

AUS DEM ZENTRUM DER PHARMAKOLOGIE
DES KLINIKUMS DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT
FRANKFURT AM MAIN

INSTITUT FÜR KLINISCHE PHARMAKOLOGIE
DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. RER. NAT. G. GEISSLINGER

**EINFLUSS DER SERUMPROTEINBINDUNG AUF DIE AUFNAHME-
UND RETENTIONSKINETIK VON IDARUBICIN IN EINE SENSIBLE
UND RESISTENTE HUMANE HL-60 LEUKÄMIEZELLINIE**

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN
DES FACHBEREICHS HUMANMEDIZIN
DER JOHANN WOLFGANG GOETHE-UNIVERSITÄT
FRANKFURT AM MAIN

VORGELEGT VON
MARTINA KESSEL
AUS KONSTANZ

FRANKFURT AM MAIN
2000

Dekan:

Prof. Dr. med. G. von Jagow

Referent:

Priv.-Doz. Dr. B.G. Woodcock

Koreferent:

Uni.-Doz. Dr. J. Cinatl

Tag der mündlichen Prüfung:

23. August 2000

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGEN	VI
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. MULTIDRUG-RESISTENZ	1
1.1.1. <i>P-Glykoprotein</i>	2
1.1.2. <i>Andere Resistenzmechanismen</i>	4
1.2. ANTHRAZYKLINE.....	5
1.2.1. <i>Idarubicin</i>	5
1.3. MODULATION DER MULTIDRUG-RESISTENZ.....	7
1.3.1. <i>R-Verapamil</i>	8
1.3.2. <i>Weitere Ansätze</i>	10
1.4. ZIELSETZUNG	11
2. MATERIALIEN	12
2.1 ZELLINIEN	12
2.2. PROBANDEN	12
2.3. CHEMIKALIEN.....	13
2.3.1. <i>Pharmaka</i>	13
2.3.2. <i>Stammlösungen</i>	13
2.3.3. <i>Inkubationsmedien</i>	14
2.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
2.5. GERÄTE	14
3. METHODEN.....	16
3.1 GRUNDTECHNIKEN	16
3.1.1. <i>Zellkultur</i>	16
3.1.2. <i>Serumgewinnung</i>	16
3.1.3. <i>Lymphozytenisolierung</i>	16
3.1.4. <i>Trypanblaufärbung</i>	16
3.2. BESTIMMUNG DER IDARUBICIN KONZENTRATION	17
3.2.1. <i>Fluoreszenzspektrometer/Emissionsspektrum</i>	17
3.2.2. <i>Eichkurve</i>	18
3.2.3. <i>Bestimmung der Meßgenauigkeit</i>	18
3.2.4. <i>Inkubationsmaterial</i>	18
3.3. GLEICHGEWICHTSDIALYSE	19
3.4. AKKUMULATIONS- UND RETENTIONSSTUDIEN	21
3.5. STATISTIK.....	22

4. ERGEBNISSE	24
4.1. GLEICHGEWICHTSDIALYSE	24
4.1.1. <i>Proteinbindung von Idarubicin an 15% FCS/PBS</i>	24
4.1.2. <i>Proteinbindung von Idarubicin an 4 g/dl Humanalbumin/PBS</i>	25
4.1.3. <i>Proteinbindung von Idarubicin an 100% Humanserum</i>	26
4.2. STUDIEN MIT DEN ZELLINIEN HL-60 UND HL-60-VINC	27
4.2.1. <i>Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Inkubationsmedium</i>	27
4.2.2. <i>Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsmedien</i>	29
4.2.3. <i>Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der Idarubicin Inkubationskonzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium</i>	31
4.2.4. <i>Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium</i>	35
4.2.5. <i>Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der α_1-sauren-Glykoprotein Konzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium</i>	37
4.2.6. <i>Idarubicin Retention in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium</i>	39
4.3. STUDIEN MIT HUMANEN LYMPHOZYTEN.....	43
4.3.1. <i>Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Inkubationsmedium</i>	43
4.3.2. <i>Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der α_1-sauren-Glykoprotein Konzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium</i>	45
5. DISKUSSION	47
5.1. DISKUSSION DER ERGEBNISSE.....	47
5.2. SCHLUßFOLGERUNG UND AUSBLICK	52
6. ZUSAMMENFASSUNG	53
7. LITERATUR	54
8. ANHANG	66
9. DANKSAGUNG	84
10. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	85
11. LEBENS LAUF	86

Abkürzungen

Abb.	Abbildung	Ffm	Frankfurt am Main
ABC	„ATP-binding cassette“/ ATP bindende Kassette	g	Gramm
ADR	Adriamycin	h	Stunde(n)
AGP	α_1 -saures Glykoprotein	^3H	Thymidin
AML	Akute myeloische Leukämie	H ₂ O	Wasser
ANOVA	„Analysis of variances“/ Varianzanalyse	HA	Humanalbumin
anorg.	anorganisch	HCl	Salzsäure
ALL	Akute lymphatische Leukämie	HL-60	Zelllinie; „human leukemic-60“
ARA-C	Cytarabin	HL-60-Vinc	Zelllinie; „human leukemic-60-vincristine resistant“
at mdr	„altered/atypical multidrug resistance“	HPLC	„high performance liquid chromatography“/ Hochleistungsflüssig- keistchromatographie
ATP	Adenosintriphosphat	HS	Humanserum
AV	atrioventrikulär	i.v.	intravenös
b	y-Achsenabschnitt	IDA	Idarubicin
BRD	Bundesrepublik Deutschland	IDAol	Idarubicinol
bzw.	beziehungsweise	KD	Kilodalton
c	Konzentration	kg	Kilogramm
Ca	Kalzium	l	Liter
ca.	circa	λ	Wellenlänge
Cl	Chlor	LDL	„low density lipo- proteins“/Lipoproteine niedriger Dichte
CLL	Chronische lymphatische Leukämie	m	Steigung
CO ₂	Kohlendioxid	max.	maximal
CVAD	Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason	MDR	„multidrug-resistance“/ Multidrug-Resistenz
d.h.	das heißt	meq	Milliäquivalent
DNA	Desoxyribonucleinsäure	Mg	Magnesium
E	Extinktion	mg	Milligramm
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	μg	Mikrogramm
EPOCH	Etoposid, Vincristin, Doxorubicin, Cyclo- phosphamid, Prednison	min	Minute(n)
FCS	fetales Kälberserum	min.	minimal
		ml	Milliliter
		μl	Mikroliter
		mM	millimolar

ABKÜRZUNGEN

μM	mikromolar	P-gp	P-Glykoprotein
mmol	Millimol	r	Korrelationskoeffizient
μmol	Mikromol	RPMI	1640 Medium
mOsm	Milliosmolar	RT	Raumtemperatur
Mr	relative Molekülmasse	R-VRP	R-Verapamil
MRP	„multidrug resistance related protein“	s	Sekunde(n)
MW	Molekulargewicht	SD	Standardabweichung
μg	Mikrogramm	Tab.	Tabelle
μl	Mikroliter	Ts.	Taurus
μM	mikromolar	UpM	Umdrehungen pro Minute
μmol	Mikromol	USA	„United States of America“/Vereinigte Staaten von Amerika
N	Normallösung		
n.b.	nicht bestimmt		
ng	Nanogramm	V	Volt
nm	Nanometer	V _r	Variationskoeffizient
p	Probabilität	VAD	Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason
P	Proband		
PBS	Dulbecco's phosphat-gepufferte Salzlösung, ohne Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Salze	VLDL	„very low density lipoproteins“/Lipoproteine sehr niedriger Dichte
PD	Privatdozent	VP-16	Etoposid
pg	Pikogramm	VRP	Verapamil
pH	pondus Hydrogenii	W	Watt
		x/y	Wertepaar

1. Einleitung

1.1. Multidrug-Resistenz

Eines der größten Probleme der Chemotherapie stellt die Resistenz von Tumorzellen gegen eine große Anzahl von zytotoxischen Substanzen dar. Bereits zu Beginn der Chemotherapie zeigt ein Teil der Tumoren keine Sensibilität gegen Zytostatika; dies wird als **primäre, bzw. intrinsische Resistenz** bezeichnet. Jedoch kann sich eine Resistenz auch erst im Laufe der Behandlung entwickeln. Nach anfänglicher Tumorreduktion schreitet die Erkrankung weiter fort und ist durch die Chemotherapie nicht mehr zu beeinflussen. Diese **sekundäre, bzw. erworbene Resistenz** wird durch den Kontakt von primär sensiblen Zellen mit antineoplastischen Substanzen erworben und auf die Selektion einer Subpopulation einer mutierten, Zytostatika resistenten Tumorzelle zurückgeführt (van der Heyden *et al.* 1995).

Diese Tumorzellen werden oft nicht nur gegen das verabreichte Zytostatikum resistent, sondern erwerben eine Kreuzresistenz gegen andere Medikamente (Ecker & Chiba 1995). Dieses Phänomen der sogenannten **Multidrug-Resistenz (MDR)** findet sich vor allem bei Pharmaka aus den Substanzklassen der Anthrazykline (z.B. Daunorubicin und Doxorubicin), der Alkaloide (z.B. Vincristin, Vinblastin und Vindesin), der Epipodophyllotoxine (z.B. Etoposid und Teniposid), der Taxane (z.B. Paclitaxel) und anderer (z.B. Actinomycin D, Amsacrin, Mitoxantron) (Sikic *et al.* 1997, Volm & Efferth 1994). In den meisten Fällen geht mit dieser Kreuzresistenz eine erniedrigte Pharmaka-Akkumulation in den resistenten Tumorzellen einher (Ecker & Chiba 1995).

Für dieses Phänomen der MDR sind die unterschiedlichsten Mechanismen verantwortlich, von denen nur eine geringe Anzahl bisher identifiziert worden sind (Tab. 1).

Resistenzmechanismus	Resistenzproteine bzw. -gene
Veränderung des Pharmakatransportes	P-Glykoprotein, MRP, Natrium-Pumpe
Veränderung der Expression, bzw. Mutation der nukleären Zielstrukturen der Pharmaka	Topoisomerase I + II, Thymidylat-Synthetase, Metallothionein, Dihydrofolat-Reduktase
Veränderung des Pharmakametabolismus	Glutathion-S-Transferase
Veränderung der DNA-Reparatur	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyl-Transferase
Veränderung der Pharmaka induzierten Apoptose	Bcl-2-Protein, p53 Gen

Tab. 1: Mechanismen der Multidrug-Resistenz (Bates *et al.* 1996, Ramachandran & Melnick 1999, Ringborg & Platz 1996, Twentyman 1997, Volm & Efferth 1994).

In den meisten Tumoren sind jedoch mindestens zwei Resistenzmechanismen bzw. -proteine aktiv (Volm *et al.* 1992). Eine solche Koexpression spricht für einen gemeinsamen Regulator, wobei Protoonkogenen und Proteinkinasen dabei eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird (Volm & Efferth 1994). Noch ist ein zentraler Regulator aber unbekannt und die Forschung konzentriert sich hauptsächlich auf die Resistenzproteine, im besonderen auf P-Glykoprotein.

1.1.1. P-Glykoprotein

Die wichtigste und am besten untersuchte Veränderung bei Multidrug resistenten Tumorzellen besteht in einer Überexpression des *mdr1* Gens auf Chromosom 7, Lokus q 21.1 (Callen *et al.* 1987, Fairchild *et al.* 1987) und seinem Gen-Produkt, dem **P-Glykoprotein (P-gp)** (Abb. 1) mit einem Molekulargewicht von 170 kDa (Ambudkar *et al.* 1999, Ueda *et al.* 1986, Volm *et al.* 1990).

P-gp ist eine Efflux-Pumpe der Zellmembran, die in die Familie der Transporter der sogenannten ATP-bindenden Kasette (ABC) gehört (Higgins 1994), mit Spezifität für hydrophobe, organismusfremde Moleküle (Shapiro *et al.* 1998, van der Heyden *et al.* 1995). Der Substrattransport ist ATP abhängig.

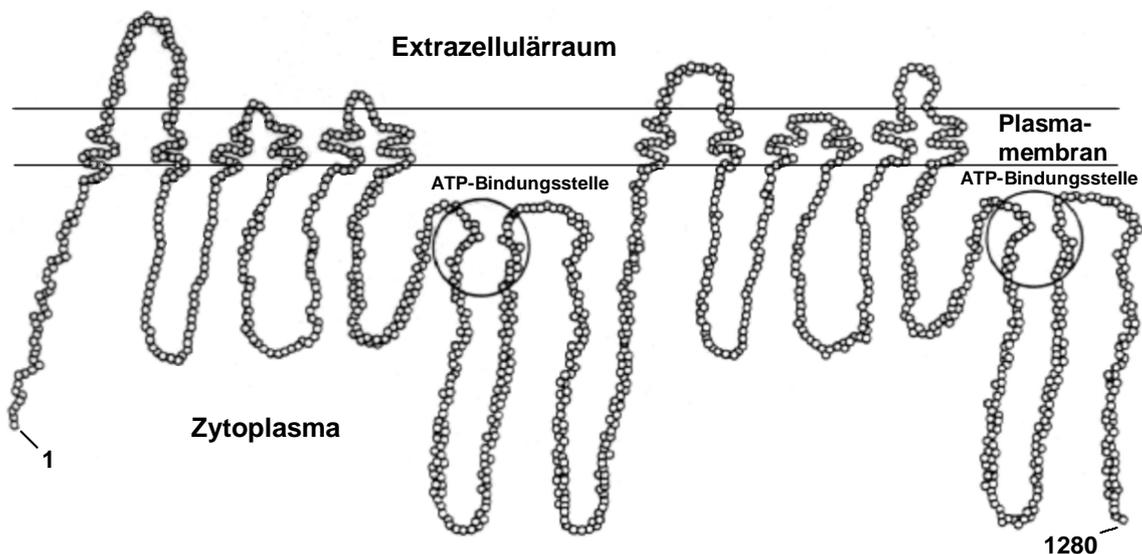


Abb. 1: Strukturmodell des Multidrug-Transporters P-Glykoprotein (Lodish *et al.* 1996).

Die beiden Proteinhälften mit einer Gesamtlänge von 1280 Aminosäuren haben ähnliche Sequenzen. Zwei ATP-Bindungsstellen befinden sich auf der zytoplasmatischen Seite der Membran.

Die Transportfunktion des P-gp ist physiologisch von Bedeutung, da sich hohe P-gp Spiegel in normalem Gewebe, wie z.B. in der Leber (Gallengang), Niere (proximaler Tubulus), Dünndarm, Kolon, Pankreas, Nebennierenrinde und Gehirn finden (van der Heyden *et al.* 1995, Fojo *et al.* 1987, Thiebaut *et al.* 1987). In den meisten Fällen ist P-gp auf der Lumenseite exprimiert und exkretiert Substanzen in die Galle oder den Urin oder hat die Funktion einer Barriere gegen exogene Toxine, z.B. im Gastrointestinaltrakt oder auch der Blut-Hirn-Schranke. Die bisher bekannten natürlichen endogenen Substrate für P-gp sind Steroide, Hormone und Bilirubin (Hegewisch-Becker & Hossfeld 1996). In peripheren Blutzellen (z.B. zytotoxischen T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen) kann ebenfalls eine *mdr1* Gen-, bzw. P-gp-Expression gefunden werden (Chaudhary *et al.* 1992, Klimecki *et al.* 1994, Nüssler *et al.* 1994).

1. EINLEITUNG

Die Funktion des P-gp als Efflux-Pumpe spielt beim Versagen der Chemotherapie eine große Rolle (Abb. 2). P-gp verhindert das Eindringen der Zytostatika durch die Zellmembran, bzw. eliminiert sie schnell wieder aus der Zelle (Gottesman *et al.* 1996). Der Grad, um den die Akkumulation sich verringert, hängt zum einen von der Affinität des P-gp zum Substrat und zum anderen von der Höhe des P-gp Spiegels ab. So sind viele Naturprodukte (z.B. Daunomycin, Taxol oder Vincristin), die aus Pflanzen oder Mikroorganismen isoliert wurden, gute Substrate für den P-gp Efflux, nicht jedoch vollsynthetisch erzeugte Zytostatika (z.B. Cisplatin, Cyclophosphamid oder Methotrexat) (Pastan & Gottesman 1991). Die Überexpression von sehr hohen P-gp Spiegeln kann zu einer mehr als 100-fachen Resistenz gegen Chemotherapeutika *in vitro* führen (Bates *et al.* 1994).

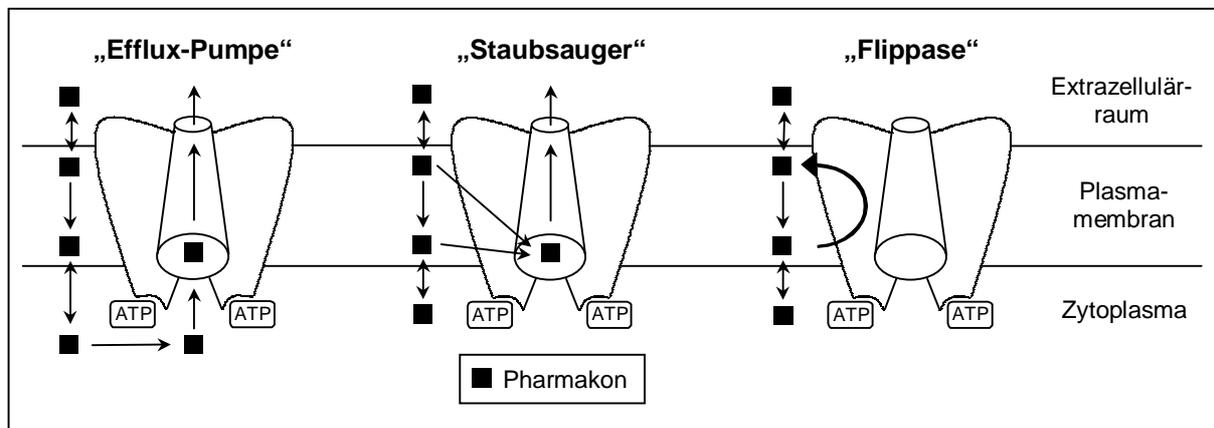


Abb. 2: P-Glykoprotein als Efflux-Pumpe (modifiziert nach Ecker & Chiba 1995, Higgins 1994).

Mehrere Modelle versuchen die Funktionsweise des P-gp als Detoxifikationssystem zu erklären. Nach klassischer Vorstellung von der „Efflux-Pumpe“ werden die Toxine im Zytoplasma an P-gp gebunden. Durch einen ATP-abhängigen Prozeß wird dann das Toxin durch transmembranöse Tunnelbildung in den Extrazellulärraum ausgeschleust (Ecker & Chiba 1995, Fardel *et al.* 1996). Nach dem „hydrophoben Staubsauger“ Modell können die Toxine noch während ihres Weges durch die Phospholipidmembran abgefangen und durch P-gp wieder ausgeschleust werden (Gottesman & Pastan 1993). Im „Flippase“ Modell trifft P-gp im inneren Anteil der Plasmamembran auf das Toxin und „flipp“ es zum äußeren Anteil, von wo es in den Extrazellulärraum diffundiert (Higgins 1994, Higgins & Gottesman 1992). Alternativ kommt eine Beeinflussung des intrazellulären pH und/oder des elektrischen Potentials der Plasmamembran in Betracht, indem P-gp als Protonenpumpe oder Chloridkanal agiert (Roepe *et al.* 1993). Dadurch wird indirekt eine Erniedrigung der intrazellulären Akkumulation von schwach basischen, kationischen lipophilen Zytostatika erreicht.

In Malignomen finden sich hohe P-gp Spiegel vor allem in Geweben, die diese bereits physiologischerweise exprimieren. Zu Beginn der Chemotherapie zeigt sich dann oft eine primär auftretende Resistenz. Besonders häufig tritt dies bei hepatozellären Karzinomen, Nieren-, Nebennierenrinden- und Pankreaskarzinomen auf (van der Heyden *et al.* 1995).

Bei Tumoren, die aus Geweben entstehen, die wenig P-gp exprimieren, scheint die neu auftretende Expression von P-gp eine wichtige Rolle zu spielen. Bei akuten Leukämien (Marie *et al.* 1991), Lymphomen (Cheng *et al.* 1993), multiplen Myelomen (Petrini *et al.* 1995) und Mammakarzinomen (Schneider *et al.* 1989) wurde eine Überexpression von P-gp nach Kontakt mit verschiedensten Chemotherapeutika berichtet. So tritt z.B. bei noch unbehandelter akuter Leukämie eine Überexpression von P-gp in ca. 30-40% der Fälle auf (Campos *et al.* 1992, Holmes *et al.* 1989, Sikic 1993, Yuen *et al.* 1994, Zhou *et al.* 1992). Zum Zeitpunkt des Rezidivs findet sich eine Expression von ca. 70%. Diese Expression korreliert ebenfalls mit dem Pharmaka Efflux. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß *mdr1* oder die P-gp-Expression bei der akuten Leukämie mit einer verringerten Überlebenszeit, verringerter kompletter Remissionsrate oder früherem Rezidiv positiv korreliert (Campos *et al.* 1992, Guerci *et al.* 1995, Kuwazuru *et al.* 1990, Marie *et al.* 1991, Zhou *et al.* 1992). Die positive Korrelation zwischen P-gp Expression und schlechter Prognose läßt sich, obwohl P-gp das bisher bedeutendste Resistenzprotein ist, jedoch nicht bei allen Tumoren nachweisen (Dalton *et al.* 1995, Galettis *et al.* 1994).

1.1.2. Andere Resistenzmechanismen

Zunehmende Bedeutung gewinnen die nicht-P-gp-vermittelten Resistenzen, z.B. durch das „**multidrug-resistance-associated-protein**“ (MRP), ein Membran Glykoprotein (190 kDa) aus der Gruppe der ABC-Transporter (Barrand *et al.* 1994, Broxterman *et al.* 1995, Hu *et al.* 1999). MRP ist eine ATP-abhängige Pumpe, unter anderem für endogene Glutathionkonjugate (Kallavaris 1997, Muller *et al.* 1994), die für die intrazelluläre Entgiftung von zytotoxischen Substanzen von Bedeutung sind (Volm & Efferth 1994). Vermutlich spielt MRP desweiteren bei der zellulären Elimination von konjugierten Substanzen und organismusfremden Molekülen, wie z.B. Zytostatika, eine wichtige Rolle (Nooter & Stoter 1996).

Außerdem kommt dem *at-mdr* Gen („altered/atypical multidrug resistance“) und damit der **DNA-Topoisomerase II** eine wichtige Rolle zu (Booser & Hortobagyi 1994). Die Topoisomerase II ist ein Zellkernenzym, das die dreidimensionale Struktur der doppelsträngigen DNA durch transiente DNA Brüche und Wiederverknüpfung reguliert (Pommier 1993, Wang 1996). Chemotherapeutika, wie die Anthrazykline und Epipodophyllotoxine, sind Topoisomerase II Inhibitoren (Pommier 1993), die sich an dieses Protein binden und einen irreversiblen Komplex bilden. Dies verhindert die Wiederverknüpfung des DNA-Doppelstranges und führt dadurch zum Zelltod (Capranico *et al.* 1989, Volm & Efferth 1994). Eine vermehrte Expression des Enzyms erhöht daher die Empfindlichkeit des Tumors gegen Zytostatika, während eine niedrige Expression zur Resistenz führt (Volm & Efferth 1994).

1.2. Anthrazykline

Eine der Substanzklassen, die besonders von der MDR betroffen ist, sind die Anthrazykline (Gianni 1997, Nielsen *et al.* 1996). Seit den späten 50er Jahren wurden Anthrazyklin-Antibiotika aus *Streptomyces peucetius* isoliert. Farmitalia Research Laboratories in Mailand (Arcamone *et al.* 1961) und die Pariser Gruppe der Rhone-Poulenc Laboratories (Dubost *et al.* 1963) entwickelten gleichzeitig die erste klinisch relevante Substanz: Daunorubicin. Erfolge mit Daunorubicin wurden in der Behandlung der akuten myeloblastischen (Boiron *et al.* 1969) und lymphoblastischen (Jacquillat *et al.* 1966) Leukämie, sowie soliden Tumoren im Kindesalter (Tan & Tasaka 1965) erzielt. Es wurden aber auch eine Reihe von toxischen Nebenwirkungen wie Knochenmarkshypoplasien, Alopezie, extravasalen Nekrosen und vor allem einer medikamentös nicht beherrschbaren Kardiotoxizität bekannt (Booser & Hortobagyi 1994).

In den folgenden Jahren wurden die verschiedensten Derivate aus der Muttersubstanz durch biochemische Modifikation der Aglykone und Zucker Anteile entwickelt. Die wichtigsten Ziele bei der Entwicklung der neuen Anthrazykline sind ein erhöhtes Aktivitätsspektrum und eine reduzierte Kardiotoxizität.

1.2.1. Idarubicin

Eines der bereits 1976 entwickelten Anthrazyklinderivate, das immer mehr an Bedeutung gewinnt (Buckley & Lamb 1997, Robert 1993), ist **Idarubicin (IDA)** (Abb. 3). Es wird vor allem in der Therapie von Leukämien, Myelodysplasien, Non-Hodgkin Lymphomen und Mammakarzinomen verwendet (Goebel 1992, Hollingshead & Faulds 1991). IDA (4-Demethoxydaunorubicin) unterscheidet sich von der Muttersubstanz durch die Substitution der C4-methoxyl-Gruppe im D Ring des Aglykons durch Wasserstoff (Molekulargewicht 533.96) (Adria Laboratories 1990, Goebel 1992).

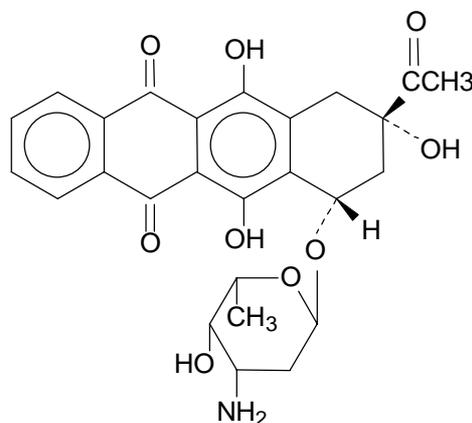


Abb. 3: Strukturformel von Idarubicin C₂₆H₂₇NO₉.HCl (Adria Laboratories 1990).

Pharmakokinetik

Diese geringfügige Veränderung des Moleküls hatte signifikante Konsequenzen für die pharmakokinetischen Eigenschaften. IDA zeichnet sich gegenüber den anderen Anthrazyklinen vor allem durch eine erhöhte Lipophilie aus. Dies verbesserte die Absorption durch die gastrointestinale Mukosa (Buckley & Lamb 1997, Cerosimo 1992), ebenso wird eine wesentlich schnellere Aufnahme in die Tumorzellen (Ganzina *et al.* 1986, Robert *et al.* 1990, Speth *et al.* 1986), sowie Liquorgängigkeit (Reid *et al.* 1990, Adria Laboratories 1990) ermöglicht. Desweiteren wird der C-13-Alkohol-Metabolit Idarubicinol (IDAol), vor allem nach oraler Gabe, durch Metabolisierung in der Leber in hohen Konzentrationen gebildet und zeigt die gleiche zytotoxische Aktivität wie die Muttersubstanz (Cerosimo 1992, Fukushima *et al.* 1994). Außerdem zeigte sich für Idarubicin und seinen Metaboliten *in vitro* und in klinischen Versuchen eine größere antitumorale Aktivität (Cerosimo 1992, Di Marco *et al.* 1977), sowie eine geringere Kardiotoxizität (Casazza *et al.* 1984, Cerosimo 1992, Goebel 1992, Platel *et al.* 1999) als für Daunorubicin.

IDA wird nach oraler Gabe im Gastrointestinaltrakt schnell resorbiert, ist nach 30 min im Plasma nachweisbar und erreicht Spitzenspiegel nach ca. 2-4 Stunden (Hollingshead & Faulds 1991, Stewart *et al.* 1991). Die Bioverfügbarkeit wird mit 30% angegeben (Gillies *et al.* 1987, Smith *et al.* 1987). Für IDA finden sich maximale Plasmakonzentrationen von 3 ng/ml (<1-9 ng/ml) (Eksborg *et al.* 1990) für den Metaboliten IDAol dagegen von 20 ng/ml (11-36 ng/ml) (Eksborg *et al.* 1990). Der Plasmaanteil des Metaboliten IDAol spiegelt den first pass Metabolismus wieder (Buckley & Lamb 1997). Die mittlere Halbwertszeit für IDA liegt bei 15h (Berman *et al.* 1983, Speth *et al.* 1989), für IDAol bei 60h (Elbaeck *et al.* 1989, Hochster *et al.* 1986, Pannutti *et al.* 1986, Stewart *et al.* 1991). Orales IDA zeigt eine lineare Pharmakokinetik, es akkumuliert nicht (Speth *et al.* 1986).

Nach i.v. Administration von IDA werden dagegen maximale Plasmakonzentrationen von 189 ng/ml (91-679 ng/ml) und für IDAol von 8 ng/ml (5-11 ng/ml) erreicht (Eksborg *et al.* 1990). Die mittlere Halbwertszeit von IDA beträgt 22 Stunden, die von IDAol sogar über 45 Stunden (Adria Laboratories 1990). Das Dispositionsprofil zeigt eine rasche Verteilungsphase, vermutlich auf Grund der extensiven Gewebefindung (Adria Laboratories 1990).

Die mittlere Plasmaproteinbindung, *in vitro* ermittelt mit der Gleichgewichtsdialyse, beträgt für *in vivo* erreichbare IDA Konzentrationen 97% und für IDAol 94 %, die Bindung ist konzentrationsunabhängig (Adria Laboratories 1990).

Die Plasmaclearance ist durch einen extensiven hepatischen Metabolismus charakterisiert. Die Elimination findet vorwiegend biliär und zu einem geringeren Anteil renal, hauptsächlich in Form des primären Metaboliten IDAol, statt (Adria Laboratories 1990).

Wirk- und Resistenzmechanismen

Der Hauptwirkungsmechanismus von IDA, wie auch der anderen Anthrazykline, ist die Beeinflussung der DNA-Synthese. Der zytotoxische Effekt wird vor allem über die Interkalierung der DNA und die Induktion von DNA-Doppelstrang-Brüchen durch Inhibition der Topoisomerase II erreicht (Gieseler *et al.* 1994). Die Bindungsaffinität von IDA an die DNA, die Fähigkeit die DNA zu interkalieren und die Topoisomerase II zu inhibieren sind ähnlich oder sogar etwas besser als die von Daunorubicin oder Doxorubicin (Fukushima *et al.* 1993, Plumbridge & Brown 1978, Rose 1988). Die erhöhte *in vitro* Zytotoxizität und *in vivo* antitumorale Aktivität von IDA wird unter anderem auf die erhöhte Lipophilie und DNA Bindungskapazität zurückgeführt (Di Marco *et al.* 1978, Gieseler *et al.* 1994, Gieseler *et al.* 1995a,b).

