

**Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main**

Klinik für Strahlentherapie und Onkologie

**Effekte von Bestrahlung mit Gamma-Strahlen und
Chemotherapie mit Paclitaxel auf Ehrlich-Aszites-Tumorzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereichs Medizin der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Johanna Susanne Kreuzeder

aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main, 2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 3 -
2	Das Chemotherapeutikum Paclitaxel	- 5 -
2.1	Die Entwicklungsgeschichte von Taxol.....	- 5 -
2.2	Die Bedeutung der Hilfsstoffe	- 6 -
2.3	Pharmakologie.....	- 7 -
2.3.1	Wirkmechanismus.....	- 7 -
2.3.2	Aktivität in vitro und in vivo.....	- 8 -
2.3.3	Resistenz	- 8 -
2.3.4	Strahlensensibilisierende Wirkung von Paclitaxel.....	- 9 -
2.3.5	Pharmakokinetik beim Menschen.....	- 9 -
2.3.6	Pharmakokinetische Wechselwirkungen	- 10 -
2.4	Nebenwirkungen und deren Prophylaxe und Behandlung.....	- 10 -
2.4.1	Hämatologische Toxizität	- 11 -
2.4.2	Überempfindlichkeitsreaktionen.....	- 11 -
2.4.3	Neurologische Toxizität.....	- 12 -
2.4.4	Kardiotoxizität	- 12 -
2.4.5	Sonstige Nebenwirkungen	- 13 -
2.5	Klinischer Einsatz von Paclitaxel.....	- 14 -
2.5.1	Ovarialkarzinom.....	- 14 -
2.5.2	Mammakarzinom	- 15 -
2.5.3	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC).....	- 18 -
2.5.4	AIDS-assoziiertes Kaposi-Sarkom (AIDS-KS).....	- 20 -
3	Strahlenwirkungen auf Zellen	- 23 -
3.1	Einzelstrangbrüche.....	- 23 -
3.2	Einzelbasenschäden.....	- 24 -
3.3	Doppelstrangbrüche	- 24 -
3.4	Doppelbasenschäden.....	- 25 -
3.5	Zellzyklusveränderungen durch Bestrahlung.....	- 25 -
3.6	Strahlenempfindlichkeit der Zellen in verschiedenen Zyklusphasen.....	- 26 -
3.7	Klonogener Zelltod durch Bestrahlung.....	- 26 -
4	Material und Methoden	- 29 -
4.1	Ehrlich-Aszites-Tumorzellen als Zellsuspension.....	- 29 -
4.1.1	Tiefgefrorene Zellstämme	- 29 -
4.1.2	Zellvermehrung.....	- 30 -
4.1.3	Quasikontinuierliche Kultur, Passage	- 31 -
4.2	Nährmedium für Zellkulturen	- 32 -
4.3	Bestimmung des Zellüberlebens	- 34 -
4.3.1	Makrokolonietest / Clonogenic essay	- 34 -
4.3.2	Praktische Durchführung des Tests.....	- 35 -

4.4	Bestrahlungsgerät	- 38 -
4.5	Chemotherapeutikum.....	- 39 -
4.6	Versuchsablauf	- 39 -
4.6.1	Kontrollen und Dosiswirkungskurven.....	- 40 -
4.6.2	Experimente mit kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel	- 41 -
4.6.3	Experimente mit zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel	- 42 -
5	Resultate	- 43 -
5.1	Kontrollen und Dosiswirkungskurven.....	- 43 -
5.2	Experimente mit kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel	- 45 -
5.2.1	Experimente mit 3, 6, 9 und 12 Stunden Abstand.....	- 45 -
5.2.2	Experimente mit 24 und 48 Stunden Abstand.....	- 48 -
5.3	Experimente mit zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel	- 50 -
5.3.1	Experimente mit 3, 6, 9 und 12 Stunden Abstand.....	- 50 -
6	Diskussion.....	- 53 -
7	Zusammenfassung	- 63 -
8	Summary	- 65 -
	Literaturverzeichnis.....	- 69 -
	Danksagung	- 77 -
	Schriftliche Erklärung	- 79 -

1 Einleitung

In Deutschland erkranken etwa 400.000 Menschen pro Jahr an Krebs. Jeder vierte Krebspatient verstirbt an seiner Erkrankung oder ihrer Folgen, wobei Krebs die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislaufkrankungen ist. Dabei treten verschiedene Tumorarten mit unterschiedlicher Häufigkeit auf. Das Prostatakarzinom, das kolorektale Karzinom und das Bronchialkarzinom treten bei Männern in abnehmender Reihenfolge am häufigsten auf. Frauen erkranken mit einer Wahrscheinlichkeit von 10% im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, gefolgt vom kolorektalen und Bronchialkarzinom.

Je nach Art, Größe und Ausbreitung des Tumors sowie Alter und Allgemeinzustand des Patienten kommen verschiedene Therapiestrategien zum Einsatz, die hauptsächlich auf operativer Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie beruhen. So erhalten etwa 50% aller Tumorpatienten während ihrer Behandlung eine Bestrahlung. Alle Therapieoptionen berücksichtigen neben der primär angestrebten Heilung auch den palliativen Ansatz zur Verbesserung der Lebensqualität.

Um die Heilungschancen zu optimieren, werden bei geeigneten individuellen Voraussetzungen die Chemotherapie und die Bestrahlung zur Radiochemotherapie kombiniert. Damit kann in bestimmten Fällen durch die strahlensensibilisierende Wirkung des Chemotherapeutikums die Wirkung der Radiatio gesteigert und so das Überleben der Erkrankten verlängert werden.

Für viele Chemotherapeutika ist in Kombination mit Bestrahlung bis heute weitgehend ungeklärt, ob sich die einzelnen Effekte synergistisch verhalten, sich also wechselseitig verstärken, oder lediglich additiver Natur sind. Um Aufschlüsse darüber und andere wichtige Fragen zu erhalten, werden in der Forschung Chemotherapeutika und Bestrahlung zunächst an verschiedenen Zelllinien, also in vitro, getestet. Bestimmte Tumorzelllinien können so direkt auf ihr Ansprechen auf eine Radiochemotherapie untersucht werden. Diese Simulation an Zellen gibt Antworten und Hinweise auf mögliche Therapiekonzepte für verschiedene Tumorerkrankungen der Patienten.

Auch für das Chemotherapeutikum Paclitaxel, das seit einigen Jahren erfolgreich besonders in der Behandlung des Ovarial-, Mamma-, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und AIDS-assoziierten Kaposi-Sarkoms erfolgreich angewendet wird, ist bisher nicht eindeutig geklärt, ob es einen Synergismus zwischen ihm und der Strahlentherapie gibt. Ebenfalls ist offen, in welcher Reihenfolge und zeitlichem Abstand Paclitaxel und Bestrahlung appliziert werden müssen, um ein möglichst geringes Überleben der Tumorzellen zu erzielen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in dieser Arbeit Ehrlich-Aszites-Tumorzellen unterschiedlich lange mit Paclitaxel inkubiert und in definierten zeitlichen Abständen entweder vorher oder nachher mit Gammastrahlung einer Dosis von 2 Gy bestrahlt.

Ziel dieser Arbeit ist es also, zur Klärung der Fragen beizutragen, ob eine genaue Definition der zeitlichen Abfolge der Bestrahlung und Medikamentengabe bei der Entwicklung zukünftiger Therapieschemata notwendig ist und ob es sich in vitro um einen additiven oder synergistischen Effekt handelt.

Die vorliegende Arbeit gibt zunächst eine ausführliche Übersicht über das Chemotherapeutikum Paclitaxel und die Strahlenwirkung auf Zellen. Daraufhin werden die Ehrlich-Aszites-Tumorzellen, alle weiteren Materialien und der Versuchsablauf beschrieben. Nach der Darstellung der Resultate werden diese in der sich anschließenden Diskussion unter Berücksichtigung der heutigen Kenntnisse und aktuellen Literatur bewertet.

2 Das Chemotherapeutikum Paclitaxel

2.1 Die Entwicklungsgeschichte von Taxol

Im Jahr 1960 wurde vom National Cancer Institute (NCI) der Vereinigten Staaten ein großes Suchprogramm angelegt, dessen Ziel es war, Naturstoffe zu identifizieren, die eine therapeutisch nutzbare anti-neoplastische Wirkung aufwiesen.

Der klinische Chemiker Monroe Wall am Research Triangle Institute in North Carolina gewann 1963 die ersten Rohextrakte aus der Rinde der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia*, die in den Wäldern der Pazifikküste vom Nordwesten der USA bis nach Kanada wächst. Diese Extrakte

hemmten in Experimenten mit verschiedenen Maus-Leukämie-Zelllinien deren Wachstum. 1969 isolierte er den Wirkstoff erfolgreich aus dem Substanzgemisch und gab ihm den Namen Taxol [1]. Taxol ist heute der Handelsname, die INN-Bezeichnung ist Paclitaxel.

1971 konnte Wall in einer Arbeitsgruppe mit Wani die chemische Struktur darstellen, ein komplexes Molekül, das zur Gruppe der Diterpene gehört, der auch ätherische Öle wie Kampfer, Pfefferminzöl und Fichtennadelöl angehören.

Solch komplexe Moleküle werden in der Natur nur von Pflanzen gebildet, wahrscheinlich um Fressfeinde abwehren zu können.

In den darauf folgenden zehn Jahren wurde der Weiterentwicklung von Paclitaxel wenig Bedeutung zugemessen, da es damals nur eine von vielen neuen in vitro antineoplastischen Substanzen war. Es war problematisch, den Rohstoff in ausreichender Menge zu beschaffen. Paclitaxel stellte wegen seiner geringen Wasserlöslichkeit hohe Anforderungen an die Galenik.

