

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -

Untersuchungen zur In-vitro-Zytotoxizität der Substanzen
Etoposid, Vincristin, Gemcitabin, Cytarabin und STI 571
an vier humanen Ewing-Tumor-Zelllinien

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von Köster, Julia Daria

aus Münster

2005

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Boos

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Andreas Schuck

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2005

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
- Pädiatrische Hämatologie und Onkologie -
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Boos
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Andreas Schuck

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen zur In-vitro-Zytotoxizität der Substanzen
Etoposid, Vincristin, Gemcitabin, Cytarabin und STI 571
an vier humanen Ewing-Tumor-Zelllinien

Julia Daria Köster

Ewing-Tumore (ET) sind nach den Osteosarkomen die zweithäufigsten primär malignen Knochentumore im Kindesalter. Eine systemische Chemotherapie der ET gehört zum weltweiten Therapiestandard für alle Stadien. So können Überlebensraten von über 50 % erreicht werden. Patienten in fortgeschrittenen Stadien haben jedoch immer noch eine schlechte Prognose. Es ist deshalb wichtig, dass neue Medikamente und Therapiekonzepte gefunden werden. Zur Zeit gibt es kein offizielles In-vitro-Screening-Programm, in dem ET-Zelllinien systematisch untersucht werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der toxischen Wirkung der Substanzen Etoposid, Vincristin, Gemcitabin, Cytarabin und STI 571 an vier humanen ET-Zelllinien.

Es wurde versucht, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Welche Wirkung zeigen die klinisch bei ET wirksamen Substanzen Etoposid und Vincristin in vitro?
- Welche Wirkung zeigen die klinisch beim ET noch nicht getesteten Substanzen Gemcitabin, Cytarabin und STI 571 bei ET-Zelllinien in vitro, und können sie zu weiteren Untersuchungen empfohlen werden?
- Wird durch Koinkubation mit STI 571 die Wirkung der untersuchten Substanzen beeinflusst?

Im Versuch wurden Testkonzentrationen gewählt, die sich im mittleren Konzentrationsbereich an klinisch erreichbaren Plasmaspiegeln orientierten. Es wurde eine Gesamtrangliste für die Wirkung aller untersuchten Substanzen und die Sensibilität der einzelnen Zelllinien ermittelt.

Insgesamt reagierten die vier untersuchten Zelllinien unterschiedlich sensibel auf die verschiedenen Testsubstanzen. Die Zelllinien VH-64 und STA-ET-1 waren sensibler als die Zelllinien STA-ET-2.1 und CADO-ES-1.

Etoposid und Vincristin zeigten in klinisch erreichbaren Konzentrationen auch in vitro deutliche wachstumshemmende Effekte.

Mit Gemcitabin konnte eine deutliche Wachstumsreduktion in einem therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich beobachtet werden. Im Vergleich dazu benötigte Cytarabin wesentlich höhere Konzentrationen für eine vergleichbare Wirkung. Mit STI 571 wurden trotz Nachweis von c-KIT für alle untersuchten Zelllinien erst bei sehr hohen, therapeutisch bisher nicht erreichbaren Konzentrationen wachstumshemmende Effekte gesehen. In der Gesamtrangliste dieser Versuchsreihe lag Gemcitabin auf dem ersten Platz, gefolgt von Vincristin und Etoposid auf den Plätzen zwei und drei. STI 571 belegte den vierten und Cytarabin den fünften Platz.

Von den drei klinisch bei ET noch nicht untersuchten Substanzen kann nur Gemcitabin zu weiteren Untersuchungen bei ET empfohlen werden.

Die Kombination mit STI 571 hat die Wirkung der einzelnen Testsubstanzen beeinflusst. In Kombination mit STI 571 konnte an den untersuchten Zelllinien eine Wirkverstärkung der Substanzen Etoposid, Vincristin, Gemcitabin und Cytarabin beobachtet werden. Demnach könnte STI 571 in Kombination mit konventioneller Chemotherapie möglicherweise eine Therapieoption bei ET sein, die in weiterführenden präklinischen und klinischen Untersuchungen zu prüfen ist.

Herrn Prof. Dr. Joachim Boos danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung und Förderung der Arbeit.

Frau Dr. Claudia Lanvers-Kaminsky danke ich für die außerordentlich engagierte Betreuung und stete Ansprechbarkeit bei allen Fragen und Problemen.

Bei dem Team des Labors für experimentelle Orthopädie des Universitätsklinikums Münster, insbesondere Frau Vera Eckervogt, bedanke ich mich für die Einweisung und Unterstützung bei den Versuchen.

Meinem Freund Martin Schulkorf danke ich für seine Unterstützung, vor allem bei den Fragen und Problemen mit der Computersoftware.

Meiner Familie danke ich für die Motivation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	1
1.2	Familie der Ewing-Tumore	3
1.2.1	Ätiologie	3
1.2.2	Epidemiologie	3
1.2.3	Klinik, Lokalisation, Metastasierung	3
1.2.4	Histologie, Molekulargenetik, Diagnose	4
1.2.5	Stadieneinteilung	4
1.2.6	Therapie	4
1.2.6.1	Lokaltherapie	5
1.2.6.2	Chemotherapie	5
1.2.7	Prognose und prognostische Faktoren	7
1.3	P-Glykoprotein assoziierte Multi-Drug-Resistance	7
1.4	Protein-Tyrosinkinasen	9
1.5	Übersicht über die verwendeten Zytostatika	11
1.5.1	Auswahl der Substanzen	11
1.5.2	Etoposid	12
1.5.2.1	Wirkungsmechanismus	12
1.5.2.2	Pharmakokinetik	13
1.5.2.3	Nebenwirkungen	13
1.5.2.4	Indikation	14
1.5.2.5	Dosierung	14
1.5.3	Vincristin	15
1.5.3.1	Wirkmechanismus	15
1.5.3.2	Pharmakokinetik	15
1.5.3.3	Nebenwirkungen	16
1.5.3.4	Indikation	16
1.5.3.5	Dosierung	16
1.5.4	Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin, dFdC)	17
1.5.4.1	Wirkmechanismus	17
1.5.4.2	Pharmakokinetik von Gemcitabin	19
1.5.4.3	Nebenwirkungen	19
1.5.4.4	Indikation	20
1.5.4.5	Dosierung	20
1.5.5	Cytarabin (4-Amino-1-(β -D-arabinofuranosyl)-1H'-pyrimidin-2-on)	21

1.5.5.1	Wirkmechanismus	21
1.5.5.2	Pharmakokinetik	22
1.5.5.3	Nebenwirkungen	22
1.5.5.4	Indikation	23
1.5.5.5	Dosierung	23
1.5.6	STI 571	24
1.5.6.1	Wirkmechanismus	24
1.5.6.2	Pharmakokinetik	25
1.5.6.3	Nebenwirkungen	25
1.5.6.4	Indikation	25
1.5.6.5	Dosierung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Material	26
2.1.1	Lösungen und Reagenzien	26
2.1.2	Pipettier- und Zellkulturmaterial	27
2.1.3	Geräte	27
2.1.4	Testsubstanzen	28
2.1.5	Zelllinien	28
2.2	Methode	29
2.2.1	Versuchsreagenzien	29
2.2.1.1	Herstellung von 0,1 N Essigsäure (500 ml)	29
2.2.1.2	Herstellung der Collagen-Essigsäure	29
2.2.1.3	Herstellung der MTT-Lösung	29
2.2.1.4	Herstellung des Lyse-Reagenzes	29
2.2.2	Zellkultur	30
2.2.2.1	Beschichtung der Zellkulturplatten	30
2.2.2.2	Auftauen/ Einfrieren	30
2.2.2.3	Anzucht	30
2.2.2.4	Wachstumskurven	31
2.2.2.5	Passagieren mit Trypsinlösung / Erstellen der Zellsuspension	32
2.2.2.6	Passagieren der Stammkulturen	32
2.2.2.7	Aussiedeln der Zellen	32
2.2.3	Verdünnungsreihen	33
2.2.4	MTT- Test	35
2.2.4.1	Prinzip	35
2.2.4.2	Durchführung	35
2.2.5	Versuchsablauf	36

2.2.6	Datenverarbeitung	37
2.2.6.1	Allgemeine Statistik	37
2.2.6.2	GI ₅₀ -Wert	37
2.2.6.3	LC ₅₀ -Wert	38
2.2.6.4	Dosis-Wirkungskurven	38
2.2.7	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	39
3	Ergebnisse	42
3.1	In-vitro-Toxizitätsscreening	42
3.1.1	Inkubation mit Etoposid	43
3.1.2	Inkubation mit Vincristin	45
3.1.3	Inkubation mit Gemcitabin	47
3.1.4	Inkubation mit Cytarabin	49
3.1.5	Inkubation mit STI 571	51
3.1.6	Vergleich der antiproliferativen Wirkung der Testsubstanzen	53
3.1.7	Vergleich der Chemosensitivität der Zelllinien	56
3.1.8	Zusammenfassung der ermittelten GI ₅₀ -Werte und LC ₅₀ -Werte	58
3.2	Koinkubationsversuche	60
3.2.1	Etoposid in Kombination mit STI 571	62
3.2.2	Vincristin in Kombination mit STI 571	68
3.2.3	Gemcitabin in Kombination mit STI 571	73
3.2.4	Cytarabin in Kombination mit STI 571	79
4	Diskussion	85
4.1	Ist ein In-vitro-Zytotoxizitätsscreening bei Ewing-Tumoren sinnvoll?	85
4.2	Handelt es sich beim MTT-Assay um eine geeignete Methode?	87
4.3	Auswertung der ermittelten Ergebnisse	89
4.4	Welche Wirkung zeigen die getesteten Substanzen ?	90
4.4.1	Etoposid	90
4.4.2	Vincristin	93
4.4.3	Gemcitabin	95
4.4.4	Cytarabin	102
4.4.5	STI 571	105
4.4.6	Beeinflusst die Koinkubation mit STI 571 die Wirkung der Testsubstanzen ?	108
5	Zusammenfassung	111
6	Literaturverzeichnis	113

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
abl	Abelson leukemia virus, (Protoonkogen auf dem Chromosom 9)
ACT	Actinomycin D
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADR	Adriamycin
AG	Aktiengesellschaft
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AraC	Cytarabin
Ara-CTP	Arabinosylcytosintriphosphat
Ara-U	Uracil-Metabolit des Cytarabins
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
bcr	breakpoint cluster region, (Protoonkogen auf dem Chromosom 22)
BCR-ABL	Tyrosinkinase, Genprodukt des Philadelphiachromosoms
BFM-Protokoll	Berlin-Frankfurt-Münster-Protokoll
Bu	Busulfan
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Kohlenstoff
CA	Carcinoma (Karzinom)
ca.	circa
Cat. No.	Katalognummer
cm ²	Quadratzentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CO ₂	Kohlendioxid
CSF-1	colony stimulating factor-1
CYC	Cyclophosphamid
d	dies (Tag)
d.h.	das heißt
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
dFdC	2',2'-Difluordesoxycytidin, Gemcitabin
dFdCDP	Gemcitabindiphosphat
dFdCMP	Gemcitabinmonophosphat
dFdCTP	Gemcitabintriphosphat
dFdU	2'-deoxy-2',2'-difluoruridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DOX	Doxorubicin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EICESS	European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study

Abkürzung	Bedeutung
ES	Ewing-Sarkom
ET	Ewing-Tumor
et al.	et alii (und andere)
ETO	Etoposid
EURO-E.W.I.N.G. 99	EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups – Ewing Tumour Studies 1999
evtl.	eventuell
EWS-Gen	Ewing Sarkom Gen
Ex	Exon
FCS	Foetal Bovine Serum
FLI1-Gen	Friend leukemia virus integration site 1-Gen
G	Malignitätsgrad
g	Gramm
GI ₅₀	50%ige Wachstumshemmung, bezogen auf die Kontrolle des Messzeitpunkts
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GI _{STI50}	50%ige Wachstumshemmung, bezogen auf die Kontrolle mit STI 571 des Messzeitpunkts
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
gr	good response
h	hora (Stunde)
H ₂ O	Wasser
HDT	Hochdosistherapie
HL	Hodgkin Lymphom
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
IC ₅₀	50%ige Wachstumshemmung
IFO	Ifosfamid
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
KOF	Körperoberfläche
l	Liter
LC ₅₀	50%ige Wachstumshemmung, bezogen auf die Kontrolle am Tag Null
LC _{STI50}	50%ige Wachstumshemmung, bezogen auf die Kontrolle ohne STI 571 am Tag Null
log	Zehnerlogarithmus
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol / Liter
µMol	Mikromol
m ²	Quadratmeter
MCP-1	Monocyte-chemoattractant-protein-1
MDR	Multidrug-Resistance
mdr1-Gen	Multidrug-Resistance 1-Gen
Mel	Melphalan
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter

Abkürzung	Bedeutung
mM	Millimol / Liter
mm	Millimeter
mRNA	messenger-Ribonucleic acid (messenger-Ribonukleinsäure)
MTD	maximal tolerierte Dosis
MTT	3(4,5- Dimethylthiazol-2 yl)-2,5 diphenyl- Tetrazolium Bromid
NaCl	Natriumchlorid
NCI	National Cancer Institute
NHL	Non Hodgkin Lymphom
nM	Nanomol / Liter
No.	Nummer
NSE	Neuronen-spezifische Enolase
OH	Alkohol
OP	Operation
p53	Tumorsuppressor-Gen
PAS-Färbung/ Reaktion	Periodic Acid Schiff Färbung/ Reaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Saline)
PDGF	platelet-derived growth factor
Pgp	P-Glykoprotein
PNET	maligner peripherer neuroektodermaler Tumor
pr	poor response
proMACE-cytaBOM-Schema	Cyclophosphamid, Adriamycin, Etoposid, Prednison, Cytarabin, Bleomycin, Vincristin, Methotrexat
R1	Standardrisiko
R2	Hochrisiko
R3	experimentelle Gruppe
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPMI-Medium	Rosewell Park Memorial Institute - Medium
RT-PCR	reverse transcriptase - polymerase chain reaction (Reverse Transscriptase Polymerasekettenreaktion)
s.	siehe
s.c.	subkutan
SCF	stem-cell factor
SDS	Sodiumdodecylsulphate (Natriumdodecylsulfat)
SOP	Standardarbeitsanweisung
STI	Signal Transduction Inhibitor 571; Imatinibmesylat
STI 571	Signal Transduction Inhibitor 571; Imatinibmesylat
STS	soft tissue sarcoma, Weichteilsarkom
t	tempus (Zeit)
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TGFβ1	transforming growth factor-β1 (Transformierender Wachstumsfaktor β1)
TM	Trade Mark
TNM-Stadium	Tumorausbreitung (T)- Lymphknotenbefall (N)- Metastasierung (M)
TV	Tumolvolumen

Abkürzung	Bedeutung
UKM	Universitätsklinikum Münster
US	United States
VAC	Vincristin, Actinomycin, Cyclophosphamid
VAI	Vincristin, Actinomycin, Ifosfamid
VCR	Vincristin
VEGF	vascular endothelial growth factor (vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor)
vgl.	vergleiche
VIDE	Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin, Etoposid
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
Wo	Woche
XTT	Natrium-3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4 tetrazolium] -bis- (4-methoxy-6-nitro) benzolsulfonsäure
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung

Die Weltgesundheitsorganisation WHO schließt die Familie der Ewing-Tumore (ET) in die Gruppe der chemosensiblen Krebserkrankungen ein [113]. Wird die Erkrankung in einem frühen Stadium entdeckt und chemotherapeutisch sowie lokal behandelt, liegt die Langzeitüberlebensrate bei über 50 % [91;93]. Ohne Chemotherapie und bei Patienten im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium ist die Prognose wesentlich schlechter [21;93].

Seit Mitte der 80er Jahre führt das US National Cancer Institute (NCI) In-vitro-Screeningtests durch. Verschiedene Zelllinien der häufigsten Krebserkrankungen werden auf Chemosensibilität gegenüber unterschiedlichen zytotoxischen Substanzen untersucht. In diesem Screening werden ET nicht überprüft [10]. Zwar sind einzelne Screeningtests in der Literatur zu finden, dennoch gibt es zur Zeit kein In-vitro-Screening-Programm, in dem ET-Zelllinien systematisch untersucht werden [23;83]. Ein systematisches Screening ist jedoch sinnvoll und schliesst diese Lücke. Die Inzidenz der ET ist gering, die Zahl der therapeutisch wirksamen Medikamente ist begrenzt. Vornehmlich Kinder sind betroffen. Oft liegen keine Daten über den klinischen Einsatz der Medikamente bei Kindern vor. Viele Medikamente zeigen zahlreiche Nebenwirkungen, und es besteht das Risiko einer sekundären Tumorentwicklung. Es ist daher wichtig, eine Vorauswahl potentiell zytotoxisch wirksamer Substanzen in vitro zu treffen, die dann in nachfolgenden präklinischen und klinischen Studien weiter erprobt werden können.

Um eine erste Abschätzung des therapeutischen Potentials neuer Substanzen bei der Behandlung der ET zu ermöglichen, wurden parallel die bereits in der Therapie der ET erfolgreich etablierten Zytostatika Vincristin und Etoposid untersucht.

In der Therapie anderer solider Tumore, wie dem nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinom(CA) und Adeno-CA des Pankreas zeigte die neue Substanz Gemcitabin vielversprechende Erfolge [2;15;16;20;98;99]. Cytarabin wird zwar nicht in der Standardtherapie solider Tumoren eingesetzt, ist aber strukturell eng mit Gemcitabin verwandt und wurde deshalb in die Untersuchungen einbezogen [73].

STI 571 stellt ein völlig neues Konzept in der Krebstherapie dar. Die Substanz hemmt unter anderem die Tyrosinkinase ABL, BCR-ABL, c-ABL, c-ARG, platelet-derived growth factor (PDGF)-Rezeptor und c-KIT [28;44;58]. Bei verschiedenen ET-Zellen konnten die Tyrosinkinase c-ABL, c-ARG, PDGF-R α , PDGF-R β und c-KIT nachgewiesen werden [61;115]. STI 571 könnte daher auch bei ET wirksam sein.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der toxischen Wirkung der oben aufgeführten Substanzen unter folgenden Fragestellungen:

- Welche Wirkung zeigen die klinisch bei ET wirksamen Substanzen Etoposid und Vincristin in vitro?
- Welche Wirkung zeigen die klinisch beim ET noch nicht getesteten Substanzen Gemcitabin, Cytarabin und STI 571 bei Ewing-Zelllinien in vitro und können sie zu weiteren Untersuchungen empfohlen werden?
- In einem zweiten Schritt wurden die getesteten Substanzen mit STI 571 kombiniert. Die Frage lautet, ob durch Koinkubation mit STI 571 die Wirkung der untersuchten Substanzen beeinflusst wird.

1.2 Familie der Ewing-Tumore

1.2.1 Ätiologie

1921 erstmals vom Pathologen James Ewing beschrieben, wird die Familie der Ewing-Tumore (ET) heute in drei Subtypen unterteilt: Ewing-Sarkom (ES), atypisches Ewing-Sarkom und maligner peripherer neuroektodermaler Tumor (PNET) [25;34;110].

Allen ist ein charakteristisches Chromosom-22-Rearrangement gemeinsam [25].

Die Ätiologie ist noch unklar. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Gruppe von Entitäten neuroektodermaler Genese, die sich im Spektrum ihrer neuronalen Differenzierung unterscheiden [48;107].

1.2.2 Epidemiologie

Es handelt sich um eine seltene Tumorerkrankung, dennoch sind ET nach den Osteosarkomen die zweithäufigsten primär malignen Knochentumore im Kindesalter. Die jährliche altersstandardisierte Inzidenz der ET beträgt ca. 3 Fälle pro einer Million Bevölkerung im Alter unter 15 Jahren. Jugendliche in der ersten und zweiten Lebensdekade sind besonders häufig betroffen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 15 Jahren. Mit einer Verteilung von 1,5:1 besteht eine Prädisposition für das männliche Geschlecht [55].

1.2.3 Klinik, Lokalisation, Metastasierung

Die Erstsymptome sind unspezifisch. Lokaler oder generalisierter Schmerz, Schwellung sowie nachfolgender Funktionsverlust gehören zu den Leitsymptomen. Vor allem Tumore in Beckenlokalisation werden wegen geringer Beschwerden oft erst spät erkannt [94;95].

Manifestationsort der ET ist zumeist das Becken, gefolgt von den Diaphysen langer Röhrenknochen, allen voran Femur, Tibia und Fibula [55].

Oft verdecken benachbarte Körperhöhlen und / oder große Muskeln das Tumorwachstum, so dass viele Tumore bei Diagnosestellung über 100 ml Tumolvolumen aufweisen.

Die häufigsten Fernmetastasierungsorte sind Lunge, Knochen und Knochenmark [94].

Zur Zeit der Diagnosestellung können bei 20-25 % der Patienten bereits Fernmetastasen festgestellt werden [95].

1.2.4 Histologie, Molekulargenetik, Diagnose

ET gehören histologisch der Gruppe der klein-, blau- und rundzelligen Tumore an. Neuronale Marker werden nicht exprimiert. Das atypische ES unterscheidet sich durch eine großzellige Morphologie und / oder Expression neuronaler Marker. Im PNET müssen definitionsgemäß Homer-Wright-Rosetten und / oder mindestens zwei neuronale Marker nachweisbar sein [111].

Zu den neuronalen immunhistochemischen Markern zählen die Neuronen-spezifische Enolase (NSE), das Protein S-100, Synaptophysin, Chromogranin, Gliafaserprotein und die Antikörper Leu-7 und PGP_{9,5} [94;109].

In den meisten ET können Glykogen in der PAS-Färbung, Vimentin und das MIC-2-Genprodukt (CD 99) nachgewiesen werden [25;26;94].

Charakteristisch für ET ist ein typisches Chromosom-22-Rearrangement. Zumeist handelt es sich um eine t(11;22)-Translokation. In den übrigen Fällen ist eine t(21;22)- oder t(7;22)- Translokation beobachtet worden [25].

Beweisend für die Diagnose ET sind die typische Morphologie und immunhistochemischen Befunde sowie der Nachweis einer Translokation (t11;22)(q24;q12), t(21;22)(q22;q12) oder t(7;22)(p22;q12) im Tumorgewebe [94].

ET werden histopathologisch als hochmaligne (G3) klassifiziert [94].

1.2.5 Stadieneinteilung

Zur Zeit besteht keine einheitliche Definition der TNM-Stadien. Bei Diagnosestellung kann bei den meisten ET eine Weichteilkomponente nachgewiesen werden, während Lymphknotenmetastasen als Rarität gelten. Man unterscheidet daher zwischen lokoregionärer Erkrankung (Stadium II) und hämatogen disseminierter Erkrankung (Stadium IV) [95].

1.2.6 Therapie

Da ohne systemische Chemotherapie die 5-Jahres-Überlebensrate unter 10 % liegt, ist eine systemische Chemotherapie in Kombination mit Lokalthherapie weltweiter Therapiestandard für alle Stadien [95].

ET metastasieren frühzeitig, daher wird vor der Lokalthherapie eine mehrwöchige initiale Chemotherapie durchgeführt. Erst danach folgt eine Lokalthherapie. An diese schließt sich eine weitere Chemotherapie an. Die Gesamtdauer der Therapie erstreckt sich über ca. 10 Monate [94;95].

1.2.6.1 Lokaltherapie

Für eine erfolgreiche Therapie ist die Lokaltherapie essentiell. Es stehen verschiedene chirurgische und radiotherapeutische Alternativen zur Verfügung. Eine alleinige Radiotherapie birgt ein höheres Risiko für ein Lokalrezidiv, so dass bei resektablen Tumoren eine onkologisch vollständige Resektion durchgeführt wird. Bei nicht vollständig im Gesunden rezidierten Tumoren und / oder histologisch nachgewiesenem schlechten Ansprechen auf die präoperative Chemotherapie schließt sich eine Radiatio an. Primär nicht resektable Tumore werden nach Chemotherapie zunächst primär bestrahlt. Die Dosis der Radiatio liegt zwischen 44,8 und 60 Gray. Sie wird entsprechend der primären und / oder postoperativen Situation abhängig vom Alter des Patienten eingestellt [94;95].

1.2.6.2 Chemotherapie

Weltweit sind die Therapieprotokolle sehr ähnlich. In aktuellen Protokollen werden drei bis fünf Medikamente kombiniert [95]. Alkylierende Substanzen (Ifosfamid (IFO), Cyclophosphamid (CYC)) und Anthracycline (Doxorubicin (DOX), Synonym Adriamycin (ADR)) stehen an erster Stelle. Etoposid (ETO), Actinomycin D (ACT) und Vincaalkaloide (Vincristin (VCR)) gehören ebenfalls zu den häufig eingesetzten Substanzen. Methotrexat, Carboplatin oder Cisplatin sind weniger wirksam [94;95].

Die Hochdosistherapie (HDT) ist zum Einen in ihrer Wirksamkeit und zum Anderen toxisch bedingt begrenzt. Nur ein Teil der Patienten profitiert von der Hochdosistherapie. Es konnten verbesserte Überlebensprognosen bei Patienten mit primären Lungen- und Knochenmetastasen (5-Jahres-Überlebensrate 34% mit vs. 5% ohne HDT) und bei Patienten mit einem Frührezidiv (< 2 Jahre) (4-Jahres-Überlebensrate 17 % mit vs. 2 % ohne HDT) beobachtet werden. Daher ist es wichtig, auch nach neuen Therapiekonzepten zu forschen [37].

Die Abb. 1 gibt das aktuelle Therapieprotokoll der EURO-E.W.I.N.G. 99 -Studie wieder. Die Patienten werden entsprechend dem initialen Tumorstadium und histologischen Ansprechen in drei Gruppen unterteilt: Standardrisiko (R1), Hochrisiko (R2) und eine experimentelle Gruppe (R3) für Patienten mit Metastasen in Knochen, Knochenmark oder multifokaler Metastasierung [74;95].

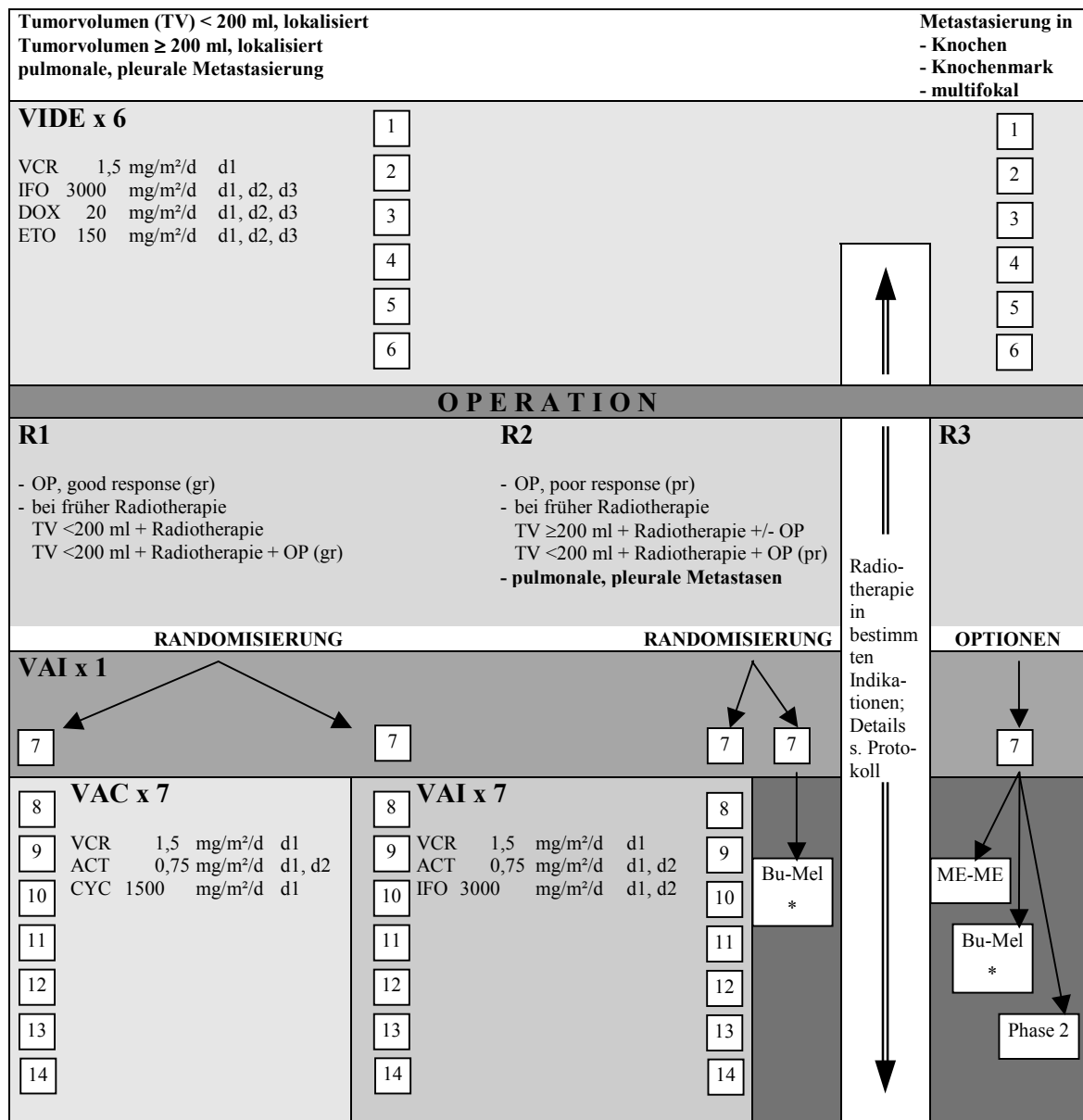


Abb. 1: EURO-E.W.I.N.G. 99, Therapieschema [74]

* kontraindiziert bei vorbestrahlten Tumoren des Körperstammes, keine R2-Randomisation

1.2.7 Prognose und prognostische Faktoren

Die Prognose erschließt sich aus der Ausbreitung des Tumors bei Diagnosestellung (Primärtumorvolumen und Dissemination) und dem Ansprechen des Tumors auf die Therapie [21;67;90].

Mit modernen Therapieschemata kann eine 5-Jahres-Überlebensrate bei lokalisierter Erkrankung von mehr als 50 % erreicht werden [67]. Bei rein pulmonaler / pleuraler Metastasierung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei ca. 36 % [90]. Patienten mit primären Metastasen, ungünstigem Ansprechen auf die Chemotherapie oder einem Tumorrezidiv haben eine schlechtere Prognose [93].

1.3 P-Glykoprotein assoziierte Multi-Drug-Resistance

Eines der Haupthindernisse für eine erfolgreiche Chemotherapie ist die Resistenz eines Tumors gegenüber den eingesetzten Zytostatika. Es sind mehrere Mechanismen zur Entwicklung einer unspezifischen Zytostatika-Resistenz, auch Multidrug-Resistance (MDR) genannt, bekannt. Bei der klassischen Form der MDR soll ein transmembranöses P-Glykoprotein (Pgp) die Substanzen verstärkt wieder aus der Zelle hinausbefördern. Es handelt sich um ein aktives ATP-abhängiges Transportprotein. Außerdem soll der Zytostatika-Influx mittels Pgp vermindert werden. Hieraus folgt eine Reduktion der Zytostatikaakkumulation in der Tumorzelle [45;47;103].

Pgp lässt sich auch in normalen Geweben, bevorzugt in diversen Transportepithelien wie z.B. adulten Nebennierenrindenzellen, renalen proximalen Tubulusepithelien, Dün- und Dickdarmmucosazellen und auch hämatopoetischen Stammzellen finden [18;36;123]. Dies weist auf eine Pgp-Funktion im Rahmen normaler Transport- und Sekretionsvorgänge hin. Dennoch ist die physiologische Funktion des Pgp noch weitgehend unklar. Es wird vermutet, dass es sich um einen Schutzmechanismus gegen toxische Substanzen handeln könnte. Weiterhin könnte Pgp eine Rolle bei der Steroidhormonsekretion und Regulation des Epithelzellvolumens spielen [18;36;123;127;128].

Ein Pgp-kodierendes Gen ist das *mdr1*-Gen [19]. Dieses ist in multidrugresistenten Zelllinien häufig nachweisbar. Auch in zwei der vier untersuchten Zelllinien konnte eine Pgp-Expression nachgewiesen werden.

Für zahlreiche Substanzen konnte ein Pgp-vermittelter Resistenzmechanismus gezeigt werden. Es handelt sich zumeist um hydrophobe Naturprodukte, sowie ihre semisynthetischen und synthetischen Analoga. Zu ihnen zählen u. a. die Vincaalkaloide wie z.B. Vincristin, die Anthracycline wie z.B. Doxorubicin und die Epidophyltoxine wie z.B. Etoposid [4;70].

Da viele der Pgp-Substrate Bestandteil pädiatrisch-onkologischer Therapieprotokolle sind, spielt die Pgp-assoziierte MDR eine wichtige Rolle für Resistenzentwicklungen bei kindlichen Tumorerkrankungen. In Gewebeproben von 21 Kindern mit ES fand sich eine signifikante Korrelation der histochemischen Detektion von Pgp mit dem morphologischen Chemotherapie-Response, sowie Tendenzen zu einer negativen Beeinflussung der Langzeitüberlebensrate [108].

In den letzten Jahren sind verschiedene Maßnahmen untersucht worden, um die klassische MDR zu überwinden. Dazu gehören ausweichende Therapien mdr1/Pgp-exprimierender Tumore mit Substanzen, bei denen dieser Resistenzmechanismus keine Rolle spielt. Zu diesen Substanzen zählen u.a. auch Antimetabolite, wie die in dieser Arbeit untersuchten Therapeutika Gemcitabin und Cytarabin.

Ein weiter Ansatz war der Einsatz sogenannter Chemosensitizer. Zu diesen gehören z.B. Calciumkanalblocker wie Verapamil, Calmodulin-Antagonisten, ProteinkinaseC-Inhibitoren, Immunsuppressiva wie Ciclosporin, Antibiotika und Surfactant [35]. Diese sensibilisieren die Pgp-exprimierenden Zellen, indem sie die hydrophobe Bindung der Zytostatika an Pgp hemmen oder selbst als Pgp-Substrat fungieren. Da aber auch gesunde Gewebe wie hämatopoetische Stammzellen Pgp exprimieren, zeigten Kombinationen von Pgp-Modulatoren mit Chemotherapie eine stark ausgeprägte Hämatotoxizität. Die Zytostatikadosierungen mussten deswegen deutlich reduziert werden, die erhofften Fortschritte konnten nicht erreicht werden [4;35;70;124].

Die Abb. 2 zeigt ein Modell des Pgp eingebettet in die Plasmamembran einer Tumorzelle. Mittels Hydrolyse eines ATP-Moleküls werden die Pgp-Substrate aktiv aus der Zelle entfernt [46;47].

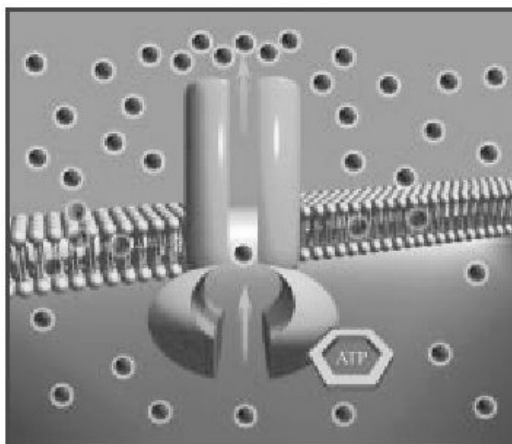


Abb. 2: Pgp-Modell [46;47]

1.4 Protein-Tyrosinkinasen

Proteinkinasen spielen als Teil von Signaltransduktionsketten eine wichtige Rolle in vielen zentralen biologischen Prozessen wie Zellwachstum, Stoffwechsel, Differenzierung und Apoptose. Tyrosinkinasen sind eine Untergruppe der Proteinkinasen. Sie binden ATP und übertragen Phosphatgruppen von ATP auf Tyrosinreste verschiedener Substrate. Die Deregulation von Protein-Tyrosinkinasen ist ein zentraler Faktor für abnormes Wachstum und Überleben von bösartigen Zellen. Protein-Tyrosinkinase-Inhibitoren hemmen Tyrosinkinasen und unterbrechen so diese deregulierten Signaltransduktionsketten [28;58].

Bei c-kit handelt es sich um ein Protoonkogen. Es befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 4 und codiert den transmembranösen Rezeptor c-KIT/CD 117. Dieser besitzt eine Tyrosinkinasekomponente, welche strukturelle Beziehungen zu dem PDGF-Rezeptor und dem clony stimulating factor-1-(CSF-1)-Rezeptor hat [143]. Der Ligand für c-KIT ist der Stammzellfaktor (stem cell factor (SCF)). Er kann in zwei Formen vorliegen. [5;62]. Die lösliche Form bindet an c-KIT und beeinflusst unter anderem Differenzierung, Migration, Zellüberleben und –proliferation [40]. Für die membrangebundene Form besteht die Hypothese, dass die Stabilität des c-KIT-Rezeptors verstärkt wird [86]. In einer Studie von Smithey et al. konnte c-KIT bei 71 % der untersuchten ET-Zelllinien beobachtet werden [115].

Die **Abb. 3** zeigt, dass bei allen in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien der c-KIT/CD 117-Rezeptor durchflusszytometrisch über einen Fluoreszenz-markierten Antikörper auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte. Mittels RT-PCR wurden für CADO-ES-1 die Tyrosinkinasen c-ABL, c-ARG, PDGF-R α und PDGF-R β und für VH-64 die Tyrosinkinasen c-ABL, c-ARG, und PDGF-R β belegt [61].

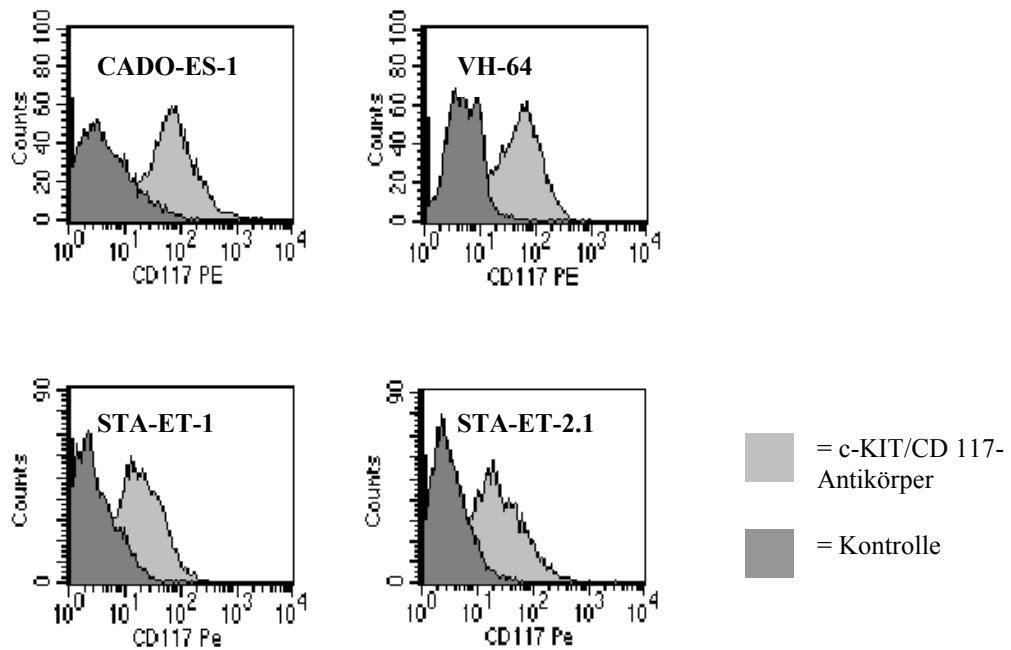


Abb. 3: Durchflusszytometrischer c-KIT/CD 117-Antikörper-Nachweis

1.5 Übersicht über die verwendeten Zytostatika

1.5.1 Auswahl der Substanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung verschiedener Substanzen am ET getestet und miteinander verglichen.

Zum Einen wurden Substanzen gewählt, die bereits erfolgreich in der ET-Therapie eingesetzt werden. Hierzu zählen Etoposid und Vincristin [74;95]. Zum Anderen wurden Substanzen gewählt, die noch nicht in der ET-Therapie eingesetzt werden, jedoch aufgrund ihres Wirkungsmechanismus und vielversprechender Ergebnisse klinischer Studien an anderen Tumoren eventuell auch zur Therapie des ET in Frage kommen.

Gemcitabin wurde untersucht, da die Substanz in der Therapie anderer solider Tumore wie dem nicht-kleinzelligen Bronchial-CA und Adeno-CA des Pankreas Wirksamkeit zeigte [2;15;16;20;98;99]. Gleichzeitig konnte die Lebensqualität bei Patienten mit infauster Prognose verbessert werden [13]. Außerdem ist Gemcitabin, anders als Etoposid und Vincristin, kein Pgp-Substrat [99]. Gemcitabin könnte daher eine Therapiealternative bei ET-Patienten mit Pgp-positiven Tumoren sein. Die Substanz Cytarabin wurde getestet, da sie strukturell eng mit Gemcitabin verwandt ist. Sie ist ebenfalls kein Pgp-Substrat. In der Therapie solider Tumore spielt sie wegen ihrer kurzen Halbwertszeit (HWZ) nur eine untergeordnete Rolle [73].