Die direkte Membrantoxizität und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch IDA sind dagegen dosisabhängige Effekte und vermutlich für die Nebenwirkungen der Chemotherapie, vor allem der Kardiotoxizität verantwortlich (Gieseler *et al.* 1995a).

Die Anthrazykline werden jedoch oft mit einem Therapieversagen auf Grund der Entwicklung einer MDR assoziiert (Gianni 1997, Nielsen *et al.* 1996). Bei den Resistenzmechanismen spielt vor allem die Behinderung der Aufnahme in die Zelle durch Membran-Transport-Mechanismen, wie z.B. P-gp (Gianni 1997), sowie die erniedrigte Expression oder Veränderung der Topoisomerase II, dem Hauptangriffsort der Anthrazykline, eine Rolle (Sikic 1993).

1.3. Modulation der Multidrug-Resistenz

Tsuruo *et al.* (1981) berichteten zum ersten Mal von einer pharmakologischen Modulation der MDR. Der Kalziumkanalblocker Verapamil (VRP) und der Calmodulin-Antagonist Trifluoperazin potenzierten in einer Multidrug resistenten murinen Leukämiezelllinie die antiproliferative Aktivität von Vincristin und erhöhten dessen intrazelluläre Akkumulation.

Seit diesen ersten Erkenntnissen sind eine ganze Reihe an Substanzen, sogenannte **Chemosensitizer**, gefunden worden, die die Wirkung von Zytostatika bei resistenten Tumoren verstärken (Tab. 2). Sie bewirken meist eine erhöhte Pharmaka-Akkumulation in den resistenten und nur wenig Veränderung in den sensiblen Zellen (Ford & Hait 1993).

Substanzklassen	Beispiele
Kalziumkanalblocker	Verapamil, Nifedipin, Diltiazem, Nifedipin
Calmodulinantagonisten	Trifluoperazin, Chlorpromazin, Thioridazin
Immunsuppressiva	Cyclosporin A, PSC 833
Steroide	Progesteron, Tamoxifen
Antibiotika	Tetrazyklin, Rifampicin
Chinolone	Chloroquin, Chinidin, Chinin
andere Pharmaka	Reserpin, Amiodaron, Vindolin

Tab. 2: Modulatoren der Multidrug-Resistenz (Fardel *et al.* 1996, Ford & Hait 1993).

Die meisten dieser Chemosensitizer werden im klinischen Alltag nicht in der Tumorthherapie verwendet. Sie zeigen nur im weitesten Sinne strukturelle Ähnlichkeiten, die meisten sind jedoch extrem lipophil und viele sind heterozyklische, positiv geladene Substanzen (Ecker & Chiba 1995, Ford & Hait 1993).

Der wichtigste Wirkmechanismus der Chemosensitizer scheint die Hemmung des P-gp abhängigen Effluxes der Pharmaka zu sein (Abb. 4). Die meisten Substanzen konkurrieren mit den Zytostatika um die Bindungsstellen an P-gp (Fardel *et al.* 1996, Safa *et al.* 1987, Yusa & Tsuruo 1989). Einige dieser Substanzen, wie z.B. VRP, sind außerdem Substrate für den P-gp Transport (Yusa & Tsuruo 1989).

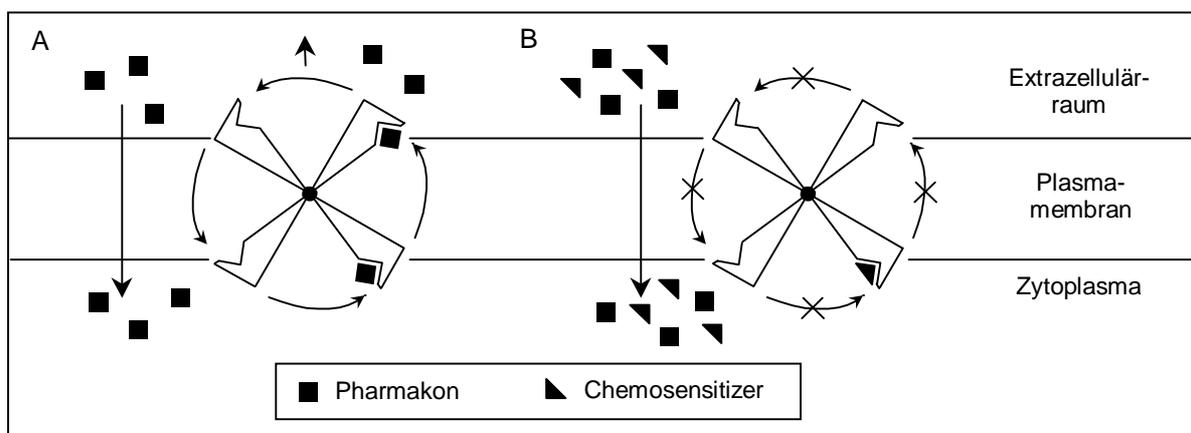


Abb. 4: Einfluß von Chemosensitizern auf P-Glykoprotein (modifiziert nach van der Heyden *et al.* 1995). (A) Nachdem die Pharmaka passiv in die Zelle eingetreten sind, werden sie aktiv von der P-gp-Efflux-Pumpe in den Extrazellulärraum transportiert. (B) Chemosensitizer blockieren die Pumpe durch Inhibition der Bindung der Pharmaka an die Pumpe.

Weitere Wirkmechanismen der Chemosensitizer, wie Interaktionen mit Kalzium Kanälen (Ford & Hait 1993), Änderung der Membranfluidität (Bhushan *et al.* 1989, Ramu *et al.* 1983), Hemmung der Calmodulin abhängigen Prozesse (Hait & Lazo 1986, Prozialeck 1984), Phosphorylierung des P-gps (Chambers *et al.* 1990, Fine *et al.* 1987) oder Hemmung lysosomaler Enzyme (Beck 1987, Sehested *et al.* 1987) werden diskutiert.

1.3.1. R-Verapamil

Kalziumantagonisten, vor allem VRP, haben sich als potente Modulatoren der MDR erwiesen. Die klinische Anwendung ist allerdings durch die kardiovaskulären Nebenwirkungen, vor allem bei bekannter Hypotonie, atrioventrikulärem (AV) Block und Herzinsuffizienz, limitiert (Dalton *et al.* 1989, Ozols *et al.* 1987). Daher können die erforderlichen Plasmakonzentrationen, welche *in vitro* zur Umkehr der MDR nötig

waren, bei Patienten kaum erreicht werden (Bates *et al.* 1994). Zudem wird die kardiotoxische Wirkung vieler Chemotherapeutika, vor allem der Anthrazykline, verstärkt (Booser *et al.* 1994).

Daher wurden sogenannte Antagonisten der zweiten Generation, wie z.B. **R-Verapamil (R-VRP)** entwickelt (Abb. 5). R-VRP (Molekulargewicht 491.08) ist ein Enantiomer von VRP und zeichnet sich durch gleiche Anti-mdr Aktivität (Pirker *et al.* 1990; Plumb *et al.* 1990), sowie durch eine 5-10 mal geringere kardiovaskuläre Wirksamkeit (Echizen *et al.* 1985) aus. Es können daher Serumspiegel erreicht werden, die bei einigen Tumoren *in vitro* die MDR umkehren können (Bates *et al.* 1994).

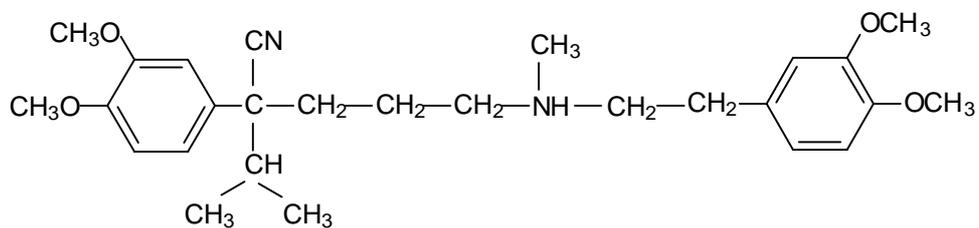


Abb. 5: Strukturformel von R-Verapamil $C_{27}H_{38}N_2O_4 \cdot HCl$.

Pharmakokinetik

Im Plasma erreichbare R-VRP Konzentrationen liegen zwischen 4-10 μM (1.96-4.91 $\mu g/ml$) (Ahmed *et al.* 1993, Bates *et al.*, 1994). Die Plasmaproteinbindung liegt bei 94% (Eichelbaum *et al.* 1984). Gross *et al.* (1988) berichteten, daß R-VRP zu 60% an 4 g/dl Albumin (nicht-absättigbar), zu 92% an 0.55 mg/ml AGP (nicht-absättigbar bis 4 μM (1.96 $\mu g/ml$) R-VRP) und zu 90% an Humanserum (nicht-absättigbar bis 10 μM (4.91 $\mu g/ml$) R-VRP) gebunden wird. Die Halbwertszeit liegt bei 4.08 Stunden (Eichelbaum *et al.* 1984). R-VRP unterliegt einem extensiven hepatischen Metabolismus und wird vorwiegend renal eliminiert (Schwartz *et al.* 1994).

Wirkmechanismen

Die Wirkmechanismen von VRP als Chemosensitizer lassen sich nicht ausreichend durch die bekannte Kalzium antagonistische Wirkung erklären, da vor allem R- und Nor-VRP, Substanzen mit niedrigerer Kalzium antagonistischer Wirkung, sich *in vitro* durch eine hohe Umkehrpotenz auszeichnen (Pereira *et al.* 1995, Toffoli *et al.* 1995). Zudem zeigen VRP Analoga mit steigender Lipophilie eine steigende Potenz in der MDR Umkehr (Pereira *et al.* 1995).

VRP und seine Isomere können die P-gp Efflux Pumpe direkt inhibieren. Durch Bindung an P-gp kann der Efflux von vielen zytostatischen Substanzen verhindert werden (Yusa & Tsuruo 1989). Ebenso können z.B. VRP und Daunorubicin als nicht-kompetitive Substrate um P-gp konkurrieren (Spoelstra *et al.* 1994) oder kann VRP z.B. fluoreszenzmarkiertes Vinblastin von seiner Bindungsstelle an P-gp verdrängen (Safa *et al.* 1987). Der Effekt als MDR Antagonist kommt zustande, weil P-gp VRP anstatt der Zytostatika ausschleust.

Desweiteren beeinflusst VRP die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran, z.B. durch Veränderung der Membranfluidität und der Permeabilität (Drori *et al.* 1995) oder der strukturellen Organisation der Plasmamembran (Garcia-Segura *et al.* 1992). Außerdem kann VRP das veränderte Verteilungsmuster von Chemotherapeutika in resistenten Zellen wieder dem in sensiblen Zellen angleichen (Hindenburg *et al.* 1987). Von einer direkten Wachstumsinhibition ab Konzentrationen von 20 μM (9.82 $\mu\text{g/ml}$) wird ebenfalls berichtet (Häußermann *et al.* 1991).

Die *in vitro* Wirksamkeit von VRP und seinem Isomer R-VRP als Chemosensitizer wurde durch zahlreiche Versuche belegt (Kiwit *et al.* 1994, Tsuruo *et al.* 1983), so daß klinische Phase I und II Studien initiiert wurden (Bates *et al.* 1996, Dicato *et al.* 1997, Ferry *et al.* 1996, Hegewisch-Becker 1996, Robert 1999). Diese *in vivo* Studien ließen allerdings meistens auf den erhofften Erfolg warten (Anhang Tab. 1).

1.3.2. Weitere Ansätze

Da die klinische Anwendung der Chemosensitizer bisher nur selten den gewünschten Erfolg gebracht hatte, wird nach neuen Möglichkeiten zur Modulation der MDR geforscht. So versucht man mit Toxinen gekoppelte Antikörper gegen P-gp zu richten, um damit den Tumor wieder sensibel gegen Zytostatika zu machen (Thiebaut *et al.* 1987), bzw. bereits die Bildung des P-gps mit „Antisense“-Nukleinsäuren zu hemmen (Volm & Efferth 1994). Desweiteren versucht man durch „Carrier“-Systeme, wie Liposomen oder konjugierte monoklonale Antikörper gegen den Tumor (Booser & Hortobagyi 1994), die Chemotherapeutika direkt an dem Wirkungsort zu bringen und damit die Effektivität zu erhöhen. Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz von amphiphilen Pharmaka, die eine Veränderung der Membranpermeabilität verursachen (Mason *et al.* 1991) oder die Membranfluidität beeinflussen (Bhushan *et al.* 1989, Pacilio *et al.* 1998).

1.4. Zielsetzung

Die zytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika ist abhängig von der Aufnahme in die Tumorzelle und der Interaktion mit dem Replikationsprozeß. Die Proteinbindung der Pharmaka im extrazellulären Kompartiment hat großen Einfluß auf diese Prozesse, da sie die freie Pharmakon-Konzentration bestimmt, die zur Aufnahme in die Zelle zur Verfügung steht.

In vitro Studien werden jedoch gewöhnlich in Medien mit niedrigen Serumproteinkonzentrationen (15% fetales Kälberserum (FCS) oder weniger) durchgeführt, was im Kontrast zu der *in vivo* Situation steht, wo die Pharmaka hohen Serumproteinkonzentrationen ausgesetzt sind. Der Wert von funktionellen Tests der zytostatischen Effektivität und Chemosensitizerwirkung könnte daher eingeschränkt und die Übertragbarkeit der Versuche auf *in vivo* nicht gewährleistet sein.

Diese Studie soll daher den Effekt der Proteinbindung auf die Aufnahme und Retention des Anthrazyklins IDA in den humanen promyelozytischen Leukämiezelllinien, HL-60 und HL-60-Vinc, untersuchen. Die Zelllinien geben außerdem Aufschluß über den Effekt des *mdr1* Gens, bzw. P-gps, auf die IDA Aufnahme, da es in der HL-60-Vinc hoch exprimiert und in der HL-60 fast nicht vorhanden ist.

Die Ziele dieser Studie waren:

- die Proteinbindungscharakteristiken von IDA in Humanserum (HS) und gebräuchlichen Zellkulturmedien zu erstellen
- den Effekt der Proteinbindung auf die Aufnahme und Retention von IDA in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc zu untersuchen
- den Einfluß der Effluxpumpe P-gp auf die Aufnahme und Retention von IDA in der Zelllinie HL-60-Vinc zu bestimmen
- die Auswirkung der Proteinbindung auf die Akkumulation von IDA in Lymphozyten gesunder Probanden zu ermitteln
- den Effekt des Chemosensitizers R-VRP auf die Modulation der MDR zu evaluieren
- den Einfluß des Akut-Phase-Proteins α_1 -saures-Glykoprotein (AGP) auf die Chemosensitizerwirkung von R-VRP zu untersuchen
- die Bedeutung der Proteinbindung für die *in vivo*-Aktivität von Zytostatika und Chemosensitizern zu analysieren

2. Material

2.1. Zelllinien

Es wurde die Zelllinie **HL-60** (human leukemic-60) und **HL-60-Vinc** (human leukemic-60-vincristine resistant) von Melvin S. Center, Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA verwendet. Die HL-60 Zellen wurden aus dem Blut einer Patientin mit promyelozytischer Leukämie isoliert (Collins *et al.* 1978). Sie sind in ihrer Entwicklung aus einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks auf der Stufe der Promyelozyten blockiert (Collins *et al.* 1979). Die HL-60-Vinc wurde auf Grund ihrer Resistenz gegen Vincristin isoliert (Marquardt *et al.* 1990; McGrath & Center 1988, McGrath *et al.* 1989).

Die Zelllinien unterschieden sich durch ihren P-gp-Anteil. Er lag in der Zelllinie HL-60 bei 0.34% der Zellen und in der HL-60-Vinc bei 55.18%, ermittelt mit Hilfe des intrazellulär bindenden MAS-506-Antikörpers (Keese 1995). Eine partielle Umkehr des Resistenzverhaltens der HL-60-Vinc wurde erst nach etwa 6 Monaten beobachtet, während denen die Zellen ohne Zugabe des Pharmakons kultiviert wurden (McGrath & Center 1988).

2.2. Probanden

Von sechs gesunden Probanden wurde aus dem Blut Serum gewonnen und/oder Lymphozyten isoliert (Tab. 3). Im Normbereich liegende Gesamtprotein-konzentrationen (55-80 g/l; Fauci *et al.* 1998), Humanalbumin (HA) Konzentrationen (35-55 g/l; Fauci *et al.* 1998), und AGP Konzentrationen (0.4-0.8 mg/ml; Kremer *et al.* 1988) im Serum, sowie der P-gp-Expression der Lymphozyten (<30%; Nüssler *et al.* 1994) wurden angenommen.

Proband	Geschlecht	Alter	Serum	Lymphozyten
1	weiblich	23	X	X
2	männlich	26	X	X
3	weiblich	24	X	X
4	männlich	24	X	-
5	männlich	27	X	X
6	weiblich	25	X	X

Tab. 3: Probanden für die Gewinnung von Humanserum und Lymphozyten.

Das Serum der Probanden 1-4 wurde für den Proteinbindungsversuch 4.1.3. verwendet. Desweiteren wurde das Serum von Proband 3 als Inkubationsmedium für die Versuche 4.2.1. - 4.2.6. mit den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc benutzt.

Die Lymphozyten des Probanden 5 wurden für den Versuch 4.3.1., die der Probanden 1, 2, 3 und 6 für den Versuch 4.3.2. verwendet. Als Inkubationsmedium wurde das HS des jeweiligen Probanden benutzt.

2.3. Chemikalien

2.3.1. Pharmaka

α_1 -Glykoprotein sauer, aus Humanplasma, Mr~45000	Fluka, Neu-Ulm, BRD
Albumin, human, prepared from fraction V albumin	Sigma, St. Louis, USA
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, BRD
Dex-Verapamil-HCl, MW 491.08	Knoll AG, Ludwigshafen, BRD
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), without calcium chloride and magnesium chloride	GibcoBRL, Paisley, Schottland
Ethanol absolut	Riedel de Haen, Seelze, BRD
Fetal Bovine Serum	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Ficoll-Paque, Research Grade	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Idarubicin, lot 321, MW 533.96	Pharmacia, Milan, Italien
L-Glutamine, 200 mM	Sigma, St. Louis, USA
Penicillin 5000 U/ml; Streptomycin 5000 μ g/ml	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
RPMI 1640, medium with L-Glutamine	GibcoBRL, Paisley, Schottland
Salzsäure c(HCl)= 2 mol/l (2N)	Merck, Darmstadt, BRD
Trypan blue solution (0,4%)	Sigma, Irvine, England

2.3.2. Stammlösungen

Idarubicin	Idarubicin wurde freundlicherweise von Pharmacia & Upjohn, Erlangen, BRD zur Verfügung gestellt. Aus der pulverigen Form des IDA wurde eine Stammlösung durch Lösung in PBS hergestellt. Diese Stammlösung wurde portioniert, bei -20°C im Dunkeln gelagert und bei Bedarf aufgetaut (Mindermann <i>et al.</i> 1994, Müller <i>et al.</i> 1992).
R-Verapamil	R-VRP wurde dankenswerterweise von der Knoll AG, Ludwigshafen, BRD bereitgestellt. R-VRP-HCl wurde in PBS gelöst und im entsprechenden Inkubationsmedium auf die verwendete Konzentration verdünnt (Produktinformation Knoll AG).
AGP	AGP wurde in dem entsprechenden Inkubationsmedium gelöst und verdünnt.

2. MATERIAL

2.3.3. Inkubationsmedien

100% PBS	
100% RPMI	
15% FCS/PBS	Das Medium PBS mit einem 15% -igen FCS Anteil.
15% FCS/RPMI	Das Medium RPMI mit einem 15% -igen FCS Anteil.
15% HS/PBS	Das Medium PBS mit einem 15% -igen HS Anteil.
15% HS/RPMI	Das Medium RPMI mit einem 15% -igen HS Anteil.
100% FCS	
100% HS	
4 g/dl HA/PBS	Das Medium PBS mit einem Anteil von 4 g Humanalbumin pro dl.

2.4. Verbrauchsmaterialien

Diachema Dialysemembranen, Membrantyp 10.14, Dicke 25.0 +/- 1.0 µm, MW cutoff 5000, Ø 63 mm	Dianorm, München, BRD
Eppendorf Combitip (5 ml, 12.5 ml)	Eppendorf, Hamburg, BRD
Eppendorf Reaktionsgefäße 3810 (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, BRD
Mikrotiterplatten, 96 Vertiefungen, mit Deckel, steril	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Minis 2000 (6 ml)	Zinsser Analytic, Ffm, BRD
Monovette Z (9 ml), zur Serumgewinnung	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Nunc Cryo Tubes (4.5 ml)	Intermed Nunc, Roskilde, Dänemark
Pipettenspitzen (gelb und blau)	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Pipettenspitzen (gelb und blau), steril	Eppendorf, Hamburg, BRD
Polystyrol Einmalpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Röhrchen (5 ml, 13,5 ml, 50 ml), steril	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Röhrchen mit konischem Boden (4.5 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Röhren Tubes (4 ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
S-Monovette KE (2.7 ml), mit 1.6 mg EDTA/ml Blut	Sarstedt, Nürnbrecht, BRD
Zellkulturflaschen Nuncleon delta (50 ml, 260 ml)	Intermed Nunc, Roskilde, Dänemark
Zytostatika-Schutzhandschuhe	Berner, Elmshorn, BRD

2.5. Geräte

Arbeitsbank, MDH Intermed Biohazard	Nunc, Wiesbaden, BRD
Bransonic, Ultrasonic cleaner, Model B 2200 E1	Branson, Shelton, CT, USA
Dispenser Multipette 4780	Eppendorf, Hamburg, BRD
Eppendorf Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg, BRD
Eppendorf Probenrüttler 5432	Eppendorf, Hamburg, BRD
Eppendorf Pipette (2-20µl, 10-100µl; 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, BRD

2. MATERIAL

Eppendorf Unipette (100 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg, BRD
Gleichgewichts-Dialyse-System Dianorm	Diachema AG, Zürich, Schweiz
Haemacytometer Deckgläser	Knittel Gläser, Braunschweig, BRD
Küvetten, Quarzglas, Schichtdicke 1 cm, min. 0.4 ml	Hellma, Müllheim/Baden BRD
Mikroskop, Axiovert 10	Zeiss, Oberkochen, BRD
pH meter, Modell 420 A	Orion, Boston, USA
QUEUE Zellkulturinkubator Modell 2711	Nunc, Wiesbaden, BRD
Spektrophotofluorometer Aminco-Bowman (Ratio II), ausgestattet mit Xenon Lampe und Power Supply	American Instrument Company, Silver Spring, USA
Waage, Sartorius 2002 MP1	Sartorius, Göttingen, BRD
Wasserbad Dialyse Ultra Thermostat K5	Colora Meßtechnik, Lorch, BRD
Wasserbad	Köttermann, Hänsingen, BRD
Zählkammer nach Neubauer	W. Schreck, Hofheim/Ts., BRD
Zentrifuge, Sepatech Cryofuge 6000	Heraeus, Hanau, BRD

3. Methoden

3.1. Grundtechniken

3.1.1. Zellkultur

Die Zelllinien wurden in einem Kulturmedium aus 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Glutamin, 15% FCS und RPMI 1640 gehalten und bei 37°C in befeuchteter Luft mit 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen erhielten jeden 2.-3. Tag neues Nährmedium. Alle 2 Wochen wurden sie abzentrifugiert und verdünnt in frischem Medium resuspendiert. Die Viabilität der verwendeten Zellen betrug immer über 95%, ermittelt mit der Trypanblaufärbung.

3.1.2. Serumgewinnung

Das Blut der Probanden wurde eine Stunde nach der Abnahme in einer Monovette Z bei 3000 Upm für 10 Minuten zentrifugiert (Anleitung des Zentrallabors; Uniklinik Frankfurt, BRD) und der Überstand, das Serum, abpipettiert. Zur Komplementinaktivierung wurde das Serum eine Stunde im Wasserbad bei 56°C erhitzt (Lindl und Bauer 1994). Die Seren wurden bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert (Lindl und Bauer 1994).

3.1.3. Lymphozytenisolierung

Die mononukleären Zellen wurden aus heparinisiertem, venösem Blut von gesunden Probanden gewonnen. Zur Isolierung der Lymphozyten wurde 15 ml Ficoll (Lymphozytentrennmedium) in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und insgesamt 20 ml Blut und PBS, im Verhältnis 1:1, auf das Trennmedium geschichtet. Nach Zentrifugation bei 1670 Upm für 20 Minuten wurden die Lymphozyten abpipettiert und dreimal mit PBS gewaschen (Anleitung des hämatologischen Labors, Uniklinik Frankfurt, BRD). Nach Resuspension im Inkubationsmedium wurde die Viabilität bestimmt (immer über 95%), die Zellzahl eingestellt, und die Zellen sofort für weitere Versuche verwendet.

3.1.4. Trypanblaufärbung

Zur Vitalitätsprüfung der Zellen wurde der Trypanblautest angewandt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, der sich sehr leicht an Proteine binden kann. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf, während vitale Zellen ungefärbt bleiben (Lindl und Bauer 1994).

10 µl einer Zellsuspension wurden mit 190 µl der Trypanblaulösung für 2 min inkubiert, gut durchmischt und anschließend in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Der prozentuale Anteil der vitalen Zellen wurde folgendermaßen bestimmt:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \text{ungefärbte Zellen} / (\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}) * 100$$

3.2. Bestimmung der Idarubicin Konzentration

3.2.1. Fluoreszenz/Emissionsspektrum

Fluoreszenz ist die emittierte Energie eines Moleküls, die durch absorbierte Lichtenergie erregt wird. Beide Wellenlängen (Exzitation und Emission) sind relativ spezifisch für eine Substanz und können für qualitative Analysen verwendet werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist direkt proportional zu der Konzentration der fluoreszierenden Substanz, wenn andere Faktoren konstant gehalten werden. Die Messung der relativen Intensität kann für quantitative Analysen verwendet werden (Aminco-Bowman: Bedienungsanleitung).

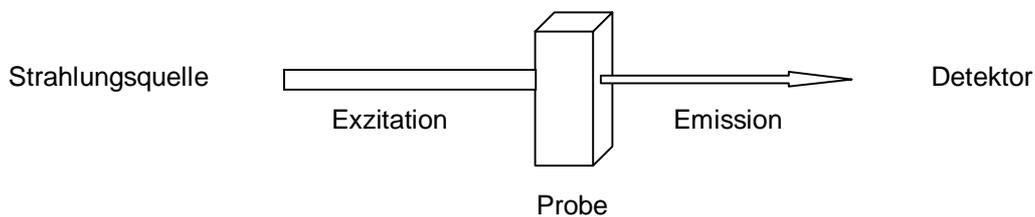


Abb. 6: Schematischer Aufbau der Meßanordnung.

IDA wird mit einer Exzitationswellenlänge von 480 nm spezifisch erregt (Gieseler *et al.* 1994). Zur Ermittlung der zugehörigen Emissionswellenlänge wurde für jede Meßlösung (Medium mit der fluoreszierenden Substanz), bzw. Referenzlösung (Medium ohne die fluoreszierende Substanz) ein Emissionswellenlängenspektrum ($\lambda = 560\text{-}590$ nm) von IDA ($c = 1000$ ng/ml) aufgestellt und die dazugehörige Fluoreszenz (Extinktion) gemessen. Von den erhaltenen Extinktionswerten für die Meßlösung wurde jeweils der Referenzwert abgezogen. Dieser Wert wurde gegen die Emissionswellenlänge aufgetragen und λ_{max} (Extinktionsmaximum bei einer bestimmten Emissionswellenlänge) ermittelt (Anhang Tab. 2).

Im Spektrophotofluorometer Aminco-Bowman wurde für IDA bei einer Exzitationswellenlänge von 480 nm in den weiter verwendeten Meßlösungen eine optimale Emissionswellenlänge von 570 nm gefunden.

Die Sensitivität der photometrischen Bestimmung der IDA Konzentration ist jedoch vor allem in den niedrigen Konzentrationsbereichen, z.B. durch hohe Extinktionswerte der Referenzproben, eingeschränkt. Eine exakte Analyse dieser IDA Konzentration könnte mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt werden, die nicht zur Verfügung stand.

3.2.2. Eichkurve

Für jeden Versuch wurde eine Eichkurve mit bekannten IDA Konzentrationen (0-5000 ng/ml) in dem jeweils verwendeten Medium erstellt. Die Extinktionswerte der Vergleichslösungen (Medium mit bekannten IDA Konzentrationen) wurden nach Abzug der Referenzwerte gegen die bekannten IDA Konzentrationen aufgetragen, und verhielten sich proportional (linear) zueinander.

Nach Ermittlung der Steigung der Eichgerade können unbekannte IDA Konzentrationen durch Messung der Extinktion bestimmt werden:

$$y = m \cdot x + b \quad (\text{mit } b=0, b=y\text{-Achsenabschnitt, } m=\text{Steigung, } (x/y)=\text{Wertepaar})$$

$$c = E / m \quad (c = \text{IDA Konzentration, } E = \text{Extinktion, } m = \text{Steigung der Eichkurve})$$

3.2.3. Bestimmung der Meßgenauigkeit

Die Beurteilung der Meßgenauigkeit erfolgte durch fünfmalige Messung einer Probe. Der relative Variationskoeffizient lag in den verschiedenen Inkubationsmedien zwischen 0.051% und 0.385%. Damit kann von einer hinreichenden Meßgenauigkeit ausgegangen werden (Anhang Tab. 3).

3.2.4. Inkubationsmaterial

Für die Versuche wurde ein geeignetes Inkubationsmaterial benötigt, da IDA zum Teil ein starkes Anheftverhalten an Plastikmaterialien zeigt. IDA wurde in verschiedenen Gefäßen in H₂O mit und ohne 15% FCS für eine Stunde inkubiert und anschließend wurde die Extinktion gemessen (Anhang Tab. 4). Als geeignetes Inkubationsmaterial erwiesen sich Eppendorfcups.

