukrain
auf vier humane Ewing-Sarkom-Zelllinien**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Nolting, Dorothea-Maria
geb. Kühn
aus Münster

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Münster.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Boos

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Zühlsdorf

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 03. 2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinderheilkunde
- Pädiatrische Hämatologie/Onkologie -
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens -
Referent: Univ.-Prof. Dr. J. Boos
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. M. Zühlendorf
ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur Zytotoxizität von Alkylanzien, Topoisomerasehemmstoffen und Ukrain auf vier humane Ewing-Sarkom-Zelllinien

Dorothea-Maria Nolting

Obwohl die WHO das Ewing-Sarkom (ES) als chemotherapiesensiblen Tumor einstuft, gibt es für diese Erkrankung keine systematischen Untersuchungen zur in-vitro-Zytotoxizität von etablierten und innovativen Zytostatika im Screening-Programm des NCI. In der vorliegenden Arbeit sollte daher die zytotoxische Wirkung verschiedener etablierter und neuer Zytostatika allein und in Kombination repräsentativ auf 4 ES-Zelllinien untersucht werden. Im Einzelnen wurden 2 alkylierende Substanzen, 2 Topoisomerasehemmstoffe, der umstrittene Wirkstoff Ukrain und ein Chelidonium majus L.-Präparat (Schöllkraut) nach Inkubation über 24 h, 48 h, 72 h und 96 h mittels modifiziertem MTT-Assay getestet.

Die beim ES etablierten Substanzen Cyclophosphamid und Etoposid zeigten sich in vitro wirksam in Konzentrationen, die auch im Plasma therapeutisch erreicht werden können. Zudem konnte die Wirksamkeit von Topotecan und ThioTEPA auf ES-Zellen in vitro nachgewiesen werden. Topotecan übte den größten wachstumshemmenden Effekt aller getesteten Substanzen aus in Konzentrationen, die auch in vivo gut erreicht werden können. ThioTEPA zeigte deutliche Wachstumshemmung in Konzentrationen, die nach einer hochdosierten Applikation erreichbar sind. Erstmals konnten außerdem antiproliferative Effekte für Ukrain und Chelidonium majus L. auf ES-Zellen in vitro nachgewiesen werden.

Die getesteten Koinkubationen von Cyclophosphamid/Etoposid, Cyclophosphamid/Topotecan, Etoposid/Topotecan und ThioTEPA/Chelidonium majus L. zeigten sich insgesamt deutlich effektiver als die Einzelinkubation mit dem jeweils zweitgenannten Zytostatikum in gleichen Konzentrationen. Im Vergleich der Kombinationen erwies sich Cyclophosphamid/Topotecan als am besten wirksam.

Fazit: Der MTT-Assay erwies sich als geeignet zur Beurteilung der Wirksamkeit von Einzelsubstanzen und deren Kombinationen auf ES-Zellen: Die Wirksamkeit der beim ES etablierten Substanzen Cyclophosphamid und Etoposid konnte mit der durchgeführten Testung bestätigt werden. Auch das Screening von Topotecan und ThioTEPA lieferte vielversprechende Ergebnisse, so dass sie nach weiteren Untersuchungen im Behandlungskonzept für Hochrisiko-Patienten zukünftig verstärkt Berücksichtigung finden könnten.

Die Koinkubation Cyclophosphamid/Topotecan zeigte in vitro die beste Wirksamkeit. Sie könnte auch in vivo eine erfolgreiche Kombination darstellen; insbesondere im fortgeschrittenen Krankheitsstadium im Hinblick auf die oftmals von Resistenzen betroffenen herkömmlichen Medikamente. Diese Hypothese wird durch verschiedene erste klinische Untersuchungen mitgetragen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Toxizitätstests können somit wichtige Anhaltspunkte bezüglich der relativen Wirksamkeit von Zytostatika und deren Kombination liefern. Potentiell wirksame Medikamente müssen in nachfolgenden präklinischen und klinischen Studien weiter erprobt werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 08. 03. 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Ewing-Sarkom.....	1
1.1.1	Definition und Ätiologie.....	1
1.1.2	Epidemiologie.....	1
1.1.3	Histologie und Molekulargenetik.....	2
1.1.4	Lokalisation und Metastasierung.....	2
1.1.5	Klinische Präsentation und Leitsymptome.....	3
1.1.6	Diagnostik.....	3
1.1.7	Stadieneinteilung.....	4
1.1.8	Therapie.....	4
1.1.9	Nachsorge und Spätfolgen.....	6
1.1.10	Prognose.....	6
1.2	Screeningprogramm des National Cancer Institute (NCI).....	6
1.3	Eingesetzte Zytostatika.....	8
1.3.1	Alkylierende Verbindungen.....	8
1.3.1.1	Wirkmechanismus.....	8
1.3.1.2	Cyclophosphamid.....	9
1.3.1.3	ThioTEPA.....	10
1.3.2	Topoisomerasehemmer.....	11
1.3.2.1	Etoposid.....	11
1.3.2.2	Topotecan.....	13
1.3.3	Ukrain und Chelidonium majus L.....	15
1.3.3.1	Ukrain.....	15
1.3.3.2	Chelidonium majus L. (Schöllkraut, Papaveraceae).....	18
1.4	Zielsetzung/Fragestellung.....	21
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Zelllinien.....	23
2.1.2	Zytostatika.....	24
2.1.3	Lösungen und Reagenzien.....	25
2.1.4	Einmal-Laborbedarf.....	26
2.1.5	Geräte.....	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Pflege der Zellkulturen.....	28
2.2.1.1	Das Einfrieren.....	28

2.2.1.2	Das Auftauen	28
2.2.1.3	Das Passagieren/Teilen	28
2.2.1.4	Das Aussiedeln	29
2.2.2	Durchführung der in-vitro-Toxizitätstests	29
2.2.2.1	Wachstumskurven.....	29
2.2.2.2	Testung der Lösungsmittel.....	30
2.2.2.3	Verdünnungsreihen der Prüfsubstanzen.....	30
2.2.2.4	Inkubation mit Zytostatikalösung	32
2.2.2.5	MTT-Assay	33
2.2.2.6	Kombinationsversuche.....	33
2.2.3	Datenauswertung	35
2.2.3.1	Ansatzgröße	35
2.2.3.2	Definition der GI50 und LC50.....	35
2.2.3.3	Graphische Darstellung der GI50	35
2.2.3.4	Berechnung der GI50/LC50.....	36
2.2.3.5	Reproduzierbarkeit.....	36
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Ergebnisse der Wachstumskurven	46
3.2	Einfluss der Lösungsmittel	46
3.3	Ergebnisse der in-vitro-Toxizitätstests.....	47
3.3.1	Graphische Darstellung der Einzelsubstanzen.....	47
3.3.1.1	4-OOH-Cyclophosphamid	47
3.3.1.2	ThioTEPA	48
3.3.1.3	Etoposid	49
3.3.1.4	Topotecan.....	50
3.3.1.5	Ukrain	51
3.3.1.6	Chelidonium majus L. (Schöllkraut).....	52
3.3.2	50 %-ige Wachstumshemmung (GI50)	53
3.3.2.1	Graphisch ermittelte GI50-Werte	53
3.3.2.2	Berechnung der GI50/LC50-Werte.....	54
3.3.3	Zusammenfassung und Vergleich der antiproliferativen Wirkung der Einzelsubstanzen.....	57
3.3.3.1	Alkylanzien	57
3.3.3.2	Topoisomerasehemmer	57
3.3.3.3	Ukrain, Chelidonium majus L. und ThioTEPA	58
3.3.4	Rangfolge der 6 Testsubstanzen	58
3.3.5	Chemosensitivität der Zelllinien.....	59
3.3.6	Graphische Darstellung der Kombinationsversuche.....	60

3.3.6.1	Koinkubation der Zelllinien mit 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid	61
3.3.6.2	Koinkubation der Zelllinien mit 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan	65
3.3.6.3	Koinkubation der Zelllinien mit Etoposid/Topotecan.....	68
3.3.6.4	Koinkubation der Zelllinien mit ThioTEPA/Chelidonium majus L.	71
3.3.7	Zusammenfassung und Vergleich der antiproliferativen Wirkung der Kombinationen..	74
3.3.7.1	Berechnung der LC50-Werte	74
3.3.7.2	Cyclophosphamid/Etoposid versus Cyclophosphamid/Topotecan	75
3.3.7.3	Etoposid/Topotecan	76
3.3.7.4	ThioTEPA/Chelidonium majus L. versus Ukrain.....	76
4	Diskussion	77
4.1	In-vitro-Chemosensitivitätstestung	77
4.1.1	Bedeutung und Potential von Vorhersage-Assays.....	77
4.1.2	MTT-Assay im Vergleich.....	78
4.2	Zur Durchführung der in-vitro-Toxizitätstests.....	79
4.2.1	Inkubationszeit.....	79
4.2.2	Reproduzierbarkeit	80
4.3	Antiproliferative Wirkung der Testsubstanzen	80
4.3.1	4-OOH-Cyclophosphamid.....	80
4.3.2	ThioTEPA.....	82
4.3.3	Etoposid.....	83
4.3.4	Kombination 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid.....	85
4.3.5	Topotecan	86
4.3.6	Kombination 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan	87
4.3.7	Kombination Etoposid/Topotecan	88
4.3.8	Ukrain	90
4.3.9	Chelidonium majus L. (Schöllkraut)	93
4.3.10	Kombination ThioTEPA/Chelidonium majus L.	94
4.4	Einfluss von Resistenzmechanismen auf die Chemosensitivität der Zelllinien.....	95
5	Zusammenfassung	100
6	Literatur	104
7	Danksagung	119

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung		(50 %-ige letale Konzentration)
aES	atypisches Ewing Sarkom	LD50	Lethal dose of 50 %
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit	LDH	Laktatdehydrogenase
bzw.	beziehungsweise	m ²	Quadratmeter
°C	Grad Celsius	MDR	Multidrug-Resistance
ca.	cirka	mg	Milligramm
4-OOH-Cyclo	4-Hydroxyperoxycyclophosphamid	min	Minute(n)
4-OH-Cyclo	4-Hydroxycyclophosphamid	ml	Milliliter
cm ²	Quadratzentimeter	MRT	Magnetresonanztomographie
Chelidonium m.	Chelidonium majus L.	MTD	maximal-tolerierte-Dosis
CO ₂	Kohlendioxid	MTT	Dimethylthiazoldiphenyl- tetrazoliumbromid
CR(s)	Complete Remission(s)		
CRP	C-reaktives Protein	μl	Mikroliter
CT	Computertomographie	μM	Mikromolar
Cyclo	Cyclophosphamid	NAD(P) ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid- (Phosphat)
d	Tag(e)		
dest.	destilliert	NB	Neuroblastom
d.h.	das heißt	NCI	National Cancer Institute
DMSO	Dimethylsulfoxid	NES	Neuronenspezifische Enolase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	(N)SCLC	(Non)-Small-Cell-Lung-Cancer
EFT	Ewing Family of Tumors	PAS	p-Aminosalicylsäure
ES	Ewing-Sarkom	P-gp	P-Glykoprotein
Eto	Etoposid	(m)PNET	(maligner)Peripherer Neuroektodermaler Tumor
FCS	Foetal Bovine Serum		
G-CSF	Granulocyte-Colony-Stimulating Factor	PR(s)	Partial Remission(s)
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage-Colony- Stimulating Factor	RMS	Rhabdomyosarcoma
GI50	Growth Inhibition of 50 % (50 %-ige Wachstumshemmung)	RNA	Ribonukleinsäure
Gy	Gray	rpm	rounds per minute
h	Stunde(n)	RT-PCR	Reverse-Transcriptase- Polymerase-chain-reaction
H ₂ O	Wasser	SD(s)	Stable Disease(s)
HWZ	Halbwertszeit	Tab.	Tabelle
IC50	Inhibition Concentration of 50 % (50 %-ige Wachstumshemmung)	TGI	Total Growth Inhibition
i.v.	intra venös	ThioT	ThioTEPA
kg	Kilogramm	TMI	Total Marrow Irradiation
l	Liter	TNM	Stadieneinteilung maligner Tu. nach Größe, Lymphknotenbefall und Fernmetastasen
LC50	Lethal Concentration of 50 %	Topo	Topotecan

u.a.	unter anderem
vergl.	vergleiche
VP ₁₆	Etoposid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Ewing-Sarkom

1.1.1 Definition und Ätiologie

Zur Familie der Ewing-Tumoren (EFT) zählen das klassische Ewing-Sarkom (ES), das atypische ES (aES), der maligne Periphere Neuroektodermale Tumor (mPNET) und der Ashkin-Tumor der Brustwand [4,131]. Charakteristisch für diese Tumor-Gruppe ist ein gemeinsames Chromosom 22-Rearrangement - in 90 % der Fälle transloziert das EWS-Gen von Chromosom 22 auf FLI-1 auf Chromosom 11 [41,122]. Es handelt sich um einen unreifen mesenchymalen Tumor mit Tendenz zur neuronalen Differenzierung [83,131]. Die Ätiologie der Erkrankung ist weitgehend ungeklärt [83].

1.1.2 Epidemiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von ca. drei Fällen pro eine Million bei den unter 15jährigen Kindern sind die Ewing-Sarkome die zweithäufigsten primär malignen Knochentumoren dieser Altersstufe [122,131]. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt in der Zeit vom zehnten bis fünfzehnten Lebensjahr. Selten sind Kinder vor dem fünften und Erwachsene nach dem dreißigsten Lebensjahr betroffen (vergl. Abb. 1) [35,71,131]. Beim Ewing-Sarkom zeigt sich eine männliche Prädisposition von 1,5:1 [71,123]. 15-30 % der Patienten weisen bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen in der Lunge und/oder dem Skelettsystem auf [4,123,124].

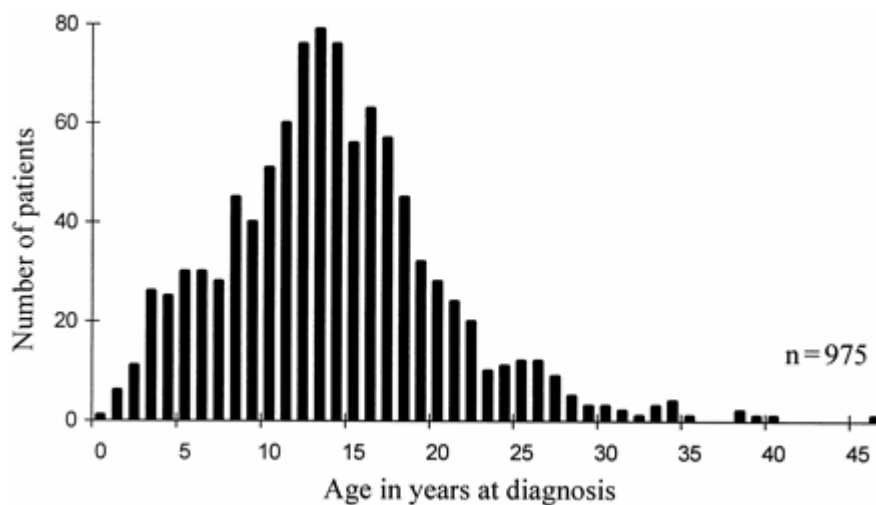


Abb. 1: Altersverteilung beim ES zum Diagnosezeitpunkt [35].

1.1.3 Histologie und Molekulargenetik

Pathognomonisch für das Ewing-Sarkom ist der molekulargenetische Nachweis einer der Translokationen $t(11;22)(q24;q12)$, $t(21;22)(q22;q12)$, oder $t(7;22)(p22;q12)$ und ihrer spezifischen Genfusionstranskripte mittels RT-PCR. Auch das MIC-2-Antigen (CD99) ist bei nahezu allen Ewing-Tumoren nachweisbar [4,124].

Histologisch zählen die Ewing-Tumoren zu der Gruppe der monomorphen, klein-blau- und rundzelligen Tumoren [124]. Das klassische ES exprimiert keine neuronalen Marker, während das atypische ES durch eine großzellige Morphologie und/oder den Nachweis eines neuronalen Markers charakterisiert ist [123].

Für die Diagnostik ist die Bestimmung von Glykogen (PAS-Reaktion) und der neuronalen Marker Neuronenspezifische Enolase (NSE), Protein S-100, Leu-7, PGP 9.5 und Synaptophysin zur Differenzierung in Ewing-Sarkom (ES), atypisches ES (aES) und malignen Peripheren Neuroektodermalen Tumor (mPNET) wesentlich [142]. Der mPNET zeichnet sich durch Bildung von Pseudorosetten (Homer-Wright-Rosetten), Neurofilamenten und/oder der Expression von mindestens zwei neuronalen Markern aus [131]. Des Weiteren wird die Positiv-Bestimmung der mesenchymalen Marker Vimentin und Zytokeratin differenzialdiagnostisch ausgewertet. Alle Ewing-Sarkome werden histopathologisch als hochmaligne (G3) klassifiziert [123]. Ob der Nachweis des mit Chemotherapieresistenz assoziierten P-Glykoproteins (P-gp) beim Ewing-Sarkom prognostische Bedeutung hat, wird kontrovers beurteilt [73,125,131,132].

1.1.4 Lokalisation und Metastasierung

Das Ewing-Sarkom zeigt intramedulläre, gewöhnlich diaphysäre Ausdehnung und transkortikalen Weichteildurchbruch [131].

Die Primärtumoren sind zu etwa 45 % am Stamm und zu etwa 55 % in den Knochen der Extremitäten zu finden (siehe Abb. 2) [2,35].

Oft sind die Ewing-Sarkome bei Diagnosestellung bereits über 100 ml groß [2,120]. Dies ist auf ein unentdecktes Tumorwachstum im Bereich von benachbarten Körperhöhlen (Becken, Thorax) und/oder großen Muskeln (Femur) zurückzuführen [35,124].

Klinisch wird zwischen einer primär metastasierten (15-30 % der Fälle) und einer primär lokalisierten Erkrankung unterschieden [124]. Die systemische Metastasierung erfolgt mit vergleichbarer Inzidenz in die Lunge und die Knochen bzw. das Knochenmark. Eine lymphonoduläre Metastasierung ist extrem selten [83].

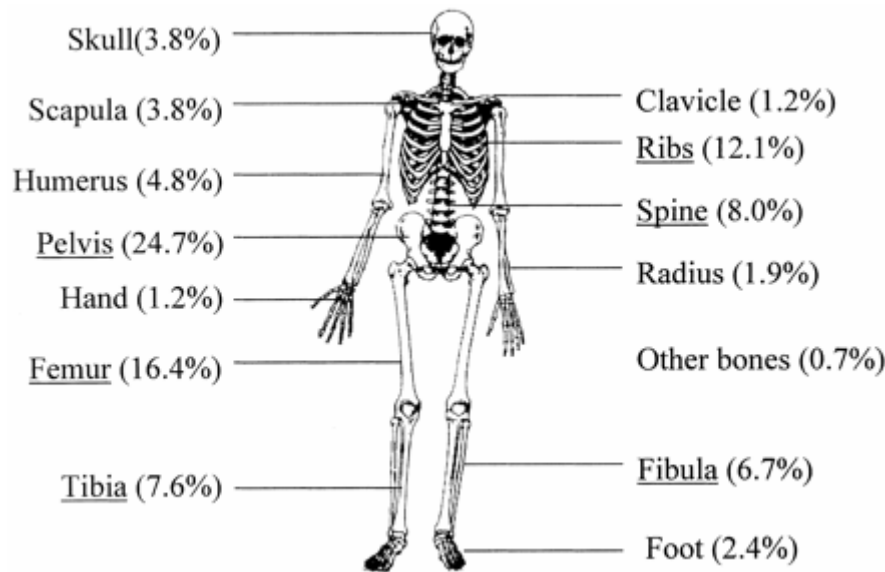


Abb. 2: Lokalisation der Primärtumoren bei 975 Patienten mit Ewing-Sarkom [35].

1.1.5 Klinische Präsentation und Leitsymptome

Das klinische Kardinalsymptom ist der lokale Schmerz und die Schwellung der betroffenen Extremität [123,124]. Lokale Überwärmung oder febrile Episoden lassen oft zunächst eine Osteomyelitis, die wichtigste klinische Differentialdiagnose des Ewing-Sarkoms, vermuten [83,131]. Später tritt ein Funktionsverlust der betroffenen Körperpartie ein. Laborchemisch kann sich das Ewing-Sarkom in Korrelation mit dem Tumolvolumen durch erhöhte Serumspiegel für LDH, Ferritin und CRP darstellen; die BSG ist beschleunigt [123].

1.1.6 Diagnostik

Zur initialen Diagnostik bei klinischem Verdacht sind sowohl bildgebende Verfahren, als auch eine anschließende Biopsie zur definitiven Diagnosestellung unabdingbar. Die radiologische Diagnostik der Primärtumorregion und Verlaufskontrollen umfassen die konventionelle Röntgendiagnostik, die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) - zur exakten Größen- und Lagebestimmung - und eventuell die Sonographie [2,120,123].

Es lässt sich eine oft zirkuläre Periostabhebung mit gelegentlicher Destruktion der Kortikalis darstellen, sowie eine zum Teil erhebliche Weichteilkomponente [124,131].

Die Biopsie dient der Gewinnung von adäquatem Tumormaterial zur histologischen und molekularbiologischen Diagnostik. Der Stichkanal muss später in die chirurgischen bzw. radiologischen Therapiemaßnahmen einbezogen werden, da ansonsten die Gefahr einer sekundären Dissemination besteht [124].

1.1.7 Stadieneinteilung

Beim Ewing-Sarkom existiert keine einheitliche Definition von TNM-Stadien, weil die meisten Ewing-Tumoren bei Diagnosestellung bereits eine Weichteilkomponente aufweisen, allerdings äußerst selten Lymphknotenmetastasen zu finden sind. Man unterscheidet daher lediglich zwischen lokoregionärer Erkrankung (Stadium II) und der primär hämatogen disseminierten Erkrankung (Stadium IV) in Lunge und/oder Knochen bzw. Knochenmark [124]. Letztere ist signifikant häufiger bei Primärtumoren im Becken, bei Tumoren größer 100 ml und beim mPNET [35,70].

Bei lokoregionärem Befund wird das Tumolvolumen als Stratifikationskriterium für die folgende Behandlungsintensität berücksichtigt [2,83,120]. Die Prognose wird außerdem u.a. von der Tumorlokalisation [15,35,83,84,117,147], primären Metastasen [15,35,147] und dem Tumoransprechen auf die Chemotherapie [15,84,117,120,133,147] beeinflusst.

1.1.8 Therapie

Da die 5-Jahres-Überlebensrate bei alleiniger Lokaltherapie unter 10 % liegt, besteht der heutige Behandlungsstandard für alle Stadien der Erkrankung weltweit in einer Kombination aus systemischer Multi-Chemotherapie und Lokaltherapie [19,50,53,84]. An die bioptische Diagnosesicherung schließt sich die ca. 10 Monate dauernde Therapie mit initialer mehrwöchiger Chemotherapie, anschließender Lokaltherapie, und folgender erneuter Chemotherapie an [49,84].

Lokaltherapeutisch bestehen chirurgische und radiotherapeutische Optionen, oft auch in Kombination angewendet. Der Tumor sollte möglichst komplett reseziert werden [120]. Ist dies nicht durchführbar, erfolgt eine kurative, fraktionierte Radiatio bis 60 Gy Tumordosis. Bei postoperativer Bestrahlung werden in Abhängigkeit von der Tumorfreiheit des Resektionsrandes und des histologischen Ansprechens auf die primäre Chemotherapie Dosen zwischen 45 und 55 Gy eingesetzt [44,147]. Bei alleiniger Radiatio ist die Lokalrezidivrate deutlich höher [147].

Bei der systemischen Behandlung kommt standardmäßig eine Kombinations-Chemotherapie zum Einsatz. Die größte Bedeutung haben die zwei Substanzgruppen der Alkylanzien und der Anthrazykline. Außerdem werden Etoposid (VP16), Actinomycin D und Vincaalkaloide verwendet. Als Standardregime bei lokalisierter Erkrankung hat sich eine Vierer-Kombination als am wirkungsvollsten erwiesen (Studien: CESS 81 und CESS 86) [84,147]: Vincristin, Actinomycin D, Cyclophosphamid und Adriamycin (VACA), oder Ifosfamid zusätzlich zu, oder anstelle von Cyclophosphamid (VAIA) [44,120,133,147]. Auch erprobt man in kontrollierten Studien mit unterschiedlichem Ergebnis den Einsatz von Etoposid im konventionellen Schema (EVAIA - im Rahmen

von EICESS 92), oder in intensivierten Programmen, um die Kombination von Alkylanzien mit Etoposid zu testen [94,104].

Im primär metastasierten Stadium IV der Erkrankung erfolgt die Behandlung prinzipiell wie bei Patienten mit lokalisiertem Befund. Bei Lungenmetastasen führt eine zusätzliche Ganzlungenbestrahlung mit 15-18 Gy zu einer Verbesserung der 5-Jahres-Prognose um ca. 10 % auf 36 % [119]. Im Rahmen kontrollierter klinischer Studien wird der Stellenwert von Hochdosis-Regimen mit unterschiedlichen Alkylanzien, kombiniert mit autologem Knochenmarks- oder Blutstammzell-Rescue, untersucht [49,56,67,92,94,102,120,127].

Bei Progredienz der Erkrankung unter Chemotherapie besteht die Option eines Therapievorsuches z.B. mit Taxanen [124], Topoisomerase-I-Inhibitoren (Topotecan) [93,124,140] und liposomalen Anthrazyklinen im Rahmen von Phase-II-Studien [124].

In der Rezidivsituation ist die Dauer des rezidivfreien Intervalls entscheidend [56]: Beim Frührezidiv wird die Prognose bei Therapieansprechen durch eine konsolidierende Hochdosistherapie verbessert. Bei Rezidiven nach längerem Intervall kann eine erneute Remission mit dosisintensivierten Chemokombinationen von Cyclophosphamid-Etoposid [27] oder Ifosfamid-Etoposid erreicht werden [124].

Die Abbildung 3 zeigt das aktuelle Therapieprotokoll der „EUROpean Ewing Tumor Working Initiative of National Groups - EURO-E.W.I.N.G.“, die sich 1999 aus bestehenden Forschungsgruppen aus mehreren Europäischen Ländern zu einer großen, multiinstitutionellen Studie zusammengeschlossen hat [49]. Als Standardtherapie wird über 16 Wochen die VIDE-Kombination gegeben. Nach 6 Zyklen VIDE werden verschiedene Randomisierungen (R1-R3) in Abhängigkeit von Tumervolumen, pathohistologischem Ansprechen, lokaler Therapie und initialer Metastasierung vorgenommen. Nach Abschluss des lokaltherapeutischen Vorgehens (OP/Radiatio) erhalten alle Patienten zunächst einen Zyklus VAI, anschließend folgt die weitere Therapie nach der entsprechenden Randomisierung (R1-R3) [49].

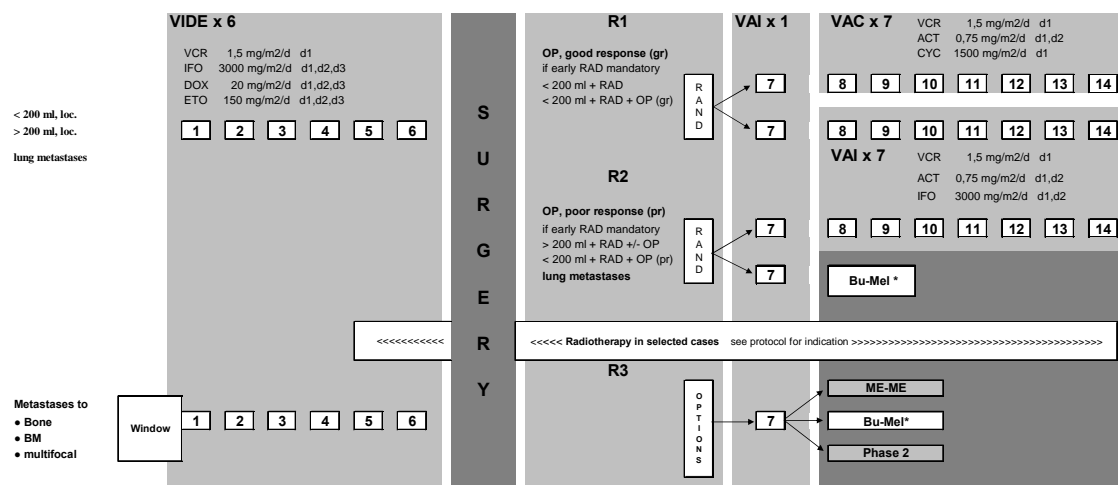


Abb. 3: Therapieprotokoll EURO-E.W.I.N.G. 99 [49].

1.1.9 Nachsorge und Spätfolgen

Da ca. 2/3 der Rezidive in den ersten zwei Jahren nach Therapieende beobachtet werden, ist das Rezidivmonitoring in den ersten zwei bis fünf Jahren am intensivsten durchzuführen. Nach einem Zeitraum von fünf Jahren werden Rezidive am Primärtumorort, der Lunge und des Skelettsystems seltener [123].

Spätfolgen können, verursacht durch die hochdosierte Medikamentengabe und Radiatio, das Herz, die Nieren, die Gonaden, die Lunge, die Leber, endokrine Organe und den Bewegungsapparat (nach rekonstruktiver oder ablativer Chirurgie) betreffen [120,123,124].

Man beobachtet außerdem nach der Therapie auftretende Sekundärmalignome wie akute myeloische Leukämie und Sarkome, selten Karzinome [43,118,120,121,123].

1.1.10 Prognose

Die Prognose wird bestimmt von der Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose (Primärtumorvolumen und -lokalisierung, Dissemination) und der durchgeführten Therapie [84,118]. Die Tabelle 1 zeigt deutlich die verbesserte Prognose der Erkrankung seit Etablierung der modernen neoadjuvanten Therapieansätze. Während unter alleiniger Lokaltherapie maximal 10 % der Erkrankten ereignisfrei überlebten, stieg die Rate bei den Patienten mit lokoregionaler Erkrankung auf 55-70 % unter Lokal- und Systemtherapie [44,84,104,120,121,122,147].

Allerdings ist die Prognose für Patienten im Stadium IV der Erkrankung, sowie mit einem Rezidiv mit ca.15-27 % weiterhin sehr schlecht; insbesondere bei disseminiertem Befall des Skelettsystems [35,118].

Tabelle 1: 5- bis 10-Jahres-Überlebensraten beim ES [84,118].

Lokoregionäre Erkrankung, alleinige Lokaltherapie	< 10 %
Lokoregionäre Erkrankung, Lokal- und Systemtherapie	~ 60 %
Primär pulmonal metastasierte Erkrankung, Lokal- und Systemtherapie	~ 35 %
Primär ossär metastasierte Erkrankung, Lokal- und Systemtherapie	< 20 %

1.2 Screeningprogramm des National Cancer Institute (NCI)

Bis 1985 testete das NCI neue Substanzen auf ihre potentielle Wirkung gegen Krebs hauptsächlich mit Hilfe von Mausmodellen, die murine Leukämiezellen (P388) trugen [22]. Um vermehrt auch solide Tumoren effektiv erfassen zu können, wurde ein in-vitro-Screeningprogramm entwickelt. Es wird seit 1990 vom NCI im Rahmen des Developmental Therapeutics Program (DTP) eingesetzt [22]. Das Screening umfasst 60

verschiedene humane Tumor-Zelllinien, welche die häufigsten Tumor-Entitäten repräsentieren (Leukämie, Melanome, Lungen-, Kolon-, ZNS-, Ovarial-, Brust-, Prostata- und Nieren-Karzinome) [22]. Eine komplette Liste des Zelllinien-Panel ist im Internet verfügbar [http://dtp.nci.nih.gov/docs/misc/common_files/cell_list.html]. Es ermöglicht die Testung von 20.000 Substanzen pro Jahr auf potentielle antineoplastische Aktivität. Seit 1995 existiert zudem ein Pre-Screen, um vorab anhand von drei ausgewählten Zelllinien (Ursprung: Brust-, Lungen- und ZNS-Karzinome) völlig unwirksame Substanzen herauszufiltern und so die Effizienz des Screenings zu erhöhen [Informationen zum DTP Human Tumor Cell Line Screen im Internet: <http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>].

Durchführung des NCI-Assays:

Die Zellen werden in Medium (RPMI 1640, 5 % fetales Kälberserum) angezchtet und zu 5.000-40.000 Zellen pro Vertiefung (je nach Wachstumsgeschwindigkeit) gelöst in 100 µl Medium auf 96-Well-Platten ausgesiedelt. Nach einer Vorinkubation von 24 h werden die Vertiefungen mit weiteren 100 µl der Testsubstanz (in verschiedenen Konzentrationen) belegt. Getestet werden in der Regel Proben von 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8} M in doppeltem Ansatz, sowie Kontrollen an Tag 0 (gemessen nach der 24 h-Vorinkubation) und zum Messzeitpunkt ohne Zytostatikainkubation. Nach 48 h Inkubation wird der Ansatz mit dem Sulforhodamine-B-Assay ausgewertet [Internet und 22].

Mit dem Screening ist es nicht nur möglich, anhand der 50 %-igen Wachstumshemmung GI50 (Growth Inhibition of 50 %), der 100 %-igen Wachstumsinhibition TGI (Total Growth Inhibition) und derjenigen Konzentration, welche eine 50 %-ige Reduktion des gemessenen Proteins (im Vergleich zum Inkubationsbeginn) bewirkt (LC50), Aussagen über die Zytotoxizität der getesteten Substanzen zu machen [160]. Es bietet auch die Möglichkeit, mit Hilfe von speziellen Programmen (COMPARE, DISCOVERY), durch Vergleichen der Aktivitätsmuster verschiedener Substanzen, Ähnlichkeiten in deren Wirkmechanismus, ihrem Resistenzmodus und ihrer molekularen Struktur festzustellen. Auf diese Weise könnte es außerdem möglich werden, Medikamente nach bestimmten Kriterien (z.B. Resistenz gegenüber einer p53-Expression des Tumors) gezielt und „krankheitsorientiert“ auszuwählen [160].

Das Ewing-Sarkom wurde von der WHO als chemotherapiesensibler Tumor der Kategorie II ausgezeichnet. Diese Kategorie beinhaltet Neoplasien, bei denen eine adjuvante Chemotherapie im frühen Krankheitsstadium eine signifikante Verlängerung der durchschnittlichen Überlebensrate bewirkt [145]. Unter diesem Gesichtspunkt und aufgrund der Tatsache, dass unter der heutigen Kombination aus multimodaler Chemotherapie, chirurgischer Resektion und/oder Radiatio eine 5-Jahres-Überlebensrate

von über 60 % erzielt wird [44,117], erscheint die in-vitro-Testung von antineoplastischen Substanzen beim Ewing-Sarkom ein vorrangiges Ziel zu sein.

Trotzdem ist diese Tumorentität weder Bestandteil des Screeningprogramms des NCI, noch findet sie Berücksichtigung in der Forschung großer Pharmaunternehmen. Beim Ewing-Sarkom gibt es daher bisher keine systematischen in-vitro-Untersuchungen zu klinisch-relevanten etablierten, oder innovativen Substanzen in internationalen Screeningprogrammen.

1.3 Eingesetzte Zytostatika

In der vorliegenden Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung von zwei alkylierenden Verbindungen (4-OOH-Cyclophosphamid, ThioTEPA) und zwei Topoisomerase-hemmstoffen (Etoposid, Topotecan) getestet. Weitere Untersuchungen umfassten die Substanz Ukrain und ein Schöllkraut (*Chelidonium majus* L.)-Präparat.

[Eine Liste der verwendeten Präparate findet sich in Kapitel 2.1.2, S. 24]

1.3.1 Alkylierende Verbindungen

1.3.1.1 Wirkmechanismus

Cyclophosphamid und ThioTEPA gehören zur Substanzgruppe der Alkylanzien. Die Medikamente dieser Gruppe wirken aufgrund einer kovalenten Bindung von Alkylgruppen an biologische Makromoleküle (Alkylierung). Die Ausgangssubstanzen müssen dabei zu reaktiven Intermediärprodukten aktiviert werden, die dann nukleophile Molekülstellen in der DNA oder bei Proteinen angreifen. Dies führt zu Quervernetzungen zwischen verschiedenen DNA-Strängen, zur Vernetzung innerhalb nur eines DNA-Stranges und auch zu Verbindungen zwischen Proteinen und DNA. Die DNA-Synthese wird an diesen Stellen gestoppt, da die Polymerase nicht angreifen kann. Strangbrüche an den entsprechenden Abschnitten, die dann Zellapoptose induzieren, können die Folge sein [16]. Das Spektrum der zellulären Angriffspunkte der polyfunktionalen Substanz ThioTEPA umfasst beispielsweise die Glykolyse, die Zellatmung, die Proteinbiosynthese und insbesondere die Nukleinsäuresynthese [97].

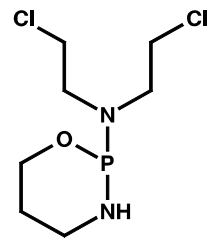
Alkylanzien wirken phasenunspezifisch, allerdings sollen die Zellen in der späten G1- und S-Phase besonders sensitiv sein. Die Substanzen weisen gegenüber rasch proliferierenden Zellen die größte zytotoxische Aktivität auf und besitzen mutagene und kanzerogene Wirkung [3].

1.3.1.2 Cyclophosphamid

1.3.1.2.1 Chemischer Aufbau

Cyclophosphamid ist ein Oxazaphosphorin und gehört zur Gruppe der Stickstoff-Lost-Derivate.

Es besitzt selbst keine zytotoxische Aktivität *in vitro* und muss *in vivo* zunächst in der Leber mit Hilfe des Cytochrom P₄₅₀ zu 4-Hydroxycyclophosphamid hydroxyliert werden [16,152].



Formel Cyclophosphamid

1.3.1.2.2 Anwendungsgebiete

Cyclophosphamid ist zur Behandlung einer Vielzahl maligner Erkrankungen zugelassen. Es wird erfolgreich in der Behandlung von malignen Lymphomen und Leukämien eingesetzt. Die Substanz ist außerdem bei vielen malignen soliden Tumoren - vor allem beim Ovarialkarzinom, Mammakarzinom, Bronchialkarzinom, Neuroblastom, Seminom und beim Ewing-Sarkom wirksam [134].

1.3.1.2.3 Pharmakokinetik

Für die *in-vitro*-Versuche wurde der stabile Metabolit 4-Hydroxyperoxycyclophosphamid (4-OOH-Cyclophosphamid) eingesetzt, der erst in wässriger Lösung spontan zu 4-Hydroxycyclophosphamid (4-OH-Cyclophosphamid) zerfällt. Durch Ringöffnung entsteht aus 4-OH-Cyclophosphamid mit einer Halbwertszeit von 34 Minuten Aldophosphamid. Dies setzt mit 55minütiger Halbwertszeit nach Abspaltung von Acrolein das Phosphoramid-Lost frei [146]. Phosphoramid-Lost ist das biologisch aktive alkylierende Agens, das für die zytostatische Wirkung von Cyclophosphamid verantwortlich ist. Acrolein besitzt ebenfalls zytostatische Wirkung [16,152].

Cyclophosphamid ist oral und intravenös applizierbar. Nach oraler Gabe beträgt die Bioverfügbarkeit über 70 %. Nur 13 % werden unverändert über die Niere eliminiert, die Hauptmetabolisierung erfolgt in der Leber zu 4-Ketocyclophosphamid und Carboxyphosphamid [3]. Die Plasmahalbwertszeit bei Kindern betrug im Mittel 3,96 h +/- 1,92 h. Sie fiel bei Dosiserhöhung ab und war kürzer als bei Erwachsenen (ca. 5-8 h) [152]. Insgesamt scheint die Pharmakokinetik von Cyclophosphamid bei Kindern variabel zu sein. Gegenüber Erwachsenen vermutet man eine schnellere Metabolisierung der Substanz [152].

1.3.1.2.4 Nebenwirkungen

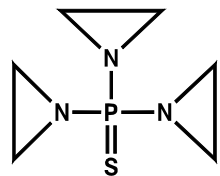
Unter der Therapie kommt es zu Knochenmarksschädigung mit abfallenden Leukozyten-, Thrombozyten- und Granulozytenzahlen [45]. Nebenwirkungen nicht-hämatologischer

Art sind Übelkeit, Erbrechen, Mukositis und Alopezie [3]. Alkylanzien führen zu Infertilität und sind karzinogen und teratogen. Selten beobachtet man Leberfunktionsstörungen mit Enzym- und Bilirubinanstieg. Zur Verhütung einer Urotoxizität durch Acrolein ist die Gabe von MESNA als Blasenschutz obligat [3]. Über das Auftreten einer sekundären, zytostatikainduzierten Kardiomyopathie, insbesondere nach hohen Dosen Cyclophosphamid, wurde berichtet [3]. Hinweise auf eine erhöhte kardiotoxische Wirkung bei vorheriger Bestrahlung der Herzregion und bei zusätzlicher Behandlung mit Anthrazyklinen oder Pentostatin liegen vor.

1.3.1.3 ThioTEPA

1.3.1.3.1 Chemischer Aufbau

Bei ThioTEPA handelt es sich um eine polyfunktional alkylierende Verbindung. Die Substanz trägt bereits drei reaktive Aziridingruppen. Ihr aktiver Metabolit ist TEPA, welcher durch oxidative Desulfurierung in der Leber entsteht [68] und eine geringere zytotoxische Wirkung als die Ausgangssubstanz besitzt.



Formel ThioTEPA

1.3.1.3.2 Anwendungsgebiete

Das Medikament wird hauptsächlich in der Hochdosis-Chemotherapie maligner Erkrankungen verwendet. In der Gynäkologie ist es zur Behandlung von fortgeschrittenen Mamma- und Ovarialkarzinomen zugelassen. Auch in der Therapie von chronischen Leukämien und Hodgkin-Lymphomen wird es eingesetzt [97]. Im Gegensatz zum Cyclophosphamid besteht für ThioTEPA bisher keine Zulassung für die Therapie pädiatrischer Tumoren.

1.3.1.3.3 Pharmakokinetik

ThioTEPA eignet sich zur intravenösen, intrapleuralen/-peritonealen Injektion, oder zur lokalen Instillation. Die Resorption nach oraler Gabe ist unsicher. Die konventionelle Dosierung beträgt 5-60 mg wöchentlich, in Kombinationsprotokollen werden niedrigere Dosen von 12-20 mg/m² pro Woche eingesetzt. Der Plasmaspiegel steigt nach i.v. Injektion schnell an. Der Konzentrationsabfall ist rasch und verläuft biexponentiell (t_{1/2} Alpha von 7,7 +/- 1,2 min) [97]. Die Clearance ist stark dosisabhängig. Bei Kindern zeigte sich ein Abfall von 28,6 l/h/m² bei einer Dosis von 25 mg/m² auf 11,9 l/h/m² bei 75 mg/m² [68]. Die Elimination erfolgt renal. Der Metabolit TEPA kann 5 min nach

ThioTEPA-Gabe nachgewiesen werden [97]. Er ist länger im Plasma nachweisbar als die Ausgangssubstanz [68]. Aufgrund ihrer apolaren, lipidlöslichen Eigenschaften erreichen beide Substanzen annähernd identische Konzentrationen im Plasma und in der zerebrospinalen Flüssigkeit [68,97].

1.3.1.3.4 Nebenwirkungen

Dosislimitierende Toxizität der Therapie mit ThioTEPA ist die Myelosuppression [60,68,102,115]. Der Tiefpunkt der Granulo- und Thrombozytopenie wird nach einer Latenzzeit von bis zu vier Wochen erreicht. Nicht-hämatologische Nebenwirkungen betreffen die Haut und Schleimhaut (Erythrodermie, Mukositis), gastrointestinale und urogenitale Störungen und eine toxische Wirkung auf das zentrale Nervensystem. Als polyfunktionales Alkylanz ist ThioTEPA kanzerogen, teratogen, mutagen und führt zu Infertilität [97].

In Kombination mit Succinylcholin zeigt sich eine Arzneimittelinteraktion: Durch die Inhibition der Pseudocholinesterase durch ThioTEPA kommt es zur Wirkungsverstärkung des Succinylcholins [97].

1.3.2 Topoisomerasehemmer

Topoisomerasen sind wesentlich an der DNA-Replikation beteiligt. Sie verhindern eine zu starke Torsionsspannung der noch nicht replizierten DNA-Stränge, indem sie vorübergehende Einschnitte in einen Chromosomenstrang (Topoisomerase I), oder in beide Stränge (Topoisomerase II) katalysieren. Auf diese Weise werden die DNA-Stränge entspannt und die Replikation kann ungehindert ablaufen [126].

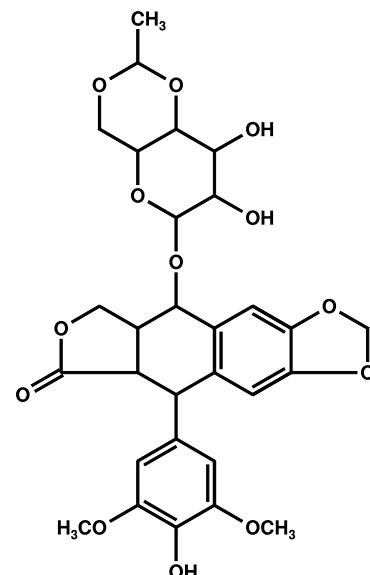
Topoisomerasehemmer greifen selektiv das jeweilige Enzym an und behindern phasenspezifisch die DNA-Synthese.

1.3.2.1 Etoposid

1.3.2.1.1 Chemischer Aufbau

Etoposid ist ein semisynthetisches Derivat des Podophyllotoxins, ein Mitosehemmstoff aus der Alraune (*Podophyllum peltatum*) [57].

Formel Etoposid



1.3.2.1.2 Wirkmechanismus

Das Präparat wirkt nicht wie seine Muttersubstanz als Mitose-Spindelgift, sondern durch Hemmung der Topoisomerase II. Die Substanz bildet einen Komplex mit der DNA und dem Enzym [64]. Auf diese Weise induziert Etoposid DNA-Doppelstrangbrüche, die zur Hemmung der DNA-Synthese führen. Die Wirkung ist phasenspezifisch - Arrest in der S- bzw. G2-Phase des Zellzyklus [57].

Etoposid soll ferner „Cross-links“ der DNA-Stränge bzw. Vernetzungen zwischen DNA-Molekülen und Nukleoproteinen bewirken und den Nucleosid-Transport in die Zelle, wie auch den Einbau von Thymidin in die DNA, inhibieren [17].

1.3.2.1.3 Anwendungsgebiete

Das Medikament ist zugelassen in der Kombinationstherapie bei akuter myeloischer Leukämie, malignen Lymphomen, dem kleinzelligen Bronchialkarzinom und Keimzelltumoren [57,64].