STI 571 stellt ein völlig neues Konzept in der Krebstherapie dar. Verschiedene Tyrosinkinasen wie z.B. ABL, BCR-ABL, c-ABL, c-ARG, PDGF-R und c-KIT werden mit niedrigen STI 571-Konzentrationen selektiv gehemmt [28;44;58]. Bei ET-Zellen konnten die Tyrosinkinasen c-KIT, c-ABL, c-ARG, PDGF-R α und PDGF-R β nachgewiesen werden [61;115]. Bei Patienten mit malignen Erkrankungen, die mit der Aktivierung der Tyrosinkinasen ABL, PDGF-R oder c-KIT assoziiert sind, zeigte der Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor STI 571 Wirksamkeit [30]. Dies führte zu der Annahme, dass STI 571 auch in der Therapie der ET eingesetzt werden könnte.

In der Literatur wurden Synergismen, additives und antagonistisches Zusammenspiel von STI 571 mit anderen Zytostatika beschrieben [68;75]. In einer zweiten Versuchsserie wurde untersucht, ob STI 571 die Wirkung der einzeln getesteten Substanzen moduliert. Die Testsubstanzen der ersten Versuchsreihe wurden hierzu mit STI 571 kokubiert.

1.5.2 Etoposid

In der Abb. 4 ist die Strukturformel von Etoposid dargestellt. Etoposid gehört zur Gruppe der Podophyllotoxinderivate [8]. Es ist ein Pgp-Substrat. In den aktuellen ET-Therapieprotokollen wird die Substanz in Kombination mit weiteren Zytostatika als Teil der Induktionstherapie eingesetzt. Ein Beispiel ist das VIDE-Schema, eine Kombination von Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und Etoposid (vgl. auch Abb. 1) [74]. Eine Hochdosistherapie mit Etoposid und autologem Stammzellrescue wird in klinischen Studien erprobt [37].

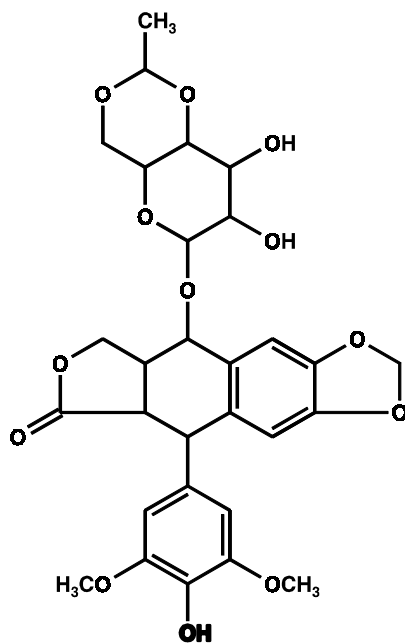


Abb. 4: Strukturformel Etoposid

1.5.2.1 Wirkungsmechanismus

Die Topoisomerase II ist ein DNA-Reparaturenzym. Etoposid hemmt die Topoisomerase II phasenspezifisch in der S- und G2-Phase der Mitose. Es werden DNA-Strangbrüche induziert, gleichzeitig findet eine Hemmung der DNA-Reparatur statt. Etoposid beeinflusst die Anordnung der Mikrotubuli nicht. In hohen Konzentrationen wirkt die Substanz auch auf ruhende Zellen zytotoxisch [8;131]. Weitere Wirkmechanismen sind die intrazelluläre Bildung freier Radikale, die Vernetzung der DNA mit Nucleoproteinen, Hemmung des Thymidineinbaus in die DNA und die Hemmung des Nucleosidtransportes in die Zelle [8].

1.5.2.2 Pharmakokinetik

Für Kinder kann die Kinetik von Etoposid als offenes Zweikompartimentmodell dargestellt werden. Nach i.v. Verabreichung steigt die Fläche unter der Konzentrations-Zeitkurve proportional mit der verabreichten Etoposid-Dosis an [140].

Bei Kindern wurden für Etoposid je nach eingesetzter Dosis verschiedene Plasmakonzentrationen ermittelt. So erreichte die Standarddosis von 150 mg/m², über zwei Stunden täglich, Plasmaspitzen Spiegel von 23,4 +/- 3,0 mg/l. Dabei wurden Konzentrationen von > 10 mg/l über 10,7 +/- 2,6 h, Konzentrationen von 1-10 mg/l über 37,2 +/- 8,4 h und Konzentrationen von < 1 mg/l über 47,9 +/- 9,8 h gemessen.

Die Steady-State-Konzentration lag unter i.v. Gabe über 96 h mit einer Gesamtdosis von 450 mg/m² Etoposid bei 3,4 +/- 0,7 mg/l.

Bei kontinuierlicher Infusion von 1800 mg/m² über vier Tage wurden Steady-State-Konzentrationen von 13,8 +/- 2,8 mg/l erreicht. Es zeigten sich 7,9 (+/- 2,6)-mal länger Konzentrationen von > 10 mg/l und 2,3 (+/- 0,4)-fach länger Konzentrationen < 1,0 mg/l, sowie eine um den Faktor 0,7 (+/- 0,8) kürzere Exposition für die Konzentrationen 1 - 10 mg/l gegenüber der Gabe von niedrigdosiertem Etoposid [140].

Kinder, die Etoposid im Rahmen der Hochdosistherapie erhalten hatten, erreichten eine Clearance von 15,5 ml/min per m² (+/- 30,6 %), der Anteil ungebundenen Etoposids lag im Median bei 7,0 % mit einer hohen Intra- und Intervariabilität [141].

Patienten mit eingeschränkter Leber- und / oder Nierenfunktion zeigten eine verlangsamte Plasmaclearance im Vergleich zu Patienten mit normaler Leber- und Nierenfunktion [131].

Im Plasma können neben unverändertem Etoposid geringfügige Konzentrationen eines cis-Laktons und des trans- und cis-Isomers von 4-Desmethylepipodophyllinsäure-9-(4,6-O-ethyliden-b-d-Glucopyranosid) nachgewiesen werden [131].

Etoposid ist liquorgängig. Die Liquorspiegel zeigen erhebliche individuelle Schwankungen. Sie liegen zwischen 0 und 14,3 % des korrespondierenden Plasmaspiegels [131].

1.5.2.3 Nebenwirkungen

Hauptnebenwirkungen sind akute Unverträglichkeitsreaktionen, Myelosuppression, Carcinogenität, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Alopezie [117].

1.5.2.4 Indikation

Im Rahmen von Kombinationschemotherapien wird Etoposid u. a. bei folgenden Tumorerkrankungen eingesetzt: ES, REL-EICESS, kleinzelliges-Bronchial-Ca, zur palliativen Therapie des fortgeschrittenen nicht-kleinzelligen Bronchial-CA, HL, NHL, AML im Kindes- und Erwachsenenalter, Hodentumore, Chorion-CA der Frau [95;131].

In Monotherapie wird Etoposid zur palliativen systemischen Behandlung fortgeschrittener Ovarial-CA nach Versagen von platinhaltigen Standardtherapien angewandt [131].

1.5.2.5 Dosierung

Die Dosierung ist abhängig von dem Therapieprotokoll, das sich für die jeweilige Erkrankung als wirksam erwiesen hat. Zumeist beträgt das Therapieintervall 3 – 4 Wochen. Es ist abhängig von der Erholung der hämatologischen Parameter (Leukozyten, Thrombozyten) [131].

Kinder und Erwachsene erhalten Etoposid in Dosierungen im Bereich von:

- täglich 50 – 100 mg Etoposid / m² Körperoberfläche (KOF) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen;
- oder täglich 120 – 150 mg Etoposid / m² KOF an den Tagen 1, 3 und 5 [131];
- Im Behandlungsprotokoll EURO-E.W.I.N.G. 99 (in VIDE- Kombination): 150mg/m²KOF als 1 – 2 h Infusion an den Tagen 1, 2, und 3 über 6 Wo. [74];
- Bei Hochrisikopatienten wird Etoposid als Bestandteil einer Hochdosistherapie in Kombination mit Stammzelltransplantation erprobt. Hier liegen die Etoposidkonzentrationen bei insgesamt 1800 mg/m² an den Tagen -6 bis -3 vor Stammzelltransplantation (Tag 0), das entspricht 450 mg/m²/d [74].

1.5.3 Vincristin

Die Abb. 5 zeigt die Strukturformel von Vincristin. In den aktuellen ET-Therapieprotokollen wird Vincristin in Kombination mit weiteren Substanzen eingesetzt. Hierzu zählen z.B. das VIDE (Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin, Etoposid)-, das VAI (Vincristin, Actinomycin, Ifosfamid)- oder das VAC (Vincristin, Actinomycin, Cyclophosphamid)- Schema [74;95]. Es handelt sich um ein Zytostatikum aus der Gruppe der Vincaalkaloide [8;134]. Auch Vincristin ist ein Pgp-Substrat.

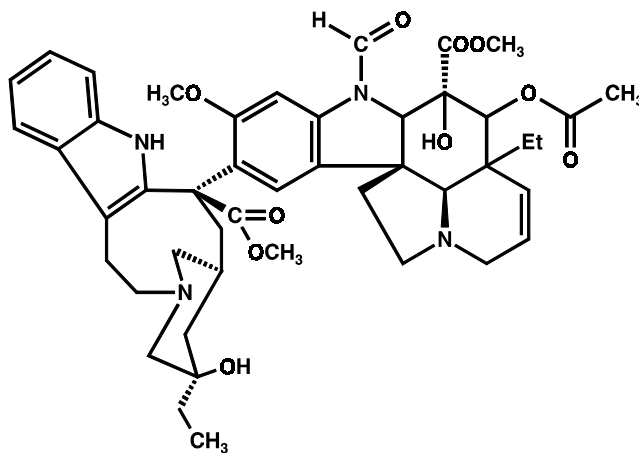


Abb. 5: Strukturformel Vincristin

1.5.3.1 Wirkmechanismus

Vincristin hemmt die Spindelapparaatbildung durch Zerstörung der Mikrotubuli, indem es an mikrotubuläre Proteine, vor allem Tubulin, bindet. So kommt es zur irreversiblen Hemmung der Zellteilung in der Metaphase der Mitose [8;134].

1.5.3.2 Pharmakokinetik

Gibt man Vincristin oral, so wird die Substanz so gut wie nicht resorbiert. Nach i.v. Gabe sind nach wenigen Minuten nur noch geringe Konzentrationen der verabreichten Vincristin-Dosis im Plasma nachzuweisen. Innerhalb von 15 - 30 Minuten nach der Injektion werden über 90 % der Substanz im Gewebe verteilt [134].

Die Gesamtkonzentration nimmt nach i.v. Applikation im Plasma triphasisch ab. Die initialen, mittleren und terminalen Halbwertszeiten liegen bei 5 min, 2,3 h und 85 h. Der Bereich für die terminale Halbwertszeit umfasst 19 - 155 h [134].

Nach i.v. Gabe werden in der Zerebrospinalflüssigkeit nur sehr geringe, therapeutisch unwirksame Konzentrationen nachgewiesen [134].

Vincristin wird zu 44 % an Plasmaproteine gebunden. Die Substanz wird größtenteils in der Leber metabolisiert. Die Elimination erfolgt zu ca. 80 % biliär. Über die Nieren werden bis zu 20 % der verabreichten Dosis innerhalb von 24 h unverändert bzw. in Form von Metaboliten ausgeschieden [134].

Zur Pharmakokinetik bei Kindern gibt es für Vincristin nur wenige Untersuchungen. Die Intra- und Interpatienten Variabilität ist groß [43]. In einer Studie wurde neu an ALL erkrankten Kindern ohne vorherige Chemotherapie 1,5 mg/m² Vincristin als Bolus gegeben. Es zeigte sich im Median (25te und 75te Perzentile) eine Gesamtkörperclearance von 228 (128 - 360) ml x min⁻¹ x m², eine AUC von 6,7 (4,2 - 12,3) mg x l⁻¹ x min⁻¹, eine Eliminations-HWZ $t_{1/2\alpha} = 6,6$ (6,1 - 7,5) min und $t_{1/2\beta} = 1001$ (737 - 1325) min, sowie ein Verteilungsvolumen im Steady-State von 262 (158 - 469) l/m² [49].

1.5.3.3 Nebenwirkungen

Zu den Hauptnebenwirkungen zählen eine ausgeprägte Neurotoxizität, das Syndrom der inadäquaten ADH-Sekretion, Stomatitis, Mucositis, Übelkeit, Erbrechen, Alopezie [117].

1.5.3.4 Indikation

In Kombination mit anderen onkologisch wirksamen Substanzen wird Vincristin u.a. bei folgenden Indikationen eingesetzt: Sarkomen (ES, osteogenes Sarkom, Rhabdomyosarkom), ALL, HL, NHL, metastasiertes Mamma-CA, kleinzelliges Bronchial-CA, Wilms-Tumor und Neuroblastom. Bei therapierefraktären, idiopathischen Thrombozytopenien (Morbus Werlhof) wird Vincristin als Monotherapie angewandt [134].

1.5.3.5 Dosierung

Die Dosis wird entsprechend der Indikation, dem angewendeten Kombinationschemotherapieplan und dem Zustand des Patienten individuell gewählt. Im Allgemeinen werden folgende Dosierungen angewandt:

Kinder:

- mit einem Gewicht bis zu 10 kg: 0,05 mg/kg Körpergewicht, i.v., 1/Wo. [134];
- mit einem Gewicht von 10 kg und mehr: 2 mg/m² KOF, i.v., 1/Wo. [134];
- EURO-E.W.I.N.G. 99 Therapieprotokoll: 1,5 mg/m² KOF; 1/Wo.[74];

Erwachsene:

- 1,4 mg/m² KOF, i.v., 1/Wo.;

Die maximale Dosis beträgt 2 mg pro Patient / Wo. [134].

1.5.4 Gemcitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin, dFdC)

Die Strukturformel der Substanz Gemcitabin wird in der Abb. 6 wiedergegeben. Gemcitabin gehört zur pharmakotherapeutischen Gruppe der Nukleosidanaloga. Es unterscheidet sich vom natürlichen Nukleosid Deoxycytidin durch 2 Fluoratome in der C₂-Position des Desoxyribosezuckers [42;99].

Die Strukturformel ist auch der des Cytarabin sehr ähnlich. Statt der zwei Fluoratome besitzt Cytarabin eine OH-Gruppe (vgl. auch Abb. 8 Strukturformel Cytarabin).

Gemcitabin ist kein Pgp-Substrat [99].

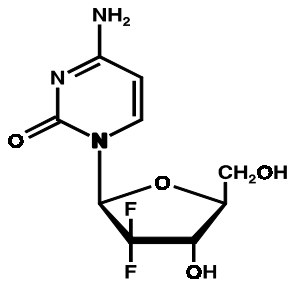


Abb. 6: Strukturformel Gemcitabin

1.5.4.1 Wirkmechanismus

Die Abb. 7 zeigt den Wirkmechanismus von Gemcitabin.

So wie natürliche Nukleoside wird auch Gemcitabin (dFdC) durch die Deoxycytidinkinase intrazellulär zu Gemcitabinmono-, -di- und -triphosphat (dFdCMP, dFdCDP und dFdCTP) metabolisiert [42;99]. Als aktive Metaboliten werden dFdCDP und dFdCTP angesehen [42].

Die zytotoxische Wirkung von Gemcitabin beruht hauptsächlich auf der Hemmung der DNA-Synthese. Der eine Metabolit (dFdCDP) blockiert die Ribonukleotidreduktase. Diese katalysiert die Reaktion, welche Deoxynukleosidtriphosphate für die DNA-Synthese liefert. So kommt es zu einer allgemeinen Reduktion der Konzentration von Deoxynukleosiden und im Speziellen von Deoxycytosintriphosphat (dCTP) (Abb. 7 Reaktion 1) [41;42;99].

Der andere Metabolit (dFdCTP) konkurriert mit dCTP um den Einbau in die DNA. Durch Reduktion des intrazellulären dCTP-Pools wird der Einbau von dFdCTP in die DNA verstärkt (Abb. 7 Reaktion 2).

Außerdem modifiziert die Minderung des dCTP-Pools die Aktivität der Deoxycytidinkinase. Diese wird im „Feedback“ durch dCTP gehemmt. Durch die Entleerung des Pools kommt es zum Fehlen dieser Feedback-Hemmung und gesteigerten Umsetzung von Gemcitabin (dFdC) zu dFdCMP und in Folge zu dFdCDP und dFdCTP (Abb. 7 Reaktion 3).

Weiterhin wird die dCMP-Deaminase beeinflusst. Wie dCTP wird dFdCMP ebenfalls durch die dCMP-Deaminase katabolisiert. Normalerweise findet durch dCTP eine Stimulation des Enzyms statt. Allerdings hebt die Reduktion des dCTP-Pools diese Wirkung auf (Abb. 7 Reaktion 4). Zusätzlich hemmt dFdCTP die Aktivität der dCMP-Deaminase (Abb. 7 Reaktion 5).

Durch die Blockierung der dCMP-Deaminase wird auch die verlangsamte Elimination von dFdCTP und somit anhaltende Hemmung der DNA-Synthese erklärt.

Ferner wird durch Gemcitabin auch die CTP-Synthetase blockiert, so dass die Synthese des natürlichen Substrats dCTP ebenfalls gehemmt wird (Abb. 7 Reaktion 6). In Folge dessen kommt es zu einer zusätzlichen Entleerung des dCTP-Vorrats und zu einer Hemmung der RNA-Synthese (Abb. 7 Reaktion 7). Weiterhin kann Gemcitabin selbst in geringem Ausmaß in die RNA eingebaut werden.

Nachdem dFdCTP in die DNA eingebaut wurde, erfolgt der Einbau eines weiteren Nukleotids. Dies wird „masked chain termination“ genannt. Es schützt Gemcitabin vor den korrekturlesenden Reparaturenzymen, so dass es nur schwer erkannt und kaum aus dem DNA-Strang wieder entfernt wird.

Im Prinzip bedeutet dieser Einbau von Gemcitabin eine vollständige Hemmung der weiteren DNA-Synthese, was zum Zelltod führt [41;42;63;99].

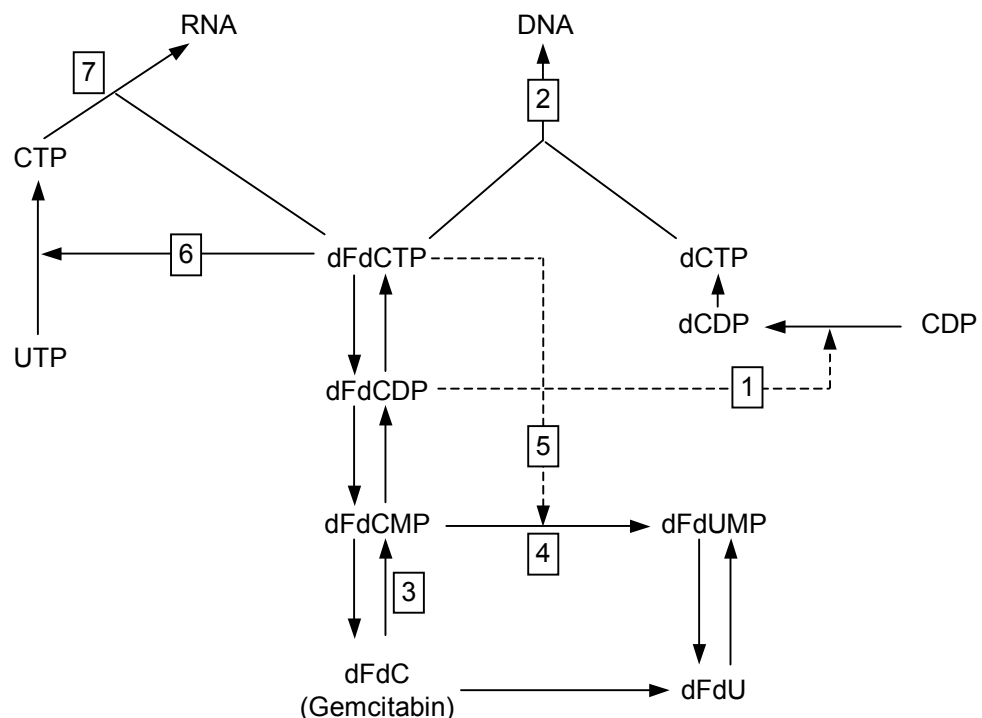


Abb. 7: Metabolismus und Wirkmechanismus von Gemcitabin; ----- = Inhibition; ——— = Reaktion [99]

1.5.4.2 Pharmakokinetik von Gemcitabin

Es gibt nur wenige Daten über den klinischen Einsatz von Gemcitabin bei Kindern.

In einer Phase-I-Studie wurde die Substanz bei Kindern mit soliden Tumoren untersucht. Die pharmakokinetischen Parameter nach Kurzinfusion von 1000 – 2100 mg/m² Gemcitabin über 30 min waren den bei Erwachsenen erhobenen Werten ähnlich. Die Plasmaverteilung und –elimination waren schnell. Für die meisten Patienten konnten sie mit einem offenen Zweikammermodell beschrieben werden. Die Hauptplasmaeliminations-HWZ lag bei 13,7 min. Die Clearance bei 2140 ml/min/m² (130 l/h/m²). Das Steady-State-Volumen lag im Median für Gemcitabin zwischen 11,5 - 27,5 l/m². Es wurden Gemcitabin-Plasmaspitzenpiegel im Median zwischen 14,0 - 49,0 µg/ml und dFdU-Plasmaspitzenpiegel im Median zwischen 31,0 - 86,4 µg/ml gemessen [104].

Gemcitabin wurde in einer anderen Studie an Kindern mit refraktären hämatologischen Erkrankungen untersucht. Sie erhielten Gemcitabin in einer Dosis von 10 mg/m²/min über 360 min pro Woche. Die Pharmakokinetik ließ sich hier mit einem Zweikompartmentmodell beschreiben mit einer terminalen HWZ von 62 min und einer Plasmaclearance von 2,2 l/min/m² [118].

Durch die Cytidineaminase wird Gemcitabin in der Leber, den Nieren, im Blut und weiteren Organen metabolisiert. Zu 91 % bis 98 % wird Gemcitabin in den primären Metabolit 2'-Deoxy-2',2'-difluoruridin (dFdU) umgewandelt. Dieser ist inaktiv und kommt sowohl im Plasma als auch im Urin vor. Bis 98 % Gemcitabin wird innerhalb einer Woche im Urin ausgeschieden. Davon liegen 99 % als dFdU vor. Von den intrazellulären Metaboliten (dFdCMP, dFdCDP und dFdCTP) wurden keine nachweisbaren Mengen im Plasma und im Urin gefunden [42].

1.5.4.2.1 Pharmakokinetik von dFdCTP

Der Metabolit dFdCTP wird in peripheren mononuklearen Blutzellen gefunden. Die terminale HWZ beträgt 0,7 – 12 Stunden. In Relation zur verabreichten Gemcitabindosis von 35 – 350 mg/m²/30 min steigen die intrazellulären Konzentrationen von dFdCTP. Eine intrazelluläre Sättigung von dFdCTP wurde bei Plasma-Konzentrationen von über 5 µg Gemcitabin / ml gesehen [42;50].

1.5.4.3 Nebenwirkungen

Die wichtigsten Nebenwirkungen sind Myelosuppression, Parästhesien, Abgeschlagenheit, psychische Dämpfung, Geschmacksveränderungen, Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Hämaturie, Proteinurie, Alopezie [104;117;118].

1.5.4.4 Indikation

Gemcitabin kommt in Kombinationstherapie beim Blasen-CA, nichtkleinzelligem Bronchial-CA und Adeno-CA des Pankreas zum Einsatz [42].

1.5.4.5 Dosierung

Kinder:

Zur Anwendung von Gemcitabin bei Kindern liegen zur Zeit kaum Informationen vor. Bei Kindern mit soliden Tumoren wurde die Substanz in einer Phase I Studie untersucht. Die maximal tolerierte Dosis (MTD) lag bei 1200 mg/m² als 30 min Infusion für drei Wochen alle vier Wochen bzw. 2100 mg/m² als 30 min Infusion für zwei Wochen alle vier Wochen. Haupttoxizität war die Myelosuppression. Andere schwere Nebenwirkungen waren Somnolenz, Fieber und Hypotension [104].

In einer anderen Phase-I-Studie wurde Gemcitabin an Kindern mit refraktären hämatologischen Erkrankungen untersucht. Die MTD lag bei 10 mg/m²/min über 360 min pro Woche in drei aufeinander folgenden Wochen (= 3600 mg/m²/Woche). Hepatotoxizität war die dosislimitierende Toxizität. 30 – 50 % der Kinder bekamen Fieber oder Myalgien [118].

Erwachsene:

- Blasen-CA (in Kombination mit Cisplatin):
1000 mg/m² KOF als 30 min. Infusion an den Tagen 1, 8 und 15 jedes 28-tägigen Behandlungszyklus. In Kombination mit Cisplatin 70 mg/m² KOF am Tag 2 jedes 28-tägigen Behandlungszyklus. Anschließend folgt eine Wiederholung des vierwöchigen Zyklus [42].
- Adeno-CA des Pankreas:
1000 mg/m² KOF als 30 min. i. v. Infusion 1/Wo. bis zu 7 Wo.
Es folgt 1 Wo. Therapiepause. Im Anschluss folgt ein Behandlungszyklus von 3 Wo. mit 1000 mg/m² KOF i.v., 1/Wo., dann eine therapiefreie Wo. [42].
- Bronchial-CA (in Kombination mit Cisplatin):
Entweder als dreiwöchiger Behandlungszyklus mit 1250 mg/m² KOF an den Tagen 1 und 8, als 30 min i.v. Infusion oder als vierwöchiger Behandlungszyklus mit 1000 mg/m² KOF an den Tagen 1, 8 und 15, als 30 min. i.v. Infusion [42].

1.5.5 Cytarabin (4-Amino-1-(β -D-arabinofuranosyl)-1H'-pyrimidin-2-on)

In der Abb. 8 ist die Strukturformel von Cytarabin abgebildet. Synonyme sind Cytosinarabinosid, Cytosin-Arabinosid, 1-Arabinofuranosylcytosin, oder AraC [3]. Wie Gemcitabin ist auch Cytarabin ein Zytostatikum aus der Gruppe der Nukleosidanaloga. Von dem natürlichen Nukleosid Deoxycytidin unterscheidet es sich nur durch die sterische Vertauschung der OH-Gruppe am C₂-Atom [3;8].

Mehrere Resistenzmechanismen sind für Cytarabin beschrieben worden. Dazu gehören eine Abnahme des Transports in die Zelle, die Abnahme der Aktivität der Deoxycytidinkinase, eine erhöhte Aktivität der Cytidineaminase, eine Zunahme der Ara-CTP-Dephosphorylation, eine Erhöhung des dCTP-Pools und eine Abnahme des Cytarabin-Einbaus in die DNA [1;9;79;120;133;138]. Cytarabin ist jedoch kein Pgp-Substrat.

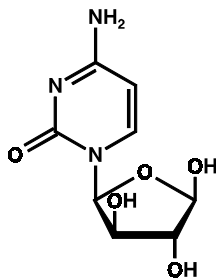


Abb. 8: Strukturformel Cytarabin

1.5.5.1 Wirkmechanismus

Cytarabin zählt zu den Pyrimidin-Antimetaboliten. Zunächst wird die Substanz intrazellulär in Arabinosylcytosintriphosphat (Ara-CTP) umgewandelt. Ara-CTP wirkt durch verschiedene Mechanismen zytotoxisch. Zum einen wird die DNA-Synthese beeinflusst. Durch Hemmung der DNA-Polymerase α mittels Ara-CTP kommt es zur Hemmung der DNA-De-novo-Synthese. Die Hemmung der DNA-Polymerase β durch Ara-CTP führt zur Hemmung der DNA-Reparatur. Außerdem wird Ara-CTP direkt in die DNA eingebaut. Dies führt während der Replikation zur ständigen Wiederholung einer bestimmten DNA-Sequenz. Des Weiteren wird das Zusammenfügen kleiner nativer DNA-Bruchstücke blockiert und die Kettenverlängerung beendet [3;8;38;71;80].

Zum anderen konnte eine starke Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase und eine allgemeine Hemmung der Glykolipid- und Glykoproteinsynthese beobachtet werden.

Insgesamt kommt es zur Dekompensation des Zellstoffwechsels, und die Zelle stirbt [3;8].

1.5.5.2 Pharmakokinetik

Charakteristisch für die Pharmakokinetik von Cytarabin ist die schnelle Elimination der Substanz aus dem Plasma. Nach i.v. Gabe erfolgt ein rascher und fast vollständiger Abbau durch die Cytidindesaminase in der Leber und in anderen Geweben zu dem inaktiven Uracil-Metaboliten Ara-U [3;119].

Bei Erwachsenen konnte nach einem Bolus von 100 mg/m² eine Plasmaspitzenkonzentration von 10 µM und eine Eliminations-HWZ von 7-20 min gemessen werden [114]. Bei Kindern mit ALL wurden nach einer konventionellen Dosis von 300 mg/m² als i.v. Infusion über 4 h Steady-State-Plasmakonzentrationen von 5 – 20 µM beobachtet [33]. Kinder, die Cytarabin hochdosiert mit 3000mg/m² als einstündige Kurzinfusion erhalten hatten, erreichten Plasmaspitzenkonzentrationen von 57 - 199 µM mit einer durchschnittlichen Plasmaspitzenkonzentrationen von 103 +/- 49 µM. Den Plasmaspitzenkonzentrationen folgte ein biexponentieller Abfall mit einer durchschnittlichen Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2\alpha} = 17$ min und einer durchschnittlichen terminalen Eliminationsphase von $t_{1/2\beta} = 4$ h. Außerdem wurden Ara-U-Spitzenkonzentrationen von durchschnittlich 501 +/- 123 µM mit einer Eliminationshalbwertszeit von $t_{1/2el} = 2,3 +/- 0,6$ h gemessen. Weiterhin wurden nach einem individuellen Bolus von 0,5 g/m² Cytarabin gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von im Mittel 130 mg/m²/h Steady-State-Plasmakonzentrationen von 20-35 µM erreicht [7].

Für Kinder konnten altersbezogene Unterschiede in der Pharmakokinetik gezeigt werden. Bei Kindern unter zwei Jahren führte eine reduzierte Cytidineaminasekapazität zu proportional höheren Cytarabin-Konzentrationen pro gegebener Dosis [97].

Zu 2 bis 20% wird Cytarabin an Plasmaeiweiße gebunden. Die Blut-Liquor-Schranke kann von Cytarabin überwunden werden. Ein Anteil von 10 bis 40 % der Plasmakonzentrationen wurde bei Dauerinfusionen im Liquor gefunden. Auf Grund der geringen Desaminaseaktivität im Zentralen Nervensystem (ZNS) wird Cytarabin relativ langsam mit einer Halbwertszeit von 2 bis 11 h aus dem Liquor eliminiert.

Die Elimination aus dem Plasma erfolgt hauptsächlich durch die Metabolisierung von Cytarabin. Nur 4 bis 10% der verabreichten konventionellen oder hohen Dosen werden als unverändertes Cytarabin renal ausgeschieden. In den ersten 24 Stunden finden sich 71 bis 96 % als Ara-U im Urin wieder [3].

1.5.5.3 Nebenwirkungen

Zu den Hauptnebenwirkungen in Standarddosierung gehören Myelosuppression, Übelkeit, Erbrechen und gastrointestinale Störungen. Hochdosiert treten vor allem akute ZNS-Toxizität, Hautreaktionen, Fieber, Anaphylaxie, Lungentoxizität, Conjunctivitis und Blepharitis auf [117].

1.5.5.4 Indikation

Zumeist wird Cytarabin in Kombination mit anderen Zytostatika angewandt. Indikationen sind akute, nichtlymphatische Leukämien bei Erwachsenen und Kindern, ALL bei Erwachsenen und Kindern, die intrathekalen Prophylaxe und Behandlung leukämischer Infiltrationen des Zentralnervensystems, NHL von intermediärem und hohem Malignitätsgrad im Erwachsenenalter, NHL im Kindesalter und die Behandlung eines Blastenschubs bei CML [3].

In der HDT wird Cytarabin bei refraktären NHL, refraktären akuten nichtlymphatischen Leukämien, refraktären akuten lymphoblastischen Leukämien, Rezidiven akuter Leukämien, Leukämien mit besonderem Risiko, sekundären Leukämien nach vorausgegangener Chemotherapie und / oder Bestrahlung, manifesten Leukämien nach Transformation von Präleukämien, zur Konsolidierung der Remission akuter, nichtlymphatischer Leukämien bei Patienten unter 60 Jahren und bei Blastenschub der CML eingesetzt [3].

1.5.5.5 Dosierung

Cytarabin wird meist im Rahmen von Polychemotherapien eingesetzt [3].

Zur Remissionsinduktion bei akuten Leukämien kommen Dosierungen von 100 bis 200 mg Cytarabin/m² KOF täglich, meist als kontinuierliche i.v. Infusion oder als Kurzinfusion für die Dauer von 5 bis 10 Tagen zum Einsatz [3].

Zur Remissionserhaltung werden Dosierungen von 70 bis 200 mg Cytarabin/m² KOF täglich als schnelle i.v. Injektion oder als s.c. Injektion an 5 Tagen im 4-Wochen-Abstand angewandt [3].

Zur Therapie der NHL werden bei Kindern, abhängig vom Krankheitsstadium und vom histologischen Typ, Dosierungen von 75 – 150 mg/m² KOF/d in Kombinationstherapie eingesetzt. Erwachsene erhalten z.B. im ProMACE-CytaBOM-Schema Cytarabin in einer Dosierung 300 mg/m² KOF am Tag 8 im jeweiligen Therapiezyklus [3].

In der HDT werden Dosierungen von 1000 bis 3000 mg/m² KOF als i.v. Infusion über 1 bis 3 h im Abstand von 12h für 4 bis 6 Tage verabreicht [3].

Zur intrathekalen Therapie werden Dosierungen von 5 bis 30 mg /m² KOF einmal alle 2 bis 7 Tage gegeben. Es besteht die Gefahr kumulativer Neurotoxizitäten.

Das Dosierungsintervall sollte bei intrathekaler Applikation 3 bis 5 Tage nicht unterschreiten [3].

1.5.6 STI 571

Die Abb. 9 zeigt die Strukturformel von STI 571. Es handelt sich um ein 2-Phenylaminopyrimidinderivat. Synonyme sind Imatinibmesylat, Imatinib, GlivecTM und GleevecTM, CGP57148B. Die Substanz gehört zur pharmakotherapeutischen Gruppe der Protein-Tyrosinkinase-Inhibitoren [44].

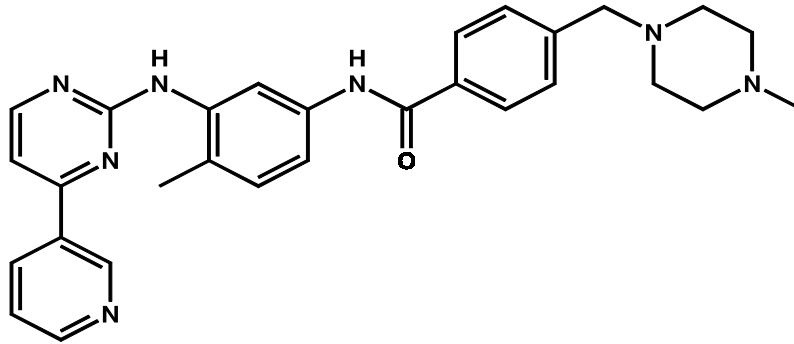


Abb. 9: Strukturformel STI 571

1.5.6.1 Wirkmechanismus

Der Protein-Tyrosinkinase-Inhibitor STI 571 hemmt spezifisch die Aktivität der Tyrosinkinasen ABL, BCR-ABL, c-ABL, c-ARG, PDGF-Rezeptor und c-KIT, so dass PDGF- und SCF vermittelte zelluläre Reaktionen inhibiert werden. Es kommt zur Hemmung der Proliferation und Induktion der Apoptose [11;28;44;54;88]. (Siehe auch Kapitel 1.4)

Die Abb. 10 zeigt ein Modell der Tyrosinkinase BCR-ABL und den Angriffspunkt des Tyrosinkinaseinhibitors STI 571 an der ATP-Bindungsstelle [82].

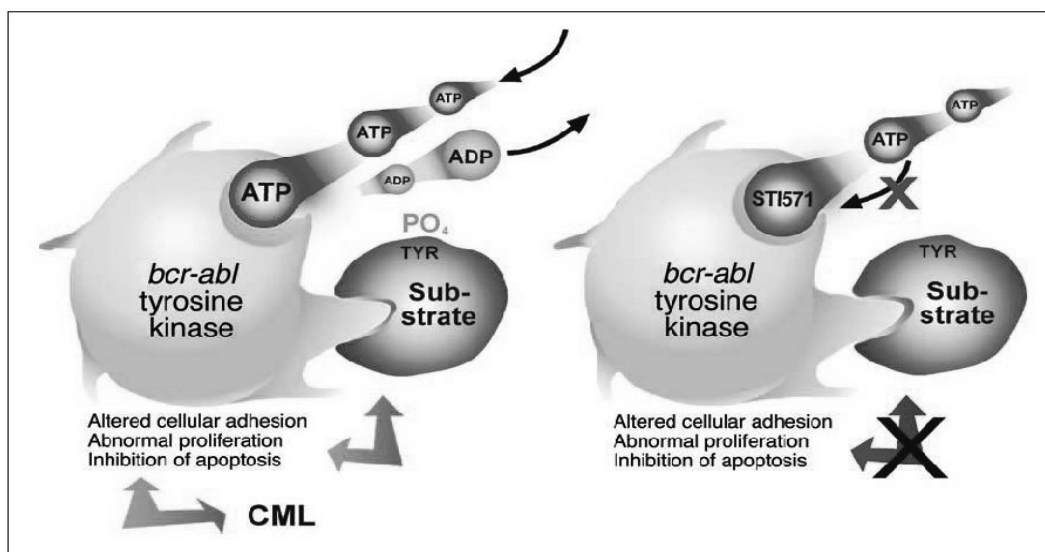


Abb. 10: Modell der Tyrosinkinase BCR-ABL [82]

1.5.6.2 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von STI 571 wurde an 83 Patienten mit Philadelphiachromosom positiver CML untersucht. Die Substanz wurde in Dosierungen von 25 bis 1000 mg verabreicht. Eine durchschnittliche Maximalkonzentration von 2,3 mg/ml (4,6 μ M) wurde unter Gleichgewichtskonzentration bei einmal täglicher Gabe von 400 mg STI 571 erreicht. Die HWZ lag zwischen 13 und 16 h [30].

Bei gesunden Probanden wurde STI 571 nach oraler Gabe schnell resorbiert. Die mittlere absolute Bioverfügbarkeit lag bei 98 %. In In-vitro-Experimenten betrug bei klinisch relevanten Konzentrationen die Plasmaproteinbindung ca. 95 %. Die Substanz war zum größten Teil an Albumin und α_1 -saurem Glykoprotein gebunden [44].

Beim Menschen zirkuliert überwiegend der Metabolit CGP74588. Dieser zeigte in vitro eine ähnliche Wirkung wie der unveränderte Wirkstoff. Die Plasma-AUC des Metaboliten lag bei nur 16 % der STI 571-Plasma-AUC [44].

Das humane P450 Enzym CYP3A4 zeigte sich in vitro verantwortlich für die Metabolisierung von STI 571. Nach oraler Gabe von 14 C-markiertem STI 571 wurden innerhalb von 7 Tagen 68 % der Dosis in den Faeces und 13 % der Dosis im Urin wiedergefunden. Davon waren 25 % der STI 571 Dosis unverändert, der übrige Anteil lag in Form von Metaboliten vor [44].

1.5.6.3 Nebenwirkungen

Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Neutropenie, Thrombozytopenie, Anämie, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Dyspepsie, Abdominalschmerzen, periorbitale Ödeme, Dermatitis / Ekzem / Hautausschlag, Muskelspasmen und Krämpfe, Schmerzen der Skelettmuskulatur, Gelenkschwellung, Flüssigkeitsretention, periphere Ödeme und Ermüdung [30;44].

1.5.6.4 Indikation

Zur Zeit wird STI 571 zur Behandlung von Erwachsenen mit Philadelphiachromosom positiver CML in der chronischen Phase nach Versagen einer Interferon-Alpha-Therapie, in der akzelerierten Phase oder in der Blastenkrise angewandt [44]. Außerdem wird STI 571 zur Behandlung KIT-(CD 117)-positiver nicht resezierbarer und / oder metastasierter GIST bei Erwachsenen eingesetzt [44].

1.5.6.5 Dosierung

Bei Kindern wird STI 571 bisher nicht angewandt. Bei erwachsenen Patienten werden je nach Erkrankung und Stadium oral Dosierungen von 400 – 600 mg/Tag gegeben [44].