3.3. Gleichgewichtsdialyse

Verschiedene Techniken wie Gleichgewichtsdialyse, Ultrazentrifugation, Gelfiltration, Ultrafiltration und Elektrophorese können die Serumproteinbindung von Pharmaka bestimmen. Die Gleichgewichtsdialyse ist die am häufigsten angewendete Methode und scheint den *in vivo* Bindungsverhältnissen am nächsten zu kommen (Kurz *et al.* 1977). Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse wurde die Proteinbindung von IDA in verschiedenen Medien untersucht. Das Prinzip beruht auf der Trennung einer hochmolekularen Verbindung (Proteinkompartiment) durch eine semipermeable Membran von dem Liganden in einer niedermolekularen Verbindung (Pufferkompartiment). 15% FCS/PBS, 4 g/dl HA/PBS und 100% HS wurden als hochmolekulares, bzw. Proteinkompartiment und IDA ($c = 100\text{-}5000$ ng/ml) in PBS als Ligand im Pufferkompartiment verwendet. Der Ligand kann im Gegensatz zu den Proteinen frei diffundieren und verteilt sich entsprechend dem Konzentrationsgradienten. Nach Erreichen des Diffusionsgleichgewichts ist die Aktivität des freien Liganden auf beiden Seiten gleich groß und kann annähernd der Konzentration gleichgesetzt werden. Diese Diffusion ist abhängig von Membranfläche, Konzentrationsgradienten und Diffusionskoeffizienten (Temperatur und Art des Liganden) (1. Fick'sches Gesetz) (Dianorm: Anleitung für Bindungsstudien). Desweiteren wurde der Einfluß des Chemosensitizers R-VRP (10 µl/ml) und des Akut-Phase-Proteins AGP (2 mg/ml) auf die Proteinbindung von IDA durch Zugabe zum Proteinkompartiment untersucht.

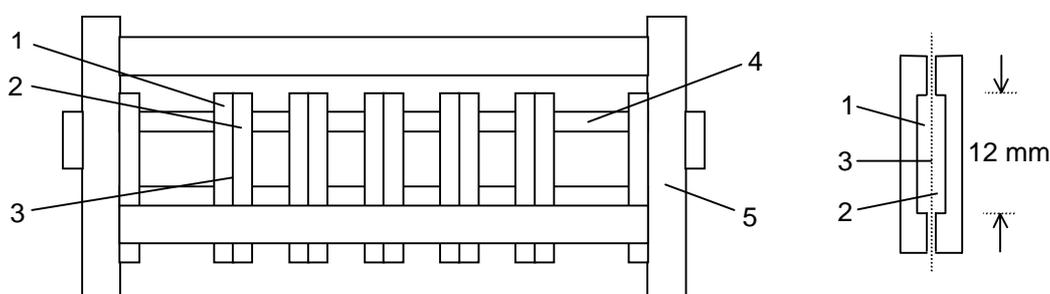


Abb. 7: Schematische Abbildung des Zellenblocks der Gleichgewichtsdialyse.

Der Zellenblock besteht aus fünf Dialysierkammern mit Kompartiment A (1) und Kompartiment B (2), Dialysemembran (3), Federpressadaptoren (4) und Haltevorrichtung (5). Das Volumen jeder Zellohälfte beträgt 1 ml.

Versuchsdurchführung

In dem verwendeten Dialyse System können jeweils 20 Dialyse Experimente parallel durchgeführt werden. Teflon-Dialysezellen wurden durch eine semipermeable Zellulosemembran in zwei Zellohälften getrennt. Durch Vorwaschen mit destilliertem Wasser (15 min), einlegen in 25-30% -igem Ethanol (10 min), auswaschen mit

destilliertem Wasser im Durchfluß (20 min) und schließlich sättigen der Membran in mindestens einmal erneuertem PBS (15 min), wurden die Membranen vor der Benutzung von möglichen Verunreinigungen gesäubert (Dianorm: Anleitung für Bindungsstudien). Die Lösungen der hochmolekularen Verbindung, sowie R-VRP und AGP, wurden in die eine Zelhälfte (Kompartiment A), die des Liganden und PBS in die andere (Kompartiment B) pipettiert. Die Zellen wurden insgesamt mit einem Volumen von 700 µl pro Halbzelle gefüllt. Im Wasserbad bei 37°C rotierten die Zellen bei konstanter Geschwindigkeit mit 6 Upm für vier Stunden. Dadurch konnte ein zufriedenstellender Mischeffekt der Dialysierlösungen und ein Diffusionsgleichgewicht erreicht werden (Anhang Tab. 5).

Bei jedem Versuch wurden desweiteren zwei Ansätze für die Referenzwertbestimmung pro verwendetem Medium (gleiche Bedingungen, aber ohne IDA) und ein Kontrollansatz für die Überprüfung des Diffusionsgleichgewichts (gleiches Medium in Kompartiment A und B, mit IDA) dialysiert.

Analyse der Proteinbindung

Zur Ermittlung der Proteinbindung wurde der Mittelwert der Referenzwerte von den gemessenen Extinktionen abgezogen und mit Hilfe der Eichkurve die IDA Konzentration in beiden Kompartiments bestimmt. Der prozentuale Anteil des proteingebundenen IDA wurde aus den Konzentrationen von Kompartiment A und B berechnet und als mittlere Bindung mit Standardabweichung angegeben.

$$\text{Bindung (\%)} = \frac{c(\text{Kompartiment A}) - c(\text{Kompartiment B})}{c(\text{Kompartiment A})} * 100$$

Bei der Gleichgewichtsdialyse müssen allerdings zahlreiche Faktoren berücksichtigt werden, die eine Wirkung auf die Proteinbindung haben können. Volumenverschiebungen, Pharmaka Konzentrationen, Puffer Zusammensetzungen, Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen, Quantität und Art der Proteine, Puffer pH, Antikoagulantien, andere Pharmaka, und Metaboliten der Pharmaka können das Ausmaß der Proteinbindung beeinflussen (Lee *et al.* 1995).

Für die Versuche mit der Gleichgewichtsdialyse war als Fehlerquelle vor allem die IDA Adsorption an der Dialysemembran und der Teflonzelle in Betracht zu ziehen. Die Adsorption war abhängig von der IDA Konzentration und dem Proteinkompartiment. Dieser Fehler konnte allerdings durch Bestimmung der Idarubicin Konzentration in beiden Kompartiments korrigiert werden (Eksborg *et al.* 1982). Die Ausgangskonzentrationen des Liganden wurde entsprechend dem Adsorptionsverlust korrigiert. Der prozentuale Anteil der IDA Adsorption wurde im Anhang Tab. 6-8 angegeben.

$$\text{korrigierte Ausgangskonzentration} = c(\text{Kompartiment A}) + c(\text{Kompartiment B})$$

$$\text{IDA Adsorption (\%)} = (1 - (\text{korrigierte Ausgangskonzentration} / \text{ursprüngliche Ausgangskonzentration})) * 100$$

Als weiterer Nachteil der Methode ist der unterschiedliche Proteinanteil in den beiden Kompartments zu erwähnen. Durch das Gefälle des osmotischen Drucks fand hierdurch eine Volumenverschiebung statt. Hierfür besteht keine Korrekturmöglichkeit, jedoch kann der Fehler als gering betrachtet werden, da leichte Variationen im Proteingehalt, wie die durch die Volumenverschiebung beobachteten, keine großen Auswirkungen auf die Proteinbindung haben (Pacifi & Viani 1992).

3.4. Akkumulations- und Retentionsstudien

Zum Nachweis einer Zytostatika-Resistenz bei Zelllinien können verschiedene Testverfahren, wie der Zellzahl-Test, der MTT-Test oder der Nukleotid Inkorporations-Test eingesetzt werden. Multidrug-resistente Zellen zeichnen sich gegenüber sensiblen jedoch vor allem durch eine geringere Aufnahme von Zytostatika aus, so daß Akkumulationsexperimente eine weitere sinnvolle Methode zur Evaluierung der MDR darstellen.

Versuchsdurchführung

In den Akkumulationsstudien wurde die Aufnahme von IDA in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, dem Inkubationsmedium und der IDA Konzentration untersucht. Desweiteren wurde der Einfluß des Chemosensitizers R-VRP und des Akut-Phase-Proteins AGP auf die IDA Akkumulation bestimmt.

Die Zellen wurden aus dem Kulturmedium abzentrifugiert und in dem jeweils verwendeten Inkubationsmedium (100% PBS, 15% FCS/RPMI und 100% HS) in einer Konzentration von $4 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert. Jeweils 250 µl dieser Suspension wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von IDA (0-5 µg/ml; 0-9,35 µM) in einem Gesamtvolumen von 400 µl bei 37°C unterschiedlich lange (0-3h) inkubiert. Die Versuchsbedingungen wurden durch die Zugabe von R-VRP (0-100 µg/ml; 0-203.6 µM) oder AGP (0-2 mg/ml) variiert. In Versuch 4.2.2. wurden als Inkubationsmedien zusätzlich 100% RPMI, 15% FCS/PBS, 15% HS/RPMI, 15% HS/PBS und 100% FCS untersucht.

In den Retentionsstudien wurde der Efflux von IDA aus den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc, sowie der Einfluß der Inkubationsmedien und des Chemosensitizers R-VRP gezeigt.

In der Akkumulationsphase wurden die Zellen (10^6) mit IDA (1 µg/ml; 1.87 µM), mit oder ohne R-VRP (10 µg/ml; 20.36 µM), bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 400 µl vorinkubiert. Nach einer Stunde wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und für die Retentionsphase in frischen Medium oder frischem Medium mit R-VRP (10 µg/ml; 20.36 µM) resuspendiert. Nach 0, 1, 2, 3, 4 und 5 Stunden wurden jeweils

zwei Ansätze zur Bestimmung der intrazellulären IDA Konzentration entnommen. Die Studien wurden in den Inkubationsmedien 15% FCS/RPMI, 100% PBS und 100% HS durchgeführt.

In den Lymphozyten der Probanden wurde ebenfalls die IDA Aufnahme in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Inkubationsmedium, sowie der Einfluß von R-VRP und AGP ermittelt. Die Inkubationen unterschieden sich nicht von den Versuchen mit den Zelllinien.

Analyse des intrazellulären Idarubicin Gehaltes

Die IDA Aufnahme, bzw. der Efflux, wurde durch die Zugabe von eiskaltem PBS abgebrochen. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet bei -20°C gelagert (Tidefelt *et al.* 1991). Durch das Tiefgefrieren der Pellets ergaben sich keine Unterschiede in den Meßergebnissen der IDA Konzentration (Tidefelt *et al.* 1991).

Zur Bestimmung der IDA Konzentration wurden die Zellen aufgetaut. Die Lyse der Zellen wurde durch eine Ultraschallbehandlung bei 50 W für 20 s (Tidefelt *et al.* 1991), sowie der anschließenden Zugabe von 200 μl 0,4 N HCl/Isopropanol erzielt (Gieseler *et al.* 1994). Nach einer Stunde wurden die Ansätze dann mit 300 μl H_2O auf ein Volumen von 500 μl aufgefüllt, gut durchmischt und die IDA Extinktion im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Die ermittelte IDA Konzentration wurde in $\text{ng}/10^6$ Zellen angegeben.

Als Referenzwerte, bzw. Negativkontrolle, dienten jeweils drei Leeransätze, deren Behandlung bis auf die Inkubation mit IDA identisch waren.

3.5. Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der Statistikprogramme BIAS (Version 6.00, 1993, epsilon-Verlag, Hochheim Darmstadt; Dr. H. Ackermann, Klinikum der Universität, Abteilung Biomathematik, Theodor-Stern-Kai 7, 60550 Frankfurt am Main, BRD), Systat (Version 5.03, 1991, Systat incorporated, Intelligent Software, Evanston, Illinois, USA) und PlotIT for Windows (Version 3.02, 1993; Scientific Programming Enterprises, Haslett, Michigan, USA) durchgeführt.

Vorversuch

Zur Beurteilung der Meßgenauigkeit wurde in dem Vorversuch 3.2.3. der relative Variationskoeffizient (V_r) bestimmt. V_r ist ein zu Vergleichszwecken verwendetes Variabilitätsmaß für zumindest angenähert normalverteilte Beobachtungen, er kann Werte zwischen 0% und 100% annehmen (Sachs 1992).

Gleichgewichtsdialyse

In den Versuchen mit der Gleichgewichtsdialyse wurde die Proteinbindung als Mittelwert (Median) mit Standardabweichung (SD) angegeben.

Bei jeder Versuchsreihe wurden mit Hilfe der Korrelationsanalyse (Pearson Korrelation) die stochastischen Zusammenhänge zwischen der IDA Konzentration und der Proteinbindung untersucht. Die Maßzahl für die Stärke und Richtung eines linearen Zusammenhanges ist der Korrelationskoeffizient r . Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Ist $r=0$, so besteht kein linearer Zusammenhang zwischen beiden Merkmalen; ist $r=\pm 1$, so findet sich ein funktionaler Zusammenhang, alle Punkte finden sich auf einer Geraden (Sachs 1992). Lag der Korrelationskoeffizient in unserer Versuchsreihe >0.95 , wurde die Proteinbindung als konzentrationsabhängig betrachtet (Ackermann, persönlicher Kontakt, 1996).

Desweiteren wurde anhand der Regressionsanalyse (Pearson Regression) für jede Versuchsreihe eine Regressionsgleichung angepaßt. Durch den Vergleich der Regressionskoeffizienten, bzw. -geraden konnten zwei Bindungsgeraden auf ihren statistischen Unterschied geprüft werden. Das Modul verglich per Ho-Prüfung die Steigungen und die Achsenabschnitte. Die Geraden unterschieden sich bei $p<0.05$ signifikant (Ackermann 1998).

Werte, die außerhalb der 4-fachen Standardabweichung lagen, wurden nicht in den Mittelwert der Proteinbindung einberechnet, jedoch in der Graphik mit eingezeichnet (Linder & Berchtold 1982).

Akkumulations- und Retentionsstudien

Die Ergebnisse der Akkumulations- und Retentionsstudien wurden mit Hilfe von Mittelwerten und der Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Die Varianzanalyse ermöglicht den Vergleich von Mittelwerten zweier unabhängiger Stichproben aus normalverteilten Grundgesamtheiten, denn sie gestattet, den Unterschied mehrerer Stichprobenmittelwerte gleichzeitig auf Signifikanz zu prüfen und damit den Einfluß eines qualitativen Merkmals auf ein quantitatives oder meßbares Merkmal zu untersuchen (Storm 1995). P-Werte <0.05 wurden als signifikant angesehen.

In Versuch 4.2.3. wurde der Zusammenhang zwischen der IDA Konzentration und der IDA Aufnahme in die Zellen mit Hilfe der Korrelationsanalyse untersucht (Pearson Korrelation) und eine Regressionsgerade erstellt.

4. Ergebnisse

4.1. Gleichgewichtsdialyse

4.1.1. Proteinbindung von Idarubicin an 15% FCS/PBS

Mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse wurde die Proteinbindung von IDA an 15% FCS/PBS bestimmt (Abb. 8, Anhang Tab. 6). Sie war unter allen Versuchsbedingungen konzentrationsunabhängig ($r_{(-)R-VRP}=0.133$; $r_{(+)R-VRP}=0.140$; $r_{AGP(-)R-VRP}=-0.600$; $r_{AGP(+)-R-VRP}=0.251$), d.h. bei unterschiedlichen IDA Konzentrationen war ein immer gleicher Prozentsatz proteingebunden.

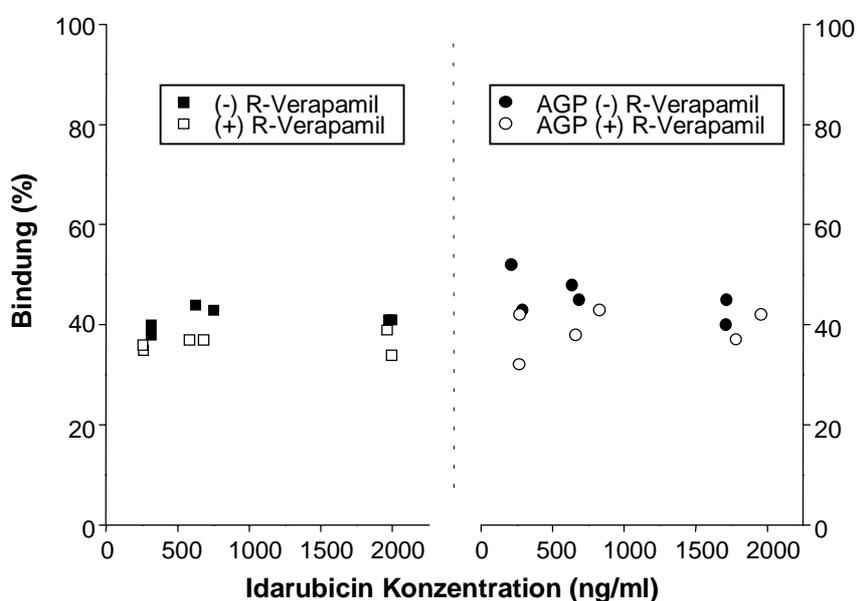


Abb. 8: Proteinbindung von Idarubicin an 15% FCS/PBS in An- (+) und Abwesenheit (-) von 10 $\mu\text{g/ml}$ R-Verapamil und 2 mg/ml α_1 -saures-Glykoprotein (AGP), ermittelt nach vier Stunden Dialysierzeit. FCS fetales Kälberserum.

In 15% FCS/PBS betrug die mittlere Proteinbindung von IDA 41.2%, damit lag ein großer Anteil ungebunden vor. Die Zugabe des Chemosensitizers R-VRP (10 $\mu\text{g/ml}$) erniedrigte die Bindung auf 36.3%, das heißt es fand eine statistisch signifikante Verdrängung von 4.9% statt ($p=0.005$).

Die Zugabe des Akut-Phase-Proteins AGP (2 mg/ml), einem bei Tumorpatienten erhöhten Bindungsprotein für basische Substanzen, erhöhte die Bindung von IDA an 15% FCS/PBS um 4.3% auf 45.5% ($p=0.046$). R-VRP (10 $\mu\text{g/ml}$) verdrängte IDA um 6.5% aus dieser Bindung auf 39.0% ($p=0.022$).

4.1.2. Proteinbindung von Idarubicin an 4 g/dl Humanalbumin/PBS

Die Proteinbindung von IDA an physiologische Konzentrationen von 4 g/dl HA/PBS, einem Plasmaeiweißkörper, wurde bestimmt (Abb. 9, Anhang Tab. 7). Sie war unter allen Versuchsbedingungen konzentrationsunabhängig ($r_{(-)R-VRP}=0.178$; $r_{(+)R-VRP}=-0.152$; $r_{AGP(-)R-VRP}=-0.581$; $r_{AGP(+)R-VRP}=-0.153$) und lag damit im Bereich der unspezifischen Sättigung.

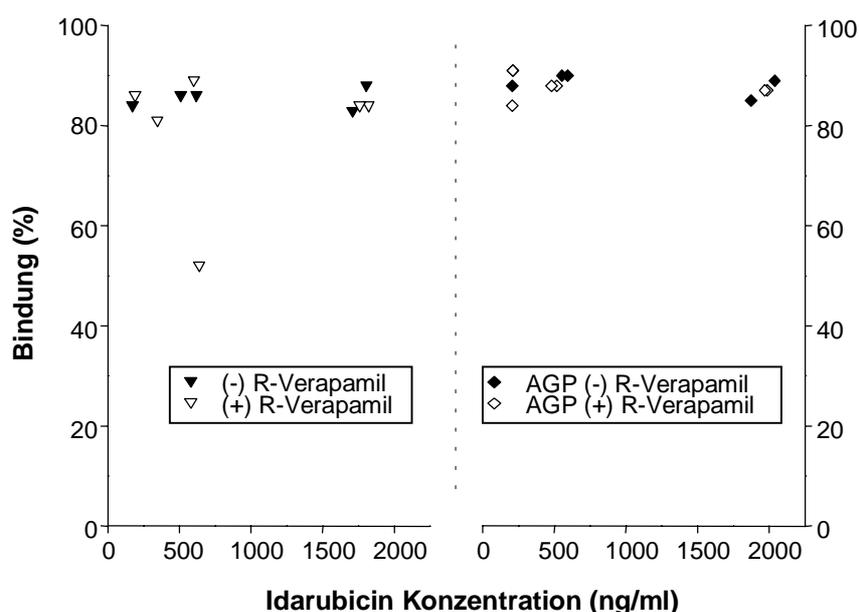


Abb. 9: Proteinbindung von Idarubicin an 4 g/dl Humanalbumin/PBS in An- (+) und Abwesenheit (-) von 10 µg/ml R-Verapamil und 2 mg/ml α_1 -saures-Glykoprotein (AGP), ermittelt nach vier Stunden Dialysierzeit. PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

4 g/dl HA/PBS ist mit einer Bindung von 85.4% ein wichtiges Bindungsprotein für IDA. (Der Bindungswert von 52% bei einer IDA Konzentration von 635 ng/ml wurde nicht in die mittlere Bindung eingerechnet, da er außerhalb der 4-fachen Standardabweichung lag. In der Abb. 9 wurde der Wert der Vollständigkeit wegen eingezeichnet.) Die Zugabe von 10 µg/ml R-VRP ergab für IDA eine statistisch nicht signifikante Verdrängung von 0.6% aus der Bindung an HA ($p=0.750$).

Desweiteren zeigte sich, daß AGP, in pathologischen Konzentrationen von 2 mg/ml, die IDA Bindung um 3.4% auf $88.8\pm 2.1\%$ erhöhen konnte ($p=0.022$). R-VRP konnte in Serumkonzentrationen von 10 µg/ml keine signifikante Verdrängung aus der Proteinbindung erzielen, sie betrug 1.3% mit einer Gesamtbindung von 87.5% ($p=0.323$).

4.1.3. Proteinbindung von Idarubicin an 100% Humanserum

Um die Bindungsdaten in den künstlichen hergestellten Medien mit *in vivo* ähnlichen Bedingungen vergleichen zu können, wurde die IDA Bindung an HS von vier gesunden Probanden untersucht (Abb. 10, Anhang Tab. 8), sie war unter allen Versuchsbedingungen konzentrationsunabhängig ($r_{P1-4}=0.229$; $r_{P3(+)\text{R-VRP}}=-0.660$; $r_{P4(+)\text{R-VRP}}=0.476$; $r_{P4\text{AGP}(-)\text{R-VRP}}=0.510$; $r_{P4\text{AGP}(+)\text{R-VRP}}=-0.403$).

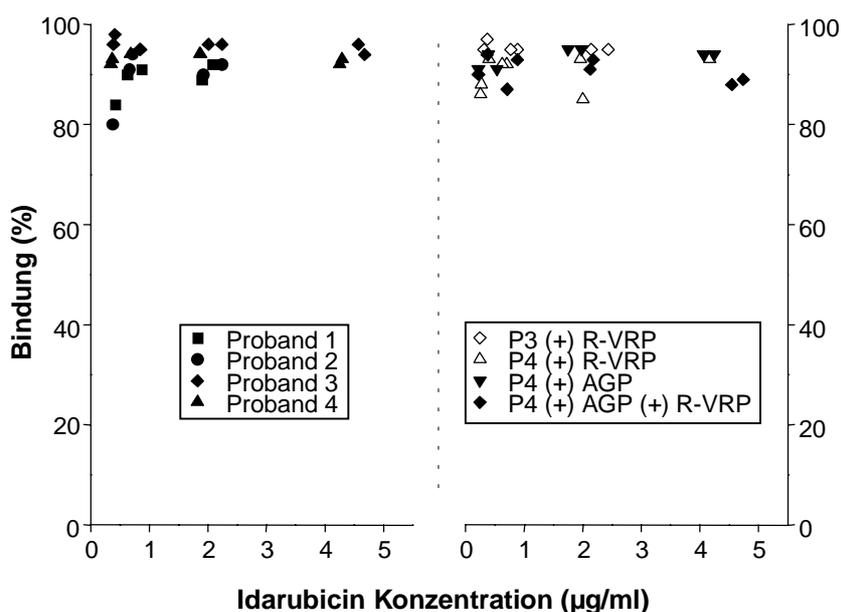


Abb. 10: Proteinbindung von Idarubicin an 100% Humanserum von Proband (P) 1-4 und an 100% Humanserum von Proband 3+4 in An- (+) und Abwesenheit (-) von 10 µg/ml R-Verapamil (R-VRP) und 2 mg/ml α_1 -saures Glykoprotein (AGP), ermittelt nach vier Stunden Dialysierzeit.

Für das HS der Probanden 1-4 ergab sich als mittlere IDA Bindung 92.4% (P1 89.2%, P2 89.4%, P3 95.8%, P4 93.1%). Bei Proband 3 und 4 wurde desweiteren die Verdrängung von IDA aus der Bindung an die Plasmaeiweiße durch den Chemosensitizer R-VRP bestimmt. Die prozentuale Bindung senkte sich bei Proband 3 um 0.7% auf 95.1% ($p=0.173$) und bei Proband 4 um 2.8% auf 90.3% ($p=0.058$).

Die Auswirkung des Akut-Phase-Proteins AGP (2 mg/ml) auf die Proteinbindung von HS wurde bei Proband 4 untersucht, es zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Bindung von 93.1% auf 93.4% ($p=0.683$). Durch die Zugabe von 10 µg/ml R-VRP ließ sich die Bindung nicht signifikant um 2.8% auf 90.6% erniedrigen ($p=0.293$).

4.2. Studien mit den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc

4.2.1. Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Inkubationsmedium

Die Aufnahmekinetik des Anthrazyklins IDA in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc wurde über einen Inkubationszeitraum von drei Stunden untersucht (Abb. 11, Anhang Tab. 9). Der Versuch sollte über den zeitlichen Ablauf des Akkumulationsprozesses, als auch über die optimale Inkubationszeit für weitere Versuche Aufschluß geben. Desweiteren sollte der Einfluß der Inkubationsmedien 15% FCS/RPMI, 100% PBS und 100% HS untersucht werden. Die IDA Konzentration im extrazellulären Medium lag bei 1000 ng/ml. Es wurden jeweils zwei identische Ansätze erstellt.

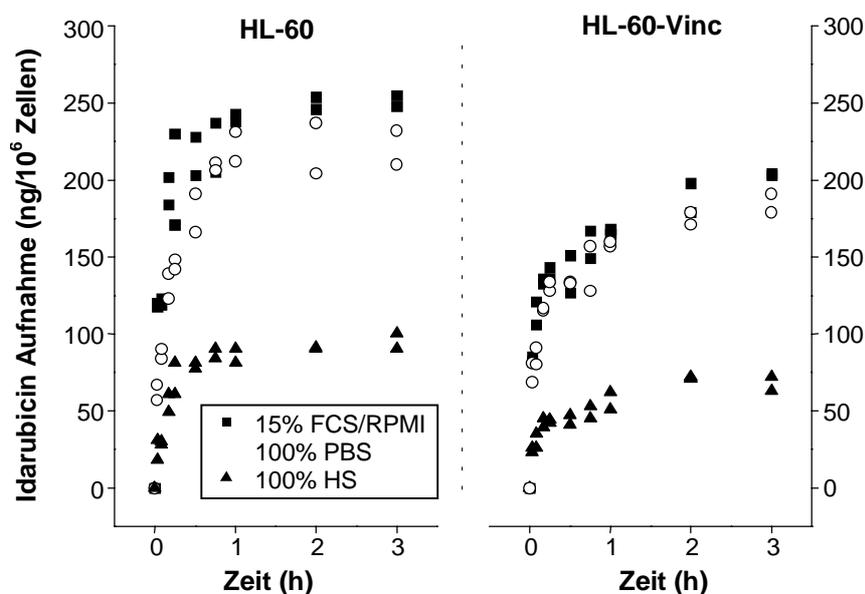


Abb. 11: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0-3h) und dem Inkubationsmedium (15% FCS/RPMI, 100% PBS, 100% HS). Die Idarubicin Inkubationskonzentration betrug 1000 ng/ml. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum, PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

Die Netto-Anthrazyklinaufnahme der resistenten Zelllinie HL-60-Vinc betrug lediglich ein Teil der Aufnahme der HL-60 ($p_{\text{FCS}} < 0.001$; $p_{\text{PBS}} < 0.001$; $p_{\text{HS}} < 0.001$). Nach 60 Minuten akkumulierte in der resistenten Zelllinie in 15% FCS/RPMI nur 69%, in PBS 72% und in HS 66% der IDA Akkumulation der sensiblen Zelllinie.

Die Aufnahmekinetik verlief unter allen Versuchsbedingungen zeitabhängig. Der größte prozentuale Anteil der intrazellulären Aufnahme, bzw. die schnellste

4. ERGEBNISSE

Transportgeschwindigkeit fand sich in den ersten 15 Minuten und nach etwa 60 Minuten wurde ein Gleichgewicht erreicht.

In der **Zelllinie HL-60** fand sich nach 60 Minuten die höchste intrazelluläre IDA Konzentration in 15% FCS/RPMI, im Vergleich war diese in PBS um 8% und in HS um 64% erniedrigt. Die IDA Aufnahme erreichte in den ersten 15 Minuten in 15% FCS/RPMI bereits 83%, in PBS 65% und in HS 83% der Konzentration nach 60 Minuten.

In der **Zelllinie HL-60-Vinc** wurde nach 60 Minuten in 15% FCS/RPMI die höchste IDA Aufnahme gefunden, diese war in PBS um 5% und in HS um 66% erniedrigt. Der IDA Transport in die Zelle fand ebenfalls vorwiegend in den ersten 15 Minuten statt und betrug nach 60 Minuten in 15% FCS/RPMI 84%, in PBS 82% und in HS 75% des gesamten Transportes.

Der Versuch wurde unter den gleichen Bedingungen ebenfalls mit einer IDA Konzentration von 5000 ng/ml durchgeführt (Anhang Tab. 9). Die Akkumulation in den Zellen steigerte sich im Vergleich zu einer Inkubationskonzentration von 1000 ng/ml um etwa das 4-fache. Die Aufnahmekinetik verlief zeitabhängig. Der größte prozentuale Anteil wurde ebenfalls in den ersten Minuten aufgenommen, es fanden sich jedoch nach 60 Minuten noch steigende intrazelluläre Konzentrationen.

Auf Grund der Aufnahmekinetik von IDA, die bei den Zelllinien und den Lymphozyten des Probanden 5 (vergleiche Versuch 4.3.1.) beobachtet worden war, wurde für alle weiteren Versuche eine Inkubationszeit von 60 Minuten verwendet.

4.2.2. Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsmedien

Auf Grund des unterschiedlichen Akkumulationsverhaltens der Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Medien mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen wurden verschiedene Inkubationsmedien 100% RPMI, 100% PBS, 15% FCS/RPMI, 15% FCS/PBS, 15% HS/RPMI, 15% HS/PBS, 100% FCS und 100% HS miteinander verglichen (Abb. 12, Anhang Tab. 10). Bei einer 60-minütigen Inkubationszeit betrug die IDA Konzentration 1000 ng/ml, pro Inkubationsmedium wurden drei Ansätze erstellt.