Auch beim Ewing-Sarkom wird Etoposid sowohl in der Basistherapie, als auch in der intensivierten Rezidivbehandlung verwendet (VIDE, EVAI(A)).

1.3.2.1.4 Pharmakokinetik

Etoposid kann oral und intravenös verabreicht werden und ist in Wasser schlecht löslich. Die Bioverfügbarkeit der oralen Etoposid-Applikation ist sehr variabel und liegt bei ca. 50 %. Bei Erhöhung der oralen Etoposid-Dosis fällt sie ab [65]. Nach Infusion von 150 mg/m^2 wird nach einer Stunde ein Plasmaspitzen Spiegel von $29,5 \pm 3,8 \text{ mg/l}$ gemessen, nach zwei Stunden $23,4 \pm 3,0 \text{ mg/l}$ [164]. Nach oraler Applikation hat das Gesamt-Etoposid eine Halbwertszeit von 5,6 h mit einer Clearance von $40,3 \text{ ml/min}$ (Werte normalisiert auf eine Etoposid-Dosis von 100 mg/m^2) [156]. Die Substanz wird zum größten Teil an Plasmaproteine gebunden, nur ca. 6 % liegen in freier Form im Serum vor [64]. Für das freie Etoposid wurde eine Clearance von 1127 ml/min und eine Halbwertszeit von 5,9 h bestimmt. Der Variationskoeffizient für die systemische Etoposid-Exposition lag bei 40 % [156]. Das Medikament wird zu 30-40 % unverändert über den Urin ausgeschieden [64].

1.3.2.1.5 Nebenwirkungen

Bei Kindern korrelierte die Toxizität der Substanz mit der verabreichten Dosis bzw. mit der erreichten Plasmakonzentration [39,40]. Bei der Behandlung mit Etoposid kommt es zur Myelosuppression, einhergehend mit zum Teil schwerer Leukopenie, Thrombozytopenie und Neutropenie [30,39,90,107]. Die Gefahr für Anämie und schwere Infektionen, wie Pneumonie oder Sepsis, ist erhöht. Auch werden die für Zytostatika typischen akuten Unverträglichkeitsreaktionen wie Übelkeit und Erbrechen, Diarrhoe,

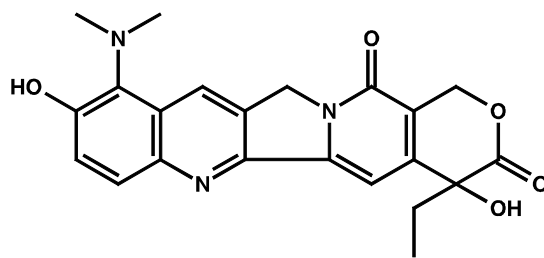
evtl. Mukositis und Alopezie beschrieben [107]. Etoposid ist potentiell malignom-induzierend. Das Risiko einer sekundären Leukämie ist erhöht [107,141].

In der Kombination mit Ciclosporin A (Sandimmun) kommt es zu einer ausgeprägten Verstärkung der Toxizität der Substanz [57].

1.3.2.2 Topotecan

1.3.2.2.1 Chemischer Aufbau

Topotecan ist ein semisynthetisches Derivat des Alkaloids Camptothecin (aus *Camptotheca acuminata*) mit einem gesättigten sechsgliedrigen Lactonring. Zwischen



Formel Topotecan

dem intakten Lactonring und der ring-offenen Carboxylatform besteht ein Gleichgewicht, wobei das Lacton die biologisch aktive Form darstellt. Diese Form überwiegt bei einem pH-Wert von 4 und ist für die zytostatische Aktivität entscheidend; bei einem pH von 10

liegt ausschließlich die offene Carboxylatform vor [126]. Eine gute Verträglichkeit der Substanz kommt durch die Substituenten in Position 9 und 10 im Ring A zustande: Die Bildung eines Hydrochlorids am basischen Stickstoff ermöglicht die Wasserlöslichkeit [1].

1.3.2.2.2 Wirkmechanismus

Topotecan bildet mit der Topoisomerase I einen stabilen Komplex und bewirkt so eine selektive Hemmung dieses Enzyms. Dadurch kommt es zur Arretierung der Replikationsgabel, zum irreversiblen DNA-Strangbruch und über die Induktion der Apoptose zum Zelltod. Topotecan wirkt phasenspezifisch in der DNA-Synthesephase (S-Phase). Zellen, die sich in dieser Phase befinden, sterben ab, während Zellen in der prämitotischen G₂-Phase in ihrem Zustand „eingefroren“ werden. Viele Tumorzellen weisen eine erhöhte Konzentration an Topoisomerase I auf und sind somit im Vergleich zu gesunden Zellen anfälliger für Topotecan [126].

1.3.2.2.3 Anwendungsgebiete

Seit 1997 ist Topotecan zur Behandlung von metastasierten Ovarialkarzinomen nach Versagen einer Primär- oder Folgetherapie zugelassen. Für die Second-line-Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms liegt eine Zulassung in den USA und der Schweiz vor [126]. Im Rahmen von Phase-II-Studien wird Topotecan in der Behandlung von

therapierefraktären soliden Tumoren im Kindesalter eingesetzt (Neuroblastom, Retinoblastom, mPNET, Osteosarkom, ES, Rhabdomyosarkom) [20,109,140].

1.3.2.2.4 Pharmakokinetik

Die Applikation von 0,5-2,5 mg/m² Topotecan erfolgt intravenös über 30 min täglich an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Der Plasmaspitzenpiegel beträgt 8,9-46 µg/l, die Clearance liegt bei 34-127 l/h/m² [1].

Bei Kindern erreicht der Plasmaspitzenpiegel 1,7-3,6 µg/m² bei einer Gabe von 0,75-1,9 mg/m² Körperoberfläche über 72 h alle drei Wochen, die Clearance beträgt 19 l/h/m².

Topotecan verteilt sich schnell und gut im Gewebe. Nach Gabe von 0,5-1,5 mg/m² liegt das Verteilungsvolumen der Lactonform im steady-state bei 73 l/m² [1].

Das Medikament hat mit 35 % eine geringe Plasmaproteinbindung [1,126], Anreicherung der Substanz im Liquor wird beobachtet [1]. Weder nach fraktionierter, noch nach kontinuierlicher Dauerinfusion ist eine Kumulation der Substanz beschrieben worden [1]. Die Halbwertszeit liegt bei zwei bis drei Stunden [126,130].

Ein Hauptweg der Clearance führt über die Hydrolyse des Lactons zur geöffneten, inaktiven Hydroxysäure [126]. Die Elimination der Substanz erfolgt zu 20-60 % über den Urin als Topotecan, oder in der ringoffenen Form [1,126].

1.3.2.2.5 Nebenwirkung

Die ermittelte dosislimitierende Toxizität bei Kindern ist eine ausgeprägte Myelosuppression [93,109,130,140,157], welche jedoch reversibel, nicht kumulativ und gut beherrschbar ist [126]. Diese Knochenmarksschädigung kann zu schwerer Neutropenie führen [85,109], in einigen Fällen verbunden mit Fieber oder Infektionen [157] - teilweise bis hin zur Sepsisentwicklung. Topotecan kann außerdem eine mittelgradige bis schwere Thrombozytopenie hervorrufen [85,109]. Ein Teil der Patienten entwickelt eine mittlere bis schwere Anämie [85,109]. Nicht-hämatologische Nebenwirkungen betreffen vor allem den Gastrointestinaltrakt mit Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe [20,109,157]. Es wurden keine Anzeichen für Kardio-, Neuro-, oder für eine andere Organtoxizität beobachtet [93,126].

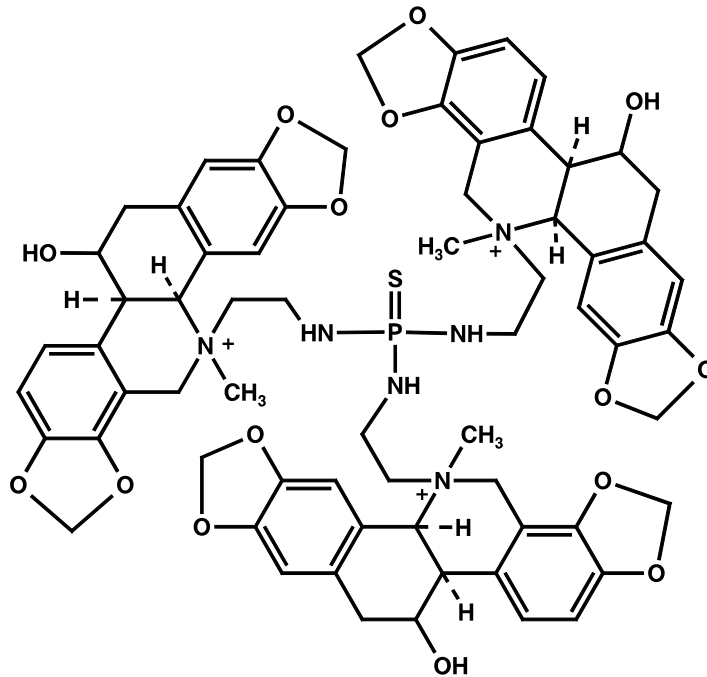
Topotecan ist kontraindiziert bei Patienten mit bereits vor dem ersten Zyklus bestehender schwerer Knochenmarksdepression, einer Neutrophilenzahl < 1,5 x 10⁹/l und/oder einer Thrombozytenzahl < 100 x 10⁹/l. Außerdem darf das Medikament nicht in der Schwangerschaft eingesetzt werden, da es embryofetale Sterblichkeit und Missbildungen verursachen kann [126].

1.3.3 Ukrain und Chelidonium majus L.

1.3.3.1 Ukrain

1.3.3.1.1 Chemischer Aufbau

5,5',5''-[Phosphinothiolydin-tris(imino-2,1-ethandiyl)]tris[5-methyl-chelidonium]trihydroxid, hexahydrochlorid



Formel Ukrain

Laut Angaben des Herstellers (Nowicky-Pharma, Wien) ist Ukrain ein semisynthetisches Produkt, das durch Komplexbildung (thermische Adduktion) zwischen Chelidonium majus L.-Alkaloiden (Chelidonin) und Thiophosphortriaziridin (ThioTEPA) erzeugt wird. Dabei sollen durch vorheriges Abspalten der Aziridingruppen drei Moleküle Chelidonin an ein Molekül ThioTEPA binden [91]. Das Endprodukt Ukrain beinhaltet noch maximal 10 % freie Alkaloide [46]. Zudem soll im Endprodukt kein freies ThioTEPA mehr vorliegen [91]. Zur Herstellung sind eine Vielzahl von Reinigungsschritten mit Chloroform und Äther nötig. Die Substanz liegt als Hydrochlorid vor und wird in einer wässrigen Lösung von 0,1 % verwendet [111]. Eine Ampulle (5 ml) enthält 5 mg Chelidonium majus L.-Alkaloid-Thiophosphorsäurederivat in 5 ml bidestilliertem Wasser für Injektionszwecke (pH: 3,5-5,5) [114].

1.3.3.1.2 Wirkmechanismus

Man postuliert eine selektive Akkumulation der Substanz in den Kernen von entarteten Zellen [74]. Ukrain soll die DNA- und RNA-abhängige Proteinbiosynthese dieser Zellen

inhibieren und irreversibel in den Sauerstoffverbrauch maligner Zellen eingreifen [113]. Apoptoseinduktion, starke malignozytolytische Aktivität, Unterbindung der Tumor-Neoangiogenese und immunmodulierende Effekte werden beschrieben [46,114]. Die Immunstimulation betrifft besonders die zelluläre Immunität [14]. Außerdem wurde antivirale Aktivität für Ukrain nachgewiesen [111]. Eine einheitliche, wissenschaftlich plausible Theorie zur Wirkung des Präparates existiert allerdings nicht [9].

1.3.3.1.3 Anwendungsgebiete

Laut Hersteller ist Ukrain zur Behandlung von kolorektalen Adenokarzinomen, Mamma-, Blasen-, Prostata-, Ovarial-, Cervix-, Endometrium-, Bronchial- und Plattenepithel-Karzinomen, sowie Hodentumoren, Sarkomen, Melanomen und malignen Lymphomen geeignet. Bisher liegt eine Zulassung nur für Weißrussland vor [114]. Wegen mangelnder Datenlage ist Ukrain bisher weder in Österreich, noch in Deutschland offiziell zur klinischen Prüfung angenommen worden [9].

1.3.3.1.4 Pharmakokinetik

Ukrain eignet sich zur intravenösen und intramuskulären Applikation [114]. Die LD50 nach intraperitonealer Injektion im Tierversuch lag bei 190 und 280 mg/kg für Mäuse und Ratten [111]. Die relevante therapeutische Dosis beim Menschen beträgt maximal 20 mg pro Applikation. Damit ist die therapeutische Dosis ca. um den Faktor 100 geringer als die toxische Dosis im Tierversuch [46]. Die maximal tolerierte Dosis (MTD) intravenös ergab bei Ratten 3,5 mg/kg und bei Kaninchen 0,35 mg/kg [111]. Es wird berichtet, dass sich Ukrain aufgrund von stärkerer Affinität zu entarteten Zellen speziell im malignen Gewebe anreichert [46,74,111]. Eventuell sind unterschiedliche Aufnahmezeiten im gesunden und im entarteten Gewebe dafür verantwortlich [158]. Die Anreicherung lässt sich durch Eigenfluoreszenz der Substanz unter UV-Bestrahlung nachweisen [112]. Diese könnte auch zur Erkennung von Mikrometastasen verwendet werden und die Tumorgrenzen in der Chirurgie anzeigen. In-vitro- und in-vivo-Studien ergaben, dass Ukrain letal auf Krebszellen wirkt, aber auch in 100fach höherer Konzentration Normalzellen nicht schädigt [74]. Im Tierversuch zeigten sich keine mutagenen, karzinogenen, oder teratogenen Effekte [34]. Die Substanz soll eine therapeutische Breite von 1250 haben, im Gegensatz zu herkömmlichen Chemotherapien, bei denen diese bei 1,4-1,8 liegt [91]. Ukrain penetriert die Blut-Hirn-Schranke und wird unverändert renal eliminiert. Die Halbwertszeit betrug im Tierversuch 61 min [111], war aber bei gesunden Tieren nach einmaliger Injektion wesentlich kürzer (< 20 min).

1.3.3.1.5 Nebenwirkungen

Laut Hersteller zeigte Ukrain im Rahmen einer Phase-I-Studie keine Nebenwirkungen an gesunden Probanden [38,111]. Allerdings liegen hierzu nur sehr vage Informationen in Form von Kurzberichten vor, die kein exaktes Nachvollziehen der eingesetzten Qualitätssicherungs- und Prüfkriterien und des Studiendesigns ermöglichen. Bei den mit Ukrain behandelten Krebspatienten traten lokale Entzündungszeichen an der Injektionsstelle auf und systemische Reaktionen wie Schwindel, Depression, Schlafprobleme, Unruhe und Abgeschlagenheit wurden beschrieben. Besonders bei Therapiebeginn traten Übelkeit, erhöhter Flüssigkeitsbedarf, vermehrte Harnausscheidung, sowie Spannung, Kribbeln, Stechen, Brennen und ein Wärmegefühl auf. Es kam ferner zu einer vorübergehenden Schwellung und/oder Verhärtung im Tumorbereich. Auch heftiges Schwitzen und Schüttelfrost wurden angegeben [114]. Die auftretenden Symptome wurden vom Hersteller als Begleiterscheinung der Therapie bezeichnet, die vorübergehend durch Tumorabbauprodukte verursacht werden [14]. Laut Nowicky verliert das in der herkömmlichen Chemotherapie hochtoxische ThioTEPA seine unerwünschten Nebenwirkungen durch die Verbindung mit den Chelidonium-Alkaloiden, da die reaktiven Aziridgruppen bei Ukrain fehlen [91].

1.3.3.1.6 Kritische Stimmen

In den Medien, insbesondere der Boulevardpresse und auch zunehmend im Internet, erscheinen wiederkehrende Berichte über Heilungserfolge sogenannter Wundermittel und verunsichern Patienten [144]. Ukrain zum Beispiel wird Ärzten und Privatpersonen im Internet als in therapeutischen Dosen nebenwirkungsfreies, selektiv die Krebszellen zerstörendes Medikament vorgestellt, welches zudem hochwirksam das Immunsystem der Patienten aktiviert, den Tumor „aushungert“, indem es die Bildung tumorversorgender Blutgefäße hemmt, und auch die Bildung von Metastasen wirkungsvoll verhindert [<http://www.ukrin.com>].

Verschiedene Gremien und Fachleute (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Arbeitskreis Komplementäre Onkologie Deutscher Heilpraktiker e.V., Arzneimittelinformation Berlin, Deutsche Gesellschaft für Onkologie e.V., Studiengruppe „Methoden mit unbewiesener Wirksamkeit in der Onkologie“ der Schweizerischen Krebsliga u.a.) warnen vor diesen „sensationellen“ Versprechungen und lehnen derzeit den Einsatz von Ukrain in der Krebstherapie mit aller Entschiedenheit ab. Besonders der Mangel an objektiven Bewertungskriterien bei der Wirksamkeitsbeurteilung (berichtet wird über „verschiedene positive Effekte“), die unscharfen Beschreibungen, zu häufige Einzelfalldarstellungen und das vollständige Fehlen von prospektiven, randomisierten Studien wird kritisiert [9]. In seiner

Kurzbewertung zu Ukrain bemängelt Hopf die Zusammenfassung von Studienresultaten als nicht nachvollziehbare Aneinanderreihung von Behauptungen in Kurzfassungen mit mangelnden Zahlenangaben bei Konzentrationsangaben, Anwendungsdauer, Anzahl der Versuchstiere etc., in Form von Supplementen oder Abstract-Bänden [76]. Die Mehrzahl der Studien sei an osteuropäischen Instituten durchgeführt worden, wobei immer wieder die gleichen Untersucher genannt würden [76]. Für Ukrain fehlen von unabhängigen Prüfzentren kontrollierte, reproduzierbare, evidenzbasierte, doppelblinde und vergleichende Studien [76]. Selbst nach Einschätzung eines Ukrain-Protagonisten wurde die Mehrzahl der Studien nicht auf der Grundlage der „Good Clinical Practice“ durchgeführt [46]. Darüber hinaus wird auf die teuren Behandlungskosten mit Ukrain hingewiesen. Eine einwöchige Therapie koste zwischen 2500 und 3500 Euro. Die derzeitige Anwendungspraxis sei somit eher profitorientiert denn patientenorientiert [144].

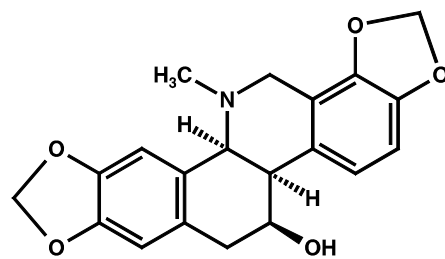
1.3.3.2 **Chelidonium majus L. (Schöllkraut, Papaveraceae)**

1.3.3.2.1 **Chemischer Aufbau**

Chelidonium majus L. ist eine Arzneipflanze, die im Durchschnitt 0,1-1 % Alkaloide enthält [162]. Es handelt sich hierbei um sogenannte Benzylisochinolinderivate, die wichtigsten sekundären Metabolite der Pflanze [150]. Insgesamt hat man mehr als 30 Alkaloide nachgewiesen [150], die sich in unterschiedliche Heterocyclen-Typen einteilen lassen [154,162]:

- Benzophenanthridine (Chelidonin, Sanguinarin, Chelerythrin, Norchelidonin, Isochelidonin, Turkiyenin)
- Protoberberine (Coptisin, Berberin, Sorisamin, Stylopin)
- Protopin-Typen (Protopin, Allocryptopin)

Es existieren weitere Alkaloid-Typen wie Chinolizidine oder Aporphine, die aber nur in verschwindend geringen Mengen vorkommen [166]. Der Alkaloidgehalt der einzelnen Pflanze ist je nach Herkunft und Erntezeitpunkt sehr unterschiedlich [162]. Daher ist auch die Wirkung der aus den Pflanzen gewonnenen Arzneiextrakte, je nach den vorherrschenden Substanzen in dem jeweiligen Präparat, als sehr unterschiedlich einzustufen [150]. Einzig Coptisin ist über die gesamte Wachstumsperiode



Formel Chelidonin

der Pflanze zu finden [150,162]. Die unterirdischen Pflanzenanteile enthalten den höchsten Alkaloidanteil - zum Teil über 3 % [150,162,166]. Die bezüglich ihrer Menge bedeutsamsten Alkaloide sind Coptisin und Chelidonin [150,154,162].

1.3.3.2.2 Wirkmechanismus

Den Alkaloiden Sanguinarin und Chelerythrin wird hohes Antitumor-Potential zugeschrieben. Folgende Wirkmechanismen könnten dafür mitverantwortlich sein: Sanguinarin kann durch Interkalierung der DNA und anderer Polynukleotide die Struktur der Doppelhelix modifizieren. Dies führt zur Inhibition verschiedener enzymatischer Reaktionen [52,154]. Als hydrophobes Kation kann es durch Neutralisationsreaktionen an der inneren Mitochondrienmembran die ATP-Synthese inhibieren und die oxidative Phosphorylierung der Zelle entgleist. Außerdem greift das Alkaloid inhibierend in das Cholinesterase-System ein. Wie Chelerythrin hat es die Möglichkeit, die biologische Aktivität SH-abhängiger Enzyme und Proteine auszuschalten [52].

1.3.3.2.3 Anwendungsgebiete

Zur Zeit finden Schöllkrautextrakte als Arzneimittel hauptsächlich Anwendung bei krampfartigen Beschwerden im Bereich der Gallenwege und des Gastrointestinaltraktes [154]. Dort, in den Bronchien und am Uterus wirkt das Alkaloid Chelidonin spasmolytisch auf die glatte Muskulatur [162]. Schwache analgetische Wirkung zeigen Chelidonin, Allocryptopin und Sanguinarin [31]. Chelidonin und Protopin sind gering zentralnervös sedierend [154]. Das Alkaloid Berberin soll eine galletreibende Wirkung auf die Leber und die Gallenblase besitzen, während Chelerythrin lokale Reizungen hervorruft. Bei Sanguinarin handelt es sich um einen Acetylcholinesterasehemmstoff [166]. Die Alkaloide Protopin, Sanguinarin, Chelerythrin und Chelidonin haben antibakterielle Wirkung [31,154]. Außer der Lokaltherapie von Warzen wurden weitere antivirale, antiinflammatorische, diuretische und blutdrucksenkende Effekte der verschiedenen Alkaloide beschrieben. Nicht zuletzt haben die Alkaloide antineoplastische Eigenschaften und sind die Basis für das Medikament Ukrain [150,154].

1.3.3.2.4 Pharmakokinetik

Die biologischen Effekte der Hauptinhaltsstoffe der Arzneipflanze sind sehr verschieden; oftmals auch antagonistisch [150].

Für die vorliegenden Experimente wurden Gallopas Tropfen der Firma Pascoe verwendet. Ein Gramm dieses Schöllkrautpräparates enthält ein Fluidextrakt (1:1) aus Schöllkraut 1g, entsprechend mindestens 1,2 mg Gesamtalkaloid, berechnet als Chelidonin. Die Tropfen enthalten als Auszugsmittel 45 Vol.-% Ethanol.

1.3.3.2.5 Nebenwirkungen

Bezüglich der Nebenwirkungen von Schöllkrautextrakten sind in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben zu finden. So berichtete die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft bereits 1998 über acht Fälle von Hepatitis nach der Einnahme von Schöllkrautextrakt-haltigen Präparaten in Monotherapie und äußerte den Verdacht einer medikamentös-toxischen Ursache, da sich die Symptomatik und Laborparameter nach Absetzen der Substanzen besserten [7]. Mittlerweile liegen der Arzneimittelkommission über 60 Meldungen zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen vor, von denen sich über 40 auf Leberschäden beziehen. Berichtet wird von Hepatitis (21x), Cholestase (12x), erhöhten Leberenzymen (Transaminasen und Gamma-GT), Bilirubinämie und Leberzellschädigung. In einem Fall wird ein tödliches Leberversagen angegeben [8]. Sowohl die Arzneimittelkommission, als auch die Redaktion des „arznei-telegramm“, die ähnliche Fälle dokumentiert, lehnen den Einsatz schöllkrauthaltiger Mittel ab, da valide klinische Wirksamkeitsnachweise zu den Chelidonium-Präparaten ausstehen [8,10,11]. Zudem könnten Laien die leberschädigende Effekte möglicherweise übersehen und die auftretenden Beschwerden auf die Grunderkrankung zurückführen [8,10,11].

Da es sich bei den im Handel befindlichen Präparaten um Extrakte mit sehr unterschiedlichem Alkaloidgehalt handelt, sei es möglich, dass sich die Lebererkrankungen auf direkte toxische Alkaloidbeimengungen im Präparat zurückführen lassen [166].

Andere Studien schildern mit einer Dosierung von dreimal täglich 20-30 Tropfen eine gute Verträglichkeit, bei zum Teil jahrelanger Verabreichung. Möglicherweise ist die aufgenommene Menge des Schöllkrautextraktes entscheidend für die Lebertoxizität. Schlechte Verträglichkeit trat hier nur vorübergehend bei Patienten mit zusätzlicher Ulkuserkrankung auf, die aber nach Abheilen das Mittel dann gut vertrugen [166].

1.4 Zielsetzung/Fragestellung

Vor Einführung der systemischen Polychemotherapie starben 90 % der Ewing-Sarkom-Patienten innerhalb von zwei bis fünf Jahren nach der Diagnosestellung an Lungen- und/oder multiplen Knochenmetastasen [50,53].

Unter der heutigen Kombination aus multimodaler Chemotherapie, chirurgischer Resektion und/oder Radiatio liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 60 % [44,117].

Für Patienten mit Metastasen bei Diagnosestellung, schlechtem Ansprechen auf die Chemotherapie, großem Tumolvolumen und ungünstiger Lokalisation ist die Prognose mit einer Überlebensrate von unter 20 % weiterhin schlecht [35,84,118,122].

Mit der Identifizierung und Validierung von primären Prognosefaktoren lässt sich die individuelle Therapie risikobezogener gestalten [2,15]. Die Gruppe der Hochrisikopatienten bedarf einer intensivierten Therapie mit neuen Optionen. Derzeit laufen Hochdosis-Chemotherapie-Studien mit Knochenmarkstransplantation bzw. autologem Stammzellrescue [49]. Darüber hinaus ist es wichtig, neue Zytostatika und ihre Kombination mit etablierten Medikamenten für diese Patientengruppe zu evaluieren.

Für die Standardrisikopatienten wird eine Modifizierung der aktuellen Therapie angestrebt, um therapiebedingte Spätfolgen, insbesondere bleibende Organschäden und sekundäre Malignität, zu reduzieren [35].

Ein Problem bei der Erprobung neuer Medikamente und Therapieregime stellt die geringe Inzidenz der Ewing-Sarkome und der malignen Peripheren Neuroektodermalen Tumoren dar [35]. Für signifikante Ergebnisse müssen randomisierte Studien über Jahre laufen, um die nötigen Fallzahlen zu erreichen.

Es ist daher sinnvoll, vorab mit Hilfe von in-vitro-Zellkulturversuchen eine Vorauswahl neuer, potentiell wirksamer Zytostatika oder Zytostatikakombinationen zu treffen. Die Verwendung von permanenten Zelllinien ermöglicht eine schnelle, detaillierte und kostengünstige Durchführung solcher Screeningtests auch in größeren Testansätzen.

Obwohl die WHO das Ewing-Sarkom als chemotherapiesensiblen Tumor der Kategorie II auszeichnet [145], ist diese Tumorentität weder Bestandteil des Screeningprogramms des National Cancer Institute (NCI), noch findet sie Berücksichtigung in der Forschung großer Pharmaunternehmen. Es gibt beim Ewing-Sarkom keine systematischen in-vitro-Untersuchungen zu klinisch relevanten und innovativen Substanzen im internationalen Screening.

Das Ziel dieser Arbeit ist daher die Evaluation der antiproliferativen Wirkung verschiedener etablierter und neuer Zytostatika und ihrer Kombination auf Ewing-Sarkom-Zellen. Im Einzelnen wurden zwei alkylierende Substanzen (Cyclophosphamid, ThioTEPA), zwei Topoisomerasehemmstoffe (Etoposid, Topotecan), sowie der

umstrittene Wirkstoff Ukrain und ein *Chelidonium majus* L.-Präparat (Schöllkraut) mittels modifiziertem MTT-Assay nach Mosmann [106] getestet.

Die vier eingesetzten Zelllinien wurden aufgrund ihres Primärtumortypus (mPNET oder ES) und der unterschiedlichen Multidrug-Resistance-(MDR-)Gen-Expremierung ausgewählt.

Folgende Fragen sollten geklärt werden:

- Gibt es effektive Zytostatika in vitro, die bisher beim Ewing-Sarkom klinisch noch nicht eingesetzt werden? Wie ist ihre Wirkung in Relation zu bereits etablierten Substanzen einzuschätzen?
- Lässt sich für die Testsubstanzen eine Zytotoxizität bei klinisch erreichbaren Medikamentenspiegeln nachweisen?
- Welchen Effekt hat die Koinkubation eines fixen Zytostatikums mit einem zweiten in verschiedenen Konzentrationen? Zeigen sich im Vergleich mit den Einzelinkubationen möglicherweise überadditive Effekte?
- Welche Ergebnisse liefert ein Vergleich der Substanz Ukrain (als semisynthetisches Mischpräparat aus Schöllkrautalkaloiden und dem Zytostatikum ThioTEPA) mit ihren Einzelbestandteilen und deren Kombination?
- Sind eventuelle Unterschiede in der Chemosensitivität der Zelllinien mit beschriebenen molekulargenetischen Charakteristika wie *MDR*-Überexpression o. ä. assoziiert?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Es wurden zwei humane Ewing-Sarkom-Zelllinien und zwei humane Periphere Neuroektodermale Tumor(PNET)-Zelllinien verwendet. Die eingesetzten Zelllinien wachsen in Form von Adhäsionszellkulturen. Sie wurden freundlicherweise von Dr. rer. nat. F. van Valen, Münster (VH-64, STA-ET-1, STA-ET-2.1) und von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen“, Braunschweig (CADO-ES-1) zur Verfügung gestellt.

Im Folgenden soll kurz auf die einzelnen Zelllinien eingegangen werden:

CADO-ES-1

CADO-ES-1 ist etabliert aus der Lungenmetastase eines 19jährigen Mädchens. Es handelt sich um Zellen mit den für Ewing-Sarkome typischen Charakteristika: kleine runde Zellen ohne neuronale Differenzierung.

Der Hauptanteil der Zellpopulation zeigt lange Fortsätze und Mikrotubuli, wenige tragen kurze Fortsätze ohne Mikrotubuli. Es findet sich zytogenetisch die Translokation $t(21;22)(q22;q12)$, wobei eine Translokation des EWS-Gens von Exon 7 auf das ERG-Gen auf Exon 6 beobachtet wird. 60 % der Zellpopulation exprimiert P-gp auf der Zelloberfläche. Der Primärtumor ist nicht definiert.

VH-64

VH-64 ist etabliert aus der Lungenmetastase eines metatarsalen Primärtumors, welcher bei einem 24jährigen Mann diagnostiziert war. Es handelt sich wiederum um ein typisches Ewing-Sarkom. Die einzelnen Zellen sind rund bis oval und locker angeordnet. Charakteristisch für VH-64 ist die Translokation $t(11;22)(q24;q12)$, bei der das EWS-Gen von Exon (Ex) 7 auf ein Mitglied der ETS-Genfamilie - hier FLI-1, Exon 6 - transloziert. Außerdem findet sich eine P-gp-Expression von ca. 2 % und die Generationszeit beträgt 25,2 h.

STA-ET-1

STA-ET-1 ist etabliert aus einem peripheren Neuroektodermalen Tumor, der primär im Humerus eines 13jährigen Mädchens diagnostiziert war. Für STA-ET-1 sind eine Generationszeit von 40,7 h und eine P-gp-Expression von 2 % beschrieben. Weiter zeigt

sich eine Mutation im p53-Gen. Die typische Translokation t(11;22)(q24;q12) findet sich auch bei STA-ET-1. Die betroffenen Gene sind wie bei VH-64: EWS, Ex 7 / FLI-1, Ex 6.

STA-ET-2.1

STA-ET-2.1 stammt aus der Fibula eines 15jährigen Jungen und ist als primärer peripherer Neuroektodermaler Tumor diagnostiziert worden. Charakteristisch sind eine Generationszeit von ca. 60 h und eine P-gp-Expression von 20 %. Bei den Zellen von STA-ET-2.1 lässt sich eine Mutation im p53-Gen und außerdem die Deletion del(22)(q12) nachweisen (involviert sind hierbei EWS, Ex 9 / FLI-1, Ex 4).

Die Tabelle 2 bietet nochmals einen Überblick über die Charakteristika der 4 Zelllinien.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Zellliniencharakteristika.

Zelllinie:	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
Klassifikation:	typisches ES	typisches ES	PNET	PNET
Primärtumor:	?	Metatarsus	Humerus	Fibula
Isolation aus:	Lungenmetastase	Lungenmetastase	Primärtumor	Primärtumor
Zytogenetik:	t21;22	t11;22	t11;22	del(22)(q12)
Molekular-Genetik:	EWS Ex 7 / ERG Ex 6	EWS Ex 7 / FLI-1 Ex 6	EWS Ex 7 / FLI-1 Ex 6	EWS Ex 9 / FLI-1 Ex 4
P-gp-Express.:	60 %	2 %	2 %	20 %
Generationszeit:	?	25,2 h	40,7 h	ca. 60 h

2.1.2 Zytostatika

4-OOH-Cyclophosphamid	<u>Endoxan®</u> Astra Medica (Frankfurt, Deutschland)
ThioTEPA	<u>ThioTEPA „Lederle“ 15 mg®</u> Lederle (Wolftratshausen, Deutschland)
Etoposid	<u>Etoposid</u> Sigma Aldrich GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
Topotecan	<u>Hycamtin®</u> SmithKline Beecham Pharma (München, Deutschland)
Ukrain	<u>Ukrain®</u> Nowicky Pharma (Wien, Österreich)
Chelidonium majus L.	<u>Gallopas Tropfen®</u> Pascoe GmbH (Gießen, Deutschland)

In Tabelle 3 sind die in vivo erreichten Plasmaspitzenpiegel der einzelnen Testsubstanzen zusammengefasst. Für Ukrain und Chelidonium majus L. sind keine Angaben verfügbar.

Tabelle 3: Übersicht über erreichbare Plasmaspitzenpiegel der Testsubstanzen in vivo.

<u>Zytostatikum:</u>	<u>Plasmaspitzenpiegel (in μM):</u>	<u>Literatur:</u>
Cyclophosphamid	106-240 (nach 1000-1500 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ i.v.)	79, 152
ThioTEPA	24-203 (nach 135-1215 mg/m^2 i.v. Hochdosis)	95
	7-10 (nach 60-80 mg als Kurzinfusion)	62
Etoposid	32-50 (nach 100-150 mg/m^2 i.v.)	23, 164
	1,6-4,8 (nach 25-50 mg/m^2 oral)	39, 151
Topotecan	0,016-0,227 (nach 0,5-2,5 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ i.v.)	25

2.1.3 Lösungen und Reagenzien

DMSO	Dimethylsulfoxid, Hybri Max, sterile; Lot No.: 90K2340, Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Ethanol 96 %	Apotheke des UKM (Münster, Deutschland)
Nährmedium	<u>RPMI 1640 Medium</u> ; GibcoBRL, Cat No.: 21875-034 + <u>Antibiotic-Antimycotic</u> ; GibcoBRL, Cat No.: 15240-062 (Penicillin G sodium 10.000 Units/ml, Streptomycin sulphate 10.000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amphotericin B als Fungizone® 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 0,85 % NaCl (5,5 ml auf 500 ml)) + <u>L-Glutamine</u> (100x) 200 mM; GibcoBRL, Cat No.: 25030-024 + <u>FCS</u> (Foetal Bovine Serum) 50 ml; (10 % FSC Medium) GibcoBRL, Cat No.: 10108-165
Trypsin	Trypsin-EDTA-Solution 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA pro Liter in <u>PBS</u> (1x) Cat No.: L11-004; Lot No.: H04121-254 PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)

Demineralisiertes Wasser	hergestellt mit Milli-Q-UF, Millipore (Eschborn, Deutschland)
0,1 N Essigsäure	497,05 ml demineralisiertes Wasser versetzt mit 2,95 ml <u>Eisessig</u> Baker Chemicals (Deventer, Niederlande)
Collagen-Essigsäure	Collagen 1 Typ R, aus Rattenschwanz 6 mg/ml in 0,2 % Essigsäure-Lösung, pH 3,2-4,0 Cell Concepts GmbH (Umkirch, Deutschland) Order No.: Z-17C03-A verdünnt auf 0,2 mg/ml mit 0,1 N Essigsäure
MTT	3[4,5- Dimethylthiazol-2 yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide M2128, Lot.: 66H5033 Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
PBS-Puffer	250 mg <u>MTT</u> werden gelöst in 50 ml <u>PBS</u> (Phosphatgepufferte Saline, pH 7,4) Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Lyse-Reagenz	20 g <u>SDS</u> (SDS-Sodiumdodecylsulphate) Sigma (Deisenhofen, Deutschland) gelöst in 50 ml H ₂ O und 50 ml <u>DMF</u> (N,N-Dimethylformamid) Merck (Darmstadt, Deutschland)

2.1.4 Einmal-Laborbedarf

Zellkulturflaschen, steril, 25 cm ²	TPP
Zentrifugenröhrchen, steril, 14 ml	TPP
sterile Pipetten, 1 ml	Castor, Steripette
sterile Pipetten, 5 ml	Falcon
sterile Pipetten, 10 ml	Falcon
sterile Pipetten, 20 ml	Falcon
sterile Pipetten, 50 ml	Falcon
Standartips, 100 µl	Eppendorf
Standartips, 1000 µl	Eppendorf
Kombitips, 0,5 ml	Eppendorf

Kombitips, 1 ml	Eppendorf
Kombitips, 5 ml	Eppendorf
Kulturplatten, 96 Well	Microtest™ 96, Tissue Culture Plate; Falcon, Becton Dickinson Labware Order No.: 353072
Zytostatika-Handschuhe Handschuhe	Nitrile 242 mm, Ref No.: 52002M Satin Plus AQL 1,5; Ref No.: SP2330E SafeSkin GmbH (Neufahrn, Deutschland)

2.1.5 Geräte

Varipette, 10-100 µl	Eppendorf
Varipette, 100-1000 µl	Eppendorf
Multipette Plus	Eppendorf
Akkupipette	pipetus-akku; Hirschmann Laborgeräte
sterile Werkbank	W.H. Mahl (Kaarst, Deutschland)
CO ₂ -Begasungsbrutschrank (Temp. 37 °C, 7 % CO ₂)	Heraeus (Düsseldorf, Deutschland)
Schüttler	IKA-VIBRAX-VXR, electronic Typ VX2; Janke&Kunkel
Mikroskop	ICM 405; Zeiss
Zellzähler	Coulter Counter ZM; Counter Electronics Ltd.
Assay Reader	Dynatech MR 7000 mit Dynatech REVELATION Software Version G 3.04
Vakuumpumpe	KNF-Vacobox (1000 mbar)

2.2 Methoden

Die verwendeten Methoden beruhen auf den Standardarbeitsanweisungen für in-vitro-Zytotoxizitäts-Tests „SOP-MTT.doc“ (Version 1-2001) der Arbeitsgruppe „Klinische Pharmakologie“; Prof. Dr. J. Boos.

2.2.1 Pflege der Zellkulturen

2.2.1.1 Das Einfrieren

Zur Langzeitlagerung einer Zelllinie im Labor dient die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff bei -197 °C. Diese Lagerung bewahrt die Zellen vor Kontamination und Variabilität durch Subkultivierung.

Die Zellen wurden dazu in Medium (bestehend aus 10 % DMSO, 10 % FCS, 80 % RPMI) in spezielle Kryo-Tubes pipettiert und langsam auf -80 °C abgekühlt (ca. 1 °C pro Minute). Nach 24 Stunden wurden sie in die Flüssigphase des Stickstoffbehälters überführt.

2.2.1.2 Das Auftauen

Nach dem Auftauen der Kryo-Tubes im 37-°C-Wasserbad wurden die Zellen mit RPMI-Medium re-suspendiert und bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in 8 ml frisches RPMI-Medium mit 10 % FCS aufgenommen und in ein Kulturfläschchen überführt.

2.2.1.3 Das Passagieren/Teilen

Die Züchtung der Zellkulturen erfolgte in 25 cm² Flaschen, die in 7 %-iger CO₂-Athmosphäre bei 37 °C im Begasungsbrutschrank inkubiert wurden.

Wenn die Flaschenböden dicht mit den adhärennten Zellen bewachsen waren, wurden sie passagiert:

Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt. Der Ablösevorgang begann mit der Zugabe von 1 ml Trypsin, welches durch Schwenken der Flasche den gesamten Boden benetzte. Nach kurzem Einwirken wurde das Trypsin bis auf ca. 100 µl abgesaugt und die Flaschen für fünf Minuten in den Inkubator gestellt. Dort lösten sich die Zellen ab und wurden dann durch „Waschen“ mit 5 ml Medium suspendiert.

Die Zellen ließen sich nun nach Schema in verschiedenen Verhältnissen teilen. Letztendlich enthielt jedes neue Kulturfläschchen 8 ml Medium-Zellsuspension.

verwendete Zellteilungs-Schemata:

CADO-ES-1:	1:5 bzw. 1:7; 2 x pro Woche
VH-64:	1:25 für 4 d bzw. 1:15 für 3 d
STA-ET-1:	1:10; 2 x pro Woche
STA-ET-2.1:	1:7 bzw. 1:10; 2 x pro Woche

2.2.1.4 Das Aussiedeln

Zunächst erfolgte das Ablösen und Suspendieren der Zellen wie unter 2.2.1.3 beschrieben. Mit Hilfe des Zellzählers wurde die Zellzahl der erhaltenen Suspension bestimmt. Durch weitere Zugabe von Medium wurde für jede Zelllinie eine Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl pro 100 µl Medium hergestellt, welche vorab anhand von Wachstumskurven über 24, 48, 72 und 96-Stunden-Inkubation (vergl. 2.2.2.1) ermittelt worden war. Von der erhaltenen Zellsuspension wurden nun 100 µl pro Vertiefung auf 96-Loch-Platten ausgesiedelt. (Diese Platten wurden vor dem Aussiedeln der Zellen unter sterilen Bedingungen mit 50 µl Collagen-Essigsäure pro Vertiefung beschichtet und unter laufender Werkbank über Nacht getrocknet.)

Nach dem Aussiedeln wurden die belegten Kulturplatten für 72 Stunden im CO₂-Inkubator bebrütet, um eine ausreichende Adhärenz der Zellen zu gewährleisten.

2.2.2 Durchführung der in-vitro-Toxizitätstests

2.2.2.1 Wachstumskurven

Es ist sinnvoll, vorab für jede Zelllinie eine Wachstumskurve unter den geplanten Versuchsbedingungen zu ermitteln. Anhand dieser Kurven wurde die für die Toxizitätstests optimale Zellzahl bestimmt.

Zu beachtende Kriterien:

- Die Zellen sollten im Beobachtungszeitraum ein exponentielles Wachstum zeigen.
- Es sollten initial ausreichend viele stoffwechselaktive Zellen vorhanden sein, um die wachstumshemmenden bzw. zytotoxischen Effekte der folgenden Toxizitätstests sicher erfassen zu können.
- Es war zu prüfen, ob eine maximale Füllung der Vertiefungen (200 µl) das optimale Wachstum der Zellen verändert, oder ob durch Absaugen des Mediums die Zellzahl beeinflusst wird.

Anhand von 2 Modifikationen eines Grundschemas wurden die Kriterien überprüft:

Grundschemata

Eine 96-Loch-Platte wurde horizontal in der Mitte in zwei Hälften aufgeteilt. In die obere Plattenhälfte pipettierte man in jede Vertiefung 5000 Zellen, in die untere Hälfte 2500. Die Zellen wurden als 100- μ l-Medium-Suspension pro Vertiefung ausplattiert. Nach diesem Schema wurde für jede Zelllinie eine eigene Platte hergestellt. Nun wurden nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h jeweils zwei vertikale Reihen pro Platte mittels MTT-Assay (10 μ l MTT/Vertiefung) ausgewertet, um die stoffwechselaktiven Zellen zu bestimmen. (Zur Durchführung des MTT-Assays siehe 2.2.2.5, S. 33)

Modifikation 1

Auch hier wurden die Zellen als 100- μ l-Medium-Suspension ausplattiert. Zusätzlich belegte man jede Vertiefung mit weiteren 100 μ l Nährmedium, welches das Volumen der Zytostatikaverdünnung bei den folgenden Tests simulierte. Der MTT-Test wurde wie im Grundschemata beschrieben durchgeführt, allerdings mit 20 μ l MTT/Vertiefung.

Modifikation 2

Vor der Durchführung des MTT-Assays wurden die nach obigem Schema belegten Platten komplett mit Unterdruck abgesaugt und mit 100 μ l frischem Medium pro Vertiefung neu belegt. Dann folgte analog der MTT-Test mit 10 μ l MTT/Vertiefung.

2.2.2.2 Testung der Lösungsmittel

Die Stammlösungen der verwendeten Zytostatika wurden durch Auflösen der Prüfsubstanzen entsprechend ihrer Löslichkeit in destilliertem Wasser, Ethanol, oder DMSO hergestellt. Um einen eventuellen Einfluss des Lösungsmittels auf das Wachstum der Zelllinien festzustellen, wurde bei allen Versuchsreihen neben der Kontrolle ohne Prüfsubstanz (K_0) eine Kontrolle ohne Prüfsubstanz, aber mit dem entsprechenden Lösungsmittel getestet (K_x). Dabei wurde das Volumen an Lösungsmittel eingesetzt, welches mit der höchsten Prüfsubstanz-Konzentration auf den Zellen verwendet worden war.

2.2.2.3 Verdünnungsreihen der Prüfsubstanzen

Die Verdünnungsreihen der Prüfsubstanzen wurden für jede Versuchsreihe mit Hilfe von eingefrorenen Stammlösungen frisch hergestellt. Hierzu wurde zunächst die höchste für den MTT-Test benötigte Konzentration an Prüfsubstanz durch Verdünnung der Stammlösung mit Medium hergestellt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Charakteristika der verwendeten Zytostatika-Stammlösungen.