2 Material und Methoden

2.1 Material

In den Tab. 1 - Tab. 4 sind die verwendeten Materialien und deren Herkunft aufgelistet

2.1.1 Lösungen und Reagenzien

Material	Herkunft
DMSO	Dimethylsulfoxid, Hybri Max, sterile; Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol 96 %	Apotheke der UKM; Münster
Nährmedium	RPMI 1640 Medium; GibcoBRL, Cat No.: 21875-034 + Antibiotic-Antimycotic; GibcoBRL, Cat No.: 15240-062 (Penicillin G sodium 10.000 Units/ml, Streptomycin sulphate 10.000 µg/ml, Amphotericin B als Fungizone® 25 µg/ml in 0,85 % NaCl (5,5 ml auf 500 ml)) + L-Glutamine (100x) 200 mM; GibcoBRL, Cat No.: 25030-024 + FCS (Foetal Bovine Serum) 50 ml; (10 % FSC Medium) GibcoBRL, Cat No.: 10108-165
Demineralisiertes Wasser	hergestellt mit Milli-Q-UF; Millipore Eschborn, Deutschland
Trypsin	Trypsin-EDTA-Solution 0,5 g Trypsin, 0,2 g EDTA pro Liter in PBS (1x) Lot-No.: H04121-254 PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Collagen	Collagen1 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
Essigsäure 99,5 %	Fluka, Chemie AG; Neu Ulm, Deutschland EEC No.: 2005807
MTT	3[4,5- Dimethylthiazol-2 yl]-2,5 diphenyl-tetrazoliumbromide Sigma, Deisenhofen, Deutschland; M2128, Lot.: 66H5033 5 mg MTT pro ml in PBS (Phosphatgepufferte Saline, pH 7,4) PBS Dulbecco`s, GibcoBRL
Lysepuffer	20 g SDS (Sodiumdodecylsulphate, Natriumdodecylsulfat); Sigma, Deisenhofen, Deutschland gelöst in 50 ml H ₂ O und 50 ml DMF (N,N-Dimethylformamid); Merck, Darmstadt, Deutschland

Tab. 1: Lösungen und Reagenzien

2.1.2 Pipettier- und Zellkulturmaterial

Material	Firma
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 TM 96, Tissue Culture Plate Falcon, Becton Dickinson Labware Order No. 353072
Zytostatika-Handschuhe	Nitrile 242 mm,
Einmalhandschuhe	Satin Plus AQL 1,5; SafeSkin GmbH, Neufahrn

Tab. 2: Pipettier- und Zellkulturmaterial

2.1.3 Geräte

Gerät	Firma
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, 5 % 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	Vakuumpumpe

Tab. 3: Geräte

2.1.4 Testsubstanzen

Testsubstanz	Firma
Etoposid	Reinsubstanz, Sigma Aldrich
Vincristin	Onco Hexal TM
Gemcitabin	Gemzar TM , Lilly Pharma Deutschland GmbH
Cytarabin	Alexan TM , Mack; Illert
STI 571	Reinsubstanz, Novartis

Tab. 4: Testsubstanzen

2.1.5 Zelllinien

Dr. rer. nat. F. van Valen, Labor für experimentelle Orthopädie Münster, hat die Kulturen VH-64, STAT-ET-1 und STAT-ET-2.1 freundlicherweise zur Verfügung gestellt [130].

Die Kultur CADO-ES-1 stammt aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland.

Durch durchflusszytometrische Bestimmung der Pgp-Expression und Nachweis der Pgp-mRNA-Expression erfolgte eine Quantifizierung der MDR der einzelnen Zelllinien.

In der Tab. 5 werden die Charakteristika der einzelnen Zelllinien zusammengefasst.

Zelllinie	CADO ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
Klassifikation	typische ES	typisches ES	PNET	PNET
Primärtumor	unbekannt	Metatarsus	Humerus	Fibula
Isolation aus	Lungenmetastase	Lungenmetastase	Primärtumor	Primärtumor
Generationszeit	35h	25,2h	40,7h	60h
Pgp-Expression	60%	2%	2%	20%
Zytogenetik	t(21;22)	t(11;22) (q24;q12)	t(11;22) (q24;q12)	del(22)(q12)
Molekulargenetik	EWS Ex7 / ERG Ex 6	EWS Ex7 / FLI-1 Ex 6	EWS Ex 7 / FLI-1 Ex 6	EWS Ex 9 / FLI-1 Ex 4

Tab. 5: Charakteristika der vier untersuchten Zelllinien

2.2 Methode

Es wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet nach der SOP (Standardarbeitsanweisung) für In-vitro-Zytotoxizität-Screening. (Version 1-2001, gültig vom 01.01.2001 bis zum 31.12.2001)

2.2.1 Versuchsreagenzien

2.2.1.1 Herstellung von 0,1 N Essigsäure (500 ml)

In einem 500 ml Messkolben wurden ca. 400 ml demineralisiertes Wasser vorgelegt und mit 2,95 ml konzentriertem Eisessig versetzt. Mit demineralisiertem Wasser wurde auf 500 ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µl Filter sterilfiltriert bzw. autoklaviert.

2.2.1.2 Herstellung der Collagen-Essigsäure

45 ml 0,1 N Essigsäure wurden in ein 50 ml Falcon-Tube gefüllt. Darauf wurden 1,5 ml Rattenschwanz Kollagen (46 mg/ ml) gegeben und beide Substanzen miteinander vermischt.

2.2.1.3 Herstellung der MTT-Lösung

250 mg MTT wurden in ein 50 ml Falcongefäß gegeben und mit 50 ml PBS-Puffer pH 7,4 gelöst.

2.2.1.4 Herstellung des Lyse-Reagenzes

100 g Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulphate (=SDS)) wurden in einen 1l-Erlenmeyerkolben überführt. Dann wurden getrennt je 250 ml demineralisiertes Wasser und Dimethylformamid zugegeben. Bis zur vollständigen Lösung des SDS wurde der Ansatz auf dem Magnetrührer gerührt. Zuletzt wurde die Lösung über einen Papierfilter in eine Braunglasflasche filtriert.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Beschichtung der Zellkulturplatten

In jede Vertiefung (Well) der 96-Loch-Zellkulturplatte wurden zunächst 50 µl Collagen-Essigsäure pipettiert. Die Platten wurden dann über Nacht, unter laufender Werkbank, getrocknet und anschließend mit den dazugehörigen Deckeln steril abgedeckt.

2.2.2.2 Auftauen/ Einfrieren

- Auftauen der Zellen

In einem 37 °C warmen Wasserbad wurden die Kryotubes mit den eingefrorenen Zellen rasch aufgetaut. Anschließend wurde der Inhalt in 5 ml Medium pipettiert und bei 1200 rpm für 5 min. bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellsuspension wurde in 8 ml Nährmedium aufgenommen und in 25 cm³ Zellkulturflaschen überführt.

- Kryokonservierung der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen zunächst in einem Gemisch aus 10 % DMSO, 10 % FCS und 80 % RPMI Medium überführt. Darauf wurden die Zellen in einem Zeitraum von 16 - 24 h langsam von Raumtemperatur auf -80 °C heruntergekühlt. Erst dann wurden sie in flüssigem Stickstoff auf eine Temperatur von -198 °C gebracht.

2.2.2.3 Anzucht

Die Zellkulturstämme wurden in 25 cm³ Zellkulturflaschen bei 37 °C in 5 %-iger CO₂-Atmosphäre im CO₂-Begasungsbrutschrank gezüchtet. Die Zellen wuchsen adhärent auf dem mit Collagen beschichteten Boden der Zellkulturflasche. Als Nährmedium wurde RPMI 1640-Medium versetzt mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin, dem Antimycoticum Amphotericin, L-Glutamin und fetalem Kälberserum eingesetzt (vgl. Tab. 1). Dem Wachstumsverhalten der einzelnen Zelllinien entsprechend, wurden die Stöcke regelmäßig geteilt (vgl. Tab. 6).

2.2.2.4 Wachstumskurven

Es ist wichtig, dass sich die Zellen während des Beobachtungszeitraumes in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Bei Inkubationsbeginn sollten ausreichend stoffwechselaktive Zellen im Ansatz sein, damit eine Reduktion der stoffwechselaktiven Zellen durch die Behandlung sicher erfasst werden kann. Andererseits sollten nicht zu viele Zellen ausgesiedelt werden, um während der Versuche ein exponentielles Wachstum der Zellen zu gewährleisten.

Um die für die Versuche optimalen Bedingungen zu ermitteln, wurden vor den Versuchen für jede Zelllinie Wachstumskurven unter verschiedenen Bedingungen erstellt.

Insgesamt wurden drei Versuchsbedingungen (A, B, C) geprüft.

Zunächst wurden für alle drei Versuchsbedingungen 96-Wellplatten zu einer Hälfte mit 2500 und zur andere Hälfte mit 5000 Zellen pro Well einer Zelllinie in 100 µl Zellkulturmedium resuspendiert belegt.

In der Versuchsreihe A wurde kein weiteres Medium hinzugegeben. In dem Versuchsaufbau B wurden zusätzlich 100 µl Medium in jede Vertiefung der Platten pipettiert. Bei der Testreihe C wurde das alte Medium am jeweiligen Messtag vor dem MTT-Test abgesaugt und durch 100 µl frisches Medium ersetzt.

Nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h und 144 h wurde ein MTT-Test durchgeführt.

Die Zellen zeigten unter den Bedingungen der Versuchsreihen A und B sowohl mit 100 µl als auch mit 200 µl Medium ein optimales Wachstumsverhalten. Das Absaugen des Zellkulturmediums bei der Versuchsreihe C erhöhte den Variationskoeffizienten auf teilweise über 25 %, da beim Absaugen offenbar in unterschiedlichem Ausmaß Zellen mit abgesaugt wurden. Für die Durchführung der Experimente wurde das Verfahren nach der Testreihe B zu Grunde gelegt.

Aus den Wachstumskurven der Versuchsbedingung B wurde die optimale Zellkonzentration / Well bestimmt. Die Werte wurden in der Tab. 6 wiedergegeben.

Da die Zellen nicht unmittelbar nach ihrer Adhäsion in eine exponentielle Proliferationsphase eintreten, wurden die Testsubstanzen in den In-vitro-Toxizitätsversuchen erst nach 72h zugesetzt.

Zelllinie	Teilungsschema	optimale Zellkonzentration (Zellen/Well)
CADO-ES-1	1: 5 bzw. 1: 7; 2x/ Woche	ca. 3000
VH-64	1:25 alle 4d oder 1:15 alle 3d	ca. 3000
STAT-ET-1	1:10; 2x/ Woche	ca. 6000
STAT-ET-2.1	1:7 bzw. 1:10; 2x/Woche	ca. 9000

Tab. 6: Teilungsschema und Optimale Zellkonzentrationen pro Well der untersuchten Zelllinien

2.2.2.5 Passagieren mit Trypsinlösung / Erstellen der Zellsuspension

Nach Absaugen des alten Mediums wurde ca. 1 ml Trypsinlösung pro 25 cm² (bei CADO-ES-1 ca. 1,5 ml Trypsinlösung pro 25 cm²) auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturflasche wurde kurz geschwenkt, so dass sich die Trypsinlösung gleichmäßig verteilen konnte. Danach wurde die Lösung abgenommen und die Flasche für ca. 5 min. in den Inkubator gestellt. Es kam zur Ablösung der Zellen. Dies wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Durch Schütteln der Kulturflasche wurde die Ablösung der Zellen vom Collagen-beschichteten Flaschenboden vervollständigt. Die Zellen wurden nun mit 5 ml Medium vom Flaschenboden gespült, gleichzeitig wurde die Trypsinlösung durch das Medium neutralisiert. Anschließend wurden die Zellen entweder passagiert oder geteilt oder für die Versuche auf 96 Loch-Platten ausgesiedelt.

2.2.2.6 Passagieren der Stammkulturen

Entsprechend dem Schema, dargestellt in Tab. 6, wurde nach dem Passagieren mit Trypsinlösung der entsprechende Anteil der Zellsuspension (z.B. 1/5 der Zellsuspension von CADO-ES-1 in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit frischem Medium auf das gewünschte Gesamtvolumen von 8 ml aufgefüllt. Das optimale Teilungsschema war aus Vorversuchen bekannt. Die passagierten Zellen wurden wieder in den Inkubator gestellt.

2.2.2.7 Aussiedeln der Zellen

Nach Passagieren mit Trypsinlösung wurde mit Hilfe des Coulter Counters die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmt. Anschließend wurde das Volumen an Zellsuspension berechnet, welches die für die Versuche benötigte Zellzahl enthielt. Das errechnete Volumen Zellsuspension wurde in ein steriles Gefäß gegeben und mit Medium auf das für den Versuch benötigte Gesamtvolumen aufgefüllt und gut resuspendiert.

Anschließend wurden 100 µl Zellsuspension in die mit Collagen beschichtete 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Die Tab. 6 gibt die optimale Zellzahl pro Well wieder.

2.2.3 Verdünnungsreihen

Etoposid und STI 571 lagen als Reinsubstanzen vor. STI 571 und Etoposid wurden in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Konzentration der STI 571 Stammlösung betrug 10 mM. Etoposid wurde zu einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Vincristin, Gemcitabin und Cytarabin wurden entsprechend der Anweisungen der Hersteller in demineralisiertem Wasser gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für jede Versuchsreihe wurde ein neues Aliquot aufgetaut.

Die Verdünnungsreihen wurden aus der jeweiligen Stammlösung durch Zugabe von Zellkulturmedium hergestellt.

Zuerst wurden die Stammlösungen mit Medium auf die für den Versuch benötigte Höchstkonzentration verdünnt. Die weiteren benötigten Konzentrationen wurden dann aus den Stammlösungsverdünnungen durch weitere Verdünnung mit Medium erstellt. Die Verdünnungsreihen wurden für jeden Versuch neu zubereitet und eingefroren. Zu Versuchsbeginn wurden die Prüfsubstanzen langsam auf Raumtemperatur erwärmt.

Da in den Vertiefungen durch das Aussiedeln schon 100 μl Zellsuspension vorgelegt waren und für die Expositionen mit einer Prüfsubstanz ein Volumen von 100 μl hinzugegeben wurde, wurden die Verdünnungsreihen doppelt konzentriert angesetzt. Für die Koinkubationen mit 2 Prüfsubstanzen, die jeweils in einem Volumen von 50 μl zugesetzt wurden, wurden die Verdünnungsreihen 4-fach konzentriert angesetzt. Durch Vermischen mit dem Medium der Zellsuspension erhielt man dann die gewünschte Versuchskonzentration.

In der ersten Versuchsserie wurden die Wirkungen von zehn verschiedenen Konzentrationen fünf unterschiedlicher Monozytostatikaverdünnungen mit jeweils zwei Kontrollen verglichen. Die eine Kontrolle enthielt ausschließlich Zellkulturmedium, die andere Zellkulturmedium und Lösungsmittel, in dem die Prüfsubstanz gelöst wurde. Die Konzentration des Lösungsmittels entsprach der höchsten Lösungsmittelkonzentration der jeweiligen Testsubstanz. Da Gemcitabin und Cytarabin bei den anfangs gewählten Konzentrationen starke antiproliferative Effekte zeigten, wurde der Versuch in niedrigerer Dosierung mit fünf verschiedenen Konzentrationen wiederholt. Diese Testreihe diente gleichzeitig dem Nachweis der Reproduzierbarkeit. Vier der zehn Konzentrationen der Testsubstanz STI 571 wurden ebenfalls ein zweites Mal untersucht. Die zweite Versuchreihe diente dem Vergleich vier unterschiedlicher Monozytostatikaverdünnungen ohne, und in Kombination mit STI 571. Hierzu wurden die untersuchten Zelllinien mit fünf verschiedenen Konzentrationen einer Monozytostatikaverdünnung in Kombination mit STI 571 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert.

STI 571 wurde in den Konzentrationen 0,1 μM bzw. 1,0 μM eingesetzt. Beide Dosierungen hatten in der ersten Versuchsserie keine antiproliferativen Effekte gezeigt.

In den Kontrollen der zweiten Versuchsreihe befanden sich Zellkulturmedium und die jeweils eingesetzte STI 571 Konzentration. Die Zelllinien CADO-ES-1 und VH-64 erwiesen sich schon bei niedriger Dosierung der Testsubstanz Cytarabin sensibel, so dass bei STA-ET-1 und STA-ET-2.1 ein niedrigeres Konzentrationsspektrum getestet wurde.

In der Tab. 7 sind die Charakteristika der Stammlösungen dargestellt.

Die Tab. 8 und die Tab. 9 geben die Konzentrationsspektren der Versuchsreihen wieder.

Testsubstanz	Molgewicht [g/mol]	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung
Etoposid	588,6	demineralisiertes H ₂ O	10 mg/ml
Vincristin	923	DMSO	1,0 mg/ml
Gemcitabin	263,2	demineralisiertes H ₂ O	40 mg/ml
Cytarabin	243,2	demineralisiertes H ₂ O	20 mg/ml
STI 571	589,72	DMSO	10 mM

Tab. 7: Charakteristika der Stammlösungen

Testsubstanz	untersuchte Konzentrationen [μ M]									
Etoposid	0,100	0,250	0,500	1,00	2,50	5,00	10,0	25,0	50,0	100
Vincristin	0,050	0,125	0,250	0,500	1,25	2,50	5,00	12,5	25,0	50,0
Gemcitabin	1,00	2,50	5,00	10,0	25,0	50,0	100	250	500	1000
Gemcitabin Wiederholung	0,050	0,100	0,250	0,500	1,00					
Cytarabin	1,15	2,88	5,75	11,5	28,8	57,5	115	288	575	1150
Cytarabin Wiederholung	0,058	0,115	0,288	0,575	1,15					
STI 571	0,100	0,250	0,500	1,00	2,50	5,00	10,0	25,0	50,0	100
STI 571 Wiederholung	0,100	1,00	10,0	100						

Tab. 8: Übersicht über die untersuchten Konzentrationen der Testsubstanzen der Monoinkubationsversuche

Testsubstanz	untersuchte Konzentrationen [μ M]				
Etoposid	0,100	1,00	10,0	100	250
Vincristin	0,050	0,500	5,00	50,0	100
Gemcitabin	0,010	0,100	1,00	10,0	100
Cytarabin (CADO-ES-1, VH-64)	0,115	1,15	11,5	115	1150
Cytarabin (STA-ET-1 STA-ET-2.1)	0,0115	0,115	1,15	11,5,0	115

Tab. 9: Übersicht über die untersuchten Konzentrationen der Testsubstanzen der Koinkubationsversuche mit STI 571 in 0,1 μ M und 1,0 μ M Konzentration

2.2.4 MTT- Test

2.2.4.1 Prinzip

Mit Hilfe des MTT- Tests wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen lebender Zellen gemessen.

Zunächst dringt das gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT) in die Zelle ein und gelangt in die Mitochondrien. Dort wird sein Tetrazoliumring aktiv mittels mitochondrialer Dehydrogenasen geöffnet, so dass das dunkelblaue, alkohollösliche Formazan entsteht. Anschließend wird das Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) hinzugegeben. Dies dient der Zelllyse und der Auflösung des Formazans. Die Intensität der alkoholischen Formazanlösung kann nun photometrisch bestimmt werden. Sie ist direkt proportional zu der Anzahl der lebenden Zellen in dem untersuchten Material.

2.2.4.2 Durchführung

An den jeweiligen Messzeitpunkten wurde in jede Vertiefung der Platte 20 µl MTT-Lösung zusätzlich zu der schon vorhandenen Flüssigkeit von 200 µl, pipettiert. Zu den Ansätzen mit 100 µl vorgelegtem Volumen wurden nur 10 µl MTT- Lösung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 h, bei 37 ° im Inkubator, wurde der Überstand mittels Unterdruck mit einer sterilen Pasteurpipette aus den einzelnen Wells abgesaugt. Danach wurde in jedes Well 100 µl Lysereagenz pipettiert und die Platten zur Auflösung der Zellmembranen und der Formazankristalle auf dem Rüttler geschüttelt. Nach vollständiger Lösung der Formazankristalle wurde die Extinktion der Farbstofflösung auf den Platten photometrisch bestimmt.

2.2.5 **Versuchsablauf**

Es wurden zwei verschiedene Versuchsserien durchgeführt. In der ersten wurden fünf unterschiedliche Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen mit einer Kontrolle verglichen. Die zweite Versuchsserie diente dem Vergleich vier unterschiedlicher Monozytostatikaverdünnungsreihen ohne und in Kombination mit STI 571.

Zunächst wurde die für den Versuch benötigte Zellzahl in 100 µl Zellsuspension auf 96-Loch-Zellkulturplatten ausgesiedelt. Eine Inkubationszeit von 72 h im Brutschrank ermöglichte die Adhäsion der Zellen und den Übergang der Zellen in eine exponentielle Wachstumsphase. So wurde auch sichergestellt, dass sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befanden. Nach 72 h erfolgte das Belegen der Platten.

In der ersten Versuchsreihe wurden die Platten mit je 100 µl Zytostatikaverdünnung pro Vertiefung belegt. Jeder Versuch wurde im vierfachen Ansatz durchgeführt.

In der zweiten Versuchsreihe wurde eine Kombination von zwei Substanzen auf die Platten gegeben. Die Platten wurden zunächst mit 50 µl pro Vertiefung einer fixen STI 571-Konzentration belegt. Zusätzlich wurden weitere 50 µl pro Vertiefung einer weiteren Testsubstanz in fünf verschiedenen Konzentrationen auf die Platten gegeben.

Anschließend wurde am gleichen Tag (0 h), nach 24 h, 48 h, 72 h und nach 96 h ein MTT- Test durchgeführt. So wurde der Anteil stoffwechselaktiver Zellen ermittelt.

2.2.6 Datenverarbeitung

2.2.6.1 Allgemeine Statistik

Bei jedem Versuch wurden für jede Konzentration, zu jedem Messzeitpunkt vier Messwerte ($n = 4$) erhoben. Der Mittelwert, die Standardabweichung und der Variationskoeffizient wurden aus den vier Messwerten berechnet.

2.2.6.2 GI_{50} -Wert

Bei dem GI_{50} -Wert handelt es sich um die Konzentration, bei der eine 50 %-ige Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle am jeweiligen Messzeitpunkt zu verzeichnen war.

Die Werte können zum Einen direkt aus den Graphen abgelesen, zum Anderen mit folgenden Formeln berechnet werden:

Die Gleichung einer Geraden im logarithmischen Diagramm lautet

$$y = m \cdot \log(x) + b.$$

Die Steigung m errechnet sich mit zwei Punkten (x_1/y_1) und (x_2/y_2) zu

$$m = \frac{y_1 - y_2}{\log(x_1) - \log(x_2)}.$$

Der GI_{50} -Wert entspricht dem x -Wert, wenn y den Wert 50 annimmt ($y_{50}=50$). Aus der umgestellten Geradengleichung ergibt sich

$$GI_{50} = 10^{\frac{\log(x_1) \cdot y_1 - y_{50}}{m}},$$

oder nur als Funktion der abgelesenen Punkte (x_1/y_1) und (x_2/y_2) :

$$GI_{50} = 10^{\frac{\log(x_1) - \frac{y_1 - y_{50}}{y_1 - y_2} [\log(x_1) - \log(x_2)]}{m}}.$$

Da die Graphen in einem logarithmischen Diagramm aufgetragen sind, wurden die GI_{50} -Werte auch mit einer logarithmischen Formel berechnet.

Bei den Kombinationsversuchen wurden weniger Konzentrationen getestet. Um Kombinations- und Einzelversuche besser vergleichen zu können, wurden die GI_{50} -Werte der Einzelversuche ein zweites Mal mit den entsprechenden Konzentrationen der Kombinationsversuche berechnet (vgl. auch Kapitel 2.2.7: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und Tab. 10: Vergleich der mit verschiedener Anzahl Testkonzentrationen berechneten GI_{50} -Werte nach 72 h Inkubation mit STI 571 für alle vier untersuchten Zelllinien).

2.2.6.3 LC₅₀-Wert

Bei dem LC₅₀-Wert handelt es sich um die Konzentration, bei der eine 50 %-ige Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle nach 0 h zu verzeichnen war.

LC₅₀-Werte wurden ebenso wie die GI₅₀-Werte mit der Formel für den logarithmischen Mittelwert berechnet.

2.2.6.4 Dosis-Wirkungskurven

Die Dosis-Wirkungskurven wurden in halblogarithmischen Graphen dargestellt. Auf der Abszisse sind die Konzentrationen der Testsubstanzen in μM abzulesen. Die Ordinate gibt das relative Wachstum im Vergleich zur Kontrolle in Prozent wieder. Das Wachstum der Kontrolle entspricht 100 %.

Zu jeder Zelllinie werden als Messpunkte jeweils die Mittelwerte der vierfachen Ansätze angegeben. Die senkrechten Markierungen an den Messpunkten geben die Standardabweichung wieder.

2.2.7 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Einzelne Versuche wurden innerhalb von Monaten wiederholt. Insgesamt zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Die Abb. 11 und Abb. 12 zeigen exemplarisch die Dosis-Wirkungskurven des Versuchs 72 h-Inkubation mit STI 571 und der Wiederholung dieses Versuchs für alle vier untersuchten Zelllinien. Der Versuch wurde unter gleichen Versuchsbedingungen, jedoch mit weniger Testkonzentrationen wiederholt. Die Abbildungen geben daher nicht alle 10 getesteten Konzentrationen der ersten Versuchsreihe wieder.

Gleichzeitig zeigen die Abb. 11 und Abb. 12, dass STI 571 in den Konzentrationen 0,1 μM und 1,0 μM reproduzierbar keine Wachstumshemmung verursacht.

In der Tab. 10 sind die berechneten GI_{50} -Werte für beide Versuche abzulesen. Für den ersten Versuch wurden die GI_{50} -Werte mit allen getesteten Konzentrationen und mit den Testkonzentrationen des Wiederholungsversuchs berechnet. Es wird deutlich, dass bei dem Vergleich von zwei Testreihen mit unterschiedlicher Anzahl an Testkonzentrationen die GI_{50} -Werte nur mit den zu vergleichenden Testkonzentrationen berechnet werden sollten, da es anderenfalls zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse käme.

Bei weniger Testkonzentrationen sind die berechneten GI_{50} -Werte ungenauer. Dies sollte ebenfalls bei der Bewertung der Ergebnisse bedacht werden. Dies verdeutlicht auch die Abb. 13. Sie zeigt die Dosis-Wirkungskurve für CADO-ES-1 nach 72h Inkubation mit STI 571 einmal mit der Angabe von 10 und einmal mit der Angabe von nur 5 Testkonzentrationen.

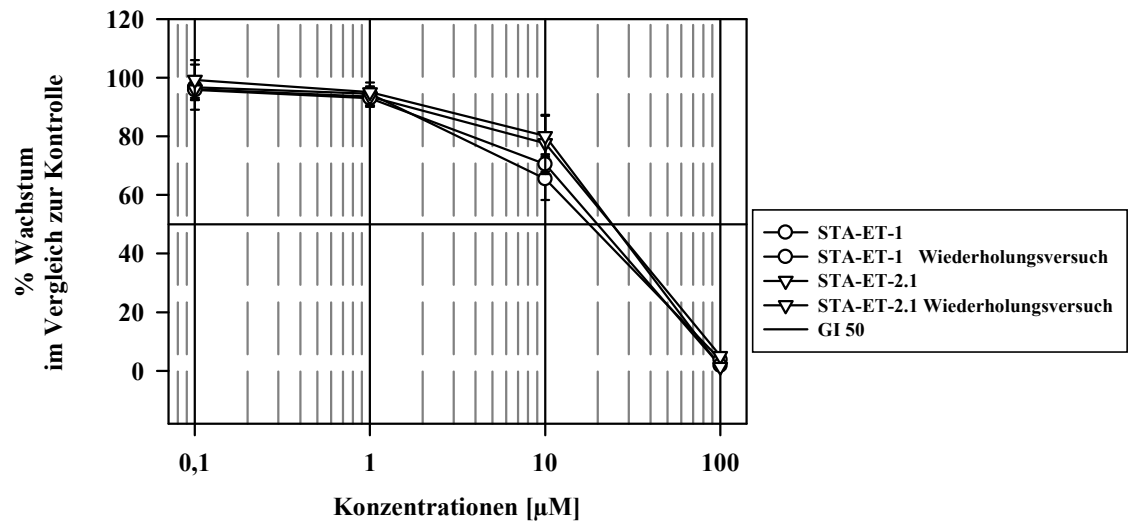


Abb. 11: Wiederholungsversuche zum Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität der Ewing-Zelllinien STA-ET-1 und STA-ET-2.1 nach 72 h Inkubation mit STI 571

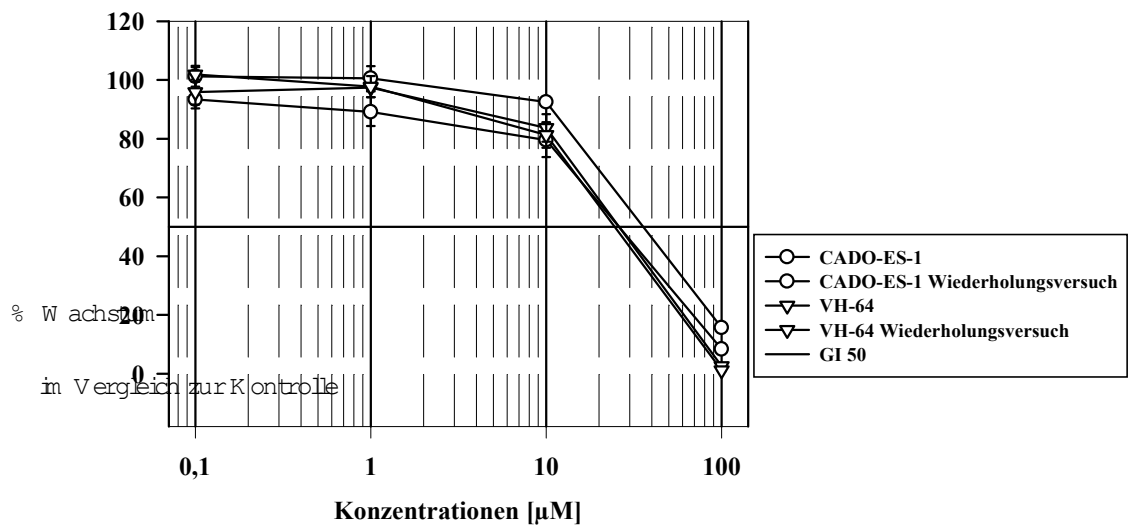


Abb. 12: Wiederholungsversuche zum Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität der Ewing-Zelllinien CADO-ES-1 und VH-64 nach 72 h Inkubation mit STI 571

72h Inkubation		Versuchsreihe mit 10 Testkonzentrationen		Wiederholungsversuch mit 5 Testkonzentrationen
Testsubstanz	Zelllinie	GI ₅₀ [µM] 10 Testkonz.	GI ₅₀ [µM] 5 Testkonz.	GI ₅₀ [µM] 5 Testkonzentrationen
STI 571	CADO-ES-1	54,0	35,7	26,0
	VH-64	15,1	26,0	24,6
	STA-ET-1	18,1	17,8	19,9
	STA-ET-2.1	29,0	24,0	24,1

Tab. 10: Vergleich der mit verschiedener Anzahl Testkonzentrationen berechneten GI₅₀-Werte nach 72 h Inkubation mit STI 571 für alle vier untersuchten Zelllinien

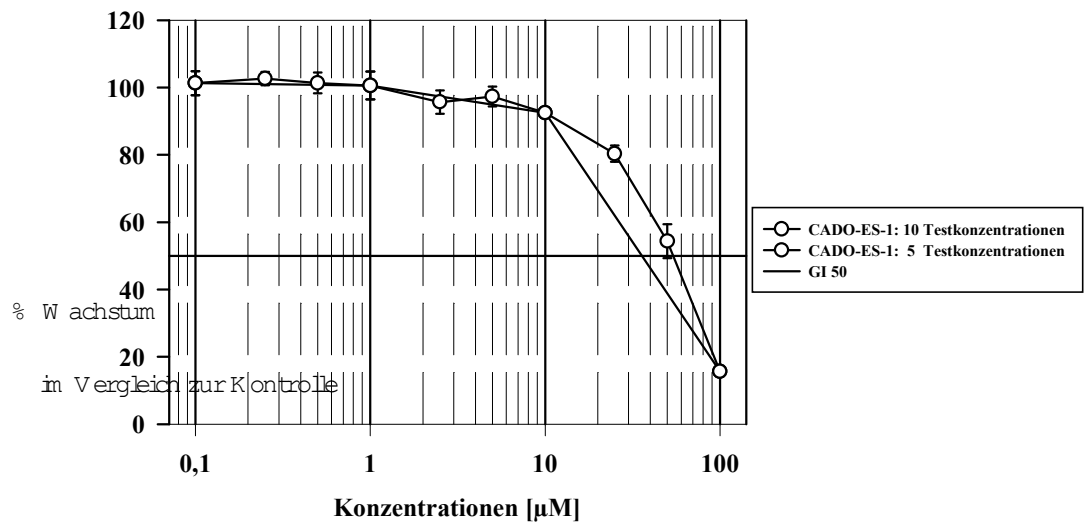


Abb. 13: Dosis-Wirkungskurve für CADO-ES-1 nach 72h Inkubation mit STI 571 mit der Angabe von 10 bzw. nur 5 Testkonzentrationen

3 Ergebnisse

3.1 In-vitro-Toxizitätsscreening

Im folgenden Teil sind in den Abbildungen Abb. 14 bis Abb. 18 exemplarisch die Ergebnisse nach 72-stündiger Exposition mit jeweils einer Testsubstanz für jede der vier untersuchten Zelllinien graphisch dargestellt. Es wurde dieser Messzeitpunkt gewählt, da zum Einen bei einigen Substanzen die Effekte erst nach 72 h besonders deutlich zu sehen waren und zum Anderen sich die Zelllinien nach 96 h zum Teil nicht mehr in der Wachstumsphase befanden. Die Graphen der Testsubstanzen Gemcitabin und Cytarabin fassen die Versuche mit niedrigen und hohen Konzentrationen der Testsubstanz zusammen. Für die graphische und rechnerische Auswertung wurden jeweils die 1 μ M bzw. 1,15 μ M-Werte der niedrigkonzentrierten Testreihe gewählt.

Die rechnerisch ermittelten GI_{50} - und LC_{50} -Konzentrationen der Testsubstanzen für die jeweiligen Messzeitpunkte wurden in den Tabellen Tab. 11 bis Tab. 20 zusammengefasst. Anschließend wurden die ermittelten Ergebnisse mittels Ranglisten miteinander verglichen. Diese werden in den Tabellen Tab. 21 bis Tab. 30 wiedergegeben.

3.1.1 Inkubation mit Etoposid

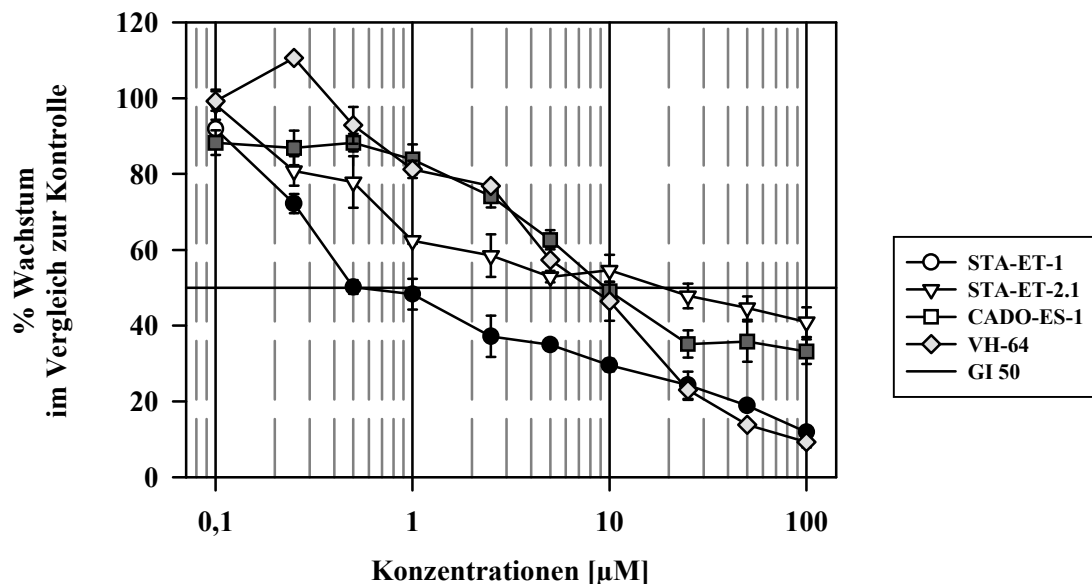


Abb. 14: Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit Etoposid

Die Abb. 14 zeigt die Dosis-Wirkungskurven von vier Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit Etoposid.

Mit zunehmender Etoposidkonzentration konnte nach 72 h eine kontinuierliche Reduktion des Anteils vitaler Zellen im Inkubationsansatz beobachtet werden. Die vier Zelllinien reagierten unterschiedlich auf die Inkubation mit Etoposid.

Mit der Höchstkonzentration von 100 µM Etoposid wurde nach 72 h bei CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 ein Restwachstum von ca. 35 – 45 % ermittelt, während unter dieser Konzentration bei VH-64 und STA-ET-1 nur noch 10 % vitale Zellen vorlagen.

Für eine 50 %-ige Wachstumshemmung waren Konzentrationen von 0,535 - 18,7 µM Etoposid nötig. Der mit Abstand niedrigste GI₅₀-Wert konnte bei STA-ET-1 mit 0,535 µM verzeichnet werden. Die GI₅₀-Werte für CADO-ES-1 und VH-64 lagen bei 9,55 µM und 7,98 µM. Sie waren ca. um den Faktor 15 höher als der GI₅₀-Wert für STA-ET-1. Für STA-ET-2.1 wurde rechnerisch ein GI₅₀-Wert von 18,7 µM ermittelt.

In der Tab. 11 werden ergänzend die GI_{50} -Werte für alle Messzeitpunkte nach Inkubation mit Etoposid für die getesteten Zelllinien aufgeführt.

Die Tab. 12 zeigt die LC_{50} -Werte der vier untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit Etoposid zu allen Messzeitpunkten.

Insgesamt erwiesen sich STA-ET-2.1 und CADO-ES-1 resistenter gegenüber Etoposid, während VH-64 und STA-ET-1 sensibler reagierten.

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	GI_{50} [μ M]	GI_{50} [μ M]	GI_{50} [μ M]	GI_{50} [μ M]
Etoposid	CADO-ES-1	▶	21,4	9,55	5,55
	VH-64	▶	34,3	7,98	0,442
	STA-ET-1	▶	1,30	0,535	0,244
	STA-ET-2.1	▶	67,8	18,7	1,38

Tab. 11: GI_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Etoposid

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	LC_{50} [μ M]	LC_{50} [μ M]	LC_{50} [μ M]	LC_{50} [μ M]
Etoposid	CADO-ES-1	▶	▶	▶	65,6
	VH-64	▶	▶	52,2	19,4
	STA-ET-1	▶	82,7	68,3	58,7
	STA-ET-2.1	▶	▶	▶	▶

Tab. 12: LC_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Etoposid

▶ durchschnittliches Wachstum über 50%

3.1.2 Inkubation mit Vincristin

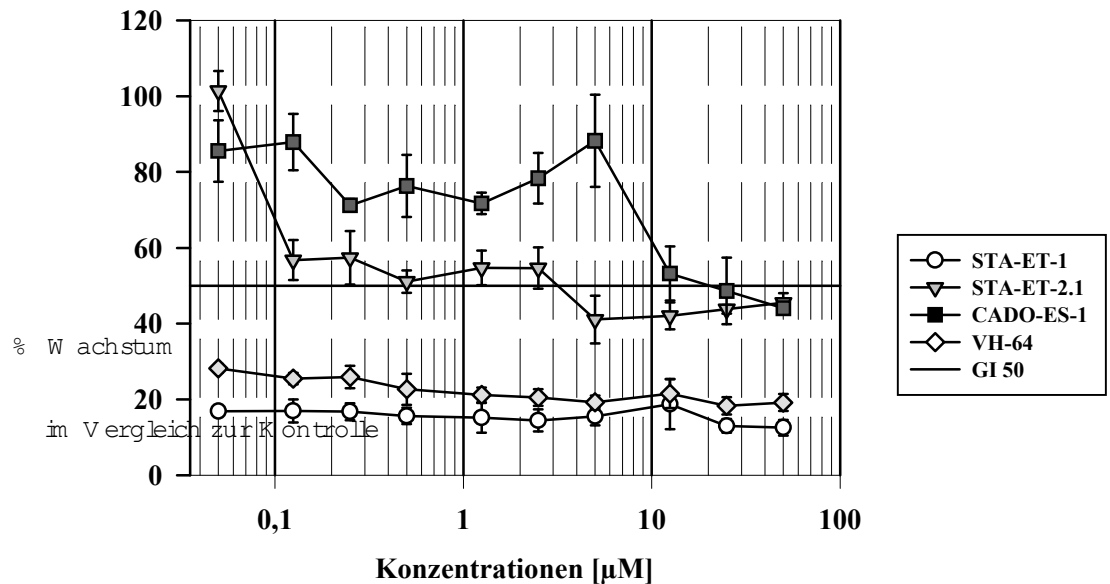


Abb. 15: Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit Vincristin

In der Abb. 15 werden die Dosis-Wirkungskurven der vier untersuchten Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit Vincristin dargestellt.

Während sich STA-ET-1 und VH-64 bei allen aufgeführten Konzentrationen durch eine Reduktion des Wachstums auf durchschnittlich 15 % bzw. 20 % auszeichneten, zeigten STA-ET-2.1 und CADO-ES-1 ein anderes Wachstumsverhalten.

Im Konzentrationsbereich von 0,125 - 2,5 µM wurde bei STA-ET-2.1 ein Wachstum von durchschnittlich 55 % erreicht. Eine Dosis von 5 µM bewirkte eine maximale Wachstumseinschränkung auf 40 %. Die Steigerung der Konzentration auf bis zu 50 µM führte zu keiner stärkeren Wachstumshemmung.

Das Zellwachstum von CADO-ES-1 wurde im Konzentrationsbereich von 0,125 – 5 µM auf durchschnittlich 80 % reduziert. Mit Erhöhung der Konzentration auf 50 µM wurde eine maximale Hemmung des Wachstums auf 45 % beobachtet.