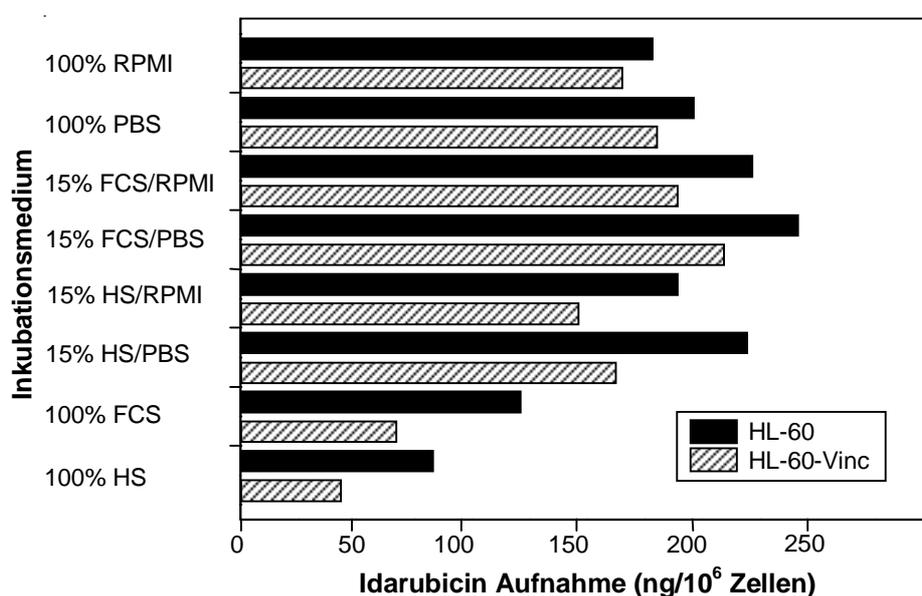


Abb. 12: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsmedien, gemessen nach einer 60-minütigen Inkubationszeit. Die Idarubicin Inkubationskonzentration betrug 1000 ng/ml. Mittelwert von drei Experimenten. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum, PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

In allen Inkubationsmedien zeigte die Zelllinie HL-60 eine höhere Aufnahme von IDA als die HL-60-Vinc ($p < 0.001$). Im Vergleich der Zelllinien unterschied sich der prozentuale Anteil der Akkumulation innerhalb der Medien und fiel in den Medien mit hohem Proteinkonzentrationen wesentlich deutlicher aus. Er betrug maximal 48% in 100% HS und minimal 7% in 100% RPMI.

Bei der Zelllinie **HL-60** wurde die höchste intrazelluläre Konzentration in 15% FCS/PBS und die niedrigste in 100% HS gefunden. In den Medien mit niedrigem Proteinanteil akkumulierte mehr IDA in den Zellen als mit hohem Proteinanteil. Alle Medien mit RPMI erzielten eine niedrigere Akkumulation als die entsprechenden

4. ERGEBNISSE

Medien mit PBS ($p=0.006$) und ebenfalls alle Medien mit HS eine niedrigere als das entsprechende mit FCS ($p<0.001$).

100% HS<100% FCS<100% RPMI<15% HS/RPMI<100% PBS
<15% HS/PBS<15% FCS/RPMI<15% FCS/PBS

Im Vergleich zu 100% HS (minimale Akkumulation) erreichte 15% FCS/PBS (maximale Akkumulation) eine 2.9-fache Steigerung der IDA Aufnahme. Die Inkubationsmedien der weiteren Versuche 15% FCS/RPMI bzw. 100% PBS erzielten eine 2.7-fache bzw. eine 2.4-fache Steigerung der IDA Aufnahme.

In der **Zelllinie HL-60-Vinc** zeigte sich ebenfalls die höchste IDA Akkumulation in dem Medium mit niedrigem Proteinanteil 15% FCS/PBS und die niedrigste in dem Medium mit 100% Humanserum. Die Medien ohne Proteinanteil lagen wieder etwas unterhalb der maximalen Akkumulation in 15% FCS/PBS. Wiederum erzielten alle Medien mit RPMI eine niedrigere Akkumulation als mit PBS ($p=0.034$) und alle Medien mit HS eine niedrigere als mit FCS ($p<0.001$).

100% HS<100% FCS<15% HS/RPMI <15% HS/PBS<100% RPMI
<100% PBS<15% FCS/RPMI<15% FCS/PBS

In 15% FCS/PBS fand sich im Vergleich zu 100% HS eine 4.9-fache Steigerung der Akkumulation, in 15% FCS/RPMI und 100% PBS eine 4.4-, bzw. 4.2-fache Steigerung.

4.2.3. Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der Idarubicin Inkubationskonzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Die intrazelluläre IDA Aufnahme wurde in Abhängigkeit von der extrazellulären IDA Inkubationskonzentration (0-5000 ng/ml) und dem Inkubationsmedium (15% FCS/RPMI, 100% PBS, 100% HS) bestimmt (Abb. 13, Anhang Tab. 11). Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Es wurden jeweils zwei identische Ansätze erstellt.

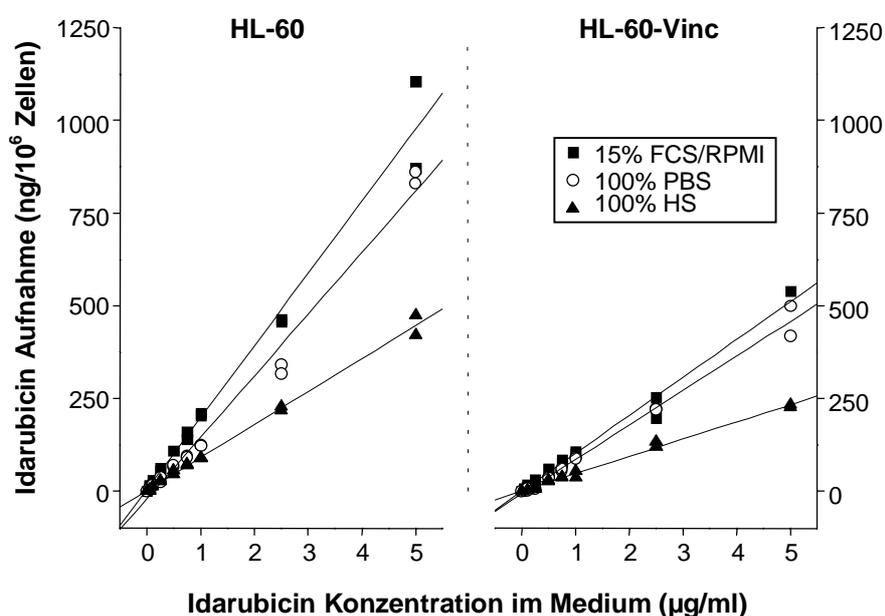


Abb.13: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von dessen Inkubationskonzentration (0-5 µg/ml) und dem Inkubationsmedium (15% FCS/RPMI, 100% PBS, 100% HS). Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum, PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

Die Anthrazyklinaufnahme unterschied sich in den beiden Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc wiederum deutlich. Der resistente Klon akkumulierte bei einer IDA Inkubationskonzentration von 500, 1000 und 5000 ng/ml in 15% FCS/RPMI lediglich 55%, 50% und 54% der sensiblen Zelllinie ($p < 0.001$), in PBS erreichte die Akkumulation 54%, 73% und 54% ($p_{\text{PBS}} < 0.001$) und in HS 56%, 52% und 51% ($p_{\text{HS}} < 0.001$) der sensiblen Zelllinie.

Bei der Zelllinie **HL-60** wurde in allen Medien eine lineare Korrelation ($r_{\text{FCS}} = 0.991$, $r_{\text{PBS}} = 0.993$, $r_{\text{HS}} = 0.998$) zwischen der extrazellulären Konzentration und der IDA Aufnahme gezeigt, ohne daß eine Sättigung erreicht wurde. Die höchste Akkumulation über den gesamten Konzentrationsbereich wurde in 15% FCS/RPMI gesehen. Die

4. ERGEBNISSE

Aufnahme war dagegen in PBS bei 500, 1000 und 5000 ng/ml um 37%, 41% und 14% ($p < 0.001$) und in HS um 55%, 57% und 55% erniedrigt ($p < 0.001$).

Bei der **Zelllinie HL-60-Vinc** zeigte sich ebenfalls eine lineare IDA Akkumulation ($r_{\text{FCS}}=0.992$, $r_{\text{PBS}}=0.995$, $r_{\text{HS}}=0.997$) in allen Medien. Im Vergleich zu 15% FCS/RPMI, in dem die Zellen wiederum die höchste Akkumulation über den gesamten IDA Konzentrationsbereich erreichten, zeigte sich in den Medien PBS und HS bei einer IDA Konzentration von 500, 1000 und 5000 ng/ml eine um 38%, 12% und 15% ($p < 0.001$) und um 53%, 56% und 58% ($p < 0.001$) erniedrigte Aufnahme.

Einfluß der R-Verapamil Konzentration

In diesem Versuch sollte desweiteren der Einfluß des Chemosensitizers R-VRP (0, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) auf die IDA Aufnahme in den Inkubationsmedien A. 15% FCS/RPMI (Abb. 14), B. 100% PBS (Abb. 15) und C. 100% HS (Abb. 16) untersucht werden. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten und es wurden jeweils zwei Ansätze erstellt.

A. Inkubationsmedium 15% FCS/RPMI

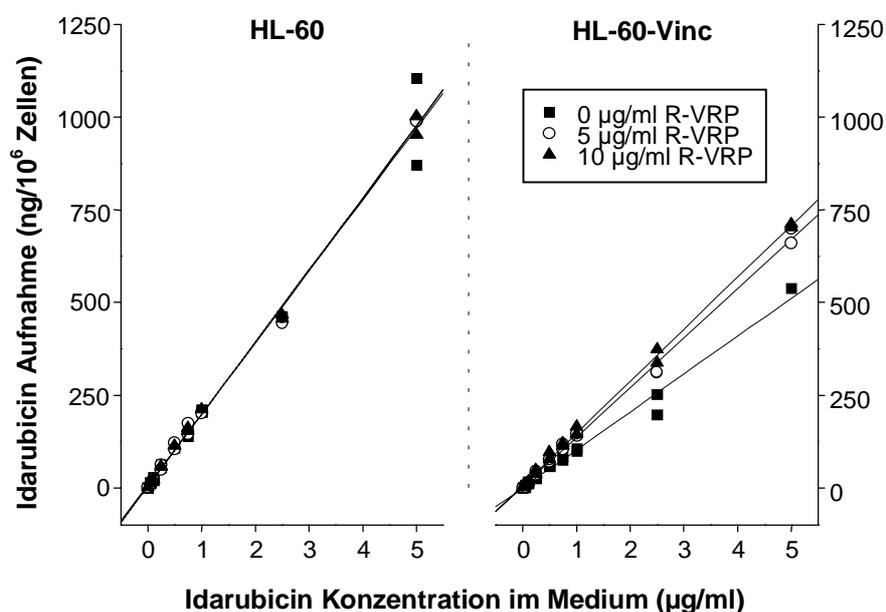


Abb. 14: Idarubicin Aufnahme (ng/ 10^6 Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von dessen Inkubationskonzentration (0-5 $\mu\text{g/ml}$) und der R-Verapamil (R-VRP) Konzentration (0, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) in 15% FCS/RPMI, gemessen nach 60-minütiger Inkubationszeit. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium.

Für die **Zelllinie HL-60** fand sich unter allen Bedingungen eine lineare IDA Akkumulation ($r_0=0.991$, $r_5=0.999$, $r_{10}=0.999$). Die Zugabe von 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP brachte keine Zunahme der IDA Akkumulation ($p_5=0.954$; $p_{10}=0.987$).

4. ERGEBNISSE

Für die **Zelllinie HL-60-Vinc** fand sich wiederum eine lineare Abhängigkeit der IDA Aufnahme von der extrazellulären Konzentration ($r_0=0.992$, $r_5=0.998$, $r_{10}=0.999$). Bei einer IDA Inkubationskonzentration von 500, 1000 und 5000 ng/ml erhöhte sich die Akkumulation durch 5 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP um 25%, 38% und 26% ($p_5<0.001$), durch 10 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP um 43%, 48% und 31% ($p_{10}<0.001$).

Bei einer IDA Inkubationskonzentration von 500, 1000 und 5000 ng/ml konnte sich durch die Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP die Differenz in der IDA Akkumulation zwischen der HL-60 und der HL-60-Vinc von 46% auf 34%, 50% auf 29% und 46% auf 31% erniedrigt werden. Durch die Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP erniedrigte sich die Akkumulationsdifferenz auf 24%, 27% und 28%.

B. Inkubationsmedium 100% PBS

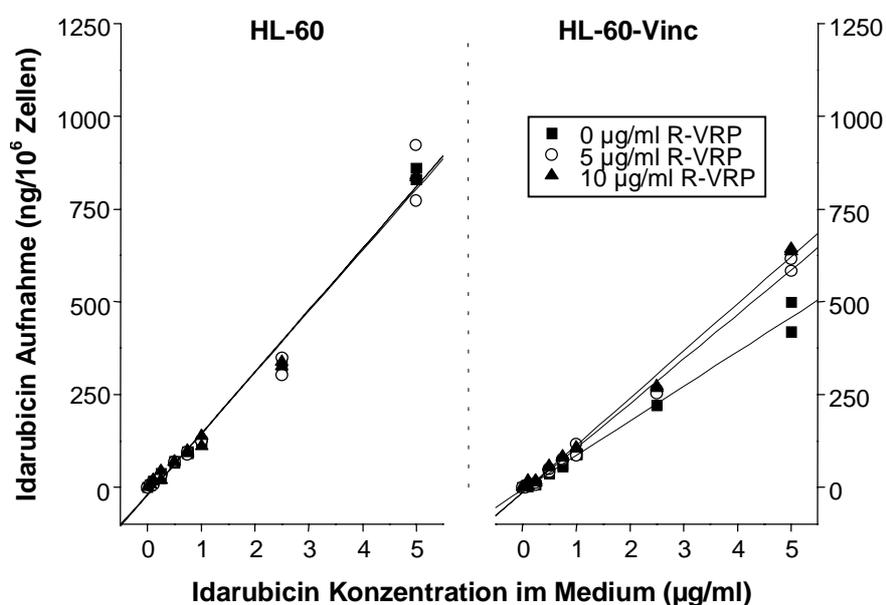


Abb. 15: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von dessen Inkubationskonzentration (0-5 $\mu\text{g/ml}$) und der R-Verapamil (R-VRP) Konzentration (0, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) in 100% PBS, gemessen nach 60-minütiger Inkubationszeit. PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

In der **Zelllinie HL-60** fand sich eine lineare IDA Aufnahme über den gesamten Konzentrationsbereich ($r_0=0.993$, $r_5=0.988$, $r_{10}=0.994$). Die Inkubation mit 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP veränderte die IDA Aufnahme nicht ($p_5=0.942$; $p_{10}=0.882$).

In der **Zelllinie HL-60-Vinc** wurde eine lineare IDA Akkumulation, abhängig von der extrazellulären Konzentration, gesehen ($r_0=0.995$, $r_5=0.997$, $r_{10}=0.997$). Durch die Zugabe von 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP stieg bei einer IDA Inkubationskonzentration von 500, 1000 und 5000 ng/ml die IDA Aufnahme um 22%, 11% und 30% ($p_5<0.001$) bzw. 49%, 15% und 39% ($p_{10}<0.001$).

4. ERGEBNISSE

Durch die Zugabe von R-VRP konnte die Akkumulation in der resistenten Zelllinie der sensiblen angenähert werden. Die Akkumulationsdifferenz bei 500, 1000 und 5000 ng/ml wurde durch 5 µg/ml von bisher 46% auf 34%, 37% auf 20% und 46% auf 29% und durch 10 µg/ml auf 19%, 16% und 24% erniedrigt werden.

C. Inkubationsmedium 100% Humanserum

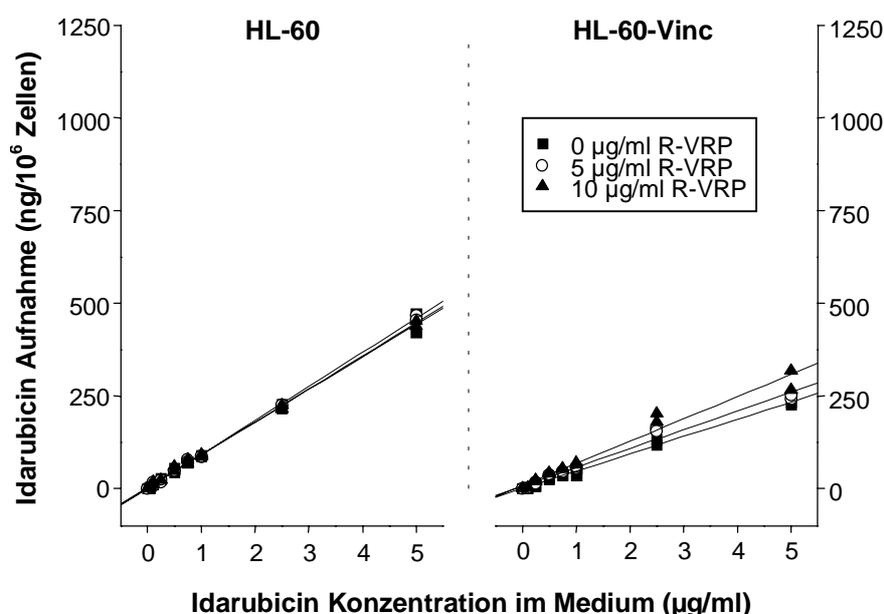


Abb. 16: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von dessen Inkubationskonzentration (0-5 µg/ml) und der R-Verapamil (R-VRP) Konzentration (0, 5, 10 µg/ml) in 100% HS, gemessen nach 60-minütiger Inkubationszeit. HS Humanserum.

In der Zelllinie HL-60 wurde eine lineare Abhängigkeit der IDA Aufnahme von der Inkubationskonzentration gesehen ($r_0=0.998$, $r_5=0.999$, $r_{10}=0.999$). Der Akkumulationsprozeß veränderte sich durch Zugabe von 5 bzw. 10 µg/ml R-VRP nicht ($p_5=0.543$; $p_{10}=0.974$).

In der Zelllinie HL-60-Vinc wurde wiederum eine lineare Akkumulation unter allen Bedingungen gesehen ($r_0=0.997$, $r_5=0.990$, $r_{10}=0.984$). Jedoch erhöhte sich die Akkumulation durch die Zugabe von R-VRP. Bei Inkubationskonzentrationen von 500, 1000 und 5000 ng/ml IDA zeigte sich bei 5 bzw. 10 µg/ml R-VRP eine intrazelluläre IDA Erhöhung um 32%, 24% und 8% ($p_5<0.001$) bzw. 50%, 46% und 28% ($p_{10}<0.001$).

Das Akkumulationsverhalten der beiden Zelllinien konnte durch die Zugabe von R-VRP einander angenähert werden. Bei einer IDA Inkubationskonzentration von 500, 1000 und 5000 ng/ml erniedrigte 5 µg/ml R-VRP die Akkumulationsdifferenz von 44% auf 24%, 48% auf 34% und 49% auf 47%. 10 µg/ml R-VRP senkte diese sogar auf 22%, 25% und 34%.

4.2.4. Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Der Chemosensitizer-effekt von R-VRP auf die Aufnahme von IDA in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc wurde in Konzentrationen zwischen 0-100 $\mu\text{g/ml}$ untersucht (Abb. 17, Anhang Tab. 12). Als Inkubationsmedien wurden wiederum 15% FCS/RPMI, 100% PBS und 100% HS verwendet. Die IDA Inkubationskonzentration betrug 1000 ng/ml, bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Es wurden jeweils drei identische Ansätze erstellt.

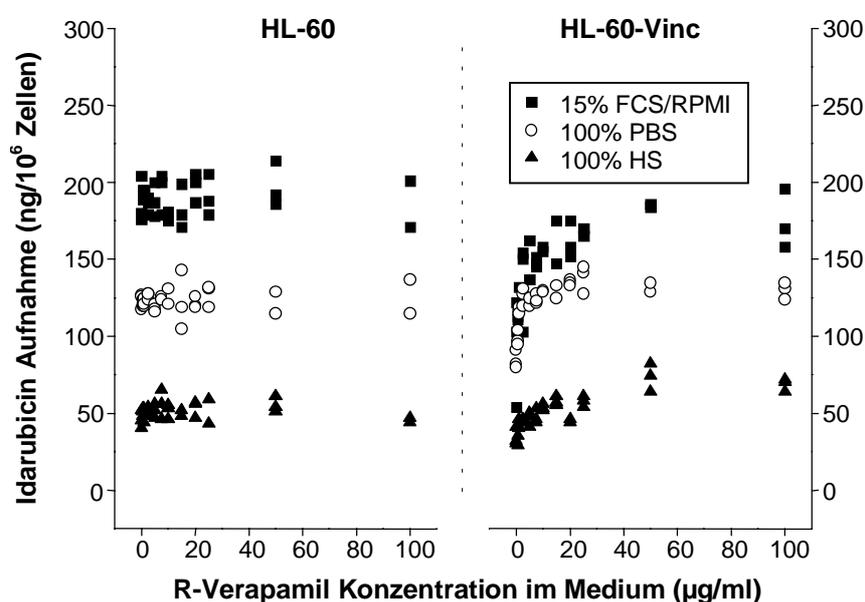


Abb. 17: Idarubicin Aufnahme ($\text{ng}/10^6$ Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der R-Verapamil Konzentration (0-100 $\mu\text{g/ml}$) und dem Inkubationsmedium (15% FCS/RPMI, 100% PBS, 100% HS). Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, die Idarubicin Inkubationskonzentration 1000 ng/ml. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum, PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

Die IDA Basisakkumulation in den zwei Zelllinien unterschied sich wiederum deutlich. Die IDA Akkumulation der resistenten Zelllinie betrug in 15% FCS/RPMI 50% ($p < 0.001$), in PBS 68% ($p < 0.001$) und in HS 74% ($p < 0.001$) der sensiblen.

In der Zelllinie HL-60 fand sich über dem gesamten R-VRP Konzentrationsbereich die höchste IDA Akkumulation in dem Medium 15% FCS/RPMI. In PBS war diese Aufnahme bei 0 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP um 34% ($p < 0.001$) und in HS um 75% ($p < 0.001$) erniedrigt.

Allerdings konnte in allen Inkubationsmedien keine intrazelluläre IDA Akkumulationssteigerung durch die Zugabe von R-VRP erreicht werden, sie war also

4. ERGEBNISSE

R-VRP konzentrationsunabhängig ($r_{\text{FCS}}=0.141$; $r_{\text{PBS}}=0.238$; $r_{\text{HS}}=-0.144$). Selbst toxische R-VRP Konzentrationen erhöhten die Aufnahme nicht.

In der Zelllinie **HL-60-Vinc** zeigte sich unabhängig von der R-VRP Konzentrationen die höchste intrazelluläre Aufnahme von IDA in 15% FCS/RPMI, gefolgt von PBS ($p<0.001$) und HS ($p<0.001$). Gegenüber 15% FCS/RPMI nahmen die Zellen bei R-VRP Konzentrationen von 0, 5, 10, 25, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ in PBS 10%, 15%, 17%, 18%, 29% und 26% ($p<0.001$) und in HS 63%, 68%, 66%, 65%, 61% und 61% ($p<0.001$) weniger auf.

In 15% FCS/RPMI zeigte sich eine Korrelation der IDA Aufnahme mit der R-VRP Konzentration. Die Zugabe von 5, 10, 25, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP steigerte die Basisakkumulation um 56%, 69%, 81%, 99% und 88%. Damit konnte die Basisakkumulation der Zelllinie HL-60 um bis auf 6% erreicht werden.

In PBS korrelierte die Zugabe von 5, 10, 25, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP mit einer Steigerung der Aufnahme um 46%, 55%, 64%, 57% und 55%. Die Akkumulation in der Zelllinie HL-60 wurde dabei maximal um 11% übertroffen.

In HS akkumulierten in den Zellen durch die Zugabe von 5, 10, 25, 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP 35%, 59%, 71%, 115% und 103% mehr IDA, dies übertrifft die Akkumulation in der Zelllinie HL-60 um maximal 33%.

In allen Medien wurde der höchste Akkumulationsgewinn durch die Zugabe von niedrigen R-VRP Konzentrationen erzielt. Bei 100 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP wurden wieder leicht abnehmende intrazelluläre Konzentrationen verzeichnet.

4.2.5. Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der α_1 -sauren-Glykoprotein Konzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

In diesem Versuch wurde der Effekt des Akut-Phase-Proteins AGP (2 mg/ml), sowie die Chemosensitizerwirkung von R-VRP (5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$), auf die IDA Akkumulation dargestellt (Abb. 18, Anhang Tab. 13). Als Inkubationsmedien wurden 15% FCS/RPMI, 100% PBS und 100% HS benutzt. Die IDA Konzentration betrug 1000 ng/ml und die Inkubationszeit 60 Minuten. Es wurden jeweils drei identische Ansätze erstellt.

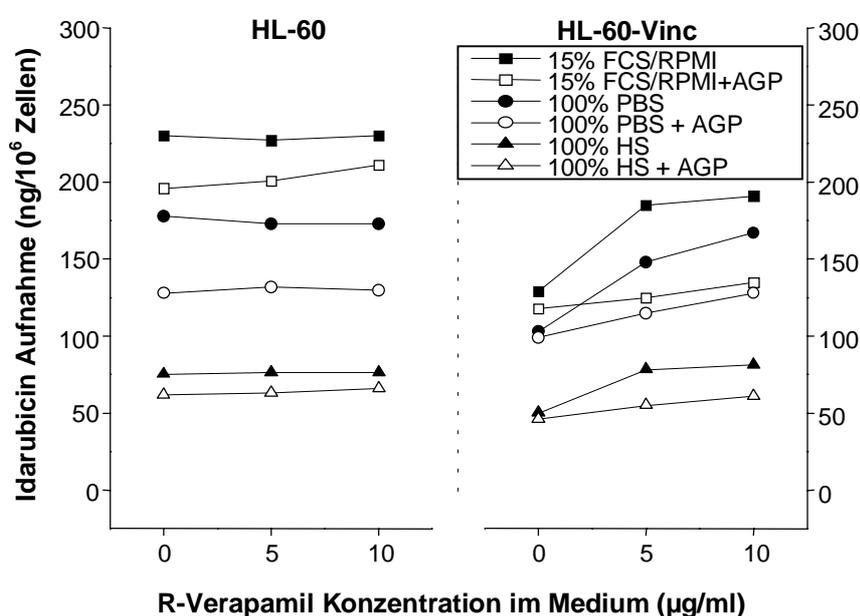


Abb. 18: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der α_1 -sauren-Glykoprotein (AGP) Konzentration (0, 2 mg/ml), der R-Verapamil Konzentration (0, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) und dem Inkubationsmedium (15% FCS/RPMI, 100% PBS, 100% HS), gemessen nach 60-minütiger Inkubationszeit. Die Idarubicin Inkubationskonzentration betrug 1000 ng/ml. Mittelwert aus drei Ansätzen. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum, PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

In der Zelllinie HL-60-Vinc zeigte sich eine Erniedrigung der IDA Akkumulation im Verhältnis zur HL-60. In 15% FCS/RPMI, PBS und HS betrug die Basisakkumulation der Zelllinie HL-60-Vinc ohne AGP 56% ($p_{\text{FCS}}=0.001$), 58% ($p_{\text{PBS}}=0.001$) und 67% ($p_{\text{HS}}=0.004$) und mit AGP 60% ($p_{\text{FCS}}<0.001$), 77% ($p_{\text{PBS}}=0.043$) und 74% ($p_{\text{HS}}=0.067$) der HL-60.

In der Zelllinie HL-60 fand sich in 15% FCS/RPMI die höchste IDA Basisakkumulation, sie war in PBS um 23% ($p=0.008$) und in HS um 67% ($p<0.001$)

4. ERGEBNISSE

erniedrigt. Die Zugabe des Chemosensitizers R-VRP veränderte die Akkumulation nicht ($p_{5;FCS}=0.840$; $p_{10;FCS}=0.981$; $p_{5;PBS}=0.341$, $p_{10;PBS}=0.481$; $p_{5;HS}=0.624$, $p_{10;HS}=0.887$).

Die Zugabe von AGP (2 mg/ml) veränderte jedoch das Akkumulationsverhalten von IDA. In 15% FCS/RPMI erniedrigte sich die Aufnahme um 15% ($p=0.080$), in PBS um 28% ($p=0.005$) und in HS um 17% ($p=0.014$). 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP konnte diese erniedrigte Aufnahme in FCS/RPMI wieder um 3% bzw. 8% ($p_5=0.625$; $p_{10}=0.286$), in PBS um 3% bzw. 2% ($p_5=0.755$ $p_{10}=0.869$) und in HS um 2% bzw. 6% ($p_5=0.851$; $p_{10}=0.292$) steigern, die Steigerung war jedoch nicht signifikant.

In der **Zelllinie HL-60-Vinc** fand sich wiederum die höchste Basisakkumulation in 15% FCS/RPMI, im Vergleich war diese in PBS um 20% ($p=0.038$) und in HS um 61% ($p<0.001$) statistisch signifikant erniedrigt. Die Zugabe von 5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ R-VRP erhöhte die Akkumulation in 15% FCS/RPMI um 43% bzw. 48% ($p_5=0.001$; $p_{10}<0.001$), in PBS um 44% bzw. 62% ($p_5=0.006$; $p_{10}=0.001$) und in HS um 56% bzw. 62% ($p_5=0.004$; $p_{10}=0.003$).

Die Basisakkumulation veränderte sich durch die Zugabe von 2 mg/ml AGP geringfügig. In 15% FCS/RPMI sank die Aufnahme um 9% ($p=0.080$), in PBS um 4% ($p=0.690$) und in HS um 8% ($p=0.594$). Die Chemosensitizerwirkung von R-VRP (5 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$) wurde durch AGP jedoch eingeschränkt, sie wirkte sich in 15% FCS/RPMI am deutlichsten aus. In 15% FCS/RPMI fand sich eine 6% bzw. 14% -ige ($p_5=0.208$; $p_{10}=0.014$) Steigerung der IDA Aufnahme, in PBS eine 16%, bzw. 29% -ige ($p_5=0.161$; $p_{10}=0.033$) und in HS eine 20% bzw. 33% -ige ($p_5=0.228$; $p_{10}=0.076$) Steigerung.

4.2.6. Idarubicin Retention in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

In diesem Versuch wurde die IDA Retention über fünf Stunden in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc untersucht (Abb. 19, Anhang Tab. 14). In den Inkubationsmedien 15% FCS/RPMI, 100% PBS und 100% HS wurden die Zellen mit 1000 ng/ml IDA für eine Stunde vorinkubiert, gewaschen und in frischem Inkubationsmedium resuspendiert. In beiden Zelllinien wurde die Basisakkumulation und nach jeder weiteren Stunde die Retention in je zwei Ansätzen bestimmt.