<u>Zytostatikum</u>	<u>Molekulargewicht</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Stammlösung</u>
4-OOH-Cyclo.	277,1 g/mol	dest.H ₂ O	2 mg/ml
ThioTEPA	189,23 g/mol	dest. H ₂ O	10 mg/ml
Etoposid	588,6 g/mol	DMSO	10 mg/ml
Topotecan	421,46 g/mol	dest. H ₂ O	1 mg/ml
Ukrain	1522,26 g/mol	dest. H ₂ O	1 mg/ml
Chelidonium m.	353,04 g/mol	dest. H ₂ O/Ethanol	1,2 mg/ml

1:1

Die übrigen Verdünnungen entstanden dann durch 1:10, 1:5, 1:2, oder entsprechend andere Weiterverdünnung. Um die Verdünnung der Prüfsubstanz durch das schon auf den Platten befindliche Volumen der Zellsuspension zu berücksichtigen, musste die gewünschte Konzentration der Prüfsubstanz jeweils verdoppelt werden (100 µl Zellsuspension plus 100 µl Prüfsubstanz doppelt konzentriert). Die Reihen umfassten für jede der Prüfsubstanzen 10 verschiedene Konzentrationen, die einen an klinischen Plasmaspiegeln orientierten Bereich abdeckten (Cyclo, Eto, Topo, ThioT), bzw. anhand von früheren in-vitro-Tests ausgewählt wurden (Cyclo, Eto, Ukrain) und einen Konzentrationsbereich von 3 Zehnerpotenzen umfassten (Tabelle 5).

Auf diese Weise entstanden Wachstumskurven, die das Wachstumsverhalten der Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (24-96 h) und den schrittweise gesteigerten Zytostatikakonzentrationen darstellen. Die in vitro wirksame Konzentration konnte daraus bestimmt werden.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zytostatikakonzentrationen.

<u>Zytostatikum</u>	<u>10 Testkonzentrationen (µM)</u>
4-OOH-Cyclophosphamid	0,4-400
Etoposid	0,1-100
ThioTEPA	0,5-500
Topotecan	0,1-100
Ukrain	0,05-50
Chelidonium majus L.	0,05-50

Die Abbildung 4 zeigt beispielhaft das Belegungsschema einer 96-Loch Platte mit 10 verschiedenen 4-OOH-Cyclophosphamid- und 10 verschiedenen Topotecan-Testkonzentrationen, Inkubationsansatz mit n = 1 (in einer 4-fachen Bestimmung). Bei **K₀** und **K_x** handelt es sich um die unter 2.2.2.2, S. 30 beschriebenen Kontrollen.

													4-OOH-Cyclophosphamid (μM)	
		↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			
		0,4	1	2	4	10	20	40	100	200	400			
													Topotecan (μM)	
↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			
K0	Kx	0,1	0,25	0,5	1	2,5	5	10	25	50	100			

Abb. 4: Beispielhaftes Belegungsschema einer 96-Loch Platte, Einzelversuche.

2.2.2.4 Inkubation mit Zytostatikalösung

Nach der 3-tägigen Anwachsphase im Inkubator wurden die Zellplatten mikroskopisch auf ausreichende Zelldichte überprüft. Anschließend wurde bei jeweils vier Vertiefungen pro Ansatz ein MTT-Assay (mit 10 μl MTT) durchgeführt, um das Wachstum der Zellen vor der Zytostatikainkubation bestimmen zu können (t_0 - Wachstum zum Zeitpunkt 0).

Die benötigten Verdünnungsreihen der zu testenden Zytostatika wurden vor jedem Experiment neu angesetzt (vergleiche 2.2.2.3). Danach wurde in jede Vertiefung der Platten 100 μl der entsprechenden Zytostatikaverdünnung bzw. des Mediums, oder des Lösungsmittel-Mediums im Falle der Kontrollen, vorsichtig zugegeben. Jede Vertiefung war nun mit insgesamt 200 μl belegt (vergl. Modifikation 1, 2.2.2.1, S. 30). Anschließend wurden die Platten in vier Gruppen aufgeteilt und entweder für 24 h, 48 h, 72 h, oder 96 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Jede der vier Zelllinien wurde mit allen sechs Zytostatika-Verdünnungsreihen getestet.

Standardversuchsablauf:

1. Aussaat der Zellen auf 96-Loch-Platten
 - 3-tägige Anwachsphase (Inkubator)
2. Zugabe der Zytostatika-Lösung
 - 4-tägige Inkubationsphase
3. Quantifizierung des Zellwachstums mittels MTT-Assay und photometrischer Messung im Elisa-Reader

2.2.2.5 MTT-Assay

Zu den jeweiligen Messzeitpunkten wurden mit einer Multipette 20 µl MTT-Lösung in die mit Kontroll- oder Prüfsubstanzen belegten Vertiefungen pipettiert.

Während der folgenden vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C wird das MTT intrazellulär unter Verbrauch von NADH und NADPH in den Mitochondrien zu violetter Formazan umgesetzt, welches in den Zellen auskristallisiert.

Nach der Inkubation wurde das MTT-Medium vorsichtig mittels Unterdruck abgesaugt, ohne den gefärbten Zellrasen zu beschädigen. Die Vertiefungen wurden mit je 100 µl Lysepuffer belegt und vorsichtig geschüttelt, bis sich die Zellmembranen und die Formazankristalle vollständig zu einer homogenen blau-violetten Färbung aufgelöst hatten. Im Elisa-Reader konnte nun die Extinktion der Farbstofflösung bei einer Wellenlänge von 550 nm als Testfilter und 630 nm als Referenzfilter photometrisch bestimmt werden.

Die gemessene optische Dichte korreliert mit der Menge an gebildetem Formazan, welches wiederum direkt mit der Anzahl an stoffwechselaktiven Zellen korreliert.

2.2.2.6 Kombinationsversuche

Im Anschluss an die Toxizitätstests mit jeweils nur einer Prüfsubstanz in verschiedenen Konzentrationen sollte die Wirkung von ausgewählten Kombinationen überprüft werden. Das Belegungsschema der Zellkulturplatten wurde dazu modifiziert. Alle Kombinationen wurden an allen vier Zelllinien getestet und zum Teil wiederholt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen (vergleiche 2.2.3.5, S. 36).

Zu testende Kombinationen:

- 4-OOH-Cyclophosphamid mit Topotecan
- 4-OOH-Cyclophosphamid mit Etoposid
- Etoposid mit Topotecan
- ThioTEPA mit Chelidonium majus L.

Anhand der Ergebnisse der Einzelversuche wurden für das erste Zytostatikum („Basiszytostatikum“) zwei Testkonzentrationen ausgesucht: Diese unterschieden sich um eine 10er-Potenz und begrenzten einen Konzentrationsbereich, in dem bei allen Zelllinien nach 72-96 h Inkubation 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht worden war. Zu diesen beiden „Basiskonzentrationen“ wurden fünf Konzentrationen des zweiten Zytostatikums ausgewählt, um sie als Verdünnungsreihe mit dem ersten zeitgleich zu kombinieren. Diese Verdünnungsreihe entsprach einem Konzentrationsbereich, der zuvor in den Einzelversuchen als wirksam befunden worden war.

Die Abbildung 5 zeigt beispielhaft das Belegungsschema einer Platte mit

<u>Cyclo 1 µM/ 10 µM</u>	mit Etoposid in 5 Konzentrationen von 0,1 µM bis 250 µM
<u>Cyclo 1 µM/ 10 µM</u>	mit Topotecan in 5 Konzentrationen von 0,001 µM bis 10 µM

Nach dem gleichen Schema wurden

<u>Etoposid 1 µM/ 10 µM</u>	mit Topotecan in 5 Konzentrationen von 0,001 µM bis 10 µM
<u>ThioTEPA 5 µM/50 µM</u>	mit Chelidonium in 5 Konzentrationen von 5 µM bis 125 µM

belegt.

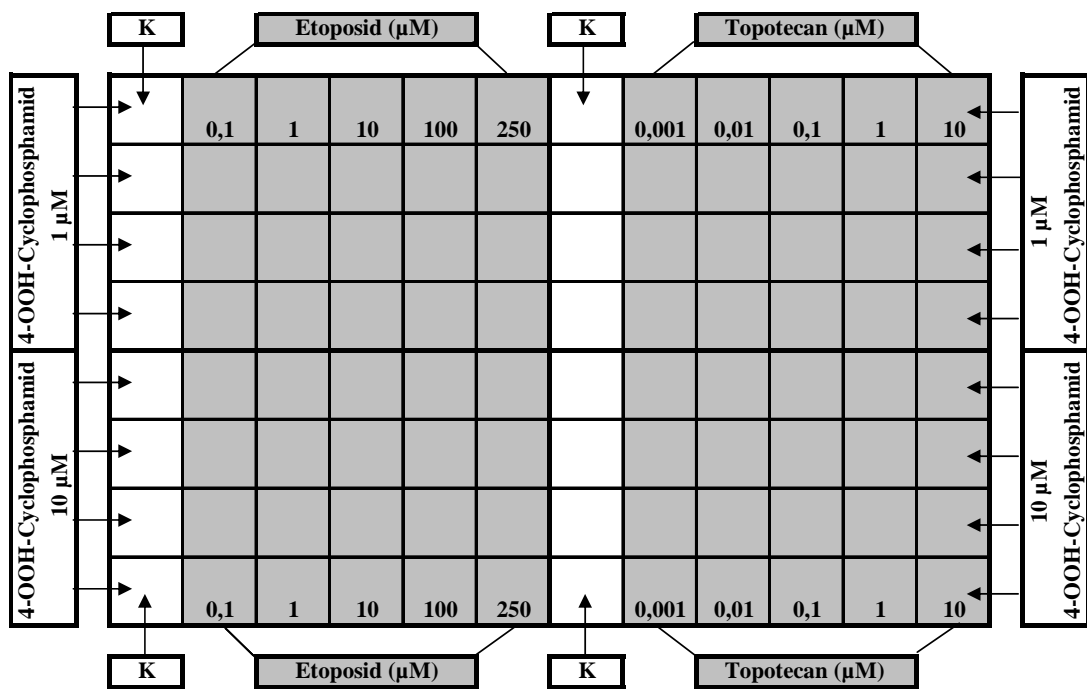


Abb. 5: Beispielhaftes Belegungsschema einer 96-Loch Platte, Kombinationsversuche.

Um insgesamt 100 µl Prüfsubstanz pro Well zu erhalten, wurden vom „Basiszytostatikum“ und dem Kombinationspartner jeweils 50 µl verwendet. Die Kontroll-Wells (**K**) waren mit 50 µl „Basiszytostatikum“ und 50 µl Kontrolllösung belegt, die sich aus Medium plus der entsprechend höchsten verwendeten Lösungsmittelkonzentration zusammensetzte. Das Gesamtvolumen des Inkubationsansatzes betrug somit 200 µl pro Vertiefung. MTT-Tests wurden an Tag 0, sowie nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h Inkubation durchgeführt.

2.2.3 Datenauswertung

Die Erfassung und Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft-Excel (Version OfficeXP).

Die Darstellung der Ergebnisse wurde mit den Programmen SigmaPlot (Version 5.0), Microsoft-Powerpoint (Version OfficeXP), sowie dem Programm Microsoft-Word (Version OfficeXP) realisiert.

2.2.3.1 Ansatzgröße

Die Größe des Inkubationsansatzes wurde pro getesteter Zytostatika-Konzentration auf $n = 1$ (in einer 4-fachen Bestimmung) festgelegt.

2.2.3.2 Definition der GI50 und LC50

In jedem Teilversuch wurde die GI50 (Growth Inhibition) oder die LC50 (Lethal Concentration) bestimmt. Es handelt sich um diejenigen Zytostatikakonzentrationen, welche nach einer bestimmten Inkubationszeit zu einer 50 %-igen Wachstumshemmung (GI50) bzw. zu einem 50 %-igen Absterben der Zellen (LC50) führten.

2.2.3.3 Graphische Darstellung der GI50

Um den Einfluss der unterschiedlichen Testsubstanzen auf das Wachstum der vier Zelllinien vergleichen zu können, wurde für jedes Zytostatikum die Wachstumshemmung nach 72stündiger Inkubation graphisch dargestellt. Die für die Kontrolle K_0 (Medium-Kontrolle nach 72 h Inkubation) gemessene Extinktion entspricht dabei einem 100 %-igen Wachstum. Alle weiteren Extinktionen wurden prozentual auf diesen Wert berechnet und als Wachstum auf die Ordinate aufgetragen. Auf der Abszisse sind halb-logarithmisch die eingesetzten Zytostatikakonzentrationen in μM aufgetragen. Die 50 %-ige Wachstumshemmung (GI50) ist in der Darstellung durch eine Parallele zur Abszisse, welche die Ordinate bei 50 % schneidet, markiert. An den Schnittpunkten der einzelnen Graphen mit dieser Parallele lassen sich die Werte der GI50 (in μM) auf der Abszisse ablesen.

(Ausführliche Erläuterungen zur graphischen Darstellung der Kombinationsversuche finden sich in Kapitel 3.3.6, S. 60)

2.2.3.4 Berechnung der GI50/LC50

Außerdem wurde die Steigung jeder Wachstumskurve zwischen einem Wert, bei dem die Wachstumshemmung noch unter 50 % betrug (Koordinaten: y_2, x_2), und einem Wert, bei dem sie schon über 50 % lag (Koordinaten: y_1, x_1), bestimmt.

Steigungsgleichung: $m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$

Gradengleichung: $y_1 = mx_1 + b$ Umgeformt zu: $x_3 = \frac{x_1 - (y_1 - 50)}{m}$

$$y_2 = mx_2 + b$$

$$50 = mx_3 + b$$

Somit ist x_3 die Zytostatikakonzentration in μM , bei der eine 50 %-ige Wachstumshemmung (GI50) bzw. 50 %-ige Letalität (LC50) der Zellen erreicht wurde.

2.2.3.5 Reproduzierbarkeit

Ausgewählte Toxizitätstests wurden unter gleichen Versuchsbedingungen wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. So wurde die Einzelinkubation mit 4-OOH-Cyclophosphamid an allen vier Zelllinien nach Monaten erneut getestet, und die Koinkubationen von 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid und 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan anhand der Zelllinie CADO-ES-1 nach einigen Wochen wiederholt. Die Ergebnisse der jeweiligen graphischen Gegenüberstellung von Ausgangs- und Wiederholungsversuch sind im Folgenden dargestellt.

Reproduzierbarkeit Einzelinkubation mit 4-OOH-Cyclophosphamid (Abb. 6 a-c):

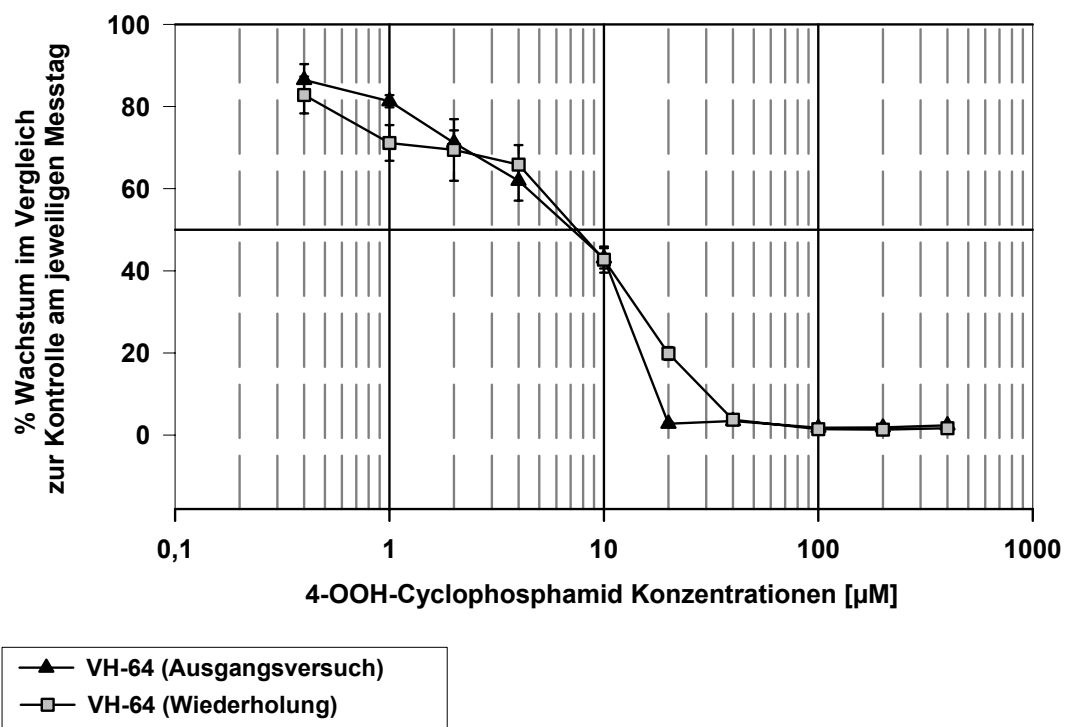


Abb. 6a: Wachstumshemmung bei VH-64 unter 72 h 4-OOH-Cyclophosphamid.

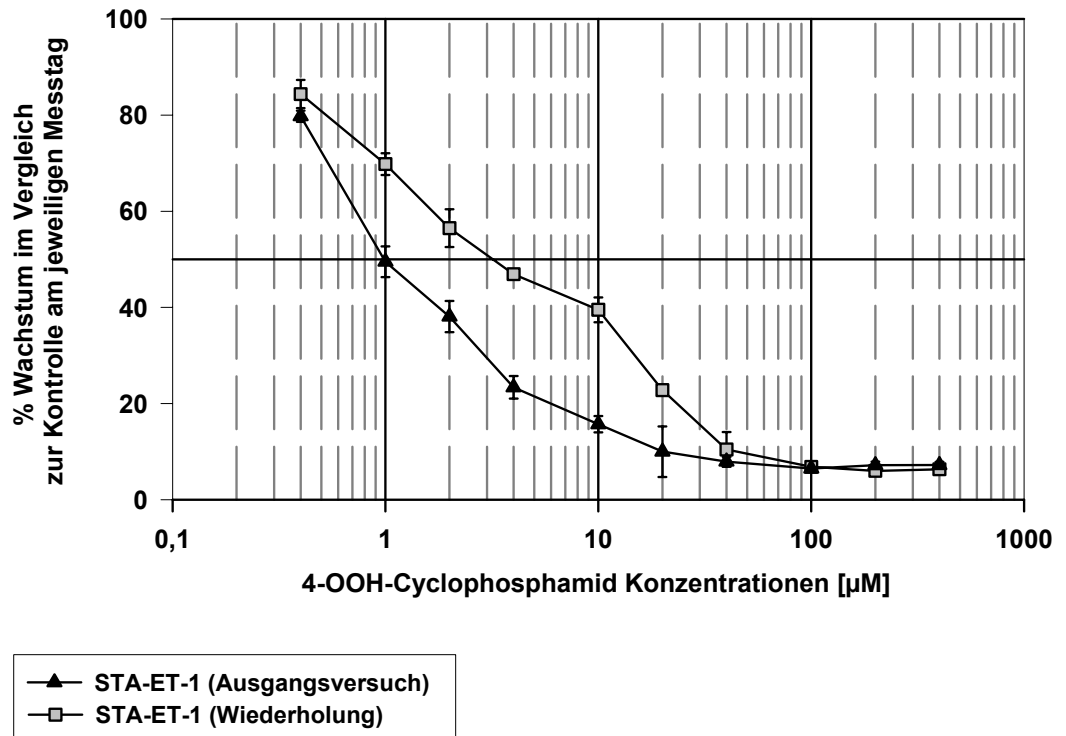


Abb. 6b: Wachstumshemmung bei STA-ET-1 unter 72 h 4-OOH-Cyclophosphamid.

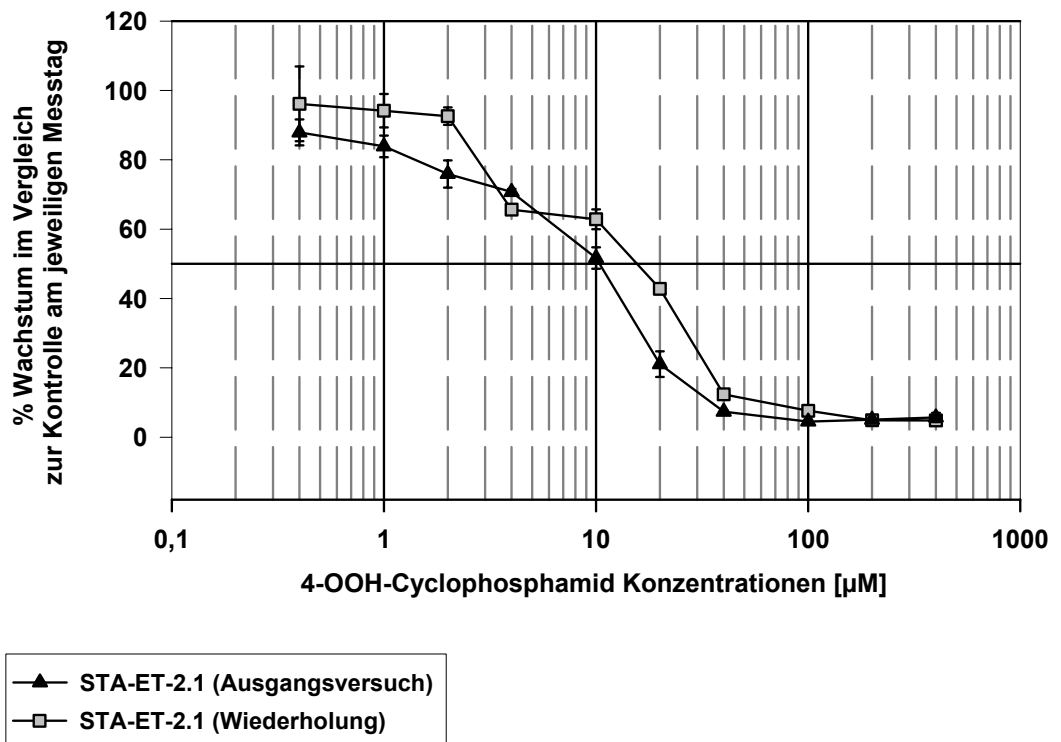


Abb. 6c: Wachstumshemmung bei STA-ET-2.1 unter 72 h 4-OOH-Cyclophosphamid.

Die Abbildungen 6a-c zeigen die Inkubation der Zelllinien mit 4-OOH-Cyclophosphamid. In je einer Abbildung werden Ausgangs- und Wiederholungsversuch für eine Zelllinie graphisch dargestellt. Bei den Linien VH-64 und STA-ET-2.1 (Abb. 6a, 6c) verliefen die Graphen für den Ausgangs- und den Wiederholungsversuch fast deckungsgleich und wiesen somit eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Auch bei STA-ET-1 (Abb. 6b) zeigte sich eine vergleichbare Wachstumshemmung im Ausgangs- und Wiederholungsversuch (GI50 von 1 bzw. 3 μM). Die Zelllinie CADO-ES-1 (ohne Abb.) zeigte im Wiederholungsversuch kein ausreichendes Ausgangswachstum (mittlere Extinktion von K_0 nach 24 h: 0,205 im Vergleich zu 0,633 im Ausgangsversuch; schon unter Inkubation mit geringen Cyclophosphamid-Konzentrationen ergaben sich daher Extinktionen von $< 0,020$, die vom Testgerät nicht mehr exakt erfasst werden können), daher war ein Vergleich der Wachstumshemmung mit der des Ausgangsversuches nicht möglich.

Insgesamt lagen die 4-OOH-Cyclophosphamid-Konzentrationen, welche eine 50 %-ige Inhibition bewirkten, beim Wiederholungsversuch im Bereich von ca. 3-15 μM . Diese Werte stimmen etwa mit denen der Ausgangstestung überein (1-10 μM). Ab 40 μM 4-OOH-Cyclophosphamid zeigte sich sowohl im Ausgangs-, als auch im Wiederholungsversuch für alle Linien eine Parallelität der Kurven mit einem Restwachstum im Bereich von 0-18 % (vergleiche dazu Abb. 6a-c).

Die Ergebnisse dieses graphischen Vergleiches belegen anhand der Inkubation mit 4-OOH-Cyclophosphamid die Reproduzierbarkeit der Einzelversuche.

Reproduzierbarkeit der Kombinationsversuche:

Um die Reproduzierbarkeit der Versuche zu überprüfen, wurde die Zelllinie CADO-ES-1 zu einem späteren Zeitpunkt unter gleichen Bedingungen erneut mit den Kombinationen 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid und 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan inkubiert. Im Folgenden wurden die Ergebnisse dieser Wiederholungsversuche den entsprechenden Ausgangsversuchen graphisch gegenübergestellt (Abb. 7a und b, Abb. 8a und b, Abb. 9 a und b, Abb. 10a und b).

Die Abbildungen 7a und 7b zeigen die Inkubation von CADO-ES-1 mit 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid, **dargestellt mit Hilfe der LC50**. Da die Ausgangszellzahlen beider Versuche an Tag 0, welche jeweils als Bezugswert dienten, um fast 50 % voneinander abwichen (Extinktionsmittelwert im Ausgangsversuch 0,491 gegenüber 0,281 bei der Wiederholung), ergab sich für beide Versuche ein unterschiedliches prozentuales Ausgangswachstum. Trotzdem zeigt sich beim Vergleich des Ausgangsversuches mit dem Wiederholungsversuch ein gleichförmiger Kurvenverlauf. Die Kombination mit 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid bewirkte in beiden Testungen über den Konzentrationsbereich von 0,1-100 μM Etoposid eine konstante Hemmung (Restwachstum 45 % im Ausgangsversuch und 65 % bei der Wiederholung), die sich ab 100 μM steigerte: weiterer Zellverlust jeweils um 20-25 %. Die Kombination mit 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid bewirkte im Bereich von 0,1-1 μM Etoposid einen Abfall von 10 % im Ausgangsversuch und 20 % bei der Wiederholung. Im Bereich von 1-10 μM betrug der Zellverlust jeweils ca. 70 %.

Obwohl die Ausgangszellzahl um fast 50 % variierte, zeigte sich doch jeweils eine gleichförmige Hemmwirkung der Testkombinationen auf die Zellen.

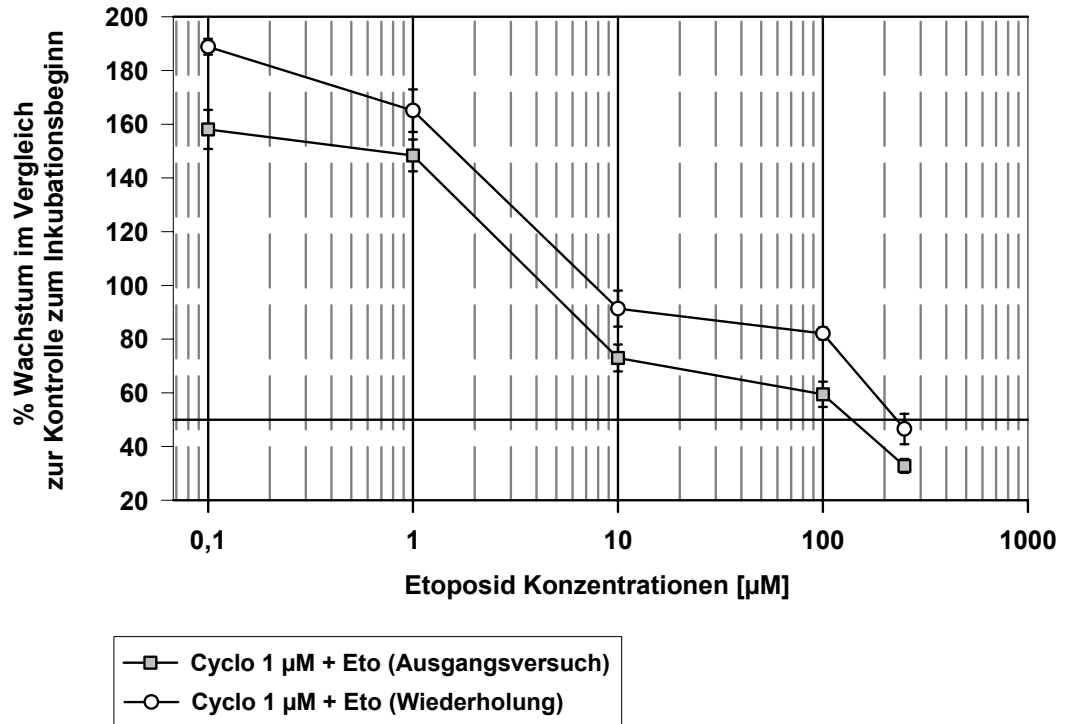


Abb. 7a: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

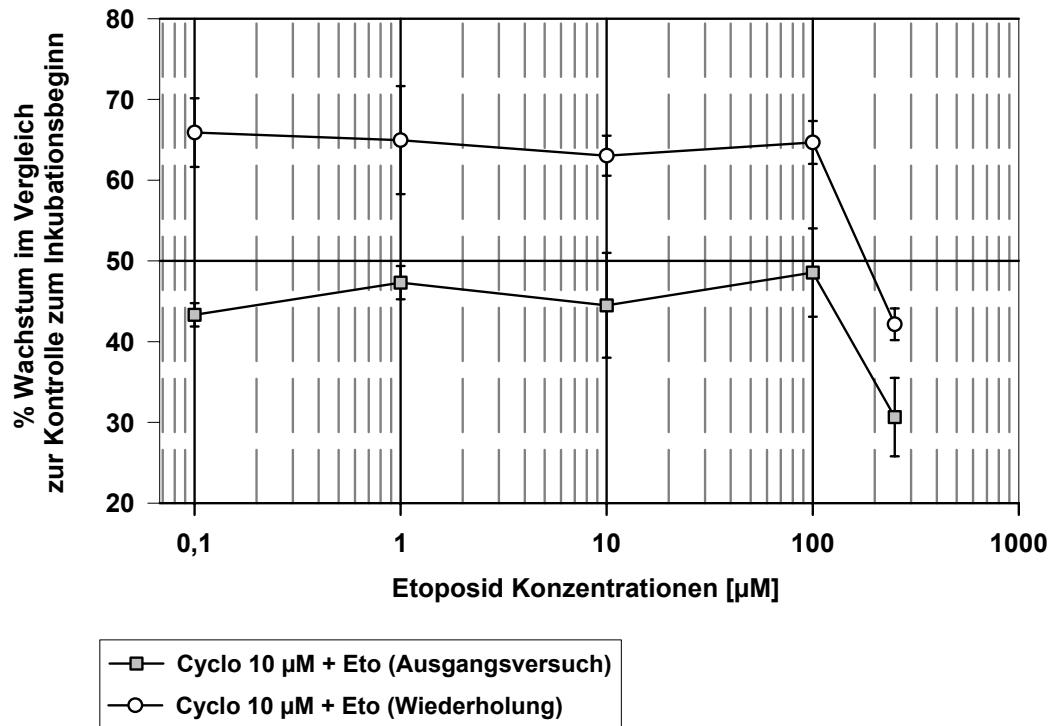


Abb. 7b: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

Ergänzend wurde die Koinkubation von CADO-ES-1 mit 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid auch **in Form der GI50** (Wachstumshemmung bezogen auf eine Kontrolle am jeweiligen Messtag) dargestellt (Abb. 8a und 8b). Durch die annähernd gleiche Ausgangszellzahl im Ausgangs- und im Wiederholungsversuch lässt sich die Reproduzierbarkeit besser beurteilen. Da allerdings bei dieser Darstellungsform die Bezugskontrollen schon mit dem jeweiligen „Basiszytostatikum“ behandelt waren (vergl. 2.2.2.6, S. 34), wird hier die reale Wachstumshemmung der beiden Kombinationen nur unzureichend dargestellt. Die Abbildungen 8a und 8b dienen also lediglich der Darstellung der Reproduzierbarkeit!

Vergleicht man die Graphen, so zeigt sich ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf: Auch in der Wiederholung lagen die GI50-Werte für die Kombination von 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit Etoposid bei 10 μM . Außerdem ließ sich auch hier keine GI50 für die Kombination von 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit Etoposid bestimmen - bei konstanter Zellzahl im Konzentrationsbereich von 0,1-100 μM Etoposid. Wie im Ausgangsversuch zeigte sich erst ab 100 μM eine Wachstumshemmung auf maximal ca. 80 % (bei 250 μM) im Vergleich zur Kontrolle.

Dieser graphische Vergleich belegt anhand von CADO-ES-1 die Reproduzierbarkeit der Kombinationsversuche bezüglich der Darstellung der Wachstumshemmung.

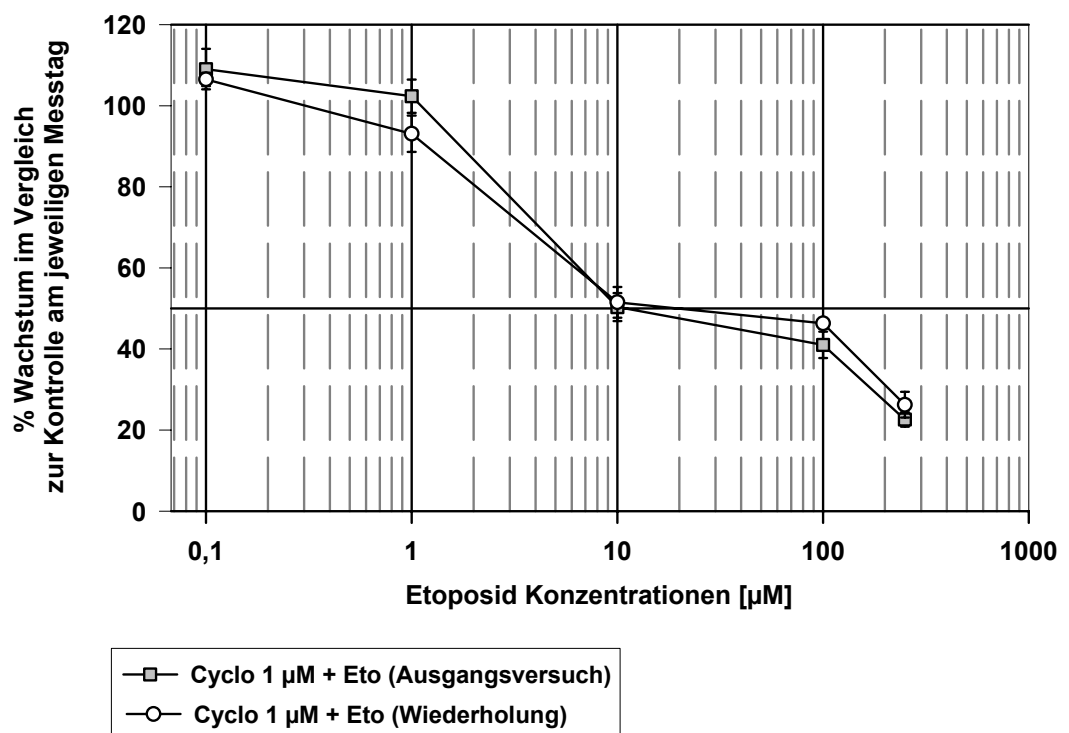


Abb. 8a: Wachstumshemmung bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

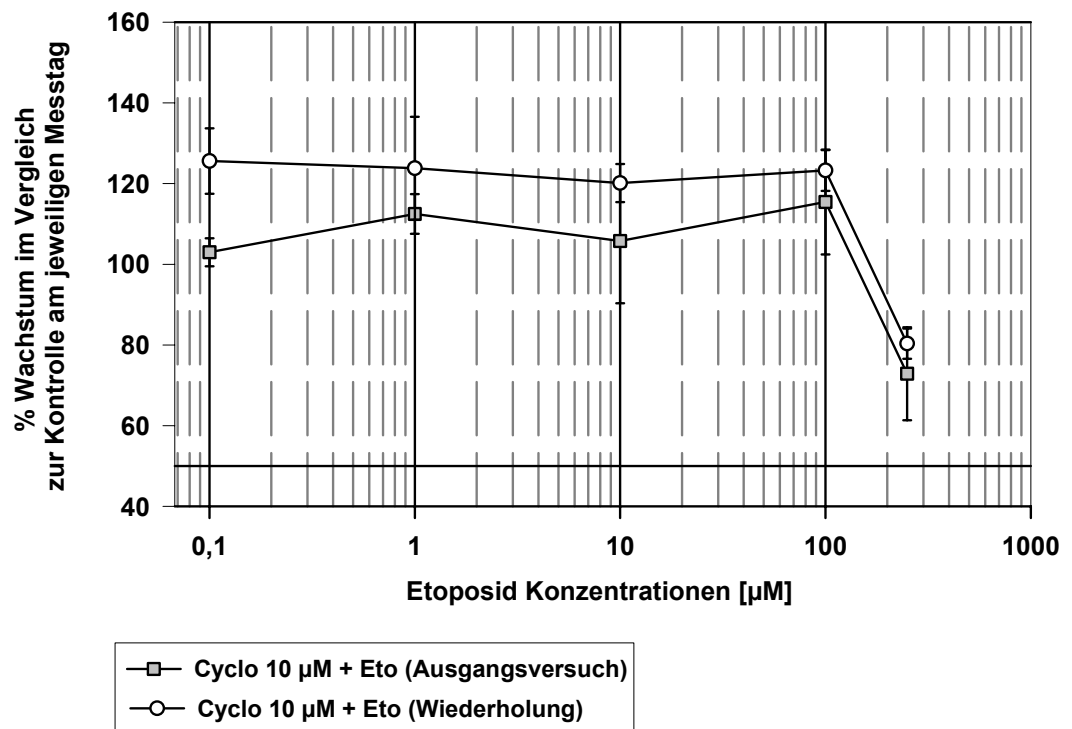


Abb. 8b: Wachstumshemmung bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

Die Abbildungen 9a und 9b zeigen die Inkubation von CADO-ES-1 mit 4-OOH-Cyclophosphamid und Topotecan zur Prüfung der Reproduzierbarkeit, zunächst **dargestellt mit Hilfe der LC50**. Unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Ausgangswachstums (siehe oben) zeigten die Verläufe der Dosiswirkungskurven weitgehende Übereinstimmung. Die Kombination mit 1 µM 4-OOH-Cyclophosphamid zeigte bei beiden Testungen im Bereich von 0,001-0,01 µM Topotecan den größten Wachstumsabfall der inkubierten Zellen. Die Graphen der Kombination mit 10 µM 4-OOH-Cyclophosphamid zeigten bei beiden Versuchen über den gesamten Konzentrationsbereich eine stagnierende Inhibition mit einem konstanten Restwachstum zwischen 20 und 25 % im Ausgangsversuch und 50 und 75 % bei der Wiederholung.

Auch hier zeigte sich also unter Berücksichtigung des unterschiedlichen Ausgangswachstums bei beiden Versuchen eine vergleichbare Reduktion der Zellzahl.

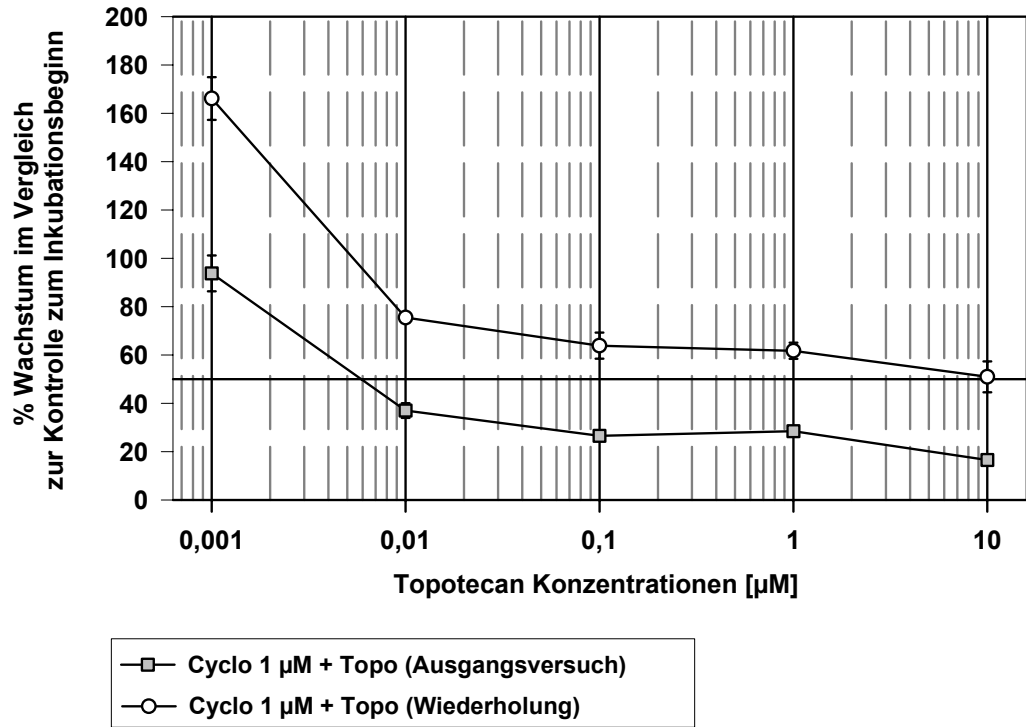


Abb. 9a: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

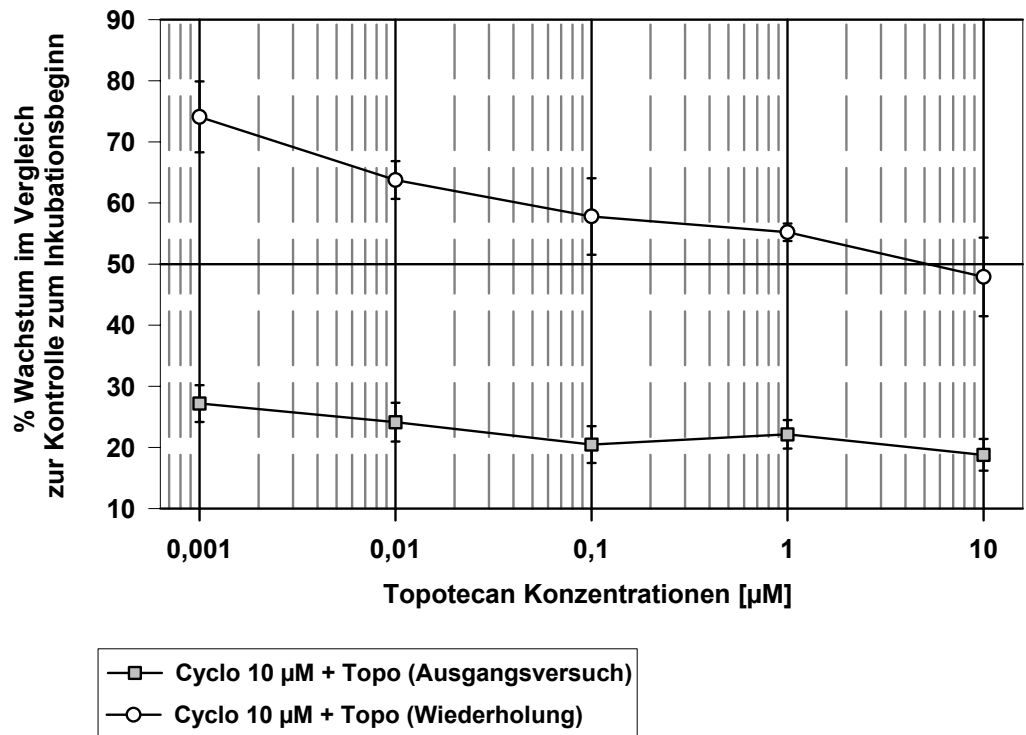


Abb. 9b: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

Ergänzend wurde die Koinkubation von CADO-ES-1 mit 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid auch **in Form der GI50** (Wachstumshemmung bezogen auf eine Kontrolle am jeweiligen Messtag) dargestellt (Abb. 10a und 10b). Durch die annähernd gleichen Ausgangszellzahlen für den Ausgangs- und den Wiederholungsversuch lässt sich die Reproduzierbarkeit der Versuche hier besser beurteilen. Auch diese Abbildungen dienen lediglich der Darstellung der Reproduzierbarkeit und nicht der exakten Wachstumshemmung!

Die Verläufe der Dosiswirkungskurven zeigten weitgehende Übereinstimmung. Zwar hatte die Kurve für die Kombination mit 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid in der Wiederholung bei 0,001 μM mit 75 % Zellwachstum einen niedrigeren Ausgangswert, doch bei 0,01 μM zeigten beide Versuche eine identische Wachstumshemmung auf 35 %. Auch die GI50 dieser Kombination war mit 0,005 μM im Ausgangsversuch und 0,004 μM in der Wiederholung fast gleich. Bei beiden Versuchen verlief die Kurve der Kombination 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan von einem Ausgangswachstum zwischen 90-100 % bis zu einer maximalen Wachstumshemmung von ca. 65 %, ohne 50 %-ige Wachstumshemmung zu erreichen.

Dieser graphische Vergleich belegt anhand von CADO-ES-1 die Reproduzierbarkeit der Kombinationsversuche bezüglich der Darstellung der Wachstumshemmung.