Bei den Zelllinien STA-ET-1 und VH-64 wurde nach 72h der GI_{50} -Wert von allen getesteten Konzentrationen unterschritten. Das Wachstum der Zelllinie STA-ET-2.1 wurde bei einer rechnerisch ermittelten Konzentration von 3,17 μM Vincristin zu 50 % gehemmt. CADO-ES-1 benötigte rechnerisch eine Dosis von 20,4 μM zum Erreichen der GI_{50} . Die Konzentration lag somit um den Faktor 6 über der Vincristin-Konzentration, die bei STA-ET-2.1 das Wachstum zu 50 % hemmte.

Die Tab. 13 führt ergänzend die GI_{50} -Werte für alle Messzeitpunkte nach Inkubation mit Vincristin für die getesteten Zelllinien auf.

In der Tab. 14 werden die LC_{50} -Werte der vier untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit Vincristin für alle Messzeitpunkte abgebildet.

Insgesamt zeigten sich auch hier die Zelllinien STA-ET-1 und VH-64 deutlich sensibler gegenüber Vincristin als CADO-ES-1 und STA-ET-2.1. Bei CADO-ES-1 wurde nach 72 h ein GI_{50} -Wert erreicht, während nach 96 h das durchschnittliche Wachstum über 50 % lag und keine GI_{50} ermittelt werden konnte.

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]
Vincristin	CADO-ES-1	▶	▶	20,4	▶
	VH-64	▶	▶	◀	◀
	STA-ET-1	▶	◀	◀	◀
	STA-ET-2.1	▶	▶	3,17	0,284

Tab. 13: GI_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Vincristin

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]
Vincristin	CADO-ES-1	▶	▶	▶	▶
	VH-64	▶	▶	▶	◀
	STA-ET-1	▶	▶	■ 0,500	◀
	STA-ET-2.1	▶	▶	▶	■ 12,5

Tab. 14: LC_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Vincristin

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50%
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50%
- Wachstum um +/- 50% bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen

3.1.3 Inkubation mit Gemcitabin

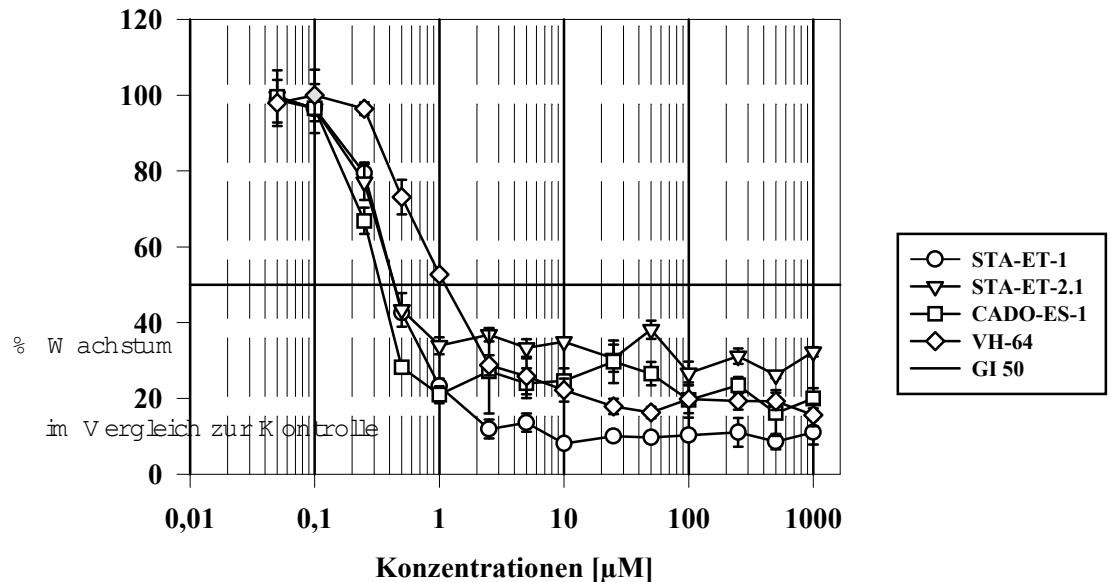


Abb. 16: Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit Gemcitabin

Die Abb. 16 bildet die Dosis-Wirkungskurven nach 72h Inkubation mit Gemcitabin für vier Ewing-Zelllinien ab. Die zwei Versuchsreihen mit Gemcitabin in hoher und niedriger Konzentration werden zusammengefasst. Zur graphischen und rechnerischen Auswertung wurden jeweils die 1 µM-Werte der niedrigkonzentrierten Testreihe eingesetzt.

Alle Zelllinien zeigen bei logarithmischer Darstellung eine sigmoidale Reduktion der vitalen Zellen mit steigender Gemcitabin-Konzentration.

Die niedrigsten eingesetzten Konzentrationen 0,05 µM und 0,1 µM zeigten bei allen Zelllinien keine Wachstumseinschränkung. Das durchschnittliche Wachstum lag bei 100 %.

Im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 - 1 µM wurde bei allen Zelllinien, bis auf VH-64, die 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht.

Bei einer Konzentration von 1 µM erreichten die Zelllinien STA-ET-2.1 und CADO-ES-1 ihre jeweilige maximale Wachstumshemmung, die durch eine weitere Steigerung der Konzentration nicht erhöht werden konnte. Gleiches galt für die Zelllinien STA-ET-1 und VH-64 bei einer Konzentration von 2,5 µM.

Die höchste Hemmung wurde bei STA-ET-1 mit einem Wachstum von durchschnittlich 10 % erreicht.

CADO-ES-1 und VH-64 konnten bis auf ein durchschnittlich 20 %-iges Wachstum reduziert werden. STA-ET-2.1 zeigte mit durchschnittlich 30 % die geringste maximale Wachstumshemmung.

Konzentrationen von 0,338 - 1,11 μM Gemcitabin waren für eine 50%-ige Wachstumsreduktion nach 72-stündiger Exposition nötig.

CADO-ES-1 zeigte sich am sensibelsten. Eine Konzentration von 0,338 μM bewirkte eine 50 %-ige Wachstumseinschränkung. Die nächsthöheren Konzentrationen (0,435 μM und 0,436 μM) wurden bei STA-ET-1 und STA-ET-2.1 festgestellt. Die Dosis war um ca. 30 % höher als die von CADO-ES-1 benötigte. Die höchste Konzentration zum Erreichen des GI_{50} -Wertes verlangte VH-64. Mit 1,11 μM war dieser GI_{50} -Wert um ca. ein 2,6-faches höher als der von STA-ET-1 und STA-ET-2.1. und ca. 3,3-mal so hoch wie der GI_{50} -Wert von CADO-ES-1.

In der Tab. 15 werden ergänzend die GI_{50} -Werte für alle Messzeitpunkte nach Inkubation mit Gemcitabin für die getesteten Zelllinien aufgeführt.

Die Tab. 16 verweist auf die LC_{50} -Werte der vier untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit Gemcitabin für alle Messzeitpunkte.

Anders als bei Vincristin und Etoposid zeigten sich bei der Behandlung mit Gemcitabin VH-64 und STA-ET-2.1 resistenter im Vergleich zu CADO-ES-1 und STA-ET-1.

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]
Gemcitabin	CADO-ES-1	▶	1,76*	0,338	0,291
	VH-64	▶	▶	1,11*	0,902
	STA-ET-1	741	1,02*	0,435	0,313
	STA-ET-2.1	946	■ 2,50	0,436	0,393

Tab. 15: GI_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Gemcitabin

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]
Gemcitabin	CADO-ES-1	▶	▶	■ 2,50	1,12*
	VH-64	▶	▶	▶	2,48*
	STA-ET-1	▶	■ 5,03	2,12*	0,853
	STA-ET-2.1	▶	▶	▶	6,71

Tab. 16 LC_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Gemcitabin

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50%
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50%
- Wachstum um +/- 50% bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen
- * Wert errechnet sich aus zwei Messreihen

3.1.4 Inkubation mit Cytarabin

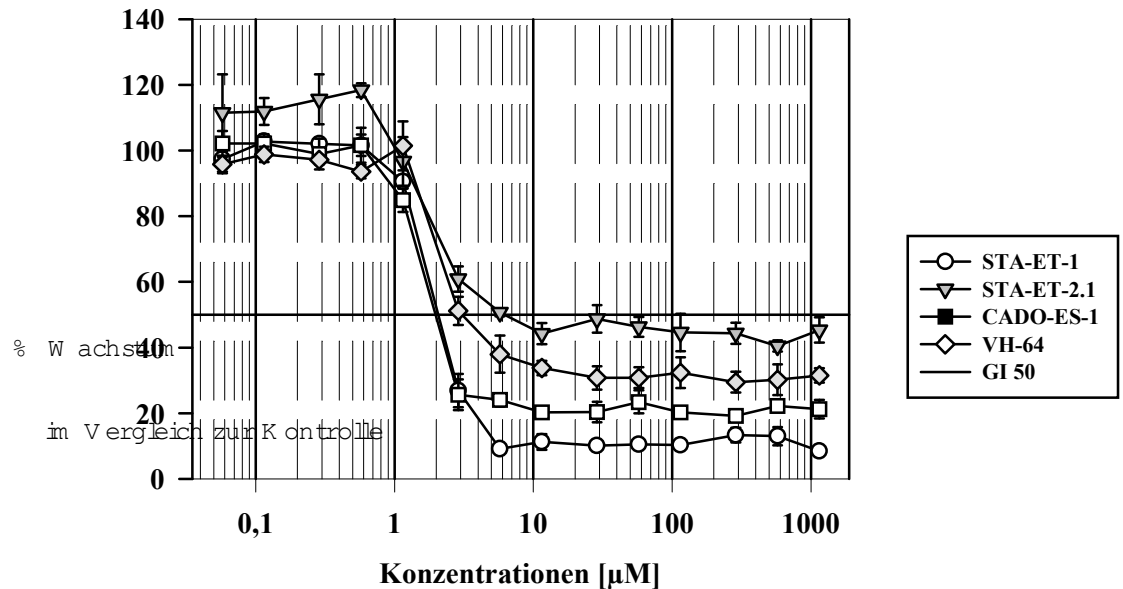


Abb. 17: Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit Cytarabin

Die Dosis-Wirkungskurven der vier untersuchten Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit Cytarabin werden in der Abb. 17 gezeigt. Dabei werden die zwei Versuchsreihen mit Cytarabin in hoher und niedriger Dosierung zusammengefasst. Für die graphische und rechnerische Auswertung wurden jeweils die 1,15 µM-Werte der niedrigkonzentrierten Testreihe benutzt. Wie bei Gemcitabin fand auch hier eine sigmoidale Reduktion der Vitalität in Abhängigkeit von der Konzentration statt.

Im Konzentrationsbereich von 0,058 – 1 µM lagen die Werte aller vier Zelllinien dicht beieinander und deutlich oberhalb der GI₅₀-Marke. Das durchschnittliche Wachstum lag bei ca. 100% im Vergleich zur Kontrolle.

Die GI₅₀-Marke wurde von allen Zelllinien im Konzentrationsabschnitt zwischen 1 – 10 µM unterschritten. Bei einer Konzentration von 11,5 µM konnte bei allen Zelllinien die jeweilige maximale Wachstumshemmung verzeichnet werden. Eine weitere Steigerung der Konzentration erhöhte diese nicht.

Jede Zelllinie zeigte eine andere maximale Wachstumsreduktion. Die höchste Hemmung wurde bei STA-ET-1 mit einem Restwachstum von durchschnittlich 10% erreicht. CADO-ES-1 wies durchschnittlich ein 20 %-iges Restwachstum auf. Das Zellwachstum von VH-64 konnte bis auf durchschnittlich 30 % reduziert werden. STA-ET-2.1 zeigte mit durchschnittlich 45 % die niedrigste maximale Wachstumshemmung. Die GI_{50} -Grenze wurde in diesem Fall knapp unterschritten.

Die GI_{50} -Werte befanden sich nach 72 h Exposition im Konzentrationsbereich von 2,04 – 6,17 μM Cytarabin. CADO-ES-1 und STA-ET-1 benötigten die niedrigsten Konzentrationen (2,04 und 2,06 μM), STA-ET-2.1 die höchste (6,17 μM). Mit 3,06 μM zeigte VH-64 eine GI_{50} -Dosis im mittleren Bereich. Diese war um ein 1,5-faches höher als die von CADO-ES-1 und STA-ET-1 zum Erreichen der GI_{50} erforderlichen.

STA-ET-2.1 beanspruchte eine doppelt so hohe Konzentration wie VH-64, ferner eine 3-mal höhere Konzentration als CADO-ES-1 und STA-ET-1.

In der Tab. 17 werden ergänzend die GI_{50} -Werte für alle Messzeitpunkte nach Inkubation mit Cytarabin für die getesteten Zelllinien dargestellt.

Die Tab. 18 listet die LC_{50} -Werte der vier untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit Cytarabin für alle Messzeitpunkte auf.

Analog zum Gemcitabin erwiesen sich VH-64 und STA-ET-2.1 insgesamt resistenter im Vergleich zu CADO-ES-1 und STA-ET-1.

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]
Cytarabin	CADO-ES-1	▶	2,71*	2,04*	2,07*
	VH-64	▶	▶	3,06	2,27*
	STA-ET-1	▶	2,11*	2,06*	1,78*
	STA-ET-2.1	▶	▶	6,17	4,42

Tab. 17: GI_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Cytarabin

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]
Cytarabin	CADO-ES-1	▶	▶	■ 5,68	3,32
	VH-64	▶	▶	▶	■ 29,7
	STA-ET-1	▶	▶	4,74	4,37
	STA-ET-2.1	▶	▶	▶	▶

Tab. 18: LC_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit Cytarabin

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50%
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50%
- Wachstum um +/- 50% bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen
- * Wert errechnet sich aus zwei Messreihen

3.1.5 Inkubation mit STI 571

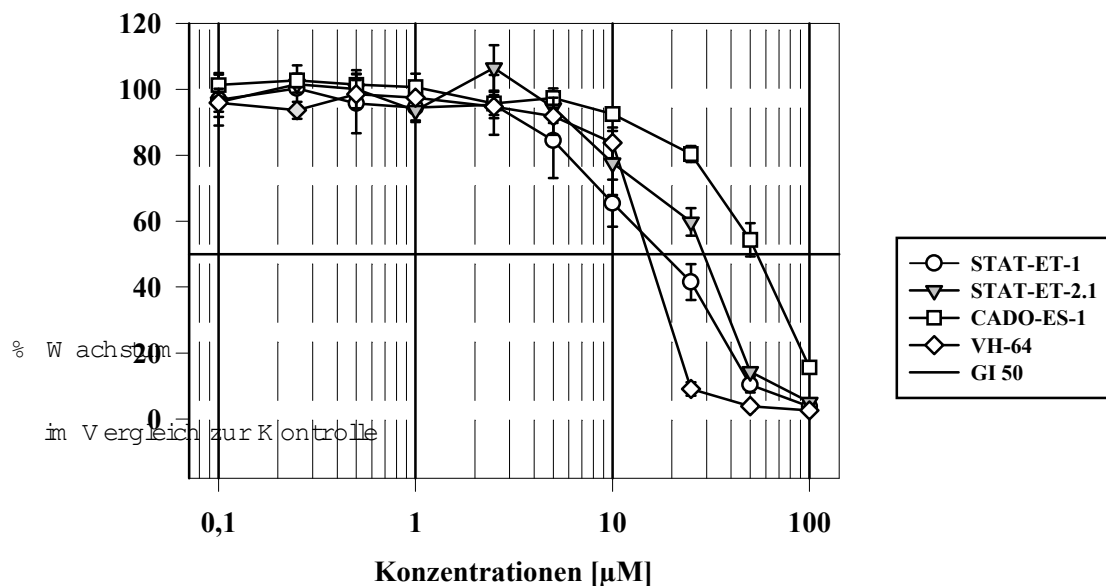


Abb. 18: Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit STI 571

In der Abb. 18 werden die Dosis-Wirkungskurven der vier untersuchten Ewing-Zelllinien nach 72 h Inkubation mit STI 571 gezeigt.

Im Konzentrationsbereich von 0,1 - 5 µM konnte bei keiner Zelllinie eine Wachstumshemmung beobachtet werden. Das durchschnittliche Wachstum lag bei 100 %.

Ab 10 µM kam es für jede Zelllinie zu einem unterschiedlich starken Abfall der Dosis-Wirkungskurve, so dass bei 25 µM jede der vier Zelllinien ein anderes Wachstumsverhalten aufwies.

Bei VH-64 überlebten bei 25 µM durchschnittlich 10 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Durch weitere Steigerung der Dosis auf 50 - 100 µM wurde die Zellzahl auf durchschnittlich 3 % reduziert. STA-ET-1 zeigte bei 25 µM ein Wachstum von ca. 40 % gegenüber der Kontrolle und lag wie auch VH-64 unter der GI_{50} -Grenze. STA-ET-2.1 und CADO-ES-1 hingegen zeigten ein Restwachstum von 60 % bzw. 80 %.

Bei einer Konzentration von 50 µM konnte bei STA-ET-1 und STA-ET-2.1 ein Wachstum von ca. 10 % beobachtet werden. Durch Einsatz der Höchstkonzentration von 100 µM wurde dies auf maximal ca. 3 % eingeschränkt. CADO-ES-1 unterschritt bei einer Konzentration von 50 µM die GI_{50} -Marke nicht und erreichte ein Wachstum von ca. 54 %. 100 µM bewirkten eine maximale Wachstumshemmung auf ca. 15 %.

Nach 72 h Inkubationszeit waren Konzentrationen von 15,1 - 54,0 μM STI 571 für eine 50 %-ige Wachstumshemmung nötig.

Die niedrigste Konzentration erforderte VH-64 mit 15,1 μM , gefolgt von STA-ET-1 mit 18,1 μM . Nach 72 h Inkubation war der GI_{50} -Wert der Zelllinie STA-ET-2.1 mit 29,0 μM ca. doppelt so hoch wie der GI_{50} -Wert von VH-64. CADO-ES-1 bedurfte mit 54,0 μM der höchsten Konzentration, um den GI_{50} -Wert zu erreichen. Die GI_{50} -Dosis war doppelt so hoch wie die von STA-ET-2.1 benötigte und ca. um den Faktor 3 größer als die von VH-64 und STA-ET-1 beanspruchten Konzentrationen.

In der Tab. 19 werden ergänzend die GI_{50} -Werte für alle Messzeitpunkte nach Inkubation mit STI 571 für die getesteten Zelllinien abgebildet.

Die Tab. 20 gibt die LC_{50} -Werte der vier untersuchten Zelllinien nach Inkubation mit STI 571 für alle Messzeitpunkte wieder.

Mit Ausnahme von VH-64 konnte keine bzw. nur eine gering ausgeprägte zeitabhängige Steigerung der Toxizität beobachtet werden. Insgesamt reagierte VH-64 daher nach 72 h bzw. 96 h am sensibelsten. CADO-ES-1 zeigte sich am resistentesten.

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]	GI_{50} [μM]
STI 571	CADO-ES-1	63,6	60,9	54,0	55,2
	VH-64	50,3	21,5	15,1	15,1
	STA-ET-1	22,3	23,0	18,1	18,7
	STA-ET-2.1	45,7	20,7	29,0	30,7

Tab. 19: GI_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit STI 571

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Testsubstanz	Zelllinie	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]	LC_{50} [μM]
STI 571	CADO-ES-1	▶	100	87,3	80,0
	VH-64	81,6	44,9	24,7	23,1
	STA-ET-1	43,5	46,6	46,0	43,6
	STA-ET-2.1	47,8	33,7	46,2	41,6

Tab. 20: LC_{50} -Werte für vier Ewing-Zelllinien nach Inkubation mit STI 571

▶ durchschnittliches Wachstum über 50%

3.1.6 Vergleich der antiproliferativen Wirkung der Testsubstanzen

Um die antiproliferative Wirkung der einzelnen Substanzen zu vergleichen, wurden anhand der rechnerisch ermittelten GI_{50} -Werte Ränge verteilt. Der niedrigste der GI_{50} -Werte erhielt den Rang 1, der höchste den Rang 5. Bei gleichen GI_{50} -Werten von zwei oder mehr Substanzen, wurden Mittelwerte aus den zu vergebenden Rängen zugeordnet. Aus den einzelnen Rängen wurden die Rangsummen errechnet. Aus den Rangsummen ergaben sich die Ränge für die jeweiligen Messzeitpunkte (=Messzeitpunktränge, 24h-, 48h-, 72h- und 96h-Rang). Aus den Summen der Messzeitpunktränge ergaben sich die Gesamtsummen und Gesamtränge.

Die Tab. 21 - Tab. 24 führen die Ränge der GI_{50} -Werte für die fünf Testsubstanzen einschließlich der Rangsummen und zu den verschiedenen Messzeitpunkten an.

Nach 24 h Inkubationszeit zeigte STI 571 die mit Abstand stärkste antiproliferative Wirkung. Bei allen getesteten Zelllinien erreichte STI 571 Rang 1. Gemcitabin lag auf dem zweiten Platz gefolgt von Etoposid, Vincristin und Cytarabin (vgl. Tab. 21).

Die Rangfolge änderte sich nach einer Inkubationszeit von 48 h. Auf dem ersten Platz befand sich nach 48 h Gemcitabin. Etoposid bewirkte einen größeren antiproliferativen Effekt und belegte nach 48 h den Rang 2. STI 571 demonstrierte, im Vergleich zu den anderen getesteten Substanzen, eine schwächere wachstumshemmende Wirkung und wechselte nach 48 h auf Rang 3. Vincristin und Cytarabin waren zu diesem Messzeitpunkt gemeinsam auf den rangniedrigsten Plätzen.

Nach 72 h Inkubationszeit war ein deutlicher Wechsel in der Rangfolge zu beobachten. Mit zunehmender Inkubationszeit zeigte Vincristin eine stärkere toxische Wirkung. Die Testsubstanz stieg in der Rangliste von den untersten Rängen nach kurzer Inkubationszeit auf Platz 2 nach 72 h Inkubation auf. STI 571 wechselte von den hohen Rängen nach kurzer Einwirkzeit zu den niedrigsten Rängen nach längerer Inkubationszeit. Nach 72 h belegte STI 571 bei allen vier getesteten Zelllinien Rang 5. Bei Etoposid, Cytarabin und Gemcitabin kam es nach 72 h zu keiner erkennbaren Änderung der Rangfolge. Gemcitabin belegte nach 72 h den ersten Rang. Etoposid und Cytarabin befanden sich mit den 72 h-Rängen 4 und 3 im hinteren mittleren Bereich.

Der Trend, der nach 72 h Inkubationszeit beobachtet wurde, setzte sich nach 96 h Einwirkzeit fort. Vincristin befand sich nach 96 h auf Rang 1. STI 571 belegte den niedrigsten Rang. Auf Platz 2 lag Gemcitabin, gefolgt von Etoposid und Cytarabin mit den 96 h-Rängen 3 und 4.

Die Tab. 25 gibt die Summe der Messzeitpunktränge und die Gesamtrangfolge der Testsubstanzen über alle Messzeitpunkte wieder.

Insgesamt zeigte Gemcitabin über den gesamten Untersuchungszeitraum in diesem Zelllinienpanel die stärksten antiproliferativen Effekte und erhielt den Gesamtrang 1. An zweiter Stelle stand Vincristin mit dem Gesamtrang 2, gefolgt von Etoposid auf dem Gesamtplatz 3. STI 571 lag mit Gesamtrang 4 auf einem der hinteren Plätze. Die schwächste antiproliferative Wirkung ging von Cytarabin aus. Die Testsubstanz belegte den Gesamtrang 5.

24 h	Testsubstanz	Etoposid	Vincristin	Gemcitabin	Cytarabin	STI 571
	Zelllinie					
	CADO-ES-1	3,5	3,5	3,5	3,5	1
	VH-64	3,5	3,5	3,5	3,5	1
	STA-ET-1	4	4	2	4	1
	STA-ET-2.1	4	4	2	4	1
	Rangsumme	15	15	11	15	4
	24 h-Rang	4	4	2	4	1

Tab. 21: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der Testsubstanzen nach 24 h Inkubationszeit

48 h	Testsubstanz	Etoposid	Vincristin	Gemcitabin	Cytarabin	STI 571
	Zelllinie					
	CADO-ES-1	3	5	1	2	4
	VH-64	2	4	4	4	1
	STA-ET-1	3	1	2	4	5
	STA-ET-2.1	3	4,5	1	4,5	2
	Rangsumme	11	14,5	8	14,5	12
	48 h-Rang	2	4,5	1	4,5	3

Tab. 22: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der Testsubstanzen nach 48 h Inkubationszeit

72 h	Testsubstanz	Etoposid	Vincristin	Gemcitabin	Cytarabin	STI 571
	Zelllinie					
	CADO-ES-1	3	4	1	2	5
	VH-64	4	1	2	3	5
	STA-ET-1	3	1	2	4	5
	STA-ET-2.1	4	2	1	3	5
	Rangsumme	14	8	6	12	20
	72 h-Rang	4	2	1	3	5

Tab. 23: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der Testsubstanzen nach 72 h Inkubationszeit

96 h	Testsubstanz	Etoposid	Vincristin	Gemcitabin	Cytarabin	STI 571
	Zelllinie					
	CADO-ES-1	3	5	1	2	4
	VH-64	2	1	3	4	5
	STA-ET-1	2	1	3	4	5
	STA-ET-2.1	3	1	2	4	5
	Rangsumme	10	8	9	14	19
	96 h-Rang	3	1	2	4	5

Tab. 24: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der Testsubstanzen nach 96 h Inkubationszeit

Testsubstanz	Etoposid	Vincristin	Gemcitabin	Cytarabin	STI 571
Gesamtsumme	13	11,5	6	15,5	14
Gesamtrang	3	2	1	5	4

Tab. 25: Summe der Messzeitpunktränge und Gesamtrangfolge der Testsubstanzen

3.1.7 Vergleich der Chemosensitivität der Zelllinien

Zum Vergleich der Chemosensitivität der einzelnen Zelllinien wurden anhand der rechnerisch ermittelten GI_{50} -Werte Ränge verteilt. Der niedrigste GI_{50} -Wert erhielt den Rang 1, der höchste den Rang 4. Bei gleichen GI_{50} -Werten unter zwei oder mehr Zelllinien, wurden Mittelwerte aus den jeweiligen Rängen errechnet.

Für die jeweiligen Messzeitpunkte wurden die für die Testsubstanzen ermittelten Ränge addiert und so die Messzeitpunktränge (24h-, 48h-, 72h- und 96h-Rang) ermittelt. Aus den Summen der Messzeitpunktränge ergaben sich die Gesamtränge für den gesamten Versuchszeitraum.

Die Tab. 26-Tab. 29 geben die Ränge der GI_{50} -Werte für die vier Zelllinien einschließlich der Rangsummen und Messzeitpunkträngen zu den verschiedenen Messzeitpunkten wieder. In der Tab. 30 werden die Gesamtränge und die Gesamtrangfolge der Zelllinien über alle Messzeitpunkte dargestellt.

CADO-ES-1 zeigte insgesamt im Vergleich zu den anderen Zelllinien die geringste Chemosensibilität und belegte den Gesamtrang 4. Auch STA-ET-2.1 zählte mit dem Gesamtrang 3 zu den widerstandsfähigeren Zelllinien. Nach kurzer Einwirkzeit von 24 h und 48 h war die Zelllinie VH-64 zunächst wenig sensibel und besetzte die hinteren Messzeitpunktränge 3 und 4. Mit zunehmender Inkubationszeit reagierte die Zelllinie zunehmend sensibel, so dass sie jeweils den 72 h- und 96 h-Rang 2 belegte. Im Gesamtvergleich stand VH-64 an zweiter Stelle. Die sensibelste der getesteten Zelllinien war STA-ET-1. Über die gesamte Inkubationszeit erlangte sie jeweils den Messzeitpunktrang 1 und somit den Gesamtrang 1.

Cytarabin und Gemcitabin zeigten sich bei CADO-ES-1 mit zunehmender Expositionsdauer effektiver im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen. VH-64 wurde mit zunehmender Inkubationsdauer sensibler gegenüber Vincristin, Etoposid und STI 571.

24 h	Zelllinie	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
Testsubstanz					
	Etoposid	2,5	2,5	2,5	2,5
	Vincristin	2,5	2,5	2,5	2,5
	Gemcitabin	3,5	3,5	1	2
	Cytarabin	2,5	2,5	2,5	2,5
	STI 571	4	3	1	2
	Rangsumme	15	14	9,5	11,5
	24 h-Rang	4	3	1	2

Tab. 26: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der getesteten Zelllinien nach 24 h Inkubationszeit

48 h	Zelllinie	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
Testsubstanz					
	Etoposid	2	3	1	4
	Vincristin	3	3	1	3
	Gemcitabin	2	4	1	3
	Cytarabin	2	3,5	1	3,5
	STI 571	4	2	3	1
	Rangsumme	13	15,5	7	14,5
	48 h-Rang	2	4	1	3

Tab. 27: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der getesteten Zelllinien nach 48 h Inkubationszeit

72 h	Zelllinie	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
Testsubstanz					
	Etoposid	3	2	1	4
	Vincristin	4	1,5	1,5	3
	Gemcitabin	1	4	2,5	2,5
	Cytarabin	1,5	3	1,5	4
	STI 571	4	1	2	3
	Rangsumme	13,5	11,5	8,5	16,5
	72 h-Rang	3	2	1	4

Tab. 28: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der getesteten Zelllinien nach 72 h Inkubationszeit

96 h	Zelllinie	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
Testsubstanz					
	Etoposid	4	1,5	1,5	3
	Vincristin	4	2	1	3
	Gemcitabin	1	4	2	3
	Cytarabin	2	3	1	4
	STI 571	4	1	2	3
	Rangsumme	15	11,5	7,5	16
	96 h-Rang	3	2	1	4

Tab. 29: Ränge und Messzeitpunktrangfolge der getesteten Zelllinien nach 96 h Inkubationszeit

Zelllinie	CADO-ES-1	VH-64	STA-ET-1	STA-ET-2.1
Gesamtsumme	12	11	4	13
Gesamtrang	4	2	1	3

Tab. 30: Summe der Messzeitpunktränge und Gesamtrangfolge der getesteten Zelllinien

3.1.8 Zusammenfassung der ermittelten GI₅₀-Werte und LC₅₀-Werte

In der Tab. 31 sind zusammenfassend die GI₅₀-Werte der Testsubstanzen bezogen auf die einzelnen untersuchten Zelllinien für alle Messzeitpunkte dargestellt.

Die Tab. 32 gibt eine Zusammenfassung der LC₅₀-Werte der Testsubstanzen zu allen Messzeitpunkten für die vier untersuchten Zelllinien wieder.

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz	GI ₅₀ [μM]	GI ₅₀ [μM]	GI ₅₀ [μM]	GI ₅₀ [μM]
CADO-ES-1	Etoposid	▶	21,4	9,55	5,55
	Vincristin	▶	▶	20,4	▶
	Gemcitabin	▶	1,76*	0,338	0,291
	Cytarabin	▶	2,71*	2,04*	2,07*
	STI 571	63,6	60,9	54,0	55,2
VH-64	Etoposid	▶	34,3	7,98	0,442
	Vincristin	▶	▶	◀	◀
	Gemcitabin	▶	▶	1,11*	0,902
	Cytarabin	▶	▶	3,06	2,27*
	STI 571	50,3	21,5	15,1	15,1
STA-ET-1	Etoposid	▶	1,30	0,535	0,244
	Vincristin	▶	◀	◀	◀
	Gemcitabin	741	1,02*	0,435	0,313
	Cytarabin	▶	2,11*	2,06*	1,78*
	STI 571	22,3	23,0	18,1	18,7
STA-ET-2.1	Etoposid	▶	67,8	18,7	1,38
	Vincristin	▶	▶	3,17	0,284
	Gemcitabin	946	■ 2,5	0,436	0,393
	Cytarabin	▶	▶	6,17	4,37
	STI 571	45,7	20,7	29,0	30,7

Tab. 31: Zusammenfassung der ermittelten GI₅₀-Werte

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50%
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50%
- Wachstum um +/- 50% bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen
- * Wert errechnet sich aus zwei Messreihen

LC50 log	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz	LC ₅₀ [μM]	LC ₅₀ [μM]	LC ₅₀ [μM]	LC ₅₀ [μM]
CADO-ES-1	Etoposid	▶	▶	▶	65,6
	Vincristin	▶	▶	▶	▶
	Gemcitabin	▶	▶	■ 2,50	1,12
	Cytarabin	▶	▶	■ 5,81	2,89
	STI 571	▶	100	87,3	80,0
VH-64	Etoposid	▶	▶	52,2	19,4
	Vincristin	▶	▶	▶	◀
	Gemcitabin	▶	▶	▶	2,48*
	Cytarabin	▶	▶	▶	■ 25,8
	STI 571	81,6	44,9	24,7	23,1
STA-ET-1	Etoposid	▶	82,7	68,3	58,7
	Vincristin	▶	▶	■ 0,500	◀
	Gemcitabin	▶	■ 5,03	2,12*	0,853
	Cytarabin	▶	▶	4,12	3,80
	STI 571	43,5	46,6	46,0	43,6
STA-ET-2.1	Etoposid	▶	▶	▶	▶
	Vincristin	▶	▶	▶	■ 12,5
	Gemcitabin	▶	▶	▶	6,71
	Cytarabin	▶	▶	▶	▶
	STI 571	47,8	33,7	46,2	41,6

Tab. 32: Zusammenfassung der ermittelten LC₅₀-Werte

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50%
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50%
- Wachstum um +/- 50% bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen
- * Wert errechnet sich aus zwei Messreihen

3.2 Koinkubationsversuche

Im folgenden Teil wurde untersucht, ob durch Koinkubation mit STI 571 die Wirkung der anderen getesteten Zytostatika beeinflusst wird.

Die Ergebnisse der ersten Versuchsreihe (Wachstum der Zellen nach Inkubation mit einer Substanz) wurden dazu mit den Ergebnissen einer zweiten Versuchsreihe (Wachstum der Zellen nach Koinkubation) verglichen. Für die Koinkubationen wurde STI 571 in Konzentrationen von 0,1 μM und 1,0 μM eingesetzt. Beide Konzentrationen zeigten keinen Einfluss auf die Vitalität der vier untersuchten Zelllinien (vgl. auch Kapitel 2.2.7 und 3.1.5). Das Zellwachstum der zweiten Versuchsreihe konnte daher auf eine Kontrolle bezogen werden, in der sich STI 571 in einer Konzentration von 0,1 μM oder 1,0 μM befand. Die Konzentration, bei der unter STI 571-Koinkubation eine 50 %-ige Wachstumshemmung beobachtet bzw. berechnet wurde, heißt in diesen Fällen $\text{GI}_{\text{STI}50}$. Da STI 571 in subtoxischen Konzentrationen eingesetzt wurde, sind die GI_{50} -Werte der Einzelversuche mit den $\text{GI}_{\text{STI}50}$ -Werten vergleichbar.

Die Anzahl der getesteten Zytostatikakonzentrationen beeinflusst sowohl die graphische als auch die rechnerische Ermittlung der GI_{50} , indem eine höhere Anzahl getesteter Zytostatikakonzentrationen eine genauere Abschätzung erlaubt. In der ersten Versuchsreihe wurden mehr Konzentrationen als bei den Kombinationsversuchen getestet. Zum Vergleich der GI_{50} -Werte mit den $\text{GI}_{\text{STI}50}$ -Werten wurden daher die GI_{50} -Werte mit den Konzentrationen der zweiten Versuchsreihe neu berechnet (vgl. auch Kapitel 2.2.7: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse).

Zur Ermittlung und Berechnung der LC_{50} -Werte wurden analog die Konzentrationen, bei denen eine 50 %-ige Wachstumshemmung im Vergleich zur Kontrolle nach 0 h beobachtet wurde eingesetzt. Die Nullkontrolle am Tag 0 enthielt kein STI 571. Die Werte heißen zur besseren Unterscheidung auch für die Koinkubationsversuche $\text{LC}_{\text{STI}50}$ -Werte. Sie sind direkt mit den LC_{50} -Werten der Einzelversuche vergleichbar.

Da die beobachteten Effekte zeitabhängig waren, werden im folgenden Teil in den Abbildungen Abb. 19 bis Abb. 38 die Dosis-Wirkungskurven nicht nach 72 h wie im ersten Teil, sondern nach 48 h Inkubationszeit miteinander verglichen. Das Wachstumsverhalten der vier untersuchten Zelllinien nach 48 h Einzelinkubation mit einer Testsubstanz wird zunächst in den Abbildungen Abb. 19, Abb. 24, Abb. 29 und Abb. 34 zusammengefasst. Anschließend werden die Dosis-Wirkungskurven jeder einzelnen Zelllinie nach 48 h Inkubation einer Testsubstanz in Kombination mit STI 571 in den Konzentrationen 0,1 μM bzw. 1,0 μM aufgeführt.

Die Tabellen Tab. 33, Tab. 36, Tab. 38, und Tab. 41 geben die errechneten GI_{50} - und $\text{GI}_{\text{STI}50}$ -Werte wieder. Die Tabellen Tab. 35, Tab. 37, Tab. 40 und Tab. 43 zeigen die berechneten LC_{50} - und $\text{LC}_{\text{STI}50}$ -Werte.

In den Tabellen Tab. 34, Tab. 39 und Tab. 42 werden die rechnerisch ermittelten GI_{50} - und $\text{GI}_{\text{STI}50}$ -Werte miteinander verglichen. Um die antiproliferativen Effekte zu vergleichen, wurden die GI_{50} -Werte der Monozytostatikaverdünnungen mit 100 % gleichgesetzt. Die Prozentwerte für die Kombinationsverdünnungen ergaben sich aus dem Quotienten $\text{GI}_{\text{STI}50}$ -Wert des Kombinationsversuchs / GI_{50} -Wert der Monoexposition mit dem jeweiligen Zytostatikum. Eine Wirkungsverstärkung durch Kombination mit STI 571 entspricht folglich einem Wert $< 100\%$ und eine Abschwächung der Wirkung durch Kombination mit STI 571 entspricht einem Wert $> 100\%$. Zum Teil konnte kein Quotient ermittelt werden, da von Dividend und / oder Divisor keine GI_{50} - oder $\text{GI}_{\text{STI}50}$ Werte erreicht wurden. Dort wo die GI_{50} und / oder $\text{GI}_{\text{STI}50}$ nicht erreicht wurden bzw. wo die Vitalität immer unter 50 % lag, wurde keine prozentuale Auswertung vorgenommen.