Auch der Wirkmechanismus war zunächst ungeklärt, bis Dr. S. Horwitz und P. Schiff am Albert Einstein College of Medicine in New York 1979 die einzigartige Mikrotubulus-stabilisierende Wirkung von Paclitaxel entdeckten [2]. Zudem wurde die Wirkung in vivo an menschlichen Tumor-Xenotransplantaten auf Versuchstieren nachgewiesen. Ab 1983 begann das NCI mit Phase-I-Studien.

1989 berichtete McGuire in einer Studie an Patientinnen mit Ovarialkarzinom von einer Ansprechrate von 30%, wobei sich die Tumorerkrankung vorher gegenüber Cisplatin oder Carboplatin als refraktär gezeigt hatte.

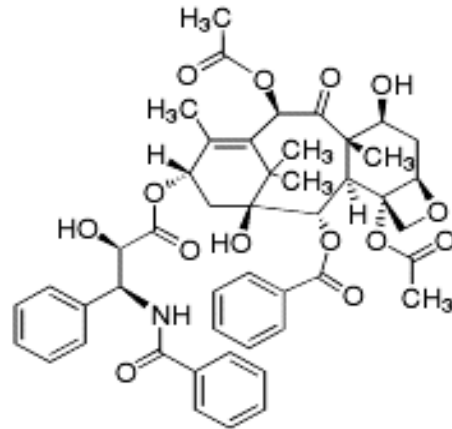


Abb. 1: Strukturformel von Paclitaxel

Nach diesem klinischen Durchbruch folgten schon bald Studien an anderen Tumorerkrankungen. Die Wirksamkeit wurde 1991 beim Mammakarzinom, 1992 beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom bestätigt.

Wegen des plötzlichen großen Interesses ergab sich ein Problem in der Rohstoffbeschaffung. Die vollständig abgeschälten Eiben gingen zugrunde und es musste nach anderen Möglichkeiten der Produktgewinnung geforscht werden. Bis Mitte der 1990er Jahre wurde Taxol halbsynthetisch aus der natürlich vorkommenden Vorstufe Baccatin III hergestellt, das in den nachwachsenden Teilen (Nadeln, Triebe) der in Baumschulen gezüchteten Eiben vorkommt und somit in ausreichender Menge vorhanden war.

1994 gelang Nicolaou die Totalsynthese von Paclitaxel. Nebenbei wurde von Stierle 1993 auch ein Pilz der Eibenrinde entdeckt, der auch in Flüssigmedium Paclitaxel bilden konnte.

Ab 1991 hat sich die Firma Phyton mit der Entwicklung von Paclitaxel mittels Pflanzenzellfermentation (plant cell fermentation, PCF) beschäftigt und das Verfahren bis zur heutigen Produktionsreife entwickelt. PCF ermöglicht standardisierte

Produktionsbedingungen mit genau definierten Medien, die frei von unerwünschten tierischen Hilfsstoffen und Proteinen sind, was sich auf die Qualität und Reinheit des Produkts positiv auswirkt. Der gesamte Produktionsprozess dauert ca. 8 Monate. Seit August 2002 wird Paclitaxel für Taxol[®] von Bristol-Myers-Squibb (BMS) ausschließlich mittels PCF hergestellt.

2.2 Die Bedeutung der Hilfsstoffe

Da das Paclitaxelmolekül weder hydrophil noch ein Salzbildner ist, ergab sich die Aufgabe, eine Lösungsform zu finden, die sowohl für die experimentelle als auch für die therapeutische Anwendung geeignet ist.

Durch den Zusatz des Lösungsvermittlers Cremophor[®]EL und Ethanol wurde letztendlich eine geeignete Lösungsform gefunden.

Bei der chemischen Reaktion von Ethylenoxid mit dem Naturprodukt Rizinusöl entsteht eine Mischung komplexer Fettsäurederivate, die in ihrer Zusammensetzung nicht genau definiert ist. Diese Zusammensetzung wird als Poly(oxyethyl)-35-Rizinusöl (POE-Rizinusöl) oder Cremophor[®]EL bezeichnet.

Um 1 mg Paclitaxel in Lösung zu bringen, werden 88 mg gereinigtes POE-Rizinusöl benötigt. Verabreicht man einem durchschnittlich großen Patienten die empfohlene Einzeldosis von 175 mg/m² Paclitaxel, so führt man ihm gleichzeitig ca. 26 g des POE-Rizinusöls zu.

Obwohl man weiß, dass Cremophor[®]EL keine direkte zytostatische Wirkung hat, muss man doch die weiteren biologischen Wirkungen bedenken. Bevor die

heutige antiallergische Prophylaxe üblich wurde, kam es regelmäßig zu Reaktionen wie Gefäßerweiterung, Blutdruckabfall, Tachykardie, Brustschmerzen und generalisierter Urtikaria durch Histaminfreisetzung.

Außerdem scheint Cremophor[®]EL als Folge seiner Micellenbildung die Pharmakokinetik von Paclitaxel und anderer Chemotherapeutika, wie z.B. Cisplatin, zu beeinflussen.

2.3 Pharmakologie

2.3.1 Wirkmechanismus

Der zelluläre Angriffspunkt für Paclitaxel sind die Mikrotubuli. Dies sind Hohlzylinder, die aus 13 parallel in Längsrichtung angeordneten Protofilamenten bestehen. Die Protofilamente wiederum bestehen aus Tubulin-Dimeren (α - und β -Tubulin), die immer abwechselnd in die Protofilamente eingebaut werden. Während des Zellzyklus befinden sich die Mikrotubuli in einem dynamischen Gleichgewicht, d.h. sie werden je nach Bedarf aufgebaut (Polymerisation) oder abgebaut (Depolymerisation). Da die Mikrotubuli Teil des Spindelapparates sind, sind sie während der Zellteilung für die ordnungsgemäße Verteilung der verdoppelten Chromosomen verantwortlich. Außerdem tragen sie zu Form, Fortbewegung, intrazellulären Transportvorgängen und Neurotransmittersekretion von Zellen bei.

Das Paclitaxelmolekül lagert sich nach Eintritt in die Zelle reversibel an das Tubulin der polymerisierten Mikrotubuli an, verzögert damit den Depolymerisationsvorgang und erniedrigt die Konzentration der freien Tubulin-Dimere für die Polymerisation. Das dynamische Gleichgewicht kippt dabei in Richtung Polymerisation, das Wachstum der Mikrotubuli wird beschleunigt und der Vorrat an freiem Tubulin erschöpft sich. Als Folge davon werden die Mikrotubuli insgesamt kürzer, stabiler und dabei ca. 10-mal biegsamer als nicht unter Paclitaxeeinfluss gebildete Mikrotubuli. Während des gesamten Zellzyklus bilden sich weiterhin abnorme Mikrotubulusstrukturen und funktionslose Mikrotubuli, die elektronenmikroskopisch betrachtet als Bündel oder Sterne imponieren können.

Durch diese Stabilisierung stört Paclitaxel die Ausbildung eines funktionstüchtigen Spindelapparates während der Zellteilung, wodurch es zu Chromosomenbrüchen und einer solchen Verlängerung der Mitose kommen kann, dass diese nicht mehr zu Ende geführt wird.

In Versuchen hat sich gezeigt, dass viele Zellen von daher versuchen in der G₂/M-Phase zu verharren oder in die G₁-Phase zurückzukehren, um sich später erneut zu

teilen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Paclitaxel bei verschiedenen Krebszelllinien die Apoptose konzentrationsabhängig fördert.

2.3.2 *Aktivität in vitro und in vivo*

Die Wirkung von Paclitaxel wurde seit der Entdeckung des neuartigen Wirkmechanismus ab Ende der 1970er Jahre an vielen humanen Tumorzelllinien *in vitro* und an Xenografttumoren *in vivo* getestet und bestätigt. Die wachstumshemmende Wirkung trat bei den Versuchen an Tumorzelllinien teilweise schon deutlich unter den klinisch erreichbaren Wirkspiegeln ein, so beim Ovarial-, Mamma-, Zervix-, Pankreas-, Prostata-, Blasen-, Magen-, Kolon-, Bronchial-, Plattenepithel- und Leberzellkarzinom sowie beim Melanom, Leukämie, Neuro- und Medulloblastom und Astrozytom. Auch bei frisch resezierten Zellen menschlicher Tumoren ließ sich die hemmende Wirkung bestätigen.

Mit steigender Inkubationsdauer und Dosis nahm die zytotoxische Wirkung zu, wobei sich ab einer *in vitro*-Dosis von 50nmol/l keine weitere Steigerung über das erreichte Plateau hinaus erzielen ließ.

Bei den Versuchen an menschlichen Xenografttumoren in Mäusen und originären Maustumoren zeigt sich ebenso die wachstumshemmende Wirkung. Je nach Tumorart, -größe, -lokalisierung und -alter waren partielle bis komplette Tumorregressionen zu beobachten. Dabei wurde Paclitaxel meist in seiner heute üblichen Infusionsform, gelöst in Cremophor[®]EL und Ethanol, intravenös, subkutan oder intraperitoneal appliziert.

2.3.3 *Resistenz*

Worauf die Bildung einer Resistenz von Zellen gegenüber Paclitaxel beruht, ist bis heute noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Dennoch vermutet man zwei Mechanismen. Zum einen könnten Strukturveränderungen der α - und β -Untereinheit des Tubulins für eine erworbene Paclitaxelresistenz verantwortlich sein, indem sich das Paclitaxel nicht mehr an das Tubulin binden kann.