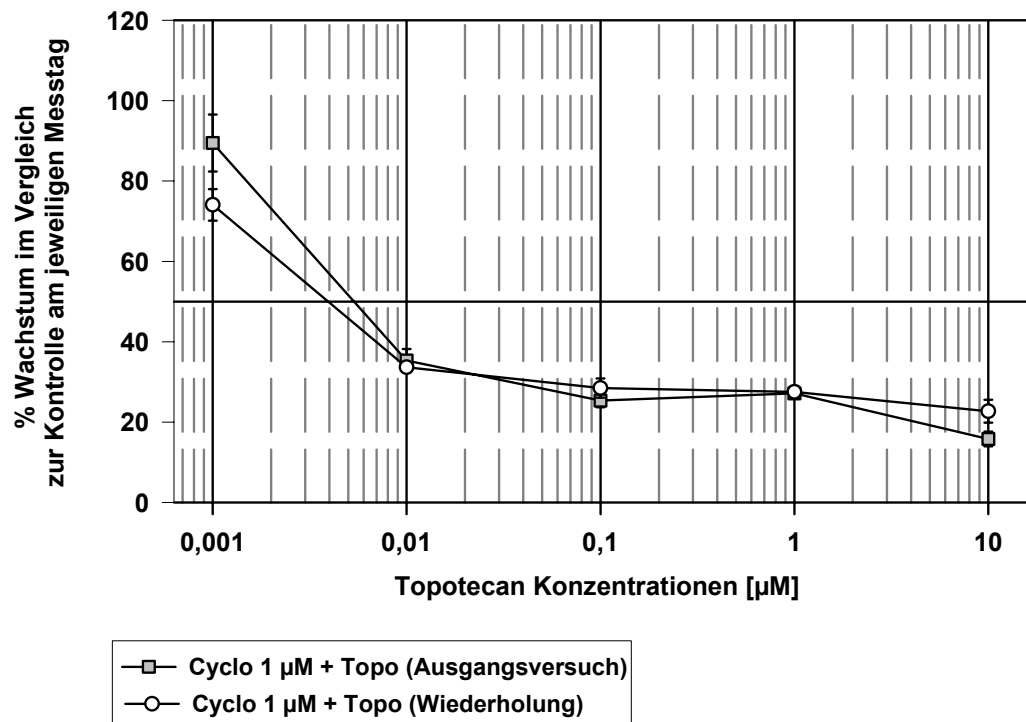


Abb. 10a: Wachstumshemmung bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

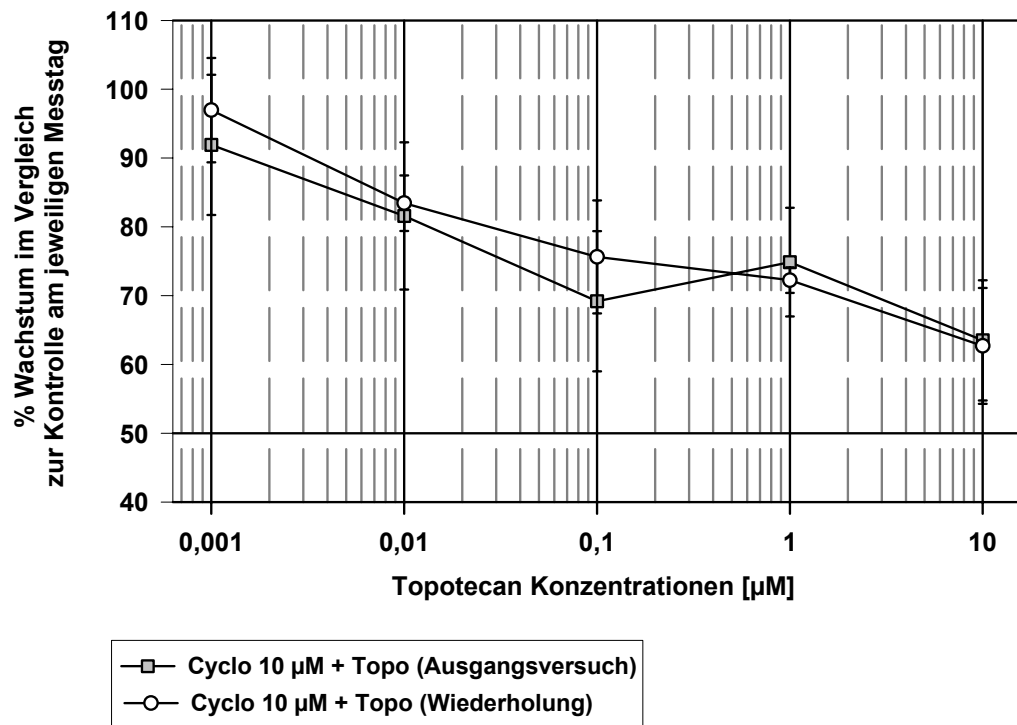


Abb. 10b: Wachstumshemmung bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Wachstumskurven

Anhand der Wachstumskurven über eine Inkubation von 24 h, 48 h, 72 h, 96 h und 120 h wurden 3000 Zellen pro Vertiefung als optimale Ausgangszellzahl für VH-64 und CADO-ES-1 ermittelt. Bei STA-ET-1 erwiesen sich 6000 und bei STA-ET-2.1 9000 Zellen pro Vertiefung als am günstigsten. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Zellen vor den geplanten Toxizitätstests zunächst für 72 h vorinkubiert werden sollten, um ausreichende Adhärenz zu erzielen. Mit diesen Ausgangskonzentrationen zeigte sich ein weitgehend exponentielles Wachstum der Zellen im Beobachtungszeitraum.

Für die geplanten Toxizitätstests erwies sich ein Verfahren nach Modifikation 1 (siehe 2.2.2.1, S. 30) am praktikabelsten: Die maximale Füllung der Wells mit 200 µl zeigte keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum im Beobachtungszeitraum. Ein Verfahren nach Modifikation 2 wurde verworfen, da es durch das Absaugen zu Zellverlusten mit signifikant niedrigeren Extinktionen bei erhöhten Standardabweichungen kam.

3.2 Einfluss der Lösungsmittel

Parallel zu den Versuchen wurden die vier Zelllinien mit den verwendeten Lösungsmitteln inkubiert (siehe 2.2.2.2, S. 30). Die Wachstums-Differenzen (in %) zwischen der Medium-Kontrolle (K_0 , entspricht 100 %) und der Kontrolle mit dem jeweiligen Lösungsmittel in seiner höchsten verwendeten Konzentration (K_x , entsprechend > oder < 100 %) nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden für jede Testsubstanz addiert und ihr Mittelwert bestimmt.

Beispiel: Testung von destilliertem Wasser (verwendet als Lösungsmittel bei 4-OOH-Cyclophosphamid) an der Zelllinie CADO-ES-1:

	<u>24 h</u>	<u>48 h</u>	<u>72 h</u>	<u>96 h</u>
<u>K_0</u>	100	100	100	100
<u>K_x</u>	96,9	104,8	100,7	107,8
<u>Diff.:</u>	3,1	-4,8	-0,7	-7,8

Summe der Differenzen: -10,2

Mittelwert der Differenzen: -2,55

Die Tabelle 6 zeigt diese Mittelwerte für alle Zelllinien. Da das Wachstum von K_x bei allen Zelllinien teils größer und teils kleiner als K_0 war, ließ sich für das Zellwachstum der Lösungsmittel-Kontrollen insgesamt kein eindeutiger Trend feststellen. Die

gemessenen Differenzen zwischen K_0 und K_x lagen in der Regel unter 10 % (siehe Tab.6). Die Lösungsmittel hatten somit keinen nennenswerten Einfluss auf das Wachstum der Zelllinien. Eine deutliche Abweichung zeigte sich einmalig bei CADO-ES-1 unter Inkubation mit dest. H₂O/Ethanol, bei der eine mittlere Differenz zwischen K_0 und K_x von 34,45 % gemessen wurde. Die Vergleichswerte bei den übrigen Zelllinien wiesen keine derartigen Abweichungen auf. Das für Chelidonium m. verwendete Lösungsmittel (dest. H₂O/Ethanol im Verhältnis 1:1) wurde bei CADO-ES-1 allerdings auch in einem größeren Volumen eingesetzt als bei den übrigen Linien, da bei CADO-ES-1 die höchste Chelidonium-m.-Konzentration 500 µM, bei den übrigen Zelllinien nach Modifizierung aber nur 50 µM betrug, und dem entsprechend dort auch weniger Lösungsmittel benötigt wurde. Möglicherweise wirkte die größere Lösungsmittelmenge bzw. Ethanolmenge zytotoxisch auf die CADO-ES-1-Zellen. Da bei der späteren Auswertung der Versuche bei allen Zelllinien (inklusive CADO-ES-1) nur Chelidonium-m.-Konzentrationen bis 50 µM Berücksichtigung fanden, wurde eine negative Beeinflussung der Ergebnisse durch das Lösungsmittel für CADO-ES-1 jedoch ausgeschlossen.

Tabelle 6: Mittelwerte der Differenzen zwischen K_0 und K_x (in %).

<u>Zytostatikum</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>CADO</u>	<u>VH-64</u>	<u>ET-1</u>	<u>ET-2.1</u>
4-OOH-Cyclo.	dest. H ₂ O	-2,55	5,75	8,85	3,63
ThioTEPA	dest. H ₂ O	-2,18	0,28	-3,13	1,28
Etoposid	DMSO	7,03	2,18	5,83	1,75
Topotecan	dest. H ₂ O	9,85	2,28	1,63	1,93
Ukrain	dest. H ₂ O	-11,4	6,88	5,53	9,30
Chelidonium m.	dest.H ₂ O/Ethanol 1:1	34,5	-1,65	0,98	7,23

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

3.3 Ergebnisse der in-vitro-Toxizitätstests

3.3.1 Graphische Darstellung der Einzelsubstanzen

(Ausführliche Erläuterungen zur graphischen Darstellung der Versuche finden sich in Kapitel 2.2.3.3, S. 35)

3.3.1.1 4-OOH-Cyclophosphamid

Die Abbildung 11 zeigt die Dosiswirkungskurven der vier Zelllinien nach einer Inkubation mit 4-OOH-Cyclophosphamid über 72 Stunden. Die Konzentrationen, die eine

50 %-ige Wachstumshemmung bewirkten, lagen im Bereich von 1-10 μM , mit einer mittleren GI50 von 5,1 μM . STA-ET-1 wies mit 1 μM den niedrigsten GI50-Wert auf. Während die Wachstumshemmung bei STA-ET-1 und CADO-ES-1 über den untersuchten Konzentrationsbereich kontinuierlich zunahm, war sie bei STA-ET-2.1 und VH-64 sigmoidal und in den Konzentrationen ab 4 μM deutlich zunehmend. Den höchsten GI50-Wert zeigte STA-ET-2.1 mit 10 μM . Ab einer 4-OOH-Cyclophosphamid-Konzentration von 40 μM verliefen die Wachstumskurven aller vier Zelllinien nahezu parallel mit einem Restwachstum im Bereich von 0-15 %.

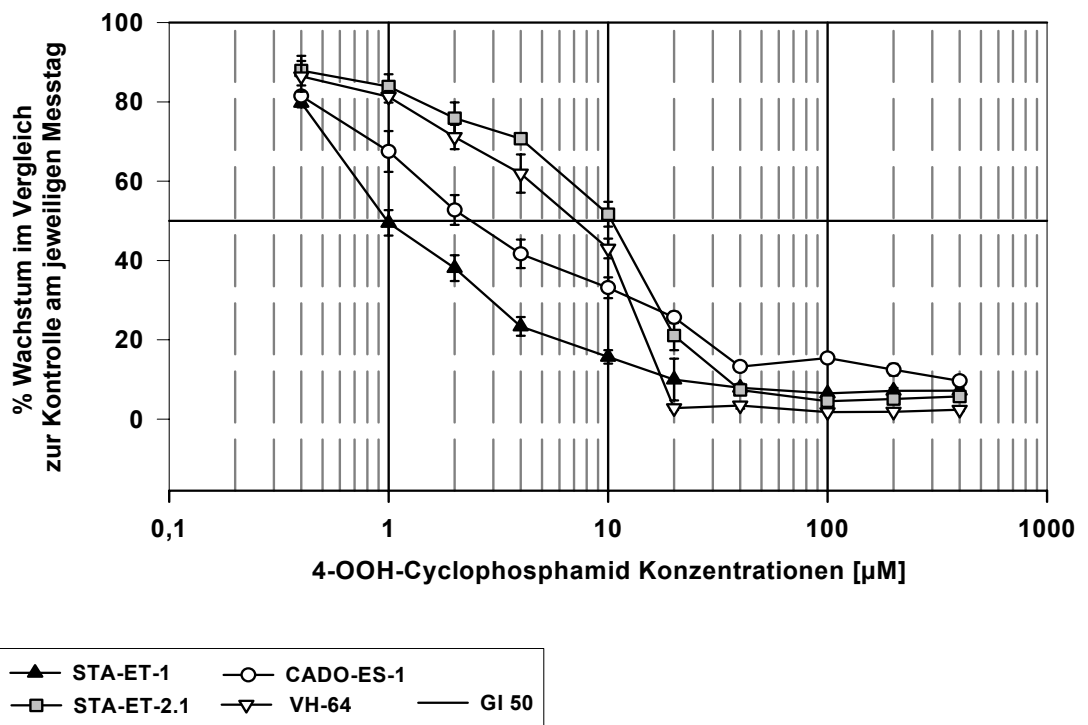


Abb. 11: Wachstumshemmung nach 72 h Inkubation mit 4-OOH-Cyclophosphamid.

3.3.1.2 ThioTEPA

Die Abbildung 12 zeigt die Dosiswirkungskurven der vier Zelllinien nach einer Inkubation mit ThioTEPA über 72 Stunden. Die GI50-Werte befanden sich in einem Konzentrationsbereich von 4-90 μM . Der GI50-Wert für die Zelllinien STA-ET-1 und CADO-ES-1 lag mit 4 μM in einem sehr großen Abstand zu VH-64 mit 70 μM und STA-ET-2.1 mit 90 μM . Während bei STA-ET-1 und CADO-ES-1 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht war, lag das Wachstum der beiden anderen Zelllinien noch in einem Bereich von 85-95 %. Analog zum 4-OOH-Cyclophosphamid nahm die

Wachstumshemmung bei STA-ET-2.1 und VH-64 unter höheren ThioTEPA-Konzentrationen zu. Erst ab einer Konzentration von 15 μM fielen die Kurven dieser beiden Zelllinien ab. Bei 500 μM , der höchsten getesteten ThioTEPA-Konzentration, lag das Restwachstum für alle Zelllinien bei 0-10 %.

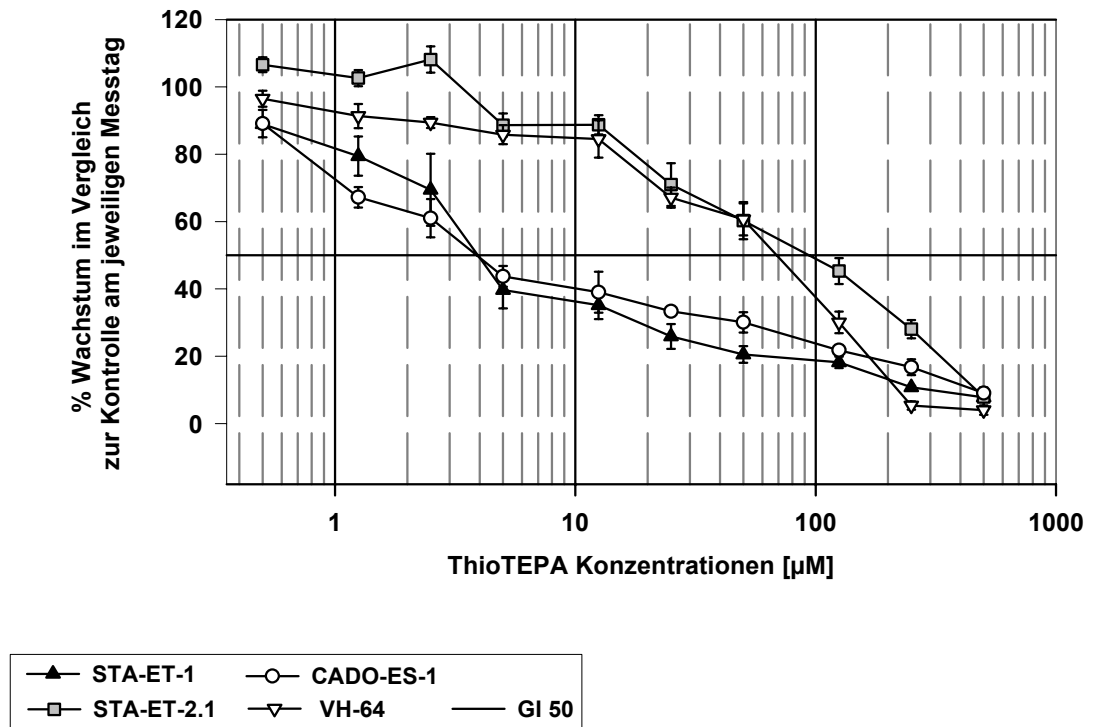


Abb. 12: Wachstumshemmung nach 72 h Inkubation mit ThioTEPA.

3.3.1.3 Etoposid

Die Abbildung 13 zeigt die Dosiswirkungskurven der vier Zelllinien nach einer Inkubation mit Etoposid über 72 Stunden. Die GI50-Werte befanden sich in einem Konzentrationsbereich von 0,5-20 μM , mit einer mittleren GI50 von 9,4 μM Etoposid. Den mit Abstand niedrigsten Wert zeigte STA-ET-1 mit 0,5 μM . Die Werte der übrigen Zelllinien lagen in einem Bereich von 8-20 μM dichter beisammen. Bei 100 μM Etoposid zeigten STA-ET-1 und VH-64 ein Restwachstum von ca. 10 %. Bei STA-ET-2.1 und CADO-ES-1 wuchsen noch 45 % bzw. 35 %.

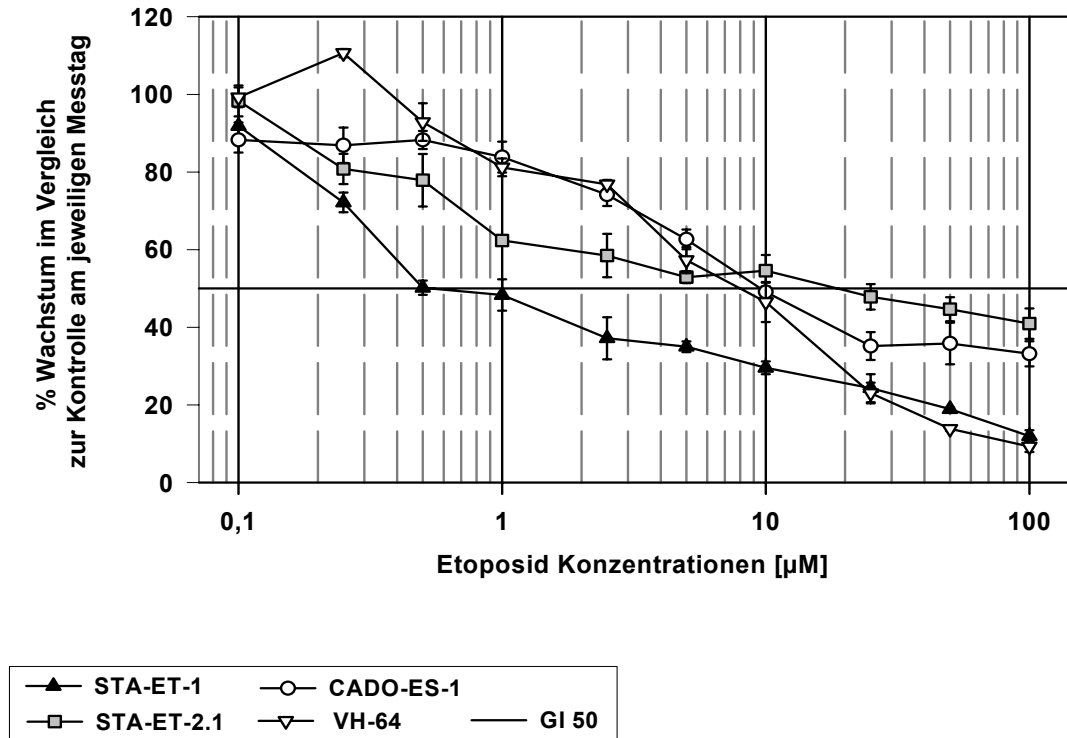


Abb. 13: Wachstumshemmung nach 72 h Inkubation mit Etoposid.

3.3.1.4 Topotecan

Die Abbildung 14 zeigt die Dosiswirkungskurven der vier Zelllinien nach einer Inkubation mit Topotecan über 72 Stunden. Zunächst wurde die Substanz nur in den Konzentrationen von 0,1 bis 100 µM getestet. Bei einer Konzentration von 0,1 µM Topotecan lag im Vergleich zur Kontrolle nach 72 h bereits bei allen Zelllinien nur noch ein Anteil vitaler Zellen von 30-35 % vor. Die Zelllinie STA-ET-2.1 zeigte zwar im Bereich von 0,1 bis 2,5 µM ein Zellwachstum, welches aber nicht über 48 % im Vergleich zur Kontrolle hinausging. Bei der höchsten Konzentration von 100 µM Topotecan lag das Restwachstum für VH-64, STA-ET-1 und STA-ET-2.1 bei ca. 3-8 % und für CADO-ES-1 bei 20 %. Um die GI50-Werte der einzelnen Zelllinien unter Topotecan ermitteln zu können, wurden weitere Versuche mit einem niedrigeren Konzentrationsbereich von 0,005-0,1 µM unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Wachstumshemmung über den gesamten Konzentrationsbereich von 0,005-100 µM ist in der Abbildung 14 dargestellt. Die Konzentrationen, bei denen eine 50 %-ige Wachstumshemmung auftrat, lagen im Bereich von 0,008-0,028 µM, mit einem Mittelwert von 0,016 µM.

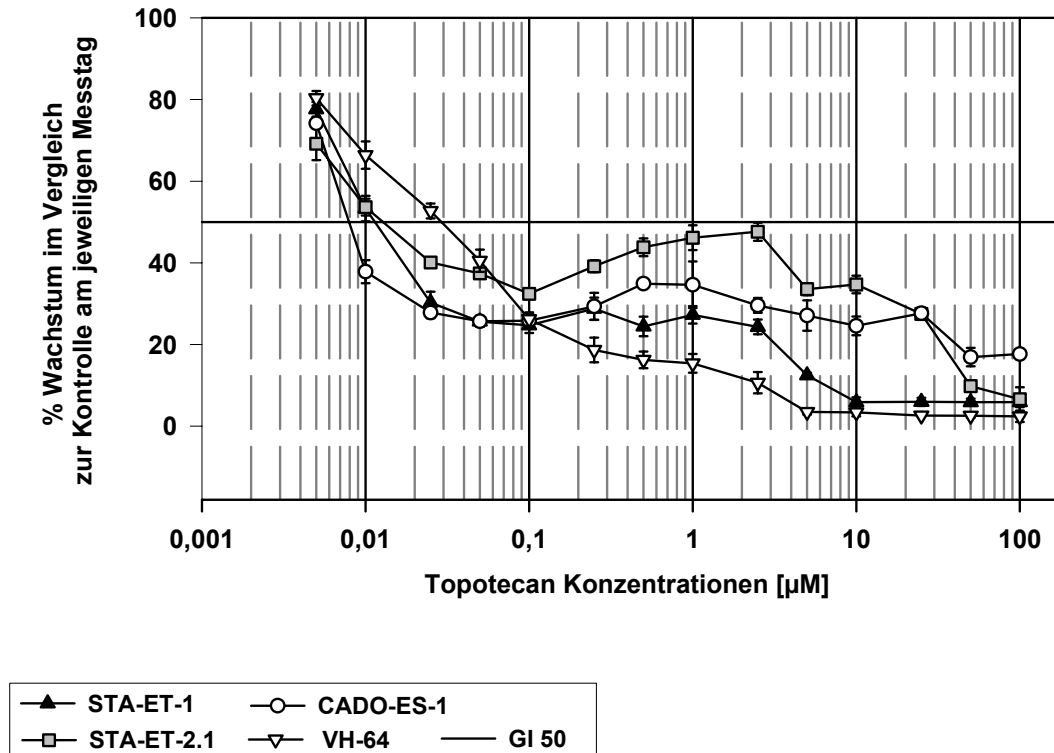


Abb. 14: Wachstumshemmung nach 72 h Inkubation mit Topotecan.

3.3.1.5 Ukrain

Die Abbildung 15 zeigt die Dosiswirkungskurven der vier Zelllinien nach einer Inkubation mit Ukrain über 72 Stunden. Im Konzentrationsbereich von 0,05 bis 0,5 µM Ukrain zeigte sich bei keiner der Zelllinien eine Wachstumshemmung, bei CADO-ES-1 und VH-64 war sogar eine Zunahme der Zellzahl bis auf 130 % bzw. auf 118 % feststellbar. Eine signifikante Wachstumshemmung trat ab einer Ukrain-Konzentration von 1,25 µM ein. Die Kurve von CADO-ES-1 fiel erst ab 2,5 µM. Der Bereich der GI50-Werte reichte von 7,5 µM für STA-ET-1 und VH-64, über 8,5 µM für STA-ET-2.1, bis 12,5 µM für CADO-ES-1. Da die Abstände zwischen den eingesetzten Ukrain-Konzentrationen im Bereich zwischen 5 und 50 µM zunächst sehr groß gewählt waren, wurden in einem zweiten Versuch ergänzend die Konzentrationsabstufungen 5 µM - 7,5 µM - 10 µM - 12,5 µM und 15 µM getestet, um eine genauere Analyse des Konzentrationsbereiches zwischen 5 und 15 µM zu ermöglichen. Die Abbildung 15 stellt die Wachstumshemmung für alle getesteten Konzentrationen dar. CADO-ES-1 und VH-64 zeigten einen steileren Wachstumsabfall als STA-ET-1 und STA-ET-2.1. Das

Restwachstum betrug unter der eingesetzten höchsten Konzentration von 50 μM Ukrain zwischen 2 % für VH-64 und 25 % für CADO-ES-1.

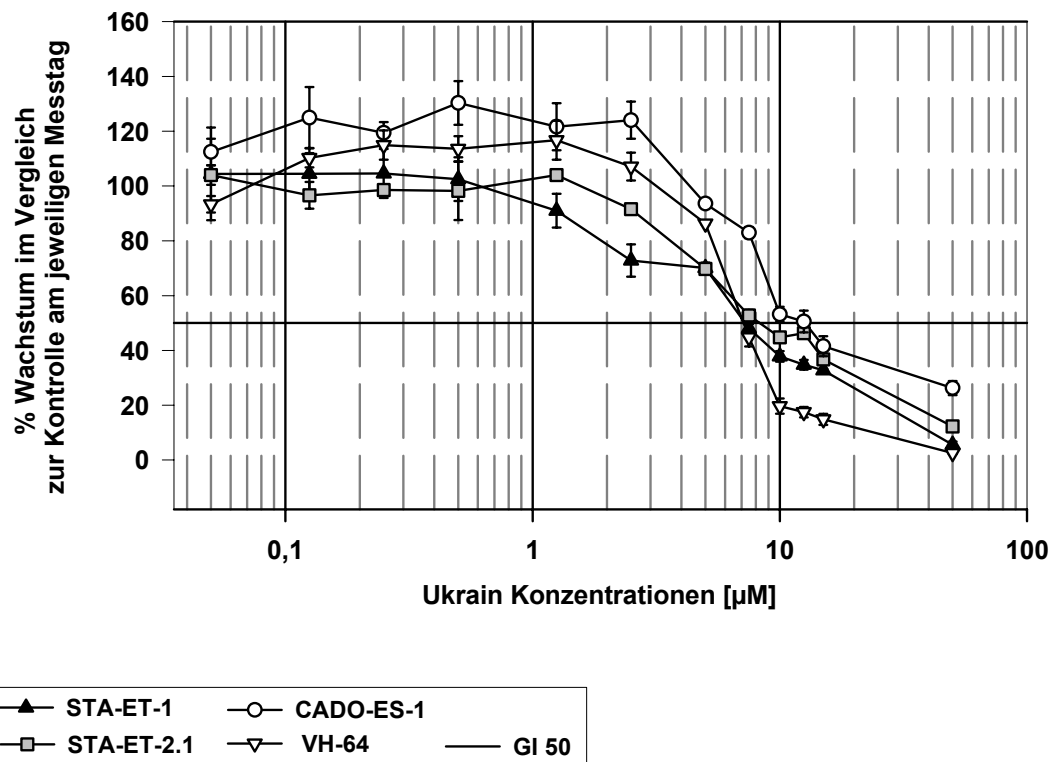


Abb. 15: Wachstumshemmung nach 72 h Inkubation mit Ukrain.

3.3.1.6 *Chelidonium majus* L. (Schöllkraut)

Die Abbildung 16 zeigt die Dosiswirkungskurven der vier Zelllinien nach einer Inkubation mit *Chelidonium-m.*-Extrakt über 72 Stunden. Zunächst wurde an CADO-ES-1 ein Konzentrationsbereich von 0,5-500 μM getestet. Da schon bei 18 μM eine 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht war, wurden für die Testung der übrigen Zelllinien niedrigere Konzentrationen von 0,05-50 μM gewählt. Am empfindlichsten stellte sich STA-ET-1 mit einem Abfall der Wachstumskurve ab 0,25 μM und einem GI50-Wert von 2 μM dar. Die Zelllinie VH-64 zeigte im Konzentrationsbereich von 0,05-0,25 μM ein deutliches Zellwachstum um 40 % im Vergleich zur Kontrolle. Ab 1,25 μM fiel das Wachstum steiler ab, mit einer GI50 bei 5 μM . Die Linien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 zeigten erst ab 2,5 bzw. 5 μM Wachstumshemmung. Ihre GI50-Werte lagen bei 18 bzw. 25 μM . Die getestete Höchst-Konzentration an *Chelidonium-m.*-Extrakt von 50 μM bewirkte bei STA-ET-2.1 ein Restwachstum von ca. 20 %; bei den übrigen Zelllinien lag es bei 5 %.

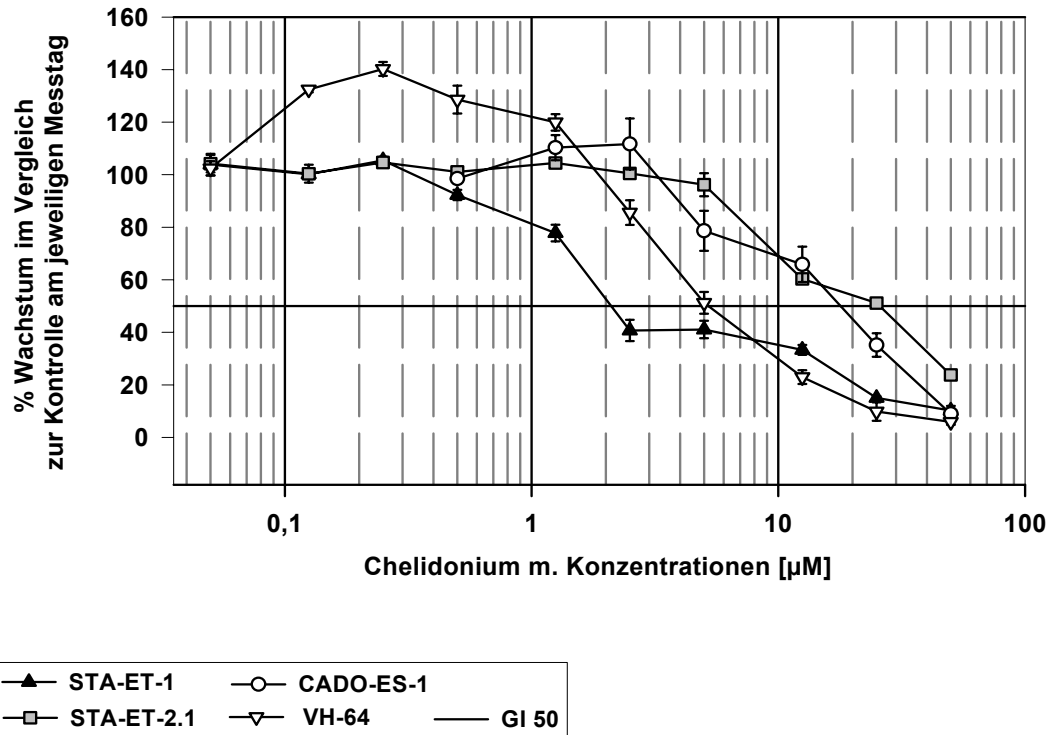


Abb. 16: Wachstumshemmung nach 72 h Inkubation mit *Chelidonium majus* L.

3.3.2 50 %-ige Wachstumshemmung (GI50)

3.3.2.1 Graphisch ermittelte GI50-Werte

Die Tabelle 7 stellt die Zytostatikakonzentrationen (in µM) unter 72stündiger Inkubation dar, die eine 50 %-ige Wachstumshemmung bewirkten und durch Ablesen der entsprechenden Werte aus den Abbildungen 11-16 ermittelt wurden.

Tabelle 7: Graphisch ermittelte GI50-Werte (in µM) der Zelllinien für die Testsubstanzen.

Zytostatikum	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
4-OOH-Cyclophosphamid	2,4	7	1	10
ThioTEPA	4	70	4	90
Etoposid	9	8	0,5	20
Topotecan	0,008	0,028	0,0125	0,015
Ukrain	12,5	7,5	7,5	8,5
Chelidonium majus L.	18	5	2	25

3.3.2.2 Berechnung der GI50/LC50-Werte

Um die graphisch ermittelten GI50-Werte nach 72stündiger Inkubation zu überprüfen, und, um auch die 50 %-ige Wachstumshemmung nach 24 h, 48 h und 96 h darzustellen, wurden die Werte zusätzlich mathematisch berechnet (vergl. hierzu 2.2.3.4, S. 36).

Die folgenden Tabellen 8-11 geben eine Übersicht über die GI50/LC50-Werte für alle Zelllinien unter Einzelinkubation mit den verschiedenen Testsubstanzen.

Die Werte der ersten Tabellenhälfte (GI50-Werte) beziehen sich auf das Zellwachstum der Kontrolle (K_0) zum jeweiligen Messzeitpunkt, welches 100 % entsprach. Die Werte der zweiten Tabellenhälfte (LC50-Werte) beziehen sich alle auf die Kontrolle, die an Tag 0, d.h. vor der eigentlichen Inkubation gemessen wurde. Auch hier wurde das Wachstum der Kontrolle an Tag 0 gleich 100 % gesetzt.

Tabelle 8: Berechnung der GI50/LC50-Werte (in μM) für CADO-ES-1.

Zytostatikum	GI50				LC50			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
4-OOH-Cyclo.	45,7	15,3	2,49	0,99	319	161	26,1	2,59
ThioTEPA	x	141	4,09	2,49	x	412	205	22,7
Etoposid	>	22,4	9,66	5,76	>	>	>	69,6
Topotecan	>	0,03	0,01	0,01	>	>	43,2	<
Ukrain	x	29,8	12,7	9,26	x	>	>	35,2
Chelidonium m.	40,2	24,6	18,9	12,1	63,6	42,9	37,2	25,9

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

- > alle Werte lagen oberhalb der GI50/LC50
- < alle Werte lagen unterhalb der GI50/LC50
- x fehlender Messwert nach 24 h

Tabelle 9: Berechnung der GI50/LC50-Werte (in μM) für VH-64.

Zytostatikum	GI50				LC50			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
4-OOH-Cyclo.	23,1	15,5	7,79	2,56	52,9	19,3	15,4	16,5
ThioTEPA	>	235	76,1	15,5	>	>	231	111
Etoposid	>	36,4	8,37	0,46	>	>	53,1	20,9
Topotecan	>	0,09	0,03	0,02	>	47,6	2,62	0,16
Ukrain	48,1	7,57	7,19	6,97	>	44,8	40,7	17,8
Chelidonium m.	18,6	10,7	5,33	2,24	>	29,9	21,6	11,4

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

> alle Werte lagen oberhalb der GI50/LC50

Tabelle 10: Berechnung der GI50/LC50-Werte (in μM) für STA-ET-1.

Zytostatikum	GI50				LC50			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
4-OOH-Cyclo.	34,7	2,67	0,99	0,69	66,4	23,2	7,09	9,43
ThioTEPA	>	19,7	4,27	1,65	>	186	154	66,4
Etoposid	>	1,44	0,55	0,25	>	86,3	72,5	61,6
Topotecan	>	0,07	0,01	0,01	>	4,51	4,37	4,05
Ukrain	30,8	8,69	7,28	6,19	42,8	33,9	33,7	24,1
Chelidonium m.	18,2	8,02	2,19	1,88	37,9	23,6	24,7	30,7

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

> alle Werte lagen oberhalb der GI50/LC50

Tabelle 11: Berechnung der GI50/LC50-Werte (in μM) für STA-ET-2.1.

Zytostatikum	GI50				LC50			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
4-OOH-Cyclo.	19,5	15,1	10,6	3,65	23,9	22,8	19,9	14,9
ThioTEPA	>	448	101	21,9	>	>	327	147
Etoposid	>	71,9	20,2	1,52	>	>	>	>
Topotecan	>	47,7	0,01	0,01	>	>	37,5	8,35
Ukrain	35,3	31,3	8,38	7,21	41,6	42,9	44,6	38,7
Chelidonium m.	27,9	24,4	26,1	11,4	42,1	>	>	38,1

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

> alle Werte lagen oberhalb der GI50/LC50

Die Tabelle 12 zeigt eine Gegenüberstellung der graphisch ermittelten (x) und der errechneten (y) GI50-Werte nach einer Inkubationszeit von 72 h.

Tabelle 12: Vergleich der graphisch ermittelten (x) mit den berechneten (y) GI50-Werten.

Zytostatikum	CADO-ES-1		VH-64		STA-ET-1		STA-ET-2.1	
	x	y	x	y	x	y	x	y
4-OOH-Cyclo.	2,5	2,49	7	7,79	1	0,99	10	10,6
ThioTEPA	4	4,09	70	76,1	4	4,27	90	101
Etoposid	9	9,66	8	8,37	0,5	0,55	20	20,2
Topotecan	0,01	0,01	0,03	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
Ukrain	12,5	12,7	7,5	7,19	7,5	7,28	8,5	8,38
Chelidonium m.	18	18,9	5	5,33	2	2,19	25	26,1

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

3.3.3 Zusammenfassung und Vergleich der antiproliferativen Wirkung der Einzelsubstanzen

3.3.3.1 Alkylanzien

Nach einer Inkubationszeit von 48 h mit 4-OOH-Cyclophosphamid lag die Konzentration, bei der 50 % des Zellwachstums gehemmt wurden für CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 bei ca. 15 μM (siehe Tab. 8, 9, 11; Kapitel 3.3.2.2). Das Wachstum der STA-ET-1-Zellen wurden dagegen schon bei 2,7 μM 4-OOH-Cyclophosphamid um 50 % reduziert. Auch gegenüber ThioTEPA zeigte sich STA-ET-1 mit einer GI50 von 19,7 μM nach 48 h Inkubation deutlich sensitiver als die übrigen Zelllinien mit GI50-Werten von 140-450 μM . Nach 96 h Inkubation zeichnete sich bezüglich der Sensitivität gegenüber 4-OOH-Cyclophosphamid eine Aufspaltung der Zelllinien in zwei Gruppen ab: CADO-ES-1 und STA-ET-1 zeigten sich mit GI50-Werten von 0,69 und 0,99 μM empfindlicher als VH-64 und STA-ET-2.1 mit 2,56 bzw. 3,65 μM . Auch bei ThioTEPA war nach 96 h Inkubation diese Spaltung zu beobachten: CADO-ES-1 mit einer GI50 von 2,49 μM und STA-ET-1 mit 1,65 μM waren zu diesem Messpunkt deutlich sensibler als VH-64 mit 15,5 μM und STA-ET-2.1 mit 21,9 μM . Das beschriebene Phänomen zeigt sich auch in der graphischen Darstellung der 72stündigen Inkubation mit ThioTEPA (in 3.3.1.2, Abb. 12, S. 49). Somit zeigten die Zelllinien unter Inkubation mit den untersuchten Alkylanzien ein vergleichbares Sensitivitätsprofil.

4-OOH-Cyclophosphamid war insgesamt schneller und in geringeren Konzentrationen wirksam als ThioTEPA. So wurde nach 96 h Inkubation bei CADO-ES-1 und STA-ET-1 die ca. 2,5fache 4-OOH-Cyclophosphamid-Menge an ThioTEPA benötigt, um die selbe Wirkung zu erzielen. Bei VH-64 und STA-ET-2.1 war es sogar die 6fache Menge. Außerdem war bei 4-OOH-Cyclophosphamid schon nach 24stündiger Inkubation bei allen Linien eine deutliche Inhibition festzustellen. Alle zeigten bereits 50 %-ige Wachstumshemmung, während bei ThioTEPA nach 24 h bei keiner der Zelllinien die GI50 erreicht wurde (vergl. Tab. 8-11; 3.3.2.2).

3.3.3.2 Topoisomerasehemmer

Topotecan zeigte sich schon in sehr geringen Konzentrationen wirksam. So lagen die Topotecan-Konzentrationen, die für eine 50 %-ige Wachstumshemmung benötigt wurden, bei den Linien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-1 bereits nach 48 h weit unter 1 μM . Im gesamten Inkubationszeitraum zeigte sich CADO-ES-1 unter Topotecan am sensibelsten, VH-64 war insgesamt gegenüber Topotecan am resistentesten.

Im Gegensatz dazu zeigte sich CADO-ES-1 unter Etoposid-Inkubation relativ unempfindlich. Nach 72 h war sie die zweitresistenteste Linie nach STA-ET-2.1. Nach

96 h Inkubation war sie die resistanteste Zelllinie bezüglich der ermittelten GI50-Werte. Die Topoisomerasehemmer Topotecan und Etoposid waren hinsichtlich der benötigten GI50-Konzentrationen in der Regel immer wirksamer als die alkylierenden Substanzen. Einzige Ausnahme bildete die 96stündige Inkubation von CADO-ES-1. Hier war Topotecan am besten wirksam, gefolgt von den Alkylanzien 4-OOH-Cyclophosphamid und ThioTEPA - erst danach folgte Etoposid.

3.3.3.3 Ukrain, Chelidonium majus L. und ThioTEPA

Um zu überprüfen, welchem von seinen beiden Grundbestandteilen Ukrain ähnlicher ist, wurde ein Vergleich der Zelliniensensitivitäten herangezogen. Nach einer Inkubation mit Chelidonium m. zeigte sich nach 72 und 96 h anhand der GI50-Werte eine Aufspaltung in STA-ET-1 und VH-64 als empfindliche, und STA-ET-2.1 und CADO-ES-1 als wesentlich resistere Zelllinien. Unter Ukrain-Inkubation stellte sich ebenfalls dieses Sensitivitätsprofil ein. Im Gegensatz dazu war die Verteilung bei ThioTEPA anders: hier war CADO-ES-1 sensibel und VH-64 sehr resistent (vergl. 3.3.3.1). Bezüglich seines Sensitivitätsprofils entsprach Ukrain also dem des Chelidonium m.

3.3.4 Rangfolge der 6 Testsubstanzen

Die folgenden Zytostatikaränge wurden ermittelt, indem zunächst anhand der GI50-Werte zu den Messzeitpunkten für jede der vier Zelllinien eine Rangfolge der sechs Testsubstanzen (bezüglich ihrer Wirksamkeit) aufgestellt wurde [Rang 1 für das Zytostatikum mit der größten Wirkung, Rang 6 für dasjenige mit der geringsten Wirkung]. Danach wurde für jedes Zytostatikum überprüft, wie oft es welchen Rang eingenommen hatte. Für Topotecan ergab sich z. B. 4mal Rang 1, für 4-OOH-Cyclophosphamid 2mal Rang 2 und 2mal Rang 3 usw. Aus dem Vergleich dieser Auflistungen ergaben sich die endgültigen Ränge der Testsubstanzen nach 48 h, 72 h und 96 h, die in Tabelle 13 aufgezählt sind.

Da nach 24stündiger Inkubation eine GI50 mit den meisten Substanzen (in den eingesetzten Konzentrationen) noch nicht erreicht war, wurde eine Rangfolge für diese Zeit nicht aufgestellt.

Tabelle 13: Rangfolge der 6 Testsubstanzen nach 48 h, 72 h und 96 h Inkubation.

	<u>Zytostatikaränge:</u>		
	<u>48 h</u>	<u>72 h</u>	<u>96 h</u>
1.	Topotecan	Topotecan	Topotecan
2.	4-OOH-Cyclophosphamid	4-OOH-Cyclo.	Etoposid
3.	Chelidonium m.	Etoposid	4-OOH-Cyclo.
4.	Etoposid	Ukrain	Chelidonium m.
5.	Ukrain	Chelidonium m.	ThioTEPA
6.	ThioTEPA	ThioTEPA	Ukrain

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

3.3.5 Chemosensitivität der Zelllinien

Eventuell bestehende Unterschiede bezüglich der Chemosensitivität der einzelnen Zelllinien wurden mittels eines Punktesystems überprüft: Für jedes Zytostatikum wurden den ermittelten GI50-Werten Ränge von 1 bis 4 zugeordnet, wobei der niedrigste Wert den Rang 1 und der höchste Rang 4 erhielt. Für gleiche GI50-Werte unter den Zelllinien wurden Mittelwerte aus beiden Rängen vergeben. Tabelle 14 zeigt beispielhaft die Ränge der GI50-Werte und die daraus ermittelten Rangsummen der einzelnen Zelllinien, die sich nach einer Inkubationszeit von 72 h ergaben.

Tabelle 14: Ränge und Rangsummen der GI50-Werte nach 72 h Inkubation.

<u>Zytostatikum</u>	<u>CADO-ES-1</u>	<u>VH-64</u>	<u>STA-ET-1</u>	<u>STA-ET-2.1</u>
4-OOH-Cyclo.	2	3	1	4
ThioTEPA	1,5	3	1,5	4
Etoposid	3	2	1	4
Topotecan	1	4	2	3
Ukrain	4	1,5	1,5	3
Chelidonium m.	3	2	1	4
Rangsumme:	14,5	15,5	8	22

4-OOH-Cyclo. = 4-OOH-Cyclophosphamid

Nach dem gleichen Schema wurden auch die Rangsummen der errechneten GI50-Werte nach 48 h und 96 h Inkubation gebildet. Insgesamt ergibt sich daraus die in Tabelle 15 aufgeführte Rangfolge der vier untersuchten Zelllinien bezüglich ihrer Chemosensitivität.

Tabelle 15: Rangfolge der Zelllinien nach 48 h, 72 h und 96 h Inkubation.

	<u>Inkubation</u>		
	<u>48 h</u>	<u>72 h</u>	<u>96 h</u>
1.	STA-ET-1	STA-ET-1	STA-ET-1
2.	CADO-ES-1/ VH-64	CADO-ES-1	VH- 64
3.		VH-64	CADO-ES-1
4.	STA-ET-2.1	STA-ET-2.1	STA-ET-2.1

Eine Bestimmung der GI50-Werte nach 24 h war nur bei Inkubation mit 4-OOH-Cyclophosphamid, Ukrain und Chelidonium m. möglich. Bei den übrigen Testsubstanzen wurde nach 24 h mit den eingesetzten Konzentrationen noch keine 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht.

Die Zelllinie STA-ET-1 reagierte im gesamten Inkubationszeitraum mit Abstand am sensibelsten auf die Testsubstanzen. Schon bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen kam es zur 50 %-igen Wachstumshemmung. Nur unter Inkubation mit Topotecan war CADO-ES-1 noch empfindlicher als STA-ET-1. Die Zelllinie VH-64 war insgesamt relativ sensibel, zeigte sich aber gegenüber den alkylierenden Substanzen und gegen Topotecan weniger empfindlich. Im Vergleich der Zelllinien reagierte CADO-ES-1 auf Topotecan über den gesamten Zeitraum mit der stärksten Wachstumshemmung. Dagegen zeigte sich diese Linie gegenüber Ukrain und Chelidonium m. am resistentesten. Auch gegen 4-OOH-Cyclophosphamid war CADO-ES-1 nach 24- und 48stündiger Inkubation relativ unempfindlich, zeigte sich aber nach längerer Inkubation hier zunehmend sensibel. Die vergleichsweise höchsten Zytostatikakonzentrationen wurden im Inkubationszeitraum von 48-96 h bei STA-ET-2.1 benötigt, um ihr Wachstum auf 50 % zu hemmen. Diese Zelllinie zeigte insgesamt die geringste Sensitivität.