3.2.1 Etoposid in Kombination mit STI 571

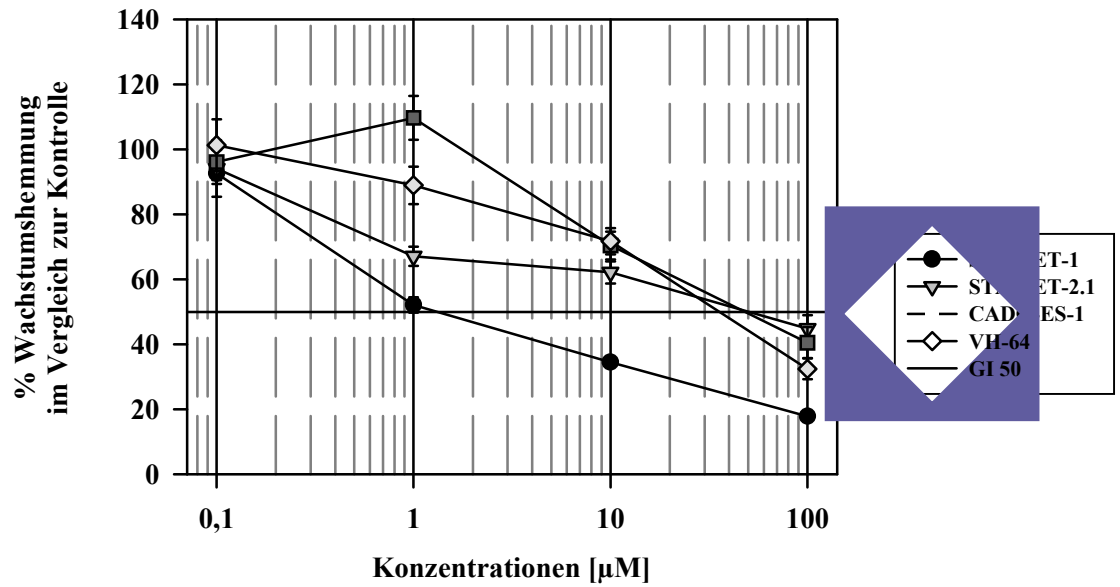


Abb. 19: Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Etoposid

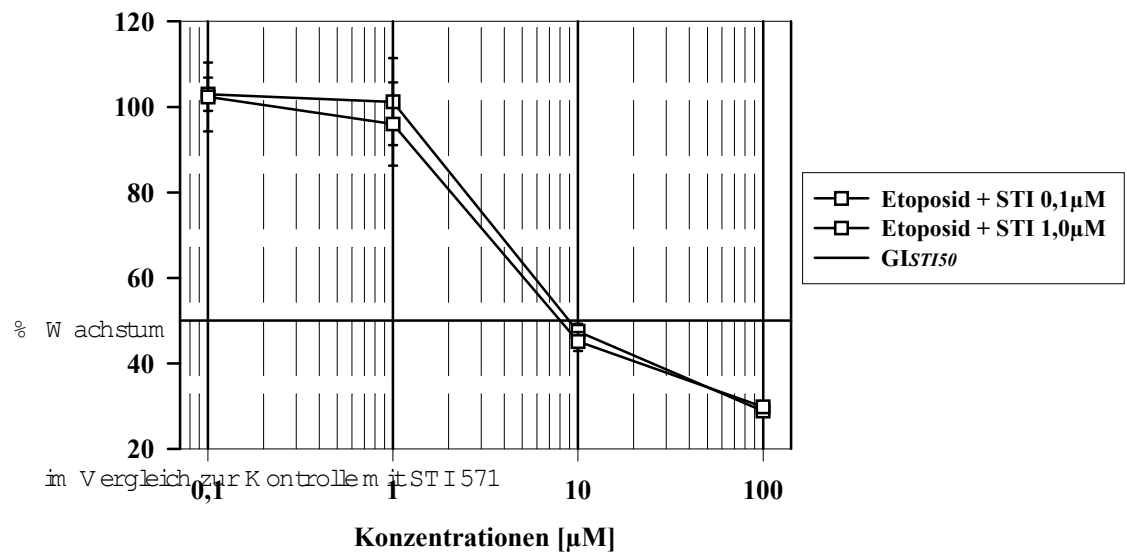


Abb. 20: In-vitro-Chemosensitivität der Zelllinie CAD-ES-1 nach 48 h Inkubation mit Etoposid in Kombination mit STI 571

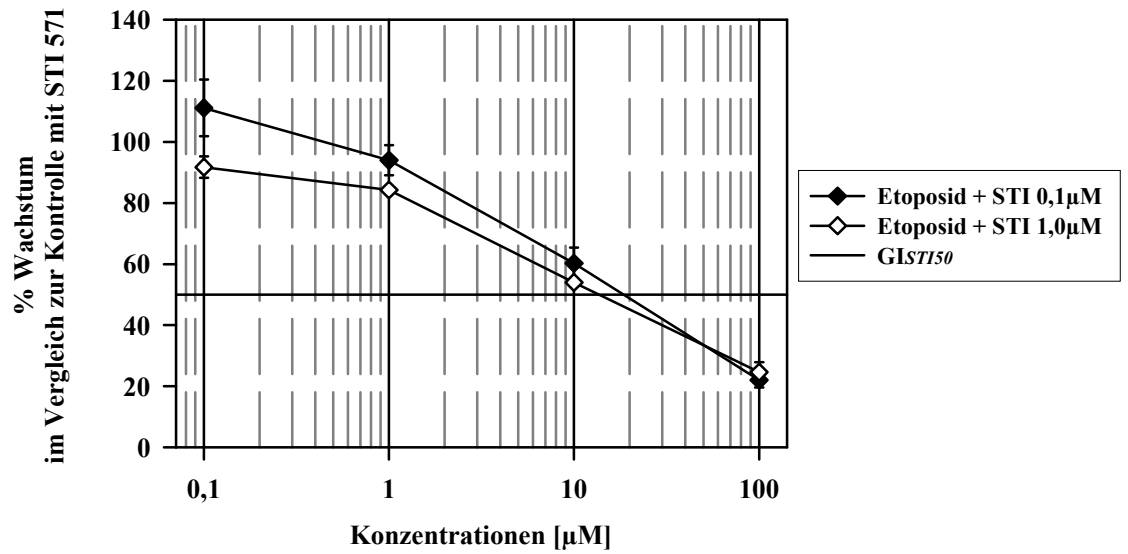


Abb. 21: In-vitro-Chemosensitivität der Zelllinie VH-64 nach 48 h Inkubation mit Etoposid in Kombination mit STI 571

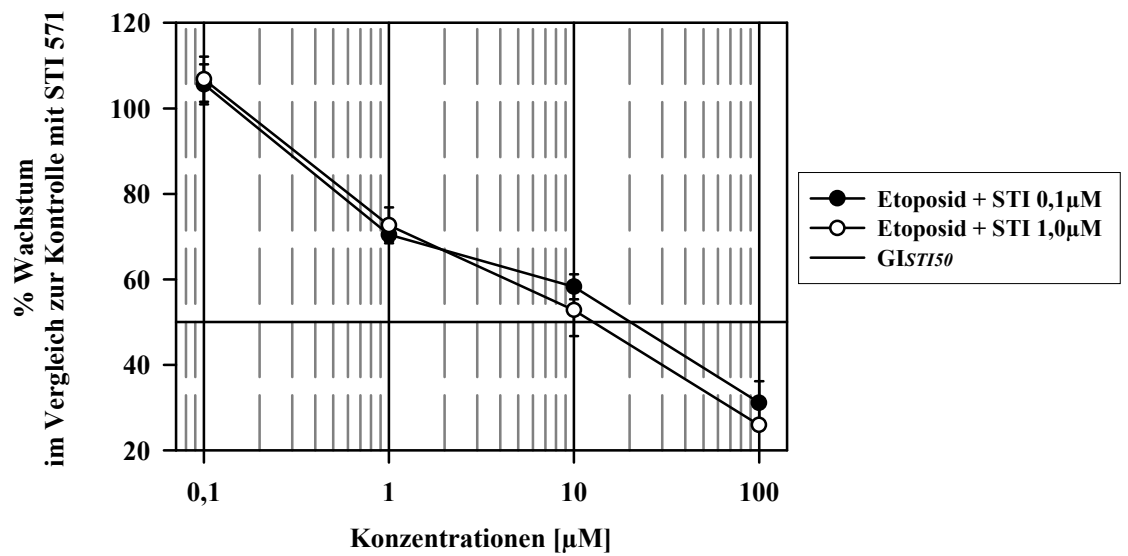


Abb. 22: In-vitro-Chemosensitivität der Zelllinie STA-ET-1 nach 48 h Inkubation mit Etoposid in Kombination mit STI 571

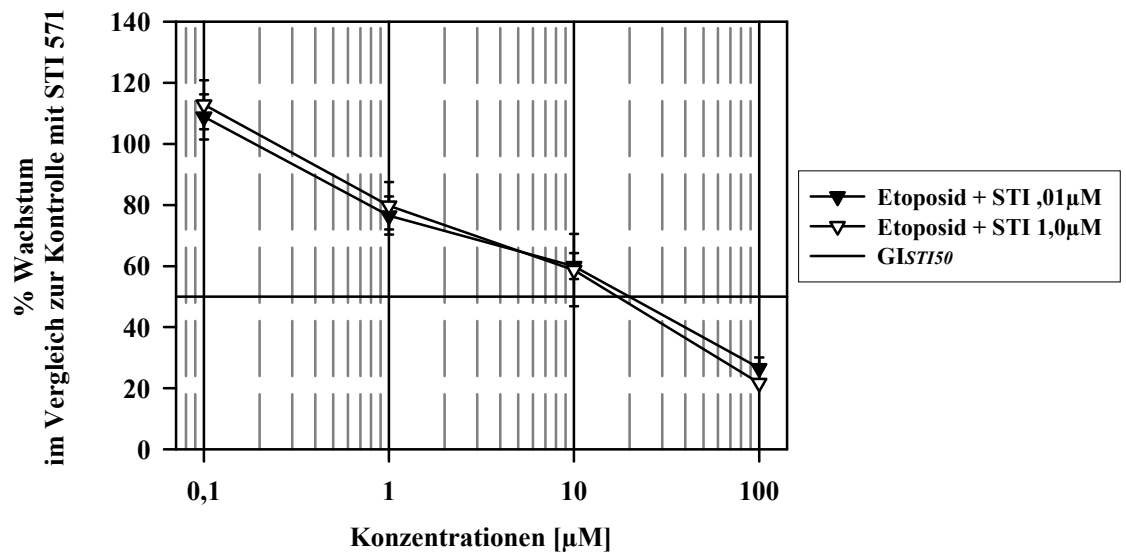


Abb. 23: In-vitro-Chemosensitivität der Zelllinie STA-ET-2.1 nach 48 h Inkubation mit Etoposid in Kombination mit STI 571

In der Abb. 19 sind die Dosis-Wirkungskurven aller untersuchter Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Etoposid zu sehen. Mit Zunahme der Konzentration an Etoposid nahm gleichzeitig der Anteil vitaler Zellen im Testansatz ab. Insgesamt reagierte STA-ET-1 nach 48 h am sensibelsten, während STA-ET-2.1, VH-64 und CADO-ES-1 resistenter waren.

Die Abb. 20 bis Abb. 23 zeigen die Dosis-Wirkungskurven der einzelnen untersuchten Zelllinien nach 48 h Koinkubation von Etoposid in verschiedenen Konzentrationen mit STI 571 in Konzentrationen von 0,1 µM bzw. 1,0 µM. In allen Fällen zeigte sich bei den Koinkubationen analog zur Monoinkubation mit zunehmender Etoposidkonzentration eine kontinuierliche Abnahme der vitalen Zellen im Testansatz.

In allen Fällen wurde nach 48 h zwischen der höheren und der niedrigeren STI 571 Konzentration von 0,1 bzw. 1,0 µM kein Unterschied bezüglich ihres Einflusses auf die Etoposid-Toxizität beobachtet. Diese Beobachtung wurde auch zu den anderen Messzeitpunkten gemacht.

Die Tab. 33 gibt die rechnerisch ermittelten GI_{50} - und GI_{STI50} -Werte für die Mono- und Koinkubationsversuche mit Etoposid für alle untersuchten Zelllinien und Messzeitpunkte wieder. In der Tab. 34 wurde der prozentuale Unterschied zwischen den GI_{50} - und GI_{STI50} -Werten für alle Messzeitpunkte und getesteten Zelllinien berechnet. In der Tab. 35 sind zusätzlich die LC_{50} - bzw. LC_{STI50} -Werte dieses Versuchs aufgeführt.

Die GI_{STI50} - bzw. LC_{STI50} -Werte der Koinkubationsmesswerte unterschieden sich zum Teil von den GI_{50} - bzw. LC_{50} -Werten der Monoinkubationsmesswerte.

Für die Zelllinie CADO-ES-1 konnte nach 48 h durch STI 571 eine Steigerung des wachstumshemmenden Effektes von Etoposid ca. um den Faktor 5 beobachtet werden. Nach 72 h Koinkubation konnten wegen zu hoher Standardabweichungen der 10 μ M Etoposid-plus-STI 571-Messwerte keine GI_{STI50} - und LC_{STI50} -Werte berechnet werden. Nach 96 h waren zwischen den wachstumshemmenden Effekten der Etoposid-Monoexposition und den Koinkubationen von Etoposid mit STI 571 keine Unterschiede mehr zu sehen. Auch eine Steigerung des zytotoxischen Effektes konnte bei CADO-ES-1 nach 48 h erfasst werden. Nach 96 h hingegen wurde bei CADO-ES-1 in den Koexpositionsexperimenten eine Reduktion der Etoposid-Toxizität beobachtet. Allerdings befand sich die Zelllinie im Monoinkubationsversuch im Gegensatz zum Koinkubationsversuch nach 96 h nicht mehr in der Wachstumsphase. Weiterhin wurden bei CADO-ES-1 die LC_{STI50} -Werte mit 111 μ M bzw. 109 μ M und der LC_{50} -Wert mit 90,1 μ M Etoposid erreicht. Die LC_{STI50} -Werte liegen somit außerhalb des Monoinkubationsmessbereichs, der nur bis 100 μ M reicht, und sind daher nicht in der Tabelle vermerkt.

Die Koinkubation von Etoposid mit STI 571 führte bei den Zelllinien VH-64 und STA-ET-2.1 nach 48 h und 72 h ebenfalls zu einer stärkeren Wachstumshemmung als im Einzelinkubationsversuch. Dabei wurde eine Steigerung des wachstumshemmenden Effektes zwischen 50 % und 80 % im Vergleich zur Monoexposition ermittelt. Ebenso konnte eine Steigerung der Zytotoxizität nach 48 h und 72 h bei diesen Zelllinien beobachtet werden. Nach 96 h nivellierte sich der Unterschied zwischen den wachstumshemmenden Effekten der Koinkubationen und der Monoexposition. Bei der Zelllinie STA-ET-2.1 konnte nach 96 h unter Koinkubation mit STI 571 ein erneutes Ansteigen der benötigten GI_{STI50} -Konzentrationen beobachtet werden.

Hingegen zeigte sich bei der gegenüber Etoposid sensibelsten Zelllinie STA-ET-1 nach 48 h und 72 h für die Kombination mit STI 571 eine Abschwächung des wachstumshemmenden Effektes im Vergleich zu Etoposid allein.

		Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz					
CADO-ES-1	Etoposid	GI ₅₀ [μM]	▶	48,0	9,41	4,25
	Etoposid+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	8,98	NA	5,16
	Etoposid+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	8,01	NA	4,73
VH-64	Etoposid	GI ₅₀ [μM]	▶	35,8	7,92	0,729
	Etoposid+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	18,5	2,23	0,965
	Etoposid+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	13,6	2,59	1,26
STA-ET-1	Etoposid	GI ₅₀ [μM]	▶	1,32	0,915	0,863
	Etoposid+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	20,2	2,20	0,892
	Etoposid+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	12,7	5,29	0,876
STA-ET-2.1	Etoposid	GI ₅₀ [μM]	▶	50,5	21,7	2,29
	Etoposid+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	19,8	4,07	3,06
	Etoposid+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	17,2	4,57	12,0

Tab. 33: GI₅₀-Werte der Testsubstanz Etoposid im Einzelversuch und GI_{STI50}-Werte des Koinkubationsversuchs Etoposid und STI 571

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz	Konzentration für vergleichbaren antiproliferativen Effekt [%]			
CADO-ES-1	Etoposid	▶	100%	NA	100%
	Etoposid+STI 0,1 μM	▶	19%	NA	121%
	Etoposid+STI 1,0 μM	▶	17%	NA	111%
VH-64	Etoposid	▶	100%	100%	100%
	Etoposid+STI 0,1 μM	▶	52%	28%	132%
	Etoposid+STI 1,0 μM	▶	38%	33%	173%
STA-ET-1	Etoposid	▶	100%	100%	100%
	Etoposid+STI 0,1 μM	▶	1529%	240%	103%
	Etoposid+STI 1,0 μM	▶	961%	578%	102%
STA-ET-2.1	Etoposid	▶	100%	100%	100%
	Etoposid+STI 0,1 μM	▶	39%	19%	133%
	Etoposid+STI 1,0 μM	▶	34%	21%	522%

Tab. 34: Vergleich der antiproliferativen Effekte von Etoposid im Einzelversuch und im Koinkubationsversuch mit STI 571 durch Berechnung der prozentualen Unterschiede zwischen GI₅₀- und GI_{STI50}-Werten

		Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz					
CADO-ES-1	Etoposid	LC ₅₀ [µM]	▶	▶	NA	90,1
	Etoposid+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	93,6	NA	▶
	Etoposid+STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	57,2	NA	▶
VH-64	Etoposid	LC ₅₀ [µM]	▶	▶	76,7	29,2
	Etoposid+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	39,8	29,1	17,8
	Etoposid+STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	37,1	23,2	19,8
STA-ET-1	Etoposid	LC ₅₀ [µM]	▶	89,1	60,5	49,3
	Etoposid+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	84,4	39,4	52,5
	Etoposid+STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	55,6	42,6	55,6
STA-ET-2.1	Etoposid	LC ₅₀ [µM]	▶	▶	▶	▶
	Etoposid+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	67,0	35,8	52,0
	Etoposid+STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	50,6	44,1	53,5

Tab. 35: LC₅₀-Werte der Testsubstanz Etoposid im Einzelversuch und LC_{STI50}-Werte des Koinkubationsversuchs Etoposid und STI 571

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50 %
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50 %
- NA nicht auswertbar

3.2.2 Vincristin in Kombination mit STI 571

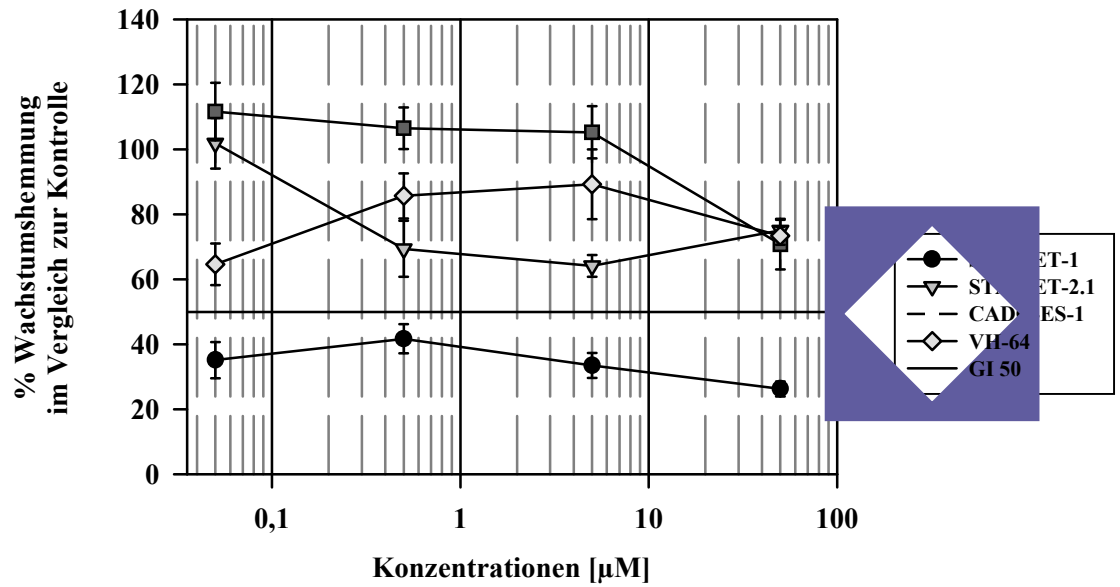


Abb. 24 Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Vincristin

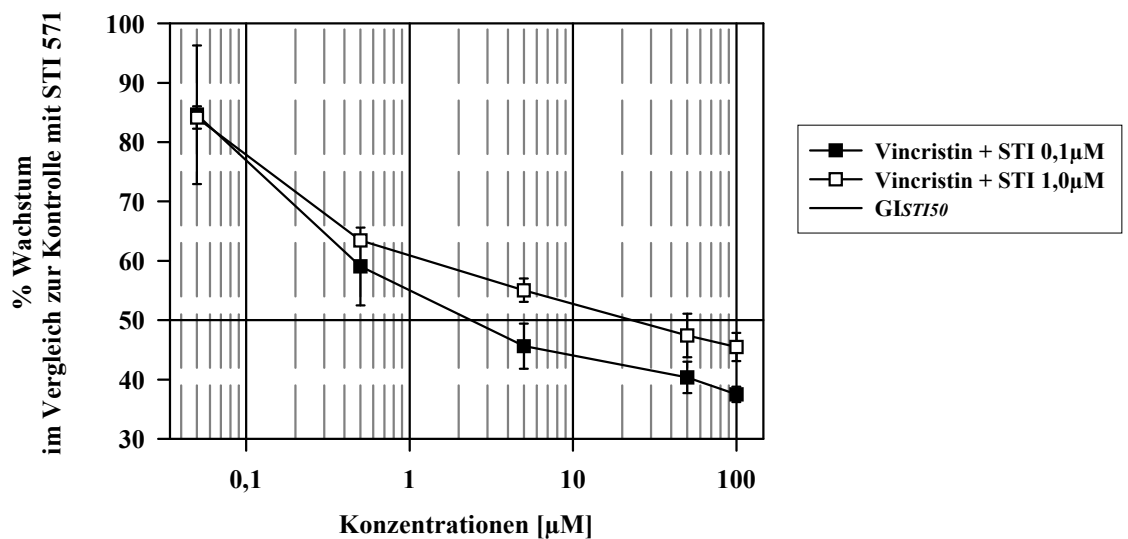


Abb. 25 In-vitro-Chemosensitivität von CADO-ES-1 nach 48 h Inkubation mit Vincristin in Kombination mit STI 571

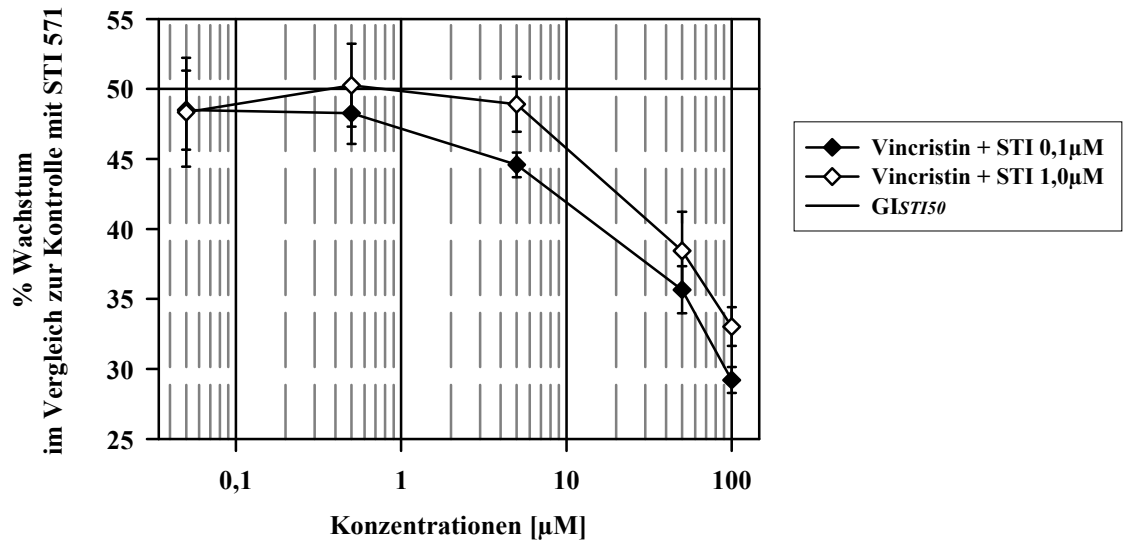


Abb. 26: In-vitro-Chemosensitivität von VH-64 nach 48 h Inkubation mit Vincristin in Kombination mit STI 571

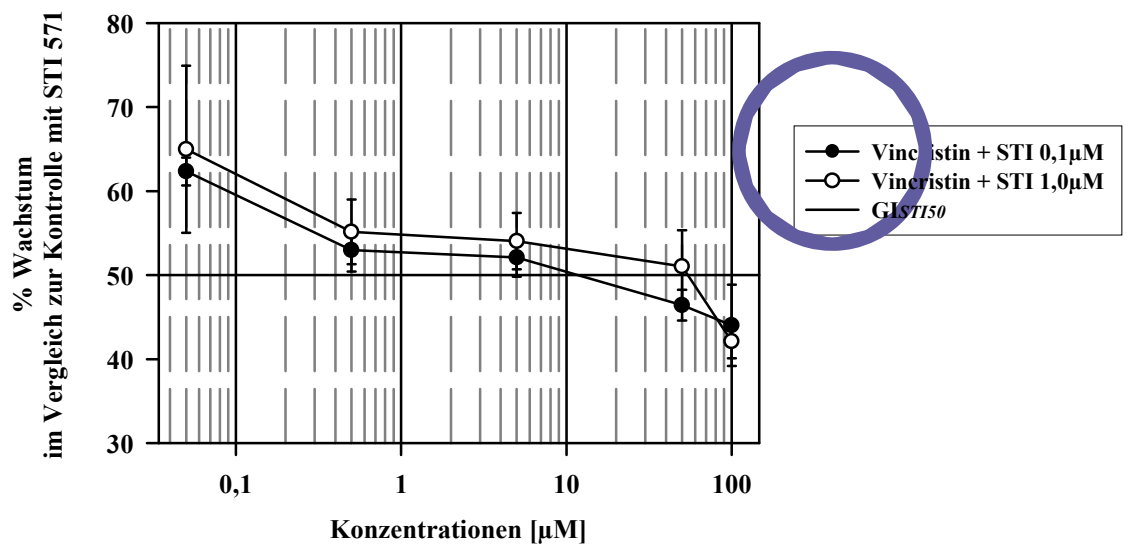


Abb. 27: In-vitro-Chemosensitivität von STA-ET-1 nach 48 h Inkubation mit Vincristin in Kombination mit STI 571

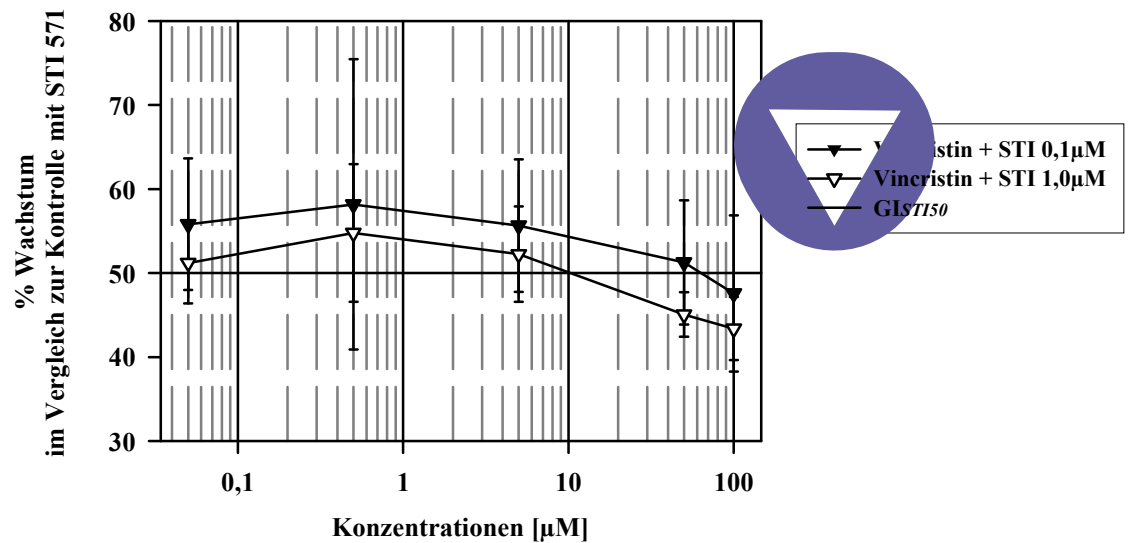


Abb. 28: In-vitro-Chemosensitivität von STA-ET-2.1 nach 48 h Inkubation mit Vincristin in Kombination mit STI 571

Die Abb. 24 zeigt die Dosis-Wirkungskurven der untersuchten Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Vincristin. Die vier Zelllinien reagierten gegenüber Vincristin unterschiedlich sensibel. STA-ET-1 war am sensibelsten: alle getesteten Konzentrationen bewirkten eine Reduktion der Zellzahl auf unter 50 %. Die Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 reagierten resistenter, bei keiner Testkonzentration wurde ein GI_{50} -Wert erreicht.

Die Dosis-Wirkungskurven jeder einzelnen Zelllinie nach 48 h Inkubation mit Vincristin in Kombination mit STI 571 in den Konzentrationen 0,1 μM oder 1,0 μM sind in den Grafiken Abb. 25 bis Abb. 28 wiedergegeben. Es ließ sich bei diesem und jedem anderen untersuchten Messzeitpunkt bei keiner Zelllinie ein deutlicher Unterschied zwischen Koinkubation mit 0,1 μM oder 1,0 μM STI 571 erkennen.

Es wurden aber Unterschiede zwischen Inkubation mit und ohne STI 571 beobachtet.

Die Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 reagierten sensibler, STA-ET-1 resistenter auf die Koexposition Vincristin mit STI 571.

Die Tab. 36 gibt die rechnerisch ermittelten GI_{50} - und GI_{STI50} -Werte für alle Messzeitpunkte und Zelllinien wieder. Die Tab. 37 zeigt ergänzend die LC_{50} - und LC_{STI50} -Werte dieser Versuchsreihe. In vielen Fällen konnten keine Prozentwerte berechnet werden, da das Zellwachstum bei den untersuchten Vincristinkonzentrationen entweder zu mehr oder zu weniger als 50 % gehemmt wurde. Daher wird für Vincristin auch keine Tabelle mit Prozentwerten angegeben.

Nach 24 h wurde bei keiner der untersuchten Zelllinien mit den getesteten Vincristinkonzentrationen eine 50 %-ige Wachstumshemmung erfasst. Nach 48 h Inkubationszeit wurde bei allen vier untersuchten Zelllinien eine Modulation der Vincristinwirkung durch Kombination mit STI 571 beobachtet. Bei den Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 wurden im Koinkubationsversuch stärkere wachstumshemmende Effekte erhoben als in den Monoexpositionen. Anders reagierte die Zelllinie STA-ET-1. Hier wurde nach 48 h eine Abschwächung der wachstumshemmenden Vincristinwirkung im Koexpositionansatz vermerkt. Nach 72 h zeigten sich nur noch bei CADO-ES-1 und STA-ET-1 Unterschiede zwischen Monoinkubation und Koinkubation. Beide waren im Koinkubationsversuch sensibler gegenüber Vincristin. Dieser Trend setzte sich auch nach 96 h fort. Bezüglich der Zytotoxizität wurden zum Teil zeitlich versetzt ähnliche Beobachtungen wie bei der Wachstumshemmung gemacht. Bei CADO-ES-1 kam es nach 96 h zur Steigerung der Vincristin-Toxizität in Kombination mit STI 571. Auch VH-64 zeigte sich nach 48 h und 72 h Koexposition sensibler gegenüber Vincristin. Nach 96 h nivellierten sich die Werte LC_{STI50} -Werte der Koinkubationsversuche und LC_{50} -Werte der Monoexposition. Die STI 571 Koinkubation wirkte nach 72 h und nach 96 h auf die Zelllinie STA-ET-2.1 zytotoxischer, auf STA-ET-1 hingegen weniger zytotoxisch.

Zelllinie	Testsubstanz	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
CADO-ES-1	Vincristin	GI ₅₀ [μM]	▶	▶	36,7	▶
	Vincristin+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	2,35	0,626	0,445
	Vincristin+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	22,9	0,362	0,478
VH-64	Vincristin	GI ₅₀ [μM]	▶	▶	◀	◀
	Vincristin+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	◀	◀	◀
	Vincristin+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	◀	◀	◀
STA-ET-1	Vincristin	GI ₅₀ [μM]	▶	◀	◀	◀
	Vincristin+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	11,7	◀	◀
	Vincristin+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	54,1	◀	◀
STA-ET-2.1	Vincristin	GI ₅₀ [μM]	▶	▶	0,642	0,453
	Vincristin+STI 0,1 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	63,3	◀	◀
	Vincristin+STI 1,0 μM	GI _{STI50} [μM]	▶	10,2	◀	◀

Tab. 36: GI₅₀-Werte der Testsubstanz Vincristin im Einzelversuch und GI_{STI50}-Werte des Koinkubationsversuchs Vincristin und STI 571

Zelllinie	Testsubstanz	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
CADO-ES-1	Vincristin	LC ₅₀ [μM]	▶	▶	▶	▶
	Vincristin+STI 0,1 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	▶	▶	83,2
	Vincristin+STI 1,0 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	▶	▶	78,9
VH-64	Vincristin	LC ₅₀ [μM]	▶	▶	▶	◀
	Vincristin+STI 0,1 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	57,9	56,0	◀
	Vincristin+STI 1,0 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	60,7	54,5	◀
STA-ET-1	Vincristin	LC ₅₀ [μM]	▶	▶	0,500■	◀
	Vincristin+STI 0,1 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	▶	0,325	0,152
	Vincristin+STI 1,0 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	▶	1,48	0,481
STA-ET-2.1	Vincristin	LC ₅₀ [μM]	▶	▶	▶	22,6■
	Vincristin+STI 0,1 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	▶	0,186■	0,200■
	Vincristin+STI 1,0 μM	LC _{STI50} [μM]	▶	▶	0,120	▶

Tab. 37: LC₅₀-Werte der Testsubstanz Vincristin im Einzelversuch und LC_{STI50}-Werte des Koinkubationsversuchs Vincristin und STI 571

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50 %
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50 %
- Wachstum um +/- 50 % bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen

3.2.3 Gemcitabin in Kombination mit STI 571

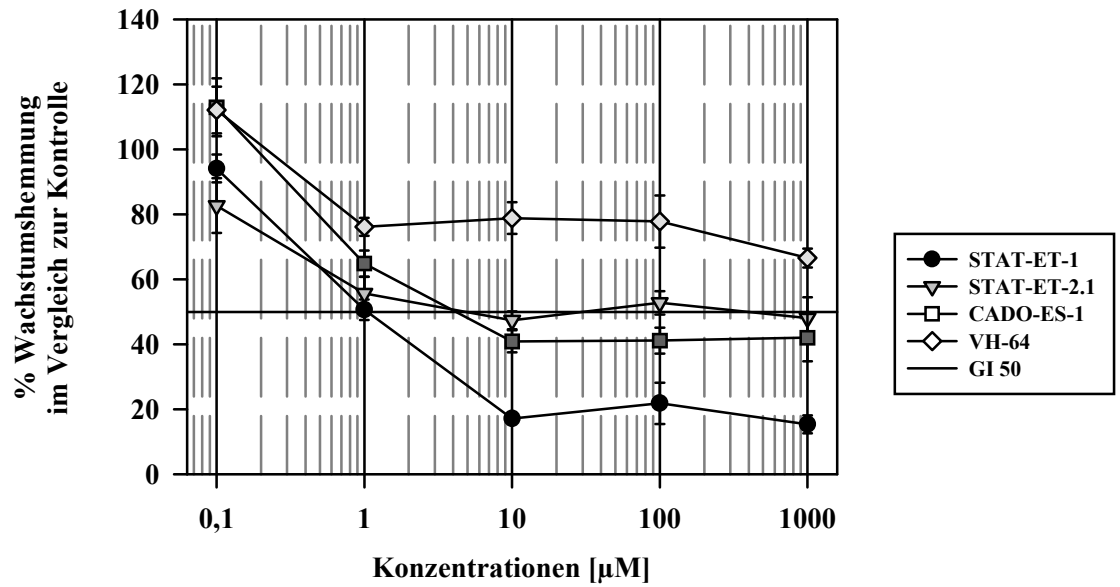


Abb. 29 Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Gemcitabin

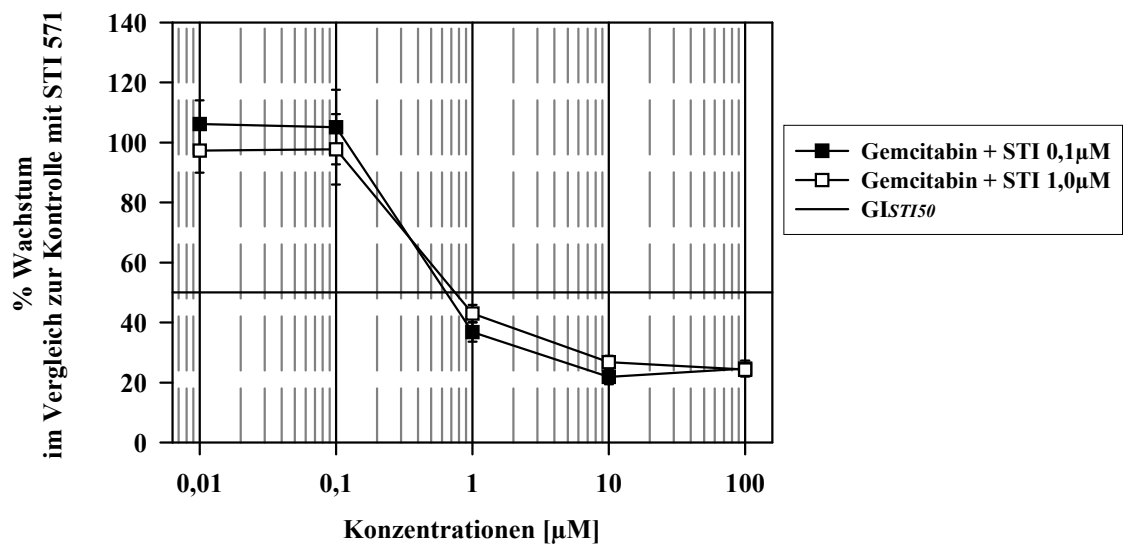


Abb. 30: In-vitro-Chemosensitivität von CADO-ES-1 nach 48 h Inkubation mit Gemcitabin in Kombination mit STI 571

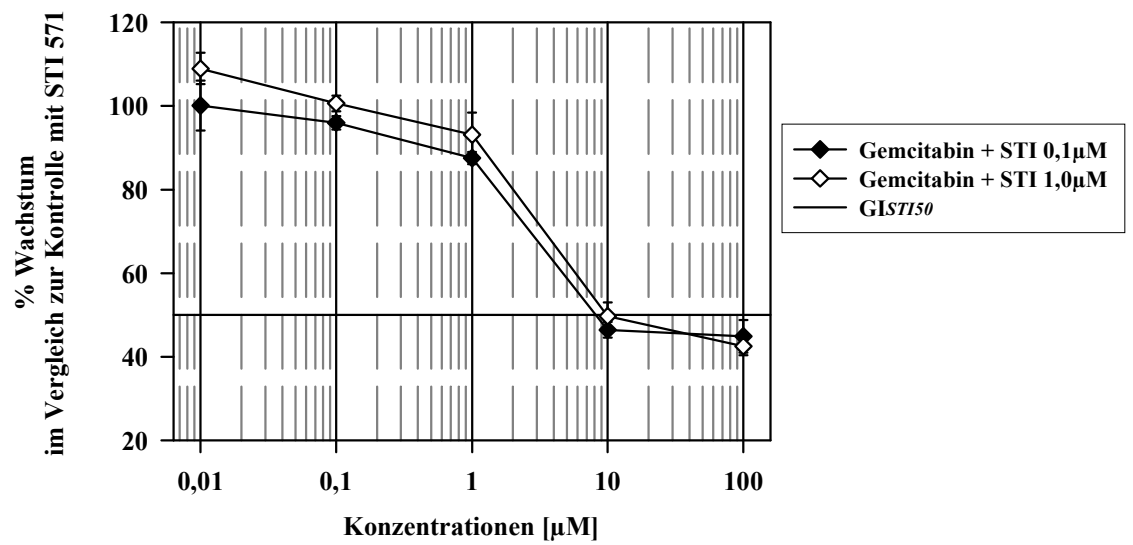


Abb. 31: In-vitro-Chemosensitivität von VH-64 nach 48 h Inkubation mit Gemcitabin in Kombination mit STI 571

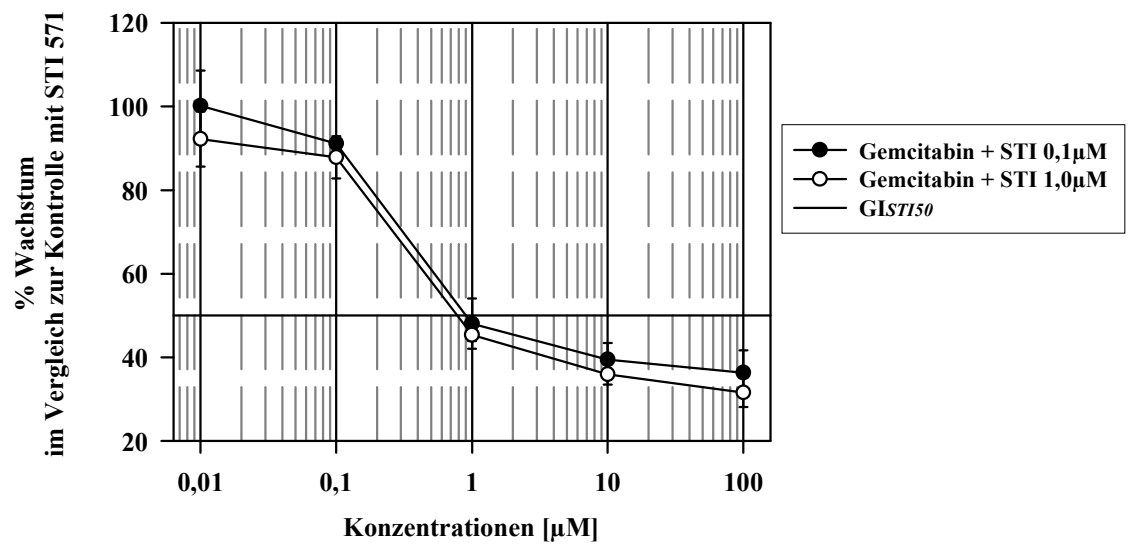


Abb. 32: In-vitro-Chemosensitivität von STA-ET-1 nach 48 h Inkubation mit Gemcitabin in Kombination mit STI 571

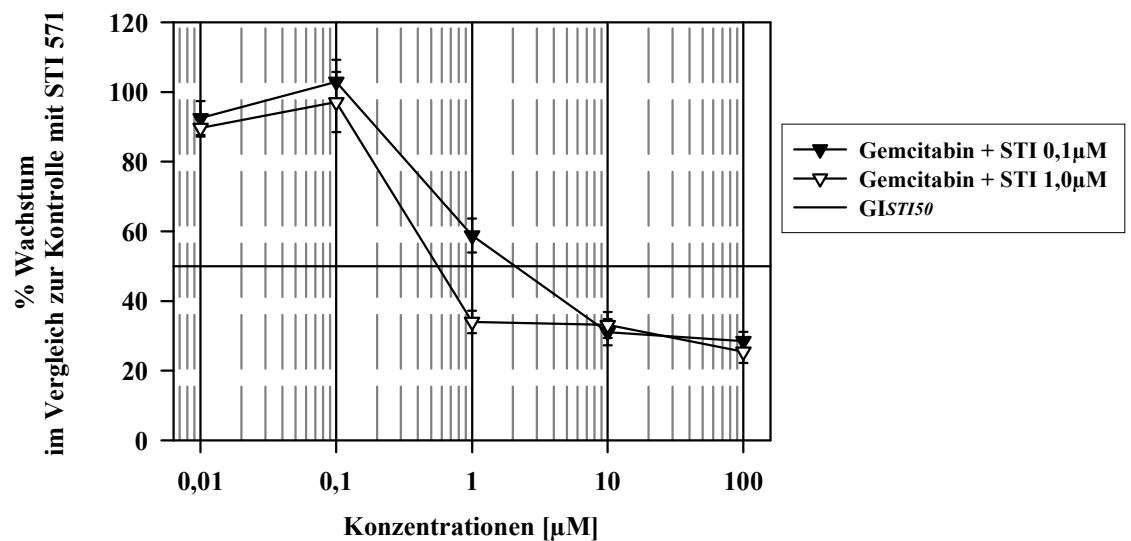


Abb. 33: In-vitro-Chemosensitivität von STA-ET-2.1 nach 48 h Inkubation mit Gemcitabin in Kombination mit STI 571

In der Abb. 29 sind die Dosis-Wirkungskurven der vier getesteten Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Gemcitabin dargestellt. Es wurden jeweils die 1 μM -Werte der niedrigkonzentrierten Testreihe zur graphischen und rechnerischen Auswertung gewählt. Die Zelllinien reagierten unterschiedlich sensibel. Mit einer Konzentration von 1,0 μM Gemcitabin bei den Zelllinien VH-64 und STA-ET-2.1 bzw. 10 μM Gemcitabin bei CADO-ES-1 und STA-ET wurde jeweils die maximale Wachstumshemmung erzielt. Diese konnte durch die höheren getesteten Gemcitabinkonzentrationen nicht gesteigert werden. Allerdings konnte nach einer 48 h Exposition bei VH-64 keine 50 %-ige Wachstumshemmung beobachtet werden, während bei STA-ET-1, CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 nach 48 h Gemcitabin-Inkubation eine 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht wurde. Insgesamt wurde nach 48 h Gemcitabininkubation bei STA-ET-1 die höchste, bei VH-64 die niedrigste Wachstumshemmung beobachtet.