Ein anderer bekannter Resistenzmechanismus ist die vermehrte Expression des *mdr-1*-Gens. Dieses „multi-drug-resistance“-Gen macht Zellen gegenüber einer Vielzahl von giftigen Naturstoffen und Zytostatika resistent, indem es die vermehrte Synthese des Zellmembranmoleküls P-Glykoprotein (p170) induziert, welches mittels eines Pumpmechanismus zellschädigende Substanzen aus der Zelle hinaustransportiert und somit die intrazelluläre Konzentration dieser

Substanzen so reduziert, dass sie keinen Schaden mehr anrichten können. Die Resistenz zumindest einiger Krebszellen oder Krebszelllinien gegen Paclitaxel könnte mdr-1-vermittelt sein.

2.3.4 Strahlensensibilisierende Wirkung von Paclitaxel

Theoretisch betrachtet sollte Paclitaxel alleine schon deshalb eine strahlensensibilisierende Wirkung haben, da sich der Anteil der Zellen in der besonders strahlenempfindlichen G₂/M-Phase erhöht. Dies bestätigten auch zahlreiche in vitro und in vivo Experimente an verschiedenen Tumormodellen und Tumorzelllinien. Lag die Inkubation der Zellen mit Paclitaxel in einem Zeitfenster von bis zu 24 Stunden vor der Bestrahlung, war der Wirkungssynergismus am ausgeprägtesten.

Eine Studie an der Ovarialkarzinom-Zelllinie BG-1 lässt noch auf weitere, bisher unbekanntes synergistische Wirkungen schließen, da hier das Paclitaxel bereits bei noch nicht zytotoxischer Konzentration die Strahlenwirkung signifikant verstärkte.

Allerdings gibt es auch Zelllinien, wie z.B. die eines Bronchialadenokarzinoms, bei denen das Paclitaxel trotz Akkumulierung der Zellen in der G₂/M-Phase keine strahlensensibilisierende Wirkung aufweist.

2.3.5 Pharmakokinetik beim Menschen

In verschiedenen Arbeiten wurde die Pharmakokinetik von Paclitaxel in vivo untersucht. Dabei wurden Infusionszeiten von 1 bis 24 Stunden und unterschiedliche Konzentrationen betrachtet. Maximale Plasmakonzentrationen C_{max} wurden regelmäßig gegen Ende der Infusion erreicht, wobei C_{max} um so höher lag, je kürzer die Infusionsdauer war. Bei Infusionen über 24 Stunden ließ sich eine Plateauphase in der Plasmakonzentration bis zum Ende der Infusion erreichen, bei kürzeren Infusionen sank die Plasmakonzentration nach Erreichen von C_{max} wieder ab, ohne dass es eine Phase mit konstanter Plasmakonzentration gegeben hätte.

Sowohl bei den 3-stündigen als auch bei den 24-stündigen Infusionen ließ sich eine nichtlineare dosisabhängige Steigerung von C_{max} feststellen, die bei den kurzen Infusionen noch ausgeprägter war als bei den langen.

Man stellte fest, dass diese nichtlineare Beziehung durch den Lösungsvermittler Cremophor[®]EL zustande kommt. Mit höheren Dosen von Taxol und damit auch zwangsläufig von Cremophor[®]EL nimmt die Affinität von Paclitaxel zum Plasma überproportional zu, weil immer mehr Wirkstoff in Micellen im Plasma gelöst

transportiert wird. Allerdings ergaben Versuche an Mäusen, dass sich Paclitaxel mit einer Konzentration, annähernd linear zur applizierten Dosis, im Gewebe anreichert.

Paclitaxel wird im Plasma zu 88 – 98 % an Eiweiß, vor allem an Albumin und α_1 -Glykoprotein, gebunden transportiert. Dennoch wird es mit einer initialen α -Eliminationshalbwertszeit von etwa einer halben Stunde relativ schnell wieder aus dem Plasma entfernt. Die β -Eliminationshalbwertszeit beträgt mit starken individuellen Schwankungen etwa 4 bis 16 Stunden.

Bislang wurde die Verteilung von Paclitaxel in den verschiedenen Körpergeweben des Menschen noch nicht systematisch untersucht. Bei Tierexperimenten ließ sich der Wirkstoff in allen Körpergeweben, ausgenommen von Nervensystem und Hoden, nachweisen. Auch klinische Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Paclitaxel kaum die intakte Blut-Hirn-Schranke überwindet. Ist diese allerdings durch Hirntumore oder Metastasen solider Tumore gestört, kann sich der Wirkstoff auch dort in therapeutischen Dosen anreichern.

Paclitaxel wird überwiegend in der Leber verstoffwechselt und biliär ausgeschieden. Bei dem Abbau durch die Isoenzyme CYP2C8 und CYP3A4 entstehen verschiedene Metaboliten, am häufigsten 6 α -Hydropaclitaxel und para-Paclitaxel. Die renale Ausscheidung von unverändertem Paclitaxel ist vernachlässigbar gering.

Die systemische Clearance von Paclitaxel liegt nach einer 3- bis 24-stündigen Infusion mit Dosen von 15 bis 275 mg/m² zwischen 8 und 23,6 l/h/m² und scheint dosisunabhängig zu sein.

2.3.6 Pharmakokinetische Wechselwirkungen

Die Pharmakokinetik von Paclitaxel kann theoretisch von sämtlichen Substanzen beeinflusst werden, die ebenfalls über die Isoenzyme CYP2C8 und CYP3A4 abgebaut werden, diese induzieren oder hemmen. Dies würde sich dann als erhöhte oder erniedrigte Taxol-Clearance zeigen.

Bei in vitro-Versuchen zeigte sich, dass Fluconazol und Ketokonazol den Taxol-Stoffwechsel hemmen können.

2.4 Nebenwirkungen und deren Prophylaxe und Behandlung

Bei der Therapie mit Paclitaxel können Nebenwirkungen auftreten, die für die Behandlung mit Zytostatika typisch sind, wie z.B. Knochenmarkstoxizität.

Zusätzlich beobachtete man bei den ersten Therapieversuchen akute allergische Reaktionen, die man heute durch antiallergische Prophylaxe gut verhindern kann. Die kardiotoxische Wirkung ist bezüglich Art und Schweregrad sehr schwer einzuschätzen. Dies gilt für die Erstexposition ebenso wie für die folgenden Therapiezyklen.

2.4.1 Hämatologische Toxizität

Die knochenmarkshemmende Wirkung von Paclitaxel ist die dosislimitierende Komponente bei der Therapie. Dabei stehen die Neutropenie und Leukozytopenie stark im Vordergrund, die Thrombozytopenie und Anämie sind von geringerer Bedeutung.

Typischerweise setzt die Neutropenie am 8. Behandlungstag ein und erreicht ihren Tiefpunkt etwa am 11. Tag. Zwischen den Tagen 15 und 21 hat sie sich üblicherweise wieder zurückgebildet. Durch die kurze Dauer der Neutropenie kommt es nur selten zu infektiösen Komplikationen.

Wurde vor der Therapie mit Paclitaxel ein anderes myelosuppressives Chemotherapeutikum verabreicht, ist die Neutropenie meist ausgeprägter und die Erholungszeit verlängert. Wird Paclitaxel wiederholt gegeben, gibt es keine Kumulation der knochenmarkstoxischen Wirkung.

Vor jedem Behandlungszyklus muss eine vollständige Blutbildkontrolle durchgeführt werden. Bei verlängerter Neutropenie und Leukozytopenie kann man beim nächsten Behandlungszyklus die applizierte Dosis verringern und die Gabe von G-CSF in Betracht ziehen.

Dank der heute üblichen Applikationsschemata kommt es nur zu geringen Schleimhautschäden, was dazu beiträgt, die Infektionsrate trotz Leukozytopenie niedrig zu halten.

2.4.2 Überempfindlichkeitsreaktionen

Bei den akuten allergischen Reaktionen, die meist wenige Minuten nach dem Infusionsbeginn von Paclitaxel auftreten, handelt es sich um allergische Sofortreaktionen vom Typ I. Sie gehen mit Atemnot bis hin zu Bronchospasmen, allergischen Hautreaktionen wie Urtikaria, Exanthenen und Gesichtsrötung sowie manchmal mit Blutdruckabfall und Angiödem einher. Bei allen betroffenen Patienten bildeten sich die Symptome nach Absetzen der Infusion zurück, leider kam es jedoch in den 1980er Jahren zu einem tödlichen Zwischenfall.

Es ist bis heute noch nicht klar, ob die allergischen Reaktionen auf den Wirkstoff Paclitaxel oder den Lösungsvermittler Cremophor[®]EL zurückzuführen sind.

Um die allergischen Reaktionen zu vermeiden, bekommen die Patienten als Prophylaxe ein Kortikosteroid und Antihistaminika. Dadurch lässt sich die Inzidenz der Reaktionen auf unter 2 % senken und auch Kurzinfusionen von einer Stunde sind gefahrlos möglich.

2.4.3 Neurologische Toxizität

Die neurologische Toxizität ist die häufigste nichthämatologische Nebenwirkung von Paclitaxel und beruht auf der Tatsache, dass Nervenzellen reich an Mikrotubuli sind, die ebenso von dem Chemotherapeutikum angegriffen werden. Das Auftreten von neurologischen Nebenwirkungen scheint dosisabhängig zu sein.

Die Symptome äußern sich in Form einer peripheren Neuropathie, die die sensorischen und die motorischen Fasern betrifft. Die motorische Neuropathie bleibt oft asymptomatisch, wohingegen sich die sensorische Neuropathie meist nach Dosen über 170 mg/m^2 mit Taubheitsgefühl, Kribbeln und Brennen in den Extremitäten äußert. Außerdem können sich die Propriozeption, das Vibrations-, Temperatur- und Schmerzempfinden sowie die tiefen Sehnenreflexe abschwächen oder verschwinden. Diese Symptome setzen meist innerhalb von 2 - 3 Tagen nach Therapiebeginn ein und bilden sich nach wenigen Monaten zurück.