3.3.6 Graphische Darstellung der Kombinationsversuche

Um die zytotoxische Wirkung der eingesetzten Zytostatikakombinationen (siehe 2.2.2.6, S. 33) auf die vier Zelllinien miteinander und mit den Einzelinkubationen vergleichen zu können, musste die **Auswertung mit Hilfe der LC50** (diejenige Konzentration, die eine 50 %-ige Letalität der Zellen bewirkte) erfolgen:

Die für die **LC50** relevante Wachstums-Kontrolle wurde sowohl bei den Einzelinkubationen, als auch bei den Kombinationen an Tag 0, d.h. vor der eigentlichen Zytostatikainkubation, bestimmt. Ein Vergleich der Ergebnisse der Einzelversuche mit denen der Kombinationsversuche war unter Beachtung annähernd gleicher Ausgangszellzahlen somit möglich. (Zur Überprüfung, ob annähernd gleiche

Ausgangszellzahlen vorlagen, wurden die Extinktionen der Einzelversuche an Tag 0 mit denen der Kombinationsversuche verglichen: z. B. bei STA-ET-2.1: Einzelversuch-Extinktion: 0,262 / Kombiversuch-Extinktion: 0,290)

Eine Gegenüberstellung der Einzelversuche und Kombinationen anhand der **GI50-Werte** war dagegen nicht möglich, weil die Kontroll-Wells (K) der Kombinationen zu den Messzeitpunkten (24 h, 48 h, 72 h, 96 h) schon mit dem jeweiligen „Basiszytostatikum“ behandelt waren (vergl. 2.2.2.6, S.33). Die Kontrollen der Einzelversuche hingegen waren unbehandelt.

Für jede Zelllinie wurde die Zytotoxizität nach 72stündiger, simultaner Inkubation graphisch dargestellt. Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils drei Graphen, von denen zwei die Dosiswirkungskurven der Koinkubationen darstellen (jede mit einer der zwei Testkonzentrationen des 1. Zytostatikums). Der dritte Graph zeigt zum Vergleich die Dosiswirkungskurve, die sich unter Einzelinkubation mit dem jeweiligen Kombinationspartner (2. Zytostatikum) ergab. Hierzu wurden die entsprechenden Konzentrationen den Daten der Einzelversuche entnommen. Die für die Wachstumskontrolle an Tag 0, d.h. vor der eigentlichen Zytostatikainkubation gemessene Extinktion, entspricht einem 100 %-igen Wachstum. Alle weiteren Extinktionen wurden prozentual auf diesen Wert berechnet und als Wachstum auf die Ordinate aufgetragen. Auf der Abszisse sind die Zytostatikakonzentrationen in μM aufgetragen, in denen das jeweils 2. Zytostatikum eingesetzt wurde. Die 50 %-ige Letalität (LC50) ist in der Darstellung durch eine Parallele zur Abszisse, welche die Ordinate bei 50 % schneidet, markiert.

3.3.6.1 Koinkubation der Zelllinien mit 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid

Die Abbildungen 17-20 zeigen die Dosiswirkungskurven für die vier Zelllinien nach Inkubation mit zwei 4-OOH-Cyclophosphamid-Konzentrationen (1 μM bzw. 10 μM) kombiniert mit fünf verschiedenen Etoposid-Konzentrationen (0,1-250 μM). Vergleichend dazu wurde für jede Zelllinie die Dosiswirkungskurve unter alleiniger Etoposid-Inkubation (0,1-100 μM) hinzugefügt. Die Tabelle 16 gibt einen Überblick über die aus den Graphen abgelesenen LC50-Konzentrationen für die einzelnen Zelllinien.

Tabelle 16: Aus den Graphen ermittelte LC50-Werte (in μM) der einzelnen Zelllinien.

	<u>CADO-ES-1</u>	<u>VH-64</u>	<u>STA-ET-1</u>	<u>STA-ET-2.1</u>
Etoposid einzeln:	> 100	80	65	> 100
Cyclo 1 μM + Eto:	150	75	70	25
Cyclo 10 μM + Eto:	< 0,1	30	60	10

Cyclo = 4-OOH-Cyclophosphamid, Eto = Etoposid

Die Dosiswirkungskurven zeigen, dass die beiden eingesetzten Kombinationen bei den Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 eine deutlich bessere Inhibition bewirkten, als die Einzelinkubation mit Etoposid. Lediglich bei STA-ET-1 verlief die Kurve der Etoposid-Einzelinkubation ab 10 μM nahezu kongruent mit denen der beiden Kombinationen. So ergaben sich bei dieser Zelllinie im höheren Konzentrationsbereich (10-250 μM) fast identische Hemmwirkungen für die Einzelinkubation und beide Koinkubationen mit LC50-Werten zwischen 60 und 70 μM .

Die Koinkubation von 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit Etoposid zeigte im gesamten Konzentrationsbereich bei allen Zelllinien die beste Wachstumshemmung. So verlief die entsprechende Dosiswirkungskurve bei CADO-ES-1 im gesamten Bereich unterhalb der LC50. Die schlechteste Wachstumshemmung bewirkte die Einzelinkubation mit Etoposid. Im getesteten Konzentrationsbereich konnte bei CADO-ES-1 und bei STA-ET-2.1 kein 50 %-iges Absterben der Zellen erreicht werden.

Der Unterschied der zytotoxischen Wirkung der beiden Kombinationen war bei allen vier Zelllinien im niedrigen Konzentrationsbereich von 0,1-10 μM Etoposid am deutlichsten ausgeprägt. So bewirkte bei der Linie CADO-ES-1 die Kombination von 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit 0,1 Etoposid bereits ein Restwachstum von weniger als 50 %, welches auch unter Kombination von 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit höheren Etoposid-Konzentrationen nicht mehr gesteigert wurde. Im Vergleich dazu lag unter 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid kombiniert mit 0,1 μM Etoposid noch ein Wachstum von 150 % vor, welches dann unter 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit 10 μM Etoposid auf 70 % abfiel. Im niedrigen Konzentrationsbereich bestand also ein deutlicher Unterschied in der Wirksamkeit der beiden Kombinationen (bei CADO-ES-1 z.B. um den Faktor 3), welcher sich aber im höheren Konzentrationsbereich (10-250 μM) stark reduzierte (die Kurven näherten sich einander an, da die Kombination mit 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit steigenden Konzentrationen einen größeren Wirkungszuwachs zeigt als die mit 10 μM).

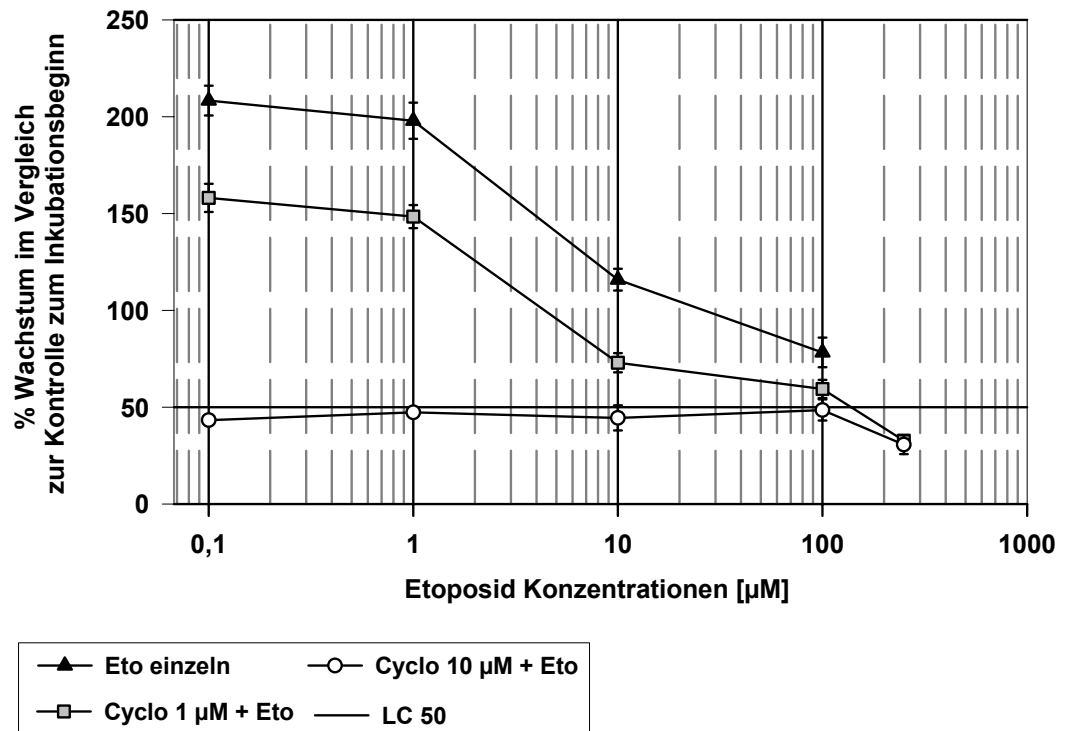


Abb. 17: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

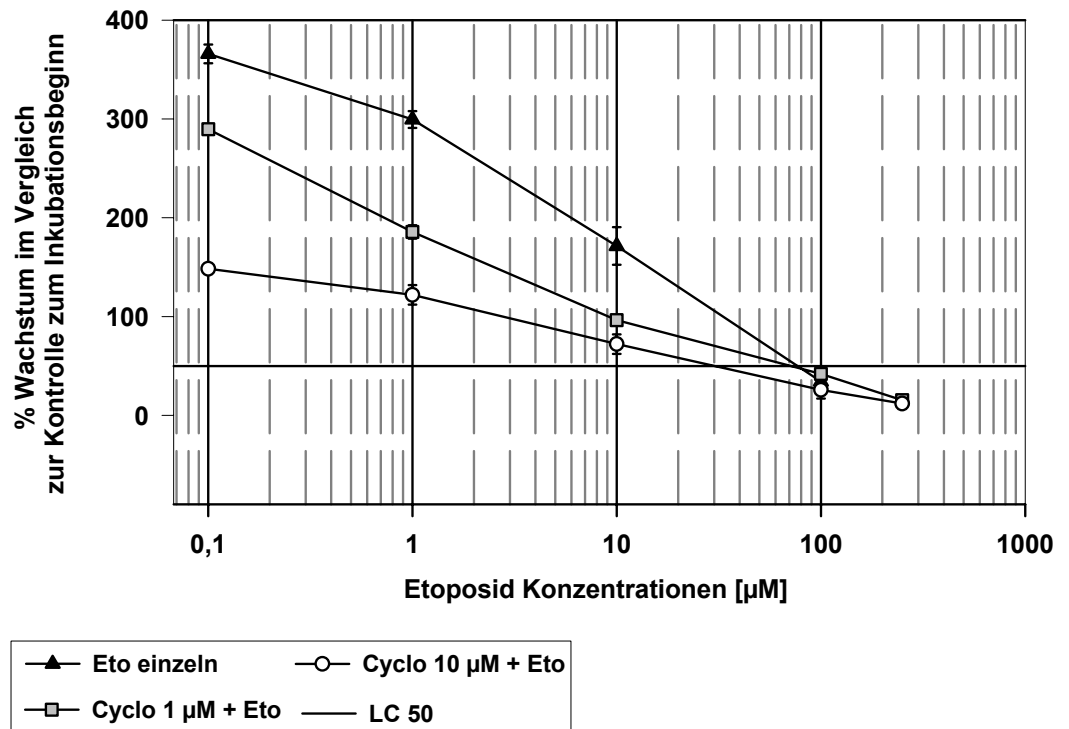


Abb. 18: Zytotoxizität bei VH-64 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

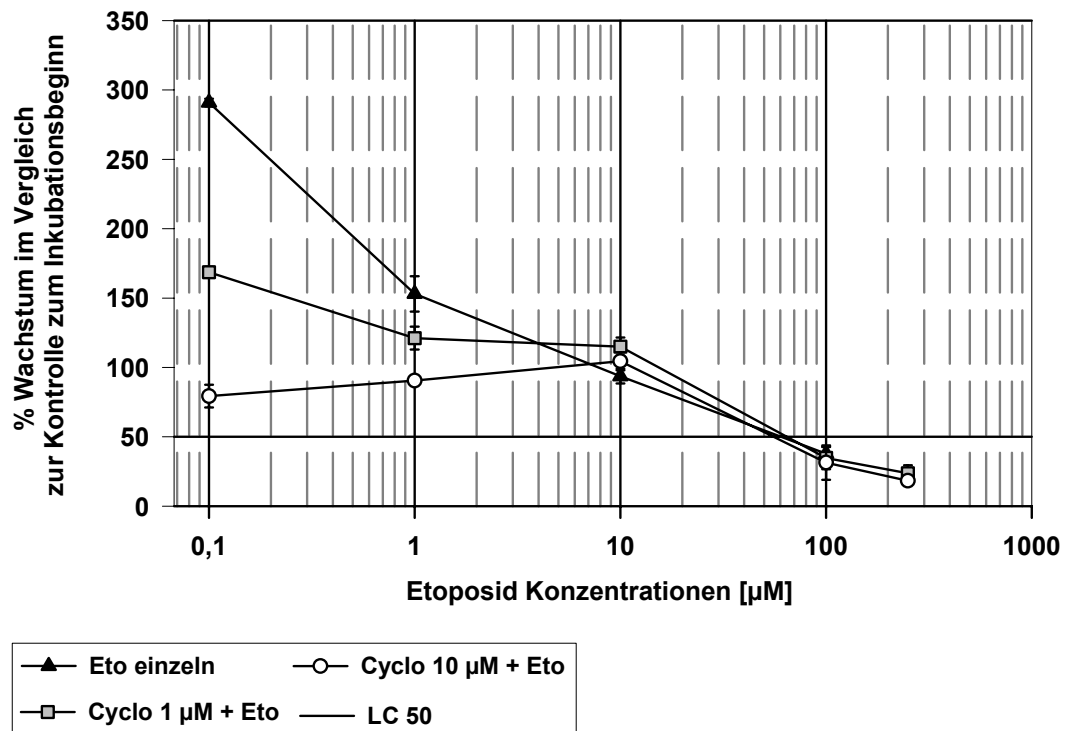


Abb. 19: Zytotoxizität bei STA-ET-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

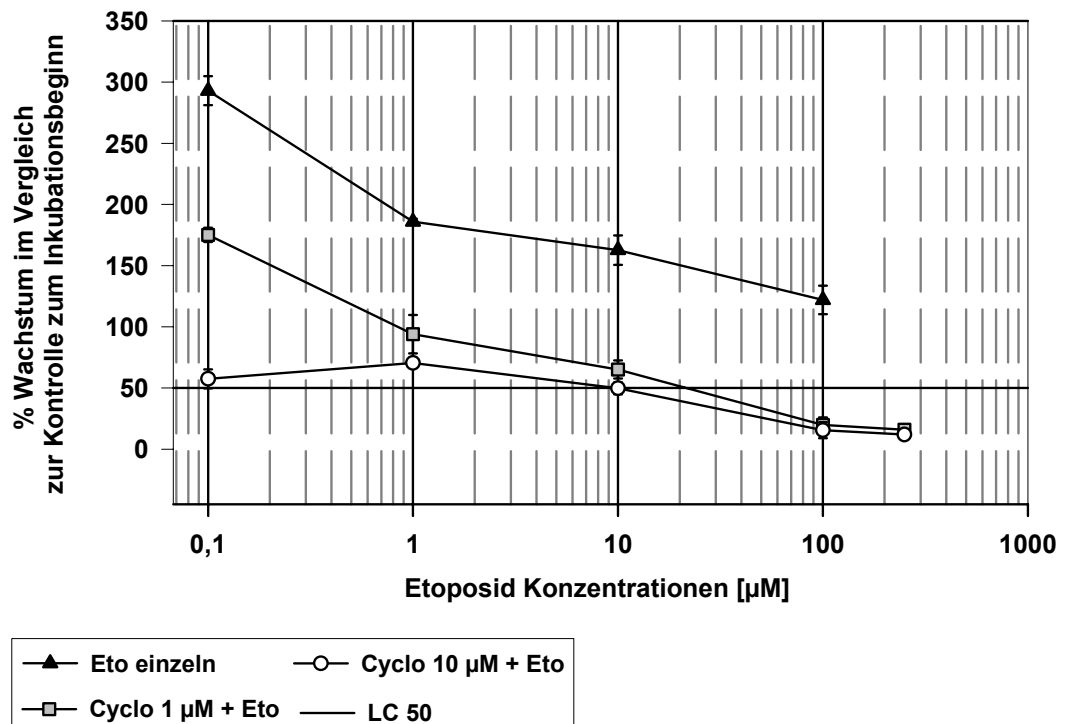


Abb. 20: Zytotoxizität bei STA-ET-2.1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Eto.

3.3.6.2 Koinkubation der Zelllinien mit 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan

Die Abbildungen 21-24 zeigen die Dosiswirkungskurven für die vier Zelllinien nach Inkubation mit zwei 4-OOH-Cyclophosphamid-Konzentrationen (1 μM bzw. 10 μM) kombiniert mit fünf verschiedenen Topotecan-Konzentrationen (0,001-10 μM). Vergleichend dazu wurde für jede Zelllinie die Dosiswirkungskurve unter alleiniger Topotecan-Inkubation (0,01-10 μM) hinzugefügt. Die Tabelle 17 gibt einen Überblick über die aus den Graphen abgelesenen LC50-Konzentrationen für die einzelnen Zelllinien.

Tabelle 17: Aus den Graphen ermittelte LC50-Werte (in μM) der einzelnen Zelllinien.

	<u>CADO-ES-1</u>	<u>VH-64</u>	<u>STA-ET-1</u>	<u>STA-ET-2.1</u>
Topotecan einzeln:	> 10	2,5	3,5	> 10
Cyclo 1 μM + Topo:	0,006	1,5	0,6	0,08
Cyclo 10 μM + Topo:	< 0,001	0,2	0,3	< 0,001

Cyclo = 4-OOH-Cyclophosphamid, Topo = Topotecan

Die Einzelinkubation mit Topotecan zeigte im Vergleich bei allen Zelllinien die schlechteste Wirkung. Bei den Zelllinien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 erreichte sie im eingesetzten Konzentrationsbereich auch in den hohen Konzentrationen (1-10 μM) keine 50 %-ige Letalität der Zellen. Bei den übrigen Zelllinien wurde die LC50 unter Topotecan-Einzelinkubation erst unter einer relativ hohen Konzentration von ca. 3 μM erreicht.

Den größten inhibitorischen Effekt auf alle 4 Zelllinien zeigte bei dieser Testung die Kombination von Topotecan mit 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid. Insgesamt war allerdings bei dieser Kombination der Wirkungszuwachs unter steigenden Topotecan-Konzentrationen bei allen Zelllinien sehr gering ausgeprägt, da schon mit der niedrigsten Topotecan-Konzentration von 0,001 μM zum Teil eine erhebliche Wachstumshemmung bewirkt wurde. So zeigte z. B. die Linie CADO-ES-1 unter Koinkubation mit 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan bereits ab 0,001 μM Topotecan über den gesamten weiteren Konzentrationsbereich ein stagnierendes Restwachstum von 25 %. Im Gegensatz dazu zeigte die Koinkubation von 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan im niedrigen Konzentrationsbereich (0,001-0,01 μM Topotecan) noch einen deutlichen Wirkungszuwachs: So fiel z. B. das Restwachstum bei der Linie STA-ET-2.1 in diesem Konzentrationsbereich von 170 auf 80 %. Ab einer Topotecan-Konzentration von 0,1 μM näherte sich die Dosiswirkungskurve dieser Kombination der Kurve der Koinkubation mit 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid an, so dass im höheren Konzentrationsbereich der Wirkungsunterschied bei den beiden Kombinationen nicht mehr so ausgeprägt war (zwischen 5 % und 30 % bei den einzelnen Zelllinien).

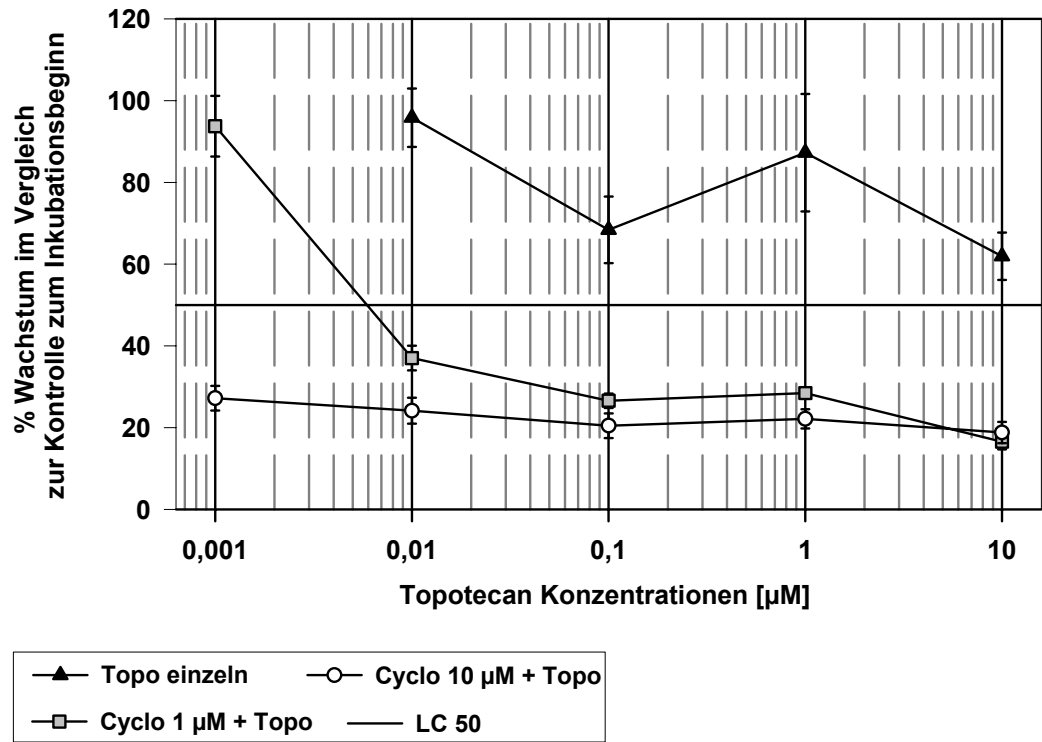


Abb. 21: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

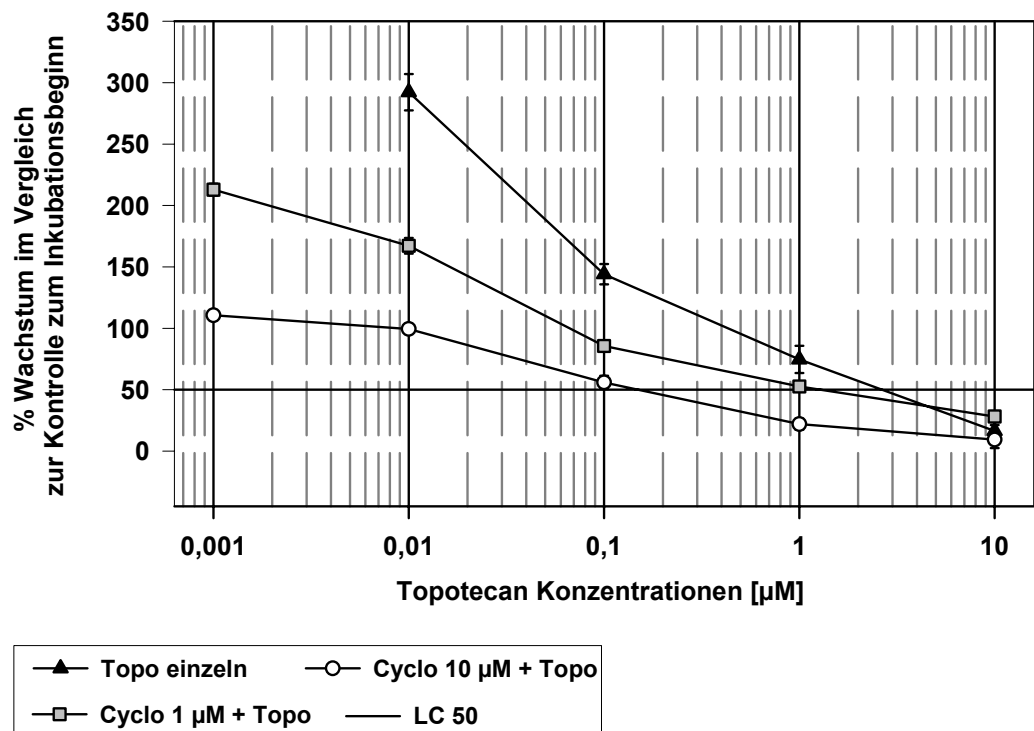


Abb. 22: Zytotoxizität bei VH-64 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

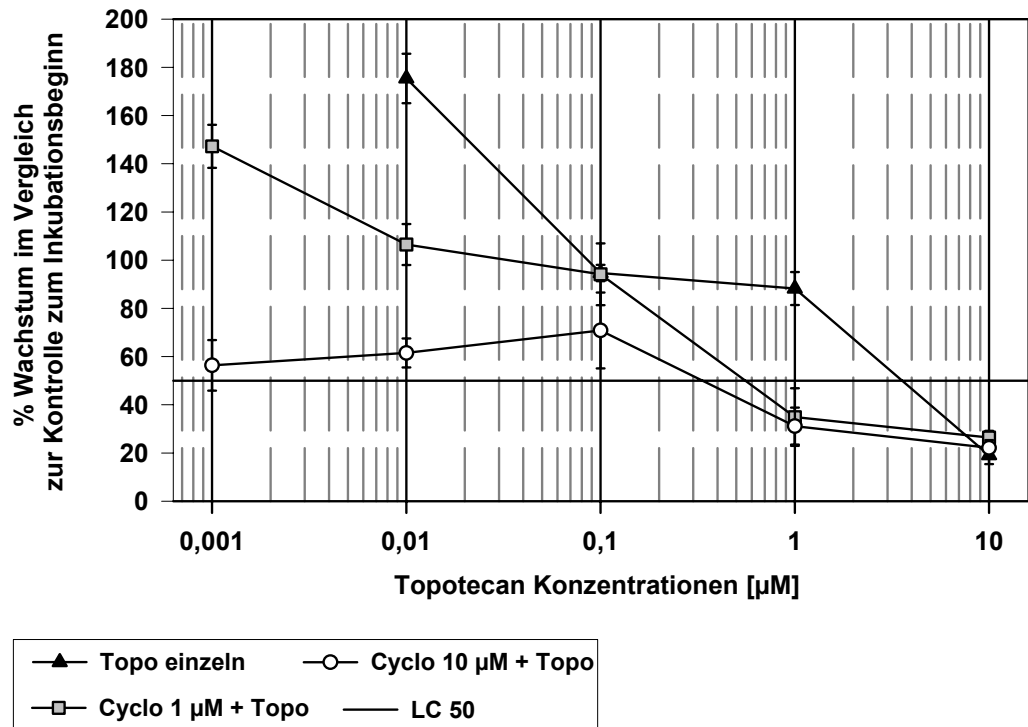


Abb. 23: Zytotoxizität bei STA-ET-1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

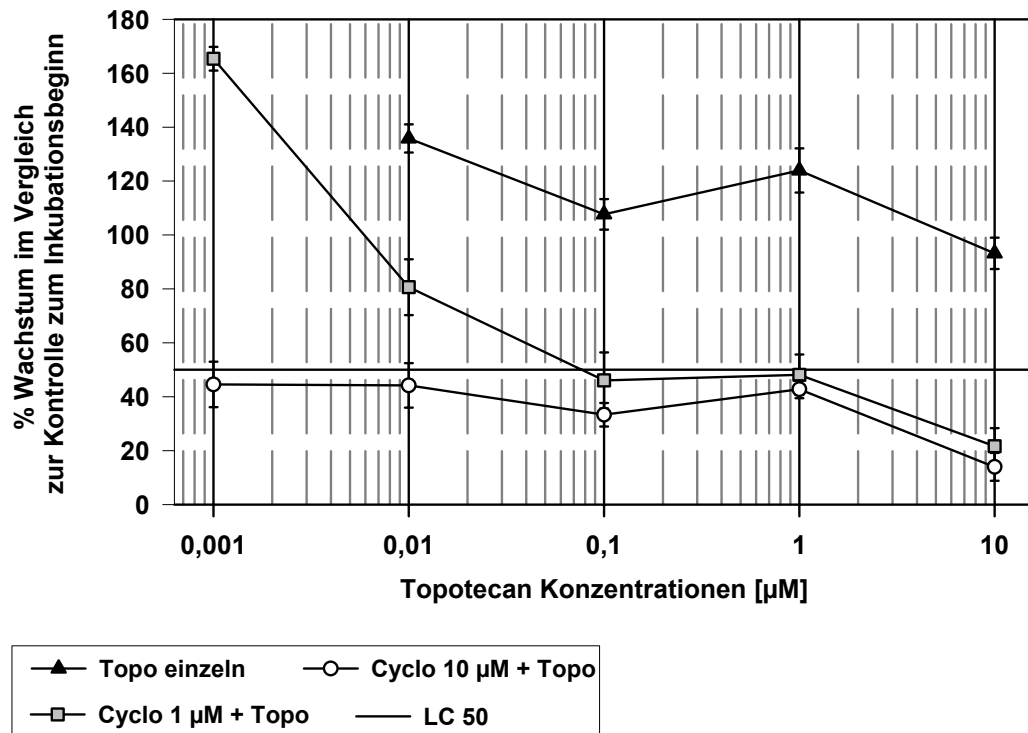


Abb. 24: Zytotoxizität bei STA-ET-2.1 nach 72 h Inkubation mit Cyclo/Topo.

3.3.6.3 Koinkubation der Zelllinien mit Etoposid/Topotecan

Die Abbildungen 25-28 zeigen die Dosiswirkungskurven für die vier Zelllinien nach Inkubation mit zwei Etoposid-Konzentrationen (1 μM bzw. 10 μM) kombiniert mit fünf verschiedenen Topotecan-Konzentrationen (0,001-10 μM). Vergleichend dazu wurde für jede Zelllinie die Dosiswirkungskurve unter alleiniger Topotecan-Inkubation (0,01-10 μM) hinzugefügt. Die Tabelle 18 gibt einen Überblick über die aus den Graphen abgelesenen LC50-Konzentrationen für die einzelnen Zelllinien.

Tabelle 18: Aus den Graphen ermittelte LC50-Werte (in μM) der einzelnen Zelllinien.

	<u>CADO-ES-1</u>	<u>VH-64</u>	<u>STA-ET-1</u>	<u>STA-ET-2.1</u>
Topotecan einzeln:	> 10	2,5	3,5	> 10
Eto 1 μM + Topo:	0,05	0,9	3,5	3
Eto 10 μM + Topo:	0,003	0,3	3,5	1

Eto = Etoposid, Topo = Topotecan

Auch bei dieser Testung zeigte die Einzelinkubation mit Topotecan bei den Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 eine deutlich schlechtere zytotoxische Wirkung als die beiden eingesetzten Kombinationen. Sowohl bei CADO-ES-1, als auch bei STA-ET-2.1 konnte mit den getesteten Topotecan-Konzentrationen kein 50 %-iges Absterben der Zellen bewirkt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei STA-ET-1 unter Topotecan-Einzelinkubation ab einer Konzentration von 0,1 μM ein kongruenter Verlauf aller drei Dosiswirkungskurven. Hier bewirkten also sowohl die Topotecan-Einzelinkubation, als auch die Kombination mit 1 μM Etoposid und die Kombination von 10 μM Etoposid mit Topotecan eine gleichstarke Inhibition der Zellen.

Bei den Zelllinien CADO-ES-1 und VH-64 verliefen die Dosiswirkungskurven der beiden Kombinationen ab einer Topotecan-Konzentration von 0,1 μM kongruent bzw. parallel zueinander. Beide Kombinationen erreichten hier somit eine vergleichbare Wirksamkeit. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Kombination von 10 μM Etoposid mit Topotecan bei der Linie STA-ET-2.1 deutlich effektiver als die Kombination von Topotecan mit 1 μM Etoposid.

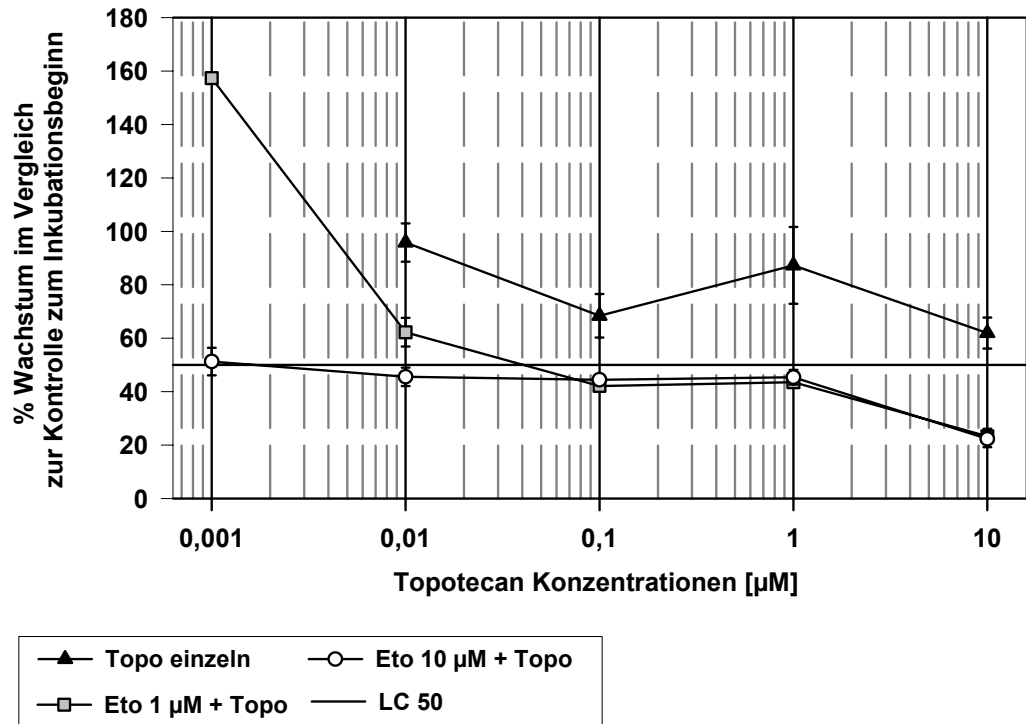


Abb. 25: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation mit Eto/Topo.

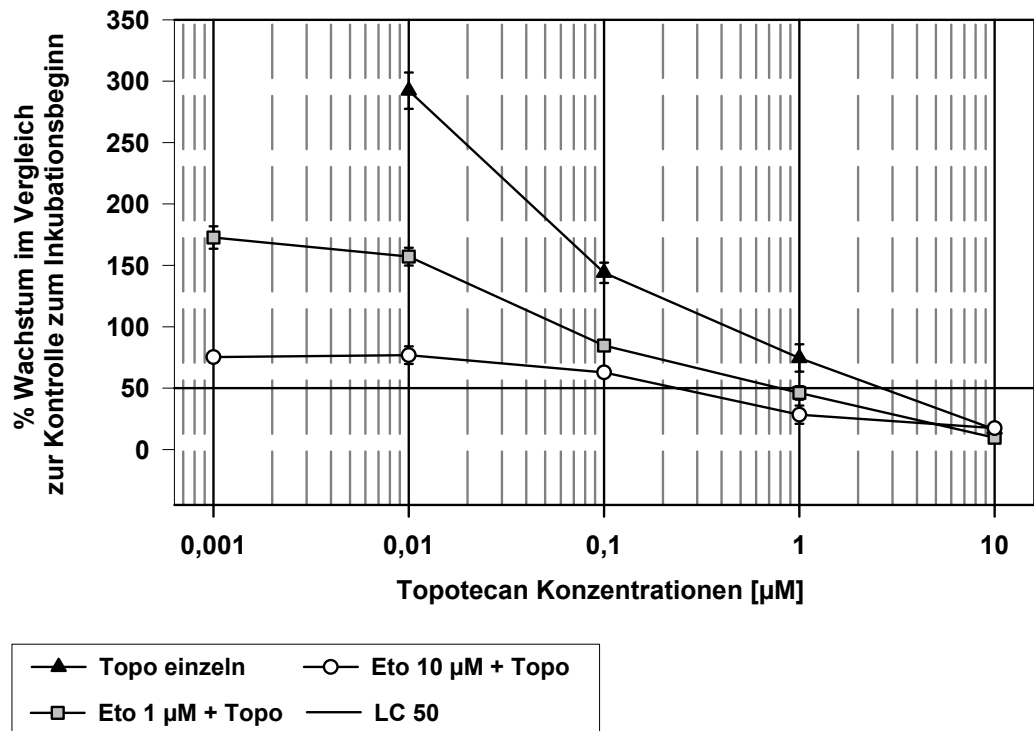


Abb. 26: Zytotoxizität bei VH-64 nach 72 h Inkubation mit Eto/Topo.

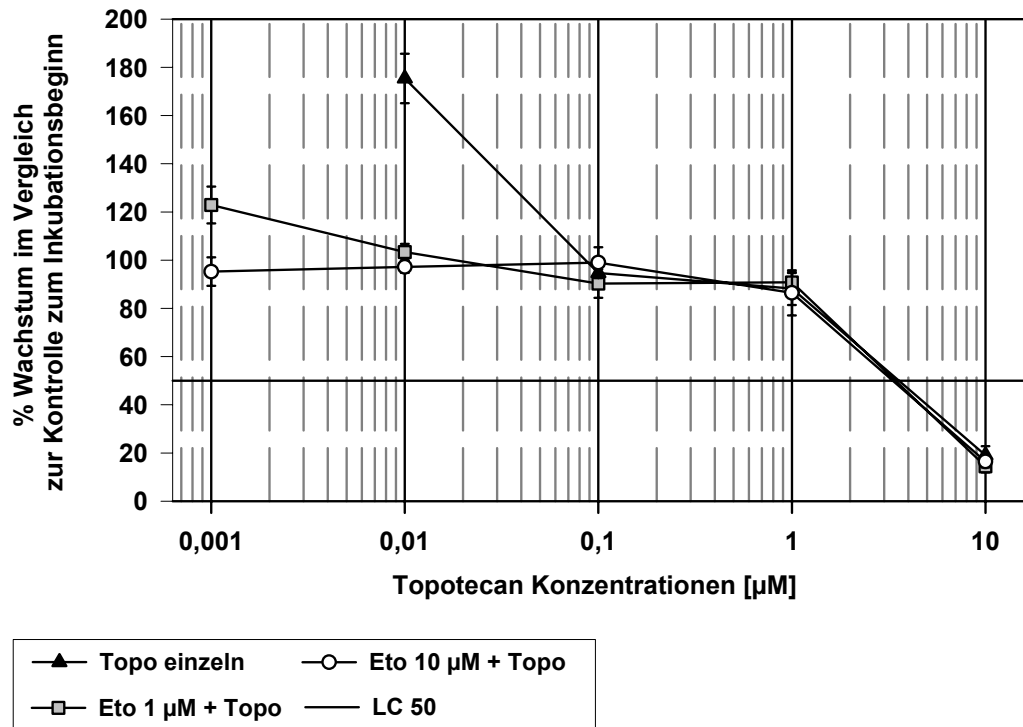


Abb. 27: Zytotoxizität bei STA-ET-1 nach 72 h Inkubation mit Eto/Topo.

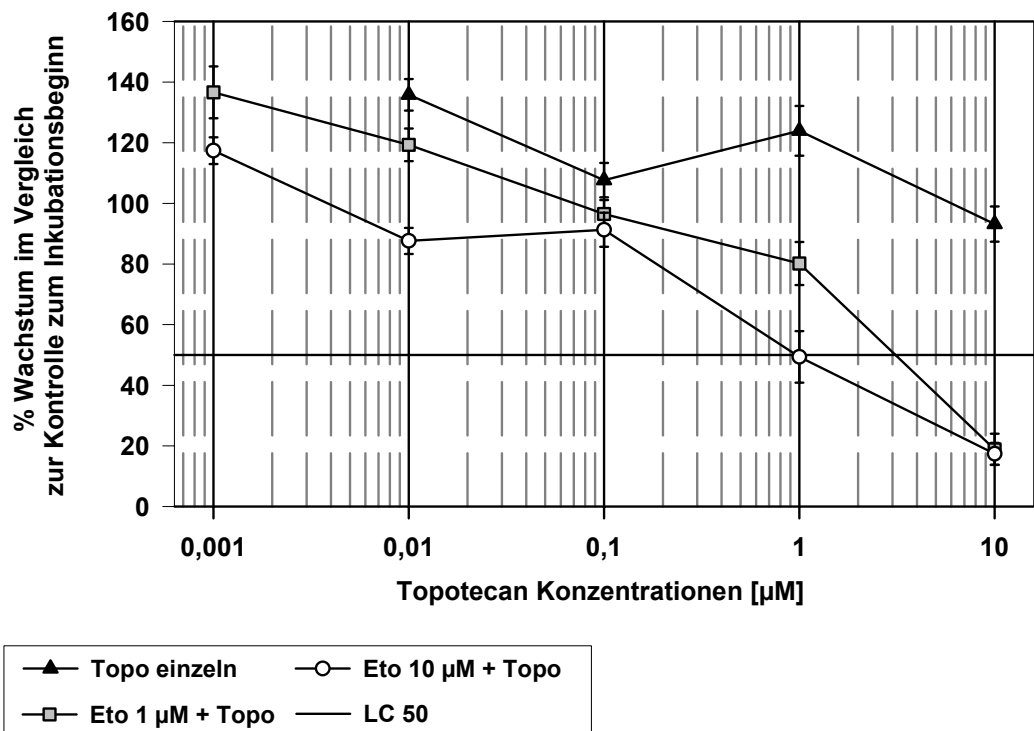


Abb. 28: Zytotoxizität bei STA-ET-2.1 nach 72 h Inkubation mit Eto/Topo.

3.3.6.4 Koinkubation der Zelllinien mit ThioTEPA/Chelidonium majus L.

Die Abbildungen 29-32 zeigen die Dosiswirkungskurven für die vier Zelllinien nach Inkubation mit zwei ThioTEPA-Konzentrationen (5 μM bzw. 50 μM) kombiniert mit fünf verschiedenen Chelidonium-m.-Konzentrationen (5-125 μM). Vergleichend dazu wurden für jede Zelllinie die Dosiswirkungskurven unter Ukrain- und Chelidonium m.-Einzelinkubation (jeweils 5-50 μM) hinzugefügt. Die Tabelle 19 gibt einen Überblick über die aus den Graphen abgelesenen LC50-Konzentrationen für die einzelnen Zelllinien.

Tabelle 19: Aus den Graphen ermittelte LC50-Werte (in μM) der einzelnen Zelllinien.

	<u>CADO-ES-1</u>	<u>VH-64</u>	<u>STA-ET-1</u>	<u>STA-ET-2.1</u>
Ukrain einzeln:	53	20	32	32
Chelidonium einzeln:	35	20	25	> 50
ThioT 5 μM + Chel:	19	15	18	16
ThioT 50 μM + Chel:	< 5	13	9	10

ThioT = ThioTEPA, Chel = Chelidonium m.

Die Dosiswirkungskurven der Abbildungen 29-32 zeigen, dass die beiden getesteten Kombinationen über den gesamten Konzentrationsbereich bei allen Zelllinien eine größere Wachstumshemmung ausgeübt haben, als die beiden getesteten Einzelsubstanzen Ukrain und Chelidonium m.

Bei den Zelllinien VH-64 und SAT-ET-2.1 bewirkten beide Kombinationen über den eingesetzten Konzentrationsbereich eine nahezu identische inhibitorische Wirkung (die Dosiswirkungskurven der Kombinationen zeigen in Abb. 30 und 32 einen kongruenten, zum Teil parallelen Verlauf). Dagegen erwies sich bei den Linien CADO-ES-1 und STA-ET-1 im Konzentrationsbereich von 5-25 μM Chelidonium m. die Koinkubation von 50 μM ThioTEPA/Chelidonium m. um den Faktor 1,6 besser wirksam als die Kombination von 5 μM ThioTEPA mit Chelidonium m. Ab 25 μM verliefen aber auch bei diesen Zelllinien die Dosiswirkungskurven deckungsgleich, mit identischer Wirkung der beiden Kombinationen. Bei allen vier Zelllinien zeigte sich ab Konzentrationen von 50 μM Chelidonium m. unter Inkubation mit den beiden Kombinationen ein stagnierendes Restwachstum der Zellen im Bereich von 0-10 %.

Bei den Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-1 zeigte sich ab einer Konzentration von 15 μM ein kongruenter, zum Teil paralleler, zum Teil sich kreuzender Verlauf der Dosiswirkungskurven der beiden Einzelsubstanzen Ukrain und Chelidonium m. Daher lässt sich hier nicht eindeutig feststellen, welche Einzelsubstanz effektiver wirkte. Allein bei der Zelllinie STA-ET-2.1 bewirkte die Einzelinkubation mit Ukrain für

72 h ein ca. um den Faktor 2 größeres Absterben der Zellen gegenüber der Einzelinkubation mit Chelidonium m.

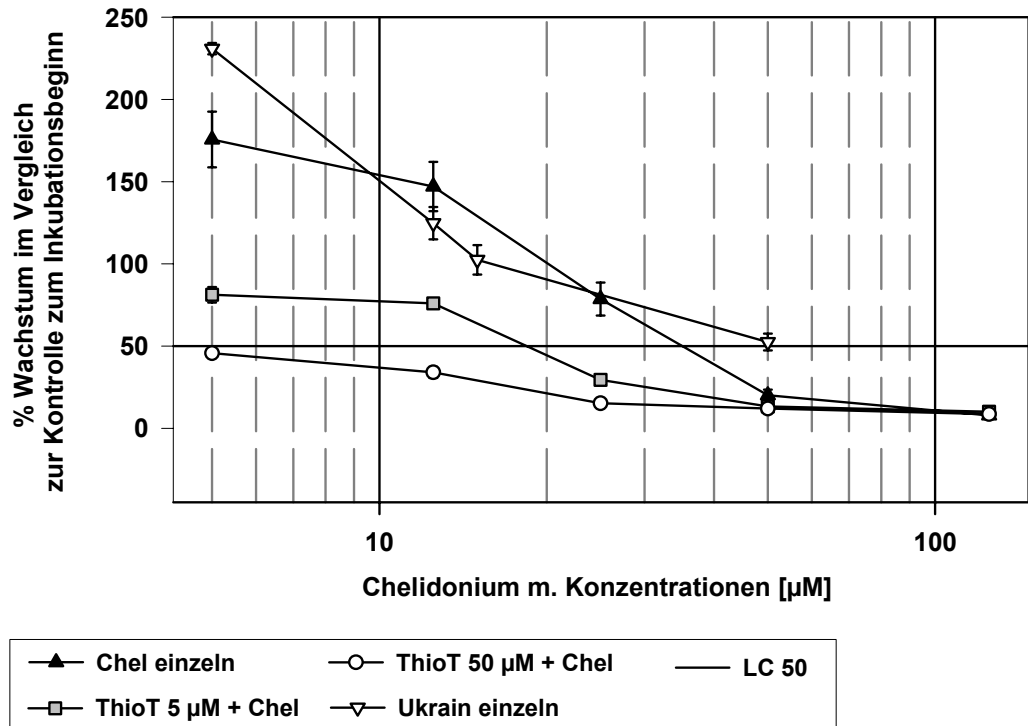


Abb. 29: Zytotoxizität bei CADO-ES-1 nach 72 h Inkubation.