Die Abb. 30 bis Abb. 33 zeigen zum Vergleich die Dosis-Wirkungskurven für jede Zelllinie einzeln nach 48 h Inkubation mit Gemcitabin in Kombination mit STI 571 in den Konzentrationen 0,1 μM oder 1,0 μM . Die Dosis-Wirkungskurven der Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-1 waren für die STI 571 Konzentrationen von 0,1 μM und 1,0 μM fast deckungsgleich. Bei STA-ET-2.1 wichen nur die Messwerte für 1,0 μM Gemcitabin plus STI 571 0,1 μM bzw. 1,0 μM um 34 % voneinander ab, die anderen Messwerte waren ebenfalls dicht beieinander.

Zu den anderen untersuchten Messzeitpunkten konnte bei keiner Zelllinie ein Unterschied zwischen den beiden STI 571 Inkubationen beobachtet werden.

Die Dosiswirkungskurven der Monoinkubationsversuche unterschieden sich zum Teil von denen der Koinkubationsversuche. CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 reagierten sensibler auf Gemcitabin in Koexposition. STA-ET-1 zeigte im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 1,0 μM und bei 100 μM Gemcitabin keine Unterschiede zwischen Mono- und Koexpositionsversuch. Nur die Messwerte bei 10 μM Gemcitabin wichen um den Faktor 2 voneinander ab.

In Tab. 38 sind die rechnerisch ermittelten GI_{50} und $\text{GI}_{\text{STI}50}$ -Werte für alle untersuchten Messzeitpunkte und Zelllinien abzulesen. Die Tab. 39 führt ergänzend an, mit welchem Prozentsatz der Gemcitabin-Konzentration des Einzelversuchs die $\text{GI}_{\text{STI}50}$ -Werte der Koinkubationsversuche erreicht wurden. In der Tab. 40 sind die rechnerisch ermittelten LC_{50} - und $\text{LC}_{\text{STI}50}$ -Werte des Versuchs wiedergegeben.

Nach 24 h wurde bei keiner der getesteten Zelllinien mit den untersuchten Gemcitabin-Konzentrationen eine 50 %-ige Wachstumshemmung beobachtet.

Nach 48 h Inkubationszeit steigerte STI 571 die wachstumshemmenden Effekte von Gemcitabin bei den Zelllinien CADO-ES-1, STA-ET-2.1 und VH-64 in unterschiedlichem Ausmaß. Bei CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 wurde das Zellwachstum mit um den Faktor 6 bis 9 geringen Gemcitabinkonzentrationen als im Einzelinkubationsversuch auf 50 % reduziert. Nach 72 h und 96 h waren bei den Zelllinien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 die wachstumshemmenden Effekte der Gemcitabinmono- und Koinkubation jeweils vergleichbar.

Anders als im Monoinkubationsansatz wurde auch bei der Zelllinie VH-64 im Koinkubationsversuch nach 48 h eine 50 %-ige Wachstumshemmung erzielt. Da bei der Monoexposition der Anteil vitaler Zellen nicht zu 50 % gesenkt wurde, konnten für die Zelllinie VH-64 keine Prozentwerte berechnet werden. Nach 72 h und 96 h wurden gegenteilige Beobachtungen gemacht. VH-64 benötigte nach 72 h im Koinkubationsversuch die ca. 3,5-fache Dosis Gemcitabin des Einzelversuchs. Durch Koinkubation mit STI 571 kam es nach 72 h und 96 h zur Reduktion der wachstumshemmenden Effekte von Gemcitabin.

Bei der Zelllinie STA-ET-1 wurden zu allen Messzeitpunkten nur geringe Unterschiede zwischen den Gemcitabin-Konzentrationen zur 50 %-igen Wachstumsreduktion im Mono- und Koexpositionsversuch ermittelt.

Bezüglich der Änderung der zytotoxischen Effekte von Gemcitabin durch Koinkubation mit STI 571 wurden analoge Beobachtungen teilweise zeitlich versetzt gemacht.

Durch Koinkubation mit STI 571 wurde eine Steigerung des zytotoxischen Gemcitabin-Effekts bei CADO-ES-1 nach 48 h, 72 h und 96 h und bei STA-ET-2.1 nach 72 h und 96 h beobachtet.

Bei der Zelllinie VH-64 wurde zunächst nach 72 h eine Verstärkung der zytotoxischen Effekte durch STI 571 ermittelt. Nach 96 h hingegen eine Abschwächung der Gemcitabin-Zytotoxizität durch Koexposition mit STI 571 gesehen.

Bei STA-ET-1 zeigte sich nach 48 h eine geringere Zytotoxizität von Gemcitabin durch Koinkubation mit STI 571. Nach 72 h kam es zur Steigerung der Zytotoxizität im Koinkubationsansatz. Nach 96 h wurde bei STA-ET-1 eine Nivellierung der LC_{50} - und LC_{STI50} -Werte beobachtet.

		Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz					
CADO-ES-1	Gemcitabin	GI_{50} [μ M]	▶	4,17*	0,413	0,371
	Gemcitabin+STI 0,1 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	0,640	0,429	0,393
	Gemcitabin+STI 1,0 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	0,744	0,464	0,426
VH-64	Gemcitabin	GI_{50} [μ M]	▶	▶	1,23*	0,885
	Gemcitabin+STI 0,1 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	8,19*	4,03	2,57
	Gemcitabin+STI 1,0 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	9,85	4,48	3,02
STA-ET-1	Gemcitabin	GI_{50} [μ M]	▶	1,05*	0,431	0,280
	Gemcitabin+STI 0,1 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	0,901	0,315	0,275
	Gemcitabin+STI 1,0 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	0,776	0,320	0,284
STA-ET-2.1	Gemcitabin	GI_{50} [μ M]	▶	4,85*	0,553	0,433
	Gemcitabin+STI 0,1 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	2,08	0,420	0,381
	Gemcitabin+STI 1,0 μ M	GI_{STI50} [μ M]	▶	0,558	0,463	0,438

Tab. 38: GI_{50} -Werte der Testsubstanz Gemcitabin im Einzelversuch und GI_{STI50} -Werte des Koinkubationsversuchs Gemcitabin und STI 571

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz	Konzentration für vergleichbaren antiproliferativen Effekt [%]			
CADO-ES-1	Gemcitabin	▶	100%	100%	100%
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	▶	15%	104%	106%
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	▶	18%	112%	115%
VH-64	Gemcitabin	▶	NB	100%	100%
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	▶	NB	329%	290%
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	▶	NB	365%	341%
STA-ET-1	Gemcitabin	▶	100%	100%	100%
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	▶	86%	73%	98%
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	▶	74%	74%	101%
STA-ET-2.1	Gemcitabin	▶	100%	100%	100%
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	▶	43%	76%	88%
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	▶	12%	84%	101%

Tab. 39: Vergleich der antiproliferativen Effekte von Gemcitabin im Einzelversuch und im Koinkubationsversuch mit STI 571 durch Berechnung der prozentualen Unterschiede zwischen GI_{50} - und GI_{STI50} -Werten

		Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz					
CADO-ES-1	Gemcitabin	LC_{50} [µM]	▶	▶	8,34	1,32
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	4,48	0,828	0,886
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	4,83	0,946	0,939
VH-64	Gemcitabin	LC_{50} [µM]	▶	▶	▶	8,74
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	▶	25,8	12,9
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	▶	25,5	15,1
STA-ET-1	Gemcitabin	LC_{50} [µM]	▶	8,42	3,83	0,885
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	▶	1,22	0,682
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	▶	0,956	0,730
STA-ET-2.1	Gemcitabin	LC_{50} [µM]	▶	▶	▶	9,21
	Gemcitabin+STI 0,1 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	▶	1,91	0,952
	Gemcitabin+STI 1,0 µM	LC_{STI50} [µM]	▶	▶	17,8	0,943

Tab. 40: LC_{50} -Werte der Testsubstanz Gemcitabin im Einzelversuch und LC_{STI50} -Werte des Koinkubationsversuchs Gemcitabin und STI571

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50 %
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50 %
- Wachstum um +/- 50 % bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen
- * Wert errechnet sich aus zwei Messreihen
- NB keine prozentuale Auswertung vorgenommen

3.2.4 Cytarabin in Kombination mit STI 571

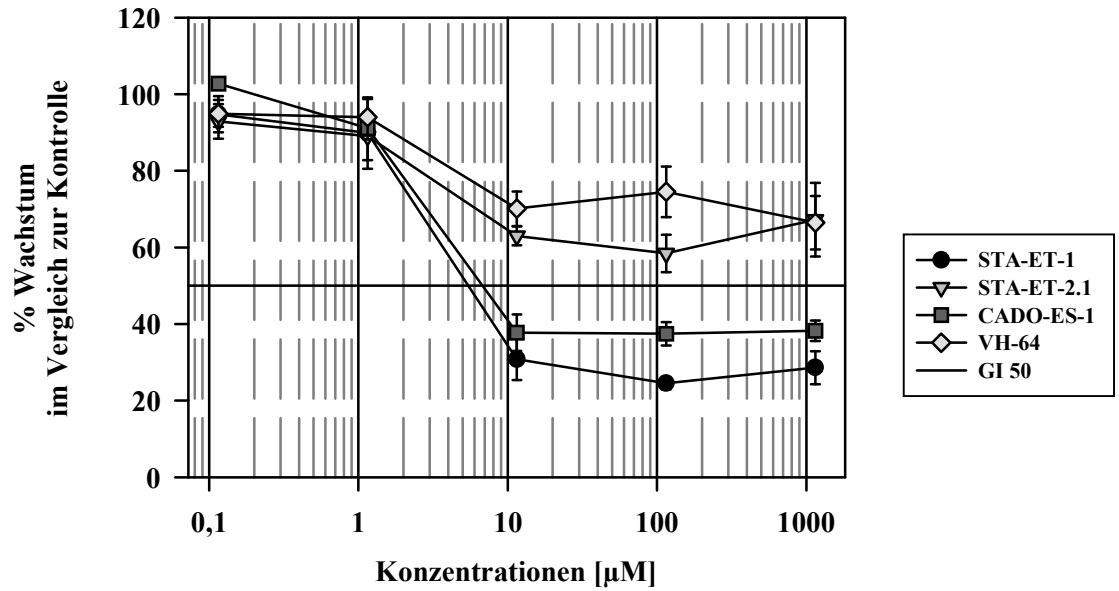


Abb. 34: Vergleich der In-vitro-Chemosensitivität von vier Ewing-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Cytarabin

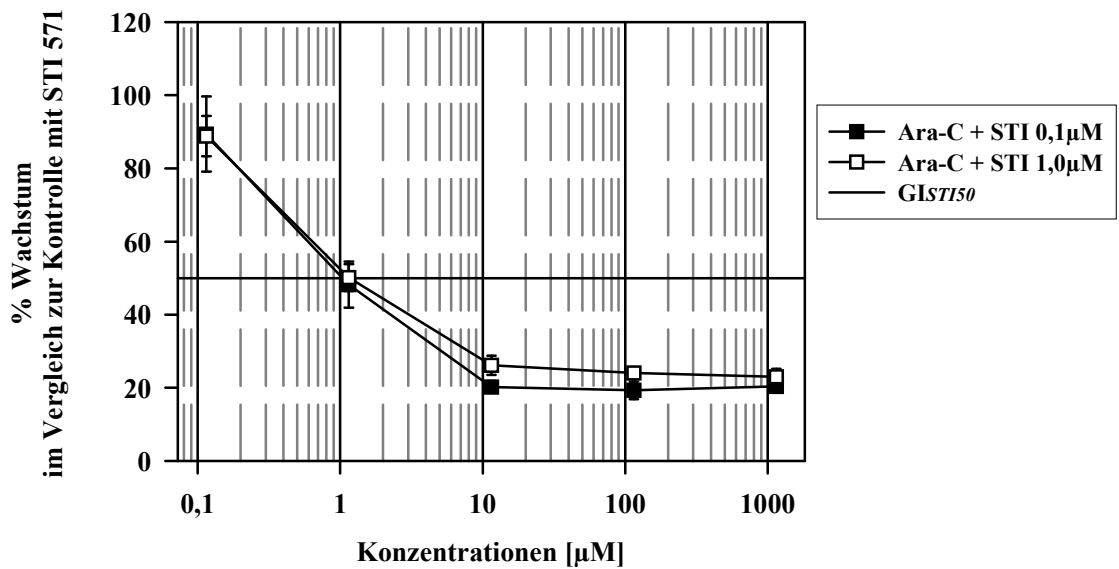


Abb. 35: In-vitro-Chemosensitivität von CADO-ES-1 nach 48 h Inkubation mit Cytarabin in Kombination mit STI 571

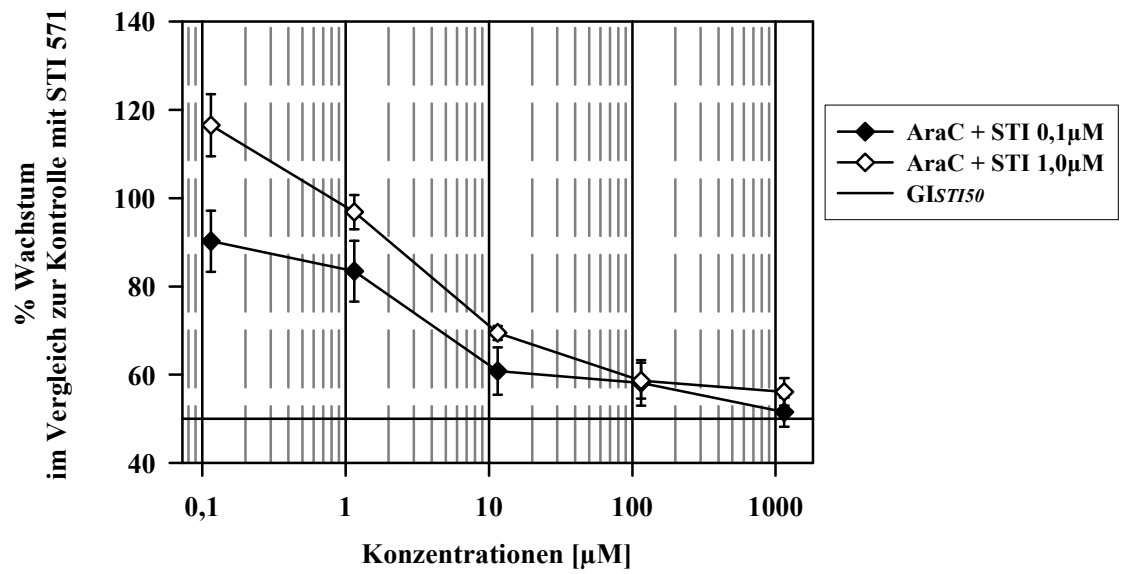


Abb. 36: In-vitro-Chemosensitivität von VH-64 nach 48 h Inkubation mit Cytarabin in Kombination mit STI 571

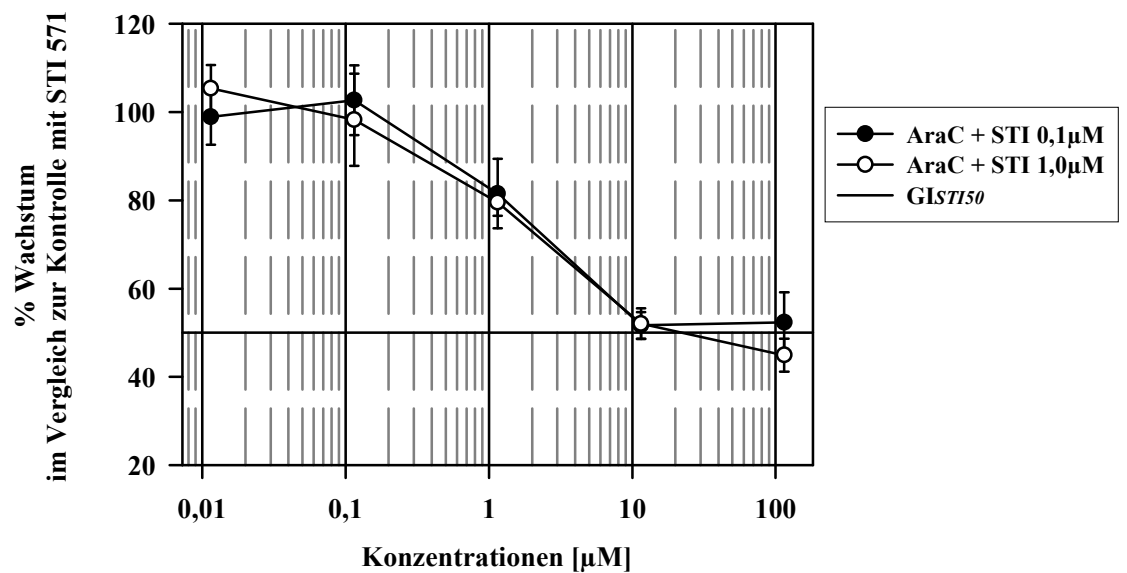


Abb. 37: In-vitro-Chemosensitivität von STA-ET-1 nach 48 h Inkubation mit Cytarabin in Kombination mit STI 571

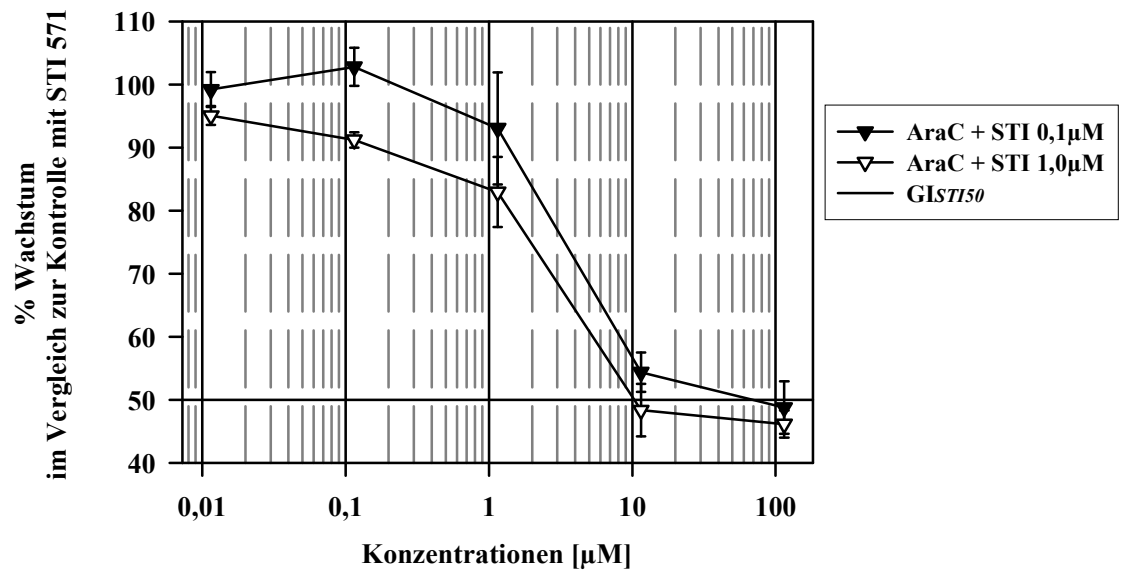


Abb. 38: In-vitro-Chemosensitivität von STA-ET-2.1 nach 48 h Inkubation mit Cytarabin in Kombination mit STI 571

In der Abb. 34 werden die Dosis-Wirkungskurven der vier untersuchten Zelllinien nach 48 h Monoinkubation mit Cytarabin miteinander verglichen. Für die graphische und rechnerische Auswertung wurden die 1,15 µM-Werte der niedrigkonzentrierten Testreihe benutzt. Nach 48 h Einzelinkubation reagierten die Zelllinien STA-ET-1 und CADO-ES-1 sensibler auf Cytarabin als STA-ET-2.1 und VH-64. Bei CADO-ES-1 und STA-ET-1 wurde das Wachstum zu mehr als 50 % reduziert, bei STA-ET-2.1 und VH-64 nicht. Bei allen untersuchten Zelllinien wurde nach 48 h die maximale Wachstumshemmung mit einer Konzentration von 11,5 µM Cytarabin erreicht. Höhere Cytarabin-Dosierungen konnten den Anteil vitaler Zellen nicht weiter verringern.

Die Abb. 35 bis Abb. 38 geben die Dosis-Wirkungskurven der einzelnen untersuchten Zelllinien nach 48 h Koinkubation von Cytarabin in verschiedenen Testkonzentrationen mit STI 571 in einer Dosis von 0,1 µM oder 1,0 µM wieder. Die 48 h-Kurven für die beiden untersuchten STI 571-Konzentrationen waren bei allen Zelllinien nahezu kongruent. Auch an den übrigen Messzeitpunkten wurde diese Beobachtung gemacht.

Analog zu den Einzelversuchen wurde die maximale Wachstumshemmung jeweils mit 11,5 µM Cytarabin erreicht. CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 zeigten sich im Koinkubationsversuch sensibler als unter Einzelexposition mit Cytarabin.

Bei VH-64 wurde kein Unterschied zwischen Mono- und Koinkubationsversuch erhoben. Bei STA-ET-1 bewirkte Cytarabin eine stärkere Reduktion des Zellwachstums im Einzelversuch als im Koinkubationsversuch.

Die Tab. 41 gibt die errechneten GI_{50} - und GI_{STI50} -Werte für alle getesteten Zelllinien und Messzeitpunkte wieder. Die Tab. 42 zeigt, mit welchem Prozentsatz der Cytarabin-Konzentration des Einzelversuchs die GI_{STI50} -Werte der Koinkubationsversuche erreicht wurden. In der Tab. 43 sind die rechnerisch ermittelten LC_{50} - und LC_{STI50} -Werte der Versuchsreihe abzulesen.

Bei den Zelllinien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 wurden nach 48 h, 72 h und 96 h die wachstumshemmenden Effekte von Cytarabin durch Koinkubation mit STI 571 verstärkt. Es konnten für STA-ET-2.1 nach 48 h keine Prozentwerte berechnet werden, da im 48 h-Monoinkubationsversuch das Zellwachstum nicht auf 50 % reduziert wurde und so kein GI_{50} -Wert erreicht wurde. Bei VH-64 konnte nach 48 h kein Unterschied zwischen Mono- und Koinkubation beobachtet werden. Nach 72 h und 96 h dann steigerte STI 571 ebenfalls die Wachstumshemmung durch Cytarabin.

Bei STA-ET-1 fand nach 48 h zunächst eine Reduktion der wachstumshemmenden Wirkung des Cytarabins durch STI 571 statt. Nach 72 h wurde jedoch eine Steigerung der Cytarabin induzierten Wachstumshemmung durch STI 571 vermerkt. Nach 96 h kam es dann zur Nivellierung der GI_{50} - und GI_{STI50} -Werte.

Bei allen Zelllinien, jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wurde eine Steigerung der Zytotoxizität durch Koexposition von Cytarabin mit STI 571 beobachtet.

Bei CADO-ES-1 wurde analog zur Wachstumshemmung auch die Zytotoxizität nach 48 h, 72 h und 96 h gesteigert. Bei STA-ET-2.1 zeigte sich nach 72 h und 96 h eine erhöhte Cytarabin-Toxizität in Koinkubation. Die Zelllinien VH-64 und STA-ET-1 reagierten nach 96 h Inkubationszeit sensibler auf die Koinkubation mit STI 571.

		Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz					
CADO-ES-1	Cytarabin	GI ₅₀ [µM]	▶	6,79*	4,20*	2,54*
	Cytarabin+STI 0,1 µM	GI _{STI50} [µM]	■11,4	1,04	1,65	1,86
	Cytarabin+STI 1,0 µM	GI _{STI50} [µM]	7,25	1,17	1,88	2,20
VH-64	Cytarabin	GI ₅₀ [µM]	▶	▶	6,62*	3,53*
	Cytarabin+STI 0,1 µM	GI _{STI50} [µM]	▶	▶	5,50	2,52
	Cytarabin+STI 1,0 µM	GI _{STI50} [µM]	▶	▶	5,70	3,16
STA-ET-1	Cytarabin	GI ₅₀ [µM]	▶	5,44*	3,74*	2,80*
	Cytarabin+STI 0,1 µM	GI _{STI50} [µM]	▶	■11,5	2,82	3,00
	Cytarabin+STI 1,0 µM	GI _{STI50} [µM]	▶	22,3	1,87	3,10
STA-ET-2.1	Cytarabin	GI ₅₀ [µM]	▶	▶	8,93*	6,52*
	Cytarabin+STI 0,1 µM	GI _{STI50} [µM]	▶	69,6	3,79	3,41
	Cytarabin+STI 1,0 µM	GI _{STI50} [µM]	▶	10,3	4,16	3,40

Tab. 41: GI₅₀-Werte der Testsubstanz Cytarabin im Einzelversuch und GI_{STI50}-Werte des Koinkubationsversuchs Cytarabin und STI 571

	Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz	Konzentration für vergleichbaren antiproliferativen Effekt [%]			
CADO-ES-1	Cytarabin	▶	100%	100%	100%
	Cytarabin+STI 0,1 µM	▶	15%	39%	73%
	Cytarabin+STI 1,0 µM	▶	17%	45%	86%
VH-64	Cytarabin	▶	▶	100%	100%
	Cytarabin+STI 0,1 µM	▶	▶	83%	71%
	Cytarabin+STI 1,0 µM	▶	▶	86%	90%
STA-ET-1	Cytarabin	▶	100%	100%	100%
	Cytarabin+STI 0,1 µM	▶	211%	75%	107%
	Cytarabin+STI 1,0 µM	▶	409%	50%	111%
STA-ET-2.1	Cytarabin	▶	NB	100%	100%
	Cytarabin+STI 0,1 µM	▶	NB	42%	52%
	Cytarabin+STI 1,0 µM	▶	NB	47%	52%

Tab. 42: Vergleich der antiproliferativen Effekte von Cytarabin im Einzelversuch und im Koinkubationsversuch mit STI 571 durch Berechnung der prozentualen Unterschiede zwischen GI₅₀- und GI_{STI50}-Werten

		Zeit	24 h	48 h	72 h	96 h
Zelllinie	Testsubstanz					
CADO-ES-1	Cytarabin	LC ₅₀ [µM]	▶	▶	10,6	8,23
	Cytarabin+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	6,56,	4,97	7,13
	Cytarabin+STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	6,64	5,22	6,85
VH-64	Cytarabin	LC ₅₀ [µM]	▶	▶	▶	■28,8
	Cytarabin+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	▶	▶	23,0
	Cytarabin+STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	▶	▶	20,6
STA-ET-1	Cytarabin	LC ₅₀ [µM]	▶	▶	10,5	9,20
	Cytarabin+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	▶	11,4	7,47
	Cytarabin+STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	▶	10,3	7,45
STA-ET-2.1	Cytarabin	LC ₅₀ [µM]	▶	▶	▶	▶
	Cytarabin+STI 0,1 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	▶	17,5	10,2
	Cytarabin +STI 1,0 µM	LC _{STI50} [µM]	▶	▶	24,0	13,8

Tab. 43: LC₅₀-Werte der Testsubstanz Cytarabin im Einzelversuch und LC_{STI50}-Werte des Koinkubationsversuchs Cytarabin und STI 571

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50 %
- ◀ durchschnittliches Wachstum unter 50 %
- Wachstum um +/- 50 % bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen
- * Wert errechnet sich aus zwei Messreihen
- NB keine prozentuale Auswertung vorgenommen

4 Diskussion

4.1 Ist ein In-vitro-Zytotoxizitätsscreening bei Ewing-Tumoren sinnvoll?

Die Familie der ET zählt zur Gruppe der chemosensiblen Erkrankungen und eine systemische Chemotherapie ist weltweiter Therapiestandard für alle Stadien [95;113]. Dennoch ist die Prognose bei Patienten im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium immer noch schlecht [90;93]. Neue Therapiekonzepte und Medikamente müssen daher gefunden werden.

Seit vielen Jahren führt das US NCI mit Erfolg In-vitro-Screeningtests durch. Zelllinien der häufigsten Krebserkrankungen werden in Screening-Versuchen auf Chemosensibilität gegenüber zytotoxischen Substanzen untersucht. Auf diese Weise wurden bereits viele therapeutisch nutzbare Medikamente ermittelt. In dieser Untersuchungsreihe werden ET jedoch nicht überprüft [10]. Zur Zeit gibt es kein offizielles In-vitro-Screening-Programm, in dem ET systematisch untersucht werden.

Bei der In-vitro-Toxizitätstestung handelt es sich um ein experimentelles Modell. Es ist nicht eins zu eins auf den lebenden Organismus übertragbar. Die Verhältnisse im Körper und in vitro sind nicht vollkommen identisch. Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der Substanzen können sich unterscheiden. Durch Dosierung, Dosierungsintervalle und Applikationsweise, sowie Stoffwechselprozesse des Körpers ist die Exposition der Tumorzellen gegenüber den Testsubstanzen in vitro anders als in vivo [135].

So wurden im Versuch die Substanzen direkt auf die Zellen gegeben, während sie im Körper je nach Applikationsweise und Lokalisation des Tumors erst Barrieren wie z.B. den Magen-Darm-Trakt, die Blutbahn oder die Hirn-Liquorschranke passieren müssen, um zur Tumorzelle zu gelangen. Die Plasmahalbwertszeit unterliegt zum Teil großen individuellen Schwankungen [140;141]. Metabolisierungsprozesse können in Zellkultur anders ablaufen als im Organismus [135]. Einige Substanzen werden z.B. in der Leber zu ihren aktiven oder inaktiven Metaboliten verstoffwechselt. Lokale Einflüsse wie Vaskularisierung, Tumor-Stroma-Interaktion, Gewebhypoxie oder das Immunsystem des Körpers wurden nicht simuliert.

Auch gesunde Zellen kommen mit den Medikamenten in Kontakt. Das bedeutet, dass Substanzen, die in vitro in sehr hohen Konzentrationen zytotoxisch wirken, ebenfalls gesunde Zellen angreifen könnten. Dosislimitierende Nebenwirkungen in vivo sind daher nicht auszuschließen.

Die verwendeten ET-Zelllinien sind Subklone einer Zelle aus heterogenem Tumorgewebe. Teilweise handelt es sich um Zelllinien von vorbehandelten, therapieresistenten Tumoren [130]. Schon vor Versuchsbeginn hat somit eine Selektion stattgefunden. In Kultur könnten diese Subklone ein anderes Wachstumsverhalten zeigen als im Tumor. Durch Variablen wie die Dichte bei der Aussiedelung in Kulturflasche oder Vertiefung der Lochplatten, sowie unterschiedliche Reaktion der einzelnen Zellen auf die Trypsinisierung und Kryokonservierung könnte eine weitere Selektion stattgefunden haben [51].

Trotzdem bieten In-vitro-Zytotoxizitätstests eine Reihe von Vorteilen. Auch wenn ET zu den zweithäufigsten malignen Knochentumoren im Kindes- und Jugendalter zählen, so ist die Inzidenz gering [55]. Die Zelllinien hingegen sind stets verfügbar. Es ist ausreichend Material mit gleichen Eigenschaften für eine große Anzahl von Testansätzen vorhanden. Da die Zahl der therapeutisch wirksamen Medikamente begrenzt ist, viele Medikamente zahlreiche Nebenwirkungen zeigen, zum Teil das Risiko einer sekundären Tumorentwicklung besteht und häufig nur wenige oder keine Daten über den klinischen Einsatz der Medikamente bei Kindern vorliegen, ist es wichtig, eine Vorauswahl zytotoxisch wirksamer Substanzen in vitro zu treffen [92;94;95]. Diese können dann in nachfolgenden präklinischen und klinischen Studien weiter erprobt werden [69;100].

Von Ergebnissen der In-vitro-Toxizitätstestung kann zwar nicht ohne weiteres auf die Wirksamkeit in der klinischen Anwendung geschlossen werden. Dennoch handelt es sich um eine geeignete Methode, um Anhaltspunkte darüber zu bekommen, welche Wirkung die ausgewählten Substanzen zeigen könnten [10;39;51;60;64;69;87;100;112;142].

Ein systematisches In-vitro-Zytotoxizitätsscreening bei Ewing-Tumoren ist demnach sinnvoll.

4.2 **Handelt es sich beim MTT-Assay um eine geeignete Methode?**

Die Grundlagen des MTT-Tests wurden 1981 von Mosmann et al. entwickelt. Heute gibt es verschiedene Modifikationen, doch das Prinzip ist gleich geblieben. Die Stoffwechselaktivität vitaler Zellen wird ermittelt und so auf den Anteil vitaler Zellen im Testansatz geschlossen [87] (vgl. auch Kapitel 2.2.4: MTT-Test).

Mit dieser Methode wird die Zahl der stoffwechselaktiven Zellen bestimmt [14]. Zwischen Zytostase und Zytotoxizität kann nicht differenziert werden. Diese beiden verschiedenen Vorgänge werden mit dieser Messmethode zusammengefasst. Es kann vorkommen, dass so eine stärkere Wirkung ermittelt wird als bei alleiniger Messung des Zellüberlebens [59].

Weitere Fehlerquellen liegen u.a. bei der praktischen Durchführung des Tests. Für eine aussagekräftige Extinktion darf die Zellzahl im Testansatz weder zu hoch noch zu niedrig sein. Das Zellwachstum sollte nicht zu dicht sein, da die Zellen sonst an Substratmangel versterben könnten. Weiterhin sollten sich die Zellen über den ganzen Versuchszeitraum in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Bei einer zu hohen Zellzahl im Testansatz wird zu schnell ein plateauförmiges Wachstum erreicht, so dass der Versuch nicht auswertbar ist. Bei zu wenigen Zellen sind die Ergebnisse nicht reproduzierbar, da die Extinktion nicht mehr exakt bestimmt werden kann [51]. Die optimale Zellzahl wurde durch Wachstumsreihen vor Versuchsbeginn ermittelt, dennoch kann nicht stets die genau gleiche Zellzahl in jeder Versuchsreihe vorausgesetzt werden. Die Testsubstanzen wurden in den In-vitro-Toxizitätsversuchen erst nach 72 h zugesetzt, da die Zellen nicht unmittelbar nach ihrer Adhäsion in eine exponentielle Proliferationsphase eintreten.

In verschiedenen Studien konnten Übereinstimmungen von MTT-Testergebnissen mit dem klinischen Verhalten des Tumors beobachtet werden [39;60;64;69;112;122;142].

Von Xu et al. wurden Tumorzellen von 83 Patientinnen von insgesamt 156 Patientinnen mit fortgeschrittenem Brustkrebs mittels MTT-Test vor Chemotherapiebeginn untersucht. 73 der untersuchten Patientinnen wurden nach den Ergebnissen des MTT-Tests als sensibel eingestuft, 10 als nicht sensibel. Die Gruppe der sensiblen Patientinnen erhielt eine Chemotherapie nach Sensibilität. Die 10 nicht sensiblen Patientinnen, sowie eine Kontrollgruppe von weiteren 73 Patientinnen erhielten eine Chemotherapie nach klinischen Gesichtspunkten. Die Responderate der MTT-sensitiven Gruppe lag bei 76,7 % (56/73), die der nicht sensiblen Gruppe bei 0 % (0/10), die der Kontrollgruppe bei 43,8 % (32/73). Zwischen in vitro und in vivo Ergebnissen wurde eine Gesamtkoinzidenzrate von 79,5 % ermittelt [142].

Hwang et al. verglichen MTT-Testergebnisse in vitro mit klinischen Response bei 31 Patienten mit ALL. Es zeigten sich richtig-positiv-Werte in 91,3 % und richtig-negativ-Werte in 77,8 % der Fälle [64].

In einer Studie von Taylor et al. wurden 120 Patientinnen mit fortgeschrittenem Adeno-CA des Ovars untersucht. Bei den nach MTT-Test sensiblen Patientinnen lag die 5-Jahresüberlebensrate bei 24 %, im Vergleich lag die mittlere 5-Jahresüberlebensrate der Gruppe der laut MTT-Test nicht sensiblen Patientinnen nur bei 12 % [122].

Mit Hilfe des MTT-Assays konnten umfassende und aussagekräftige Datenmengen ermittelt werden [51;69;100]. Ein weiterer Vorteil ist die kostengünstige und schnelle Realisierung. Unter relativ einfachen Laborbedingungen können nach kurzer Zeit die Ergebnisse erhoben werden. Gerade für eine Screening-Reihe ist dies wichtig. Auch wenn die Aussagekraft ihre Grenzen hat, handelt es sich um ein geeignetes Verfahren zur Vorauswahl potentiell klinisch wirksamer Substanzen.

4.3 Auswertung der ermittelten Ergebnisse

Die Anzahl der getesteten Zytostatikakonzentrationen beeinflusst sowohl die graphische als auch die rechnerische Ermittlung der GI_{50} - und LC_{50} -Werte. Eine höhere Anzahl getesteter Zytostatikakonzentrationen ermöglicht eine genauere Abschätzung dieser Werte. Da in den Koinkubationsversuchen weniger Konzentrationen getestet wurden, sind diese Ergebnisse etwas ungenauer (vgl. auch Kapitel 2.2.7: Reproduzierbarkeit der Ergebnisse).

Die GI_{50} - und LC_{50} -Werte können sowohl logarithmisch als auch linear berechnet werden. Da die graphische Auswertung logarithmisch erfolgte, wurden auch die Werte logarithmisch berechnet. Im Idealfall wäre an den Dosis-Wirkungskurven ein sigmoidaler Abfall zu beobachten, d. h. bei der logarithmischen Berechnung der GI_{50} - und LC_{50} -Werte fließt ein geringerer Fehler mit ein. Zur Berechnung der GI_{50} - und LC_{50} -Werte wurden jeweils die Konzentrationen gewählt, die über bzw. unter 50 % Wachstum lagen. Hier liegt eine potentielle Fehlerquelle bzw. Unschärfe des Systems, da von einer Varianz der Werte ausgegangen werden muss und einige Konzentrationen nur knapp oberhalb oder unterhalb dieser Grenze lagen.

Insgesamt geben die Ergebnisse einen Anhalt, in welchem Konzentrationsbereich die einzelnen Substanzen in diesem Testsystem wirksam sind. Sie sind in diesem System miteinander vergleichbar. Die erhobenen Werte sind also nicht als absolute Werte zu sehen, sondern geben lediglich Anhaltspunkte für die eventuelle Wirksamkeit *in vivo*.

4.4 Welche Wirkung zeigen die getesteten Substanzen?

4.4.1 Etoposid

Etoposid ist seit vielen Jahren ein wichtiger Bestandteil der Therapieprotokolle zur Behandlung der ET [95]. Die Therapiepläne sind risikoadaptiert. Patienten aller Risikogruppen erhalten im EURO-E.W.I.N.G. 99-Protokoll zunächst Etoposid in Kombination mit Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin (VIDE-Schema) in einer Dosierung von $150 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ an den Tagen d1, d2, d3 als Teil der Induktionstherapie (vgl. auch Abb. 1 EURO-E.W.I.N.G.99, Therapieschema) [74]. Bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung konnte mit dieser Etoposidkombination eine 5-Jahres-Überlebensrate von mehr als 50 % erreicht werden [67].

Bei an ET erkrankten Hochrisikopatienten wird Etoposid als Bestandteil einer Hochdosistherapie in Kombination mit Stammzelltransplantation erprobt. Hier liegen die Etoposiddosierungen bei insgesamt 1800 mg/m^2 an den Tagen -6 bis -3 vor Stammzelltransplantation (Tag 0). Das entspricht $450 \text{ mg/m}^2/\text{d}$ [74]. Im Rahmen der Hochdosistherapie konnten verbesserte Überlebensprognosen zum Einen von Patienten mit primären Lungen- und Knochenmetastasen (5-Jahres-Überlebensrate 34% mit vs. 5% ohne HDT) und zum Anderen von Patienten mit einem Frührezidiv (< 2 Jahre) (4-Jahres-Überlebensrate 17 % mit vs. 2 % ohne HDT) beobachtet werden [37].