Auch eine autonome Neuropathie mit paralytischem Ileus und orthostatischer Hypotonie wurden beobachtet.

Bei Dosen über 200 mg/m^2 kommt es gehäuft zu Myalgien und Arthralgien, die meist in Schulter- und paraspinaler Muskulatur auftreten. Man vermutet, dass diese Nebenwirkung eventuell auch durch das abrupte Absetzen der relativ hohen Dosen von Dexamethason ausgelöst werden könnte, weshalb ein langsames Ausschleichen des Kortikoids zu empfehlen ist.

Um das Auftreten neurologischer Nebenwirkungen zu verringern, sollte man die applizierte Dosis im nächsten Behandlungszyklus herabsetzen. Bei starken neuropathischen Schmerzen, die oft als oberflächlich, brennend oder stechend beschrieben werden, kann man trizyklische Antidepressiva wie Clomipramin, Imipramin oder Doxepin verabreichen. Patienten mit Muskel- und Gelenkschmerzen sprechen gut auf Paracetamol und nichtsteroidale Antiphlogistika an.

2.4.4 Kardiotoxizität

Durch welchen Mechanismus es zu kardialen Nebenwirkungen kommt und ob diese durch Paclitaxel oder Cremophor[®]EL verursacht werden, ist noch unklar.

Ebenfalls unbeantwortet ist die Frage, ob das myokardiale Reizleitungssystem direkt betroffen ist oder im Sinne einer autonomen Neuropathie beeinflusst wird. Bei den meisten Patienten bleiben die Nebenwirkungen asymptomatisch und nicht behandlungsbedürftig. Durch EKG-Langzeitmessungen wurde aber festgestellt, dass es zu asymptomatischer Bradykardie, ventrikulären Herzrhythmusstörungen, AV-Überleitungsstörungen, Schenkelblocks und Myokardischämien kommen kann. Schwerwiegendere Nebenwirkungen wie Myokardinfarkte, Herzinsuffizienz und plötzlicher Herztod wurden nur vereinzelt beobachtet.

Zudem hat man festgestellt, dass Patienten bei mehrmaliger Paclitaxelgabe kardial immer anders reagieren, die Nebenwirkungen also nicht reproduzierbar sind.

Es wird dennoch empfohlen, Paclitaxel bis 6 Monate nach einem Herzinfarkt sowie bei Patienten mit Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz oder medikamentöser Behandlung mit Betablockern, Kalziumantagonisten oder Digoxin nicht einzusetzen [3].

2.4.5 Sonstige Nebenwirkungen

Allgemeine Nebenwirkungen von Paclitaxel sind Haarausfall, Mukositis, Übelkeit und Erbrechen sowie lokale Venenreizungen.

Der Haarausfall tritt schnell und meist vollständig ein. Etwa 6 bis 8 Wochen nach Beendigung der Therapie beginnt das Haarwachstum wieder.

Die Mukositis stellt bei der empfohlenen Dosierung von 175 mg/m^2 bei Infusionen von 3 bis 24 Stunden in der Regel kein Problem dar. Allerdings ist sie im Auftreten und Ausmaß dosisabhängig und kann bei Hochdosischemotherapien ab 250 mg/m^2 limitierender Faktor sein. Beim Auftreten der ersten Symptome wie Trockenheit, Brennen oder Rötung der Mundschleimhaut sollte der Mund regelmäßig mit nichtalkoholischen Lösungen wie Salbeitee, Amphotericin C oder Dexpanthenollösung gespült werden. Bei starken Schmerzen gibt es auch die Möglichkeit der Spülung mit einem lokalen Anästhetikum.

Übelkeit und Erbrechen treten bei etwa 60 % der Patienten in meist milder Form auf und lassen sich durch antiemetische Prophylaxe oder Therapie gut behandeln.

Die lokale Reizwirkung äußert sich mit Hautrötungen, Spannungsgefühl und Brennen entlang der infundierten Vene. Es kann auch zu Sklerosierung und Hyperpigmentierung kommen.

2.5 *Klinischer Einsatz von Paclitaxel*

2.5.1 *Ovarialkarzinom*

Das Ovarialkarzinom ist der vierthäufigste Tumor der Frau mit einem Altersgipfel zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr und weltweit die sechsthäufigste Tumorerkrankung. Bei 70% der Frauen wird der Tumor im fortgeschrittenen metastasierten Stadium diagnostiziert, was ihn zur letalsten gynäkologischen Tumorart macht [4]. Als Standardtherapie gilt die Kombination aus Operation mit Entfernung der Ovarien, Tuben, des Uterus, des Appendix, des Omentum majus und minus, der iliakalen und paraaortalen Lymphknoten sowie bei Befall auch Teilen der Harnblase oder des Darms sowie die first-line-Chemotherapie mit Paclitaxel und Carbo- oder Cisplatin. Des weiteren gibt es die Möglichkeit der Bestrahlung als palliativen Ansatz bei inoperablen Tumoren, Tumorrezidiven oder Knochenmetastasen.

Das Überleben der Patientinnen beträgt bei der Diagnosestellung im Stadium I und II 80-95% und sinkt im Stadium III und IV auf 10-30%. Zwar reagieren über 70% der Patientinnen im Stadium III und IV mit einem längeren progressionsfreien Intervall (PFS) und längerem Überleben (S), jedoch erleidet die Mehrheit innerhalb von 3 Jahren ein mit heutigen Mitteln unheilbares Rezidiv, das mit einer second-line-Chemotherapie palliativ behandelt werden kann, wobei verschiedene Substanzen in Abhängigkeit von der vorausgegangenen Therapie in Frage kommen [5,6].

Anfang der 1990er Jahre bestand die Standardchemotherapie beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom aus der Kombination Cisplatin plus Cyclophosphamid (CC). Nachdem erste Erfolge in der Tumorthherapie mit Paclitaxel Mitte der 1990er Jahre verzeichnet werden konnten [7], wurden vergleichende Studien zwischen der Standardchemotherapie und einer mit Cisplatin plus Paclitaxel (PT) durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Ansprechrates von 73% auf PT zu 60% auf CC, ein medianes PFS von 17,9 bei PT zu 12,9 Monaten bei CC und ein medianes S von 38% bei PT zu 24% bei CC [8]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine weitere Studie, die Ansprechraten von 59% bei PT zu 45% bei CC, mediane PFS von 15,5 bei PT zu 11,5 Monaten bei CC und mediane S von 35,6 bei PT zu 25,8 Monaten bei CC erzielte [9]. Aufgrund dieser Resultate wurde Cisplatin plus Paclitaxel als neue Standardtherapie festgelegt. Da in dieser Kombination das Paclitaxel beim stationären Patienten als 24h-Infusion verabreicht werden muss, versuchte man die Infusionszeit durch Dosiserhöhung auf 3 Stunden zu verkürzen, um die Patienten ambulant behandeln zu können [10]. Trotz geringerer Myelosuppression aber wegen verstärkt auftretender Neurotoxizität ersetzte man das neurotoxische Cisplatin durch das weniger

neurotoxische Carboplatin, wodurch sich die 3h-Infusionen verwirklichen ließen [11]. Die Kombination Paclitaxel plus Carboplatin (TC) zeigt zwar mit einem medianen PFS von 16 Monaten und einem medianen S von 31 Monaten keinen Unterschied zu PT in Bezug auf Effektivität [12], bietet den Patientinnen aber eine bessere Lebensqualität aufgrund kürzerer Infusionszeiten und dem geringeren Auftreten von Übelkeit, Erbrechen, Appetitlosigkeit, Müdigkeit und neurotoxischen Symptomen [13].

In dem palliativen Therapieansatz des rezidivierenden Ovarialkarzinoms gibt es derzeit keinen Standard für die second-line-Therapie. Je nach Vorbehandlung gibt es hier mehrere Optionen. Eine Studie bei häufig mit verschiedenen Chemotherapeutika vorbehandelten Patientinnen mit Rezidiv zeigte ein Ansprechen von 28,9% auf wöchentliche Monotherapie mit Paclitaxel [14]. Bei Patientinnen mit Platinum-sensitiven rezidivierendem Ovarialkarzinom zeigte eine Monotherapie mit Paclitaxel keinen Vorteil im Vergleich zu einer Monotherapie mit einem Platinumderivat [15], wobei eine Kombinationsbehandlung mit Paclitaxel und einem Platinumderivat effektiver sei als eine Monotherapie mit Platinum (mediane PFS 13 vs 10 Monate, mediane S 29 vs 24 Monate) [16]. Bei Platinum-refraktärem Ovarialkarzinom sprachen in einer Studie 22% auf die Therapie an. Das mediane PFS lag bei 4,5 Monaten und das mediane S bei 8,8 Monaten nach Therapiebeginn [17]. In einer weiteren Studie sprachen sogar 25% der Patientinnen mit Platinum- und Paclitaxel-refraktärem Ovarialkarzinom auf eine wöchentliche Monotherapie mit Paclitaxel an, wobei medianes PFS bei 5,5 und medianes S bei 13,3 Monaten lagen [18]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine Kombinationschemotherapie mit Paclitaxel und Epirubicin beim rezidivierenden Platinum-vorbehandelten Ovarialkarzinom keinen Vorteil gegenüber der Monotherapie mit Paclitaxel hat (mediane PFS 6 Monate für beide Schemata, mediane S 12 und 14 Monate bei Kombinations- und Monochemotherapie) [19]. In der Literatur findet sich ein Fallbericht einer Patientin mit rezidiviertem Ovarialkarzinom nach first-line-Chemotherapie, die anstelle einer erneuten Chemotherapie mit Bestrahlung des Beckens behandelt wurde. Trotz der Bildung einer retrovaginalem Fistel überlebte sie mindestens 1,5 Jahre nach Bestrahlung ohne Hinweis auf ein Tumorrezidiv [20].