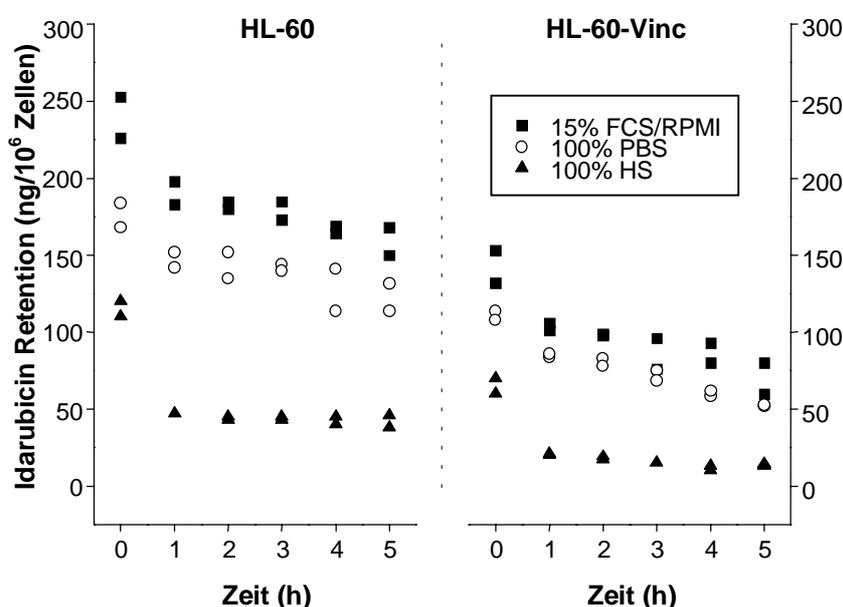


Abb. 19: Idarubicin Retention (ng/10⁶ Zellen) über fünf Stunden in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc nach einer 60-minütigen Preinkubation mit Idarubicin (1000 ng/ml) in den Inkubationsmedien (15% FCS/RPMI, 100% PBS, 100% HS) und Transfer in Idarubicin freies Medium zum Zeitpunkt 0. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum, PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

Die Netto-Anthracyklinaufnahme der beiden Zelllinien unterschieden sich nach einer Stunde. In 15% FCS/RPMI akkumulierte die resistente Zelllinie 60% ($p_{\text{FCS}} < 0.001$), in PBS 63% ($p_{\text{PBS}} < 0.001$) und in HS 57% ($p_{\text{HS}} < 0.001$) des IDA der sensiblen.

In der Zelllinie HL-60 fand sich nach der 60-minütigen Inkubation die höchste intrazelluläre IDA Konzentration in 15% FCS/RPMI. Die Zellen in den Inkubationsmedien PBS und HS akkumulierten im Vergleich 27% und 52% weniger. Der schnellste IDA Efflux nach extrazellulär fand sich in der ersten Stunde. Durch die Transportmechanismen nahm in dem Medium 15% FCS/RPMI die Konzentration um 20% ab. Der weitere Efflux verlief langsamer. Nach fünf Stunden betrug er 33% der Basisakkumulation. In PBS zeigte sich ebenfalls der größte Efflux mit 16% des

intrazellulären IDA Gehaltes in der ersten Stunde, nach fünf Stunden betrug er insgesamt 30%. Den mit Abstand größten Efflux mit 59% in der ersten Stunde fand sich in HS. Danach sank die IDA Konzentration nur noch geringfügig, in den verbleibenden vier Stunden um 4% auf insgesamt 63%.

In der **Zelllinie HL-60-Vinc** wurde in 15% FCS/RPMI nach 60 Minuten wiederum die höchste IDA Basisakkumulation gefunden. Im Vergleich betrug diese Konzentrationen in PBS 22% und in HS 55% weniger.

Der IDA Efflux war in allen Medien in der ersten Stunde am größten. In 15% FCS/RPMI und PBS betrug der Efflux in der ersten Stunde 27% und 23%, nach den fünf Stunden insgesamt 51% und 52%. Der Transport von IDA in den Extrazellulärraum fiel in HS am größten aus. Nach einer Stunde war die intrazelluläre Konzentration bereits um 68%, nach fünf Stunden um insgesamt 78% erniedrigt.

Einfluß der R-Verapamil Konzentration

Desweiteren wurde in den Medien A. 15% FCS/RPMI (Abb. 20), B. 100% PBS (Abb. 21) und C. 100% HS (Abb. 22) der Einfluß des Chemosensitizers R-VRP auf den Efflux untersucht. In der Akkumulations- und Retentionsphase wurden die Experimente ohne (-) und mit (+) 10 µg/ml R-VRP durchgeführt.

A. Inkubationsmedium 15% FCS/RPMI

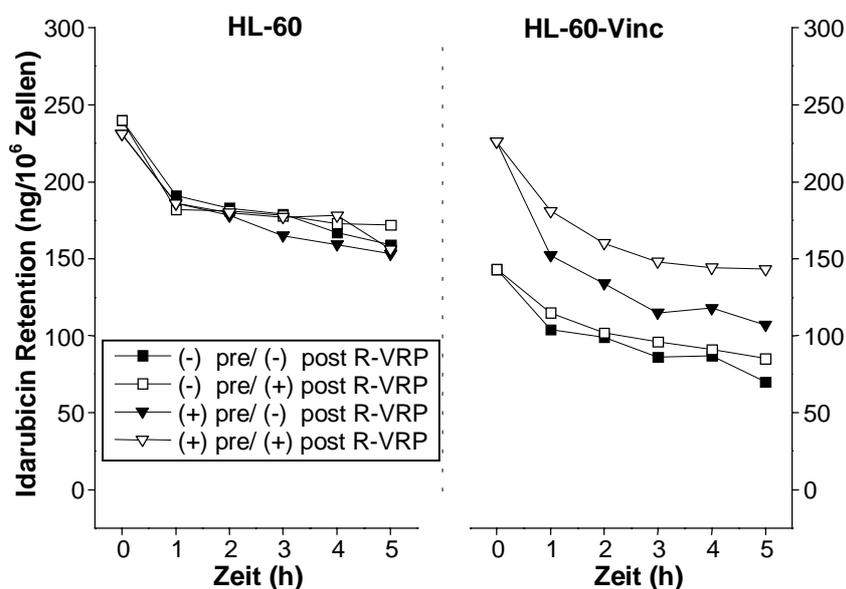


Abb. 20: Idarubicin Retention (ng/10⁶ Zellen) über fünf Stunden in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc nach einer 60-minütigen Preinkubation mit Idarubicin (1000 ng/ml) in 15% FCS/RPMI und Transfer in Idarubicin freies Medium zum Zeitpunkt 0. In der Preinkubations- (pre) und Postinkubations- (post) Periode wurden die Experimente ohne (-) und mit (+) 10 µg/ml R-Verapamil (R-VRP) durchgeführt. Mittelwert von zwei Experimenten. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium.

4. ERGEBNISSE

In der Zelllinie **HL-60** zeigte sich bei Zugabe von R-VRP weder in der Akkumulations- noch Retentionsphase eine Veränderung der intrazellulären Aufnahme oder des Effluxes ($p_{\pm}=0.760$; $p_{\pm}=0.211$, $p_{\pm}=0.719$).

In der Zelllinie **HL-60-Vinc** verlangsamte die Zugabe von R-VRP in der Retentionsphase den Efflux. Nach einer bzw. fünf Stunden verringerte sich der intrazelluläre IDA Gehalt um 20% bzw. 41% ($p_{\pm}=0.121$).

Die Inkubation mit R-VRP in der Akkumulationsphase steigerte die Basisakkumulation um 58%. Ohne R-VRP in der Retentionsphase zeigte sich ein starker Efflux. Nach einer bzw. fünf Stunden betrug der Efflux 33% bzw. 53% ($p_{\pm}<0.001$). Mit R-VRP in der Akkumulations- und Retentionsphase zeigte sich jedoch ein deutlich verlangsamter Efflux, nach einer bzw. fünf Stunden erniedrigte sich die Ausgangskonzentration um 20% bzw. 37% ($p_{\pm}<0.001$). Das Effluxverhalten war damit über die gesamte Zeit mit dem der Zelllinie HL-60 vergleichbar.

B. Inkubationsmedium 100% PBS

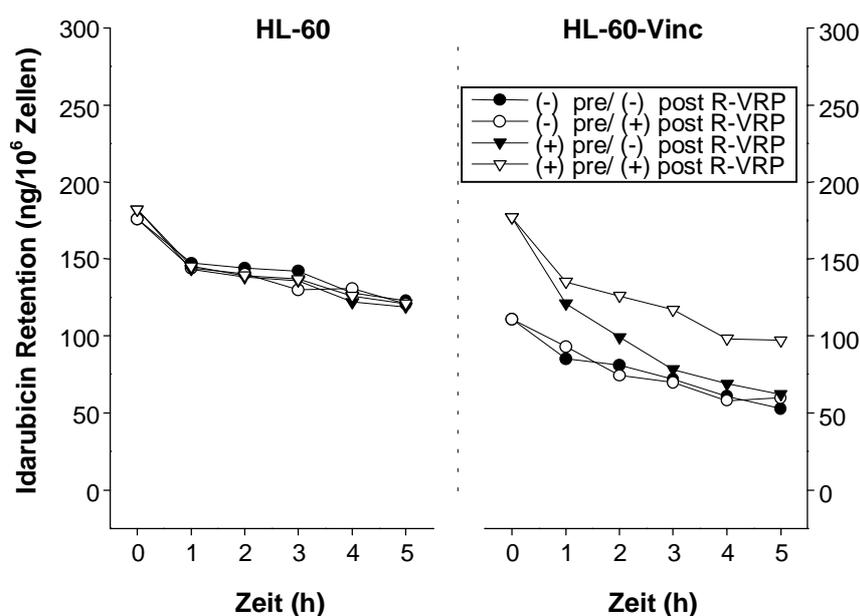


Abb. 21: Idarubicin Retention (ng/10⁶ Zellen) über fünf Stunden in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc nach einer 60-minütigen Preinkubation mit Idarubicin (1000 ng/ml) in 100% PBS und Transfer in Idarubicin freies Medium zum Zeitpunkt 0. In der Preinkubations- (pre) und Postinkubations- (post) Periode wurden die Experimente ohne (-) und mit (+) 10 µg/ml R-Verapamil (R-VRP) durchgeführt. Mittelwert von zwei Experimenten. PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

In der Zelllinie HL-60 wurde keine Veränderung des IDA Transportes nach extrazellulär durch die Zugabe von R-VRP in der Akkumulations- oder Retentionsphase beobachtet ($p_{\pm}=0.509$; $p_{\pm}=0.351$, $p_{\pm}=0.627$).

In der Zelllinie **HL-60-Vinc** zeigte R-VRP alleine in der Retentionsphase keinen Effekt auf den Efflux ($p_{\pm}=0.703$). Der intrazelluläre Gehalt von IDA erniedrigte sich nach einer und fünf Stunden um 16% und 46%.

4. ERGEBNISSE

Die Zugabe von R-VRP in der Akkumulationsphase erhöhte die Basisakkumulation um 59%. In der folgenden Retentionsphase sanken die intrazellulären Konzentrationen in der ersten Stunde um 32% und nach fünf Stunden um 65% ($p_{+/-}<0.001$). R-VRP in der Akkumulations- und Retentionsphase bewirkte dagegen eine erhöhte Ausgangskonzentration als auch einen reduzierten Efflux. Die intrazelluläre Konzentration erniedrigte sich nach einer und fünf Stunden um 24% und 45% ($p_{+/+}<0.001$). Damit waren die intrazellulären Konzentration mit denen der HL-60 vergleichbar.

C. Inkubationsmedium 100% Humanserum

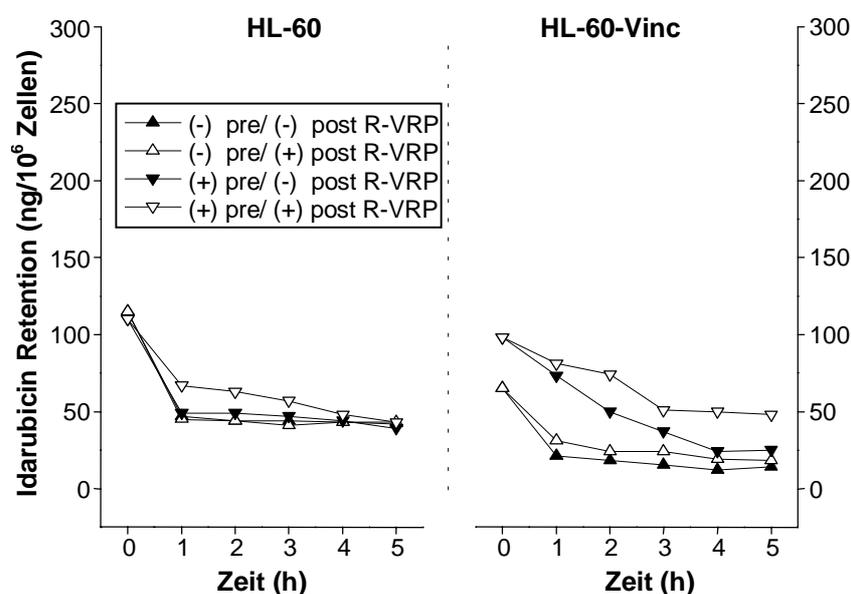


Abb. 22: Idarubicin Retention (ng/10⁶ Zellen) über fünf Stunden in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc nach einer 60-minütigen Preinkubation mit Idarubicin (1000 ng/ml) in 100% HS und Transfer in Idarubicin freies Medium zum Zeitpunkt 0. In der Preinkubations- (pre) und Postinkubations- (post) Periode wurden die Experimente ohne (-) und mit (+) 10 µg/ml R-Verapamil (R-VRP) durchgeführt. Mittelwert von zwei Experimenten. HS Humanserum.

Die Retention von IDA in der Zelllinie HL-60 zeigte durch Zugabe von R-VRP in der Akkumulations- und/oder Retentionsphase keine wesentliche Veränderung ($p_{-/+}=0.710$; $p_{+/-}=0.771$, $p_{+/+}<0.001$).

In der Zelllinie HL-60-Vinc verringerte die Zugabe von R-VRP in der Retentionsphase den Efflux. Die intrazelluläre IDA Konzentration war nach einer und fünf Stunden um 52% und 72% erniedrigt ($p_{-/+}=0.006$).

Die Basisakkumulation steigerte sich wiederum nach der Zugabe von R-VRP in der Akkumulationsphase um 51%. In der Retentionsphase zeigte sich daraufhin ein starker Efflux der fast die Werte ohne R-VRP erreichte. Nach einer bzw. fünf Stunden betrug der Efflux 26% bzw. 74% ($p_{+/-}<0.001$). Mit R-VRP in der Retentionsphase waren die intrazellulären Konzentrationen nach einer und fünf Stunden um 17% und 51% erniedrigt ($p_{+/+}<0.001$). Der Efflux entsprach dem der HL-60.

4.3. Studien mit humanen Lymphozyten

4.3.1. Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Inkubationsmedium

Die Aufnahmekinetik von IDA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0-3h) wurde bei den Lymphozyten des Probanden 5 untersucht (Abb. 23, Anhang Tab. 15). Die IDA Inkubationskonzentration lag bei 1000 ng/ml. Als Inkubationsmedien wurden 15% FCS/RPMI, 100% PBS und 100% HS des Probanden 5 verwendet und jeweils zwei identische Ansätze erstellt.

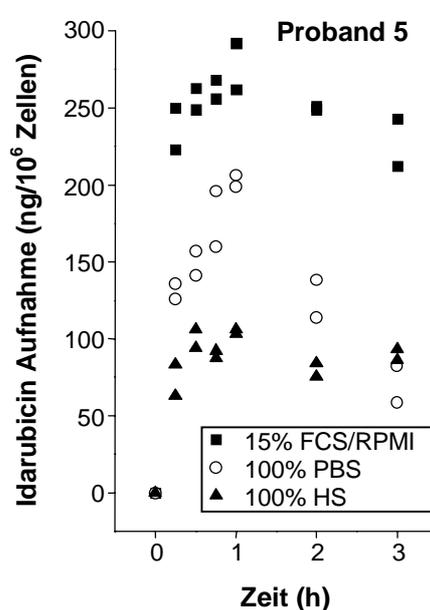


Abb. 23: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Lymphozyten des Probanden 5 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (0-3h) und dem Inkubationsmedium (15% FCS/RPMI, 100% PBS, 100% HS). Die Idarubicin Inkubationskonzentration betrug 1000 ng/ml. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum, PBS Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung.

Für die Lymphozyten des Probanden 5 fand sich, wie in den Versuchen mit den Zelllinien, ein unterschiedliches Akkumulationsverhalten von IDA in den drei Medien. In 15% FCS/RPMI wurden die höchsten intrazellulären Konzentrationen gefunden. Im Vergleich waren sie nach 60 Minuten in PBS um 27% ($p < 0.001$) und in HS um 64% ($p < 0.001$) erniedrigt. Es wurden nach 60 Minuten vergleichbare Konzentrationen gefunden wie in der sensiblen Zelllinie HL-60.

Die Aufnahmekinetik in den Medien verlief zeitabhängig. Der größte Teil wurde in den ersten 15 Minuten aufgenommen, nach 60 Minuten erreichte die IDA Aufnahme

4. ERGEBNISSE

in allen Medien ihren Maximalwert. Es wurde kein Gleichgewicht erreicht, stattdessen sanken die intrazellulären Konzentrationen wieder ab.

In 15% FCS/RPMI erreichte der Akkumulationsprozeß bereits nach 15 Minuten 86% der maximalen Aufnahme nach 60 Minuten. Nach Erreichen der maximalen Aufnahme sank die intrazelluläre Konzentration wieder ab. Nach drei Stunden fand sich nur noch 80% der maximalen intrazellulären Konzentration.

In PBS wurden in den ersten 15 Minuten die schnellste Transportgeschwindigkeit (65%) des Anthrazyklins in die Zellen gefunden, und sank nach dem maximalen Aufnahmezeitpunkt nach 60 Minuten wieder rapide ab. So ließen sich nach drei Stunden nur noch 34% nachweisen.

Die schnellste intrazelluläre Aufnahme fand in HS in den ersten 15 Minuten statt (70%) und erreichte nach 60 Minuten seinen Höhepunkt, um dann langsam abzunehmen. Nach drei Stunden lagen die intrazellulären Konzentrationen noch bei 84%.

4.3.2. Idarubicin Akkumulation in Abhängigkeit von der α_1 -sauren-Glykoprotein Konzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Für die Lymphozyten der Probanden 1, 2, 3 und 6 wurde ebenfalls die Abhängigkeit der IDA Aufnahme von der AGP Konzentration (0, 2 mg/ml), der R-VRP Konzentration (0, 5, 10 μ g/ml) und den Inkubationsmedien 15% FCS/RPMI und 100% HS des jeweiligen Probanden untersucht (Abb. 24, Anhang Tab. 16). Die IDA Inkubationskonzentration betrug 1000 ng/ml und die Inkubationszeit 60 Minuten. Es wurden jeweils drei Ansätze bestimmt.

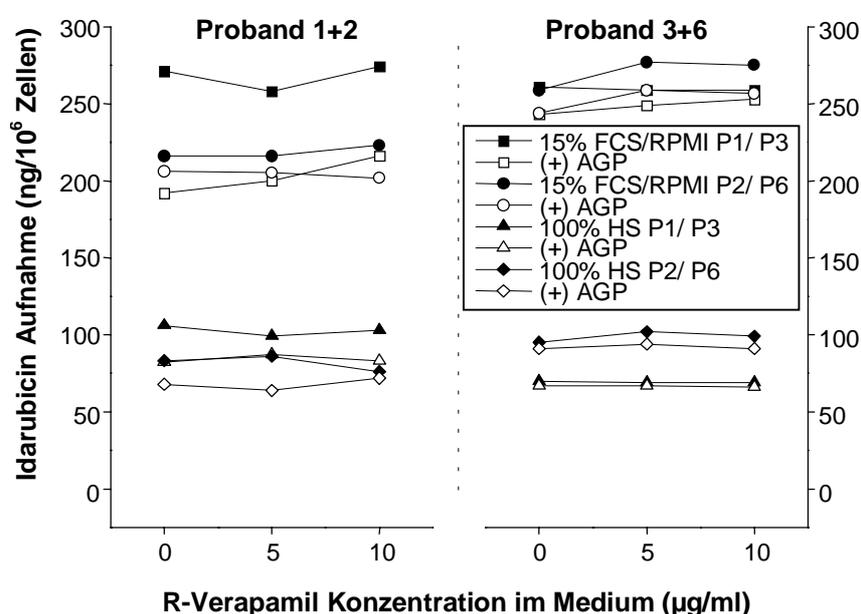


Abb. 24: Idarubicin Aufnahme (ng/10⁶ Zellen) in die Lymphozyten der Probanden (P) 1, 2, 3 und 6 in Abhängigkeit von der α_1 -sauren-Glykoprotein (AGP) Konzentration (0, 2 mg/ml), der R-Verapamil Konzentration (0, 5, 10 μ g/ml) und dem Inkubationsmedium (15% FCS/RPMI, 100% HS). Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten, die Idarubicin Inkubationskonzentration 1000 ng/ml. FCS fetales Kälberserum, RPMI 1640 Medium, HS Humanserum.

Die Akkumulation in den Inkubationsmedien 15% FCS/RPMI und HS unterschied sich bei allen Probanden beträchtlich. Die erreichten Konzentrationen entsprechen in beiden Medien der sensiblen Zelllinie HL-60.

In 15% FCS/RPMI wurde bei allen Probanden die höchste Basisakkumulation gefunden. Im Vergleich dazu ist sie in HS bei Proband 1, 2, 3 und 6 um 61% (pP1=0.001), 62% (pP2=0.001), 73% (pP3<0.001) und 63% (pP6<0.001) erniedrigt. Die Zugabe des Chemosensitizers R-VRP (10 μ g/ml) veränderte die Akkumulation weder in 15% FCS/RPMI (pP1=0.859; pP2=0.669; pP3=0.901; pP6=0.272) noch in 100% HS (pP1=0.739; pP2=0.449; pP3=0.944; pP6=0.180).

4. ERGEBNISSE

Die Basisakkumulation veränderte sich durch die Gabe von 2 mg/ml AGP. Es zeigten sich große individuelle Schwankungen. In 15% FCS/RPMI sank die Aufnahme bei Proband 1, 2, 3 und 6 um 29% ($p_{P1}=0.021$), 5% ($p_{P2}=0.633$), 7% ($p_{P3}=0.243$) und 6% ($p_{P4}=0.265$) und in 100% HS um 23% ($p_{P1}=0.001$), 18% ($p_{P2}=0.226$), 4% ($p_{P3}=0.355$) und 4% ($p_{P4}=0.112$).

Eine Chemosensitizerwirkung konnte auch in Anwesenheit von AGP sowohl in 15% FCS/RPMI ($p_{P1}=0.203$; $p_{P2}=0.898$; $p_{P3}=0.322$; $p_{P6}=0.189$) als auch in 100% HS ($p_{P1}=0.861$; $p_{P2}=0.724$; $p_{P3}=0.561$; $p_{P6}=0.852$) nicht nachgewiesen werden.

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Ergebnisse

Eines der ungelösten Probleme in der zytostatischen Behandlung von malignen Tumoren ist die Entstehung der MDR. Die Identifikation und Analyse vieler Resistenzmechanismen, vor allem des *mdr1* Gens und seines Produkts P-gp, hat daher zur Entwicklung von zahlreichen *in vitro* Modellen der MDR geführt. Es wurden durch Selektion Zytostatika-resistente Zelllinien etabliert, die als Tumormodelle bzw. zur Untersuchung verschiedener Resistenzmechanismen zur Verfügung stehen. Diese Modelle spielen eine wichtige Rolle bei der Erforschung der MDR, sowie der Evaluierung der Effektivität von Zytostatika und Chemosensitizern. Allerdings wurde dem Effekt der Proteinbindung auf die Aktivität von Zytostatika und Chemosensitizern wenig Aufmerksamkeit geschenkt, obwohl viele dieser Substanzen eine hohe Proteinbindung besitzen. So wurden die meisten Studien in Medien mit niedrigen Proteinkonzentrationen, wie z.B. 15% FCS oder weniger, durchgeführt. Dies steht jedoch im Kontrast zu der klinischen Situation, in welcher Pharmaka hohen Proteinkonzentrationen, sowohl in der freien Zirkulation als auch im Gewebe, ausgesetzt sind. Es ist daher von klinischer und experimenteller Bedeutung, daß die Ergebnisse dieser Studien bisher ohne Berücksichtigung der Proteinbindung auf die *in vivo* Situation übertragen wurden, insbesondere da Proteinbindungsinteraktionen einer der Gründe für den bisher eingeschränkten klinischen Erfolg bei der Modulation der MDR sein könnten.

In den vorliegenden Studien wurde daher die Auswirkung von verschiedenen Proteinkonzentrationen auf die Serumproteinbindung von IDA untersucht. Es wurde gezeigt, daß die freie Konzentration des Zytostatikums IDA mehr als 7-fach, von ungefähr 59% in 15% FCS/PBS zu nur 8% in Humanserum, variiert. Die Differenz in der Serumproteinbindung ist zum einen auf die unterschiedliche Konzentration der Bindungsproteine und zum anderen auf die verschiedenartige Struktur der Proteine in Human- und fetalem Kälberserum zurückzuführen. So ist z.B. in 15% FCS die durchschnittliche Gesamtproteinkonzentration etwa um das 13-fache und die von Albumin etwa um das 12-fache im Vergleich zu Humanserum reduziert (siehe Anhang Tab. 17). Die IDA Proteinbindung steht in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten, die für diesen Liganden eine Bindung von 97% in Humanserum zeigten (Adria Laboratories 1990).

Zur Proteinbindung der Anthrazykline tragen mehrere Proteine bei, von denen Humanalbumin das wichtigste ist (Rivory *et al.* 1992). Dies bestätigte sich bei physiologischen Humanalbumin Konzentrationen von 4 g/dl mit einer Proteinbindung von 85% für IDA. Schwankungen im Humanalbuminanteil können daher einen großen Einfluß auf die freie Konzentration des Zytostatikums haben. *In vivo* können die Proteinkonzentrationen auf Grund von genetischen Variationen, physiologischen

oder pathologischen Zuständen erheblich variieren (Hervé *et al.* 1994). Physiologischerweise sinkt z.B. der Serumalbumingehalt mit dem Alter, unabhängig vom Gesundheitszustand, ebenso zeichnen sich Tumorpatienten durch erniedrigte Werte aus (Veering *et al.* 1990, Woo *et al.* 1994).

Zur hohen Proteinbindung von IDA trägt vor allem dessen Lipophilie bei, welche die Bindung an die Plasmaproteine, vor allem auch an die Lipoproteine, erhöht (Chassany *et al.* 1994). Eine Korrelation zwischen Lipophilie und Proteinbindung wurde auch bei anderen Pharmaka, wie Benzo[a]pyrene Derivaten, Insektiziden und Beta-Blockern beobachtet (Chassany *et al.* 1994). Desweiteren zeigen Anthrazykline im Plasma von Hasen Interaktionen mit α_2 -, β - und γ -Globulinen (Maniez-Devos *et al.* 1985), entsprechende Studien in Humanserum wurden nicht durchgeführt.

Die Proteinbindung bestimmt den Gradienten freier Pharmaka zwischen dem Extra- und Intrazellulärraum, sowie die Konzentration des ungebundenen Pharmakons an der Tumorzelloberfläche. Die Aufnahme der Anthrazykline in die Zelle ist jedoch essentiell für ihre Wirkmechanismen. Da nur der Anteil des ungebundenen Pharmakons zur Aufnahme in die Zelle zur Verfügung steht, war ein Hauptziel der beschriebenen Studien, den Effekt der Proteinbindung auf die Aufnahme und Retention von IDA in HL-60 Zellen zu bestimmen. Die IDA Konzentrationen von 50-5000 $\mu\text{g/ml}$, die in der Studie verwendet wurden, lagen zum Teil in einer Größenordnung wie sie im Plasma von Patienten vorliegen können. Plasmakonzentrationen von im Mittel 191 ng/ml (91-679 ng/ml) können dort erreicht werden (Eksborg *et al.* 1990). Es wurde demonstriert, daß in 100% Humanserum, mit nur 8% ungebundener Substanz, die Aufnahme in die Zelle wesentlich niedriger ist, verglichen mit den Inkubationsmedien mit niedrigerer IDA Bindung.

Diese Korrelation zwischen Proteinbindung und intrazellulärer Aufnahme fand sich jedoch nicht in allen Versuchsmedien. Die unerwartete Beobachtung, daß sich in Medien mit niedrigen Serumproteinkonzentrationen im Vergleich zu proteinfreien Medien die intrazelluläre IDA Akkumulation erhöhte, läßt eine Interaktion der Serumproteine mit der Pharmaka Akkumulation vermuten. Dieser Effekt könnte bei hohen IDA Konzentrationen an der Zellmembran, z.B. durch eine gegenseitige sterische Behinderung der Moleküle, verursacht werden. Desweiteren ist eine direkte Beteiligung der Serumproteine bei der IDA Aufnahme in Betracht zu ziehen.

Chassany *et al.* (1994) zeigte, daß der Effekt der Plasmaproteinbindung auf die intrazelluläre Aufnahme von Zytostatika *in vivo* teilweise wieder aufgehoben werden kann, wenn eine signifikante Fraktion der Pharmaka an Lipoproteine gebunden ist. Die Lipoproteine, sowie die daran gekoppelten Pharmaka, können in die Zellen über LDL oder VLDL Rezeptor Endozytose aufgenommen werden (Chassany *et al.* 1994, Muindi & Young 1990). Dieser Mechanismus der Zellaufnahme kann bei malignen Zellen eine relevante Rolle spielen, da oft eine hohe Anzahl an LDL-Rezeptoren exprimiert werden. Beispielhaft wurde für die Zelllinie HL-60 eine erhöhte Aufnahme von Retinylestern über den LDL Rezeptor gezeigt (Wathne *et al.* 1989). LDL könnte

daher als Carrier für lipophile Substanzen in Zellen mit erhöhter LDL-Rezeptorendichte dienen.

Die durchgeführten Experimente wurden ebenso mit der Multidrug resistenten Zelllinie HL-60-Vinc durchgeführt, die sich von der sensiblen durch die Expression des Membrantransporters P-gp unterscheidet. In den HL-60-Vinc Zellen verringerte P-gp die IDA Aufnahme und beschleunigte in den Retentionsstudien den IDA Efflux signifikant. Die Differenz in der IDA Akkumulation zwischen den beiden Zelllinien unterstreicht die Bedeutung des Transporters P-gp für das Resistenzverhalten der Leukämiezelllinien.