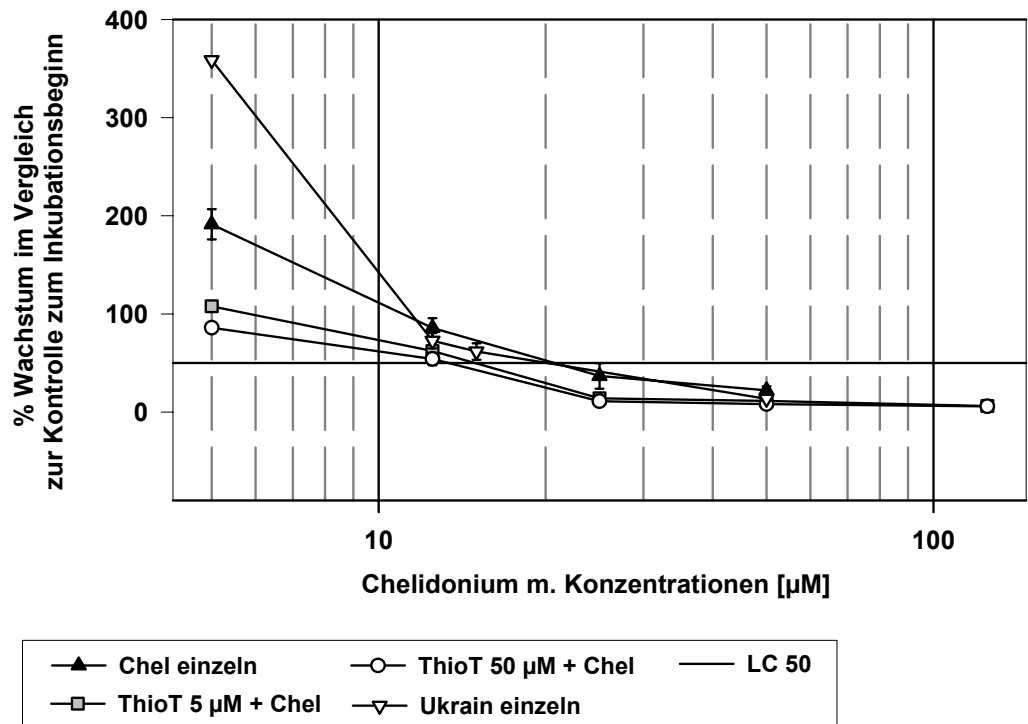


Abb. 30: Zytotoxizität bei VH-64 nach 72 h Inkubation.

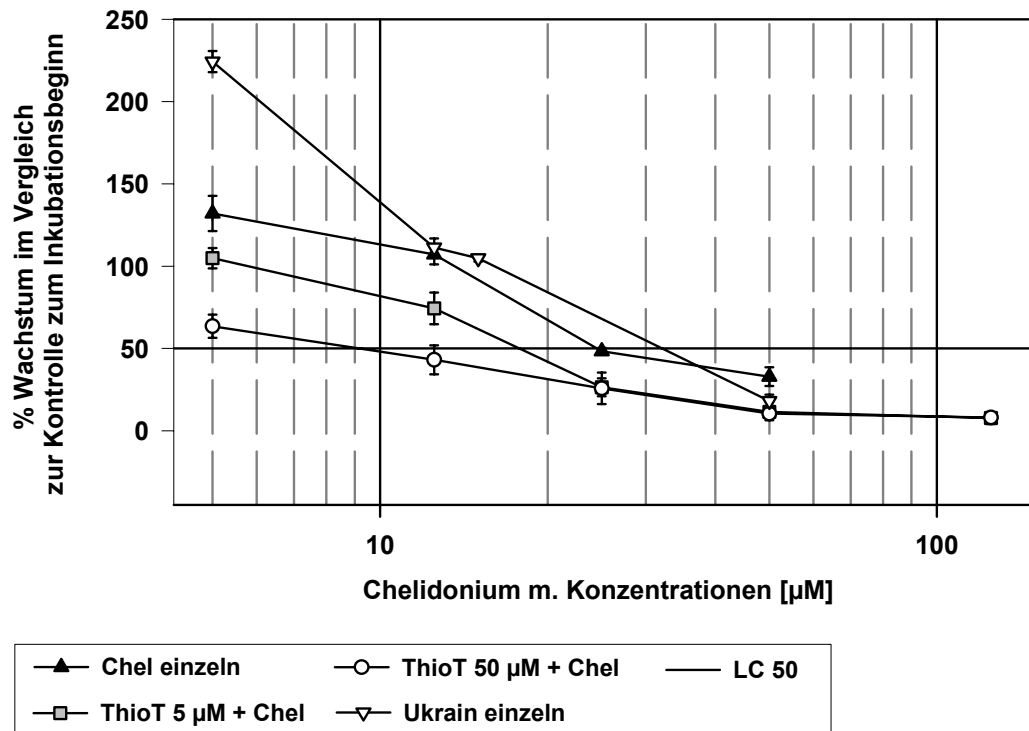


Abb. 31: Zytotoxizität bei STA-ET-1 nach 72 h Inkubation.

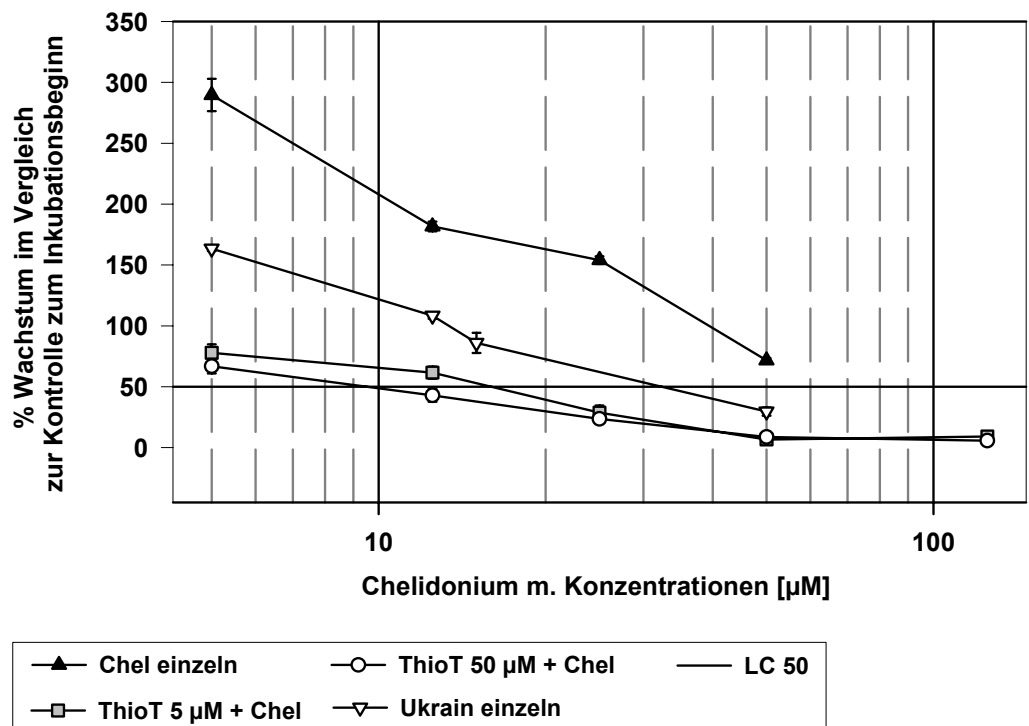


Abb. 32: Zytotoxizität bei STA-ET-2.1 nach 72 h Inkubation.

3.3.7 Zusammenfassung und Vergleich der antiproliferativen Wirkung der Kombinationen

3.3.7.1 Berechnung der LC50-Werte

Analog zu den Berechnungen für die Einzelinkubationen (siehe 2.2.3.4, S. 36) wurden die Konzentrationen ermittelt, die bei den getesteten Koinkubationen eine 50 %-ige Letalität (LC50) der Zellen bewirkten (Tabellen 20, 21). Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Einzelversuchen wurden die entsprechenden LC50-Werte unter alleiniger Etoposid-, Topotecan- Chelidonium m.- und Ukrain-Inkubation ergänzt (grau unterlegte Zeilen).

Tabelle 20: Berechnung der LC50-Werte (in μM) für CADO-ES-1 und VH-64.

Zytostatika-Kombination	CADO-ES-1				VH-64			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Etoposid einzeln	>	>	>	69,6	>	>	53,1	20,9
Cyclo 1 μM + Eto	>	111	153	x	>	60,1	86,8	9,92
Cyclo 10 μM + Eto	242	6,84	<	x	>	80,2	53,1	7,85
Topotecan einzeln	>	>	43,2	>	>	47,6	2,62	0,16
Cyclo 1 μM + Topo	>	0,09	0,01	x	>	6,26	1,93	0,18
Cyclo 10 μM + Topo	>	0,04	<	x	>	5,04	0,26	0,04
Eto 1 μM + Topo	>	8,78	0,07	0,01	>	3,37	0,91	0,97
Eto 10 μM + Topo	>	>	0,003	<	>	0,76	0,44	<
Chelid. m. einzeln	63,6	43	37,2	25,9	>	29,9	21,6	11,4
Ukrain einzeln	x	>	>	35,2	>	44,8	40,7	17,8
ThioT 5 μM + Chel	36,8	22	19,5	17,8	20,9	18,7	15,7	16,5
ThioT 50 μM + Chel	21,9	14,4	<	<	18,8	16,7	13,7	14,2

Cyclo = 4-OOH-Cyclophosphamid, Eto = Etoposid, Topo = Topotecan,

Chel = Chelidonium m., ThioT = ThioTEPA

> alle Werte lagen oberhalb der LC50

< alle Werte lagen unterhalb der LC50

x fehlender Messwert nach 96 h Inkubation

Tabelle 21: Berechnung der LC50-Werte (in μM) für STA-ET-1 und STA-ET-2.1.

Zytostatika-Kombination	STA-ET-1				STA-ET-2.1			
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h
Etoposid einzeln	>	86,3	72,5	61,6	>	>	>	>
Cyclo 1 μM + Eto	>	181	82,9	93,3	>	88,7	40,1	84,6
Cyclo 10 μM + Eto	>	181	77,1	71,5	>	88,7	9,88	70,7
Topotecan einzeln	>	4,51	4,37	4,05	>	>	37,5	8,3
Cyclo 1 μM + Topo	>	>	0,77	0,98	>	7,62	0,09	0,1
Cyclo 10 μM + Topo	>	9,39	0,57	<	>	6,38	<	0,01
Eto 1 μM + Topo	>	8,84	5,81	7,08	>	>	5,43	5,19
Eto 10 μM + Topo	>	9,75	5,68	3,69	>	8,53	0,99	0,8
Chelid. m. einzeln	37,9	23,6	24,7	30,7	42,1	>	>	38
Ukrain einzeln	42,8	33,9	33,7	24,1	41,6	43	44,6	38,7
ThioT 5 μM + Chel	31,8	22,3	18,9	23,2	35,4	24,3	16,9	20,4
ThioT 50 μM + Chel	31	21,3	9,98	18,7	28,8	25,4	10,3	12,3

Cyclo = 4-OOH-Cyclophosphamid, Eto = Etoposid, Topo = Topotecan,

Chel = Chelidonium m., ThioT = ThioTEPA

> alle Werte lagen oberhalb der LC50

< alle Werte lagen unterhalb der LC50

3.3.7.2 Cyclophosphamid/Etoposid versus Cyclophosphamid/Topotecan

Die graphische Auswertung der 72stündigen Inkubation von 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid und 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan lässt Gemeinsamkeiten erkennen: Bei beiden Testungen erreichten die Kombinationen einen größeren inhibitorischen Effekt als die jeweiligen Einzelsubstanzen. Außerdem zeigte die jeweilige Kombination mit 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid die größte zytotoxische Wirkung, während die jeweilige Kombination mit 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid zwar insgesamt etwas weniger wirksam war, allerdings mit steigender Konzentration einen deutlicheren Wirkungszuwachs verzeichnete (vergl. graphische Auswertung der 72 h Inkubation).

Im Vergleich der LC50-Werte zeigte sich insgesamt die Kombination von 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan bei allen Zelllinien weitaus wirksamer als die Kombinationen von 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid (vergl. Tab. 20, 21). So war die Inkubation mit 1 μM 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan im Vergleich mit der Kombination von 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid nach 72 h bei den Zelllinien VH-64 und STA-ET-1 um den Faktor 25 bzw. 100 wirksamer; die Inkubation

mit **10 μM** 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan zeigte sich sogar um den Faktor 200 bzw. 135 effektiver. Bei CADO-ES-1 wirkte die Kombination von 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit Topotecan gar um mehr als 10^4 mal besser als die entsprechende Koinkubation mit Etoposid!

3.3.7.3 Etoposid/Topotecan

Die Einzelinkubation mit Topotecan war im Vergleich der LC50-Werte insgesamt schlechter wirksamer als die Koinkubationen von Etoposid mit Topotecan. Bei der Zelllinie STA-ET-1 erwies sich die Topotecan-Einzelinkubation allerdings über den gesamten Inkubationszeitraum geringfügig potenter als die beiden Kombinationen. Von den beiden Kombinationen zeigte sich die Koinkubation mit der höheren Etoposid-Konzentration (10 μM) bei allen Linien effektiver.

Auch die Kombination von Etoposid/Topotecan wurde anhand der LC50-Werte mit den Kombinationen 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid und 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan verglichen. Beide Kombinationen von Etoposid/Topotecan waren bei allen Zelllinien weitaus wirksamer als die entsprechenden Kombinationen von 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid (vergl. Tab. 20, 21). Verglichen mit der Kombination von 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan war die Kombination Etoposid/Topotecan bei der Zelllinie VH-64 zum größten Teil besser wirksam, bei den übrigen Linien zeigte sich eine schlechtere Wirkung (siehe Tabellen 20, 21 für CADO-ES-1, STA-ET-1, STA-ET-2.1).

3.3.7.4 ThioTEPA/Chelidonium majus L. versus Ukrain

Im Vergleich der ermittelten LC50-Werte zeigte sich die Kombination von 50 μM ThioTEPA mit Chelidonium m. bei allen Zelllinien im gesamten Inkubationszeitraum etwas besser wirksam als die Kombination mit 5 μM ThioTEPA. Beide Kombinationen wirkten zudem auf alle Zelllinien zytotoxischer als die Vergleichssubstanz Ukrain. Auch Chelidonium m. allein war außer bei der Linie STA-ET-2.1 insgesamt effektiver als Ukrain.

4 Diskussion

4.1 In-vitro-Chemosensitivitätstestung

4.1.1 Bedeutung und Potential von Vorhersage-Assays

Seit man in den 50er Jahren die Forschung im Sinne einer „individuellere“ Krebstherapie ausrichtete, wurde eine Vielzahl verschiedener in-vitro-Assays entwickelt, die sich in unterschiedliche Kategorien einordnen lassen: Einige dieser Tests basieren auf der Bestimmung der Zellvitalität, andere messen die Inkorporation radioaktiver Präkursoren. Weitere Tests untersuchen speziell den Tumorzellklon (Clonogenic Assays) und eine andere Kategorie bestimmt die metabolische Aktivität der Zellen.

Mit Hilfe der Tests können innovative Zytostatika an etablierten Zelllinien orientierend gescreent, oder in komplexeren Studien auf ihre Wirksamkeit hin überprüft werden. Außerdem ist es durch in-vitro-Sensitivitäts- und (Kreuz-)Resistenztests an Primärtumorzellen möglich, Anhaltspunkte für die Entwicklung eines individuell abgestimmten Chemotherapieprofils zu gewinnen. Die Chemosensitivitätstestung bietet durch die Verwendung von permanenten Zelllinien jederzeit die Möglichkeit einer schnellen, detaillierten und kostengünstigen Durchführung von Screeningtests - auch in größeren Testansätzen.

Natürlich sind diese Tests in ihrer Aussagekraft begrenzt, da sie unter optimalen Laborbedingungen in einem Milieu durchgeführt werden, das nur näherungsweise dem physiologischen entspricht. In vitro fehlen pharmakokinetische und -dynamische Einflüsse, die weitgehend die Wirkung einer Substanz in vivo bestimmen. Des Weiteren gibt es keine natürlichen Barrieren, da das Medikament direkt auf die Zellen gegeben wird. So bleiben Einflussgrößen wie der pH-Wert, Tumoroxygenierung, Tumovaskularisation, extrazelluläre Matrix, die Rolle des Immunsystems etc. unberücksichtigt. Da die Tumorzellen aus ihrem Wachstumsverband heraus isoliert werden, ergeben sich unter Umständen in vitro ganz andere Wachstumsraten und damit ein anderes Sensitivitätsprofil der Zellen. Viele Zelllinien stammen zudem von vorbehandelten und deshalb häufig therapieresistenten Tumoren ab. Auch die in vivo dosislimitierenden Nebenwirkungen spielen in der Zellkultur keine Rolle.

In-vitro-Assays können nicht das optimale Medikament herausfiltern, oder die absolute Wirkung einer bestimmten Dosierung messen, aber sie sind geeignet zur Beurteilung der relativen Wirksamkeit von Zytostatika und können unwirksame Substanzen aufdecken, um den Patienten vor unnötiger Toxizität zu bewahren. Potentiell wirksame Medikamente können dann in nachfolgenden präklinischen und klinischen Studien weiter erprobt werden.

4.1.2 MTT-Assay im Vergleich

In der vorliegenden Arbeit wurde der MTT-Test zur Beurteilung der Chemosensitivität ausgewählter Ewing-Sarkom-Zelllinien eingesetzt. Es handelt sich um einen 1983 von Mosmann entwickelten quantitativen Test, um anhand von metabolischer Aktivität Zellproliferation oder Zytotoxizität *in vitro* zu bestimmen [106]. Aufgrund der Reduktion einer Tetrazoliumverbindung zu einem Farbstoff durch mitochondriale Dehydrogenasen ist es möglich, Aussagen über den Aktivitätsgrad lebender Zellen zu machen [106]. Analysen ergaben eine direkte Korrelation zwischen der anwachsenden Zellzahl und der gemessenen optischen Dichte [26,33,55,80]. Die Tests waren mit einer Mittelwertabweichung von weniger als 10 % reproduzierbar [26,80] und zeigten bei adhärennten Zellen weniger Abweichungen als bei Suspensionszellen [26]. Besonders vorteilhaft beim MTT-Test ist sein geringer Zeit- (Dauer: 4-5 h) und Kostenaufwand und die Möglichkeit der automatisierten Auswertung mittels Photometer [106]. Dadurch ist der Test besonders in großangelegten Studien für das detaillierte Screening mehrerer Testsubstanzen in verschiedenen Dosierungen und Kombinationen geeignet. Im Vergleich mit labortechnisch aufwendigeren, und damit zeitintensiveren Assays, wie den Farbstoff-Exklusions-Assays, Clonogenic Assays und mit den Zell-Protein-Assays zeigten sich gute Übereinstimmungen der Ergebnisse [26,33,136]. Auch gegenüber Assays, die auf der Einbauhemmung radioaktiv markierter Präkursoren basieren, kommt der MTT-Test ohne diese teure Markierung aus und zeigte im Vergleich einen hohen Korrelationsgrad (0,89 im Vergleich mit dem ³H-Tdr-Assay; 0,96 mit dem ⁵¹Cr-Assay) [80].

Der MTT-Test bewies in Studien außerdem ein gewisses Vorhersagepotential für die Sensitivität getesteter Substanzen *in vivo*: In einer Studie mit 120 Proben von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkrebs zeigte sich für den MTT-Test eine starke Korrelation zwischen der Sensitivität *in vitro* und der Tumorausbrechrate *in vivo* (positiver Vorhersagewert bezüglich Chemo-Resistenz von 83 %) [153]. Bei 22 Tumorpatienten wurde beim Vergleich der Chemotherapieeffekte *in vivo* mit den MTT-Test-Ergebnissen *in vitro* eine Gesamt-Vorhersagerate von 86,4 % beschrieben [58].

Nachteilig beim MTT-Test ist, dass nicht exakt zwischen zytostatischer und zytozidaler Wirkung auf die Zellen unterschieden werden kann, da der Test lediglich metabolisch aktive Zellen misst [18,26,136]. Diese können durch temporäre Zytostase vorübergehend stark eingeschränkt sein, aber nach einer Erholungsphase wieder volle Proliferationsfähigkeit erreichen. Außerdem ist der Test nicht tumorzellspezifisch, da er auch die metabolische Aktivität von Stromazellen oder Bakterien miterfasst [149]. Bei geringen Zellzahlen in den Plattenvertiefungen (<150 Zellen) erwies sich der auch vom NCI eingesetzte SRB-Assay (Sulforhodamin B) gegenüber dem MTT-Test als

vorteilhafter, da letzterer die tatsächliche Zellzahl unterschätzte [66]. Der SRB-Assay zeigte eine bessere Linearität mit der Zellzahl und größere Sensitivität [66,88]. Um diese potentielle Fehlerquelle zu umgehen wurde bei den eigenen Versuchen auf ausreichend hohe Ausgangszellzahlen (3000-6000-9000 Zellen pro Well, siehe Kapitel 3.1, S. 46) geachtet. Die MTT-Auswertung muss außerdem immer direkt erfolgen, da sich nach kurzer Zeit Färbungsveränderungen ergeben können [18] - die Platten wurden aus diesem Grund immer sofort im Anschluss an die Lysereaktion mit dem Elisa-Reader ausgewertet. Insgesamt erwies sich der MTT-Test als geeignet zur Beurteilung der Wirksamkeit von Einzelsubstanzen und deren Kombinationen auf Ewing-Sarkom-Zellen.

4.2 Zur Durchführung der in-vitro-Toxizitätstests

4.2.1 Inkubationszeit

In dieser Arbeit wurde eine Inkubationszeit von insgesamt 7 Tagen (inklusive Vorinkubation) mit einer 4tägigen, kontinuierlichen Zytostatikaexposition gewählt. In diesem Versuchszeitraum zeigte sich ein weitgehend exponentielles Wachstum der Kontrollen. Dies ist insofern wichtig, als dass die GI50-Werte bei einem Wachstumsplateau der Kontrollzellen, aber noch wachsenden behandelten Zellen, stark überbewertet werden könnten [18]. Auch in anderen MTT-Studien wurde ein Inkubationszeitraum von 4-7 Tagen vorgeschlagen, um optimales Zellwachstum und ausreichende Formazanlevel zu erreichen [5]. Das Intervall sollte lang genug sein, um den Zytostatika-induzierten Zelltod bzw. den Verlust der Dehydrogenaseaktivität feststellen zu können, und um Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Assays zu schaffen. Die Notwendigkeit zur Nachfütterung der Zellen, welche mit erhöhtem Fehlerrisiko verbunden ist, schränkt eine längere Inkubation (> 7 Tage) ein [26]. Die in diesen Versuchen gewählte kontinuierliche Exposition ermöglicht im Gegensatz zur Kurzzeit-Inkubation auch den Substanzen mit schlechter Löslichkeit und solchen, die intensiven Zellkontakt zur Wirkentfaltung brauchen, einen Effekt zu zeigen [5]. Zudem wird ein verzögerter Zelltod, wie er bei phasenspezifischen Substanzen (z. B. den Topoisomerasehemmern Etoposid und Topotecan) vorkommt, nur bei kontinuierlicher, längerer Inkubation sichtbar [5]. In der vorliegenden Arbeit wurden die Testsubstanzen nur einmal, zu Beginn der 96stündigen Inkubation, zugegeben. Für phasenunspezifische Zytostatika ist eine Abhängigkeit des zytozidalen Effektes von dem Produkt aus der Konzentration und der Inkubationszeit beschrieben. Es bleibt zu bedenken, ob die Wirkung von Substanzen mit einer kurzen Halbwertszeit (z.B. 4-OOH-Cyclophosphamid) bei einmaliger Applikation möglicherweise unterschätzt wird. Dies ließe sich in weiteren Tests mit fraktionierter Applikation überprüfen.

Bei den Kombinationsversuchen wurde ausschließlich das simultane Aufbringen (Koinkubation) beider Testsubstanzen zu Beginn der Inkubation praktiziert. Einige der in dieser Arbeit zitierten Studien beschreiben allerdings eine größere Inhibition von Zellen nach sequenzieller Inkubation (z.B. Etoposid nach Topotecan) [21]. In auf dieser Arbeit aufbauenden Folgeversuchen könnten daher die selben Testsubstanzen sequenziell eingesetzt werden, und die resultierende Wachstumshemmung mit derjenigen unter Koinkubation verglichen werden. Auf diese Weise ließen sich möglicherweise wichtige Anhaltspunkte für spätere klinische Tests gewinnen.

4.2.2 Reproduzierbarkeit

Aufgrund der Komplexität der durchgeführten Untersuchungen war eine Mehrfachwiederholung aller Versuchsreihen zur weitergehenden statistischen Beurteilung der Reproduzierbarkeit nicht möglich. Um dennoch die Reproduzierbarkeit der Versuche überprüfen zu können, wurden ausgewählte Toxizitätstests unter gleichen Versuchsbedingungen nach einigen Wochen bzw. nach Monaten wiederholt (vergl. 2.2.3.5, S. 36-45). Als Vergleichskriterien zwischen jeweiligem Ausgangs- und Wiederholungsversuch dienten die graphisch ermittelten GI50- bzw. LC50-Werte, ein gleichförmiger Kurvenverlauf und das aus der Graphik resultierende Restwachstum in % (teilweise unter Berücksichtigung unterschiedlicher Ausgangszellzahlen, vergl. 2.2.3.5). Die Reproduzierbarkeit der Tests konnte somit anhand der jeweiligen Gegenüberstellung von Ausgangs- und Wiederholungsversuch in graphischer Form hinreichend deutlich gemacht werden (vergl. 2.2.3.5 Reproduzierbarkeit der Einzelversuche Abb. 6a-c; der Koinkubationen Abb. 7a und b, 8a und b, 9a und b, 10a und b).

4.3 Antiproliferative Wirkung der Testsubstanzen

4.3.1 4-OOH-Cyclophosphamid

Cyclophosphamid hat sich als sehr aktive Substanz in der first-line-Behandlung von verschiedenen soliden Tumoren im Kindesalter bewährt. Beim Ewing-Sarkom wird es in einer Dosis von $1500 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ im aktuellen Therapieprotokoll eingesetzt [49].

In Untersuchungen zum Purging, d.h. bei der Entfernung von malignen Zellen aus dem Knochenmark vor einer Knochenmarkstransplantation, bewirkten $100 \text{ }\mu\text{M}$ des stabilen Metaboliten 4-Hydroperoxycyclophosphamid ein nahezu vollständiges Absterben der Krebszellen (darunter auch die Ewing-Sarkom-Zelllinien ES-5838 und ES-A45573), und eine Inhibition der normalen Knochenmarkszellen von ca. 83 % [29,61]. Bei den eigenen Versuchen war bereits ab einer Konzentration von $40 \text{ }\mu\text{M}$ bei allen Zelllinien maximale Wachstumshemmung eingetreten, mit einem Restwachstum zwischen 0 und 10 %.

Allerdings betrug die Inkubationszeit beim Purgung nur Minuten bis Stunden, während die Zellen der Substanz bei den durchgeführten Toxizitätstests für 24-96 h ausgesetzt waren.

In verschiedenen klinischen Studien zeigte sich Cyclophosphamid wirksamer, wenn die Dosis nicht als einmaliger Bolus, sondern verteilt über einige Tage gegeben wurde. In einer Phase-I-Studie mit Cyclophosphamid über 96 h bei erwachsenen Patienten mit therapierefraktären, metastasierten Tumoren lag die maximal tolerierte Dosis bei 7 g/m^2 . Neun von 21 Patienten zeigten Tumoransprechen, acht davon waren erfolglos mit Oxazaphosphorinen vorbehandelt [45]. Die gleiche Dosis wurde über 8 h verteilt auf vier Fraktionen (je $1,75 \text{ g/m}^2$) in einer anderen Studie bei Kindern mit fortgeschrittenen soliden Tumoren eingesetzt. Fünf der 20 Kinder zeigten objektives Ansprechen bei vorübergehend schwerer Myelosuppression [28]. Ifosfamid, ein strukturelles Isomer, wird beim Ewing-Sarkom zusätzlich, oder an Stelle von Cyclophosphamid eingesetzt (VIDE). Mit einer Infusion von 5 g/m^2 über 24 h alle 2-3 Wochen wurde bei Kindern mit rezidierten oder therapierefraktären Tumoren eine Ansprechrate von 30 % erzielt (3 x CR, darunter ein Ewing-Sarkom und 3 x PR). Die meisten der Patienten hatten vorab Cyclophosphamid in Dosierungen von $600\text{-}1000 \text{ mg/m}^2$ erhalten [129].

Bei einer, auch im aktuellen Ewing-Sarkom-Therapieprotokoll praktizierten Cyclophosphamidgabe von $1000\text{-}1500 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ konnten Plasmaspitzenpiegel von $106\text{-}240 \text{ }\mu\text{M}$ erreicht werden [79,152]. In den eigenen Versuchen wurde 4-OOH-Cyclophosphamid in Konzentrationen von $0,4\text{-}400 \text{ }\mu\text{M}$ einmalig appliziert und erreichte nach 72 h 50 %-ige Wachstumshemmung in einem Bereich von $1\text{-}10 \text{ }\mu\text{M}$. Im Gegensatz zu der kurzen Halbwertszeit von 4-OOH-Cyclophosphamid in vitro (15-20 min) erfolgt in vivo über einen gewissen Zeitraum eine kontinuierliche Aktivierung von Cyclophosphamid durch die Leber und die Halbwertszeit der aktivierten Metabolite beträgt 1-5 h [146]. Aufgrund dieser pharmakokinetischen Unterschiede könnte das zytotoxische Potential von Cyclophosphamid bei nur einmaliger Gabe von 4-OOH-Cyclophosphamid zu Beginn der Inkubation in vitro möglicherweise unterschätzt werden. Trotzdem lagen die erreichbaren Peakplasmaspiegel weitaus höher als die wirksamen Konzentrationen nach einmaliger 4-OOH-Cyclophosphamidgabe in vitro. Ob eine fraktionierte Gabe die zytotoxische Wirkung noch steigert, könnte in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Die Ergebnisse des MTT-Tests, sowie die Resultate der zitierten klinischen Studien, haben die Wirksamkeit einer Cyclophosphamid-Monotherapie beim Ewing-Sarkom demonstriert.

4.3.2 ThioTEPA

ThioTEPA ist eine multifunktional-alkylierende Substanz, die signifikante chemotherapeutische Wirkung gegen verschiedene solide Tumoren aufweist [97]. Es liegt jedoch noch keine Zulassung für den Gebrauch in der pädiatrischen Onkologie vor. Aufgrund von ausgeprägter Myelosuppression betrug die maximal tolerierte Bolusgabe bei Kindern mit refraktären Tumoren, die in einer Phase-I-Studie mit ansteigenden Dosierungen von 25 bis 75 mg/m² ThioTEPA behandelt wurden, 65 mg/m² [68]. Diese Dosis führte jedoch in der klinischen Testung bei Kindern mit rezidivierten soliden Tumoren zu keiner signifikanten Wirkung [60], und konnte auch, trotz zusätzlicher Gabe des hämatopoietischen Wachstumsfaktors GM-CSF, wegen auftretender kumulativer Thrombozytopenie nicht weiter gesteigert werden [115].

Erst die Einführung der autologen Knochenmarkstransplantation in die Therapieprogramme erlaubte eine drastische Dosiserhöhung von ThioTEPA. Mittlerweile ist ThioTEPA im Rahmen von Hochdosis-Regimen auch für viele pädiatrische solide Tumoren, darunter das Ewing-Sarkom, mit ermutigenden Ansprechraten getestet worden [96,102]. Bei einer Gesamtdosis von 1125 mg/m² zeigte sich in einer kleinen Patientengruppe (9 Kinder) ein Ansprechen von 71 % mit 2 CRs, 3 PRs (darunter 1 ES und 1 OS) und 2 SDs, obwohl alle Kinder in hohem Maße chemotherapeutisch vorbehandelt waren [137]. In weiteren Studien wurden 900 mg/m² ThioTEPA als optimale Dosis bestimmt [96,102,163]. Hier zeigte sich bei massiv vorbehandelten Kindern eine Ansprechrate von 50 % mit 11/22 PRs (darunter 2/3 ES) [102]. In einer anderen Studie lag ein Therapieansprechen > 50 % in 33 % der Fälle vor [96]. Höhere Mengen ThioTEPA führten zu limitierender, nicht-hämatologischer Toxizität [72,137].

Bei den eigenen Untersuchungen wurde ThioTEPA in Konzentrationen von 0,5-500 µM getestet und erreichte eine 50 %-ige Wachstumshemmung im Bereich von 4-90 µM nach 72 h, bzw. im Bereich von 2,5-22 µM nach 96 h. Diese Konzentrationen lagen unter bzw. im Bereich der Plasmaspitzenpiegel von 24-203 µM, die nach der hochdosierten intravenösen Gabe von insgesamt 135-1215 mg/m² gemessen wurden [95]. Mit einer geringeren Dosis ThioTEPA von 60-80 mg als Kurzzeitinfusion wurden Spiegel von lediglich 7-10 µM erreicht [62], was eventuell das geringe Ansprechen bei dieser Dosierung erklären könnte.

ThioTEPA wird außerdem in weiteren, auf Alkylanzien basierenden Hochdosis-Kombinationsregimen für Ewing-Patienten mit schlechter Prognose erprobt. In einer Phase-I-Studie untersuchte man bei Kindern mit disseminierten soliden Tumoren eine Kombination von verschiedenen ThioTEPA-Dosierungen mit Busulfan (480 mg/m²) und Etoposid (2400 mg/m²) mit anschließender Stammzellen-Rescue. Dabei ergab sich eine maximal tolerierte ThioTEPA-Dosis von 750 mg/m² [127]. In einer anderen Studie

bekamen 16 Ewing-Sarkom-Patienten mit schlechter Prognose zunächst eine Chemotherapie mit Busulfan, Melphalan und ThioTEPA, welche zu drei primären CRs, neun sekundären CRs, einer sekundären PR und einer tertiären CR führte. Bei neun Patienten folgte danach eine zweite myeloablative Therapie mit Knochenmarksbestrahlung (TMI), welche bei sechs Patienten (67 %) Rezidivfreiheit bewirkte. Insgesamt führte diese duale Therapie zu einem rezidivfreien 3-Jahres-Überleben von 36 % [67]. Man sucht in derartigen Studien nach einer optimalen Kombination mit breitem Wirkspektrum, deren Partner sich in der Zytotoxizität ergänzen, aber keine überlappende extrahämatologische Toxizität besitzen.

Insgesamt ist bei allen aufgeführten Studien zu berücksichtigen, dass die Patienten weit fortgeschrittene Befunde aufwiesen und massiv chemotherapeutisch vorbehandelt waren; insbesondere auch mit anderen Alkylanzien. Daher könnten die Tumoren unbehandelter Kinder auf eine ThioTEPA-Gabe möglicherweise noch weitaus sensibler ansprechen. Die Ergebnisse der MTT-Testung haben die Wirksamkeit einer ThioTEPA-Monotherapie auf Ewing-Sarkom-Zellen demonstriert, bei Spiegeln, die gut nach einer hochdosierten Applikation erreichbar waren. Auch die Ergebnisse der zitierten klinischen Studien deuten darauf hin, dass die hochdosierte Anwendung von ThioTEPA eine effektive therapeutische Option beim fortgeschrittenen Ewing-Sarkom sein könnte.

4.3.3 Etoposid

Etoposid gehört zu den wichtigsten Medikamenten, die im Einsatz gegen pädiatrische Tumoren verfügbar sind. Während bei Erwachsenen eine Abhängigkeit der Etoposid-Wirkung und Toxizität sowohl von der Dosis, als auch vom eingesetzten Therapieschema besteht, ist die Relevanz dieser Beobachtungen bei Kindern unsicher [101]. In den verschiedenen Studien lassen sich zwei Prinzipien bezüglich der Etoposidgabe bei kindlichen soliden Tumoren feststellen: Die eine Hälfte der Studien beschäftigt sich mit einer prolongierten oralen Gabe, während die andere Hälfte eine höhere Dosis Etoposid an drei bis fünf aufeinander folgenden Tagen intravenös verabreicht.

Bei oraler Gabe sind erhebliche interindividuelle Schwankungen in der Bioverfügbarkeit der Substanz aufgetreten [101,156]. Daher wird empfohlen, die tägliche Dosis in zwei Gaben aufzuteilen [156]. Die prolongierte orale Gabe erfolgt in der Regel über 21 Tage in einer Konzentration von 50 mg/m² täglich [39,40,107]. Konzentrationen über 80 mg/m² sind wegen erhöhter Toxizität nicht akzeptabel [40]. Obiges Schema führte in einer Studie mit refraktären oder rezidivierten pädiatrischen Tumoren nach zwei Zyklen zu 1 CR, 5 PRs und 22 SDs. Die Ansprechrate von 10 % war zwar insgesamt gering, doch die erreichten Stabilisierungen boten einen Ausgangspunkt für weitere Therapiemaßnahmen [39]. Die besten Ergebnisse dieses Therapieschemas wurden bei

Hirntumoren verzeichnet [39,107,141]. Von den untersuchten vier Patienten mit Ewing-Sarkomen hatten alle Krankheitsprogression, bei den übrigen soliden Tumoren zeigte sich bestenfalls eine Stabilisierung der Erkrankung. Allerdings waren die Fallzahlen sehr gering und die Patienten massiv vorbehandelt [107].

In einer Phase-II-Studie mit intravenösen Etoposid-Dosen von 75-125 mg/m²/d über fünf Tage zeigten 10 von 48 Kindern mit soliden Tumoren partielles Ansprechen, darunter ein Patient mit Ewing-Tumor [30]. 150 mg/m²/d i.v. über drei Tage alle drei Wochen bei 154 Kindern mit rezidierten soliden Tumoren führte zu 3 CRs und 6 PRs (beim Ewing-Sarkom, Hodgkin Lymphom, Neuroblastom und Rhabdomyosarkom), weitere 27 zeigten gemischtes Ansprechen, 10 eine Stabilisierung [90]. Die beschleunigte Gabe von 100 mg/m²/d i.v. x 3 jede Woche, 3 Wochen lang, führte im Vergleich mit dem konventionellen Schema zu einer besseren Ansprechrate von 42 %, bei Kindern mit refraktären oder rezidierten Rhabdomyosarkomen [128]. Modifizierend wurden 150 mg/m²/d Etoposid über drei Tage intravenös kombiniert mit Verapamil, einem potentiellen Multidrug-Resistance-Modulator. Nach zwei Zyklen zeigten sich 6 x PRs bei Neuroblastom- und Rhabdomyosarkom-Patienten [36]. Burdach und Jürgens fanden bei 3 verschiedenen Phase-II-Studien mit Etoposid-Monotherapie (von 375-1800 mg/m²) Ansprechraten zwischen 20 und 33 % bei EFT-Patienten [Review: 24].

In den eigenen Untersuchungen wurden die Zelllinien kontinuierlich mit Etoposid in Konzentrationen von 0,1-100 µM über vier Tage inkubiert. Gulati et al. beschreiben bei Purgung-Versuchen mit den Ewing-Sarkom-Zelllinien ES-5838 und ES-A4573 eine Wachstumshemmung von 3-3,5 log unter 100 µM Etoposid [61]. Die eigenen GI50-Werte lagen nach 72 h in einem Konzentrationsbereich von 0,5-20 µM und nach 96 h bei 0,3-5,8 µM, wobei CADO-ES-1 und STA-ET-2.1, die Zelllinien mit höherer P-gp-Expression, wesentlich resistenter gegen Etoposid waren. Nach der intravenösen Gabe von 100-150 mg/m² Etoposid wurden im Plasma Spitzenspiegel von 32-50 µM bestimmt [23,164]. Damit lagen die mittels MTT-Test gemessenen GI50-Werte in einem Konzentrationsbereich, der deutlich unter den Peakplasmawerten nach intravenöser Etoposidgabe lag. Nach einer oralen Dosis von 25-50 mg/m² ließen sich weitaus geringere Spitzenspiegel von 1,6-4,8 µM messen [39,151] - ein Bereich, in dem die eigenen Tests nur mit 4tägiger Inkubation 50%-ige Wachstumshemmung erreichten.

Die Ergebnisse der MTT-Tests haben die Wirksamkeit einer Etoposid-Monotherapie auf Ewing-Sarkom-Zellen bestätigt in Konzentrationen, die weit unter den erreichbaren Plasmaspitzenspiegeln nach intravenöser Applikation lagen. Die Resultate der zitierten klinischen Studien lassen allerdings vermuten, dass Etoposid allein zwar häufig zur Krankheitsstabilisierung führt [30,39,90], eine wirklich hohe Ansprechrate aber nur in

Kombination mit anderen Präparaten erzielt werden kann. Etoposid stellt ein effektives Mittel in der aktuellen Kombinationstherapie des Ewing-Sarkoms dar (VIDE, EVAI(A)).

4.3.4 **Kombination 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid**

In vitro wurde die Kombination Cyclophosphamid/Etoposid erfolgreich beim Puring von malignen Zellen aus dem Knochenmark eingesetzt. Mit einer Kombination aus geringen Dosen Etoposid und Cyclophosphamid wurde dabei eine größere Elimination von Tumorzellen festgestellt als beim Einzelpuring mit 100 mg/ml Cyclophosphamid. Die resultierende Toxizität war dagegen nicht erhöht [51]. Weitere Studien beschreiben mit der Kombination eine synergistische Wirkung auf maligne Zellen [29,99] und mittels Computersimulation einen „antagonistischen Effekt“ bezüglich der Inhibition normaler Knochenmarkszellen [29]. Eine Kombination von 100 μ M Cyclophosphamid mit 17 μ M Etoposid (im Verhältnis 1:0,342) reduzierte die Krebszellen auf unbestimmbare Anzahl, während die Knochenmarkszellen um 87,2 % reduziert wurden [29].

In den eigenen Tests wurde 4-OOH-Cyclophosphamid in vergleichsweise geringeren Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M eingesetzt und mit Etoposid (0,1-250 μ M) kombiniert. Insgesamt zeigte sich bei den beiden Kombinationen ein deutlich effektiveres Absterben der Krebszellen als unter Einzelinkubation mit Etoposid (z.B. LC50-Werte bei VH-64 unter 96 h Inkubation: **1.** mit Etoposid 20,9 μ M, **2.** mit 1 μ M 4-OOH-Cyclophosphamid/ Etoposid 9,9 μ M, **3.** mit 10 μ M 4-OOH-Cyclophosphamid/ Etoposid 7,9 μ M). Eine Ausnahme bildet die Zelllinie STA-ET-1, bei der die Etoposid-Einzelwirkung über den gesamten Inkubationszeitraum nicht durch die Kombinationen mit 4-OOH-Cyclophosphamid übertroffen wurde (vergl. Tab. 21, 3.3.7.1, S. 75). Die Koinkubation 10 μ M 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid zeigte im gesamten Konzentrationsbereich bei allen anderen Zelllinien die beste Wachstumshemmung. Besonders im niedrigen Konzentrationsbereich war sie der Kombination mit 1 μ M 4-OOH-Cyclophosphamid überlegen.

Der in der Literatur beschriebene Synergismus konnte durch die eigene Testung bestätigt werden. Interessant wäre an dieser Stelle ein Vergleich der hier beschriebenen Ergebnisse, die ausschließlich unter simultaner Inkubation der beiden Substanzen entstanden, mit der Wirkung unter sequenzieller Applikation.

Ergänzend zu den eigenen Beobachtungen zeigte die Kombination der beiden Substanzen auch in klinischen Studien gute Resultate: In einer Phase-II-Studie mit Osteosarkom-Patienten wurde eine Kombination von 600 mg/m² Etoposid (kontinuierliche Infusion) und 1800 mg/m² Cyclophosphamid (verteilt auf 6 Bolusgaben alle 12 h) über 72 h appliziert. Die Rate der CRs und PRs lag bei 88 %, darunter 60 % der Patienten mit Metastasen bei Diagnosestellung. Myelosuppression war die einzige bedeutende, aber

reversible Toxizität dieses Schemas [138]. In einer anderen Studie wurden 17 Kinder mit fortgeschrittenen, oder refraktären soliden Tumoren (darunter fünf Ewing-Sarkome) täglich mit kurzen Infusionen von 500 mg/m² Cyclophosphamid und 100 mg/m² Etoposid über fünf Tage behandelt. Nach zwei Kursen erreichten 59 % der Patienten PR und 23,5 % Krankheits-Stabilisierung [103]. Beim refraktären Neuroblastom zeigte eine simultane Kombination von Hochdosis-Cyclophosphamid mit Etoposid eine Ansprechrate von 43 % mit 1 CR und 11 PRs [105]. In einer Phase-I-Studie mit simultaner Gabe von Hochdosis-Cyclophosphamid, Etoposid und Cisplatin zeigte sich eine Ansprechrate von 61 % mit 9 CRs und 13 PRs [108].

Die zitierten klinischen Studien und die eigenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die simultane Kombination von Cyclophosphamid und Etoposid wirksam beim Ewing-Sarkom eingesetzt werden könnte.

4.3.5 Topotecan

In Zellkultur-Versuchen erwies sich Topotecan als wirksam in proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellsystemen. Es war aktiver gegen hämatologische, als gegen solide Tumoren. Bei letzteren zeigte sich unter der höchsten eingesetzten Konzentration von 10 µg/ml eine Überlebensrate von 59 %, während bei den hämatologischen Tumoren eine IC50-Konzentration von 0,066 µg/ml gemessen werden konnte, bei einer Überlebensrate von 21 % unter 10 µg/ml. Gegen Sarkome und gegen solide Tumoren im Kindesalter zeigten sich dennoch Ansprechraten von 50 % und 40 % [81].