2.5.2 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit 25% aller Malignomerkankungen bei Frauen die häufigste Krebserkrankung der Frau. Pro Jahr erkranken etwa 47500 Frauen in Deutschland an Brustkrebs mit einem Erkrankungsgipfel in der 5. Lebensdekade. Im Jahr 2002 war das Mammakarzinom die häufigste Todesursache bei Frauen im

Alter zwischen 35 und 55 Jahren und war für 18% aller Krebstodesfälle bei Frauen verantwortlich. Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei 75% [21]. Aufgrund der hohen Erkrankungsrate bietet das gesetzliche Krebsfrüherkennungsprogramm Frauen ab 30 Jahren im Rahmen der Vorsorge die klinische Untersuchung der Brust und die Unterweisung in die Selbstuntersuchung an. Neben der Tastuntersuchung stellen die Mammographie, der Ultraschall und die MRT die Säulen in der Diagnostik des Mammakarzinoms dar.

Wird ein Mammakarzinom diagnostiziert, hängt die Therapie von Art, Größe, Ausdehnung, Hormonrezeptorpositivität und Metastasierung des Karzinoms sowie von Alter und Allgemeinzustand der Patientin ab, wobei die operative Entfernung des Karzinoms, entweder brusterhaltend oder durch Brustamputation, mit nachfolgender lokaler Radiotherapie immer Bestandteil der Therapie sein soll. Zusätzlich werden die Patientinnen in solche mit niedrigem und hohem Risiko eingeteilt.

Frauen mit niedrigem Risiko müssen alle folgenden Bedingungen erfüllen: Patientinnen 35 Jahre oder älter, Tumordurchmesser unter 2 cm, Grading I, positiver Östrogen- und/oder Progesteronrezeptor und tumorfreie Lymphknoten in der Axilla (N0). Hier kann nach operativer Entfernung auf eine adjuvante systemische Therapie verzichtet werden. In Einzelfällen kann eine endokrine Therapie in Betracht gezogen werden.

Alle anderen Patientinnen haben ein erhöhtes Risiko und bei rezeptornegativem Befund sollte über eine Chemotherapie nachgedacht werden.

Bei Frauen mit erhöhtem Risiko und rezeptorpositivem Befund ist entweder die alleinige

endokrine Therapie (z.B. mit Tamoxifen oder Aromataseinhibitoren) oder die Kombination von Chemotherapie mit endokriner Therapie nach Operation zu erwägen. Außerdem gibt es noch die Möglichkeit der Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]), der erfolgreich bei Tumoren eingesetzt wird, die den HER2-Rezeptor überexprimieren [22].

Die Chemotherapie findet ihren Einsatz also vorwiegend in der adjuvanten Therapie zur Verringerung des Rezidivrisikos oder in der neoadjuvanten Therapie beim primär inoperablen Mammakarzinom [23]. Als first-line-Chemotherapeutika gelten derzeit Anthrazykline (Doxorubicin), Taxane (Paclitaxel und Docetaxel) und Cyclophosphamid, wobei die beiden ersten sowohl als Mono- als auch als Polychemotherapie in Kombination mit anderen Chemotherapeutika zum Einsatz kommen [24,25]. Paclitaxel wird ebenso als second-line-Chemotherapeutikum bei Patientinnen mit Anthrazyklin-vorbehandeltem oder Anthrazyklin-resistentem Mammakarzinom angewendet [21].

In einer Studie zur adjuvanten Chemotherapie nach brusterhaltender OP mit nachfolgender Radiotherapie zeigte die Gruppe mit der Therapie aus Doxorubicin/Cyclophosphamid (AC) eine 5-Jahres-Inzidenz eines Lokalrezidivs

von 9,7%, die bei der Gruppe mit AC+Paclitaxel bei 3,7% lag und somit für die Kombination mit Paclitaxel spricht [26]. Eine weitere Studie untersuchte die Behandlung von lokalen Rezidiven, die entweder inoperabel waren oder reseziert werden konnten, mit gleichzeitiger Radiotherapie und Paclitaxel oder Radiotherapie und Paclitaxel mit Cisplatin. Die Ansprechrate, das Rezidiv-freie Überleben sowie das systemische Rezidiv-freie Überleben waren bei der Therapie ohne Cisplatin höher, weshalb hier die Radiotherapie mit der Monotherapie mit Paclitaxel empfohlen wird [27]. Eine retrospektive Studie kam zu dem Schluss, dass die zusätzliche adjuvante Behandlung mit Paclitaxel zu einer Anthrazyklin-basierten Therapie den Erfolg bei Patientinnen mit Östrogenrezeptor-negativem inflammatorischem Mammakarzinom signifikant verbessern kann [28]. Wird Paclitaxel innerhalb der adjuvanten Therapie als second-line-Chemotherapeutikum mit gleichzeitiger Radiotherapie als Folge auf eine Anthrazyklin-basierte Therapie nach Operation angewendet, gibt es nicht selten toxische Nebenwirkungen, die zur Reduzierung oder zum Abbruch der Behandlung führen können. In der Studie von Hanna [29] erhielten 20 Patientinnen mindestens zwei Zyklen Paclitaxel ($175\text{mg}/\text{m}^2$) alle drei Wochen mit gleichzeitiger Radiotherapie. Dabei entwickelten 13 Patientinnen (65%) Hautdefekte vom Grad 2-3 und 4 (20%) post-radiation Pneumonie. In einer weiteren Studie wurden 24 Patientinnen mit ähnlichem Schema behandelt, wobei die stärkste Nebenwirkung Hautdefekte vom Grad 2 bei 17 Patienten war. Es trat keine post-radiation Pneumonie auf [30]. Eine dritte Studie verzeichnete bei 3 von 16 Patientinnen, die wöchentlich $60\text{mg}/\text{m}^2$ Paclitaxel erhielten, eine zweit- bis drittgradige post-radiation Pneumonie sowie bei 2 von 24 Patientinnen, die alle drei Wochen $135\text{-}175\text{ mg}/\text{m}^2$ Paclitaxel erhielten, eine zweitgradige post-radiation Pneumonie [31]. Das Risiko einer Lungenbeteiligung bei gleichzeitiger Paclitaxel-Therapie mit Bestrahlung nach Anthrazyklin-basierter adjuvanter Chemotherapie ist also nicht zu vernachlässigen und ist umso höher, je frequenter Paclitaxel verabreicht wird.

Paclitaxel wird in Kombination mit Radiotherapie immer häufiger erfolgreich in der neoadjuvanten Therapie beim primär inoperablen lokal fortgeschrittenen Mammakarzinom angewendet. In der Studie von Skinner [32] wurden 28 Patientinnen neoadjuvant zweimal wöchentlich mit $30\text{ mg}/\text{m}^2$ Paclitaxel und insgesamt 45 Gy (25 Fraktionen zu je 1,8 Gy) behandelt. Das klinische Ansprechen lag bei 89% und zum Zeitpunkt der Operation zeigten 33% keine oder nur minimale mikroskopische Tumorresiduen. Die Radiochemotherapie wurde gut vertragen, konnte aber mit einer erhöhten postoperativen Komplikationsrate von 41% in Verbindung gebracht werden. Die Fortführung dieser Studie konnte die Ergebnisse bestätigen, wobei die Therapie durch die adjuvante Polychemotherapie mit Doxorubicin und Paclitaxel oder Cytosin abgeschlossen wurde [33]. Chakravarthy konnte bei 13 von 38 Patientinnen

(34%) zum Zeitpunkt der OP, nach neoadjuvanter Behandlung mit 3 Zyklen, 175 mg/m² Paclitaxel alle drei Wochen gefolgt von 30 mg/m² Paclitaxel zweimal wöchentlich und gleichzeitiger Bestrahlung, ein komplettes pathologisches Ansprechen feststellen [34].

Paclitaxel ist somit eine potente Therapieoption, sowohl in der adjuvanten als auch in der neoadjuvanten Anwendung.

2.5.3 Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)

Etwa 25% aller malignen Tumorerkrankungen sind Bronchialkarzinome. In Deutschland gibt es pro Jahr ca. 50000 Neuerkrankungen, wobei es die dritthäufigste Krebserkrankung bei Männern ist. Allerdings ist es die häufigste Krebstodesursache bei Männern und dritthäufigste Krebstodesursache bei Frauen, und sogar die dritthäufigste Todesursache überhaupt bei Männern. Der Erkrankungsgipfel liegt um das 60. bis 70. Lebensjahr [35] und die Diagnose wird meist in einem fortgeschrittenen Stadium gestellt. Hauptrisikofaktor ist das Rauchen von Zigaretten, etwa 90% aller Erkrankten sind Raucher [36].

Das Bronchialkarzinom wird in das kleinzellige (20%) und das nicht-kleinzellige (80%) Bronchialkarzinom unterteilt, da sich hier Therapieziel und Behandlung unterscheiden. Zu den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen werden das Plattenepithelkarzinom (25%), das Adenokarzinom (40%) und das großzellige Bronchialkarzinom (15%) gezählt.

Im Stadium I und II der Erkrankung ist bei Operabilität in erster Linie die komplette Tumorentfernung Therapieziel. Zur adjuvanten Unterstützung wird die Radiotherapie eingesetzt. Kombinierte adjuvante Radiochemotherapie findet derzeit nur innerhalb von Studien statt [37].