Die Funktion von P-gp als Transporter von IDA wird allerdings kontrovers diskutiert (Roovers et al. 1999, Sikic et al. 1997), da man in einigen Studien zu dem Schluß kam, daß IDA kein gutes Substrat für den P-gp vermittelten Efflux sei (Berman & McBride 1992, Hollingshead & Faulds 1991, Michieli et al. 1993, 1994, Petrini et al. 1993, Ross 1995). Die Eigenschaft von IDA, dem Efflux durch die P-gp Pumpe in einem geringeren Maße unterworfen zu sein als die anderen Anthrazykline, wird auf die erhöhte Lipophilie des Pharmakons und damit auf die rasche passive Aufnahme durch die zelluläre Plasmamembran, sowie die hohe DNA Bindungskapazität zurückgeführt (Berman & McBride 1992). Außerdem sind Mechanismen, wie die LDL-Rezeptorendozytose, ebenfalls von Bedeutung (Chassany et al. 1994, Muindi & Young 1990). Die Pumpfunktion von P-gp auf die zytosolische freie Konzentration von IDA wird aber nicht durch die Lipophilie verändert (Mülder et al. 1995). Andererseits berichten jedoch weitere Studien, daß sich mit steigender Lipophilie der Pharmaka die Affinität für P-gp und damit auch der Efflux erhöhe. Für Chemosensitizer konnte dies von Zamora et al. (1988) und Facchetti et al. (1991) gezeigt werden.

Zum Vergleich des Akkumulationsverhaltens wurden ebenfalls Studien mit humanen Lymphozyten durchgeführt. Deren IDA Aufnahme glich der Zelllinie HL-60. Somit scheint das Modell der HL-60 Zelllinie ein geeignetes Studienobjekt zu sein, um die Auswirkung von Zytostatika auf P-gp negative Zellen zu testen.

Zur Überwindung der durch P-gp vermittelten Zytostatika-Resistenz, wurden zahlreiche Chemosensitizer entwickelt, die *in vitro* P-gp komplett inhibieren bzw. MDR Zellen sensitivieren. Da klinische Studien mit diesen Modulatoren jedoch nur selten Erfolge aufwiesen, wurde vermutet, daß *in vivo* Proteinbindungsphänomene mit der Chemosensitizer Aktivität interferieren könnten. So zeigten Lehnert et al. (1993), daß durch die Verwendung von physiologischen Serumproteinkonzentrationen die Modulation der MDR durch einige Chemosensitizer, wie Amiodaron und Trifluoperazin, aufgehoben werden konnte, gemessen an Hand der Proliferationsrate. Andere Chemosensitizer, wie VRP oder Chinin, wurden davon weniger beeinflusst. Jedoch ermittelten diese Untersucher nicht den Effekt von Serum auf die Aufnahme der Zytostatika. Smith et al. (1995), der die Pharmaka Aufnahme untersuchte, zeigte eine deutliche Abnahme des intrazellulären ³H-markierten Vinblastins und

³H-markiertem Paclitaxels in MCF-7/ADR Zellen mit steigenden FCS Konzentrationen. Der Chemosensitizereffekt von VRP nahm ebenfalls mit steigenden FCS Konzentrationen ab. Desweiteren konnten Stratmann et al. (1998) in Zytotoxizitätsstudien, ebenso wie in Akkumulationsstudien (persönlicher Kontakt), mit der Zelllinie HL-60-Vinc und dem Zytostatikum Vincristin eine Aufhebung des Chemosensitizereffektes von R-VRP in Humanserum im Gegensatz zu 15% FCS/RPMI zeigen.

In den vorliegenden Studien mit der Zelllinie HL-60 und HL-60-Vinc konnte R-VRP in allen Inkubationsmedien den Effekt von P-gp in Konzentrationen zwischen 10-20 µg/ml aufheben. Die Akkumulations- und Retentionscharakteristiken der HL-60-Vinc Zellen für IDA entsprachen in Anwesenheit von R-VRP denen der HL-60 Zellen. Dies zeigte sich sowohl für die Inkubationen in den Medien mit niedrigen als auch hohen Proteinkonzentrationen, der Chemosensitizereffekt schien unabhängig von der Proteinkonzentration zu sein. Auf der anderen Seite konnte R-VRP den Effekt von hohen Proteinkonzentrationen auf die IDA Aufnahme nicht beeinflussen. Dies steht auch in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß R-VRP keine signifikante Verdrängung von IDA aus seiner Bindung an Humanserum erreichen kann.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit, sowie der hierzu verfügbaren Literatur, zeigte sich, daß physiologische Serumproteinkonzentrationen die Modulation der MDR je nach verwendetem Zytostatikum und Chemosensitizer erheblich beeinflussen können. Interessanterweise wird die Wirkung von Substanzen, wie R-VRP, welche zu mehr als 90% an Serumproteine gebunden sind, in verschiedenen Studien in sehr unterschiedlichem Ausmaß von Serum inhibiert (Lehnert et al. 1993, Smith et al. 1995, Stratmann et al. 1998). Bei der freien Chemosensitizerkonzentration, die zur Modulation an der Zelle zur Verfügung steht, scheint dabei neben der Eiweiß- und Wirkstoffkonzentration auch die Proteinbindung des verwendeten Zytostatikums eine Rolle zu spielen. So wurde beobachtet, daß bei der Verwendung von Zytostatika mit hoher Proteinbindung ein größerer Chemosensitizereffekt nachgewiesen werden konnte als bei einer niedrigen. Dies weist auf mögliche Pharmakainteraktionen zwischen den Zytostatika und Chemosensitizern hin. Die Pharmaka könnten sich durch Konkurrenz um die Bindungsstellen gegenseitig in der Wirkungsstärke und Wirkungsdauer beeinflussen, vor allem wenn deren gebundener Anteil mehr als 80% beträgt (Mutschler 1991). Weiterführende Studien, die auch die Chemosensitizerkonzentrationen bestimmen, wären daher empfehlenswert.

Bei den vorangegangenen *in vitro* Versuchen mit Chemosensitizern, die die MDR modulieren können, wurden zudem oft Konzentrationen verwendet, die bei Patienten fast nicht erreichbar sind. Am Beispiel von R-VRP wurde gezeigt, daß die Konzentrationen, die den maximalen Effekt bewirkten, etwa das 2-3 -fache über denen lagen, die während einer Behandlung *in vivo* erreicht werden können. Allerdings erzielten auch *in vivo* erreichbare Konzentrationen in allen untersuchten Medien einen

signifikanten Effekt. Für R-VRP können individuell verschiedene Plasmakonzentrationen von 4-10 μM (1.96-4.91 $\mu\text{g/ml}$) ohne limitierende Toxizität erzielt werden (Bates *et al.* 1994). Bei anderen, vor allem neueren Substanzen, wie z.B. MM36, ein Verapamilabkömmling, oder Chinolonderivaten (Berger *et al.* 1999, Teodori *et al.* 1999), können jedoch oft Wirkspiegel erreicht werden, die gut vertragen werden und die MDR modulieren können. Solche wichtigen Variablen sollten daher auch in Betracht gezogen werden, wenn man neue Chemosensitizer-substanzen für klinische Studien auswählt.

Desweiteren zeigten bereits Chatterjee *et al.* (1990 a,b,c) in MDR-positiven-Zellen eines chinesischen Hamsterovars, die resistent gegen Adriamycin sind, daß das Akut-Phase-Protein AGP mit der Chemosensitizerwirkung von Verapamil interferiert. Durch Zugabe von 2 mg/ml AGP wurde eine komplette Aufhebung des Umkehreffektes des Chemosensitizers Verapamil gesehen, was auf eine unspezifische, aber hochaffine Bindung von Verapamil an AGP zurückgeführt wurde.

In den durchgeführten *in vitro* Experimenten bestätigte sich, daß das Bindungsprotein AGP die Akkumulation des Zytostatikums IDA beeinflussen kann. AGP reduzierte die freie Konzentration des Zytostatikums im extrazellulären Medium, was zu einer erniedrigten Pharmaka Akkumulation in der Zelle führte. Dies zeigte sich vor allem in den Medien mit niedrigen Proteinkonzentrationen. Jedoch war auch in Humanserum die Akkumulation von IDA erniedrigt, obwohl sich in den Proteinbindungsstudien keine signifikante Reduktion der freien IDA Konzentration zeigte. Desweiteren bindet AGP den Chemosensitizer R-VRP und führte so in allen Medien zu einem verminderten Modulationseffekt. Die Studien von Stratmann *et al.* (1998) und Woodcock *et al.* (1993 a,b, 1997) unterstützen diese Ergebnisse. Die Modulation der MDR durch R-VRP scheint daher maßgeblich von der AGP Konzentration bestimmt werden zu können.

Diese Beobachtungen stimmen mit Studien überein, die zeigten, daß AGP ein wichtiger Bindungspartner für basische Substanzen, wie VRP, ist (Hervé *et al.* 1994, McGowan *et al.* 1983). Es wurde gezeigt, daß 1,5 μM AGP ungefähr 1 μM Verapamil, bzw. 2 mg/ml AGP ungefähr 17 $\mu\text{g/ml}$ Verapamil, binden können (Gillis *et al.* 1985, Woodcock *et al.* 1997). Diese Beobachtung könnte klinische Bedeutung erlangen, da bei Patienten mit schweren Erkrankungen, insbesondere Tumorgeschehen, der AGP Serumspiegel (Normwerte 0.4-0.8 mg/ml) auf bis zu 4 mg/ml erhöht sein kann, mit durchschnittlichen Werten um 2 mg/ml (Abramson *et al.* 1982, Kremer *et al.* 1988, Zini *et al.* 1990) und damit mit einer Aufhebung des Chemosensitizereffekts zu rechnen wäre.

5.2. Schlußfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Aktivität von Zytostatika und Chemosensitizern durch Proteinbindungsphänomene in hohem Maße beeinflußt werden kann. So bestimmt die Proteinbindung vor allem die freie Konzentration des Pharmakons, die zur Aufnahme in die Zelle zur Verfügung steht. Erwartungsgemäß zeigte sich daher in den Medien mit hohen Proteinkonzentrationen eine geringere zelluläre Aufnahme des Zytostatikums als in proteinarmen- oder freien Medien. Dies ist von Bedeutung, da die zytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika, wie IDA, von der Aufnahme in die Zelle abhängig ist. Desweiteren kann insbesondere die Wirkung von Chemosensitizern, die wie R-VRP zu einem hohen Prozentsatz proteingebunden sind, durch hohe Proteinkonzentrationen eingeschränkt bzw. aufgehoben werden. Dies scheint neben der Quantität auch maßgeblich von der Qualität der Proteine, sowie der Bindungsaffinität des Chemosensitizers abzuhängen. So wird z.B. der Modulationseffekt von R-VRP durch Humanserum kaum beeinflußt, in Anwesenheit von AGP jedoch fast vollständig aufgehoben. Die Vernachlässigung solcher Pharmakainteraktionen in *in vitro* Versuchen durch Verwendung von Medien mit reduzierten Serumproteinkonzentrationen oder Versuchsmedien nicht adäquater Zusammensetzung, kann daher eine unzureichende Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse zur Folge haben.

Die vorliegenden Studien führten zu der Schlußfolgerung, daß *in vitro* Modelle, mit dem Ziel die potentielle klinische Effektivität von Zytostatika und Chemosensitizern zu evaluieren, in Medien mit physiologischen Serumproteinkonzentrationen, wie Humanserum, durchgeführt werden sollten. Es ist von Bedeutung, daß insbesondere die Serumproteinkonzentrationen von Albumin und AGP denen von Tumorpatienten entsprechen, da diese Proteine maßgeblich an der Bindung von Pharmaka beteiligt sein können. Falls möglich, sollten die *in vitro* Versuche sogar mit dem entsprechenden Patientenserum durchgeführt werden.

Die in dieser Studie dargestellten Ergebnisse lieferten erste Ansätze zur Verbesserung von *in vitro* Modellen, mit dem Ziel, die Aussagekraft zur *in vivo*-Aktivität von Zytostatika und Chemosensitizern zu erhöhen. Neben der Proteinbindung können jedoch noch zahlreiche weitere Faktoren, vor allem pharmakokinetische Eigenschaften, zu einer limitierten klinischen Relevanz der *in vitro* Studien beitragen. Die Entwicklung einer, an tatsächliche *in vivo* Verhältnisse weitgehend angepaßten Versuchssituation, steht somit als fundamentale Anforderung an Versuche zur Überprüfung der Wirksamkeit von Zytostatika und Chemosensitizern zur Diskussion.

6. Zusammenfassung

Hintergrund: Einer der wichtigsten Gründe für das Therapieversagen von Zytostatika ist die MDR von malignen Zellen. Deren Modulation mit sogenannten Chemosensitizern scheint ein erfolgversprechender Therapieansatz zu sein, so daß zahlreiche *in vitro* Studien initiiert wurden. Jedoch beachten diese Studien nur selten den Effekt der Proteinbindung auf die zelluläre Aufnahme von Zytostatika und der Wirkung von Chemosensitizern. Der Vorhersagewert der *in vitro* Tests für die *in vivo* Effektivität steht somit zur Diskussion. Die Ziele dieser Untersuchung waren es deshalb a) die Bindungscharakteristiken des Anthrazyklins IDA in HS und Zellkulturlösungen zu bestimmen, b) den Effekt der Proteinbindung, sowie des Chemosensitizers R-VRP und des Akut-Phase-Proteins AGP, auf die Aufnahme und Retention von IDA in eine humane HL-60 Leukämiezelllinie zu untersuchen und c) die Bedeutung der Proteinbindung für die *in vivo*-Aktivität von Zytostatika und Chemosensitizern zu analysieren.

Methoden: Die Proteinbindung von IDA wurde mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse in HS und gebräuchlichen Zellkulturlösungen bestimmt. Die Zellaufnahme und Retention von IDA wurde in einer sensiblen und einer P-gp-exprimierenden, resistenten humanen Leukämiezelllinie (HL-60 und HL-60-Vinc), sowie in Lymphozyten gesunder Probanden untersucht. Die Versuchsbedingungen wurden durch verschiedene Inkubationsmedien und die Zugabe von R-VRP und AGP variiert. Die IDA Konzentration wurde spektrophotofluorometrisch analysiert.

Ergebnisse: In den untersuchten Inkubationsmedien variierte die freie Fraktion von IDA um mehr als 7-fach von ungefähr 60% in 15% FCS/PBS zu nur 8% in HS. In den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc war die zelluläre Aufnahme von IDA in dem Medium mit niedrigen Proteinkonzentrationen ungefähr dreimal höher als in HS. Die Bedeutung von P-gp für das Resistenzverhalten der Leukämiezelllinie zeigte sich durch die erniedrigte Akkumulation von IDA in den resistenten Zellen. R-VRP konnte in allen Medien die Differenz der IDA Aufnahme und Retention zwischen der sensiblen und der resistenten Zelllinie aufheben. Jedoch konnte R-VRP nicht den Effekt von hohen Proteinkonzentrationen auf die IDA Aufnahme ausgleichen. In Anwesenheit von AGP konnte sowohl in den Medien mit hohen als auch niedrigen Proteinkonzentrationen nur eine sehr geringe Chemosensitizerwirkung nachgewiesen werden. Das Akkumulationsverhalten der Lymphozyten glich der sensiblen HL-60 Zelllinie.

Schlußfolgerung: Proteinbindungsphänomene können die Aktivität von Zytostatika und Chemosensitizern erheblich beeinflussen. So ist *in vitro* die Serumproteinbindung eine wichtige Determinante für die zelluläre Aufnahme von IDA. Der Modulationseffekt von R-VRP reagiert weniger sensitiv auf Unterschiede in der Gesamte Proteinkonzentration, allerdings kann er durch erhöhte AGP Konzentrationen, wie sie bei Tumorpatienten vorkommen, erheblich beeinflußt werden. Bei der Interpretation von *in vitro* funktionellen Tests der zytostatischen Effektivität und Chemosensitizerwirkung sollte daher die Serumproteinbindung berücksichtigt und Untersuchungen in HS einbezogen werden.

7. Literatur

Abramson, F., Jenkins, J., Ostchega, Y.: Effect of cancer and its treatment on plasma concentration of α_1 -acid glycoprotein and propranolol binding. *Clin Pharmacol Ther* 32, 659-663, 1982

Ackermann, H.: Biometrische Analyse von Stichproben. 6th Edition, Epsilon-Verlag, Darmstadt, 1998

Adria Laboratories: Idamycin package insert. Columbus, Ohio, USA, 1990

Ahmed, J.H., Godden, J., Meredith, P.A., Elliott, H.L.: R-Verapamil: pharmacokinetics and effects on PR interval, blood pressure and heart rate. *Br J Clin Pharmacol* 36, 93-98, 1993

Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M.: Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 361-398, 1999

Arcamone, F., Di Marco, A., Gaetani, M.: Isolamento ed attivita antitumorale di un antibiotico da *Streptomyces* sp. *Giorn Microbiol* 9, 83-90, 1961

Barrand, M.A., Heppell-Parton, A.C., Wright K.A., Rabbitts, P.H., Twentyman P.R.: A 190-kilodalton protein overexpressed in non-P-glycoprotein-containing multidrug-resistant cells and its relationship to the MRP gene. *J Natl Cancer Inst* 86, 110-107, 1994

Bates, S.E., Meadows, B., Goldspiel, B.R., Denicoff, A., Le, T.B., Steinberg, S.M., Elwood, L.J.: A pilot study of amiodarone with infusional doxorubicin or vinblastine in refractory breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 35, 457-463, 1995

Bates, S.E., Regis, J.I., Robey, E.W., Zhan, Z., Scala, S., Meadows, B.J.: Chemoresistance in the clinic: overview 1994. *Bull Cancer* 9, 55-61, 1994

Bates, S.E., Wilson, W.H., Fojo, A.T., Alvarez, M., Zhan, Z., Regis, J., Robey, R., Monks, A., Kang, Y.K., Chabner, B.: Clinical reversal of multidrug resistance. *Stem Cells* 14, 56-63, 1996

Beck, W.T.: The cell biology of multiple drug resistance. *Biochem Pharmacol* 36, 2879-2887, 1987

Berger, D., Citarella, R., Dutia, M., Greenberger, L., Hallett, W., Paul, R., Powell, D.: Novel multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* 42, 2145-2161, 1999

Berman, E., McBride, M.: Comparative cellular pharmacology of daunorubicin and idarubicin in human multidrug resistant leukemia cells. *Blood* 79, 3267-3273, 1992

Berman, E., Wittes, R.E., Leyland-Jones, B., Casper, E.S., Gralla, R.J. Howard, J., Williams, L., Baratz, R., Young, C.W.: Phase I and clinical pharmacology studies of intravenous and oral administration of 4-demethoxydaunorubicin in patients with advanced cancer. *Cancer Res* 43, 6096-6101, 1983

Bhushan, A., Kermode, J.C., Posada, J., Tritton, T.R.: Anthracycline resistance. [Review] *Cancer Treat Res* 48, 55-72, 1989

Boiron, M., Jacquillat, C., Weil, M., Tanzer, J., Levy, D., Sultan, C., Bernard, J.: Daunorubicin in the treatment of acute myelocytic leukemia. *Lancet* 1, 330-333, 1969

Booser, D.J., Hortobagyi, G.N.: Anthracycline antibiotics in Cancer Therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 47, 223-258, 1994

- Broxterman, H.J., Giaccone, G., Lankelma, J.:** Multidrug resistance proteins and other drug transport-related resistance to natural product agents. *Curr Opin Oncol* 7, 532-540, 1995
- Buckley, M.M., Lamb, H.M.:** Oral idarubicin. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in the treatment of haematological malignancies and advanced breast cancer. *Drugs Aging* 11, 61-86, 1997
- Callen, D.F., Baker, E., Simmers, R.N., Seshadri, R., Roninson, I.B.:** Localisation of the human multiple drug resistance gene, MDR1, to 7q21.1. *Hum Genet* 77, 142-144, 1987
- Campos, L., Guyotat, D., Archimbaud, E., Calmard-Oriol, P., Tsuruo, T., Troncy, J., Treille, D., Fiere, D.:** Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 79, 473-476, 1992
- Capranico, G., Butelli, E., Zunino, F.:** Change of the sequence specificity of daunorubicin-stimulated topoisomerase II DNA cleavage by epimerization of the amino group of the sugar moiety. *Cancer Res* 55, 312-317, 1995
- Cassaza, A.M., Bertazzoli, C., Pratesi, G., Bellini, O., Di Marco, A.:** Antileukemic activity and cardiac toxicity of 4-demethoxydaunorubicin (idarubicin) with single oral dose. *Invest New Drugs* 2, 281, 1984
- Cerosimo, R.J.:** Idarubicin: an anthracycline antineoplastic agent. *Clin Pharm* 11, 152-167, 1992
- Chambers, T.C., McAvoy, E.M., Jakobs, J.W., Eilon, G.:** Protein kinase C phosphorylates P-glycoprotein in multidrug resistant human KB carcinoma cells. *J Biol Chem* 265, 7679, 1990
- Chassany, O., Urien, S., Claudepierre, P., Bastian, G., Tillement, J.P.:** Binding of anthracycline derivatives to human serum lipoproteins. *Anticancer Res* 14, 2353-2356, 1994
- Chatterjee, M., Harris, A.:** Enhancement of adriamycin cytotoxicity in a multidrug resistant Chinese hamster Ovary (CHO) subline, CHO-adr by toremifene and its modulation by α_1 -acid glycoprotein. *Eur J Cancer* 26, 432-436, 1990a
- Chatterjee, M., Harris, A.:** Reversal of acquired resistance to adriamycin in CHO cells by tamoxifen and 4-hydroxy tamoxifen: Role of drug interaction with α_1 -acid glycoprotein. *Br J Cancer* 62, 712-717, 1990b
- Chatterjee, M., Robson, Harris, A.:** Reversal of multidrug-resistance by verapamil and modulation by α_1 -acid glycoprotein in wild-type and multidrug-resistant Chinese hamster ovary cell lines. *Cancer Res* 50, 2818-2822, 1990c
- Chaudhary, P.M., Mechetner, E.B., Roninson, I.B.:** Expression and activity of the multidrug resistance p-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes. *Blood* 80, 2735-2739, 1992
- Cheng, A.L., Su, I.J., Chen, Y.C., Lee, T.C., Wang, C.H.:** Expression of P-glycoprotein and glutathione S-transferase in recurrent lymphoma/ The possible role of Epstein-Barr virus, immunophenotypes and other predisposing factors. *J Clin Oncol* 11, 109-115, 1993
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., Gallo R.C.:** Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J Exp Med* 149, 969-974, 1979
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., Gallo, R.C.:** Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Sci U S A* 75, 2458-2462, 1978

Dalton, W.S., Crowley, J.J., Salmon, S.S., Grogan, T.M., Laufman, L.R., Weiss, G.R., Bonnet, J.D.: A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. *Cancer* 75, 815-820, 1995

Dalton, W.S., Grogan, T.M., Melker, P.S., Scheper, R.J., Durie, B.G.M., Taylor, C.H.W., Miller, T.P., Salmon, S.E.: Drug resistance in multiple myeloma and non hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J Clin Oncol* 7, 415, 1989

Di Marco, A., Cassaza, A.M., Pratesi, G.: Antitumor activity of 4-demethoxy-daunorubicin administered orally. *Cancer Treat Rev* 61, 893-894, 1977

Di Marco, A., Zunino, F., Cassaza, A.M.: Comparison of biochemical and biological methods in the evaluation of new anthracycline drugs. *Antibiot Chemother* 23, 12-20, 1978

Dicato, M., Duhem, C., Pauly, M., Ries, F.: Multidrug resistance: molecular and clinical aspects. *Cytokines Cell Mol Ther* 3, 91-100, 1997

Drori, S., Eytan, G.D., Assaraf, Y.G.: Potentiation of anticancer-drug cytotoxicity by multidrug-resistance chemosensitizers involves alterations in membrane fluidity leading to increased membrane permeability. *Eur J Biochem* 228, 1020-1029, 1995

Dubost, M., Ganter, P., Maral, R., Ninet, L., Pinnert, S.: Un nouvel antibiotique à propriétés cytostatiques: la rubidomycine. C.R. Academie des Sciences (Paris) 257, 1813-1815, 1963

Echizen, H., Vogelgesang, B., Eichelbaum, M.: Effects of d,l-verapamil on atrioventricular conduction in relation to its stereoselective first pass metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 38, 71-76, 1985

Ecker, G., Chiba, P.: Structure-activity-relationship studies on modulators of the multidrug transporter P-glycoprotein - an overview. *Wien Klin Wochenschr* 107, 681-686, 1995

Eichelbaum, M., Mikus, G., Vogelsang, B.: Pharmacokinetics of (+)-, (-)- and (±)-verapamil after intravenous administration. *Br J Clin Pharmacol* 17, 453-458, 1984

Eksborg, S., Ehrsson, H., Ekquist, B.: Protein binding of anthraquinone glycosides with special reference to adriamycin. *Cancer Chemother Pharmacol* 10, 7-10, 1982

Eksborg, S., Soderberg, M., Nilsson, B., Antila, K.: Plasma pharmacokinetics of idarubicin and its 13-hydroxy metabolite after intravenous and oral administration under fasting and non-fasting conditions. *Acta Oncol* 29, 921-925, 1990

Elbaek, K., Ebbeoj, E., Jakobsen, A., Juui, P., Rasmussen, S.N., Bastholt, L., Dalmark, M., Steiness, E.: Pharmacokinetics of oral idarubicin in breast cancer patients with reference to antitumor activity and side effects. *Clin Pharmacol Ther* 45, 6, 1989

Facchetti, I., Grandi, M., Cucchi, P., Geroni, C., Penco, S., Vigevani, A.: Influence of lipophilicity on cytotoxicity of anthracyclines in Lo Vo and Lo Vo/Dx human cell lines. *Anti Cancer Drug Res* 6, 385-397, 1991

Fairchild, C.R., Ivy, S.P., Kao-Shan, C.S., Wang-Peng, J., Rosen, N. Israel, M.A., Melera, P.W., Cowan, K.H., Goldsmith, M.E.: Isolation of amplified and overexpressed DNA sequences from adriamycin-resistant human breast cancer cells. *Cancer Research* 47, 5141-5148, 1987

Fardel, O., Lecureur, V., Guillouzo, A.: The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen Pharmacol* 27, 1283-1291, 1996

- Fauci, A.S., Braunwald, E., Isselbacher, K.J., Wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Hauser, S.L., Longo, D.L.:** Harrison's principles of internal medicine. 14th. ed., McGraw-Hill, 1998
- Ferry, D.R., Traunecker, H., Kerr, D.J.:** Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. *Eur J Clin Pharmacol* 32, 1070-1081, 1996
- Fine, R.L., Chabner, B.A.:** Multidrug Resistance. *Cancer Chemother Biol Response Modif* 9, 81-92, 1987
- Fojo, A., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D., Gottesman, M.M., Pastan, L.:** Expression of a multidrug resistance gene in human tumours and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 265-269, 1987
- Ford, J.M., Hait, W.N.:** Pharmacologic circumvention of multidrug resistance. *Cytotechnology* 12, 171-212, 1993
- Fukushima, T., Kawai, Y., Urasaki, Y., Yoshida, A., Ueda, T., Nakamura, T.:** Influence of idarubicinol on the antileukemic effect of idarubicin. *Leukemia Res* 18, 943-947, 1994
- Fukushima, T., Ueda, T., Uchida, M., Nakamura, T.:** Action mechanism of idarubicin (4-demethoxydaunorubicin) as compared with daunorubicin in leukemic cells. *Int J Hematol* 57, 121-130, 1993
- Galettis, P., Boutagy, J., Ma, D.D.F.:** Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia. *Br J Cancer* 70, 324-329, 1994
- Ganzina, F., Pacciarini, M.A., Di Pietro, N.:** Idarubicin (4-demethoxydaunorubicin): a preliminary overview of preclinical and clinical studies. *Invest New Drugs* 4, 85-105, 1986
- Garcia-Segura, L.M., Soto, F., Planells-Cases, R., Gonzalez-Ros, M., Ferragut, J.A.:** Verapamil reverses the ultrastructural alterations in the plasma membrane induced by drug resistance. *FEBS Lett* 314, 404-408, 1992
- Gianni, L.:** Anthracycline resistance: the problem and its current definition. *Semin Oncol* 24, S10-11-S10-17, 1997
- Gieseler, F., Biersack, H., Brieden, T., Manderscheid, J., Nüssler, V.:** Cytotoxicity of anthracyclines: correlation with cellular uptake, intracellular distribution and DNA binding. *Ann Hematol* 69: 13-17, 1994
- Gieseler, F., Pfeifer, W., Briden, Th., Clark, M., Wilms, K.:** Idarubicin: intracellular mechanisms of action. *Ann Hematol* 70, 99, 1995a
- Gieseler, F., Pfeifer, W., Valsamas, S., Kunze, J., Clark, M.:** Intracellular effects of anthracyclines. Personal Communication, 1995b
- Gillies, H.C., Herriott, D., Liang, R., Ohashi, K., Rogers, H.J., Harper, P.G.:** Pharmacokinetics of idarubicin (4-demethoxydaunorubicin; IMI-30; NSC 256439) following intravenous and oral administration in patients with advanced cancer. *Br J Clin Pharmacol* 23, 303-310, 1987
- Gillis, A.N., Yee, K.G., Kates, R.E.:** Binding of antiarrhythmic drugs to purified human α_1 -acid glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 34, 4279-4282, 1985
- Goebel, M.:** Oral idarubicin - an anthracycline derivative with unique properties. *Ann Hematol* 66, 33-43, 1992

Gottesman, M.M., Pastan, I., Ambudkar, S.V.: P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin in Genet & Dev* 6, 610-617, 1996

Gottesman, M.M., Pastan, I.: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 62, 385-427, 1993

Gross, A.S., Heuer, B., Eichelbaum, M.: Stereoselective protein binding of verapamil enantiomers. *Biochem Pharmacol* 37, 4623-4627, 1988

Guerci, A., Merlin, J.L., Missoum, N., Feldmann, L., Marchal, S., Witz, F., Rose, C., Guerci, O.: Predictive value for treatment outcome in acute myeloid leukemia of cellular daunorubicin accumulation and P-glycoprotein expression simultaneously determined by flow cytometry. *Blood* 85, 2147-2153, 1995

Hait, W.N., Lazo, J.S.: Calmodulin-a potential target for cancer. Chemotherapeutic agents. *J Clin Oncol* 4, 994-1012, 1986

Häußermann, K., Benz, B., Gekeler, V., Schumacher, K., Eichelbaum, M.: Effects of verapamil enantiomers and major metabolites on the cytotoxicity of vincristine and daunomycin in human lymphoma cell lines. *Eur J Clin Pharmacol* 40, 53-59, 1991