Für Etoposid wurden bei Kindern je nach eingesetzter Dosis verschiedene Plasmakonzentrationen ermittelt. Mit der Standarddosis von 150 mg/m^2 über zwei Stunden täglich, über drei Tage wurden Plasmaspitzenpiegel von $23,4 \pm 3,0 \text{ mg/l}$ ($= 39,8 \pm 5,1 \mu\text{M}$) erreicht. Dabei konnten im Plasma Konzentrationen von $> 10 \text{ mg/l}$ ($= 17,0 \mu\text{M}$) über $10,7 \pm 2,6 \text{ h}$, Konzentrationen von $1-10 \text{ mg/l}$ ($= 1,7- 17,0 \mu\text{M}$) über $37,2 \pm 8,4 \text{ h}$ und Konzentrationen von $< 1 \text{ mg/l}$ ($= 1,7 \mu\text{M}$) über $47,9 \pm 9,8 \text{ h}$ gemessen werden. Bei i.v. Gabe über 96 h mit einer Gesamtdosis von 450 mg/m^2 Etoposid lag die Steady-State-Konzentration bei $3,4 \pm 0,7 \text{ mg/l}$ ($= 5,8 \pm 1,2 \mu\text{M}$).

Eine kontinuierliche Infusion von 1800 mg/m^2 führte zu Steady-State-Konzentrationen von $13,8 \pm 2,8 \text{ mg/l}$ ($= 23,4 \pm 4,8 \mu\text{M}$). Hierbei wurden 7,9 ($\pm 2,6$)-mal länger Konzentrationen von $> 10 \text{ mg/l}$ ($= 17,0 \mu\text{M}$) und 2,3 ($\pm 0,4$)-fach länger Konzentrationen $< 1,0 \text{ mg/l}$ ($= 1,7 \mu\text{M}$) gemessen, außerdem eine um den Faktor 0,7 ($\pm 0,8$) kürzere Exposition für die Konzentrationen $1-10 \text{ mg/l}$ ($= 17,0 - 1,7 \mu\text{M}$) gegenüber Etoposid in der Niedrigdosis 150 mg/m^2 [140].

In den Einzelversuchen der vorliegenden Arbeit wurden nach 72 h Etoposidexposition Konzentrationen von 0,535 bis 18,7 μM zum Erreichen der GI_{50} -Werte benötigt.

Damit lagen die GI_{50} -Werte in einem Konzentrationsbereich, der im auch Plasma gut erreicht werden könnte und mit vertretbarer Toxizität einhergeht.

Es gibt nur wenige Publikationen, die über In-vitro-Zytotoxizitätsscreeningtests mit ES-Zelllinien berichten.

Debes et al. untersuchten die ES-Zelllinien VH-64 und SK-ES-1. Die Zellen wurden für eine Stunde mit Etoposid in den Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 50 $\mu\text{g/ml}$ behandelt. In der Kontrolle befand sich kein Etoposid. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mittels XTT-Test bestimmt. 72 h nach der Behandlung wurde die Extinktion gemessen. Etoposid in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (= 84,95 μM) verminderte die Überlebensfraktion von SK-ES-1 auf 18 % und von VH-64 auf 31 % [23]. Rechnerisch wurde in der vorliegenden Arbeit mit 85 μM Etoposid nach 72 h Inkubationszeit die Überlebensfraktion der Zelllinie VH-64 auf 38 % und für STA-ET-1 auf 43 % reduziert. (Für STA-ET-2.1 lag die Überlebensfraktion nach 72 h unter 85 μM Etoposid rechnerisch bei 125 % und für CADO-ES-1 bei 115 %.) Obwohl die Versuchsbedingungen nicht identisch sind, scheinen die Ergebnisse ähnlich. Beiden Untersuchungen gemeinsam ist, dass die Überlebensfraktion der Etoposid-sensiblen Zellen zu mehr als 50 % reduziert wurde. Weiterhin konnte auch bei Debes et al. eine dosisabhängige Reduktion der Überlebensfraktion beobachtet werden [23].

In einer Screeningstudie von Zwaan et al. wurden Tumorzellen von Patienten mit ALL und AML über 96 h mit Etoposid inkubiert (0,05-50 $\mu\text{g/ml}$). Der Median der LC_{50} -Werte lag für AML-Zellen bei 7,45 $\mu\text{g/ml}$ (= 12,7 μM) und für ALL-Zellen bei 1,52 $\mu\text{g/ml}$ (= 2,1 μM) [144]. Die LC_{50} -Werte von Zwaan et al. sind wie in dieser Arbeit definiert.

Selbst die Etoposid-sensibleren Zelllinien dieser Arbeit (VH-64 und STA-ET-1) benötigten deutlich höhere Etoposidkonzentrationen, um die LC_{50} zu erreichen (19,4 μM und 58,7 μM). Von der Etoposid-resistenteren Zelllinie STA-ET-2.1 wurde kein LC_{50} -Wert erreicht. Dies zeigt, dass es Tumore gibt, die noch sensibler auf Etoposid reagieren als ET.

Über den gesamten Versuchszeitraum reagierte die Zelllinie STA-ET-1 am sensibelsten. Die höchsten Konzentrationen zum Erreichen einer 50 %-igen Wachstumshemmung wurden bei STA-ET-2.1 und CADO-ES-1 beobachtet.

Dies könnte auf das unterschiedliche Ausmaß an Pgp-Expression der einzelnen Zelllinien zurückzuführen sein. Die Pgp-vermittelte MDR ist ein Problem in der Krebstherapie einiger Tumore. Über ein Pgp-Tunnelprotein wird die Substanz wieder aktiv aus der Zelle hinausbefördert [45;47;103].

Etoposid ist ein solches Pgp-Substrat. Bei den Zelllinien CADO-ES-1 konnte eine Pgp-Expression von 60 %, bei STA-ET-2.1 von 20 % nachgewiesen werden. Diese beiden Zelllinien reagierten resistenter gegenüber Etoposid. Neben Pgp existieren noch weitere Transportproteine, die eine Zytostatikaresistenz vermitteln. Dies könnte erklären, weshalb CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 trotz unterschiedlicher Pgp-Expression ähnlich resistent reagierten.

Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit getesteten Substanzen (Vincristin, Gemcitabin, Cytarabin und STI 571) lag Etoposid im mittleren Bereich der Gesamtrangfolge. Gemcitabin und Vincristin zeigten eine stärkere zytotoxische Wirkung. STI 571 und Cytarabin waren weniger toxisch als Etoposid.

Die Ergebnisse des In-vitro-Zytotoxizitätsscreenings dieser Arbeit bestätigen die Wirksamkeit von Etoposid in der Behandlung der ET.

4.4.2 Vincristin

Auch Vincristin wird seit langer Zeit in den Therapieprotokollen zur Behandlung der ET eingesetzt [95]. Die Anwendung von Vincristin erfolgt risikoadaptiert in Kombination mit anderen Chemotherapeutika z.B. im VIDE-, VAI- oder VAC- Schema. Im aktuellen Therapieprotokoll der EURO-E.W.I.N.G. 99-Studie wird Vincristin in einer Konzentrationen von 1,5 mg/m²/d am Tag 1 des jeweiligen Zyklus gegeben (vgl. auch Abb. 1 EURO-E.W.I.N.G. 99, Therapieschema) [74]. Im Rahmen dieses Therapie-schemas wurde eine 5-Jahres-Überlebensrate von mehr als 50 % bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung erreicht [67].

Zur Pharmakokinetik bei Kindern gibt es für Vincristin nur wenige Studien. Die Intra- und Interpatienten-Variabilität ist groß [43]. Neu an ALL erkrankten Kindern ohne vorherige Chemotherapie wurden 1,5 mg/m² Vincristin als Bolus verabreicht. Es ergab sich im Median (25te und 75te Perzentile) eine Gesamtkörperclearance von 228 (128 - 360) ml x min⁻¹ x m², eine AUC von 6,7 (4,2 - 12,3) mg x L⁻¹ x min⁻¹, Eliminations-HWZ $t_{1/2\alpha} = 6,6$ (6,1 - 7,5) min und $t_{1/2\beta} = 1001$ (737 - 1325) min, sowie ein Verteilungsvolumen im Steady-State von 262 (158 - 469) l/m² [49].

In der vorliegenden Arbeit reagierten die vier untersuchten Zelllinien unterschiedlich sensibel auf die Inkubation mit Vincristin. Nach 24 h wurde bei keiner Zelllinie das Wachstum mit den Testkonzentrationen von 0,05 bis 50 µM zu mehr als 50 % gehemmt. Nach 48 h wurde das Wachstum der Zelllinie STA-ET-1 bei allen getesteten Dosierungen zu mehr als 50 % reduziert, während bei den übrigen Zelllinien der Anteil vitaler Zellen mit keiner der untersuchten Konzentrationen zu mehr als 50 % gesenkt wurde. Erst nach 72 h reduzierte Vincristin das Wachstum aller Zelllinien zu 50 % und mehr.

Auch bei Vincristin besteht das Problem in der Pgp-vermittelten MDR. Vincristin wird nicht nur mittels Pgp-Tunnelprotein wieder aus der Zelle herausgepumpt, es induziert außerdem eine Pgp-Expression. Die Zelllinien mit hoher Pgp-Expression CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 reagierten deutlich resistenter als STA-ET-1 und VH-64.

Nach 96 h wurden bei STA-ET-1, STA-ET-2.1 und VH-64 ähnliche Beobachtungen wie nach 72 h gemacht. Bei CADO-ES-1 hingegen wurde, anders als nach 72 h, nach 96 h keine 50 %-ige Reduktion des Wachstums mehr erreicht. Dies hängt wahrscheinlich mit der Wachstumskinetik von CADO-ES-1 zusammen. Die Kontrolle befand sich zu diesem Zeitpunkt nicht mehr in der Wachstumsphase. Das Kontrollwachstum war nach 96 h geringer als nach 72 h und somit die Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Zellen geringer. Dafür spricht auch, dass die Überlebensfraktion und LC₅₀-Werte für CADO-ES-1 nach 96 h nicht wieder angestiegen sind.

Insgesamt war die Wirkung von Vincristin mehr von der Zeit als von der Konzentration abhängig. Dies liegt vermutlich am Wirkmechanismus der Substanz. Als Mitosehemmer kann Vincristin erst seine Wirkung entfalten, wenn alle Zellen in die Mitose kommen. Dies könnte ein weiterer Grund sein, weshalb die Zelllinien STA-ET-1 und VH-64 mit einer kürzeren Verdopplungszeit sensibler reagierten als STA-ET-2.1 mit einer längeren Generationszeit.

Im Vergleich zu den anderen in dieser Arbeit untersuchten Substanzen stand Vincristin nach Gemcitabin an zweiter Stelle in der Gesamtrangfolge. Auch wenn Vincristin erst nach längerer Expositionszeit seine volle Wirkung entfaltetete, wurden über den gesamten Beobachtungszeitraum geringere Konzentrationen an Vincristin als an Etoposid, STI 571 und Cytarabin benötigt.

4.4.3 Gemcitabin

Gemcitabin ist erst seit 1995 in Deutschland zugelassen [98]. Es wird in der Therapie solider Tumore wie z.B. dem Harnblasen-CA, dem nichtkleinzelligem Bronchial-CA und dem Adeno-CA des Pankreas angewandt. Die Substanz zeigte in zahlreichen klinischen Studien auch Aktivität gegen weitere maligne solide Tumorerkrankungen wie z.B. des Ovars und der Brust [2;13;15-17;20;42;76;99]. Gemcitabin gehört nicht zur Standardtherapie der ET.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit und als Zulassungskriterium wurde erstmals nicht das Vorliegen von Tumorremissionsraten, sondern eine Verbesserung der Lebensqualität z.B. durch Reduktion der Schmerzintensität herangezogen [98].

Daten über den klinischen Einsatz von Gemcitabin bei Kindern sind rar. An Kindern mit soliden Tumoren wurde die Substanz in einer Phase-I-Studie untersucht. Nach 30-min-Kurzinfusion von 1000 – 2100 mg/m² Gemcitabin lag das Steady-State-Volumen im Median für Gemcitabin zwischen 11,5 - 27,5 l/m², die Gemcitabin-Plasmaspitzenpiegel im Median zwischen 14,0 - 49,0 µg/ml (= 53,2 - 186,2 µM) [104].

In den Monokultivationsversuchen mit Gemcitabin der vorliegenden Arbeit reagierten vor allem die gegenüber Etoposid und Vincristin resistenteren Zelllinien sehr sensibel. Nach 48 h wurde mit geringen Gemcitabinkonzentrationen von 1,02 - 2,50 µM das Wachstum der Zelllinien CADO-ES-1, STA-ET-1 und STA-ET 2.1 zu 50 % gehemmt. Nach 72 h reduzierten sogar um den Faktor 2 - 6 geringere Dosierungen das Wachstum dieser Zelllinien auf 50 %. Vh-64 reagierte resistenter als die übrigen untersuchten Zelllinien gegenüber Gemcitabin. Nach 48 h wurde bei keiner der getesteten Konzentrationen das Wachstum zu 50 % gehemmt. Nach 72 h und 96 h wurde bei VH-64 jeweils eine ca. 3-fach höhere Gemcitabinkonzentration als bei den anderen getesteten Zelllinien benötigt.

Die Wirkung von Gemcitabin war sowohl zeit- als auch dosisabhängig. Vermutlich wurde die maximale Gemcitabinwirkung bei allen Zelllinien nach 72 h erreicht, da nach 96 h jeweils keine nennenswerte Steigerung der Toxizität beobachtet wurde.

Insgesamt lagen die Werte in einem Konzentrationsbereich, der auch im menschlichen Organismus erreicht werden kann und mit einer akzeptablen Toxizität einhergeht [104].

In verschiedenen In-vitro-Studien wurde die Wirkung von Gemcitabin an soliden Tumorzellen erprobt [56;65;89].

Die Tab. 44 gibt die GI_{50} -Werte nach 48 h Gemcitabininkubation der ES –Zelllinien dieser Arbeit im Vergleich zu den GI_{50} -Werten von vier Osteosarkom(OS)-Zelllinien und sechs Zervikal-CA-Zelllinien wieder.

Gemcitabin	Zeit	48 h
Quelle	Zelllinie	GI_{50} [μ M]
diese Arbeit	CADO-ES-1	1,76*
ES	VH-64	▶
	STA-ET-1	1,02*
	STA-ET-2.1	■ 2,50
Jia et al. [65]	MG-63	0,200
OS	SAOS-2	8,50
	TE-85	0,0065
	SAOS-LM-7	9,00
Hernandez et al. [56]	SiHA	203
Zevix-CA	CaLo	0,89
	InBl	0,63
	HeLa	0,32
	C33A	0,27
	CasKi	0,11

Tab. 44: GI_{50} -Werte nach 48h Gemcitabininkubation

- ▶ durchschnittliches Wachstum über 50%
- Wachstum um +/- 50% bei dieser und allen höheren getesteten Konzentrationen
- * Wert errechnet sich aus zwei Messreihen

Jia et al. untersuchten mittels MTT-Test die In-vitro-Toxizität von Gemcitabin an vier humanen Osteosarkom (OS)-Zelllinien (MG-63, TE 85, SAOS- 2 und SAOS-LM7) [65]. Gemcitabin reduzierte das Wachstum und induzierte Apoptose bei allen vier untersuchten Zelllinien. Nach 48 h Gemcitabininkubation lagen die IC_{50} -Werte zwischen 6,5 nM und 9 μ M [65]. Die IC_{50} -Werte wurden wie die GI_{50} -Werte dieser Arbeit ermittelt und sind somit vergleichbar.

Anders als in dieser Arbeit wurden nach 48 h für alle vier OS-Zelllinien IC_{50} -Werte erreicht. Die in dieser Arbeit Gemcitabin-resistenteste ES-Zelllinie (VH-64) erlangte nach 48h keinen GI_{50} -Wert. Die zwei sensibelsten OS-Zelllinien benötigten nach 48 h für eine 50 %-ige Wachstumshemmung ungefähr um den Faktor 140 bzw. 5 geringere Gemcitabinkonzentrationen als die nach 48 h sensibelste ES-Zelllinie dieser Arbeit (STA-ET-1).

Vergleicht man die 48 h-Werte der OS-Zelllinien mit den 72 h-Werten der ES-Zelllinien, so war für die nach 72 h sensibelste ES-Zelllinie eine um ca. den Faktor 50 bzw. 1,7 höhere Gemcitabinkonzentration im Vergleich zu den 48 h Konzentrationen der sensibelsten OS-Zelllinien nötig.

Die weniger sensiblen OS-Zelllinien hingegen brauchten ca. um den Faktor 9 höhere Gemcitabindosen als die sensibelste ES-Zelllinie, um nach 48 h eine 50 %-ige Wachstumshemmung zu erreichen [65]. Insgesamt scheinen nach 48 h die untersuchten OS-Zelllinien noch sensibler gegenüber Gemcitabin als die ES-Zelllinien dieser Arbeit.

In einer Studie von Hernandez et al. wurde die Gemcitabinaktivität an sechs Zervikal-CA-Zelllinien (SiHa, CaLo, InBl, HeLa, C33A, CasKi) untersucht [56]. Zur Bestimmung der Überlebensfraktion wurde nicht der MTT-Test, sondern ein ähnliches Verfahren (Färbung mit Kristall-Violett) angewandt. Die beobachteten Zelllinien reagierten unterschiedlich auf die Gemcitabinexposition. Nach 48 h wurden Gemcitabinkonzentrationen zwischen 0,11 und 203 μM zur 50 %-igen Wachstumshemmung benötigt. Ohne die gemcitabinresistente Zelllinie lagen die Dosen zur 50 %-igen – Wachstumshemmung nach 48 h zwischen 0,11 und 0,89 μM [56]. Nach 72 h wurden keine Werte erhoben.

Für die sensibelste Zervikal-CA-Zelllinie (CasKi) wurde ca. um den Faktor 9 weniger Gemcitabin benötigt als für die nach 48 h sensibelste ES-Zelllinie. Insgesamt scheinen die untersuchten Zervikal-CA-Zelllinien nach 48 h sensibler gegenüber Gemcitabin zu sein. Allerdings wurde in dieser Arbeit die maximale Gemcitabinwirksamkeit gegenüber den ES-Zellen erst nach 72 h gesehen. Ausserdem benötigte die weniger sensible Zervikal-CA-Zelllinie (CaLo) nur eine gering niedrigere Gemcitabinkonzentration als die nach 48 h gemcitabinsensibelste ES-Zelllinie (STA-ET-1) für einen vergleichbaren Effekt.

Pace et al. untersuchten Gemcitabin an drei nicht kleinzelligen Lungen-CA-Zelllinien (NCI-H292, NCI-CorL23 und NCI-Colo699) [89]. Die Zellen wurden mit und ohne 0,5, 0,05 und 0,005 μM Gemcitabin über 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Um die dort ermittelten Werte mit dieser Arbeit zu vergleichen, wurde das Restwachstum der Lungen-CA-Zelllinien unter Gemcitabineinfluss auf die Kontrolle ohne Gemcitabin am jeweiligen Messtag bezogen. Anders als in der vorliegenden Arbeit befand sich die Kontrolle jedoch nicht in der Wachstumsphase, sondern lag im Durchschnitt bei ca. 90 % des Wachstums der Kontrolle am Tag Null.

Die drei Zelllinien reagierten unterschiedlich auf Gemcitabin. Bei allen wurde, wie auch in dieser Arbeit, eine konzentrations- und zeitabhängige Wachstumshemmung beobachtet.

Nach 24 h wurden, wie auch in der vorliegenden Versuchsreihe, keine wachstumshemmenden Effekte gesehen. Die Dosis von 0,005 μM Gemcitabin beeinflusste das Überleben der drei Zelllinien über den gesamten Versuchszeitraum nicht [89].

Nach 48 h konnte nur bei einer Zelllinie (NCI-H292) eine signifikante Reduktion der überlebenden Zellen erfasst werden. Unter 0,05 μM Gemcitabin überlebten noch 77 %, unter 0,5 μM noch 60 % der Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach 48 h.

Nach 72 h zeigte sich für die sensibelste Lungen-Ca-Zelllinie (NCI-H292) mit 0,05 μM Gemcitabin ein Restwachstum von 23 % sowie mit 0,5 μM von 21 % im Vergleich Kontrolle nach 72 h. Die beiden anderen Zelllinien waren weniger sensibel. Nach 72 h wiesen NCI-Colo699 und NCI-CorL23 unter 0,05 μM Gemcitabin ein Überleben von 89 % bzw. 79 % im Vergleich Kontrolle nach 72 h vor. Unter 0,5 μM zeigte sich ein Überleben von 73 % bei NCI-Colo699 und bei NCI-CorL23 von 61 % im Vergleich Kontrolle nach 72 h [89].

Das Zellwachstum der in dieser Arbeit untersuchten ES-Zelllinien hingegen wurde mit 0,05 μM nach 72 h nicht beeinflusst. Anders verhielt es sich mit 0,5 μM Gemcitabin. Für die gegenüber Gemcitabin sensibleren ES-Zelllinien wurde nach 72 h mit 0,5 μM Gemcitabin ein Restwachstum zwischen 28 % (CADO-ES-1) und 43 % (STA-ET-1 und STA-ET 2.1) beobachtet. Bei der Gemcitabin-resistenteren Zelllinie VH-64 zeigte sich mit 0,5 μM Gemcitabin ein Restwachstum von 73 %. Demnach scheinen die untersuchten ES-Zelllinien nach 72 h zwar resistenter als die sensibelste Lungen-CA-Zelllinie, aber gleichzeitig sensibler als die resistenteren Lungen-CA-Zelllinien.

Zur Therapie der ET wird Gemcitabin zur Zeit nicht standardmäßig eingesetzt. In der Literatur wurde in zwei Studien über die Wirksamkeit von Gemcitabin bei therapieresistenten Weichteilsarkomen berichtet [84;116].

In einer Phase-II-Studie wurde Gemcitabin an 18 Patienten mit vorbehandelten und fortgeschrittenen Weichteilsarkomen untersucht [116]. Die Patienten wurden in die Studie aufgenommen, wenn die histologische Diagnose eines nichtresektablen, wiederaufgetretenen oder metastasierten fortgeschrittenen Weichteilsarkoms vorlag und wenigstens eine chemotherapeutische Behandlung mit einem Anthracyclin und / oder Ifosfamid einschließenden Protokoll stattgefunden hatte. Nur zwei der untersuchten Patienten hatten zuvor auf eine palliative Chemotherapie angesprochen. Gemcitabin wurde als 360 min Infusion in einer Dosierung von 200 mg/m^2 an den Tagen 1,8 und 15 eines 28-tägigen Zyklus gegeben. Eine Steigerung der Dosis auf 250 mg/m^2 war bei Stabilisierung der Erkrankung und guter Toleranz gegenüber Gemcitabin erlaubt. Im Median wurden 3 Zyklen (Ränge 1 - 7) verabreicht.

Zwei Patienten (11 %) zeigten ein teilweises Ansprechen auf die Therapie für 5 bzw. 6 Monate. Davon gehörte einer zu den zwei Patienten, die bereits auf eine palliative Chemotherapie angesprochen hatten. Bei einem weiteren Patienten kam es zur Reduktion von mehr als 50 % der Lungenmetastasen und Stabilisierung des lokalen Rückgangs für 6 Monate. Für sechs Patienten konnte eine Stabilisierung der Erkrankung über 3 - 6 Monate erreicht werden. Neun Patienten erlitten ein Fortschreiten der Erkrankung. Im Median lag das Überleben bei 8 Monaten, fünf Patienten lebten auch nach 12 Monaten noch [116]. Gemcitabin zeigte Antitumoraktivität mit einem vertretbaren Toxizitätsprofil in dieser Patientengruppe [116].

In einer anderen Phase-II-Studie wurde die Effektivität von Gemcitabin an 18 Patienten mit Weichteil- oder Knochensarkomen untersucht. Sie reagierten zuvor resistent gegenüber den auf Adriamycin und Ifosamid basierenden Standard-Chemotherapien [84]. Gemcitabin wurde in einer Dosierung von 1000 mg/m²/Woche über sieben aufeinanderfolgende Wochen gefolgt von einer Woche Pause verabreicht. Wurde keine Progression beobachtet, bekamen die Patienten weiterhin 1000 mg /m²/Woche über 3 Wochen alle 28 Tage, bis ein Scheitern der Therapie klinisch oder radiologisch bewiesen wurde. Es konnte ein partielles Ansprechen bei einem Patienten mit Leiomyosarkom und ein minimaler Respon bei einem Patienten mit Angiosarkom beobachtet werden. Außerdem erreichten sechs Patienten mit Chondrosarkom bzw. Osteosarkom eine vorübergehende Stabilisierung der Krankheit. Die „Overall-Disease-Controll“-Rate lag bei 44 % (8/18). Die Zeit bis zur Progression der Erkrankung lag zwischen 8 und 86 Wochen. Im Median lag die Zeit bis zum Fortschritt der Erkrankung bei 27 Wochen. Ein klinischer Benefit (Verbesserung des Bewegungsstatus, Linderung der respiratorischen Symptome, Schmerzabnahme und geringer Bedarf an Schmerzmedikation) wurde bei den Patienten gesehen, die einen progressionsfreien Zustand erreichten [84].

Bei Kindern wurde Gemcitabin bisher nicht standardmäßig eingesetzt. In einer Phase-I-Studie wurde die Substanz bei 42 Kindern mit soliden Tumoren untersucht [104]. Alle waren therapierefraktär gegenüber der konventionellen Therapie und hatten eine Lebenserwartung von mindestens zwei Monaten. Gemcitabin wurde als 30 min Infusion zwei oder drei Wochen alle vier Wochen verabreicht. Dosierungen von 1000, 1200 und 1500 mg/m² wurden über drei Wochen gegeben, anschließend wurden für nur zwei Wochen Konzentrationen von 1500, 1800 und 2100 mg/m² angewandt. An toxischen Nebenwirkungen wurden v.a. Myelosuppression sowie Somnolenz, Fieber, Hypotension und Rash beobachtet.

Bei einem Kind mit Adeno-CA des Pankreas wurde ein teilweises Ansprechen erreicht. Insgesamt konnte bei sieben Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung zwischen 2 bis 17 Monaten beobachtet werden. Darunter waren vier von insgesamt 13 an Osteosarkomen erkrankten Kindern. Eine Stabilisierung wurde für 2 bis 6 Monate erreicht. Eines von vier Kindern mit ET erhielt 17 Kurse Gemcitabin.

In dieser Zeit wurde ebenfalls eine Stabilisierung der Erkrankung gesehen. Sechs Monate nach der letzten Dosis Gemcitabin kam es zum Rückfall [104].

Die oben angeführten Untersuchungen deuten darauf hin, daß Gemcitabin nicht nur in vitro, sondern auch klinisch bei ET wirksam sein könnte. Bei den untersuchten Patienten konnte zwar keine Heilung erreicht werden, aber wenigstens ein Fortschreiten der Erkrankung konnte aufgehalten werden. Selbst wenn es unter Gemcitabin zu keiner Heilung käme, könnte zumindest eine Verbesserung der Lebensqualität erreicht werden. So konnte z.B. eine Zunahme der Lebensqualität für Patienten mit Pankreas-CA gezeigt werden [13]. In einer randomisierten Phase-III-Studie wurde der klinische Benefit von Gemcitabin in Monotherapie im Vergleich zu Fluoro-Uracil (FU), der Standard-Therapie, an insgesamt 126 Patienten mit Pankreas-CA untersucht. Der klinische Benefit wurde definiert über Schmerzlevel, Analgetikaverbrauch und generelle Verfassung des Patienten. Für 23,8 % der mit Gemcitabin behandelten Patienten konnte ein klinischer Benefit nachgewiesen werden, während für nur 4,8 % der FU Patienten ein Benefit beschrieben wurde. Gleichzeitig waren Überleben im Median und Gesamtüberleben nach einem Jahr für die mit Gemcitabin behandelten Patienten (5,65 Monate und 18%) signifikant höher als in der FU Gruppe (4,41 Monate und 2 %) [13]. Es handelte sich in dieser Studie um stark vorbehandelte und therapieresistente Patienten. Vielleicht könnte Gemcitabin bei sensibleren Patienten noch besser wirken.

Es wurde außerdem für Gemcitabin ein radiosensibilisierender Effekt festgestellt [56]. Dies könnte auch für Patienten mit ES von Bedeutung sein, da die Radiotherapie wichtiger Bestandteil der Therapie des ES ist.

Es hat sich gezeigt, dass Gemcitabin die Lebensqualität bei Patienten mit soliden Tumoren und sehr schlechter Prognose verbessern konnte [13;84;85]. Bei Kindern konnten die Gemcitabinkonzentrationen, die zu einer 50%-igen Wachstumshemmung nötig sind, bei vertretbarer Toxizität erreicht werden [104;118]. Die Substanz zeigte bei Zelllinien verschiedener Tumore, bei denen Gemcitabin zum Teil schon klinisch eingesetzt wird, auch in vitro wachstumshemmende und zytotoxische Effekte [56;65;89]. Diese Effekte waren mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar.

Insgesamt wies Gemcitabin in der vorliegenden Arbeit eine ausgeprägte wachstumshemmende Wirkung bei allen vier untersuchten Zelllinien auf. Selbst die Pgp-exprimierenden Zelllinien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 reagierten sehr sensibel. In der Rangfolge der untersuchten Zytostatika stand Gemcitabin an erster Stelle vor den bei ET bewährten Substanzen Vincristin und Etoposid. Die ermittelten Konzentrationen, die zu einer deutlichen Reduktion des Zellwachstums führten, lagen alle im klinisch relevanten Bereich [104]. Gemcitabin sollte daher weiter in präklinischen und klinischen Studien untersucht werden.

4.4.4 Cytarabin

Cytarabin wird seit vielen Jahren erfolgreich zur Remissionsinduktion bei Kindern mit AML eingesetzt [6;32;81]. Die Substanz gehört zum Therapiestandard der AML und ALL im Kindesalter. Für die ALL im Kindesalter hat sich die Prognose in den letzten Dekaden bedeutend verbessert. Zur Zeit liegt das Überleben bei 70 – 80 % [101;105]. Kinder mit AML haben mit Gesamtüberlebensraten von 40 – 60 % eine schlechtere Prognose [22;102;121;139]. Zur Therapie solider Tumore wird Cytarabin nicht eingesetzt.

Bei Kindern, die Cytarabin in Hochdosis von 3000 mg/m² als einstündige Kurzinfusion erhalten hatten, konnten Plasmaspitzenkonzentrationen von 57 - 199 µM gemessen werden. Die durchschnittliche Plasmaspitzenkonzentration lag bei 103 +/- 49 µM. Es schloss sich ein biexponentieller Abfall mit einer durchschnittlichen initialen Halbwertszeit $t_{1/2\alpha}$ von 17 min und einer durchschnittlichen terminalen Halbwertszeit von $t_{1/2\beta}$ von 4h an. Steady-State-Plasmakonzentrationen von 20 – 35 µM wurden nach einem individuellen Bolus von 0,5 g/m² Cytarabin, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von im Mittel 130 mg/m²/h, ermittelt [7].

In der vorliegenden Arbeit reagierten die vier untersuchten Zelllinien unterschiedlich sensibel auf die Inkubation mit Cytarabin. Nach 48 h wurde bei den Zelllinien CADO-ES-1 und STA-ET-1 das Wachstum mit Konzentrationen von 2,71 µM bzw. 2,13 µM Cytarabin auf 50 % reduziert. VH-64 und STA-ET-2.1 hingegen reagierten nach 48 h resistenter. In beiden Fällen konnte mit der Höchstkonzentration von 1150 µM Cytarabin keine 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht werden. Nach 72 h konnte bei allen untersuchten Zelllinien ein GI₅₀-Wert erhoben werden. CADO-ES-1 und STA-ET-1 zeigten sich am sensibelsten mit GI₅₀-Konzentrationen von 2,04 µM bzw. 2,06 µM, gefolgt von VH-64 mit 3,06 µM. Der höchste Wert mit 6,17 µM wurde bei STA-ET-2.1 beobachtet. Nach 96 h konnte bei STA-ET-1 und VH-64 noch eine geringe Steigerung der Wirkung beobachtet werden. Es wurde jeweils eine 1,4-fach niedrigere Konzentration zum Erreichen des GI₅₀-Wertes als nach 72 h benötigt. Bei CADO-ES-1 und STA-ET-1 wurden wahrscheinlich bereits nach 72 h die maximalen Cytarabin-Effekte erreicht. Die Pgp-exprimierenden Zelllinien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 reagierten ähnlich sensibel wie STA-ET-1 und VH-64.

Die ermittelten GI_{50} -Werte lagen zwar im klinisch erreichbaren Bereich, dennoch war die Wirkung von Cytarabin schwächer als die von Gemcitabin.

Nach 48 h konnte das Wachstum der Zelllinie STA-ET-2.1 mit 2,5 μM Gemcitabin auf 50 % herabgesetzt werden, mit Cytarabin gelang dies nicht einmal mit der Höchstkonzentration von 1150 μM .

Insgesamt wurden um 1,5- bis 14,2-fach höhere Cytarabin- als Gemcitabin-Konzentrationen zu einer 50 %-igen Wachstumsreduktion benötigt. Dabei reagierten die einzelnen Zelllinien unterschiedlich.

CADO-ES-1 benötigte zwischen 1,5 (48 h) bis 7,1-fach (96 h) höhere Cytarabin Konzentrationen. Für VH-64 waren 2,8- (72 h) und 2,5-fach höhere (96 h) GI_{50} -Dosierungen notwendig. Bei STA-ET-1 waren die Cytarabin-Konzentrationen zwischen 2,1- (48 h) und 5,7-fach (96 h) höher. STA-ET-2.1 reagierte am resistantesten gegenüber Cytarabin. Hier wurden 14,2- (72 h) und 11,2-fach (96 h) höhere Cytarabin-Dosierungen beobachtet.

Obwohl Gemcitabin und Cytarabin sich strukturell sehr ähnlich sind, konnte gezeigt werden, dass bei äquimolarer Konzentration der Muttersubstanz der aktive Gemcitabin-Metabolit dFdCTP in 20-fach höherer Konzentration vorliegt als der aktive Cytarabin-Metabolit AraCTP. Hierfür wurden verschiedene Erklärungen angeführt. Gemcitabin soll schneller als Cytarabin über die Zellmembran in die Zellen aufgenommen werden. Weiter zeigte die Deoxycytinkinase eine höhere Affinität für Gemcitabin ($K_m = 3,6 \mu\text{M}$) als für Cytarabin ($K_m = 8,8 \mu\text{M}$). Außerdem war die Elimination von intrazellulären dFdCTP biphasisch mit $t_{1/2\alpha} = 3,9\text{h}$ und $t_{1/2\beta}$ mehr als 16 h. Der Abbau von AraCTP hingegen war monophasisch und signifikant schneller ($t_{1/2} = 0,7\text{h}$). Die vergleichsweise längere HWZ von FdCTP war mit einer längeren Hemmung der DNA-Synthese verbunden. All diese Faktoren tragen wahrscheinlich zu einer stärkeren Zytotoxizität von Gemcitabin im Vergleich zu Cytarabin bei [52].

Pieters et al. untersuchten in einer Screeningstudie Zellen von Kindern mit neudiagnostizierter und rezidivierter ALL. Nach 96 h Inkubation mit Cytarabin lagen die durchschnittlichen LC_{50} -Werte (entsprechen den GI_{50} -Werten dieser Arbeit) für die Blasten der neudiagnostizierten ALL bei $0,186 \pm 0,220 \mu\text{g/ml}$ ($= 0,765 \mu\text{M} \pm 0,905 \mu\text{M}$) (Median $0,127$ ($0,016 - 1,188$) $\mu\text{g/ml}$ ($= 0,522 \mu\text{M}$ ($0,066 - 4,89\mu\text{M}$))). Für die Blasten der ALL im Rezidiv betragen die LC_{50} -Werte durchschnittlich $0,687 \pm 0,446 \mu\text{g/ml}$ ($= 2,83\mu\text{M} \pm 1,83\mu\text{M}$) (Median $0,475$ ($0,278 - 1,440$) $\mu\text{g/ml}$ ($= 1,95\mu\text{M}$ ($1,14 - 5,92 \mu\text{M}$))). In der Studie wurden auch andere Substanzen untersucht. Insgesamt waren die Proben der Patienten im Rezidiv resistenter [100].

Im Vergleich zu den Medianwerten der Proben der neudiagnostizierten ALL wurden bei den in dieser Arbeit untersuchten ET-Zellen nach 96 h 3,4- bis 8,5-fach höhere Konzentrationen zur 50 %-igen Wachstumshemmung beobachtet. In Relation zu den Medianwerten der ALL-Proben im Rezidiv wurden in dieser Arbeit vergleichbare bzw. bis maximal 2,3-fach höhere GI_{50} -Werte erhoben. Demnach scheint Cytarabin bei den Zellen des soliden ET weniger effektiv als bei den Zellen der ALL.

In der Gesamtrangliste der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen befand sich Cytarabin auf dem untersten Platz. Alle übrigen untersuchten Substanzen (Etoposid, Vincristin, STI 571 und Gemcitabin) waren toxischer. Die strukturell verwandte Substanz Gemcitabin zeigte im In-vitro-Vergleich eine wesentlich stärkere Wirkung. Sie lag auf dem ersten Platz der Gesamtrangliste und wird bereits erfolgreich zur Behandlung solider Tumore eingesetzt. Cytarabin ist aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zum Einsatz bei ET nicht zu empfehlen.

4.4.5 STI 571

Der Tyrosinkinaseinhibitor STI 571 steht für ein neues Konzept in der Krebstherapie. Es konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinkinasen ABL, BCR-ABL, c-ABL, c-ARG, PDGF-Rezeptor und c-KIT-Rezeptor spezifisch durch STI 571 gehemmt werden [11;28;44;54;58;88].

Bei Tumoren, die diese Tyrosinkinasen exprimierten, konnte STI 571 beachtliche Erfolge verzeichnen [29;30;66;82;132]. Phase-I-Studien zeigten, dass STI 571 ab Dosierungen von 300 mg p.o./d bei Patienten mit CML in der Interferon- α (IFN- α)-refraktären chronischen Phase und auch in fortgeschrittenen Phasen hämatologische und zytogenetische Remissionen erreicht wurden [29;30]. Bei 53 von insgesamt 54 Patienten in der chronischen Phase wurden komplette hämatologische Remissionen bewirkt. Diese wurden meist schon in den ersten vier Wochen der Therapie gesehen. 29 Patienten zeigten ein zytogenetisches Ansprechen, darunter wurde in 7 Fällen eine komplette zytogenetische Remission beobachtet [30]. 21 von 38 Patienten (55%) in der myeloischen Blastenkrise erreichten ebenfalls hämatologische Remissionen, vier davon waren komplett [29].

Mutationen von c-KIT scheinen eine zentrale Rolle in der Pathogenese der GIST zu spielen [57;77]. An Patienten mit GIST und Weichteilsarkomen (soft tissue sarcoma; STS) wurde STI 571 in einer Phase-II-Studie untersucht [132]. Alle GIST-Patienten waren c-KIT-positiv, während bei den STS-Patienten c-KIT nicht nachgewiesen werden konnte. STI 571 wurde in einer Dosis von 800 mg/d (zwei mal 400 mg p.o.) verabreicht. Nach einem Jahr waren 73 % der GIST-Patienten progressionsfrei. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung wurde bei 4 % der untersuchten GIST-Patienten eine komplette Remission erreicht. Bei 67 % lag eine teilweise Remission vor, 18 % zeigten eine Stabilisierung der Erkrankung, bei 11 % kam es zur Progression. In der STS-Gruppe hingegen wurde kein objektiver Response gesehen. Hier lag im Median die Zeit bis zur Progression bei 58 Tagen [132].

Auch bei ET-Zellen konnten c-KIT und weitere Tyrosinkinasen wie PGDF, c-ABL und c-ARG nachgewiesen werden [61;72;106;115]. Es besteht die Hypothese, dass c-KIT und sein Ligand SCF an Wachstum, Migration und Metastasierung von ET-Zellen beteiligt sind [72]. Dies führte zu der Annahme, dass STI 571 auch bei ET wirksam sein könnte. Pharmakokinetische Untersuchungen von STI 571 bei Patienten mit Philadelphia-chromosom-positiver-CML zeigten eine durchschnittliche Maximalkonzentration von 2,3 mg/ml (4,6 μ M) unter Steady-State-Konzentration bei einmal täglicher Gabe von 400 mg STI 571 mit einer HWZ zwischen 13 und 16 h [30].

In mehreren Phase-I-Studien lag die MTD für STI 571 bei 1000 mg/d [29;30;96;129]. In dieser Dosierung können Konzentrationen zwischen 6-10 μM STI 571 im Blut erreicht werden [96].

Insgesamt wurden über den gesamten Versuchszeitraum in der vorliegenden Arbeit erst mit relativ hohen STI 571-Konzentrationen die 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht. Nach 24h wurden Konzentrationen von 22,3 bis 63,6 μM STI 571 zum Erreichen der GI_{50} -Werte benötigt. Nach 48 h lagen die GI_{50} -Werte zwischen 20,7 und 60,9 μM , nach 72 h zwischen 15,1 und 54,0 μM und nach 96 h zwischen 15,1 und 55,2 μM . Dies sind Konzentrationsbereiche, die klinisch unter der MTD von 1000 mg/d nicht erreicht wurden [96].

Die einzelnen Zelllinien reagierten unterschiedlich sensibel. Im Durchschnitt waren die GI_{50} -Werte der Pgp-exprimierenden-Zelllinien CADO-ES-1 und STA-ET-2.1 höher, als die der Zelllinien VH-64 und STA-ET-1. Für STI 571 ist eine gesteigerte Pgp-Expression mit Induktion einer MDR beschrieben worden [78;137].