Ab dem Stadium III bis IV tritt die Operation als erste Maßnahme immer mehr in den Hintergrund und die Hauptsäulen der Therapie stellen nun die Bestrahlung und die Chemotherapie dar. Dabei muss das Therapieziel - kurativ oder palliativ – individuell angepasst werden, wie auch die Entscheidung für eine Mono- oder Polychemotherapie sowie Radiochemotherapie, eventuell mit neoadjuvanter Absicht.

Häufig verwendete Chemotherapeutika beim NSCLC sind Carboplatin, Cisplatin, Gemcitabin, Vinorelbin und seit Mitte der Neunziger Jahre auch die Taxane. 1999 wurde Docetaxel als second-line-drug beim fortgeschrittenen NSCLC eingesetzt [38] und kurze Zeit später stiegen Paclitaxel und Docetaxel in die first-line-Therapie beim fortgeschrittenen NSCLC auf [39]. Somit findet Paclitaxel bis heute seine Anwendung hauptsächlich ab dem Stadium III und liefert mitunter vielversprechende Resultate.

Studien über die adjuvante Anwendung von Paclitaxel bei Patienten mit Stadium-II-IIIa-Bronchialkrebs zeigten ähnliche Ergebnisse. In der Gruppe um Feigenberg [40] bestand die adjuvante Therapie aus einer Kombination von Paclitaxel, Carboplatin und gleichzeitiger Bestrahlung. Die 2-Jahresüberlebensrate (JÜR) lag hier bei 72%. In der Gruppe um Bradley [41] lag die 2-JÜR bei gleicher Patientenauswahl und fast identischer Therapie bei 70%. Perry [42] stellte in seiner klinischen Studie fest, dass die Patienten mit Stadium-III-NSCLC keinen Überlebensvorteil haben, wenn sie zu der adjuvanten Chemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin danach noch bestrahlt werden. Die 1-JÜR lag zwischen 72 und 74%.

Steht nur die Radio-, Chemo- oder Radiochemotherapie als Behandlung zur Auswahl, so konnte Wolski [43] zeigen, dass die Patienten mit NSCLC im Stadium I-III einen klaren Überlebensvorteil mit Radiochemotherapie mit Paclitaxel und Carboplatin gegenüber der nur bestrahlten Patientengruppe haben (2-JÜR 40 vs 19,6% und 5-JÜR 14 vs 0%). Zwei weitere Studien behandelten ihre Stadium-III-Patienten mit Radiochemotherapie, die einen verwendeten nur Paclitaxel mit Bestrahlung [44], die anderen noch zusätzlich Carboplatin [45]. Die Zweierkombination der Chemotherapeutika zeigte eine höhere 5-JÜR und ein längeres medianes Überleben als die Monotherapie (26 vs 15% und 28 vs 12 Monate).

In einer Studie mit 214 Patienten erhielten 101 Patienten nach Induktionstherapie mit Paclitaxel und Carboplatin eine fortführende Therapie mit Paclitaxel und gleichzeitiger Bestrahlung, 113 wurden nach gleicher Induktionstherapie nur bestrahlt [46]. Das mediane Überleben war bei der nur bestrahlten Patientengruppe mit 14,1 Monaten niedriger als bei der noch mit Paclitaxel behandelten Gruppe (medianes Überleben 18,7 Monate).

Auch in der Anwendung als Konsolidierungstherapie gibt es für Paclitaxel sprechende Ergebnisse. So zeigte in der Studie von Shi [47] an 26 Patienten mit Stadium-III-NSCLC die Gruppe mit Paclitaxel und Bestrahlung nach Induktionstherapie mit Cisplatin und Vinorelbin eine partielle Remissionsrate von 78,2%, im Gegensatz zu der Patientengruppe ohne Konsolidierung mit einer Rate von 47,8%. Ebenso wurde in der Studie von Keene [48] bei Stadium-III-NSCLC nach Radiochemotherapie mit Cisplatin bei der Gruppe ohne Konsolidierungstherapie eine 3-JÜR von 20% und in der Gruppe mit Konsolidierungstherapie mit Paclitaxel und Carboplatin eine 3-JÜR von 50% verzeichnet. Belani [49] hat an Patienten mit Stadium-III-NSCLC gleich drei verschiedene Anwendungsschemata verglichen: Die erste Gruppe bekam erst Paclitaxel mit Carboplatin und wurde danach bestrahlt, die zweite Gruppe bekam erst die gleich Menge Paclitaxel mit Carboplatin wie die Gruppe 1 und wurde danach nochmals mit einer geringeren Dosis Paclitaxel und Carboplatin und gleichzeitiger Bestrahlung behandelt, und die dritte Gruppe erhielt zunächst die

geringere Menge Paclitaxel und Carboplatin mit gleichzeitiger Bestrahlung und wurde daraufhin mit der höheren Dosis Paclitaxel und Carboplatin behandelt. Das mediane Überleben betrug 13 vs 12,7 vs 16,3 Monate, was darauf schließen lässt, dass die auf die Radiochemotherapie folgende Konsolidierungstherapie mit beiden Chemotherapeutika am effektivsten ist.

Leider gibt es noch keine Ergebnisse zum direkten Vergleich zwischen der Anwendung von Paclitaxel und anderen Chemotherapeutika. Weitere Studien sind abzuwarten.

2.5.4 *AIDS-assoziiertes Kaposi-Sarkom (AIDS-KS)*

Das AIDS-assoziierte Kaposi-Sarkom (AIDS-KS) ist eine angioproliferative Neoplasie des Gefäßendotheliums. Es kann in jedem Stadium der HIV-Infektion auftreten, wobei es weit häufiger im fortgeschrittenen Stadium mit starker Immunsuppression und erhöhter Viruslast diagnostiziert wird [50]. Das AIDS-KS ist die häufigste Neoplasie bei HIV-infizierten Patienten [51] und wurde erstmals 1981 von Friedman-Kien et al. [52] als aggressive und oftmals fatale epidemische Variante des Kaposi-Sarkoms bei homosexuellen Männern beschrieben. Etwa 6% aller HIV-Infektionen werden über die Diagnose des AIDS-KS festgestellt [53].

Am häufigsten präsentiert sich das AIDS-KS als multifokale, lilabraune, wenige Millimeter bis mehrere Zentimeter große Hautläsionen, die am ganzen Körper auftreten können und gewöhnlich zunächst an Kopf, Hals, Oberkörper und Extremitäten erscheinen [54]. Am zweithäufigsten werden Lymphknoten gefolgt vom gastrointestinalen und respiratorischen Trakt befallen. Der Befall des gastrointestinalen Trakts bleibt meist asymptomatisch und ohne Einfluss auf die Prognose des Patienten [55], wohingegen ein Lungenbefall die lebensbedrohlichste Form der Erkrankung darstellt [56].

Das AIDS-KS ist bisher nicht heilbar und der Therapieansatz daher palliativ. Prinzipiell gibt es lokale und systemische Behandlungsmethoden, die bei jedem Patienten je nach Tumorausbreitung und -wachstum, Immunstatus, Anamnese von opportunistischen Infektionen und Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten individuell zur Anwendung kommen [57, 58]. Die systemische Therapie ist indiziert bei der Behandlung von aggressivem, weit gestreutem, schmerzhaftem und symptomatischem AIDS-KS mit visceralem und/oder Lungenbefall, wohingegen die lokale Therapie bei minimalem Befall und kosmetischer Behandlung zum Einsatz kommt [59].

Als Basis der systemischen zytotoxischen Therapie mit verschiedenen Chemotherapeutika gilt die vorangehende, gleichzeitige oder nachfolgende „highly active anti-retroviral therapy“ (HAART). Mit HAART behandelte Patienten entwickelten weniger aggressive AIDS-KS [60] oder zeigten sogar in

einigen Studien eine Regression des AIDS-KS [61,62,63,64,65,66] sowie ein verzögertes Einsetzen des Therapieversagens [67] und verlängerter Überlebensdauer bei gleichzeitiger Chemotherapie [68,69].

Die systemische First-Line-Therapie des AIDS-KS besteht aus der Monotherapie mit liposomalen Anthrazyklinen (Doxorubicin oder Daunorubicin) oder der kombinierten Chemotherapie mit Bleomycin, Vincristin und/oder Doxorubicin. Bei der Monotherapie mit liposomalen Anthrazyklinen konnten bei einer Gabe von 20 bis 60 mg/m² alle 2 oder 3 Wochen Ansprechraten bei 25 bis 59% der Patienten erreicht werden, bei der kombinierten Chemotherapie lagen die Ansprechraten bei niedrigeren Dosen zwischen 23 und 28% und bei höheren Dosen zwischen 84 und 88% [70,71,72,73].

Bei Therapieversagern der First-Line-Therapie mit fortgeschrittenem AIDS-KS hat sich Paclitaxel mittlerweile als Second-Line-Therapie etabliert. Neben seiner bekannten Mikrotubulus-stabilisierenden Wirkung inhibiert es die in den KS-Zellen überexprimierte Bcl-2 antiapoptotische Aktivität [74].

In der Studie von Tulpule et al. [75] wurde Paclitaxel 107 männlichen Patienten mit fortgeschrittenem AIDS-KS in einer Dosis von 100 mg/m² alle zwei Wochen verabreicht. Alle Patienten erhielten vorher eine andere Chemotherapie, 38% der Patienten hatten schon 2 oder mehrere Chemotherapien hinter sich. 77% der Patienten erhielten während der Therapie mit Paclitaxel Protease-Inhibitoren, wobei sich die Ansprechraten der Patienten mit oder ohne HAART ähnelten (54 vs 59%). Insgesamt lag die Ansprechrate aller Patienten auf Paclitaxel bei 56% und stellt so eine effektive Behandlungsoption dar. Gill et al. [76] bestätigte diese Ansprechrate in seiner Studie mit 56 Patienten mit gleichem Behandlungsschema, in der er bei 59% der Patienten ein Ansprechen auf die Therapie feststellen konnte. Zudem vermerkte er mit einer medianen Dauer des Ansprechens von 10,4 Monaten die längste für sämtliche Behandlungsstrategien.