Hegewisch-Becker, S., Hossfeld, D.K.: The MDR phenotype in hematologic malignancies: prognostic relevance and future perspectives. *Ann Hematol* 72, 105-117, 1996

Hegewisch-Becker, S.: MDR1 reversal: criteria for clinical trials designed to overcome the multidrug resistance phenotype. *Leukemia* 10, 32-38, 1996

Hervé, F., Urien, S., Albengres, E., Duché, J.-C., Tillement, J.-P.: Drug binding in plasma. A summary of recent trends in the study of drug and hormone binding. *Clin Pharmacokinet* 26, 44-58, 1994

Higgins, C.F., Gottesman, M.M.: Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 17, 18-21, 1992

Higgins, C.F.: To flip or not to flip? *Curr Biol* 4, 259-269, 1994

Hindenburg, A.A., Baker, M.A., Gleyzer, E., Stewart, V.J., Case, N., Taub, R.N.: Effect of verapamil and other agents on the distribution of anthracyclines and on reversal of drug resistance. *Cancer Res* 47, 1421-1425, 1987

Hochster, H.S., Green, M.D., Liebes, L., Speyer, J.L., Wernz, J.C., Blum, R.H., Muggia, F.: Oral 4-demethoxydaunorubicin (idarubicin) in bronchogenic lung cancer: phase II trial. *Inves New Drugs* 4, 275-278, 1986

Hollingshead, L.M., Faulds, D.: Idarubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the chemotherapy of cancer. *Drugs* 42, 690-719, 1991

Holmes, J., Jacobs, A., Cartner, G., Janowska-Wieczorek, A., Padua, R.A.: Multidrug resistance in haematopoietic cell lines, myelodysplastic syndromes and acute myeloblastic leukemia. *Br J Haematol* 72, 40, 1989

Hu, X.F., Slater, A., Rischin, D., Kantharidis, P., Parkin, J.D., Zalberg, J.: Induction of MDR1 gene expression by anthracycline analogues in a human drug resistant leukaemia cell line. *Br J Cancer* 79, 831-837, 1999

Isonishi, S., Kirmani, S., Kim, S., Plaxe, S.C., Braly, P.S., McClay, E.F., Howell, S.B.: Phase I and pharmacokinetic trial of intraperitoneal etoposide in combination with the multidrug-resistance-modulating agent dipyrindamole. *J Natl Cancer Inst* 83, 621-626, 1991

- Jacquillat, C., Boiron, M., Weil, M., Tanzer, J., Najean, Y., Bernard, J.:** Rubidomycin: a new agent active in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2, 27-28, 1966
- Kavallaris, M.:** The role of multidrug resistance-associated protein (MRP) expression in multidrug resistance. *Anticancer Drugs* 8, 17-25, 1997
- Keese, H.:** Untersuchungen zur Multidrug Resistenz an Leukämiezellen von de novo AML-Patienten und der HL-60 und HL-60-Vinc Zelllinie, Dissertation, Frankfurt am Main, 1995
- Kiwit, J.C.W., Hertel, A., Matuschek, A.E.:** Reversal of chemoresistance in malignant gliomas by calcium antagonists: correlation with the expression of multidrug-resistant p-glycoprotein. *J Neurosurg* 81, 587-594, 1994
- Klimecki, W.T., Futscher, B.W., Groogan, T.M., Dalton, W.S.:** P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood* 83, 2451-2458, 1994
- Kremer, J., Wilting, J., Janssen, L.:** Review: Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol* 40, 1-47, 1988
- Kurz, H., Trunk, H., Weitz, B.:** Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. Equilibrium dialysis, ultrafiltration, ultracentrifugation, gel filtration. *Arzneimittelforschung* 27, 1373-80, 1977
- Kuwazuru, Y., Yoshimura, A., Hanada, S., Utsunomiya, A., Makino, T., Ishibashi, K., Kodama, M., Iwahashi, M., Arima, T., Akiyama, S.I.:** Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in acute leukemia cells and correlation to clinical drug resistance. *Cancer* 66, 868, 1990
- Lee, W.I., Yoon, W.H., Park, J.H., Lee, J.W., Shim, C.K., Lee, M.G.:** Factors influencing the protein binding of YH-439 using an equilibrium dialysis technique. A new hepatoprotective agent. *Biopharm Drug Dispos* 16, 775-789, 1995
- Lehnert, M., Emerson, S., Dalton, W.S., Salmon, S.E.:** Reversal of mdr1: how to evaluate clinical usefulness of chemosensitizers *in vitro*. In: Kaspers, G.J.L., Pieters, R., Twentymann, P.R., Weisenthal, L.M., Veerman, A.J.P. (ed): Drug resistance in leukemia and lymphoma. The clinical value of laboratory studies. Harwood academic publishers, Switzerland, 183-188, 1993
- Lehnert, M., Mross, K., Schueller, J., Thuerlimann, B., Kroeger, N., Kupper, H.:** Phase II trial of dexverapamil and epirubicin in patients with non-responsive metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 77, 1155-1163, 1998
- Linder, A., Berchtold, W.:** Statistische Methoden, Birkhäuser, 1982
- Lindl, T., Bauer, J.:** Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen. 3. Überarbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart, Jena, New York: Gustav Fischer Verlag, 1994
- Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipurski, S.L., Matsudeira, P., Darnell, J., Übersetzung von Träger, L.:** Molekulare Zellbiologie. Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York, 1996
- Maniez-Devos, D.M., Baurain, R., Trouet, A., Lesne, M.:** Doxorubicin pharmacokinetics in the rabbit. *J Pharmacol* 16, 159-169, 1985
- Marie, J.P., Bastie, J.N., Coloma, F., Faussat-Suberville, A.M., Delmer, A., Rio, B., Delmas-Massalet, B., Leroux, G., Casassus, P., Baumelou, E.:** Cyclosporin A as a modifier agent in the salvage treatment of acute leukemia (AL). *Leukemia* 7, 821-824, 1993

- Marie, J.P., Zittoun, R., Sikic, R.I.:** Multidrug resistance (mdr 1) gene expression in adult acute leukemias: correlation with treatment outcome and *in vitro* drug sensitivity. *Blood* 78, 586-592, 1991
- Marquardt, D., McCrone, S., Center, M.S.:** Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: Detection of resistance associated proteins with antibodies against synthetic peptides that correspond to the deduced sequence of P-glycoprotein. *Cancer Research* 50, 1426-1430, 1990
- Mason, M.J., Garcia-Rodriguez, C., Grinstein, S.:** Coupling between intracellular Ca²⁺ stores and the Ca²⁺ permeability of the plasma membrane. Comparison of the effects of thapsigargin, 2,5-di-(tert-butyl)-1,4-hydroquinone, and cyclopiazonic acid in rat thymic lymphocytes. *J Biol Chem* 266, 20856-20862, 1991
- McGowan, F.X., Reiter, M.J., Pritchett, E.L.C., Shand, D.G.:** Verapamil plasma binding: relationship to α_1 -acid glycoprotein and drug efficacy. *Clin Pharmacol Ther* 33, 485-490, 1983
- McGrath, T., Center, M.S.:** Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells: Evidence that a surface membrane protein distinct from P-glycoprotein contributes to reduced cellular accumulation of drug. *Cancer Res* 48, 3959-3963, 1988
- McGrath, T., Latoud, C., Arnold, S.T., Safa, A.R., Felsted, R.L., Center, M.S.:** Mechanisms of multidrug resistance in HL60 cells. *Biochem Pharmacol* 38, 3611-3619, 1989
- Michieli, M., Damiani, D., Michelutti, A., Melli, C., Russo, D., Fanin, R., Baccarani, M.:** p170-dependent multidrug resistance. Restoring full sensitivity to idarubicin with verapamil and cyclosporin A derivatives. *Haematologica* 79, 119-126, 1994
- Michieli, M., Michelutti, A., Pipan, C., Raspadori, D., Lauria, F., Baccarani, M.:** A comparative analysis of sensitivity of multidrug resistant (MDR) and non-MDR cells to different anthracycline derivatives. *Leuk Lymphoma* 9, 255-264, 1993
- Miller, T.P., Grogan, T.M., Dalton, W.S., Spier, C.M., Scheper, R.J., Salmon, S.E.:** P-glycoprotein expression in malignant lymphomas and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high dose verapamil. *J Clin Oncol* 9, 17-24, 1991
- Minderman, H., Linsen, P., Van der Lely, N., Wessels, J., Boezeman, J., De Witte, T., Haanen, C.:** Toxicity of idarubicin and doxorubicin towards normal and leukemic human bone marrow progenitors in relation to their proliferation state. *Leukemia* 8, 382-387, 1994
- Muindi, J., Young, C.:** *In vitro* interactions of anthracyclines with human low-density lipoproteins. *Proc Am Ass Clin Res*, Washington DC 31, abstract 1049, 1992
- Mülder, H.S., Dekker, H., Pinede, H.M., Lankelma, J.:** The P-glycoprotein-mediated relative decrease in cytosolic free drug concentration is similar for several anthracyclines with varying lipophilicity. *Biochem Pharmacol* 50, 967-974, 1995
- Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N.H., de Vries, E.G., Jansen, P.L.:** Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 13033-13037, 1994
- Müller, M.R., Lennartz, K., Boogen, C., Nowrousian, M.R., Rajewsky, M.F., Seeber, S.:** Cytotoxicity of adriamycin, idarubicin, and vincristine in acute myeloid leukemia: chemosensitization by verapamil in relation to P-glycoprotein expression. *Ann Hematol* 65, 206-212, 1992

- Mutschler, E.:** Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 6. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1991
- Nielsen, D., Maare, C., Skovsgaard, T.:** Cellular resistance to anthracyclines. *Gen Pharmac* 27, 251-255, 1996
- Nooter, K., Stoter, G.:** Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Path Res Pract* 192, 768-780, 1996
- Nüssler, V., Pelka-Fleischer, R., Zwierzina, H., Nerl, C., Beckert, B., Gullis, E., Gieseler, F., Bock, S., Bartl, R., Petrides, P.E., Wilmanns, W.:** Clinical importance of P-glycoprotein-related resistance in leukemia and myelodysplastic syndromes-first experience with their reversal. *Ann Hematol* 69, 25-29, 1994.
- Ozols, R.F., Cunnion, R.E., Klecker, R.W., Hamilton, T.C., Ostchega, Y., Parrillo, J.E., Young, R.C.:** Verapamil and adriamycin in the treatment of drug resistant ovarian cancer patients. *J Clin Oncol* 5, 641-647, 1987
- Pacifi, G.M., Viani, A.:** Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. Pharmacokinetic consequences. *Clin Pharmacokinet* 23, 449-489, 1992
- Pacilio, C., Florio, S., Pagnini, U., Crispino, A., Claudio, P.P., Pacilio, G., Pagnini, G.:** Modification of membrane fluidity and depolarization by some anthracyclines in different cell lines. *Anticancer Res* 18, 4027-4034, 1998
- Pannutti, F., Camaggi, C.M., Strocchi, E., Comparsi, R., Angelelli, B., Pacciarini, MA.:** Low dose oral administration of 4-demethoxy-daunorubicin (idarubicin) in advanced cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 16, 295-299, 1986
- Pastan, I., Gottesman, M.M.:** Multidrug resistance. *Ann Rev Med* 42, 277-286, 1991
- Pereira, E., Teodor, E., Dei, S., Gualtieri, F., Garnier-Suillerot, A.:** Reversal of multidrug resistance by verapamil analogues. *Biochem Pharmacol* 50, 451-457, 1995
- Petrini, M., Di Simone, D., Favati, A., Mattii, L., Valentini, P., Grassi, B.:** GST-pi and P-170 co-expression in multiple myeloma. *Br J Haematol* 90, 393-397, 1995
- Petrini, M., Mattii, L., Valentini, P., Sabbatini, A.R., Grassi, B., Grandi, M.:** Idarubicin is active on MDR cells: evaluation of DNA synthesis inhibition on P388 cell lines. *Ann Hematol* 67, 227-230, 1993
- Pirker, R., Keilhauer, G., Raschack, M., Lechner, C., Ludwig, H.:** Reversal of multi-drug resistance in human KB cell lines by structural analogs of verapamil. *Int J Cancer* 45, 916-919, 1990
- Platel, D., Pouna, P., Bonoron-Adele, S., Robert, J.:** Comparative cardiotoxicity of idarubicin and doxorubicin using the isolated perfused rat heart model. *Anticancer Drugs* 10, 671-676, 1999
- Plumb, J.A., Milroy, R., Kaye, S.B.:** The activity of verapamil as a resistance modifier *in vitro* in drug resistant human tumor cell lines is not stereospecific. *Biochem Pharmacol* 39, 787-792, 1990
- Plumbridge, T.W., Brown, J.R.:** Studies on the mode of interaction of 4-epi-adriamycin and 4-demethoxy-daunomycin with DNA. *Biochem Pharmacol* 27, 1881-1882, 1978
- Pommier, Y.:** DNA topoisomerase I and II in cancer chemotherapy: update and perspective. *Cancer Chemother Pharmacol* 32, 103-108, 1993

- Presant, C.A., Kennedy, P.S., Wiseman, C., Gala, K., Bouzaglou, A., Wyres, M., Naessig, V.:** Verapamil reversal of clinical doxorubicin resistance in human cancer. A Wilshire oncology medical group pilot phase I-II study. *Am J Clin Oncol* 9, 355-357, 1986
- Prozialeck, W.C.:** Interaction of quaternary phenothiazine salts with calmodulin. *J Pharmacol Exp Ther* 231, 473-479, 1984
- Ramachandran, C., Melnick, S.J.:** Multidrug resistance in human tumors - molecular diagnosis and clinical significance. *Mol Diagn* 4, 81-94, 1999
- Ramu, A., Glaubiger, D., Magrath, I.T., Joshi, A.:** Plasma membrane lipid structural order in doxorubicin-sensitive and -resistant P388 cells. *Cancer Res* 43, 5533-5537, 1983
- Reid, J.M., Pendergrass, T.W., Krailo, M.D., Denman Hammond, G., Ames, M.M.:** Plasma pharmacokinetics and cerebrospinal fluid concentrations of idarubicin and idarubicinol in pediatric leukemia patients: a childrens cancer study group report. *Cancer Res* 50, 6525-6528, October 15, 1990
- Reizenstein, P.:** Can verapamil induce second response in patients refractory to vincristine? *Anticancer Res* 10, 955-958, 1990
- Ringborg, U., Platz, A.:** Chemotherapy resistance mechanisms. *Acta Oncol* 35, 76-80, 1996
- Rivory, L.P., Pond, S.M., Winzor, D.J.:** The influence of pH on the interaction of lipophilic anthracyclines with bovine serum albumin. Quantitative characterization by measurement of fluorescence quenching. *Biochem Pharmacol* 44, 2347-2355, 1992
- Robert, J., Rigal-Huguet, F., Huet, S., Pris, J., Hurteloup, P.:** Pharmacokinetics of idarubicin after oral administration in elderly leukemic patients. *Leukemia* 4, 227-229, 1990
- Robert, J.:** Clinical pharmacokinetics of idarubicin. *Clin Pharmacokinet* 24, 275-288, 1993
- Robert, J.:** Multidrug resistance in oncology: diagnostic and therapeutic approaches. *Eur J Clin Invest* 29, 536-545, 1999
- Roepe, P.D., Wei, L.Y., Cruz, J., Carlson, D.:** Lower electrical membrane potential and altered pH homeostasis in multidrug-resistant (MDR) cells: Further characterization of a series of MDR cell lines expressing different levels of P-gp. *Biochem* 32, 11042-11056, 1993
- Roovers, D.J., van Vliet, M., Bloem, A.C., Lokhorst, H.M.:** Idarubicin overcomes P-glycoprotein-related multidrug resistance: comparison with doxorubicin and daunorubicin in human multiple myeloma cell lines. *Leuk Res* 23, 539-548, 1999
- Rose, K.M.:** DNA topoisomerases as targets for chemotherapy. *FASEB J* 2, 2474-2478, 1988
- Ross, D.D., Doyle, L.A., Yang, W., Tong, Y., Cornblatt, B.:** Susceptibility of idarubicin, daunorubicin, and their C-13 alcohol metabolites to transport-mediated multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 50, 1673-1683, 1995
- Sachs, L.:** *Angewandte Statistik*, Springer, 1992
- Safa, A.R., Glover, C.J., Sewel, J.L., Meyers M.B., Biedler, J.L., Felsted, R.L.:** Identification of the multidrug-resistance related membrane glycoprotein as an acceptor for calcium channel blockers. *J Biol Chem* 262, 7884-7888, 1987
- Scheithauer, W., Kornek, G., Kastner, J., Raderer, M., Locker, G., Depisch, D., Pidlich, J., Tetzner, C.:** Phase II study of D-verapamil and doxorubicin in patients with metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 29, 2337-2338, 1993
- Schneider, J., Bak, M., Efferth, T., Kaufmann, M., Mattern, J., Volm, M.:** P-glycoprotein expression in treated and untreated human breast cancer. *Br J Cancer* 60, 815-818, 1989

- Schwartz, J.B., Capili, H., Wainer, I.W.:** Verapamil stereoisomers during racemic verapamil administration: Effects of aging and comparisons to administration of individual stereoisomers. *Clin Pharmacol Ther* 56, 368-376, 1994
- Sehested, M., Skovsgaard, T., Van Deurs, B., Winther-Nielsen, H.:** Increased plasma membrane traffic in daunorubicin resistant P388 leukaemic cells. Effect of daunorubicin and verapamil. *Br J Cancer* 56, 747-751, 1987
- Shapiro, A.B., Fox, K., Lee, P., Yang, Y.D., Ling, V.:** Functional intracellular P-glycoprotein. *Int J Cancer* 76, 857-864, 1998
- Sikic, B.I., Fisher, G.A., Lun, B.L., Halsey, J., Beketic-Oreskovic, L., Chen, G.:** Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein. *Cancer Chemother Pharmacol* 40, 13-19, 1997
- Sikic, B.I.:** Modulation of multidrug resistance: at the threshold. *J Clin Oncol* 11, 1629-1635, 1993
- Smith, C.D., Zilfou, J.T., Zhang, X., Hudes, G.R., Tew, K.D.:** Modulation of P-glycoprotein activity by estramustine is limited by binding to plasma proteins. *Cancer* 75(10), 2597-2604, 1995
- Smith, D.B., Margison, J.M., Lucas, S.B., Wilkinson, P.M., Howell, A.:** Clinical pharmacology of oral and intravenous 4-demethoxydaunorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 19, 138-142, 1987
- Solary, E., Quiquandon, I., Moreau, P., Witz, B., Casanovas, R.O., Genne, P., Cahm, J.Y., Sadoun, A., Pignon, B., Berthou, C., Audhuy, B., Colombat, P., Harousseau, J.L.:** Phase III multicentric randomized study of quinine as a potential MDR reversing agent in acute leukemias. *Anticancer Drugs* 5, 46, 1994
- Sonneveld, P., Durie, B.G.M., Lokhorst, H.M., Marie, J.P., Solbu, G., Suci, S., Zittoun, R., Löwenberg, B., Nooter, K.:** Modulation of multidrug-resistant multiple myeloma by cyclosporin. *Lancet* 340, 255-259, 1992
- Speth, P.A.J., Minderman, H., Haanen, C.:** Idarubicin vs daunorubicin: preclinical and clinical studies. *Semin Oncol* 16, 2-9, 1989
- Speth, P.A.J., van der Loo, F.A.J., Linsen, P.C.M., Wessels, H.M., Haanen, C.:** Plasma and human leukemic cell pharmacokinetics of oral and intravenous 4-demethoxydaunomycin. *Clin Pharmacol Ther* 40, 643-649, 1986
- Spoelstra, E.C., Westerhoff, H.V., Pinedo, H.M., Dekker, H., Lankelma, J.:** The multidrug-resistance-reverser verapamil interferes with cellular P-glycoprotein-mediated pumping of daunorubicin as a non-competing substrate. *Eur J Biochem* 221, 363-373, 1994
- Stewart, D.J., Grewaal, D., Green, R.M., Verma, S., Maroun, J.A., Redmond, D., Robillard, L., Gupta, S.:** Bioavailability and pharmacology of oral idarubicin. *Cancer Chemother Pharmacol* 27, 308-314, 1991
- Storm, R.:** Wahrscheinlichkeitsrechnung, mathematische Statistik und statistische Qualitätskontrolle. 10. Auflage, Leipzig, Köln, Fachbuchverlag, 1995
- Stratmann, G., Harder, S., Hölzer, D., Hoffmann, W.K., Ottmann, O.G., Woodcock, B.G.:** Modulation of vincristine cytotoxicity by dexverapamil in sensitive and resistant HL-60 cell lines as a function of extracellular protein binding. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36, 103-106, 1998

- Tan, C., Tasaka, H.:** Clinical studies of daunomycin. Abstract 253, *Proc Am Ass Cancer Res* 6, 64, 1965
- Teodori, E., Dei, S., Quidu, P., Budriesi, R., Chiarini, A., Garnier-Suillerot, A., Gualtieri, F., Manetti, D., Romanelli, M.N., Scapecchi, S.:** Design, synthesis, and *in vitro* activity of catamphiphilic reverters of multidrug resistance: discovery of a selective, highly efficacious chemosensitizer with potency in the nanomolar range. *J Med Chem* 42, 1687-1697, 1999
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C.:** Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 7735-7738, 1987
- Tidefelt, U., Sundmann-Engberg, B., Paul, C.:** Intracellular uptake and cytotoxic effect *in vitro* of doxorubicin and epirubicin in human leukemic and normal hematopoietic cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 29, 7-12, 1991
- Toffoli, G., Simone, F., Corona, G., Raschack, M., Cappelletto, B., Gigante, M., Boiocchi, M.:** Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. *Biochem Pharmacol* 50, 1245-1255, 1995
- Trümper, L.H., Ho, A.D., Wulf, G., Hunstein, W.:** Addition of verapamil to overcome drug resistance in multiple myeloma: preliminary clinical observations in 10 patients. *J Clin Oncol* 7, 1578, 1989
- Tsuruo, T., Iida, H., Naganuma, K., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y.:** Promotion by verapamil of vincristine responsiveness in tumor cell lines inherently resistant to the drug. *Cancer Res* 43, 808-813, 1983
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y.:** Overcoming of vincristine resistance in P 388 leukemia *in vivo* and *in vitro* through enhanced cytotoxicity of vincristin and vinblastine by verapamil. *Cancer Res* 41, 1967-1972, 1981
- Twentyman, P.R.:** Transport proteins in drug resistance: biology and approaches to circumvention. *J Intern Med* 242, 133-137, 1997
- Ueda, K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, I., Roninson, I.B., Ling, V., Riordan, J.R.:** The *mdr1* gene, responsible for multidrug resistance, codes for P-gp. *Biochem Biophys Res Commun* 141, 956-969, 1986
- Van der Heyden, S., Gheuens, E., DeBruijn, E., Van-Oosterom, A., Maes, R.:** P-glycoprotein: clinical significance and methods of analysis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32, 221-264, 1995
- Veering, B.T., Burm, A.G.L., Souverijn, J.H.M., Serree, J.M.P., Spierdijk, J.:** The effect of age on serum concentrations of albumin and α_1 -acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol* 29, 201-206, 1990
- Volm, M., Efferth, T.:** Resistenzüberwindung bei Tumoren. *Dtsch Med Wochenschr* 119, 475-479, 1994
- Volm, M., Mattern, J., Efferth, T., Pommerenke, E.W.:** Expression of several resistance mechanisms in untreated human kidney and lung carcinomas. *Anticancer Res* 12, 1063, 1992
- Volm, M., Mattern, J., Efferth, T.:** P-glycoprotein als Marker für Multidrug-Resistenz in Tumoren und Normalgewebe. *Tumordiag Ther* 11, 189-197, 1990
- Wang, J.C.:** DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem* 65, 635-692, 1996
-

- Wathne, K.O., Carlander, B., Norum, K.R., Blomhoff, R.:** Uptake of retinyl ester in HL-60 cells via the low density lipoprotein receptor pathway. *Biochem J* 257, 239-244, 1989
- Wilson, W.H., Bates, S.E., Fojo, A., Bryant, G., Zhan, Z., Regis, J., Wittes, R.E., Jaffe, E.S., Steinberg, S.M., Herdt, J., Chabner, B.A.:** Controlled trial of dexverapamil, a modulator of multidrug resistance, in lymphomas refractory to EPOCH chemotherapy. *J Clin Oncol* 13, 1995-2004, 1995
- Woo, J., Chan, H.S., Or, K.H., Arumanayagam, M.:** Effect of age and disease on two drug binding proteins: albumin and α -1-acid glycoprotein. *Clin Biochem* 27, 289-292, 1994
- Woodcock, B.G., Abdel-Rahman, M., Harder, S., Wosch, F.:** Effect of D, L-verapamil, verapamil enantiomeres and verapamil metabolites on the binding of vincristine to alpha-1-acid glycoprotein. *Eur J Cancer* 29, 559-561, 1993a
- Woodcock, B.G., Abdel-Rahman, M.S., Harder, S., Ganser, A.:** Kumulation von Vincristin bei intakten Zellen und ihre Modulation durch Verapamil und alpha-1-Glycoprotein. *Klin Pharm akt* 4, 21, 1993b
- Woodcock, B.G., Keese, A., Harder, S., Ganser, A., Abdel-Rahman, M.S., Rietbrock, S.:** α -1-acid glycoprotein and multidrug resistance. In: Pieters, R., Kaspers, G.J.L., Veerman, A.J.P. (ed): Drug resistance in leukemia and lymphoma II. Harwood academic publishers, Switzerland, 435-442, 1997
- Yuen, A.R., Sikic, B.I.:** Multidrug resistance in lymphomas. *J Clin Oncol* 12, 2453-2459, 1994
- Yusa, K., Tsuruo, T.:** Reversal mechanism of multidrug resistance by verapamil: direct binding of verapamil outward across the plasma membrane of K562/ADM cells. *Cancer Res* 49, 5002-5006, 1989
- Zamora, J.M., Pearce, H.L., Beck, W.T.:** Physical-chemical properties shared by compounds that modulate multidrug resistance in human leukemic cells. *Mol Pharmacol* 33, 454-462, 1988
- Zhou, D.C., Marie, J.P., Suberville, A.M., Zittoun, R.:** Relevance of mdrl gene expression in acute myeloid leukemia and comparison of different diagnostic methods. *Leukemia* 6, 879-885, 1992
- Zini, R., Riant, P., Barre, J., Tillement, J.P.:** Disease-induced variations in plasma protein levels: implications for drug dosage regimens (part 1). *Clin Pharmacokinet* 19, 147-159, 1990

8. Anhang

Tab. 1: Studien mit Modulatoren der Multidrug-Resistenz *in vivo*

Quelle	Malignom	Zytostatika	Modulator	Ansprechrate (%)
Bates <i>et al.</i> 1995	Mammakarzinom	Adriamycin/Vinblastin	(+) Amiodaron	9/33 (27%)
Dalton <i>et al.</i> 1995	Multiples Myelom, refraktär	VAD	(-) Verapamil	25/61 (41%)
		VAD	(+) Verapamil	21/59 (36%)
Isonishi <i>et al.</i> 1991	Ovariakarzinom	VP-16	(+) Dipyridamol	1/16 (6%)
Lehnert <i>et al.</i> 1998	Mammakarzinom, refraktär	Epirubicin	(+) R-Verapamil	4/23 (17%)
Marie <i>et al.</i> 1993	Akute Leukämie	Mitoxantron + VP-16	(+) Cyclosporin A	6/16 (38%)
Miller <i>et al.</i> 1991	Lymphom	CVAD	(+) Verapamil	13/18 (72%)
Ozols <i>et al.</i> 1987	Ovariakarzinom	Adriamycin	(+) Verapamil	0/8 (0%)
Presant <i>et al.</i> 1986	Malignom, fortgeschritten	Adriamycin	(+) Verapamil	3/13 (23%)
Reizenstein 1990	CLL, Immunozytom, refraktär	Vincristin	(+) Verapamil	4/9 (44%)
Scheithauer <i>et al.</i> 1993	Kolorektales Karzinom	Doxorubicin	(+) R-Verapamil	1/15 (7%)
		ARA-C/Mitoxantron	(-) Chinin	26/54 (48%)
Solary <i>et al.</i> 1994	AML, Rezidiv, refraktär	ARA-C/Mitoxantron	(+) Chinin	29/52 (56%)
Sonneveld <i>et al.</i> 1992	Multiples Myelom	VAD	(+) Cyclosporin A	10/21(48%)
Trümper <i>et al.</i> 1989	Multiples Myelom, refraktär	VAD	(+) Verapamil	1/10 (10%)
Wilson <i>et al.</i> 1995	Lymphom, Rezidiv	EPOCH	(+) R-Verapamil	10/41(24%)
VAD Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason		CVAD (+) Cyclophosphamid		
EPOCH Etoposid, Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid, Prednison		ARA-C Cytarabin		
AML Akute myeloische Leukämie ALL Akute lymphatische Leukämie		VP-16 Etoposid		
(+) mit (-) ohne				

Tab. 2: Spektren für die Medien der Gleichgewichtsdialyse und Zellstudien

Exzitationswellenlänge $\lambda=480$ nm; Inkubationskonzentration Idarubicin 1000 ng/ml