In in-vitro- und Phase-I-Studien mit Topotecan erwies sich die prolongierte Darreichung als wirksamer gegenüber einer höher dosierten Kurzzeitexposition [25,78,135]. So zeigten sich bei 141 frischen Tumorproben nach einer Stunde Ansprechraten von 10 bzw. 25 % unter 1 bzw. 10 µg/ml Topotecan. Bei kontinuierlicher Exposition lagen die Raten bei 34 bzw. 76 % unter Konzentrationen von 0,1 bzw. 1 µg/ml [25]. In Xenograft-Studien erwies sich die tägliche intravenöse Gabe von Topotecan für 5 Tage über 2 Wochen in 21-tägigem Rhythmus als optimales Schema [155,165].

In den eigenen Untersuchungen war Topotecan mit Abstand die wirksamste der getesteten Einzelsubstanzen. Unter 72 h Inkubation mit 100 µM Topotecan lag das Restwachstum für CADO-ES-1 bei ca. 20 % und für die übrigen Linien bei 3-8 %. 50 %-ige Wachstumshemmung wurde nach 96 h Inkubation bei VH-64 mit 0,02 µM und bei den übrigen Zelllinien im Bereich von 0,005-0,011 µM gemessen. In Untersuchungen der Topotecan-Wirkung auf NSCLC-Zelllinien mittels MTT-Test lag die mittlere IC50 nach 72 h bei 0,1 µM [100]. In den eigenen Tests lag mit 0,1 µM Topotecan nach 72 h bereits bei allen Zelllinien nur noch ein Restwachstum von 30-35 % vor.

Mit Topotecan ließen sich in vivo Plasmaspitzenpiegel von 0,016-0,227 μM (6,9-95,7 ng/ml) erreichen [25]. Damit lagen die mit dem MTT-Test ermittelten GI50-Werte aller Zelllinien in einem Konzentrationsbereich, der im Plasma erreicht werden konnte.

Bei Kindern wurden Topotecan als 24 h, 72 h und 120 h-Infusion, oder als tägliche Gabe x 3 bzw. x 5 in Phase-II-Studien getestet [20,85,130,157]. Phase-II-Studien bei Kindern mit therapierefraktären oder rezidivierten Sarkomen weisen unterschiedliche Verabreichungs-schemata für Topotecan auf: Die Gabe von 1 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$ als kontinuierliche 72-h-Infusion zeigte minimale Wirkung [20,85]. Ein Tumoransprechen wurde in 1/26 Neuroblastompatienten und in 1/25 Patienten mit ES/PNET verzeichnet [20]. Als maximal tolerierte Dosis (MTD) ohne G-CSF-Gabe bewirkten dagegen 1,4 mg/m^2 Topotecan täglich (als 30-min-Infusion über fünf Tage) Tumoransprechen bei drei Neuroblastompatienten und Stabilisierung über mehr als sechs Monate bei vier weiteren Patienten, darunter ein Ewing-Sarkom [157]. Eine protrahierte Darreichung von 2 mg/m^2 täglich für fünf Tage führte zu 3 CRs und 2 PRs bei vorbehandelten Patienten mit Neuroblastomen (NB), Ewing-Tumoren und Retinoblastomen. Außerdem zeigte sich eine Krankheitsstabilisierung über längere Zeit bei weiteren 24 Patienten dieser Gruppen [109]. In einer Studie der Pediatric-Oncology-Group wird über Ansprechraten von 38 % beim Neuroblastom im Stadium IV berichtet [89]. Wie bei den oben erwähnten Xenograft-Studien [155,165] zeigen also auch die klinischen Studien einen deutlichen Vorteil der protrahierten intermittierenden Darreichung von Topotecan.

Die Ergebnisse des MTT-Tests haben die Wirksamkeit von Topotecan auf Ewing-Sarkom-Zellen gezeigt in Konzentrationen, die im Plasma erreicht werden können. Auch die Resultate der zitierten Studien deuten darauf hin, dass Topotecan in protrahierter intermittierender Gabe insbesondere effektiv bei refraktären, soliden pädiatrischen Tumoren bzw. beim Ewing-Sarkom ist. Unter Berücksichtigung, dass Topotecan in den aufgeführten Studien nur bei massiv vorbehandelten Kindern mit rezidivierenden Tumoren getestet wurde, könnte der inhibitorische Effekt bei unbehandelten Kindern möglicherweise noch größer sein. Analog dazu zeigte sich beim Rhabdomyosarkom (RMS) insgesamt eine Ansprechrate von 45 %. Beim alveolären RMS sogar 67 % bei Kindern, die bislang unbehandelt waren [116].

4.3.6 Kombination 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan

Es gibt bisher nur sehr wenige in-vitro-Untersuchungen zu Kombinationen mit Topotecan. Kaufmann et al. kombinierten Topotecan mit 4-Hydroperoxy-Cyclophosphamid im Verhältnis 1:167 und fanden mittels Clonogenic Assay heraus, dass die Kombination im Bereich der IC50 subadditiv bzw. antagonistisch wirkte, im Bereich der IC90 bei einigen Zelllinien aber einen größer als additiven Effekt zeigte [87].

In den eigenen Tests wurde 4-OOH-Cyclophosphamid in Konzentrationen von 1 und 10 μM eingesetzt und mit Topotecan (0,001-10 μM) simultan kombiniert. Die Ergebnisse zeigen, dass die Koinkubationen von 4-OOH-Cyclophosphamid mit Topotecan eine noch deutlich bessere Wachstumshemmung aufwiesen, als die Inkubation mit der Einzelsubstanz Topotecan. Den größten inhibitorischen Effekt auf alle 4 Zelllinien zeigte bei dieser Testung die Kombination von Topotecan mit 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid. Im höheren Konzentrationsbereich war der Wirkungsunterschied der beiden Kombinationen allerdings nicht mehr so ausgeprägt.

Vergleicht man die Wirkung dieser Kombination mit den übrigen getesteten Koinkubationen, so lässt sich insgesamt bei 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan die beste zytotoxische Wirkung verzeichnen. Sie zeigte sich bei allen Zelllinien deutlich effektiver als die Kombination 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid (bei CADO-ES-1 um mehr als Faktor 10^4 !!) und bei den Zelllinien CADO-ES-1, STA-ET-1 und STA-ET-2.1 auch als die Koinkubation mit Etoposid/Topotecan. Lediglich bei VH-64 erreichte die Kombination Etoposid/Topotecan insgesamt eine bessere Zytotoxizität.

In einer Phase-I-Studie für Kinder ergab die Kombination von Topotecan mit Cyclophosphamid (250 mg/m^2 Cyclophosphamid tägl. für 5 Tage, mit ansteigenden Topotecan-Dosierungen kombiniert) Neutropenie als Dosis-limitierenden-Faktor und eine MTD von 0,75 mg/m^2 Topotecan unter G-CSF-Support [139]. In der darauf folgenden Phase-II-Studie mit einer täglichen Applikation von 250 mg/m^2 Cyclophosphamid direkt gefolgt von 0,75 mg/m^2 Topotecan über 5 Tage zeigten sich Ansprechraten von 35-50 % für rezidierte NB, Ewing-Sarkome (von 17 Pat. zeigten 2 CR, 4 PR) und RMS [140]. Es gibt außerdem eine Pilot-Studie von Kushner et al. mit Topotecan (6 mg/m^2) und Hochdosis-Cyclophosphamid (4,2 g/m^2) als Ansatz bei therapieresistenten, soliden Tumoren im Kindesalter [93]. Hier zeigte sich eine geringere Toxizität im Vergleich zu anderen, bei refraktären kindlichen Tumoren eingesetzten Kombinationen.

Die eigenen Ergebnisse stützen die Hypothese verschiedener erster klinischer Untersuchungen, dass die Kombination der etablierten Substanz Cyclophosphamid mit dem Topoisomerasehemmer Topotecan einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie der Erkrankung darstellt. Besonders im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit könnte diese Kombination ein bedeutsames Wirkungspotential gegenüber den oftmals von Resistenzen betroffenen herkömmlichen Medikamenten bieten.

4.3.7 Kombination Etoposid/Topotecan

Kombinationen von Topotecan mit dem Topoisomerase-II-Hemmer Etoposid führten in bisher durchgeführten Untersuchungen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen - je

nachdem, ob die Gabe simultan oder sequenziell erfolgte, und in welcher Reihenfolge die Substanzen sequenziert gegeben wurden (siehe unten).

In den eigenen MTT-Tests wurden zwei verschiedene Etoposid-Konzentrationen mit unterschiedlichen Topotecan-Konzentrationen simultan kombiniert. Die Einzelinkubation mit Topotecan war im Vergleich der LC50-Werte insgesamt schlechter wirksamer als die Koinkubationen von Etoposid mit Topotecan. Bei der Linie STA-ET-1 erwies sich die Topotecan-Einzelinkubation allerdings über den gesamten Inkubationszeitraum geringfügig potenter gegenüber dieser Kombination. Die Koinkubation mit der höheren Etoposid-Konzentration (10 μM) war bei allen Zelllinien die effektivere der beiden Kombinationen.

Auch die Kombination von Etoposid mit Topotecan wurde anhand der LC50-Werte mit den Kombinationen 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid und 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan verglichen. Beide Kombinationen von Etoposid/Topotecan waren bei allen Zelllinien weitaus wirksamer als die entsprechenden Kombinationen von 4-OOH-Cyclophosphamid/Etoposid. Bei der Zelllinie VH-64 bewirkte die Kombination Etoposid/Topotecan insgesamt sogar ein größeres Absterben der Zellen als die Kombination von 4-OOH-Cyclophosphamid/Topotecan. Bei den übrigen Linien zeigte sich jedoch bei diesem Vergleich eine schlechtere Wirkung.

Im Gegensatz zu den eigenen Beobachtungen findet man in der Literatur verschiedene Beispiele, bei denen die simultane Gabe von Etoposid und Topotecan zu nicht-additiven bzw. sogar antagonistischen Effekten geführt hat [86,161]. Kaufmann vermutet in diesen Fällen eine Hemmung der für die Wirkung des Topoisomerase-II-Inhibitors notwendigen DNA-Synthese durch den Topoisomerase-I-Inhibitor [86]. In seiner Studie zeigte die simultane Kombination mit dem Topoisomerase-I-Hemmer Camptothecin (CPT) im Vergleich zur Einzelinkubation mit Etoposid im Bereich von 15-17 μM Etoposid plus 1 μM CPT eine 6mal höhere Überlebensrate der inkubierten leukämischen HL60-Zellen - in höheren Etoposid-Konzentrationen sogar bis 30mal höhere Raten. Ab einer Konzentration von 0,01 μM CPT war eine Hemmung der Etoposid-Wirkung zu beobachten, mit 0,1 μM CPT war halbmaximale Inhibition erreicht und ab 1 μM CPT konnte die Hemmung der Etoposid-Wirkung nicht weiter gesteigert werden. Ähnliche Resultate erbrachten Versuche mit Topotecan [86]. In einer anderen Studie mit primären Tumorzellkulturen mittels FMCA-Assay führten 0,04 $\mu\text{mol/l}$ Topotecan kombiniert mit 8,5 $\mu\text{mol/l}$ Etoposid über 72 h bei unterschiedlichen soliden Tumoren zwar in 11 % zu synergistischen Interaktionen, trotzdem zeigte die Kombination bei keinem dieser Tumoren Überlebensraten der Krebszellen < 50 % [82]. Im Gegensatz dazu fand man bei den untersuchten hämatologischen Tumorzellen in 29 % einen Synergismus mit Absterberaten > 50 % in 76 % der Fälle [82].

Für die Wirkung der Kombination scheint die Expression der beiden Topoisomerasen von Bedeutung zu sein. In einigen Modellen führte die Gabe des Topoisomerase-I-Hemmers zum kompensatorischen Anstieg der Topoisomerase II [37,161]. Dies würde einen synergistischen Effekt bei sequenzieller Gabe vermuten lassen. In vitro zeigte sich ein maximaler Synergismus bei Gabe von Etoposid nach dem Topoisomerase-I-Hemmer [21]. Allerdings führte im Model für pädiatrische Tumoren die Gabe von Etoposid nach Irinotecan, einem weiteren Topoisomerase-I-Hemmer, zu verminderten Antitumor-Effekten bei synergistischer Toxizität [77]. Auch die Kombination von Topotecan ($0,2-2 \text{ mg/m}^2$ tägl. für 3-5 d) vor Etoposid ($20-100 \text{ mg/m}^2$ tägl. für 3-5 d) bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren zeigte eine zum Teil stark erhöhte Toxizität bei minimaler Wirkung [42,63]. Ursächlich wurde ein nur kurzlebiger Anstieg der Topoisomerase II vermutet, der sich nicht auf die folgende Etoposidgabe auswirkte [42]. Eine weitere Studie berichtet konträr über einen signifikanten Abfall der Topoisomerase II nach Camptothecin-Gabe. Trotzdem ließ sich hier ausschließlich additive Wirkung der Kombination Camptothecin/Etoposid feststellen, egal ob die Inkubation simultan oder sequenziell erfolgte [148]. Bei Kombination von Topotecan nach Doxorubicin, einem weiteren Topoisomerase-II-Hemmer, zeigten sich Tumoransprechen bei 50 % der Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, und abfallende Topoisomerase-I-Werte nach der Doxorubicin-Gabe [143].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die eigenen Untersuchungen mit der simultanen Inkubation von Etoposid und Topotecan - im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen antagonistischen Effekten - eine Steigerung der zytotoxischen Wirkung gegenüber der Einzelinkubation mit Topotecan auf die untersuchten Ewing-Sarkom-Zellen erbracht haben. Die theoretischen Überlegungen und in-vitro-Tests zur sequenziellen Gabe und die zitierten Ergebnisse der klinischen Studien machen deutlich, dass in weiterführenden Versuchen, zum Vergleich der eigenen Beobachtungen, die Testung einer sequenziellen Gabe der beiden Substanzen von großem Interesse wäre. Möglicherweise würde man auf diese Weise die Wirksamkeit der hier getesteten simultanen Inkubation noch übertreffen.

4.3.8 **Ukrain**

Das National Cancer Institute (NCI) bestimmte die Wirksamkeit von Ukrain nach 48 h Inkubation auf 60 verschiedene humane Tumorzelllinien mit dem SRB-Protein-Assay. Um 50 %-ige Wachstumshemmung zu erreichen, wurden im Mittel $10^{-5,5}$ M Ukrain ($3,2 \mu\text{M}$) benötigt. Totale Wachstumshemmung wurde bei $10^{-4,8}$ M ($15,8 \mu\text{M}$) und 50 %-ige Zelllyse mit $10^{-4,17}$ M ($67,6 \mu\text{M}$) erreicht [98]. In ähnlichen Tests wurden normale humane endotheliale Zellen und Hautfibroblasten auch durch Konzentrationen

von 10^{-4} M (100 μ M) nicht in ihrem Wachstum und Überleben beeinträchtigt [98]. Ukrain-Konzentrationen zwischen 20-50 μ g/ml (13,1-32,8 μ M) zeigten in einer anderen Studie unter 48 h Inkubation 50 %-ige Wachstumshemmung bei endothelialen Zellen, während Osteosarkomzellen bei 50 μ g/ml (32,8 μ M) schon komplett abstarben [74]. Die Konzentration für eine 50 %-ige Wachstumshemmung der Osteosarkomzellen lag mit ca. 7 μ g/ml (4,6 μ M) Ukrain geringfügig über den mittleren GI50-Werten des NCI.

In den eigenen in-vitro-Toxizitätstests wurde Ukrain in Konzentrationen von 0,05-50 μ M eingesetzt. Unter 72 h Inkubation wurde bei allen getesteten Zelllinien mit Konzentrationen von 1,25-5 μ M deutliche Wachstumshemmung beobachtet. Eine 50 %-ige Wachstumshemmung aller Zelllinien erfolgte im Bereich von 7,5-12,5 μ M. Unter Inkubation mit 50 μ M Ukrain betrug das Restwachstum zwischen 2 und 25 % im Vergleich zur Kontrolle.

Die rechnerisch ermittelten GI50-Werte nach 48 h Inkubation lagen im Bereich von 7,5-31 μ M mit einem Mittelwert von 19,3 μ M. Die wirksamen Konzentrationen bei den eigenen Messungen lagen also im Vergleich zu den Ergebnissen des NCI-Screening insgesamt um den Faktor 6 höher. Dies könnte auf die Verwendung von zwei unterschiedlichen Untersuchungsmethoden zurückzuführen sein: Es wurde beschrieben, dass mit dem MTT-Assay generell höhere IC50-Werte gemessen werden, als mit dem SRB-Protein-Assay [55]. Eventuell spielen auch die eingesetzten Zelllinien eine Rolle, denn beim NCI wurden keine Zelllinien von Knochtumoren getestet. Die in den Studien beschriebene „selektive Malignotoxizität“ des Ukrains wurde in den eigenen Versuchen nicht überprüft.

Ukrain wurde außerdem von der EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) in Konzentrationen von 0,001-100 μ g/ml an sechs humanen Tumorenografts (HTX) mit dem Colony-Forming-Assay getestet. Es zeigte sich eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung mit inhibierender Wirkung nur unter den beiden eingesetzten Höchstkonzentrationen [bei 10 μ g/ml (6,6 μ M) reagierte nur 1/6 HTX (Ovarial-Karzinom, OVXF 899), bei 100 μ g/ml (66 μ M) 5/6 HTX]. In den übrigen Konzentrationen zeigte Ukrain keine Effekte [48].

Aufgrund von fehlenden Angaben zu erreichbaren Spitzenspiegeln im menschlichen Plasma war nicht beurteilbar, ob Ukrain in den im MTT-Test ermittelten Konzentrationen auch in vivo wirksam sein könnte.

Bezüglich seines Sensitivitätsprofils entsprach Ukrain im Wesentlichen dem des Chelidonium m. und nicht dem von ThioTEPA (vergl. 3.3.3.3, S. 58). Dem phosphorsäurehaltigen ThioTEPA-Anteil des Ukrains wird in der Literatur die Rolle einer Trägersubstanz zugeschrieben, die möglicherweise die Affinität des Gesamtmoleküls an die Tumorzelle erhöht und so die therapeutische Aktivität verstärkt [110]. Die

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft hält allerdings eine selektive Anreicherung im Tumor für die nicht exakt beschriebene Kopplung von ThioTEPA mit Schöllkrautalkaloiden für unwahrscheinlich und nicht bewiesen [9]. Die Beurteilung ist insofern schwierig, dass man nicht sicher weiß, wie viel ThioTEPA überhaupt im Ukrain enthalten ist. Es gibt Angaben über einen ThioTEPA-Anteil von 14 mol. % [158]. Zumindest zeigten in den eigenen Tests nach ausreichend langer Inkubation auch schon geringe ThioTEPA-Konzentrationen eine deutliche Zytostase.

Es gibt insgesamt nur sehr wenige Berichte über den Einsatz von Ukrain in der Krebstherapie, insbesondere beim Ewing-Sarkom. Die vorliegenden Berichte aus präklinischen und klinischen Studien erlauben wegen mangelnder objektiver Kriterien keine Beurteilung der Wirksamkeit [46]. Es fehlen bisher prospektiv randomisierte Studien. Ukrain ist daher weder in Österreich, noch in Deutschland offiziell zur klinischen Prüfung angenommen worden [9].

In einer der erwähnten Studien wurden 203 Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien, für die keine weitere konventionelle Therapie verfügbar war, über einen Zeitraum von 2,5 Jahren mit Ukrain (teilweise kombiniert mit lokaler Hyperthermie) behandelt. 20 % der Patienten erreichten CR, 60 % PR; die höchsten Ansprechraten zeigten Seminome und Prostatakarzinome. Auch die pädiatrischen Tumoren erreichten sehr hohe CR-Anteile: Neuroblastom 60 %, Ewing-Sarkom 57,1 % und Astrozytom 33,3 % [14]. An anderer Stelle wird vom selben Autor der Einzelfall einer Ewing-Sarkom-Patientin beschrieben, die trotz Bestrahlung und Chemotherapie über 1,5 Jahre Tumorprogress zeigte. Durch die Therapie mit drei Zyklen Ukrain (15 mg i.v. jeden 2. Tag über 20 Tage) in Kombination mit lokaler Hyperthermie wurde nach 6 Wochen kein weiteres Tumorwachstum, und nach 8 Monaten komplette Remission erreicht [12]. Insgesamt fünf Ewing-Sarkom-Patienten im Alter zwischen 10 und 26 Jahren wurden nach diesem Schema behandelt, mit erreichten vier Vollremissionen und einer Partialremission [13].

Die sensationellen Resultate dieser wenigen Einzelfalldarstellungen (allesamt vom selben Autor) sind allerdings sehr kritisch zu sehen, da es sich nicht um Langzeitresultate handelt. Nachfragen bei den weiterbehandelnden Ärzten ergaben nach primärer Remission Krankheitsrezidive in nahezu allen Fällen (persönliche Mitteilung). Auch ist ungeklärt, ob wirklich die Ukrain-Therapie allein zu den Erfolgen führte, oder ob die initial erfolgte konventionelle Therapie eventuell doch nicht so wirkungslos wie beschrieben war. Um die Wirkung der umstrittenen Substanz Ukrain beim Ewing Sarkom korrekt einzustufen zu können, bedarf es weiterer klinischer Studien, die unabhängig und nach evidenzbasierten Kriterien durchzuführen sind.

4.3.9 **Chelidonium majus L. (Schöllkraut)**

Chelidonium m. ist als Arzneipflanze in der alternativen Medizin weit verbreitet und wird hauptsächlich bei Spasmen im Gastrointestinaltrakt angewendet. Den Alkaloiden Sanguarin und Chelerythrin wird Antitumor-Potential zugeschrieben, wobei es bisher nur Vermutungen über die zugrundeliegenden Wirkmechanismen gibt [52]. Es liegen keine Studien über den Einsatz von Schöllkrautextrakt in in-vitro-Toxizitätstests vor.

In den durchgeführten MTT-Tests zeigte sich die Substanz nach 72 h bei den Zelllinien STA-ET-1 und VH-64 mit GI50-Werten von 2 bzw. 5 μM erstaunlich wirksam. Diese Konzentrationen lagen in einem Bereich, der mit den von Cyclophosphamid (1 bzw. 7 μM) und Etoposid (0,5 bzw. 8 μM) benötigten Konzentrationen vergleichbar war. Gegen die Linien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 war Schöllkraut allerdings mit GI50-Werten von 18 bzw. 25 μM weitaus weniger wirksam. Für die beschriebenen Unterschiede könnten Resistenzmechanismen wie z.B. die *MDR1*-Überexpression verantwortlich sein (siehe dazu 4.4, S. 95). Das Restwachstum nach 72 h Inkubation mit 50 μM Chelidonium m. lag bei STA-ET-2.1 bei 20 %, bei allen anderen Zelllinien bei 5 %.

Mit den durchgeführten Versuchen wurde erstmalig die Wirksamkeit von Chelidonium majus L. auf Ewing-Sarkom-Zellen gezeigt. Ob der im MTT-Test ermittelte wirksame Konzentrationsbereich auch im Plasma erreicht werden kann, konnte nicht geklärt werden. Es fehlen vergleichbare Ergebnisse, da zur Krebsbehandlung allgemein, und insbesondere zur Behandlung pädiatrischer solider Tumoren, bzw. des Ewing-Sarkoms, keine entsprechenden Studien mit Chelidonium m. vorliegen.

Eine wesentliche Einschränkung für den Einsatz in der Krebstherapie dürfte die vermutlich erhebliche Toxizität der Schöllkraut-Präparate in antineoplastisch wirksamen Dosen darstellen. Sowohl die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, als auch die Redaktion des „Arznei-Telegramms“ warnen mehrfach ausdrücklich vor den gehäuft aufgetretenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen unter verschiedenen Chelidonium-Präparaten [7,8,10,11]. Berichtet wird von zahlreichen Hepatitisfällen, Bilirubin- und Leberenzym erhöhungen, akutem Ikterus, Cholestase, toxischen Nekrosen des Leberparenchyms und einem Fall von letalem Leberversagen. Ein valider klinischer Wirksamkeitsnachweis für diese Substanzen stehe aus und lebertoxische Effekte würden häufig als Beschwerden der Grunderkrankung fehlgedeutet [10,11]. In der Literatur findet man entsprechende Darstellungen über toxische Nebenwirkungen beim oralen Einsatz von Schöllkraut bei Magen-Darm-Beschwerden. So beschrieben Benninger et al. 1999 insgesamt neun Frauen, bei denen es nach längerer Einname (über 2-12 Monate) zu Leberentzündung mit stark erhöhten Leberwerten kam. Greving et al. berichteten 1998 über eine Frau mit ausgedehnter toxischer Leberparenchymnekrose nach dreimonatiger

Einname von Panchelidon N. Degott (1998) berichtete im Arznei-Telegramm über zwei Fälle einer gesicherten Hepatitis, die durch schöllkrauthaltige Medikamente hervorgerufen worden war. Auch Strahl et al. beschrieben 1998 eine mehrmalig drastische Lebertransaminasen-Erhöhung (GOT 175 U/l, GPT 350 U/l) und daraus resultierende Hepatitisschübe bei einer Patientin, die sich mit täglich 3 Kapseln a 200 mg Schöllkrautextrakt selbstmediziert hatte [recherchiert in 166].

Über eine intravenöse Applikation von Schöllkraut bzw. Chelidonin gibt es bisher keine entsprechenden Berichte, so dass vor einem potentiellen Einsatz der Substanz in der Krebstherapie zunächst die Toxizität relevanter Dosen sowohl auf gesunde, als auch auf maligne Zellen getestet werden müsste und die entsprechenden Präparate in Phase-I-Studien überprüft werden müssten.

Aufgrund der Vielzahl von unerwünschten Wirkungen und des mangelnden klinischen Wirksamkeitsnachweises scheint der Einsatz von Schöllkraut-Präparaten sehr bedenklich. In der Chemotherapie lägen die wirksamen Dosen vermutlich weit über denjenigen, in denen die Präparate gegen gastrointestinale Beschwerden eingesetzt werden. Daraus würde vermutlich auch eine nicht vertretbare Steigerung der Toxizität resultieren. Diese Überlegungen legen nahe, dass Schöllkraut trotz seiner Wirksamkeit in den durchgeführten in-vitro-Versuchen für den Einsatz in der Therapie des Ewing-Sarkoms ungeeignet wäre.

Als Bestandteil des Zytostatikums Ukrain erscheint ein Vergleich der beiden Substanzen interessant: Chelidonium m. war im Vergleich der GI50-Werte insgesamt wirksamer als Ukrain und auch als dessen zweiter Bestandteil ThioTEPA. Lediglich bei den Linien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 zeigte Ukrain nach 72 h und 96 h eine größere Wachstumshemmung. Das Sensitivitätsprofil der Substanz entsprach dem von Ukrain.

4.3.10 Kombination ThioTEPA/Chelidonium majus L.

Bei der Kombination von ThioTEPA mit verschiedenen Chelidonium-Konzentrationen übten die beiden getesteten Kombinationen insgesamt auf alle Zelllinien eine größere Zytotoxizität aus, als die beiden getesteten Einzelsubstanzen Ukrain und Chelidonium m. Zudem zeigte sich im Vergleich der ermittelten LC50-Werte die Kombination von 50 µM ThioTEPA mit Chelidonium m. im gesamten Inkubationszeitraum bei allen Zelllinien etwas besser wirksam als die Kombination mit 5 µM ThioTEPA. Allerdings wird anhand der graphischen Auswertung deutlich, dass zumindest nach einer 72stündigen Inkubation der Unterschied in der Wirksamkeit der beiden Koinkubationen nur gering ausgeprägt war. So bewirkten beide Kombinationen bei den Zelllinien VH-64 und STA-ET-2.1 im eingesetzten Konzentrationsbereich eine nahezu identische inhibitorische Wirkung. Zudem zeigte sich bei den Linien CADO-ES-1 und STA-ET-1 zwar die Koinkubation

von 50 μM ThioTEPA/Chelidonium m. im Konzentrationsbereich von 5-25 μM Chelidonium m. um den Faktor 1,6 wirksamer als die Kombination von 5 μM ThioTEPA/Chelidonium m., ab 25 μM zeigte sich aber auch bei diesen Zelllinien eine identische Wirkung der beiden Kombinationen. An dieser Stelle wäre es interessant zu überprüfen, wie sich der Unterschied bezüglich der Wirksamkeit beider Kombinationen im geringeren Konzentrationsbereich verhält. Vielleicht würde die Kombination mit der geringeren ThioTEPA-Dosis dort deutlich schlechter wirken?

Zudem konnten die bisherigen Untersuchungen nicht vollständig klären, welche der beiden kombinierten Einzelsubstanzen (ThioTEPA oder Chelidonium m.) die hauptsächliche Wirkung der Kombination hervorruft. Aus dem Vergleich der LC50-Werte wird allerdings ersichtlich, dass die Kombination sich bezüglich ihres Konzentrationsprofils eindeutig besser dem Chelidonium m. zuordnen lässt, da unter einer ThioTEPA-Einzelinkubation weitaus höhere Konzentrationen zum Erreichen der LC50 benötigt wurden.

Bei allen vier Zelllinien zeigte sich unter Inkubation mit den beiden Kombinationen ab Konzentrationen von 50 μM Chelidonium m. ein stagnierendes Restwachstum im Bereich von 0-10 %. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Kombinationen von ThioTEPA und Chelidonium m. bereits mit einer Konzentration von 50 μM ihre maximale Hemmwirkung entfaltet hatten, die auch mit zunehmender Chelidonium-Konzentration (bis auf 125 μM) nicht weiter gesteigert werden konnte. Die hohe Wirksamkeit der Kombinationen im geringen bis mittleren Konzentrationsbereich ist möglicherweise auf eine gute Penetration der Kombination in die Zellen, und/oder auf mehrere Angriffspunkte bzw. unterschiedliche Wirkmechanismen zurückzuführen.

Ein Wirkungsvergleich zwischen den getesteten Kombinationen und der Substanz Ukrain ist nur sehr eingeschränkt möglich, da es in der Literatur keine Angaben über die genaue Zusammensetzung von Ukrain gibt. So bleibt z.B. unklar, ob der Alkaloidanteil der Substanz aus einzelnen Bestandteilen, oder aus einem Gesamtextrakt gewonnen wird [9]. Im Vergleich der LC50-Werte wurden von Ukrain in den eigenen Messungen über die gesamte Inkubationszeit höhere Konzentrationen benötigt als von den beiden getesteten Kombinationen.

4.4 Einfluss von Resistenzmechanismen auf die Chemosensitivität der Zelllinien

Das Haupthindernis einer erfolgreichen antineoplastischen Chemotherapie im Kindesalter besteht oftmals im Auftreten von Zytostatikaresistenzen. In der Regel handelt es sich nicht um spezifische Resistenzen gegen nur eine Substanz bzw. Substanzgruppe, sondern um einen unspezifischen Widerstand gegen eine Vielzahl verschiedener Zytostatika. Dieser ist häufig auf die gleichzeitige Beteiligung von mehreren spezifischen, und/oder unspezifischen Faktoren an der Resistenzentwicklung zurückzuführen. Unter dem Begriff

„Multidrug-Resistance“ werden die bisher bekanntesten unspezifischen molekularen Resistenzmechanismen zusammengefasst:

1. Überexpression des *MDRI*-Gens und seines Proteinproduktes P-Glykoprotein
2. Überexpression des *MRP* (multidrug resistance-associated protein)-Gens
3. verminderte Expression und/oder Aktivität der Topoisomerase II
4. gesteigerte Aktivität neutralisierender Thiole (Glutathion) und
5. eine DNA-Repair-vermittelte Resistenz

Der wohl bekannteste dieser Mechanismen ist die klassische Multidrug-Resistance (*MDRI*), auf die daher - im Zusammenhang mit dem Ewing-Sarkom - in der vorliegenden Arbeit näher eingegangen werden soll. Ergänzend war für dieses Phänomen durch Bestimmung der P-Glykoprotein-Expression (in %) mittels Durchflusszytometrie (mit FACS CaliburTM und CellQuestTM-Software; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und der P-Glykoprotein-m-RNA-Expression mittels Northern Blot eine Quantifizierung der *MDRI*-Resistenz der einzelnen Zelllinien möglich:

Zelllinie:	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
P-gp-Expression:	60%	2%	2%	20%

Die *MDRI*-Überexpression ist ein Phänomen, das vor allem die Chemotherapeutika pflanzlichen und fungalen Ursprungs betrifft. Dabei treten Kreuzresistenzen zwischen antibiotischen Zytostatika, Vinca-Alkaloiden, Anthrazyklinen, Epipodophyllotoxinen und dem Actinomycin D auf [47]. Charakteristisch für die betroffenen Zellen ist eine erhöhte Expression des in der Plasmamembran vorkommenden P-Glykoproteins (P-gp). Dieses auch bei normalen Zellen nachgewiesene Protein scheint als Membran-Transportprotein eine physiologische Rolle bei der Ausschleusung von toxischen Substanzen zu spielen [47]. Man vermutet einen energieabhängigen Efflux eines Zytostatikums, durch direkte Bindung an das P-Glykoprotein via einer Pore oder eines Kanals [47].

Die prognostische Bedeutung einer *MDRI*-Überexpression für das Ewing-Sarkom wird widersprüchlich diskutiert: Rössner et al. messen dem Nachweis des p-Glykoproteins Bedeutung für die spätere Therapie bei [131], da sie eine signifikante Korrelation zwischen der P-gp-Expression und dem morphologischen Ansprechen auf die Therapie, und eine wahrscheinliche Korrelation zur rezidivfreien Überlebensrate beim Ewing-Sarkom feststellten [132]. Im Gegensatz dazu fanden Perri et al. bei 53 Ewing-Sarkom-Gewebeproben, von denen 64 % P-gp-positiv waren, keinen signifikanten Unterschied in den Überlebensraten bei Patienten mit positiver und denen mit negativer P-gp-Expression. Außerdem wurde bei Rezidivpatienten nach der Chemotherapie zum Teil eine erhöhte, zum Teil aber auch eine geringere P-gp-Expression verglichen zum Diagnosezeitpunkt gemessen [125]. Auch Hijazi et al. konnten keine signifikanten

Unterschiede bezüglich des rezidivfreien Überlebens zwischen P-gp-positiven und negativen Fällen darstellen [73]. Für die eigenen Untersuchungen wurden vier Ewing-Sarkom-Zelllinien aufgrund ihres Primärtumortypus (mPNET oder ES) und der unterschiedlichen P-gp-Expression (in %, siehe oben) ausgewählt.

Die Linie STA-ET-1 reagierte insgesamt im Inkubationszeitraum mit Abstand am sensibelsten auf die Testsubstanzen. Bei STA-ET-1-Zellen wurde eine P-gp-Expression von 2 % gemessen, die im Zusammenhang mit der festgestellten hohen Chemosensitivität auf das Fehlen eines signifikanten *MDR1*-Mechanismus schließen lässt.

VH-64 war insgesamt relativ sensibel, zeigte sich aber gegenüber den alkylierenden Substanzen und gegenüber Topotecan weniger empfindlich. Auch bei dieser Zelllinie lag die P-gp-Expression nur bei 2 %. Das geringere Ansprechen auf die durch *MDR1*-Expression unbeeinflussten Alkylanzien und auf Topotecan lässt bei VH-64 das Vorhandensein anderer Multidrug-Resistance-Mechanismen vermuten (siehe unten).

Über die Sensitivität von Topotecan gegen *MDR*-resistente-Tumoren gibt es unterschiedliche Ergebnisse und Erklärungsmodelle in der Literatur, auf die an dieser Stelle etwas genauer eingegangen werden soll: Jonsson et al. untersuchten 10 Zelllinien, die verschiedene Resistenzmechanismen repräsentierten und 218 frische Tumorproben mit dem FMCA-Assay. Topotecan war unempfindlich gegen die meisten untersuchten Mechanismen wie P-gp-, Topoisomerase-II- und Glutathion-assoziierte-Resistenzen, aber die *MRP*-(multidrug-resistance-associated protein)-exprimierende Zelllinie H69AR (resistente SCLC-Zelllinie) zeigte sich 77mal resistenter gegen Topotecan, als ihre parentale Zelllinie ohne diesen Mechanismus [81]. Burriss et al. beobachteten bei einigen gegen Doxorubicin oder Fluorouracil resistenten Tumorproben signifikante Sensitivität gegen Topotecan. Ferner war Topotecan wirksam gegen Cyclophosphamid- und Etoposid-resistente Tumorproben [25]. Bei Houghton et al. war Topotecan in vitro und in Tumorxenografts aktiv gegen Vincristin-resistente Tumoren, was auf eine eventuelle Unempfindlichkeit gegenüber *MDR*-Expression zurückzuführen sein könnte [78].

In den eigenen Untersuchungen reagierte die Zelllinie CADO-ES-1 im Vergleich der Zelllinien auf Topotecan über den gesamten Zeitraum mit der stärksten Wachstumshemmung. CADO-ES-1-Zellen haben eine vergleichsweise hohe P-gp-Expression von 60 %. Die bei CADO-ES-1 festgestellte Topotecan-Empfindlichkeit bestätigt möglicherweise, dass Topotecan weitgehend unbeeinflusst vom *MDR1*-Mechanismus wirkt. Im Gegensatz dazu wurde in mehreren Studien bei P-gp-exprimierenden Zellen eine verminderte Akkumulation und Zytotoxizität von Topotecan festgestellt. Die Resistenz gegen Topotecan war aber viel geringer als gegen die definitiv von der *MDR1* betroffenen Substanzen, wie z.B. Dauno-, Doxorubicin und Etoposid [69,75]. Während sich die Muttersubstanz Camptothecin resistent gegen *MDR1*-

Überexpression und das P-Glykoprotein zeigte, war das positiv geladene Topotecan empfindlicher [32,75].

Obschon CADO-ES-1 im Vergleich der Zelllinien auf Topotecan über den gesamten Zeitraum mit der stärksten Wachstumshemmung reagierte, zeigte sie sich gegenüber Ukrain und Chelidonium m. von allen Zelllinien am resistentesten. Die Resistenz lässt vermuten, dass Ukrain und Chelidonium majus L. durch Zellen mit *MDR1*-Gen-Expression in ihrer Wirkung gehemmt werden. In der Literatur gibt es bisher keine Untersuchungen über Resistenzmechanismen beim Ukrain.

Auch unter Inkubation mit dem Epipodophyllotoxin Etoposid zeigte sich CADO-ES-1 relativ unempfindlich. Nach 72 h war sie die zweit-resistenteste, nach 96 h Inkubation die resistenteste Zelllinie bezüglich der ermittelten GI50-Werte. Etoposid gehört definitiv zu den von der *MDR1*-Überexpression betroffenen Substanzen [47]. Da CADO-ES-1 eine P-gp-Expression von 60 % aufweist, könnte seine Unempfindlichkeit gegen Etoposid darauf zurückzuführen sein.

Die vergleichsweise höchsten Zytostatika-Konzentrationen wurden nach 48-96 h Inkubation bei STA-ET-2.1 für eine 50 %-ige Wachstumshemmung benötigt. Diese Zelllinie besitzt eine P-gp-Expression von 20 %. Da sich STA-ET-2.1 zudem relativ unempfindlich gegen Substanzen zeigte, die nicht von der *MDR1*-Überexpression betroffen sind (z.B. die Alkylanzien), kommen hier vermutlich weitere Resistenzmechanismen zum tragen, auf die im Folgenden eingegangen werden soll:

Unter Inkubation mit den Alkylanzien 4-OOH-Cyclophosphamid und ThioTEPA zeigte sich ein sehr ähnliches Sensitivitätsprofil der Zelllinien. Die Linien VH-64 und STA-ET-2.1 waren vergleichsweise unempfindlich gegenüber den untersuchten Alkylanzien. Daraus lässt sich schließen, dass die Zytostatika dieser Substanzgruppe eventuell auf die selben, für Alkylanzien spezifischen Resistenzmechanismen ansprechen, welche von den verschiedenen Zelllinien in unterschiedlicher Höhe exprimiert werden.

Ein Mechanismus mit diesen Kriterien ist die Glutathion-assoziierte-Multidrug-Resistance. Durch erhöhte spontane oder enzymatische (Überexpression der katalysierenden Glutathion-S-Transferasen) Kopplung der elektrophilen Alkylanzien mit Glutathion erfolgt eine Entgiftung der Zytostatika. Irreparable DNA-Schäden werden verhindert [6,159].

Eine Alkylanzien-Resistenz könnte außerdem auf einer erhöhten Expression von DNA-Repair-Enzymen (z.B. ERCC-1, Glycosylasen, Ligasen und Polymerasen) basieren [59]. Diese Enzyme beseitigen die durch Alkylanzien induzierten Intra- oder Interstrangvernetzungen der DNA [54].

Auch die bei STA-ET-2.1 festgestellte p53-Mutation könnte für die relative Unempfindlichkeit dieser Zelllinie gegenüber Alkylanzien mitverantwortlich sein. Bei

Mutation im p53-Gen reagiert die betroffene Zelle bei DNA-Schädigung nicht wie üblich mit einem Zellzyklusarrest und einer Apoptoseinduktion, falls der Schaden irreparabel ist. Daher zeigen sich die mutierten Zellen auch resistenter gegenüber der DNA-schädigenden Wirkung der alkylierenden Substanzen.

Für die heterogene Sensitivität der Zelllinien bezüglich der verschiedenen Testsubstanzen spielt neben den verschiedenen Resistenzmechanismen auch das Proliferationsverhalten der Zellen eine große Rolle: Substanzen mit phasenspezifischer Wirkung haben bei gleicher Inkubationsdauer bei Zelllinien mit kurzer Generationszeit einen besseren Effekt als bei Zelllinien mit langer Generationszeit. So zeigten die Zelllinien VH-64 und STA-ET-1, bei denen Generationszeiten von 25,2 h bzw. 40,65 h gemessen wurden, unter 48 h-Inkubation mit dem phasenspezifischen Topotecan in Konzentrationen von 0,2-5 μ M eine Überlebensrate unter 50 % (bis 20 % bei STA-ET-1) gegenüber STA-ET-2.1, bei der noch Wachstumsraten von ca. 70 % vorlagen. Die Generationszeit von STA-ET-2.1 liegt bei 60 h.

Die unterschiedliche Chemosensitivität der vier Zelllinien bekräftigt die Notwendigkeit, Zelllinien mit verschiedenen Charakteristika für die in-vitro-Zytotoxizitätstestung auszuwählen, um den Tumor näherungsweise in seiner biologischen Vielfalt darzustellen.

5 Zusammenfassung

Obwohl die WHO das Ewing-Sarkom als chemotherapiesensiblen Tumor einstuft, gibt es keine systematischen in-vitro-Untersuchungen zu klinisch relevanten und innovativen Substanzen gegen diese Erkrankung im Screening-Programm des National Cancer Institutes.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die zytotoxische Wirkung verschiedener etablierter und neuer Zytostatika allein und in Kombination repräsentativ auf 4 Ewing-Sarkom-Zelllinien untersucht werden. Im Einzelnen wurden 2 alkylierende Substanzen (4-OOH-Cyclophosphamid, ThioTEPA), 2 Topoisomerase-Hemmstoffe (Etoposid, Topotecan), der umstrittene Wirkstoff Ukrain und ein Chelidonium majus L.-Präparat (Schöllkraut) nach Inkubation über 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h mittels modifiziertem MTT-Assay getestet. Die 4 eingesetzten Zelllinien wurden aufgrund ihres Primärtumortypus (ES oder mPNET) und der unterschiedlichen *MDR1*-Gen-Expriemierung ausgewählt.

Antworten auf die Eingangs gestellten Zielsetzungsfragen:

- *Gibt es effektive Zytostatika in vitro, die bisher beim Ewing-Sarkom klinisch noch nicht eingesetzt werden? Wie ist ihre Wirkung in Relation zu bereits etablierten Substanzen einzuschätzen?*
- *Lässt sich für die Testsubstanzen eine Zytotoxizität bei klinisch erreichbaren Medikamentenspiegeln nachweisen?*

Die in der Therapie des Ewing-Sarkoms etablierten Testsubstanzen Cyclophosphamid und Etoposid zeigten sich in vitro wirksam in Konzentrationen, die auch im Plasma therapeutisch erreicht werden können: 4-OOH-Cyclophosphamid zeigte nach 72 h Inkubation 50 %-ige Wachstumshemmung (GI50) im Bereich von 1-10 μM , nach Gabe von 1-1,5 $\text{g}/\text{m}^2/\text{d}$ sind im Plasma Spitzenspiegel von 106-240 μM beschrieben. Die GI50 für Etoposid nach 72 h war mit 0,5-20 μM erreicht, nach 96 h mit 0,3-5,8 μM , nach i.v.-Applikation liegen die Plasmaspitzenspiegel im Bereich von 32-50 μM .

Es konnte zudem die Wirksamkeit von Topotecan und ThioTEPA auf Ewing-Sarkom-Zellen in vitro nachgewiesen werden: Topotecan übte den größten wachstumshemmenden Effekt aller getesteten Substanzen aus in Konzentrationen (GI50 nach 96 h bei allen Zelllinien im Bereich von 0,005-0,02 μM), die ebenfalls in vivo gut erreicht werden können (Plasmaspitzenspiegel 0,016-0,227 μM). ThioTEPA zeigte deutliche Wachstumshemmung bei Konzentrationen (GI50 nach 72 h im Bereich von 4-90 μM), die nach einer hochdosierten Applikation in vivo erreichbar sind (24-203 μM).

Erstmals konnten außerdem antiproliferative Effekte für Ukrain und Chelidonium majus L. auf Ewing-Sarkom-Zellen in vitro nachgewiesen werden. Bei den Linien STA-ET-1 und VH-64 wurden nach 72 h für 50 %-ige Wachstumshemmung Chelidonium-Konzentrationen (2 bzw. 5 μM) benötigt, die mit den von 4-OOH-Cyclophosphamid und Etoposid benötigten Konzentrationen vergleichbar waren. Über eine Effektivität dieser getesteten Konzentrationen in vivo und über ihre möglicherweise erhebliche Toxizität (unter Einnahme von Schöllkraut-Präparaten wurden Hepatitis, Cholestase, Leberparenchymnekrosen und letales Leberversagen beschrieben) lassen sich keine Aussagen machen, da es in der Literatur für Chelidonium majus L. keine exakten Angaben zu erreichbaren Plasmaspitzenpiegel gibt. Auch für Ukrain liegen keine solchen Angaben vor. Die GI50-Werte für Ukrain nach 72stündiger Inkubation lagen im Bereich von 7,5-12,5 μM .