Welles et al. [77] und Saville et al. [78] konnten in kleineren Studien mit jeweils 28 bzw. 20 Patienten und einer Dosis von 135 mg/m² alle 3 Wochen Ansprechraten von 71 bzw. 65% verzeichnen. Der dosislimitierende Faktor ist für alle Patienten die Neutropenie. Zudem wird Paclitaxel wie die meisten retroviralen Medikamente über das Cytochrom P-450-System abgebaut und kann deshalb nur mit Vorsicht verabreicht werden.

Paclitaxel ist also ein geeignetes Medikament bei auf die anderen Chemotherapeutika therapieresistenten Patienten mit fortgeschrittenem AIDS-KS und verbessert signifikant die Lebensqualität der Patienten.

3 Strahlenwirkungen auf Zellen

Prinzipiell lässt sich Strahlung in Korpuskularstrahlung (Teilchenstrahlung) und Quantenstrahlung (Wellenstrahlung, Photonenstrahlung) einteilen. Die Wirkung besteht bei beiden Arten aus Energieabgabe an die umliegende Materie. Geladene Teilchen können dabei beim Durchdringen der Materie die Atome unmittelbar ionisieren und werden deshalb als direkt ionisierend bezeichnet. Die Photonen der Quantenstrahlung benötigen Wechselwirkungsprozesse mit Teilchen, die durch den Fotoeffekt oder Compton-Effekt mittels Energieabgabe Elektronen aus den Atomen lösen können und so zu geladenen Teilchen führen, die dann ihrerseits Energie an die Materie abgeben. Deshalb wird diese Strahlung auch als indirekt ionisierende Strahlung bezeichnet.

Die Energiedosis, die bei der Wechselwirkung von Strahlung mit Materie auf die Materie übertragen wird, ist definiert als absorbierte Energie pro Masse und wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben:

$$\text{Energiedosis} = \frac{\text{absorbierte Energie}}{\text{absorbierende Masse}} \quad 1\text{Gy} = \frac{1\text{J}}{1\text{kg}}$$

Das wichtigste Target der Strahlenwirkung in Zellen ist die Desoxyribonukleinsäure (DNA). Dabei entstehen sowohl bei der direkten als auch bei der indirekten ionisierenden Strahlung hochreaktive Radikale in der DNA, die ihrerseits zu chemischen Veränderungen und somit zu Schäden am Molekül führen können. Die verschiedenen Schäden und ihre Reparaturmöglichkeiten sollen in den folgenden Abschnitten 3.1 bis 3.4 näher erläutert werden.

3.1 Einzelstrangbrüche

Bei Einzelstrangbrüchen wird lediglich ein Strang des DNA-Moleküls aufgebrochen. Für die EAT-Zellen wurde festgestellt, dass die Anzahl der erzeugten Einzelstrangbrüche linear mit der Strahlendosis ansteigt [79,80]. Bei einer Dosis von 1 Gy werden etwa 1000 Einzelstrangbrüche pro Zelle erzeugt. Einzelstrangbrüche werden enzymatisch über eine Exzisionsreparatur behoben. Dabei wird zu beiden Seiten des Einzelstrangbruchs durch eine Endonuklease das Teilstück mit dem Defekt markiert, durch eine Exonuklease herausgeschnitten, durch eine DNA-Polymerase mit Hilfe der Information des intakten komplementären Stranges ersetzt und am Schluss durch eine Ligase mit dem originären Strang verknüpft.

Die EAT-Zellen können Einzelstrangbrüche innerhalb von wenigen Minuten fehlerfrei reparieren [81].

Einzelstrangbrüche werden also in der DNA bestrahlter Zellen in sehr großer Anzahl erzeugt, haben aber wegen ihrer schnellen und fehlerfreien Reparatur [82] für den Zelltod keine Bedeutung [83] und können somit als nichtletale Strahlenschäden bezeichnet werden.

3.2 Einzelbasenschäden

Bei Einzelbasenschäden kommt es zu einer irreversiblen Strukturveränderung einer Base des DNA-Moleküls. Man kann annehmen, dass Einzelbasenschäden etwa so häufig wie Einzelstrangbrüche in den Zellen erzeugt werden und ebenso schnell und fehlerfrei wie diese repariert werden können [84]. Einzelbasenschäden werden ähnlich wie Einzelstrangschäden über eine Exzisionsreparatur behoben, wobei die initialen Schritte der Erkennung und Entfernung der geschädigten Base über verschiedene Enzyme vermittelt sein können [85]. Da über eine fehlerhafte Reparatur von Einzelbasenschäden nichts bekannt ist, kann angenommen werden, dass sie fehlerfrei geschieht und keinen nennenswerten Einfluss auf den Zelltod bei Säugetierzellen hat [83].

3.3 Doppelstrangbrüche

Bei Doppelstrangbrüchen der DNA sind beide Stränge dicht beieinander aufgebrochen.

Schäden dieser Art sind in den EAT-Zellen hauptsächlich für die letale Wirkung ionisierender Strahlung verantwortlich [79,86,87,88]. Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der Schäden linear mit der Bestrahlungsdosis ansteigt und dass bei einer Dosis von 1 Gy etwa 40 Doppelstrangbrüche pro Zelle entstehen, wobei aber nur etwa ein letaler Schaden entsteht [86]. Das kommt dadurch zustande, dass 39 von 40 Schäden innerhalb kürzester Zeit fehlerfrei repariert werden können.

Prinzipiell kann die Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination unter Zuhilfenahme der DNA des Schwesterchromosoms, durch nicht homologe Rekombination mittels Abbau beider Stränge, bis sie am Ort einer zufälligen Homologie wieder verknüpft werden können oder durch indirekte end-to-end-Verbindung ohne Verlust größerer DNA-Sequenzen erfolgen.

Einen Hinweis auf diagonal und glatt durch die DNA verlaufende Doppelstrangbrüche erhielt man durch die Untersuchung mit Restriktionsenzymen an den EAT-Zellen [89,90]. Dabei hat man festgestellt, dass diagonal durch die

DNA verlaufende Schäden reparabel, glatt durch die DNA verlaufende Brüche irreparabel sind.

Generell gelten nicht reparierte bzw. falsch reparierte Doppelstrangbrüche als wichtigster Mechanismus der biologischen Wirkung einer Bestrahlung.

3.4 Doppelbasenschäden

Bei Doppelbasenschäden werden zwei sich gegenüberstehende Basen der DNA geschädigt. Die DNA-Polymerase kann dort keine Reparatur vornehmen, da ihr die Information des komplementären Stranges zum Ersetzen fehlt. Der Defekt ist somit irreparabel.

Durch einen Doppelbasenschaden können ein oder höchstens zwei Gene auf der DNA geschädigt werden. Durch einen Doppelstrangbruch kann dagegen ein ganzer Chromosomenabschnitt mit viele Genen verloren gehen. Insbesondere kann ein Doppelstrangbruch in einem völlig redundanten Informationsbereich der DNA erfolgen oder in einer sehr häufig repetierten Sequenz und würde so immer zu einem wesentlichen Schaden führen [91], während das für einen Doppelbasenschaden an diesen Stellen nicht gelten würde. Man kann deshalb davon ausgehen, dass Doppelbasenschäden in Bezug auf eine Zellabtötung sehr viel weniger wichtig sind als Doppelstrangbrüche.

3.5 Zellzyklusveränderungen durch Bestrahlung

Der Zellzyklus wird in die G1-, S-, G2- und M-Phase eingeteilt. Die G1-Phase liegt zwischen M- und S-Phase und gibt der Zelle Zeit zum Wachsen, zur Reparatur und zur Beobachtung der Umgebung. Bei günstiger Umgebung kann die Zelle den Schritt zur Teilung einleiten.

In der S-Phase verdoppelt die Zelle ihre DNA mittels Replikation. Am Ende dieser Phase besteht jedes Chromosom aus zwei Schwesterchromatiden.

In der G2-Phase gewinnt die Zelle Zeit, um vor der Teilung noch weiter zu wachsen und gleichzeitig zu prüfen, ob die DNA-Replikation abgeschlossen ist.

Während der M-Phase (Mitosephase) wandern die verdoppelten Chromosomen entlang der Mikrotubuli zu den Polen der Mitosespindel, eine neue Kernmembran bildet sich um jede Erbgutgruppe und die Zellmembran schnürt sich am Ende zwischen beiden Kernen ein, so dass zwei neue Tochterzellen entstehen.

Spezielle Gene und deren Proteine steuern ein hochspezialisiertes Zellzyklus-Kontrollsystem. Dabei prüfen sie an bestimmten Kontrollpunkten (checkpoints), ob der vorangegangene Schritt erfolgreich abgeschlossen wurde. Nur wenn das der Fall ist, wird der nächste Schritt eingeleitet. Der G1-Checkpoint liegt am Ende

der G1-Phase und verhindert, dass sich Zellen mit beschädigter DNA in die S-Phase begeben. Der G2-Checkpoint gewährleistet den Zellen vor der Mitose Zeit zur Bestandsaufnahme und ggf. Reparaturprozessen.

Nach Bestrahlung kommt es typischerweise an verschiedenen Checkpoints zu einer dosisabhängigen Zellzyklusverzögerung. Nach Dosen von 1-3 Gy kommt es in Säugetierzellen regelmäßig zum G2-Block. Die Dauer des Blocks beträgt etwa 10% der Zellzykluszeit pro appliziertem Gy.