Emissionswellenlänge (nm)	560	562	564	566	568	570	572	574	576	578	580	582	584	586	588	590
<i>Gleichgewichtsdialyse</i>																
$E_{\text{IDA/PBS}}$	0.487	0.485	0.485	0.487	0.488	0.489	0.488	0.487	0.485	0.482	0.479	0.478	0.476	0.476	0.472	0.471
E_{PBS}	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
$E_{\text{korrigiert}}$	0.482	0.48	0.48	0.482	0.483	0.484	0.483	0.482	0.48	0.477	0.474	0.473	0.471	0.471	0.467	0.466
$E_{\text{IDA/15%FCS/PBS}}$	0.426	0.425	0.423	0.422	0.422	0.422	0.42	0.419	0.416	0.415	0.411	0.408	0.406	0.405	0.408	0.4
$E_{\text{15%FCS/PBS}}$	0.045	0.043	0.042	0.042	0.04	0.038	0.039	0.038	0.039	0.036	0.035	0.033	0.034	0.032	0.03	0.029
$E_{\text{korrigiert}}$	0.381	0.382	0.381	0.38	0.382	0.384	0.381	0.381	0.377	0.379	0.376	0.375	0.372	0.373	0.378	0.371
$E_{\text{IDA/15% FCS/PBS/R-VRP/AGP}}$	0.432	0.435	0.434	0.433	0.433	0.432	0.43	0.429	0.428	0.426	0.425	0.419	0.414	0.408	0.403	0.402
$E_{\text{15% FCS/PBS/R-VRP/AGP}}$	0.054	0.054	0.052	0.053	0.052	0.05	0.05	0.048	0.047	0.046	0.046	0.044	0.043	0.04	0.038	0.037
$E_{\text{korrigiert}}$	0.378	0.381	0.382	0.38	0.381	0.382	0.38	0.381	0.381	0.38	0.379	0.375	0.371	0.368	0.365	0.365
$E_{\text{IDA/4g/dIHA/PBS}}$	0.522	0.512	0.504	0.497	0.49	0.48	0.47	0.452	0.452	0.429	0.417	0.404	0.396	0.377	0.368	0.349
$E_{\text{4 g/dl Humanalbumin/PBS}}$	0.36	0.352	0.342	0.333	0.324	0.312	0.304	0.296	0.286	0.281	0.271	0.26	0.252	0.245	0.236	0.223
$E_{\text{korrigiert}}$	0.162	0.16	0.162	0.164	0.166	0.168	0.166	0.156	0.166	0.148	0.146	0.144	0.144	0.132	0.132	0.126
$E_{\text{IDA/100% HS P3}}$	0.263	0.256	0.252	0.248	0.241	0.236	0.23	0.226	0.221	0.219	0.207	0.201	0.193	0.187	0.179	0.174
$E_{\text{100% HS P3}}$	0.193	0.185	0.179	0.174	0.166	0.159	0.153	0.15	0.145	0.14	0.142	0.138	0.131	0.125	0.122	0.117
$E_{\text{korrigiert}}$	0.07	0.071	0.073	0.074	0.075	0.077	0.077	0.076	0.076	0.079	0.065	0.063	0.062	0.062	0.057	0.057
$E_{\text{IDA/15%FCS/RPMI}}$	0.334	0.334	0.327	0.321	0.318	0.314	0.31	0.305	0.303	0.297	0.29	0.283	0.274	0.269	0.26	0.25
$E_{\text{15%FCS/RPMI}}$	0.192	0.188	0.181	0.177	0.17	0.165	0.16	0.153	0.15	0.145	0.141	0.136	0.131	0.127	0.122	0.118
$E_{\text{korrigiert}}$	0.142	0.146	0.146	0.144	0.148	0.149	0.15	0.152	0.153	0.152	0.149	0.147	0.143	0.142	0.138	0.132
<i>Zellstudien</i>																
$E_{\text{IDA/0.4N HCl/Isopropanol/H2O}}$	0.594	0.602	0.606	0.611	0.613	0.614	0.612	0.61	0.602	0.592	0.578	0.567	0.554	0.534	0.52	0.5
$E_{\text{0.4N HCl/Isopropanol/H2O}}$	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
$E_{\text{korrigiert}}$	0.589	0.597	0.601	0.606	0.608	0.609	0.607	0.605	0.597	0.87	0.573	0.562	0.549	0.529	0.515	0.495

Tab. 3: Bestimmung der Meßgenauigkeit der Idarubicin Extinktion mittels des relativen Variationskoeffizienten (V_r) in verschiedenen Medien

Idarubicin Konzentration 1000 ng/ml

Medium der	1. Messung E	2. Messung E	3. Messung E	4. Messung E	5. Messung E	V_r (%)
<i>Gleichgewichtsdialyse</i>						
15% FCS/PBS	0.422	0.421	0.422	0.422	0.421	0.052
4 g/dl HA/PBS	0.424	0.425	0.423	0.423	0.424	0.079
100% HS	0.235	0.234	0.234	0.233	0.233	0.143
100% PBS	0.476	0.476	0.486	0.475	0.476	0.385
<i>Zellstudien</i>						
0,4 N HCl/ Isopropanol/H ₂ O	0.601	0.599	0.6599	0.600	0.601	0.067

Tab. 4: Adsorptionsverluste an verschiedenen Inkubationsgefäßen

Idarubicin Konzentration 1000 ng/ml

Exzitation $\lambda=480$ nm, Emission $\lambda=570$ nm

Inkubationsgefäß	Medium	E	E_{Leerwert}	E_{korr}
Eppendorf-Cup	100% PBS	0.424	0.005	0.419
	15% FCS/PBS	0.462	0.036	0.426
Röhren Tubes	100% PBS	0.434	0.005	0.429
	15% FCS/PBS	0.454	0.036	0.418
Nunc Cryo Tubes	100% PBS	0.422	0.005	0.417
	15% FCS/PBS	0.446	0.036	0.410
Minis 2000	100% PBS	0.422	0.005	0.417
	15% FCS/PBS	0.458	0.036	0.422
Röhrchen, konischer Boden	100% PBS	0.405	0.005	0.400
	15% FCS/PBS	0.442	0.036	0.406

Tab. 5: Experimentelle Bestimmung der Dialysierzeit

Dialysiermedium PBS; Idarubicin Konzentration 1000 ng/ml

Extinktion	Zeit (Stunden)					
	0	1	2	3	4	5
Kompartiment A	1000	365	268	259	275	254
Kompartiment B	0	153	247	263	263	271

Tab. 6: Proteinbindung von Idarubicin an 15% FCS/PBS in An- und Abwesenheit von 10 µg/ml R-Verapamil und 2 mg/ml α₁-saurer Glykoprotein

Inkubationsmedium: Proteinkompartiment 15% FCS/PBS
Pufferkompartiment 100% PBS

Idarubicin ng/ml	Idarubicin* ng/ml	Bindung %	Adsorption %
15% FCS/PBS			
2500	1990	41	20
2500	1975	41	21
1000	747	43	25
1000	622	44	38
500	313	40	37
500	312	38	38
15% FCS/PBS (+) 10 µg/ml R-VRP			
2500	1991	34	20
2500	1960	39	22
1000	678	37	32
1000	580	37	42
500	258	35	48
500	254	36	49
15% FCS/PBS (+) 2 mg/ml AGP			
2500	1714	45	31
2500	1710	40	32
1000	688	45	31
1000	635	48	37
500	292	43	42
500	212	52	58
15% FCS/PBS (+) 2 mg/ml AGP (+) 10 µg/ml R-VRP			
2500	1957	42	22
2500	1782	37	29
1000	827	43	17
1000	662	38	34
500	271	42	46
500	267	32	47

*Idarubicin Ausgangskonzentration nach Abzug der Adsorption

Tab. 7: Proteinbindung von Idarubicin an 4 g/dl Humanalbumin/PBS in An- und Abwesenheit von 10 µg/ml R-Verapamil und 2 mg/ml α_1 -saures Glykoprotein

Inkubationsmedium: Proteinkompartiment 4 g/dl Humanalbumin/PBS
Pufferkompartiment 100% PBS

Idarubicin ng/ml	Idarubicin* ng/ml	Bindung %	Adsorption %
4 g/dl Humanalbumin/PBS			
2500	1805	88	28
2500	1707	83	32
1000	619	86	38
1000	508	86	49
500	n.b.	n.b.	n.b.
500	174	84	65
4 g/dl Humanalbumin/PBS (+) 10 µg/ml R-VRP			
2500	1818	84	27
2500	1758	84	30
1000	635	52	37
1000	602	89	40
500	344	81	31
500	192	86	62
4 g/dl Humanalbumin/PBS (+) 2 mg/ml AGP			
2500	2083	89	17
2500	1872	85	25
1000	594	90	41
1000	555	90	45
500	213	91	57
500	205	88	59
4 g/dl Humanalbumin/PBS (+) 2 mg/ml AGP (+) 10 µg/ml R-VRP			
2500	1987	87	21
2500	1969	87	21
1000	519	88	48
1000	481	88	52
500	207	91	59
500	204	84	59

*Idarubicin Ausgangskonzentration nach Abzug der Adsorption
n.b. nicht bestimmt

Tab. 8: Proteinbindung von Idarubicin an 100% Humanserum Proband 1-4 in An- und Abwesenheit von 10 µg/ml R-Verapamil und 2 mg/ml α₁-saures Glykoprotein

Inkubationsmedium: Proteinkompartiment 100% Humanserum
Pufferkompartiment 100% PBS

Idarubicin ng/ml	Idarubicin* ng/ml	Bindung %	Adsorption %
100% Humanserum Proband 1			
2500	2079	92	17
2500	1899	89	24
1000	869	91	13
1000	626	90	37
500	n.b.	n.b.	n.b.
500	424	84	15
100% Humanserum Proband 2			
2500	2242	92	10
2500	1922	90	23
1000	722	94	28
1000	669	91	33
500	n.b.	n.b.	n.b.
500	375	80	25
100% Humanserum Proband 3			
5000	4677	94	6
5000	4567	96	9
2500	2237	96	11
2500	2013	96	19
1000	853	95	15
1000	834	95	17
500	410	98	18
500	384	96	23
100% Humanserum Proband 3 (+) 10 µg/ml R-Verapamil			
5000	4368	94	13
5000	n.b.	n.b.	n.b.
2500	2433	95	3
2500	2142	95	14
1000	890	95	11
1000	775	95	23
500	367	97	27
500	317	95	37

*Idarubicin Ausgangskonzentration nach Abzug der Adsorption
n.b. nicht bestimmt

8. ANHANG

Idarubicin ng/ml	Idarubicin* ng/ml	Bindung %	Adsorption %
---------------------	----------------------	--------------	-----------------

100% Humanserum Proband 4

5000	4282	93	14
5000	4255	92	15
2500	1870	94	25
2500	1860	94	26
1000	682	94	32
1000	n.b.	n.b.	n.b.
500	370	93	26
500	340	92	32

100% Humanserum Proband 4 (+) 10 µg/ml R-VRP

5000	4165	93	17
5000	3935	93	21
2500	2006	85	20
2500	1960	93	22
1000	703	92	30
1000	626	92	37
500	274	88	45
500	256	86	49

100% Humanserum Proband 4 (+) 2 mg/ml AGP

5000	4245	94	15
5000	4059	94	19
2500	1978	95	21
2500	1747	95	30
1000	533	91	47
1000	309	94	38
500	n.b.	n.b.	n.b.
500	219	91	56

100% Humanserum Proband 4 (+) 2 mg/ml AGP (+) 10 µg/ml R-VRP

5000	4732	89	5
5000	4539	88	9
2500	2176	93	13
2500	2124	91	15
1000	889	93	11
1000	712	87	29
500	372	94	26
500	221	90	56

*Idarubicin Ausgangskonzentration nach Abzug der Adsorption
n.b. nicht bestimmt

8. ANHANG

Tab. 9: Idarubicin Akkumulation in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und dem Inkubationsmedium

Inkubationskonzentration Idarubicin 1000 ng/ml

Medium Zelllinie Zeit (min)	15% FCS/RPMI		100% PBS		100% HS	
	HL-60 Idarubicinaufnahme c (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme c (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme c (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme c (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme c (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme c (ng/10 ⁶ Zellen)
2	118	82	67	81	31	23
	120	85	57	69	18	26
5	119	121	84	80	28	26
	123	106	90	91	30	35
10	202	136	123	115	49	39
	184	133	139	117	61	45
15	171	136	148	128	81	44
	230	143	142	134	61	42
30	228	127	166	134	81	41
	203	151	191	133	77	47
45	205	167	211	157	90	53
	237	149	206	128	84	45
60	243	165	231	157	90	51
	238	168	212	160	81	62
120	246	198	204	171	90	72
	254	179	237	179	91	71
180	248	204	210	191	90	72
	255	203	232	179	100	63

Inkubationskonzentration Idarubicin 5000 ng/ml

2	306	361	330	256	89	80
	313	476	291	261	127	90
5	483	456	390	387	146	111
	523	420	396	351	137	123
10	698	505	476	564	219	150
	646	646	523	440	206	147
15	724	600	531	605	212	191
	657	538	610	590	236	184
30	868	600	847	610	286	203
	724	610	852	533	313	176
45	888	646	863	641	340	210
	821	621	935	677	324	194
60	1027	857	976	888	370	235
	1007	852	996	729	377	215
120	1141	832	1084	765	415	268
	1099	852	1012	893	385	271
180	1130	899	945	744	445	286
	1161	832	1094	960	416	280

Tab. 10: Idarubicin Akkumulation in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von verschiedenen Inkubationsmedien

Inkubationskonzentration Idarubicin 1000 ng/ml; Inkubationszeit 1h

Zelllinie	HL-60	HL-60-Vinc
Medium	Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	
100% PBS	183	174
	203	193
	203	173
100% RPMI	177	172
	160	170
	198	154
15% FCS/PBS	238	225
	249	197
	236	204
15% FCS/RPMI	234	205
	217	176
	212	187
15% HS/PBS	241	171
	213	158
	203	156
15% HS/RPMI	177	172
	187	142
	203	125
100% FCS	123	74
	105	58
	134	70
100% HS	98	42
	78	47
	74	41

Tab. 11: Idarubicin Akkumulation in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der Idarubicin Konzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Inkubationszeit 1h

Inkubationsmedium Zelllinie		15% FCS/RPMI		100% PBS		100% HS	
Idarubicin (ng/ml)	R-VRP (µg/ml)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)
50	0	11	8	6	n.b.	1	n.b.
		16	2	8	2	4	n.b.
	5	8	8	5	n.b.	5	2
		8	4	7	1	n.b.	2
	10	11	8	8	n.b.	2	n.b.
		14	5	7	1	6	n.b.
100	0	20	11	14	2	11	2
		29	17	17	7	12	n.b.
	5	24	14	16	8	19	n.b.
		23	14	8	5	8	2
	10	20	17	18	17	11	2
		23	14	16	2	17	2
250	0	55	26	24	8	28	10
		62	31	38	8	25	6
	5	62	46	29	8	19	18
		50	35	32	11	24	14
	10	56	48	18	12	23	20
		59	38	43	17	23	23
500	0	110	60	66	38	56	29
		109	59	71	36	44	26
	5	122	72	68	40	48	36
		104	77	n.b.	50	49	38
	10	113	76	68	53	48	41
		113	95	67	56	59	42
750	0	140	76	95	56	72	38
		160	84	91	61	70	36
	5	174	119	96	73	79	48
		146	104	88	76	74	44
	10	162	114	97	79	66	52
		152	120	90	82	78	54
1000	0	205	100	125	92	90	54
		212	107	122	89	88	37
	5	206	140	125	116	85	55
		200	148	126	86	89	58
	10	212	164	139	106	86	64
		212	144	110	103	91	70
2500	0	457	197	342	223	217	133
		463	252	317	221	228	119
	5	445	310	304	262	223	164
		460	312	349	252	226	156
	10	466	372	326	266	214	179
		456	336	337	272	224	202
5000	0	871	539	862	420	421	232
		1106	n.b.	830	499	473	226
	5	991	700	773	617	468	242
		989	660	922	583	455	251
	10	952	702	835	642	451	266
		1001	712	840	636	439	317

n.b. nicht bestimmt

8. ANHANG

Tab. 12: Idarubicin Akkumulation in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Inkubationskonzentration Idarubicin 1000 ng/ml; Inkubationszeit 1h

Medium Zelllinie Verapamil (ng/ml)	15% FCS/RPMI		100% PBS		100% HS	
	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)
0	204	103	127	82	45	32
	180	122	126	80	52	40
	176	54	118	91	40	30
0,5	189	113	121	97	48	35
	195	111	120	104	53	29
	193	100	124	95	51	n.b.
1	193	132	120	117	53	46
	195	132	125	119	44	40
	193	118	121	115	48	41
2,5	179	154	128	128	54	44
	187	150	124	131	50	46
	190	103	128	120	48	44
5	200	137	121	120	56	41
	178	137	118	125	47	50
	187	162	116	n.b.	52	48
7,5	200	151	126	122	65	44
	204	145	124	128	46	46
	179	147	n.b.	123	56	53
10	175	155	131	130	55	56
	181	158	121	130	46	53
	n.b.	n.b.	n.b.	129	53	52
15	179	175	143	125	52	57
	171	147	105	133	48	55
	199	n.b.	119	133	n.b.	61
20	205	175	120	137	47	44
	200	158	126	135	57	46
	187	152	119	133	56	n.b.
25	179	170	131	141	43	61
	188	165	132	145	43	54
	205	n.b.	119	128	59	58
50	214	184	129	n.b.	61	82
	192	186	115	129	51	64
	186	n.b.	n.b.	135	54	74
100	171	196	115	131	47	70
	201	158	137	135	44	64
	n.b.	170	137	124	44	72

n.b. nicht bestimmt

8. ANHANG

Tab. 13: Idarubicin Akkumulation in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der α_1 -sauren-Glykoprotein Konzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Inkubationskonzentration Idarubicin 1000 ng/ml; Inkubationszeit 1h

Medium Zelllinie		15% FCS/RPMI		100% PBS		100% HS	
R-VRP ($\mu\text{g/ml}$)	AGP (mg/ml)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/ 10^6 Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/ 10^6 Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/ 10^6 Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/ 10^6 Zellen)	HL-60 Idarubicinaufnahme (ng/ 10^6 Zellen)	HL-60-Vinc Idarubicinaufnahme (ng/ 10^6 Zellen)
0	0	242	136	184	91	76	43
		239	121	173	102	72	55
		210	129	177	116	78	53
5	0	219	182	173	154	77	83
		212	177	166	139	77	73
		250	195	179	151	75	78
10	0	226	185	173	162	66	83
		219	197	162	165	88	84
		245	191	183	175	75	75
0	2	197	120	117	110	58	58
		185	117	144	97	67	41
		205	118	124	90	62	40
5	2	218	118	123	101	64	58
		186	133	150	124	66	55
		199	124	124	119	59	52
10	2	229	133	121	134	66	57
		213	143	138	135	70	62
		191	130	131	114	63	65

Inkubationskonzentration mit Idarubicin 5000 ng/ml

0	0	1041	585	n.b.	594	287	223
		1148	693	769	623	265	180
		1067	671	710	590	304	190
5	0	1089	861	807	818	274	303
		1159	872	656	737	285	301
		1089	970	743	780	278	307
10	0	1148	981	802	807	281	330
		1100	861	682	834	300	315
		1052	991	769	813	289	356
0	2	954	606	667	503	261	183
		1030	677	688	428	268	205
		1013	623	661	472	264	186
5	2	1024	732	656	721	254	227
		991	710	677	671	289	243
		n.b.	682	671	688	277	250
10	2	1057	796	693	726	274	273
		954	726	682	769	277	206
		1078	758	667	774	n.b.	257

n.b. nicht bestimmt

Tab. 14: Idarubicin Retention in den Zelllinien HL-60 und HL-60-Vinc in Abhängigkeit von der Retentionszeit, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Inkubationskonzentration in der ersten Stunde Idarubicin 1000 ng/ml

Medium	15% FCS/RPMI		100% PBS		100% HS	
Zelllinie	HL-60	HL-60-Vinc	HL-60	HL-60-Vinc	HL-60	HL-60-Vinc
Zeit (h)	Idarubicinretention (ng/10 ⁶ Zellen)		Idarubicinretention (ng/10 ⁶ Zellen)		Idarubicinretention (ng/10 ⁶ Zellen)	

R-Verapamil Konzentration
in der Akkumulationsphase c=0 µg/ml, in der Retentionsphase c=0 µg/ml

0	226	153	184	114	120	70
	253	132	168	108	110	60
1	183	106	142	84	47	20
	198	101	152	86	47	21
2	180	99	152	83	45	17
	185	98	135	78	43	19
3	173	96	144	75	45	15
	185	76	140	69	43	15
4	169	93	141	59	40	13
	164	80	114	62	45	10
5	168	80	132	52	38	14
	150	60	114	53	46	13

R-Verapamil Konzentration
in der Akkumulationsphase c=0 µg/ml in der Retentionsphase c=10 µg/ml

0	226	153	184	114	120	70
	253	132	168	108	110	60
1	184	116	149	87	47	24
	180	113	138	99	42	37
2	187	109	140	69	53	21
	175	94	140	79	34	27
3	172	103	132	71	41	23
	183	89	128	68	41	24
4	173	99	140	56	44	17
	n.b.	82	121	60	42	20
5	178	89	130	61	43	21
	166	81	112	59	42	15

n.b. nicht bestimmt

8. ANHANG

Medium Zelllinie Zeit (h)	15% FCS/RPMI		100% PBS		100% HS	
	HL-60	HL-60-Vinc	HL-60	HL-60-Vinc	HL-60	HL-60-Vinc

R-Verapamil Konzentration
in der Akkumulationsphase c=10 µg/ml in der Retentionsphase c=0 µg/ml

0	238	244	176	171	110	96
	224	208	187	183	109	100
1	182	167	141	124	46	80
	190	137	144	117	52	65
2	158	142	139	101	49	46
	198	125	137	97	49	53
3	152	115	133	81	48	40
	178	115	138	74	46	33
4	170	119	126	77	47	20
	148	117	117	60	41	28
5	147	111	117	71	40	24
	159	103	120	52	37	26

R-Verapamil Konzentration
in der Akkumulationsphase c=10 µg/ml in der Retentionsphase c=10 µg/ml

0	238	244	176	171	110	96
	224	208	187	183	109	100
1	186	181	148	149	66	n.b.
	n.b.	180	141	121	67	81
2	188	160	139	132	60	68
	171	160	139	119	65	80
3	177	147	135	115	58	38
	n.b.	149	138	118	56	64
4	182	128	129	111	45	49
	173	159	122	85	50	50
5	171	140	120	104	43	50
	141	145	122	90	43	46

n.b. nicht bestimmt

Tab. 15: Idarubicin Akkumulation in den Lymphozyten des Probanden 5 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, der Idarubicin Konzentration und dem Inkubationsmedium

Lymphozyten Proband 5

Medium	1000 ng/ml			5000 ng/ml		
	15%FCS/RPMI Inkubationskonzentration	100% PBS Inkubationskonzentration	100% HS Inkubationskonzentration	15%FCS/RPMI Inkubationskonzentration	100% PBS Inkubationskonzentration	100% HS Inkubationskonzentration
Zeit (min)	Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)			Idarubicinaufnahme (ng/10 ⁶ Zellen)		
15	250	136	63	946	415	234
	223	126	83	833	402	234
30	263	141	94	956	442	274
	249	157	106	1018	532	300
45	268	160	87	961	504	322
	256	196	92	936	403	285
60	292	199	103	1213	613	346
	262	206	106	1059	644	357
120	251	138	75	1013	551	311
	249	114	84	910	567	301
180	243	82	86	731	374	307
	212	59	93	920	197	324

Tab. 16: Idarubicin Akkumulation in den Lymphozyten der Probanden 1, 2, 3 und 6 in Abhängigkeit von der α_1 -sauren-Glykoprotein Konzentration, der R-Verapamil Konzentration und dem Inkubationsmedium

Proband 1, 2, 3, 6: Lymphozyten; Inkubationskonzentration Idarubicin 1000 ng/ml

Inkubationsmedium 15% FCS/ RPMI

Probanden R-VRP ($\mu\text{g/ml}$)	AGP (mg/ml)	Proband 1	Proband 2	Proband 3	Proband 6
		Idarubicinaufnahme ($\text{ng}/10^6$ Zellen)			
0	0	277	243	282	254
		241	197	253	245
		294	208	248	278
5	0	236	240	243	276
		236	206	256	282
		301	203	279	272
10	0	265	215	246	274
		290	239	264	289
		267	216	268	262
0	2	167	224	256	240
		192	213	229	236
		217	182	244	256
5	2	217	219	248	263
		184	211	264	245
		198	186	235	270
10	2	208	236	254	267
		227	221	246	248
		212	150	258	256

Inkubationsmedium 100% Humanserum von den jeweiligen Probanden

0	0	105	79	64	96
		105	74	73	95
		108	96	72	93
5	0	88	97	66	95
		110	67	67	109
		100	93	75	102
10	0	96	76	76	101
		121	84	67	102
		91	69	65	94
0	2	81	74	67	88
		87	78	67	94
		79	51	66	90
5	2	90	72	69	97
		95	62	71	91
		75	57	62	93
10	2	87	82	64	97
		78	73	67	88
		84	60	67	89

Tab. 17: Zusammensetzung der Kulturmedien

Medium	Gesamtproteine g/dl	Albumin g/dl	Quelle
15% FCS/PBS	0.6	0.3	Lindl & Baur 1994
4 g/dl Humanalbumin	-	4	Sigma, USA
100% Humanserum	5.5-8.0	3.5-5.5	Fauci <i>et al.</i> 1998
RPMI	-	-	GibcoBRL, Schottland

Fetales Kälberserum (Durchschnitt; Lindl & Bauer 1994)

Endotoxin	0.356 ng/ml	Glutamat Oxalat- Transaminase	130 mU/ml
pH	7.40		340
Hämoglobin	11.3 mg/dl	Selen	0.026 µg/ml
Glucose	125 mg/100 ml	Cortison	0.05 µg/100 ml
Natrium	137 meq/l	Insulin	10 µU/ml
Kalium	11.2 meq/l	Parathyroid	1718 pg/ml
Chlorid	103 meq/l	Progesteron	8 ng/100 ml
Stickstoff	16 mg/100 ml	T3	119 ng/100 ml
Gesamtprotein	3.8 g/100 ml	T4	12.1 ng/100 ml
Albumin	2.3 g/100 ml	Testosteron	40 ng/100 ml
Calcium	13.6 mg/100ml	Prostaglandin E	5.91 ng/ml
Anorg. Phosphor	9.8 mg/100 ml	Prostaglandin F	12.33 ng/ml
Cholesterin	31 mg/100 ml	TSH	1.22 ng/ml
Harnsäure	2.9 mg/100 ml	FSH	9.5 ng/ml
Kreatinin	3.1 mg/100 ml	Wachstumshormon	39.0 ng/ml
Gesamt-Bilirubin	0.4 mg/100 ml	Prolaktin	17.6 ng/ml
Direktes Bilirubin	0.2 mg/100 ml	LTH	0.79 ng/ml
Alkalische Phosphatase	255 mU/ml	Vitamin A	9 µg/100 ml
Lactatdehydrogenase	864 mU/ml	Vitamin E	0.11 mg/100ml

PBS

NaCl	8 g/l	KH ₂ PO ₄	0.2 g/l
KCl	0.2 g/l	pH	7.2
Na ₂ HPO ₄	1.15 g/l		

RPMI-1640 Medium

Komponenten	g/l	Vitamine	
Anorganische Salze		D-Biotin	0.0002
Calcium Nitrate.4H ₂ O	0.1	Choline Chloride	0.003
Magnesium Sulfate (anhydrous)	0.04884	Folic Acid	0.001
Potassium Chloride	0.4	Myo-Inositol	0.035
Sodium Bicarbonate	-	Niacinamide	0.001
Sodium Chloride	6.0	p-Amino Benzoic Acid	0.001
Sodium Phosphate Dibasic	0.8	D-Pantothenic Acid	0.00025
		Pyridoxine*HCl	0.001
		Riboflavin	0.0002
		Thiamine*HCl	0.001
		Vitamin B-12	0.000005
Aminosäuren			
L-Arginine (free base)	0.2		
L-Asparagine (anhydrous)	0.05	Diverse	
L-Aspartic Acid	0.02	D-Glucose	2.0
L-Cystine 2HCl	0.0652	Glutathione (reduced)	0.001
L-Glutamic Acid	0.02	HEPES	-
L-Glutamine	0.3	Phenol Red.Na	0.0053
Glycine	0.01		
L-Histidine (free base)	0.015	Zugabe	
Hydroxy-L-Proline	0.02	Sodium Bicarbonate	2.0
L-Isoleucine	0.05		
L-Leucine	0.05	Spezifikationen	
L-Lysine.HCl	0.04	pH at RT (without sodium bicarbonate)	8.1±0.3
L-Methione	0.015	pH at RT (with sodium bicarbonate)	8.1±0.3
L-Phenylalanine	0.015	Osmolality-mOsm/Kg H ₂ O (without sodium bicarbonate)	237±5%
L-Proline	0.02	Osmolality-mOsm/Kg H ₂ O (with sodium bicarbonate)	279±5%
L-Serine	0.03	Grams of powder required to prepare 1	10.4
L-Threonine	0.02		
L-Tryptophan	0.005		
L-Tyrosine*2Na*2H ₂ O	0.02883		
Valine	0.02		

9. Danksagung

Meinen Dank möchte ich aussprechen:

Herrn PD Dr. B.G. Woodcock für die Überlassung des Themas und des Laborplatzes, sowie für seine freundliche Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. H. Ackermann (Zentrum für Medizinische Informatik, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, BRD) für die Hilfe bei der statistischen Ausarbeitung.

Der Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. D. Hoelzer (Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Infektiologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, BRD) für die Unterstützung bei der Kultivierung von Zellen.

Herrn Dr. S. Kerpel-Fronius (Pharmacia & Upjohn, Erlangen, BRD) für die Bereitstellung von Idarubicin, sowie Herrn Dr. med. J. Kempini und Herrn Dr. H. Kupper (Knoll AG, Ludwigshafen, BRD) für die Gabe von R-Verapamil.

Meinen Kommilitonen, die sich als Probanden zur Verfügung gestellt haben, für die zahlreichen Blutspenden.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für klinische Pharmakologie für Ihre Hilfsbereitschaft.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch das Edith von Heyden Vermächtnis.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„EINFLUSS DER SERUMPROTEINBINDUNG AUF DIE AUFNAHME-
UND RETENTIONS KINETIK VON IDARUBICIN IN EINE SENSIBLE
UND RESISTENTE HUMANE HL-60 LEUKÄMIEZELLINIE“

in dem Institut für Klinische Pharmakologie,
unter Leitung von: Herrn PD Dr. B.G. Woodcock
ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine
anderen als in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung
zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Kessel, M., Gieseler, F., Woodcock, B.G.: Influence of serum protein binding on the
uptake and retention of idarubicin by sensitive and multidrug resistant human
leukemic cells. *Eur J Clin Pharmacol* 55, 369-373, 1999

Frankfurt am Main, den 20.03.00

Nastina Kessel

Curriculum vitae

Martina Kessel

geboren am 03.04.1971 in Konstanz

Gutenbergweg 29

78467 Konstanz

Telefon: 07531 / 75123

Schulausbildung

1977 - 1981 Haidelmoos-Grundschule in Konstanz

1981 -1990 Alexander von Humboldt-Gymnasium in Konstanz
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

WS 90/91 Mathematik, Volkswirtschaftslehre und Spanisch an der
Universität Konstanz

ab SS 91 Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt am Main

WS 96/97 Traditionelle chinesische Medizin an der Zhejiang University of
TCM, Hangzhou, VR China

SS 97 - WS 97/98 Praktisches Jahr:
- Anästhesie an den Kliniken des Main-Taunus-Kreises, Bad
Soden
- Innere Medizin am New York Medical College, Valhalla, USA
- Chirurgie am St. Luke's Hospital, Guardamangia, Malta

12.05.98 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung an der Johann
Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Beruf

12/98-1/99 ÄiP Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus Friedrichshafen

ab 2/99 ÄiP Innere Medizin, St. Vincenz- und Elisabeth-Hospital, Mainz

Frankfurt am Main, den 20.03.2000

Martina Kessel