- *Welchen Effekt hat die Koinkubation eines fixen Zytostatikums mit einem zweiten in verschiedenen Konzentrationen? Zeigen sich im Vergleich mit den Einzelinkubationen möglicherweise überadditive Effekte?*

Die getesteten Koinkubationen von Cyclophosphamid/Etoposid, Cyclophosphamid/Topotecan, Etoposid/Topotecan und ThioTEPA/Chelidonium majus L. zeigten sich insgesamt deutlich effektiver als die Einzelinkubation mit dem jeweils zweitgenannten Zytostatikum in gleichen Konzentrationen. Im Vergleich der Kombinationen erwies sich die Koinkubation von Cyclophosphamid/Topotecan als am besten wirksam. Bei CADO-ES-1 wirkte die Kombination von 10 μM 4-OOH-Cyclophosphamid mit Topotecan z.B. um mehr als 10^4 mal besser als die entsprechende Koinkubation mit Etoposid!

Die Kombinationsversuche dienten dazu, eine Einschätzung der Wirkung einzelner Koinkubationen zu bekommen und sie miteinander zu vergleichen. Ob überadditive Effekte im Vergleich mit den Einzelinkubationen vorliegen, war mit der gewählten Versuchsdurchführung nicht hinreichend beurteilbar und muss in nachfolgenden Versuchen geklärt werden.

- *Welche Ergebnisse liefert ein Vergleich der Substanz Ukrain (als semisynthetisches Mischpräparat aus Schöllkraut-Alkaloiden und dem Zytostatikum ThioTEPA) mit ihren Einzelbestandteilen und deren Kombination?*

Chelidonium majus L. war im Vergleich der GI50-Werte insgesamt wirksamer als Ukrain und auch als dessen zweiter Bestandteil ThioTEPA (außer bei der Linie STA-ET-2.1).

Bezüglich seines Sensitivitätsprofils entsprach Ukrain im Wesentlichen dem des *Chelidonium majus* L. und nicht dem von ThioTEPA (vergl. 3.3.3.3, S. 58).

Bei der Kombination von ThioTEPA mit verschiedenen *Chelidonium*-Konzentrationen übten die beiden getesteten Kombinationen insgesamt auf alle Zelllinien eine größere Zytotoxizität aus als das Ukrain (und auch als die Einzelinkubation mit *Chelidonium majus* L.) Im Vergleich der LC50-Werte wurden somit von Ukrain über die gesamte Inkubationszeit höhere Konzentrationen benötigt als von den beiden getesteten Kombinationen. Ein Wirkungsvergleich zwischen den getesteten Kombinationen und der Substanz Ukrain ist nur sehr eingeschränkt möglich, da es in der Literatur keine Angaben über die genaue Zusammensetzung von Ukrain gibt. Dem phosphorsäurehaltigen ThioTEPA-Anteil des Ukrains wird dort „nur“ die Rolle einer Trägersubstanz zugeschrieben, allerdings zeigten in den eigenen Tests auch geringe ThioTEPA-Konzentrationen nach ausreichend langer Inkubation deutliche Zytostase.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten nicht vollständig klären, welche der beiden kombinierten Einzelsubstanzen (ThioTEPA oder *Chelidonium majus* L.) die Hauptwirkung der Kombination hervorruft. Aus dem Vergleich der LC50-Werte lässt sich die Kombination bezüglich ihres Konzentrationsprofils allerdings eindeutig besser dem *Chelidonium m.* zuordnen (unter einer ThioTEPA-Einzelinkubation wurden weitaus höhere Konzentrationen zum Erreichen der LC50 benötigt).

Im Vergleich der ermittelten LC50-Werte zeigte sich die Kombination von 50 μM ThioTEPA mit *Chelidonium majus* L. im gesamten Inkubationszeitraum bei allen Zelllinien nur geringfügig besser wirksam als die Kombination mit 5 μM ThioTEPA. In höheren Konzentrationen war die Wirkung identisch. Auffällig war die hohe Wirksamkeit der Kombinationen im geringen bis mittleren Konzentrationsbereich: Die Koinkubationen von ThioTEPA und *Chelidonium m.* hatten bereits mit 50 μM ihre maximale Hemmwirkung entfaltet (stagnierendes Restwachstum im Bereich von 0-10 %).

- *Sind eventuelle Unterschiede in der Chemosensitivität der Zelllinien mit beschriebenen molekulargenetischen Charakteristika wie MDR-Überexpression o. ä. assoziiert?*

Die 4 Zelllinien wiesen Unterschiede in der Chemosensitivität gegenüber den Testsubstanzen auf, welche mit der Expression von verschiedenen Resistenzmechanismen assoziiert sein könnten. So zeigte sich CADO-ES-1 (P-gp-Expression 60 %) vergleichsweise unempfindlich gegenüber Etoposid, Ukrain und *Chelidonium majus* L., reagierte aber im Vergleich der Zelllinien auf Topotecan mit der stärksten Wachstumshemmung. Die festgestellte Topotecan-Empfindlichkeit bestätigt

möglicherweise die Hypothese, dass Topotecan weitgehend unbeeinflusst vom *MDRI*-Mechanismus wirkt. Etoposid gehört dagegen definitiv zu den von der *MDRI*-Überexpression betroffenen Substanzen. Die Unempfindlichkeit bei CADO-ES-1 lässt vermuten, dass Ukrain und Chelidonium majus L. ebenfalls durch *MDRI*-Gen-Expression in ihrer Wirkung gehemmt werden. In der Literatur gibt es bisher keine Untersuchungen über Resistenzmechanismen beim Ukrain.

Die Linie STA-ET-1 reagierte insgesamt im Inkubationszeitraum mit Abstand am sensibelsten. Hier wurde eine P-gp-Expression von 2 % gemessen, die im Zusammenhang mit der festgestellten hohen Chemosensitivität auf das Fehlen eines signifikanten *MDRI*-Mechanismus schließen lässt.

Neben den verschiedenen Resistenzmechanismen spielte auch das Proliferationsverhalten der Zellen eine Rolle: Substanzen mit phasenspezifischer Wirkung (Topotecan) hatten bei gleicher Inkubationsdauer bei Zelllinien mit kurzer Generationszeit (VH-64) einen besseren Effekt als bei Zelllinien mit langer Generationszeit (STA-ET-2.1).

Resümee:

Der MTT-Assay erwies sich als geeignet zur Beurteilung der Wirksamkeit von Einzelsubstanzen und deren Kombinationen auf Ewing-Sarkom-Zellen. So konnte die Wirksamkeit der beim Ewing-Sarkom etablierten Substanzen Cyclophosphamid und Etoposid mit der durchgeführten Testung bestätigt werden. Auch das Screening von Topotecan und ThioTEPA lieferte vielversprechende Ergebnisse. Diese Zytostatika sollten in folgenden Tests näher untersucht werden, um im Behandlungskonzept für Hochrisiko-Patienten zukünftig verstärkt Berücksichtigung zu finden.

Die Koinkubation von Cyclophosphamid mit Topotecan zeigte *in vitro* die beste Wirksamkeit. Sie könnte auch *in vivo* eine sehr erfolgreiche Kombination darstellen - insbesondere im fortgeschrittenen Krankheitsstadium im Hinblick auf die oftmals von Resistenzen betroffenen herkömmlichen Medikamente. Diese Hypothese wird durch verschiedene erste klinische Untersuchungen mitgetragen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Toxizitätstests können somit wichtige Anhaltspunkte bezüglich der relativen Wirksamkeit von Zytostatika und deren Kombination liefern. Potentiell wirksame Medikamente müssen in nachfolgenden präklinischen und klinischen Studien weiter erprobt werden.

6 Literatur

- [1] Ahlke E (1997) Topotecan. Informationsblatt, Münster
- [2] Ahrens S, Hoffmann C, Jabar S, Braun-Munzinger G, Paulussen M, Dunst J, Rube C, Winkelmann W, Heinecke A, Göbel U, Winkler K, Harms D, Treuner J, Jürgens H (1999) Evaluation of prognostic factors in a tumor volume-adapted treatment strategy for localized Ewing sarcoma of bone: the CESS 86 experience. *Med Pediatr Oncol* 32:186-195
- [3] Aktoris K, Unger C, Freiburg I Br (2001) Mittel zur Behandlung von Tumoren. Chemotherapie. In: Forth W, Henschler D, Rummel W (Hrsg) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban&Fischer, München Jena, 8. Aufl, S 949-981
- [4] Alava E de, Gerald WL (2000) Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 18:204-213
- [5] Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR (1988) Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48:589-601
- [6] Arrick BA, Nathan CF (1984) Glutathione metabolism as a determinant of therapeutic efficacy: a review. *Cancer Res* 44:4224-4232
- [7] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (1998) Aus der UAW-Datenbank der AkdÄ: Hepatitis nach Schöllkrautextrakt. *Dtsch Ärztebl* 95:A-2790, Heft 44
- [8] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (2002) Aus der UAW-Datenbank der AkdÄ: Schwere Leberschäden unter Chelidonium. *Dtsch Ärztebl* 99:A-3211, Heft 47
- [9] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (16.02.2001) Zur Anwendung des Präparates Ukrain in der Krebstherapie. *Dtsch Ärztebl* 98:A-418, Heft 7
- [10] Redaktion arznei-telegramm (11/97) Hepatitis unter Schöllkraut-haltigen Gallenmitteln. *arznei-telegramm* (11/97) S.118, A.T.I. Arzneimittelinformation Berlin GmbH&Co.KG (Hersg.)
- [11] Redaktion arznei-telegramm (6/99) Schöllkraut - rezeptfrei und lebertoxisch. *arznei-telegramm* (06/99) S.65, A.T.I. Arzneimittelinformation Berlin GmbH&Co.KG (Hersg.)
- [12] Aschhoff B (1998) Ukrain treatment in a patient with Ewing's sarcoma (case report). *Drugs Exptl Clin Res* 24(5/6):241-242

- [13] Aschhoff B (1999) Erfahrungsbericht über Behandlungen mit einem Alkaloidderivat aus *Chelidonium majus* (Ukrain). Vortrag auf d. Kongress „5. Wiener Dialog für Ganzheitliche Krebstherapie“, 26.03.99, Wien.
- [14] Aschhoff B (2000) Retrospective study of ukrain treatment in 203 patients with advanced-stage tumors. *Drugs Exptl Clin Res* 26(5/6):249-252
- [15] Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Rimondini S, Longhi A, Bacchini P, Forni C, Manfrini M, Donati D, Picci P (2000) Prognostic factors in nonmetastatic Ewing's sarcoma of bone treated with adjuvant chemotherapy: analysis of 359 patients at the Instituto Ortopedico Rizzoli. *J Clin Oncol* 18:4-11
- [16] Bauch HJ (1989) Zytostatika. Teil 1: Platinverbindungen, alkylierende und interkalierende Zytostatika. *Med Mo Pharm* 12:8-20
- [17] Bauch HJ (1989) Zytostatika. Teil 2: Bleomycine, Antimetaboliten, Mitosespindelgifte, L-Asparaginase und Antihormone. *Med Mo Pharm* 12:34-45
- [18] Bellamy WT (1992) Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. *Drugs* 44:690-708
- [19] Bethge JFJ (1955) Die Ewingtumoren oder Omoblastome des Knochens. Differenzialdiagnostische und kritische Erörterungen. *Ergeb Chir Orthop* 39:327-342 (abstract)
- [20] Blaney SM, Needle MN, Gillespie A, Sato JK, Reaman GH, Berg SL, Adamson PC, Krailo MD, Bleyer WA, Poplack DG, Balis FM (1998) Phase II trial of topotecan administered as 72-hour continuous infusion in children with refractory solid tumors: a collaborative Pediatric Branch, National Cancer Institute, and Children's Cancer Group Study. *Clin Cancer Res* 4:357-360
- [21] Bonner JA, Kozelsky TF (1996) The significance of the sequence of administration of topotecan and etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol* 39:109-112
- [22] Boyd MR (1995) The NCI in vitro anticancer drug discovery screen. Concept, implementation, and operation, 1985-1995. from: *Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval*. B. Teicher Humana Press Inc. (Hrsg.) Totowa, NJ
- [23] Bristol-Myers Squibb (1999) Etopophos, 3404DIM-05
- [24] Burdach S, Jürgens H (2002) High-dose chemotherapy (HDC) in the Ewing family of tumors (EFT). *Critical Rev Oncol/Hematol* 41(2002) 169-189
- [25] Burris III HA, Hanauske AR, Johnson RK, Marshall MH, Kuhn JG, Hilsenbeck SG, Hoff DD von (1992) Activity of topotecan, a new topoisomerase I inhibitor, against human tumor colony-forming units in vitro. *J Natl Cancer Inst* 84:1816-1819

- [26] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47:936-942
- [27] Carpenter PA, White L, McCowage GB, Nayanar V, Toogood I, Shaw PJ, Lockwood L, Tiedemann K (1997) A dose-intensive, cyclophosphamide-based regimen for the treatment of recurrent/progressive or advanced solid tumors of childhood. *Cancer* 80:489-496
- [28] Chan LL, Ater J, Cangir A, Jaffe N, Raney RB, Herzog C, Culbert S, Chan KW (1996) Fractionated high-dose cyclophosphamide for advanced pediatric solid tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 18:63-67
- [29] Chang TT, Gulati SC, Chou TC, Vega R, Gandola L, Ezzat Ibrahim SM, Yopp J, Colvin M, Clarkson BD (1985) Synergistic effect of 4-hydroperoxycyclophosphamide and etoposide on a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60) demonstrated by computer analysis. *Cancer Res* 45:2434-2439
- [30] Chard RL Jr, Krivit W, Bleyer WA, Hammond D (1979) Phase II study of VP-16-213 in childhood malignant disease: a Children's Cancer Study Group report. *Cancer Treat Rep* 63:1755-1759 (abstract)
- [31] Chelidonium majus (greater celandine) - Natural medical protocols. online rech.: <http://www.natmedpro.com/nmp/chelidonium.htm>
- [32] Chen AY, Yu C, Potmesil M, Wall ME, Wani MC, Liu LF (1991) Camptothecin overcomes MDR1-mediated resistance in human KB carcinoma cells. *Cancer Res* 51:6039-6044
- [33] Chen CF, Hwang JM, Wu CH, Chen CS, Chen KY (1990) Evaluation of a rapid tetrazolium-based colorimetric assay for selecting anticancer drugs. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 46:7-16 (abstract)
- [34] Chlopkiewicz B, Marczevska J, Ejchart A, Anusewska E, Koziorowska J (1992) Evaluation of mutagenic, genotoxic and transforming properties of ukrain. *Drugs Exp Clin Res* 18:31-34
- [35] Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jürgens HF, Voûte PA, Gardner H, Craft AW (2000) Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: Analysis of 975 patients from the European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol* 18:3108-3114
- [36] Cowie FJ, Pinkerton CR, Phillips M, Dick G, Judson I, McCarthy PT, Flanagan RJ (1995) Continuous-infusion verapamil with etoposide in relapsed or resistant paediatric cancers. *Br J Cancer* 71:877-881
- [37] Crump M, Lipton J, Hedley D, Sutton D, Shepherd F, Minden M, Stewart K, Beare S, Eisenhauer E (1999) Phase I trial of sequential topotecan followed by etoposide

- in adults with myeloid leukemia: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study. *Leukemia* 13:343-347
- [38] Danysz A, Kokoschinegg M, Hamler F (1992) Clinical studies of Ukrain on healthy volunteers (phase 1). *Drug Exp Clin Res* 18(Suppl.):39-43
- [39] Davidson A, Gowing R, Lowis S, Newell D, Lewis I, Dicks-Mireaux C, Pinkerton CR (1997) Phase II study of 21 day schedule oral etoposide in children. New Agents Group of the United Kingdom Children's Cancer Study Group (UKCCSG) *Eur J Cancer* 33:1816-1822
- [40] Davidson A, Lewis I, Pearson AD, Stevens MC, Pinkerton CR (1993) 21-day schedule oral etoposide in children - a feasibility study. *Eur J Cancer* 29A(16):2223-2225
- [41] Delattre O, Zucman J, Plougastel B, Desmaze C, Melot T, Peter M, Kovar H, Joubert I, Jong P de, Rouleau G, Aurias A, Thomas G (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359:162-165
- [42] Dowlati A, Levitan N, Gordon NH, Hoppel CL, Gosky DM, Remick SC, Ingalls ST, Berger SJ, Berger NA (2001) Phase II and pharmacokinetic/pharmacodynamic trial of sequential topoisomerase I and II inhibition with topotecan and etoposide in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 47:141-148
- [43] Dunst J, Ahrens S, Paulussen M, Rube C, Winkelmann W, Zoubek A, Harms D, Jürgens H (1998) Second malignancies after treatment for Ewing's sarcoma: a report of the CESS-studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42:379-384
- [44] Dunst J, Jürgens H, Sauer R, Pape H, Paulussen M, Winkelmann W, Rube C (1995) Radiation therapy in Ewing's sarcoma: an update of the CESS 86 trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 32:919-930
- [45] Eder JP, Elias AD, Ayash L, Wheeler CA, Shea TC, Schnipper LE, Frei E 3rd, Antman KH (1991) A Phase I trial of continuous-infusion cyclophosphamide in refractory cancer patients. *Cancer Chemther Pharmacol* 29:61-65
- [46] Eick H von, (1998) Synopsis der wissenschaftlichen und ökonomischen Aspekte der pharmazeutischen Substanz Ukrain. online rech.: <http://www.ukrin.com/drugsger.html>
- [47] Endicott JA, Ling V (1989) The biochemistry of p-gp-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 58:137-171
- [48] EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) (1991) Screening results - human tumor xenografts in vitro. Ukrain. ref. in: Communication to Nowicky, 2pages.
- [49] EURO-E.W.I.N.G 99- Therapieprotokoll, Version Dec-1999; UKM, Münster

- [50] Ewing J (1921) Diffuse endothelioma of bone. *Proc NY Pathol Soc* 21:17-24
- [51] Fabritiis P de, Pulsoni A, Sandrelli A, Simone F, Amadori S, Meloni G, Mandelli F (1987) Efficacy of a combined treatment with ASTA-Z 7654 and VP16-213 in vitro in eradicating clonogenic tumor cells from human bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 2:287-298 (abstract)
- [52] Faddeeva MD, Beliaeva TN (1997) Sanguinarine and ellipticine cytotoxic alkaloids isolated from well-known antitumor plants. Intracellular targets of their action. *Tsitologiya* 39:181-208 (abstract)
- [53] Falk S, Alpert M (1967) Five-year survival of patients with Ewing sarcoma. *Surg Gynecol Obstet* 124:319-324 (abstract)
- [54] Fox M, Roberts JJ (1987) Drug resistance and DNA repair. *Cancer Metastasis Rev* 6:261-281
- [55] Fricker SP, Buckley RG (1996) Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. *Anticancer Res* 16(6B):3755-3760
- [56] Fröhlich B, Ahrens S, Burdach S, Klingebiel T, Ladenstein R, Paulussen M, Zoubek A, Jürgens H (1999) High-dosage chemotherapy in primary metastasized and relapsed Ewing's sarcoma. (E)CESS. *Klin Pädiatr* 211:284-290
- [57] Fülgraff, Palm. (2001) *Pharmakotherapie. Klinische Pharmakologie*. Lemmer B, Brune K (Hrsg), Urban&Fischer, München Jena, 11. Aufl
- [58] Furukawa T, Kubota T, Suto A, Takahara T, Yamaguchi H, Takeuchi T, Kase S, Kodaira S, Ishibiki K, Kitajima M (1991) Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay. *J Surg Oncol* 48:188-193
- [59] Geleziunas R, McQuillan A, Malapetsa A, Hutchinson M, Kopriva D, Wainberg MA, Hiscott J, Bramson J, Panasci L (1991) Increased DNA synthesis and repair-enzyme expression in lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia resistant to nitrogen mustards. *J Natl Cancer Inst* 83:557-564
- [60] Geyer JR, Balis FM, Krailo MD, Heideman R, Broxson E, Sato JK, Popleck D, Bleyer WA (1996) A phase II study of thioTEPA in children with recurrent solid tumor malignancies: a Children's Cancer Group study. *Invest New Drugs* 13:337-342 (abstract)
- [61] Gulati SC, Kwon JH, Atzpodien J, Triche TJ, Colvin OM, Clarkson BD (1989) In vitro chemosensitivity of two Ewing's sarcoma cell lines: implication for autologous bone marrow transplantation. *Cancer Invest* 7:411-416 (abstract)
- [62] Hagen B (1991) Pharmacokinetics of thioTEPA and TEPA in the conventional dose-range and its correlation to myelosuppressive effects. *Cancer Chemother Pharmacol* 27:373-378

- [63] Hammond LA, Eckardt JR, Ganapathi R, Burris HA, Rodriguez GA, Eckhardt SG, Rothenberg ML, Weiss GR, Kuhn JG, Hodges S, Hoff DD von, Rowinsky EK (1998) A phase I translational study of sequential administration of the topoisomerase I and II inhibitors topotecan and etoposide. *Clin Cancer Res* 4:1459-1467
- [64] Hande KR (1992) Etoposide pharmacology. *Semin Oncol* 19(6Suppl 13):3-9
- [65] Hande KR, Krozely MG, Greco FA, Hainsworth JD, Johnson DH (1993) Bioavailability of low-dose oral etoposide. *J Clin Oncol* 11:374-377
- [66] Haselsberger K, Peterson DC, Thomas DG, Darling JL (1996) Assay of anticancer drugs in tissue culture: comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short term cultures derived from human malignant glioma. *Anticancer Drugs* 7:331-338
- [67] Hawkins D, Barnett T, Bensinger W, Gooley T, Sanders J (2000) Busulfan, melphalan, and thiotepa with or without total marrow irradiation with hematopoietic stem cell rescue for poor-risk Ewing-sarcoma-family tumors. *Med Pediatr Oncol* 34:328-337
- [68] Heideman RL, Cole DE, Balis F, Sato J, Reaman GH, Packer RJ, Singher LJ, Ettinger LJ, Gillespie A, Sam J, Poplack DG (1989) Phase I and pharmacokinetic evaluation of thiotepa in the cerebrospinal fluid and plasma of pediatric patients: evidence for dose-dependent plasma clearance of thiotepa. *Cancer Res* 49:736-741
- [69] Hendricks CB, Rowinsky EK, Grochow LB, Donehower RC, Kaufmann SH (1992) Effect of p-glycoprotein expression on the accumulation and cytotoxicity of topotecan (SK&F 104864), a new camptothecin analogue. *Cancer Res* 52: 2268-2278
- [70] Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jürgens H (1999) Factors associated with tumor volume and primary metastases in Ewing tumors: results from the (EI)CESS studies. *Ann Oncol* 10:1073-1077
- [71] Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jürgens H (1999) Descriptive epidemiology of Ewing's tumor - analysis of German patients from (EI)CESS 1980-1997. *Klin Pädiatr* 211:271-275
- [72] Herzig RH, Brown RA, Fay JW et al. (1990) Phase I and II studies of high dose N,N',N''-triethylene thiophosphoramidate and autologous marrow transplantation in patients with refractory malignancies. *Cancer Ther and Control* 1:141-153, ref. in [102]
- [73] Hijazi YM, Axiotis CA, Navarro S, Steinberg SM, Horowitz ME, Tsokos M (1994) Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors before and after chemotherapy. *Am J Clin Pathol* 102:61-67

- [74] Hohenwarter O, Strutzenberger K, Katinger H, Liepins A, Nowicky JW (1992) Selective inhibition of in vitro cell growth by the anti-tumour drug ukraine. *Drugs Exp Clin Res* 18 (Suppl.):1-4
- [75] Hoki Y, Fujimori A, Pommier Y (1997) Differential cytotoxicity of clinically important camptothecin derivatives in p-glycoprotein-overexpressing cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 40:433-438
- [76] Hopf G (2002) Kurzbewertung: Ukraine - Fortschritt oder Rückschritt in der medikamentösen Therapie onkologischer Erkrankungen? *Arzneim.-,Therapie-Kritik* 34, 143-150 Hans Marseille Verlag GmbH München
- [77] Houghton JA, Cheshire PJ, Hallman JD 2nd, Lutz L, Luo X, Li Y, Houghton PJ (1996) Evaluation of irinotecan in combination with 5-fluorouracil or etoposide in xenograft models of colon adenocarcinoma and rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res* 2:107-118
- [78] Houghton PJ, Cheshire PJ, Myers L, Stewart CF, Synold TW, Houghton JA (1992) Evaluation of 9-dimethylaminomethyl-10-hydroxycamptothecin against xenografts derived from adult and childhood solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 31:229-239
- [79] Huitema ADR, Kerbusch T, Tibben MM, Rodenhuis S, Beijnen JH (2000) Reduction of cyclophosphamide bioactivation by thioTEPA: critical sequence-dependency in high-dose chemotherapy regimens. *Cancer Chemother Pharmacol* 46:119-127
- [80] Hussain RF, Nouri AM, Oliver RT (1993) A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *J Immunol Methods* 160:89-96
- [81] Jonsson E, Fridborg H, Csoka K, Dhar S, Sundstrom C, Nygren P, Lars R (1997) Cytotoxic activity of topotecan in human tumour cell lines and primary cultures of human tumour cells from patients. *Br J Cancer* 76:211-219
- [82] Jonsson E, Fridborg H, Nygren P, Larsson R (1998) Synergistic interactions of combinations of topotecan with standard drugs in primary cultures of human tumor cells from patients. *Eur J Clin Pharmacol* 54:509-514
- [83] Jürgens H (1998) Ewing-Sarkom/PNET. In: Seeber S, Schütte J (Hrsg) *Therapiekonzept Onkologie*. Springer, Berlin Heidelberg, 3. Aufl, S. 855-865
- [84] Jürgens H, Exner U, Gadner H, Harms D, Michaelis J, Sauer R, Treuner J, Voûte T, Winkelmann W, Winkler K, Göbel U (1988) Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone. A 6-year experience of a European Cooperative Trial. *Cancer* 61:23-32
- [85] Kadota RP, Stewart CF, Horn M, Kuttesch JF Jr, Burger PC, Kepner JL, Kun LE, Friedman HS, Heideman RL (1999) Topotecan for the treatment of recurrent or

- progressive central nervous system tumors - a pediatric oncology group phase II study. *J Neurooncol* 43:43-47
- [86] Kaufmann SH (1991) Antagonism between camptothecin and topoisomerase II-directed chemotherapeutic agents in a human leukemia cell line. *Cancer Res* 51:1129-1136
- [87] Kaufmann SH, Peereboom D, Buckwalter CA, Svingen PA, Grochow LB, Donehower RC, Rowinsky EK (1996) Cytotoxic effects of topotecan combined with various anticancer agents in human cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 88:734-741
- [88] Keepers YP, Pizao PE, Peters GJ, Ark-Otte J van, Winogard B, Pinedo HM (1991) Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur J Cancer* 27:897-900
- [89] Kretschmar C, Kletzel M, Murray K, Joshi V, Smith E, Pao PV, Castleberry R (1995) Upfront phase II therapy with taxol (Txl) and topotecan (Topo) in untreated children (>365 days) with disseminated (INSS stage 4) neuroblastoma (NB). A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Med Pediatr Oncol* 25:243
- [90] Kung F, Hayes FA, Krischer J, Mahoney D Jr, Leventhal B, Brodeur G, Berry DH, Dubowy R, Toledano S (1988) Clinical trial of etoposide (VP-16) in children with recurrent malignant solid tumors. A phase II study from the Pediatric Oncology Group. *Invest New Drugs* 6:31-36 (abstract)
- [91] Kuno MD. Fachartikel. AKODH-Dokumentation: Ukrain. online rech.: <http://www.naturheilkunde-online.de/akodh/Fachartikel/ukrain.htm>
- [92] Kushner BH, Cheung N-KV, Kramer K, Dunkel IJ, Calleja E, Boulad F (2001) Topotecan combined with myeloablative doses of thiotepa and carboplatin for neuroblastoma, brain tumors, and other poor-risk solid tumors in children and young adults. *Bone Marrow Transplant* 28:551-556
- [93] Kushner BH, Kramer K, Meyers PA, Wollner N, Cheung N-KV (2000) Pilot study of topotecan and high-dose cyclophosphamide for resistant pediatric solid tumors. *Med Pediatr Oncol* 35:468-474
- [94] Kushner BH, Meyers PA (2001) How effective is dose-intensive/myeloablative therapy against Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor metastatic to bone or bone marrow? The Memorial Sloan-Kettering experience and a literature review. *J Clin Oncol* 19:870-880
- [95] Lazarus HM, Reed MD, Spitzer TR, Rabaa MS, Blumer JL (1987) High-dose i.v. thioTEPA and cryopreserved autologous bone marrow transplantation for therapy of refractory cancer. *Cancer Treat Rep* 71:689-695

- [96] Lafay-Cousin L, Hartmann, Plouvier P, Mechinaud F, Boutard P, Oberlin O (2000) High-dose thiotepa and hematopoietic stem cell transplantation in pediatric malignant mesenchymal tumors: a phase II study. *Bone Marrow Transplant* 26:627-632
- [97] Lederle (1995) Thiotepa Lederle 15 mg; Fachinformation 7039-o937
- [98] Liepins A, Nowicky JW (1991) Ukrain is selectively cytostatic and/or cytotoxic to human tumor and HIV-infected cells but not to human normal cells. In: *Recent advances in chemotherapy. Proceedings of the 17th International Congress of Chemotherapy (June 23-28, Berlin)*, Adam D, Büchner T, Rubenstein E (Hersg.), Futuramed Publishers, München, 1991, S 2660-2661
- [99] Lilley ER, Rosenberg MC, Elion GB, Colvin OM, Bigner DD, Friedman HS (1990) Synergistic interactions between cyclophosphamide or melphalan and VP-16 in a human rhabdomyosarcoma xenograft. *Cancer Res* 50:284-287
- [100] Loprevite M, Favoni RE, Cupis A de, Pirani P, Merlo F, Grossi F, Ardizzoni A (1999) Pre-clinical evaluation of new antineoplastic agents in NSCLC cell lines: evidence of histological subtype-dependent cytotoxicity. *Int J Oncol* 15:787-792
- [101] Lowis SP, Newell DR (1996) Etoposide for the treatment of paediatric tumours: what is the best way to give it? *Eur J Cancer* 32:2291-2297
- [102] Lucidarme N, Valteau-Couanet D, Oberlin O, Couanet D, Kalifa C, Beaujean F, Lapiere V, Hartmann O (1998) Phase II study of high-dose thiotepa and hematopoietic stem cell transplantation in children with solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 22:535-540
- [103] Mantadakis E, Herrera L, Leavey PJ, Bash RO, Winick NJ, Kamen BA (2000) Fractionated cyclophosphamide and etoposide for children with advanced or refractory solid tumors: a phase II window study. *J Clin Oncol* 18:2576-2581
- [104] Marina NM, Pappo AS, Parham DM, Cain AM, Rao BN, Poquette CA, Pratt CB, Greenwald C, Meyer WH (1999) Chemotherapy dose-intensification for pediatric patients with Ewing's family of tumors and desmoplastic small round-cell tumors: a feasibility study at St. Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol* 17:180-190
- [105] Meresse V, Vassal G, Michon J, Cervens C de, Courbon B, Rubie H, Perel Y, Landman J, Chastagnier P, Valck C de, Hartmann O (1993) Combined continuous infusion etoposide with high-dose cyclophosphamide for refractory neuroblastoma: a phase II study from the Societe Francaise d'Oncologie Pediatrique. *J Clin Oncol* 11:630-637
- [106] Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63

- [107] Needle MN, Molloy PT, Geyer JR, Herman-Liu A, Belasco JB, Goldwein JW, Sutton L, Phillips PC (1997) Phase II study of daily oral etoposide in children with recurrent brain tumors and other solid tumors. *Med Pediatr Oncol* 29:28-32
- [108] Neidhart JA, Kohler W, Stidley C, Mangalik A, Plauche A, Anderson T, Quenzer RW, Rinehart JJ (1990) Phase I study of repeated cycles of high-dose cyclophosphamide, etoposide, and cisplatin administered without bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 8:1728-1738
- [109] Nitschke R, Parkhurst J, Sullivan J, Harris MB, Bernstein M, Pratt C (1998) Topotecan in pediatric patients with recurrent and progressive solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *J Pediatr Hematol Oncol* 20:315-318
- [110] Nowicky JW (1983) New immuno-stimulating anti-cancer preparation Ukrain. 13th Int Congr Chemother, Wien, Aug. 28- Sept. 2, Abst PS 12.5.33/A-6, Part 288/57
- [111] Nowicky JW (1993) Ukrain antineoplastic immunostimulant. E09/029, NSC-631570, NSC-B238865; UKSR-222, W122. *Drugs Future* 18:1011-1015
- [112] Nowicky JW, Greif M, Hamler F, Hiesmayr W, Staub W (1988) Macroscopic UV-marking through affinity. *J Tumor Marker Oncol* 33:463-465
- [113] Nowicky JW, Hiesmayr W, Nowicky W, Liepins A (1996) Influence of ukrain on DNA, RNA and protein synthesis in malignant cells. *Drugs Exp Clin Res* 22(Suppl):9-19
- [114] Nowicky Pharma (1996) Ukrain- Ampullen. (Fachinformation)
- [115] O'Dwyer PJ, LaCreta FP, Schilder R, Nash S, McAleer C, Miller LL, Hudes GR, Ozols RF (1992) Phase I of thiotepa in combination with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol* 10:1352-1358
- [116] Pappo AS, Lyden E, Breneman J, Wiener E, Teot L, Meza J, Crist W, Vietti T (2001) Up-front window trial of topotecan in previously untreated children and adolescents with metastatic rhabdomyosarcoma: an intergroup rhabdomyosarcoma study. *J Clin Oncol* 19:213-219
- [117] Paulussen M, Ahrens S, Braun-Munzinger G, Craft AW, Dockhorn-Dworniczak B, Dörffel W, Dunst J, Fröhlich B, Göbel B, Haussler M, Klingebiel T, Koscielniak E, Mittler U, Rube C, Winkelmann W, Voûte PA, Zoubek A, Jürgens H (1999) EICESS 92 (European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study) - preliminary results. *Klin Pädiatr* 211:276-283
- [118] Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, Craft A, Dockhorn-Dworniczak B, Dunst J, Fröhlich B, Winkelmann W, Zoubek A, Jürgens H (1998) Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. European Intergroup Cooperative Ewing Sarcoma Studies. *Ann Oncol* 9:275-281

- [119] Paulussen M, Ahrens S, Craft AW, Dunst J, Fröhlich B, Jabar S, Rube C, Winkelmann W, Wissing S, Zoubek A, Jürgens H (1998) Ewing's tumor with primary lung metastases: survival analysis of 114 (European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Studies patients). *J Clin Oncol* 16:3044-3052
- [120] Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, Amann G, Dockhorn-Dworniczak B, Harms D, Müller-Wehrich S, Welte K, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Göbel U, Treuner J, Voûte PA, Zoubek A, Gadner H, Jürgens H (2001) Localized Ewing tumor of bone: final results of the Cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 19:1818-1829
- [121] Paulussen M, Ahrens S, Lehnert M, Taeger D, Hense HW, Wagner A, Dunst J, Harms D, Reiter A, Henze G, Niemeyer C, Göbel U, Kremens B, Fölsch UR, Aulitzky WE, Voûte PA, Zoubek A, Jürgens H (2001) Second malignancies after Ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/Austrian/Dutch study. *Ann Oncol* 12:1619-1630
- [122] Paulussen M, Fröhlich B, Jürgens H (2001) Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs* 3:899-913 (abstract)
- [123] Paulussen M, Jürgens H. Ewing-Sarkome und PNET. AWMF-Leitlinien Nr.025/006. online rech.: <http://www.uniduesseldorf.de/WWW/AWMF/ll/ponk-203.htm>
- [124] Paulussen M, Poremba C, Schuck A, Winkelmann W, Dunst J, Jürgens H (2001) Behandlungskonzept des Ewing-Tumors. *Onkologe* 7:428-437
- [125] Perri T, Fogel M, Mor S, Horev G, Meller I, Loven D, Issakov J, Kollender Y, Smirnov A, Zaizov R, Cohen IJ (2001) Effect of p-glycoprotein expression on outcome in the Ewing family of tumors. *Pediatr Hematol Oncol* 18:325-334 (abstract)
- [126] Peruche B, Schulz M (2000) Topotecan, ein Zytostatikum. *Pharm Ztg* (14) 145: 1092-1097
- [127] Pession A, Prete A, Locatelli F, Bella S, Melchionda F, Garaventa A, Burnelli R, Paolucci G (1999) Phase I study of high-dose thiotepa with busulfan, etoposide, and autologous stem cell support in children with disseminated solid tumors. *Med Pediatr Oncol* 33:450-454
- [128] Phillips MB, Flamant F, Sommelet-Olive D, Pinkerton CR (1995) Phase II study of rapid-scheduled etoposide in paediatric soft tissue sarcomas. *Eur J Cancer* 31A:782-784
- [129] Pinkerton CR, Pritchard J (1989) A phase II study of ifosfamide in paediatric solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* 24(Suppl 1):S13-15

- [130] Pratt CB, Stewart C, Santana VM, Bowman L, Furman W, Ochs J, Marina N, Kuttesch JF, Heideman R, Sandlund JT, Avery L, Meyer WH (1994) Phase I study of topotecan for pediatric patients with malignant solid tumors. *J Clin Oncol* 12:539-543
- [131] Roessner A, Mittler U, Röse I, Radig K, Grote H(1996) Pathologie des Ewing Sarkoms. *Pathologe* 17:6-17
- [132] Roessner A, Ueda Y, Dockhorn-Dworniczak B, Blasius S, Peters A, Wuisman P, Ritter J, Paulussen M, Jürgens H, Böcker W (1993) Prognostic implication of immunodetection of p glycoprotein in Ewing's sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 119:185-189
- [133] Rosito P, Mancini AF, Rondelli R, Abate ME, Pession A, Bedei L, Bacci G, Picci P, Mercuri M, Ruggieri P, Frezza G, Campanacci M, Paolucci G (1999) Italian Cooperative Study for the treatment of children and young adults with localized Ewing sarcoma of bone. *Cancer* 86:421-428
- [134] Rote Liste (1999) Rote Liste Service GmbH, Frankfurt/Main (Hrsg) Editio Cantor Verlag, Aulendorf
- [135] Rowinsky EK, Verweij J (1997) Review of phase I clinical studies with topotecan. *Semin Oncol* 24:S20-3-S20-10
- [136] Ruben RL, Neubauer RH (1987) Semiautomated colorimetric assay for in vitro screening of anticancer compounds. *Cancer Treat Rep* 71:1141-1149
- [137] Saarinen UM, Hovi L, Makiperna A, Riikonen P (1991) High-dose thiotepa with autologous bone marrow rescue in pediatric solid tumors. *Bone Marrow Transplant* 8:369-376 (abstract)
- [138] Saleh RA, Graham-Pole J, Cassano W, Abbot F, Vander Griend R, Dickson N, Metha P, Heare M, Kedar A, Heare T, Gross S (1990) Response of osteogenic sarcoma to the combination of etoposide and cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 65:861-865
- [139] Saylor RL 3rd, Stewart CF, Zamboni WC, Wall DA, Bell B, Stine KC, Vietti TJ (1998) Phase I study of topotecan in combination with cyclophosphamide in pediatric patients with malignant solid tumors: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 16:945-952
- [140] Saylor RL 3rd, Stine KC, Sullivan J, Kepner JL, Wall DA, Bernstein ML, Harris MB, Hayashi R, Vietti TJ (2001) Cyclophosphamide plus topotecan in children with recurrent or refractory solid tumors: a Pediatric Oncology Group phase II study. *J Clin Oncol* 19:3463-3469

- [141] Schiavetti A, Varrasso G, Maurizi P, Cappelli C, Clerico A, Properzi E, Castello MA (2000) Ten-day schedule oral etoposide therapy in advanced childhood malignancies. *J Pediatr Hematol Oncol* 22:119-124 (abstract)
- [142] Schmidt D, Harms D (1988) CESS 81/86: Pathologisch-anatomische und immunhistochemische Befunde sowie Differenzialdiagnosen des Ewing-Sarkoms. *Klin Pädiatr* 200:236-242
- [143] Seiden MV, Ng SW, Supko JG et al. (1999) A phase I study of sequential doxorubicin and topotecan. *Proc Annu Meet Am Soc Clin Oncol* 18:A673
- [144] Selbsthilfe-Vereinigung zur Unterstützung erwachsener Leukämie und Lymphom Patienten e.V. (4.12.2002) Meldungen- Sogenannte Krebsmittel UKRAIN und GALAVIT nicht empfehlenswert. online rech.: <http://www.selp.de/index.htm?/rundb18.htm>
- [145] Sikora K, Advani S, Koroltschouk V, Magrath I, Levy L, Pinedo H, Schwartzmann G, Tattersall M, Yan S (1999) Essential drugs for cancer therapy: A World Health Organization consultation. *Ann Oncol* 10:385-390
- [146] Sladek NE, Powers JF, Grage GM (1984) Half-life of oxazaphosphorines in biological fluids. *Drug Metab Dispos* 12:553-559 (abstract)
- [147] Sluga M, Windhager R, Lang S, Heinzl H, Krepler P, Mittermayer F, Dominkus M, Zoubek A, Kotz R (2001) A long-term review of the treatment of patients with Ewing's sarcoma in one institution. *E J Surg Oncol* 27:569-573
- [148] Stahl M, Kasimir-Bauer S, Harstrick A (1997) Down-regulation of topoisomerase II by camptothecin does not prevent additive activity of the topoisomerase II inhibitor etoposide in vitro. *Anticancer Drugs* 8:671-676
- [149] Suto A, Kubota T, Shimoyama Y, Ishibiki K, Abe O (1989) MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy. *J Surg Oncol* 42:28-32
- [150] Taborska E, Bochorakova H, Dostal J, Paulova H(1995) The greater celandine (*Chelidonium majus* L.) - review of present knowledge. *Ceska Slov Farm* 44:71-75 (abstract)
- [151] Taguchi O, Yamakami T, Machishi M, Gabazza EC, Ibata H, Tsutsui K, Suzuki S (1992) Pharmacokinetic study and side effects of chronic daily administration of oral etoposide. *Gan To Kagaku Ryoho* 19:2005-2009 (abstract)
- [152] Tasso MJ, Boddy AV, Price L, Wyllie RA, Pearson ADJ, Idle JR (1992) Pharmacokinetics and metabolism of cyclophosphamide in paediatric patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 30:207-211
- [153] Taylor CG, Sargent JM, Elgie AW, Williamson CF, Lewandowicz GM, Chappatte O, Hill JG (2001) Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 22:278-282

- [154] Teuscher E (1997) Biogene Arzneimittel. Wiss Verl.-Ges, Stuttgart, 5. Aufl, S 325-326
- [155] Thompson J, George EO, Poquette CA, Cheshire PJ, Richmond LB, deGraaf SSN, Ma M, Stewart CF, Houghton PJ (1999) Synergy of Topotecan in combination with Vincristine for treatment of pediatric solid tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 5:3617-3631
- [156] Tillmann B, Krumpelmann S, Wuerthwein G, Wagner A, Schulze-Westhoff P, Hempel G, Jürgens H, Boos J (1998) Pharmacokinetic aspects of oral administration of etoposide. *Klin Pädiatr* 210:159-164
- [157] Tubergen DG, Stewart CF, Pratt CB, Zamboni WC, Winick N, Santana VM, Dryer ZA, Kurtzberg J, Bell B, Grier H, Vietti TJ (1996) Phase I trial and pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamics (PD) study of topotecan using a five-day course in children with refractory solid tumors: a pediatric oncology group study. *J Pediatr Hematol Oncol* 18:352-361
- [158] Uglyanitsa KN, Nefyodov LI, Doroshenko YM, Nowicky JW, Volchek IV, Brzosko WJ, Hodysh YJ (2000) Ukrain: a novel antitumor drug. *Drugs Exp Clin Res* 26:341-356
- [159] Wang AL, Tew KD (1985) Increased Glutathione-S-Transferase activity in a cell line with acquired resistance to nitrogen mustards. *Cancer Treat Rep* 69:677-682
- [160] Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace Jr AJ, Kohn KW, Fojo T, Bates SE, Rubenstein LV, Anderson NL, Buolamwini JK, Osdol van WW, Monks AP, Scudiero DA, Sausville EA, Zaharevitz DW, Bunow B, Viswanadhan VN, Johnson GS, Wittes RE, Paull KD (1997) An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 275:343-349
- [161] Whitacre CM, Zborowska E, Gordon NH, Mackay W, Berger NA (1997) Topotecan increases topoisomerase II alpha levels and sensitivity to treatment with etoposide in schedule-dependent process. *Cancer Res* 57:1425-1428
- [162] Wichtl M (1997) *Chelidonii herba*. In: *Teedrogen und Phytopharmaka*. Wiss Verl.-Ges, Stuttgart, 3.Aufl, 147-149
- [163] Wolff SN, Herzig RH, Fay JW, LeMaistre CF, Brown RA, Frei-Lahr D, Stranjord S, Giannone L, Coccia P, Weick JL, et al. (1990) High-dose N,N',N''-triethylthiophosphoramidate (thiotepa) with autologous bone marrow transplantation: phase I studies. *Semin Oncol* 17(1 Suppl 3):2-6
- [164] Wuerthwein G.; Simulationstool_eto; persöhl. Mitteilung (basierend auf: Wuerthwein G, Boos J (2001) Simulation tool for schedule-dependent etoposide exposure based on pharmacokinetic findings published in the literature. *Anticancer Drugs* 12:151)

- [165] Zamboni WC, Houghton PJ, Hulstein JL (1999) Relationship between tumour extracellular fluid exposure to topotecan and tumour response in human neuroblastoma xenograft and cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 43:269-276
- [166] Ziegler R (1999) Schöllkraut – Gallenmittel mit Nebenwirkungen. *VRZ Klinik Aktuell* 4(3):67-70

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. J. Boos danke ich für die Überlassung des Themas, für die Unterstützung meines Promotionsvorhabens und für seine wertvollen Anregungen.

Frau Dr. rer. nat. C. Lanvers-Kaminsky möchte ich für ihre engagierte Unterstützung zu jeder Zeit und für die Beratung bei der graphischen Auswertung der Daten danken.

Den Mitarbeitern des Labors für experimentelle Orthopädie/Zellbiologie der Klinik und Poliklinik für Allgemeine Orthopädie - besonders Herrn PD Dr. rer. nat. F. van Valen und Frau V. Eckervogt - danke ich für die Bereitstellung der Zelllinien, für die Erlaubnis, meine Testungen in ihrem Labor durchzuführen und für ihre exzellente technische Unterstützung.

Dorothea-Maria Nolting