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in vergleichbaren In-vitro-Versuchen beobachtet.

Hotfilder et al. zeigten, dass an weiteren vier c-KIT-positiven-ET-Zelllinien RD-ES, RM-82, TC-71 und WE-68 mit Dosierungen zwischen 0,1-10 μM STI 571 über einen Beobachtungszeitraum von 72 h keine zytotoxischen Effekte erreicht wurden. Erst mit hohen Konzentrationen zwischen 50 und 100 μM konnte eine signifikante Reduktion des Zellwachstums bewirkt werden [61].

Merchant et al. untersuchten 10 verschiedene ET-Zelllinien. Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien waren nicht darunter. Alle 10 Zelllinien waren in unterschiedlichem Ausmaß c-KIT-positiv. Bei sieben Zelllinien konnte außerdem PDGF β nachgewiesen werden. Es wurde ein Versuchszeitraum von 72 h beobachtet. Höchstwerte für die Apoptose wurden zwischen 36 und 72 h gesehen. Die Konzentrationen um eine 50 %-ige Wachstumshemmung zu erreichen lagen zwischen 10-12 μM [83].

Im Tierversuch konnte bei ES-Xenografts während der Behandlung mit 50 mg/kg STI 571 eine Stabilisierung bzw. ein minimales Fortschreiten des Tumorwachstums beobachtet werden. Unter einer Dosierung von 100 mg/kg kam es zur Tumorregression. Der Hochdosisarm des Versuchs musste jedoch vorzeitig abgebrochen werden, da sechs der 10 untersuchten Mäuse zwischen dem 3. und 6. Beobachtungstag verstarben. Die übrigen Mäuse erschienen matt und kraftlos [83].

Ab Konzentrationen von 10 μM und aufwärts verliert STI 571 seine Spezifität [11;12]. Die beobachtete toxische Wirkung ist daher vermutlich auf eine unselektive Hemmung anderer Tyrosinkinasen zurückzuführen. Dies könnte im lebenden Organismus zu einer Störung der Funktion gesunder Zellen und somit zu Nebenwirkungen führen.

Es konnte gezeigt werden, dass c-KIT in vitro mit STI-571-Dosierungen im Bereich zwischen 0,1 - 1 μM zu 50 % gehemmt wird [11].

Die c-KIT-positive GIST-Zelllinie (GIST882) zeigte nach 72 h Inkubation mit 0,1 μM STI 571 ebenfalls eine deutliche Reduktion des Zellwachstums. Mit 1,0 μM STI 571 wurde das Wachstum nach 72 h zu mehr als 50% gehemmt [126].

In vitro-Versuche mit c-KIT-positiven-SCLC-Zellen zeigten nach 48 h Inkubation eine 50 %-ige Wachstumshemmung mit ungefähr 1 μM STI 571. Die Positivkontrolle mit einer BCR/ABL-positiven Zelllinie ergab ebenfalls eine Hemmung des Wachstums auf 50 % mit ca. 1 μM STI 571, die Negativkontrolle hingegen benötigte deutlich mehr als 10 μM zur 50 %-ige Wachstumshemmung [136].

Im In-vitro-Versuch wurde das Wachstum verschiedener BCR-ABL-positiver Zelllinien mit 1,0 μM STI 571 nach 24 bis 72 h deutlich reduziert. Unter gleichen Versuchsbedingungen wurde mit 1,0 μM STI 571 das Wachstum BCR-ABL-negativer Zelllinien mit 1,0 μM nicht beeinflusst. Erst mit 10 μM STI 571 konnte bei einem Teil der BCR/ABL-negativen eine Wachstumshemmung beobachtet werden [24]. Für eine 50 %-ige Hemmung der Substratphosphorylation der Tyrosinkinase BCR-ABL in vitro lag die STI 571 Konzentration bei 0,025 μM [31].

Für c-KIT sind bei GIST-Patienten verschiedene Mutations- und Wildtypformen beschrieben worden. Es konnte gezeigt werden, dass die Wirkung von STI 571 in Zusammenhang mit dem jeweiligen c-KIT Mutationsstatus steht [53]. Vielleicht liegt bei untersuchten ET-Zelllinien ein c-KIT-Mutationsstatus vor, der nicht essentiell für Wachstum und Überleben des Tumors ist [27]. Dies könnte eventuell erklären, weshalb die Zelllinien, obwohl sie c-KIT exprimieren, nur bedingt sensibel reagierten.

Im Vergleich zu den anderen Testsubstanzen dieser Arbeit verursachte STI 571 nach 24 h bei allen vier untersuchten Zelllinien die stärkste Wachstumshemmung. Die GI_{50} -Werte lagen allerdings in einem Konzentrationsbereich, der klinisch bisher nicht erreicht wurde [96]. Weiterhin wurden bei STI 571-sensiblen Zellen wesentlich niedrigere Konzentrationen zur Wachstumshemmung benötigt [136]. Zu den anderen Messzeitpunkten befand sich STI 571 auf den ranguntersten Plätzen. In der Gesamtwertung lag die Substanz auf Rang vier hinter Gemcitabin, Vincristin und Etoposid. Allein scheint STI 571 hiernach kein wirksames Mittel in der Therapie von ET zu sein. Allenfalls eine Verlangsamung des Tumorwachstums könnte vielleicht erreicht werden. Die Substanz könnte außerdem zu einer verstärkten Sensitivität gegenüber anderen zytotoxisch wirksamen Mitteln führen. Dies wurde in den weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeit überprüft.

4.4.6 **Beeinflusst die Koinkubation mit STI 571 die Wirkung der Testsubstanzen ?**

Im Einzelversuch konnte gezeigt werden, dass STI 571 erst in vergleichsweise hohen, nicht mehr spezifischen Konzentrationen das Wachstum c-KIT-positiver ET-Zellen beeinflusst. In verschiedenen In-vitro-Studien sind in Kombination mit STI 571 für mehrere Substanzen additive bis synergistische Effekte beobachtet worden [68;125].

Aus diesem Grund wurden die Testsubstanzen der ersten Versuchsreihe mit STI 571 koinkubiert. STI 571 wurde in, nach den Ergebnissen der STI 571 Monoinkubationsreihe, subtoxischen Konzentrationen eingesetzt. Die Kombinationssubstanzen wurden in weniger Konzentrationen als im Einzelversuch getestet. Daher ist anzunehmen, dass die Werte für die 50 %-ige Wachstumshemmung durch die niedrigere Anzahl an Messpunkten weniger genau sind (vgl. auch Kapitel 2.2.7). Bei Betrachtung der Ergebnisse der Koinkubationsexperimente ist folglich vor allem der Trend wichtig, weniger die genauen Werte.

STI 571 scheint bei allen untersuchten Zelllinien die Wirkung von Etoposid zu modulieren. Bezogen auf die Wachstumshemmung konnte eine Steigerung der Wirkung nach 48 h für CADO-ES-1 und nach 48 h und 72 h für die Zelllinien VH-64 und STA-ET-2.1 beobachtet werden. Bei STA-ET-1 bewirkte die Kombination nach 48 h und nach 72 h eine Reduktion der wachstumshemmenden Etoposideffekte.

Auch die Wirkung von Vincristin wurde durch STI 571 beeinflusst. Die Zelllinien CADO-ES-1, VH-64 und STA-ET-2.1 reagierten sensibler, STA-ET-1 resistenter.

Die Kombination mit STI 571 zeigte ebenfalls eine Beeinflussung der wachstumshemmenden Effekte von Gemcitabin. CADO-ES-1 reagierte nur nach 48 h sensibler auf die Koinkubation als auf die Monoexposition. Nach 72 h und nach 96 h wurde für diese Zelllinie keine Modulation beobachtet. Ähnlich verhielt es sich bei der Zelllinie STA-ET-2.1. Nach 48 h konnte eine Steigerung der Wachstumshemmung durch STI 571 gesehen werden. Nach 72 h und 96 h zeigte sich kaum ein Unterschied zwischen Mono- und Koinkubation. Für VH-64 konnte im Kombinationsversuch nach 48 h sogar ein GI_{STI50} -Wert erhoben werden. Im Gemcitabineinzelversuch wurde nicht einmal mit 1000 μ M der Substanz eine 50 %-ige Wachstumshemmung erreicht. Nach 72 h und 96 h hingegen reagierte VH-64 auf die Koinkubation deutlich resistenter als auf Gemcitabin allein. STA-ET-1 reagierte bezogen auf die Wachstumshemmung kaum sensibler auf die Koinkubation als auf die Gemcitabinmonoinkubation.

Für Cytarabin konnte ebenfalls eine Veränderung der wachstumshemmenden Wirkung mit STI 571 gezeigt werden. Die Zelllinien CADO-ES-1, STA-ET-1 und STA-ET-2.1 reagierten zu verschiedenen Versuchszeitpunkten sensibler auf die Koinkubation CADO-ES-1 nach 48 h und 72 h und STA-ET-2.1 nach 48 h, 72 h sowie 96 h.

STA-ET-1 war nach 48 h Inkubationszeit resistenter gegenüber der Koinkubation, nach 72 h jedoch sensibler. Nach 96 h wurde kein Unterschied zwischen Mono und Koinkubation gesehen. Für STA-ET-1 wurden jeweils stärkere Effekte mit 1,0 μM als mit 0,1 μM STI 571 gesehen. Die Zelllinie VH-64 zeigte keine Unterschiede zwischen Einzel- und Kombinationsversuch.

Auch in anderen Studien konnte eine Modulation der Wirkung der Substanzen Cytarabin, Etoposid und Vincristin durch STI 571 beobachtet werden.

So konnte von Liu et al. für die BCR-ABL-positiven CML-Zelllinien K562 und KU812 synergistische Effekte für die Koinkubation von STI 571 mit Etoposid oder mit Cytarabin gezeigt werden [75].

Kano et al. untersuchten neben den Zelllinien K562 und KU812 außerdem die ebenfalls BCR-ABL-positiven Zelllinien TCC-S und TCC-Y. Bei allen vier Zelllinien wurden additive Effekte für die Koinkubation von STI 571 mit Etoposid oder mit Cytarabin gesehen. Für die Kombination von STI 571 mit Vincristin wurden für drei Zelllinien synergistische und für eine Zelllinie (K562) additive bis synergistische Effekte gesehen [68].

Bislang wurden nur Zelllinien geprüft, die gegenüber STI 571 sensibel waren. Zelllinien, die als nicht STI-571-sensibel eingestuft wurden, sind noch nicht auf eventuelle Synergismen untersucht worden.

Auch wenn STI 571 bei den untersuchten ES-Zelllinien nicht so stark zytotoxisch war wie bei sensiblen Zelllinien, greift die Substanz dennoch in die Signalkaskade ein. Sie könnte somit die Wirksamkeit einer Chemotherapie modulieren.

Insgesamt scheint STI 571 die Wirkung der untersuchten Substanzen bei ET-Zellen zu beeinflussen. In Kombination mit Etoposid, Vincristin, Gemcitabin oder Cytarabin könnte vielleicht eine Wirkverstärkung erzielt werden. Für Etoposid und Vincristin ist eine Steigerung der Sensitivität durch Kombination mit STI 571 bei den im Einzelversuch resistenteren Zelllinien (CADO-ES-1, STA-ET-2.1 und VH-64) beobachtet worden. Die Sensitivität der gegenüber Etoposid und Vincristin empfindlichsten Zelllinie STA-ET-1 wurde im STI-571-Kombinationsversuch nicht gesteigert.

Die Kombination von STI 571 mit Cytarabin zeigte ebenfalls eine Steigerung der Sensitivität der Cytarabin-resistentesten Zelllinien (CADO-ES-1, STA-ET-2.1).

Nach 48h Inkubationszeit reagierten die im Einzelversuch Gemcitabin-resistenten Zelllinien (CADO-ES-1, STA-ET-2.1 und VH-64) sensibler auf die Koinkubation. Nach 72h jedoch nivellierte sich der Effekt. Bei VH-64 wurde sogar eine Abnahme der Sensitivität beobachtet.

In dieser Reihe wurde nur eine gleichzeitige und kontinuierliche Koinkubation untersucht. Eine intermittierende oder zeitlich begrenzte Kombination der Substanzen könnte zu anderen Ergebnissen führen. Auch die Reihenfolge, in der die Substanzen kombiniert werden, könnte zu einer Variation führen. Die pharmakokinetischen und toxischen Effekte der Kombinationen müssten in vivo bestimmt werden. Dennoch scheint STI 571 ein interessanter Kombinationspartner zu sein. Die STI-571-Konzentrationen von 0,1 μM und 1,0 μM können auch unter therapeutischen Dosierungen im Plasma erreicht werden [30;96]. Sie liegen weit unter den Konzentrationen, die im STI-571-Einzelversuch zur Wachstumshemmung benötigt wurden. Demnach könnte STI 571 in Kombination mit konventioneller Chemotherapie evtl. eine Therapieoption bei ET sein. Vorher sollten jedoch weiterführende präklinische und klinische Untersuchungen stattfinden.

5 Zusammenfassung

Für die Behandlung der ET gehört eine systemische Chemotherapie zum weltweiten Therapiestandard [91;94]. So können Überlebensraten von über 50 % erreicht werden [91]. Patienten in fortgeschrittenen Stadien haben jedoch immer noch eine schlechtere Prognose [37]. Es ist deshalb wichtig, dass neue Medikamente und Therapiekonzepte gefunden werden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der toxischen Wirkung der Substanzen Etoposid, Vincristin, Gemcitabin, Cytarabin und STI 571 an vier humanen ET-Zelllinien.

Es wurde versucht, folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Welche Wirkung zeigen die klinisch bei ET wirksamen Substanzen Etoposid und Vincristin *in vitro*?
- Welche Wirkung zeigen die klinisch beim ET noch nicht getesteten Substanzen Gemcitabin, Cytarabin und STI 571 bei ET-Zelllinien *in vitro*, und können sie zu weiteren Untersuchungen empfohlen werden?
- Wird durch Koinkubation mit STI 571 die Wirkung der untersuchten Substanzen beeinflusst?

Im Versuch wurden Testkonzentrationen gewählt, die sich im mittleren Konzentrationsbereich an klinisch erreichbaren Plasmaspiegeln orientierten. Die Konzentrationsbereiche umfassten 2-3 Zehnerpotenzen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte graphisch und rechnerisch. Es wurde eine Gesamtrangliste für die Wirkung aller untersuchten Substanzen und die Sensibilität der einzelnen Zelllinien ermittelt.

Insgesamt reagierten die vier untersuchten Zelllinien unterschiedlich sensibel auf die Testsubstanzen. Die Zelllinien VH-64 und STA-ET-1 waren sensibler als die Pgp-exprimierenden Zelllinien STA-ET-2.1 und CADO-ES-1.

Etoposid und Vincristin zeigten in klinisch erreichbaren Konzentrationen auch *in vitro* deutliche wachstumshemmende Effekte. Diese waren sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig. Etoposid lag auf Rang 3 und Vincristin auf Rang 2 der Gesamtrangliste. Auch mit Gemcitabin konnte eine deutliche Wachstumsreduktion in einem therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich beobachtet werden. In der Gesamtwertung lag die Substanz sogar auf Platz 1. Im Vergleich dazu benötigte Cytarabin wesentlich höhere Konzentrationen für eine vergleichbare Wirkung. Cytarabin lag mit Rang 5 auf dem letzten Platz.

Mit STI 571 wurden trotz Nachweis von c-KIT für alle untersuchten Zelllinien erst bei sehr hohen, therapeutisch bisher nicht erreichbaren Konzentrationen wachstumhemmende Effekte gesehen. Die Substanz lag auf Rang 4.

Von den 3 klinisch bei ET noch nicht untersuchten Substanzen ist nur Gemcitabin zu weiteren Untersuchungen bei ET zu empfehlen.

Die Kombination mit STI 571 hat die Wirkung der einzelnen Testsubstanzen beeinflusst. In Kombination mit Etoposid, Vincristin, Gemcitabin oder Cytarabin wurde eine Wirkverstärkung der Substanzen beobachtet. Die in den Einzelversuchen Etoposid- und Vincristin-resistenteren Zelllinien (CADO-ES-1, STA-ET-2.1 und VH-64) zeigten eine Steigerung der Sensitivität durch Kombination mit STI 571. Die Sensitivität der gegenüber Etoposid und Vincristin empfindlichsten Zelllinie STA-ET-1 wurde im STI-571-Kombinationsversuch nicht gesteigert.

Die Gemcitabin-resistenteren Zelllinien (CADO-ES-1, STA-ET-2.1 und VH-64) reagierten zwar nach 48h sensibler auf die Koinkubation. Nach 72h hingegen nivellierte sich der Effekt. Bei VH-64 wurde sogar eine Abnahme der Sensitivität beobachtet.

Der Einsatz von STI 571 in Kombination mit konventioneller Chemotherapie könnte demnach möglicherweise eine Therapieoption bei ET sein. Vorher müssten aber weiterführende präklinische und klinische Untersuchungen erfolgen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Abe I, Saito S, Hori K, Suzuki M, Sato H. Role of dephosphorylation in accumulation of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate in human lymphoblastic cell lines with reference to their drug sensitivity. *Cancer Res* 1982; 42(7):2846-2851.
- [2] Abratt RP, Bezwoda WR, Falkson G, Goedhals L, Hacking D, Rugg TA. Efficacy and safety profile of gemcitabine in non-small-cell lung cancer: a phase II study. *J Clin Oncol* 1994; 12(8):1535-1540.
- [3] ALEXAN. Fachinformation. 2000. Karlsruhe, Pfizer GmbH.
- [4] Ambudkar SV, Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1999; 39:361-98.:361-398.
- [5] Anderson DM, Lyman SD, Baird A, Wignall JM, Eisenman J, Rauch C et al. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms. *Cell* 1990; 63(1):235-243.
- [6] Avramis VI, Biener R, Krailo M, Finklestein J, Ettinger L, Willoughby M et al. Biochemical pharmacology of high dose 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in childhood acute leukemia. *Cancer Res* 1987; 47(24 Pt 1):6786-6792.
- [7] Avramis VI, Weinberg KI, Sato JK, Lenarsky C, Willoughby ML, Coates TD et al. Pharmacology studies of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in pediatric patients with leukemia and lymphoma after a biochemically optimal regimen of loading bolus plus continuous infusion of the drug. *Cancer Res* 1989; 49(1):241-247.
- [8] Bauch HJ. Cytostatic drugs. 2: Bleomycins, antimetabolites, mitotic spindle poisons, L-asparaginase and anti-hormones. *Med Monatsschr Pharm* 1989; 12(2):34-45.
- [9] Bhalla K, Nayak R, Grant S. Isolation and characterization of a deoxycytidine kinase-deficient human promyelocytic leukemic cell line highly resistant to 1-beta-D- arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1984; 44(11):5029-5037.
- [10] Boyd M. The NCI in vitro anticancer drug discovery screen - Concept, implementation and operation, 1985-1995. http://home.ncifcrf.gov/mtdp/full_text/Paper309/Paper309.pdf . 3-10-2001.
Ref Type: Electronic Citation
- [11] Buchdunger E, Cioffi CL, Law N, Stover D, Ohno-Jones S, Druker BJ et al. Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(1):139-145.

- [12] Buchdunger E, Matter A, Druker BJ. Bcr-Abl inhibition as a modality of CML therapeutics. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1551(1):M11-M18.
- [13] Burris HA, III, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15(6):2403-2413.
- [14] Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 1987; 47(4):936-942.
- [15] Carmichael J, Fink U, Russell RC, Spittle MF, Harris AL, Spiessi G et al. Phase II study of gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1996; 73(1):101-105.
- [16] Casper ES, Green MR, Kelsen DP, Heelan RT, Brown TD, Flombaum CD et al. Phase II trial of gemcitabine (2,2'-difluorodeoxycytidine) in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Invest New Drugs* 1994; 12(1):29-34.
- [17] Catimel G, Vermorken JB, Clavel M, de Mulder P, Judson I, Sessa C et al. A phase II study of Gemcitabine (LY 188011) in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. EORTC Early Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 1994; 5(6):543-547.
- [18] Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* 1991; 66(1):85-94.
- [19] Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; 47(3):381-389.
- [20] Cormier Y, Eisenhauer E, Muldal A, Gregg R, Ayoub J, Goss G et al. Gemcitabine is an active new agent in previously untreated extensive small cell lung cancer (SCLC). A study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 1994; 5(3):283-285.
- [21] Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jurgens HF, Voute PA, Gadner H et al. 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* 2000; 18(17):3108-3114.
- [22] Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, Henze G, Graf N, Loffler H et al. Definition of a standard-risk group in children with AML. *Br J Haematol* 1999; 104(3):630-639.
- [23] Debes A, Rommel F, Breise M, Willers R, Gobel U, Wessalowski R. In vitro test-system for chemo- and thermosensitivity: an analysis of survival fractions and cell-cycle distributions in human Ewing's sarcomas as a model for tumors in pediatric oncology. *Klin Padiatr* 2002; 214(4):223-229.

- [24] Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 1997; 90(9):3691-3698.
- [25] Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM et al. The Ewing family of tumors - a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med* 1994; 331(5):294-299.
- [26] Dockhorn-Dworniczak B, Schafer KL, Dantcheva R, Blasius S, van Valen F, Burdach S et al. Detection of EWS-/FLI-1 gene fusion transcripts by RT-PCR as a tool in the diagnosis of tumors of the Ewing sarcoma group. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1994; 78:214-219.
- [27] Druker BJ. Taking aim at Ewing's sarcoma: is KIT a target and will imatinib work? *J Natl Cancer Inst* 2002; Nov 20;94(22):1660-1661.
- [28] Druker BJ, Lydon NB. Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 2000; 105(1):3-7.
- [29] Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001; 344(14):1038-1042.
- [30] Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344(14):1031-1037.
- [31] Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996; 2(5):561-566.
- [32] Ellison RR, Holland JF, Weil M, Jacquillat C, Boiron M, Bernard J et al. Arabinosyl cytosine: a useful agent in the treatment of acute leukemia in adults. *Blood* 1968; 32(4):507-523.
- [33] Evans WE, Rodman J, Relling MV, Crom WR, Rivera GK, Crist WM et al. Individualized dosages of chemotherapy as a strategy to improve response for acute lymphocytic leukemia. *Semin Hematol* 1991; 28(3 Suppl 4):15-21.
- [34] Ewing J. Diffuse endothelioma of bone. *Proceedings of the New York Pathological Society* 1921; 21:17-24.
- [35] Ferry DR, Traunecker H, Kerr DJ. Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Cancer* 1996; 32A(6):1070-1081.
- [36] Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(1):265-269.

- [37] Frohlich B, Ahrens S, Burdach S, Klingebiel T, Ladenstein R, Paulussen M et al. High-dosage chemotherapy in primary metastasized and relapsed Ewing's sarcoma. (EI)CESS. *Klin Padiatr* 1999; 211(4):284-290.
- [38] Furth JJ, Cohen SS. Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-d-arabinofuranoxyladenine. *Cancer Res* 1968; 28(10):2061-2067.
- [39] Furukawa T, Kubota T, Suto A, Takahara T, Yamaguchi H, Takeuchi T et al. Clinical usefulness of chemosensitivity testing using the MTT assay. *J Surg Oncol* 1991; 48(3):188-193.
- [40] Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN. The kit ligand, stem cell factor. *Adv Immunol* 1994; 55:1-96.:1-96.
- [41] Gandhi V, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Plunkett W. Metabolism and action of 2',2'-difluorodeoxycytidine: self-potentialiation of cytotoxicity. *Adv Exp Med Biol* 1991; 309A:125-30.:125-130.
- [42] GEMZAR. Fachinformation. 2002. Giessen, Lilly Deutschland GmbH.
- [43] Gidding CE, Meeuwse-de Boer GJ, Koopmans P, Uges DR, Kamps WA, de Graaf SS. Vincristine pharmacokinetics after repetitive dosing in children. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44(3):203-209.
- [44] Glivec. Fachinformation. 2002. Nürnberg, Novartis Pharma GmbH.
- [45] Gottesman MM. How cancer cells evade chemotherapy: sixteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. *Cancer Res* 1993; 53(4):747-754.
- [46] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(1):48-58.
- [47] Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993; 62:385-427.:385-427.
- [48] Grier HE. The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am* 1997; 44(4):991-1004.
- [49] Groninger E, Meeuwse-de Boer T, Koopmans P, Uges D, Sluiter W, Veerman A et al. Pharmacokinetics of vincristine monotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Res* 2002; 52(1):113-118.
- [50] Grunewald R, Abbruzzese JL, Tarassoff P, Plunkett W. Saturation of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate accumulation by mononuclear cells during a phase I trial of gemcitabine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991; 27(4):258-262.

- [51] Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 1989; 119(2):203-210.
- [52] Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res* 1988; 48(14):4024-4031.
- [53] Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003; 21(23):4342-4349.
- [54] Heinrich MC, Griffith DJ, Druker BJ, Wait CL, Ott KA, Ziegler AJ. Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor. *Blood* 2000; 96(3):925-932.
- [55] Hense HW, Ahrens S, Paulussen M, Lehnert M, Jurgens H. Descriptive epidemiology of Ewing's tumor--analysis of German patients from (EI)CESS 1980-1997. *Klin Padiatr* 1999; 211(4):271-275.
- [56] Hernandez P, Olivera P, Duenas-Gonzalez A, Perez-Pastenes MA, Zarate A, Maldonado V et al. Gemcitabine activity in cervical cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001; 48(6):488-492.
- [57] Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279(5350):577-580.
- [58] Hochhaus A, Lahaye T, Kreil S, Berger U, Metzgeroth G, Hehlmann R. Selective inhibition of tyrosine kinases - a new therapeutic principle in oncology. *Onkologie* 2001; 24 Suppl 5:65-71.
- [59] Hoffman RM. In vitro sensitivity assays in cancer: a review, analysis, and prognosis. *J Clin Lab Anal* 1991; 5(2):133-143.
- [60] Hongo T, Fujii Y, Igarashi Y. An in vitro chemosensitivity test for the screening of anti-cancer drugs in childhood leukemia. *Cancer* 1990; 65(6):1263-1272.
- [61] Hotfilder M, Lanvers C, Jurgens H, Boos J, Vormoor J. c-KIT-expressing Ewing tumour cells are insensitive to imatinib mesylate (STI571). *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 50(2):167-169.
- [62] Huang EJ, Nocka KH, Buck J, Besmer P. Differential expression and processing of two cell associated forms of the kit-ligand: KL-1 and KL-2. *Mol Biol Cell* 1992; 3(3):349-362.
- [63] Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res* 1991; 51(22):6110-6117.
- [64] Hwang WS, Chen LM, Huang SH, Wang CC, Tseng MT. Prediction of chemotherapy response in human leukemia using in vitro chemosensitivity test. *Leuk Res* 1993; 17(8):685-688.
- [65] Jia SF, Worth LL, Turan M, Duan X, X, Kleinerman ES. Eradication of osteosarcoma lung metastasis using intranasal gemcitabine. *Anticancer Drugs* 2002; 13(2):155-161.

- [66] Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartiala P, Tuveson D et al. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001; 344(14):1052-1056.
- [67] Jurgens H, Exner U, Gadner H, Harms D, Michaelis J, Sauer R et al. Multidisciplinary treatment of primary Ewing's sarcoma of bone. A 6-year experience of a European Cooperative Trial. *Cancer* 1988; 61(1):23-32.
- [68] Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mano H, Sato Y, Honma Y et al. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 2001; 97(7):1999-2007.
- [69] Kaspers GJ, Veerman AJ, Pieters R, Van Zantwijk CH, Smets LA, Van Wering ER et al. In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997; 90(7):2723-2729.
- [70] Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000; 11(4):265-283.
- [71] Kufe DW, Major PP, Egan EM, Beardsley GP. Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA. *J Biol Chem* 1980; 255(19):8997-900.
- [72] Landuzzi L, De Giovanni C, Nicoletti G, Rossi I, Ricci C, Astolfi A et al. The metastatic ability of Ewing's sarcoma cells is modulated by stem cell factor and by its receptor c-kit. *Am J Pathol* 2000; 157(6):2123-2131.
- [73] Lech-Maranda E, Korycka A, Robak T. The interaction of gemcitabine and cytarabine on murine leukemias L1210 or P388 and on human normal and leukemic cell growth in vitro. *Haematologica* 2000; 85(6):588-594.
- [74] Lewis I, Oberlin O, Judson IR, Juergens H, Gadner H, Exner GU. EURO E.W.I.N.G. 99. <http://euro-ewing.uni-muenster.de/>. 1999.
Ref Type: Electronic Citation
- [75] Liu WM, Stimson LA, Joel SP. The in vitro activity of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR-ABL positive chronic myeloid leukaemia cells: synergistic interactions with anti-leukaemic agents. *Br J Cancer* 2002; 86(9):1472-1478.
- [76] Lund B, Hansen OP, Theilade K, Hansen M, Neijt JP. Phase II study of gemcitabine (2',2'-difluorodeoxycytidine) in previously treated ovarian cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1994; Oct 19;86(20):1530-1533.
- [77] Lux ML, Rubin BP, Biase TL, Chen CJ, Maclure T, Demetri G et al. KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 156(3):791-795.

- [78] Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM et al. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000; 96(3):1070-1079.
- [79] Major PP, Egan EM, Beardsley GP, Minden MD, Kufe DW. Lethality of human myeloblasts correlates with the incorporation of arabinofuranosylcytosine into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(5):3235-3239.
- [80] Major PP, Egan EM, Herrick DJ, Kufe DW. Effect of ARA-C incorporation on deoxyribonucleic acid synthesis in cells. *Biochem Pharmacol* 1982; 31(18):2937-2940.
- [81] Mastrianni DM, Tung NM, Tenen DG. Acute myelogenous leukemia: current treatment and future directions. *Am J Med* 1992; 92(3):286-295.
- [82] Mauro MJ, Druker BJ. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist* 2001; 6(3):233-238.
- [83] Merchant MS, Woo CW, Mackall CL, Thiele CJ. Potential Use of Imatinib in Ewing's Sarcoma: Evidence for In Vitro and In Vivo Activity. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94(22):1673-1679.
- [84] Merimsky O, Meller I, Flusser G, Kollender Y, Issakov J, Weil-Ben-Arush M et al. Gemcitabine in soft tissue or bone sarcoma resistant to standard chemotherapy: a phase II study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45(2):177-181.
- [85] Merimsky O, Meller I, Kollender Y, Inbar M. Palliative effect of gemcitabine in osteosarcoma resistant to standard chemotherapy. *Eur J Cancer* 1998; 34(8):1296-1297.
- [86] Miyazawa K, Williams DA, Gotoh A, Nishimaki J, Broxmeyer HE, Toyama K. Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* 1995; 85(3):641-649.
- [87] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.
- [88] Okuda K, Weisberg E, Gilliland DG, Griffin JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* 2001; 97(8):2440-2448.
- [89] Pace E, Melis M, Siena L, Bucchieri F, Vignola AM, Profita M et al. Effects of gemcitabine on cell proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 46(6):467-476.
- [90] Paulussen M, Ahrens S, Craft AW, Dunst J, Frohlich B, Jabar S et al. Ewing's tumors with primary lung metastases: survival analysis of 114 (European Intergroup) Cooperative Ewing's Sarcoma Studies patients. *J Clin Oncol* 1998; 16(9):3044-3052.

- [91] Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R et al. Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 2001; 19(6):1818-1829.
- [92] Paulussen M, Ahrens S, Lehnert M, Taeger D, Hense HW, Wagner A et al. Second malignancies after ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/Austrian/Dutch study. *Ann Oncol* 2001; 12(11):1619-1630.
- [93] Paulussen M, Frohlich B, Jurgens H. Ewing tumour: incidence, prognosis and treatment options. *Paediatr Drugs* 2001; 3(12):899-913.
- [94] Paulussen M, Juergens H. Ewing-Sarkom und PNET des Kindesalters. Dt.Krebsgesellschaft: Kurzgefasste Interdisziplinäre Leitlinien 2002, 3.Auflage AWMF-Leitlinien-Register Nr. 025/006. 2002. <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/ll/ponk-203.htm>
Ref Type: Electronic Citation
- [95] Paulussen M, Radig K, Schuck A, Winkelmann W, Dunst J, Juergens H. Behandlungskonzept des Ewing-Tumors. *Der Onkologe* 2001; 7(4):428-437.
- [96] Peng B, Hayes M, Resta D, Racine-Poon A, Druker BJ, Talpaz M et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of imatinib in a phase I trial with chronic myeloid leukemia patients. *J Clin Oncol* 2004; 22(5):935-942.
- [97] Periclou AP, Avramis VI. NONMEM population pharmacokinetic studies of cytosine arabinoside after high-dose and after loading bolus followed by continuous infusion of the drug in pediatric patients with leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 39(1-2):42-50.
- [98] Peruche B, Schulz M. Gemcitabin, ein neues Zytostatikum. <http://www.pharmazeutische-zeitung.de> 07.1999. 1999. GOVI-Verlag.
Ref Type: Electronic Citation
- [99] Peters HD, Blatter J, Ermisch S. Gemcitabin: Pharmakologisches Profil und klinische Anwendung. *Der Onkologe* 1995; 1:367-382.
- [100] Pieters R, Loonen AH, Huisman DR, Broekema GJ, Dirven MW, Heyenbrok MW et al. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 1990; 76(11):2327-2336.
- [101] Pui CH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339(9):605-615.
- [102] Ravindranath Y, Yeager AM, Chang MN, Steuber CP, Krischer J, Graham-Pole J et al. Autologous bone marrow transplantation versus intensive consolidation chemotherapy for acute myeloid leukemia in childhood. Pediatric Oncology Group. *N Engl J Med* 1996; 334(22):1428-1434.

- [103] Raviv Y, Pollard HB, Bruggemann EP, Pastan I, Gottesman MM. Photosensitized labeling of a functional multidrug transporter in living drug-resistant tumor cells. *J Biol Chem* 1990; 265(7):3975-3980.
- [104] Reid JM, Qu W, Safgren SL, Ames MM, Krailo MD, Seibel NL et al. Phase I trial and pharmacokinetics of gemcitabine in children with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2004; 22(12):2445-2451.
- [105] Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* 1994; 84(9):3122-3133.
- [106] Ricotti E, Fagioli F, Garelli E, Linari C, Crescenzo N, Horenstein AL et al. c-kit is expressed in soft tissue sarcoma of neuroectodermic origin and its ligand prevents apoptosis of neoplastic cells. *Blood* 1998; 91(7):2397-2405.
- [107] Roessner A, Mittler U, Rose I, Radig K, Grote H. Pathology of Ewing sarcoma. *Pathologe* 1996; 17(1):6-17.
- [108] Roessner A, Ueda Y, Bockhorn-Dworniczak B, Blasius S, Peters A, Wuisman P et al. Prognostic implication of immunodetection of P glycoprotein in Ewing's sarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993; 119(4):185-189.
- [109] Schmidt D, Harms D. Cooperative Ewing's Sarcoma Studies 81/86: pathologico-anatomic and immunohistochemical findings and differential diagnosis of Ewing sarcoma. *Klin Padiatr* 1988; 200(3):236-242.
- [110] Schmidt D, Harms D, Burdach S. Malignant peripheral neuroectodermal tumours of childhood and adolescence. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 406(3):351-365.
- [111] Schmidt D, Herrmann C, Jurgens H, Harms D. Malignant peripheral neuroectodermal tumor and its necessary distinction from Ewing's sarcoma. A report from the Kiel Pediatric Tumor Registry. *Cancer* 1991; 68(10):2251-2259.
- [112] Shimoyama Y, Kubota T, Watanabe M, Ishibiki K, Abe O. Predictability of in vivo chemosensitivity by in vitro MTT assay with reference to the clonogenic assay. *J Surg Oncol* 1989; 41(1):12-18.
- [113] Sikora K, Advani S, Korolchouk V, Magrath I, Levy L, Pinedo H et al. Essential drugs for cancer therapy: a World Health Organization consultation. *Ann Oncol* 1999; 10(4):385-390.
- [114] Slevin ML, Pfall EM, Aherne GW, Harvey VJ, Johnston A, Lister TA. Effect of dose and schedule on pharmacokinetics of high-dose cytosine arabinoside in plasma and cerebrospinal fluid. *J Clin Oncol* 1983; 1(9):546-551.

- [115] Smithey BE, Pappo AS, Hill DA. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(4):486-492.
- [116] Spath-Schwalbe E, Genvresse I, Koschuth A, Dietzmann A, Grunewald R, Possinger K. Phase II trial of gemcitabine in patients with pretreated advanced soft tissue sarcomas. *Anticancer Drugs* 2000; 11(5):325-329.
- [117] Stahlmann R, Maschmeyer G. Behandlung mit Zytostatika. In: Lemmer B, Brune K, editors. *Pharmakotherapie - Klinische Pharmakologie*. München, Jena: Urban und Fischer Verlag, 2001: 162-172.
- [118] Steinherz PG, Seibel NL, Ames MM, Avramis VI, Krailo MD, Liu-Mares W et al. Phase I study of gemcitabine (difluorodeoxycytidine) in children with relapsed or refractory leukemia (CCG-0955): a report from the Children's Cancer Group. *Leuk Lymphoma* 2002; 43(10):1945-1950.
- [119] Steuart CD, Burke PJ. Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nat New Biol* 1971; 233(38):109-110.
- [120] Steuart CD, Burke PJ. Cytidine deaminase and the development of resistance to arabinosyl cytosine. *Nat New Biol* 1971; 233(38):109-110.
- [121] Stevens RF, Hann IM, Wheatley K, Gray RG. Marked improvements in outcome with chemotherapy alone in paediatric acute myeloid leukemia: results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party. *Br J Haematol* 1998; 101(1):130-140.
- [122] Taylor CG, Sargent JM, Elgie AW, Williamson CJ, Lewandowicz GM, Chappatte O et al. Chemosensitivity testing predicts survival in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2001; 22(4):278-282.
- [123] Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84(21):7735-7738.
- [124] Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control* 2003; 10(2):159-165.
- [125] Topaly J, Zeller WJ, Fruehauf S. Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 2001; 15(3):342-347.
- [126] Tuveson DA, Willis NA, Jacks T, Griffin JD, Singer S, Fletcher CD et al. STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein: biological and clinical implications. *Oncogene* 2001; 20(36):5054-5058.

- [127] Ueda K, Okamura N, Hirai M, Tanigawara Y, Saeki T, Kioka N et al. Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone, and dexamethasone, but not progesterone. *J Biol Chem* 1992; 267(34):24248-24252.
- [128] Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, Gill DR, Hyde SC, Higgins CF. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 1992;(355):830-833.
- [129] van Oosterom AT, Judson I, Verweij J, Stroobants S, Donato dP, Dimitrijevic S et al. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. *Lancet* 2001; 358(9291):1421-1423.
- [130] van Valen F. Ewing's sarcoma family of tumors. In: Masters J, Palsson B, editors. *Human Cell Culture* Vol. I. Kluwer Academic Publishers, 1999: 55-85.
- [131] VEPESID. Fachinformation. 2000. München, Bristol-Myers Squibb GmbH.
- [132] Verweij J, van Oosterom A, Blay JY, Judson I, Rodenhuis S, van der GW et al. Imatinib mesylate (STI-571 Glivec, Gleevec) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target. Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *Eur J Cancer* 2003; 39(14):2006-2011.
- [133] Vincent BR, Buttin G. Studies on 1-beta-D-arabinofuranosyl cytosine-resistant mutants of Chinese hamster fibroblasts: III. Joint resistance to arabinofuranosyl cytosine and to excess thymidine--a semidominant manifestation of deoxycytidine triphosphate pool expansion. *Somatic Cell Genet* 1979; 5(1):67-82.
- [134] Vincristinsulfat. Fachinformation. 1999. Holzkirchen, Hexal AG.
- [135] Wagner A, Hempel G, Gumbinger HG, Jurgens H, Boos J. Pharmacokinetics of anticancer drugs in vitro. *Adv Exp Med Biol* 1999; 457:397-407.
- [136] Wang WL, Healy ME, Sattler M, Verma S, Lin J, Maulik G et al. Growth inhibition and modulation of kinase pathways of small cell lung cancer cell lines by the novel tyrosine kinase inhibitor STI 571. *Oncogene* 2000; 19(31):3521-3528.
- [137] Weisberg E, Griffin JD. Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 2000; 95(11):3498-3505.
- [138] Wiley JS, Jones SP, Sawyer WH, Paterson AR. Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *J Clin Invest* 1982; 69(2):479-489.
- [139] Woods WG, Kobrinsky N, Buckley JD, Lee JW, Sanders J, Neudorf S et al. Timed-sequential induction therapy improves postremission outcome in acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 1996; 87(12):4979-4989.

- [140] Wurthwein G, Boos J. Low dose--high dose: what is the right dose? Pharmacokinetic modeling of etoposide. *Cancer Chemother Pharmacol* 2002; 49(4):303-308.
- [141] Wurthwein G, Klingebiel T, Krumpelmann S, Metz M, Schwenker K, Kranz K et al. Population pharmacokinetics of high-dose etoposide in children receiving different conditioning regimens. *Anticancer Drugs* 2002; 13(1):101-110.
- [142] Xu JM, Song ST, Tang ZM, Jiang ZF, Liu XQ, Zhou L et al. Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay in vitro. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 53(1):77-85.
- [143] Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ et al. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987; 6(11):3341-3351.
- [144] Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R, Ramakers-Van Woerden NL, den Boer ML, Wunsche R et al. Cellular drug resistance profiles in childhood acute myeloid leukemia: differences between FAB types and comparison with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 96(8):2879-2886.