3.6 Strahlenempfindlichkeit der Zellen in verschiedenen Zyklusphasen

Untersuchungen an synchronisierten Zellkulturen haben gezeigt, dass Zellen in der G2- und M-Phase am empfindlichsten auf Strahlen reagieren und in der späten S-Phase die höchste Strahlenresistenz aufweisen [92]. Die Ausprägung der Sensitivität und Resistenz schwankt zwischen verschiedenen Zellkulturen erheblich. Die Strahlensensitivität in der G2-/M-Phase kommt durch die in dieser Zeit inaktiven Reparaturenzyme zustande.

Bestrahlt man Zellen einer nicht synchronisierten Zellpopulation, sterben zunächst die Zellen in der empfindlichsten Zellzyklusphase ab. Der Anteil der Zellen in den resistenteren Phasen nimmt somit nach Bestrahlung relativ zu und es kommt bei den überlebenden Zellen zur Ausbildung des dosisabhängigen G2-Blocks. Dadurch kommt es in der Zellpopulation zu einer partiellen Synchronisation der Zellzyklusverteilung. Mit größerem zeitlichen Abstand zur Bestrahlung verteilen sich die Zellen wieder auf alle Phasen des Zellzyklus.

3.7 Klonogener Zelltod durch Bestrahlung

Unbegrenzt teilungsfähige Tumorzellen und Stammzellen von Normalgeweben werden auch als klonogene Zellen bezeichnet, weil sie die Fähigkeit haben, durch mehrere Zellteilungen Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen zu bilden. Diese Koloniebildungsfähigkeit (Klonogenität) kann durch Bestrahlung verloren gehen und wird dann als klonogener Zelltod bezeichnet.

Nach Bestrahlung mit klinischen Dosen von 1 – 3 Gy sterben die meisten Zellen nicht sofort ab, sondern bleiben morphologisch intakt und metabolisch aktiv. Dabei können die bestrahlten Zellen sogar noch ein- bis zweimal die Mitose durchlaufen, bevor Chromosomenschäden zu einem frühzeitigen Ende derselben führen. Dieser sogenannte Mitosetod ist bei der Bestrahlung von Tumoren der wichtigste Mechanismus zur Abtötung der Tumorzellen.

Zusätzlich kann es durch Bestrahlung zur Einleitung von frühzeitiger Apoptose kommen, so dass die Zellen schon vor der nächsten Teilung sterben. Dieser Mechanismus der Abtötung der Zellen wird auch als Interphasetod bezeichnet.

4 Material und Methoden

4.1 Ehrlich-Aszites-Tumorzellen als Zellsuspension

Bei den verwendeten Ehrlich-Aszites-Tumorzellen (EAT-Zellen) handelt es sich um ein Spontankarzinom der Brustdrüse von Mäusen, das bei allen Mäusestämmen auftritt [93]. Von mehreren vorhandenen EAT-Zellstämmen wurde ein spezieller [94], annähernd diploider Zellstamm verwendet [95], bezeichnet als EAT-F5, der den Vorteil hat, in vitro als Zellsuspensionskultur zu wachsen [96]. Im Vergleich zu anwachsenden Zellen haben Zellsuspensionskulturen einige experimentelle Vorteile, z.B. findet keine Beeinflussung der Zellen bzw. der Zellmembran durch eine Trypsinbehandlung wie bei anwachsenden Zellen statt. Des Weiteren lassen sich diese Zellen als Aszitestumor in der Bauchhöhle von Mäusen kultivieren und erzeugen durch Impfen in den Oberschenkel der Maus einen soliden Tumor.

Die EAT-Zellen werden in einzelnen Plastikröhrchen mit je 3 ml Inhalt in tiefgefrorenem Zustand aufbewahrt, um jederzeit die gleichen Zellen zur Verfügung zu haben (Kap. 4.1.1). Taut man eine Probe auf und führt mit den Zellen eine tägliche Passage durch (Kap. 4.1.3), stehen ebenso täglich Zellen mit exponentieller Teilung zur Verfügung.

Die Experimente dieser Arbeit wurden stets mit Mischpopulationen aus stationären und sich teilenden Zellen durchgeführt. Auf die Synchronisation der Zellen auf eine Zyklusphase hin wurde mit der Überlegung verzichtet, dass sich in einem soliden Tumor ebenfalls Zellen in jeder Zyklusphase befinden.

4.1.1 Tiefgefrorene Zellstämme

Beim Einfrieren von Säugetierzellen können osmotische Veränderungen zu irreversiblen Änderungen an den Riboproteinkomplexen führen, was wiederum für die intrazelluläre Spaltung von Membranen verantwortlich gemacht werden kann [93]. Dieses Problem lässt sich durch Hinzufügen von Glycerin oder Dimethylsulfoxid (DMSO) in das Medium vor dem Einfrieren der Zellen weitgehend umgehen. [97,98]. Die hier benutzten EAT-Zellen werden wie folgt eingefroren: im exponentiellen Wachstum werden die Zellen in einer Konzentration von 6×10^5 Zellen/ml in Nährmedium (A₂-Medium, Kap. 4.2) mit einem Anteil von 10% DMSO versetzt und in 1,8-ml-Ampullen (Nunc) bei -80°C eingefroren und gelagert.

Das Auftauen der Zellen ist unproblematisch, solange es hinreichend schnell, d.h. in etwa einer Minute in einem Wasserbad mit 37°C geschieht. Die aufgetaute Zellsuspension wird dann in ein Reagenzglas gegeben und über einen Zeitraum von ca. 1,5 Stunden in 0,5 ml-Schritten mit A₂-Medium auf insgesamt 10 ml aufgefüllt. Die Konzentration des DMSO ist bis dahin hinreichend verdünnt und beeinträchtigt die Zellen nicht in ihrem Wachstum. In dieser „neuen“ quasikontinuierlichen Kultur der Passage beginnen die Zellen nach etwa 24 Stunden mit ihrer normalen Vermehrung.

4.1.2 Zellvermehrung

Unter optimalen Wachstumsbedingungen lassen sich in einer Kultur mit begrenztem Nährmedium (Batchkultur) drei zeitlich aufeinander folgende Phasen der Zellvermehrung unterscheiden. Auf eine Phase mit exponentiellem Wachstum folgt eine stationäre Phase. Werden die Zellen zuvor in ein anderes Nährmedium gebracht oder überführt man stationäre Zellen in frisches Nährmedium, tritt in der Regel zu Beginn noch eine „Lagphase“ auf, da sich die Zellen vor Eintreten in einen neuen Zellzyklus erst an die neuen Bedingungen adaptieren müssen.

Die Zellkonzentration in der stationären Phase bleibt annähernd konstant, da ein Gleichgewicht zwischen dem Absterben der Zellen und ihrer geringen Vermehrung eingetreten ist. Die geringere Zellvermehrung lässt sich auf einen Mangel an Wachstumsfaktoren im Nährmedium zurückführen, wobei ein Nährstoffmangel als Ursache wegen immer noch hinreichender Konzentration von Nährstoffen ausgeschlossen werden kann.

Die Abb. 2 zeigt eine experimentell bestimmte Zellvermehrungskurve für die hier benutzten Zellen und Nährmedium. Dazu wurden jeweils 10 ml einer Zellsuspension in Kulturflaschen mit einer Anfangskonzentration von 1×10^5 Zellen/ml im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂ inkubiert. Alle 24 Stunden wurde die Zellkonzentration durch Anfärben mit Methylblau und manuellem Auszählen in der Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Zellkonzentration in der stationären Phase betrug nach 72 Stunden $8,2 \times 10^5$ Zellen/ml.

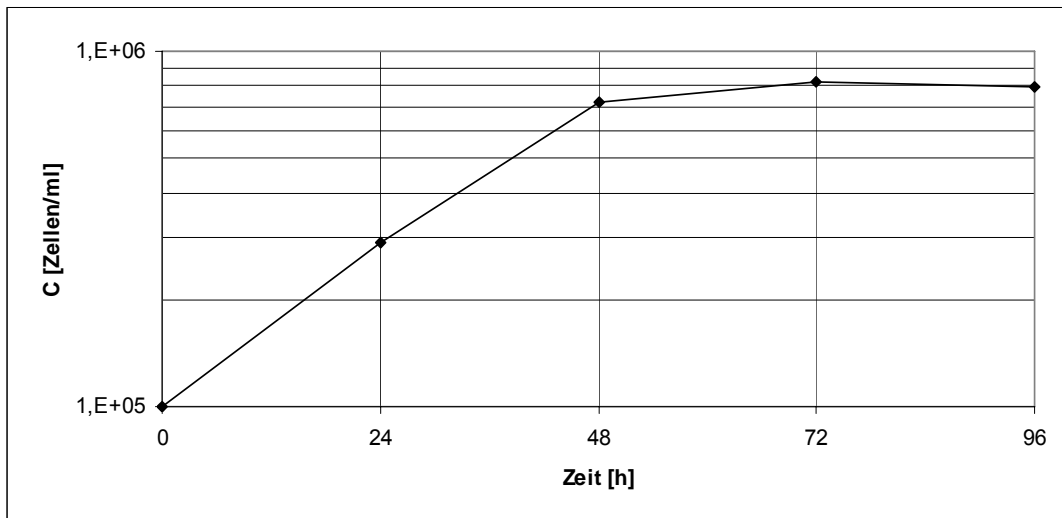


Abb. 2: Aufwachskurve von EAT-Zellen. Stamm EAT-F5, in A₂-Medium bei T=37°C, die bei t=0 aus einer quasikontinuierlichen Kultur in eine Batchkultur überführt wurden.

4.1.3 Quasikontinuierliche Kultur, Passage

Die Passage dient der kontinuierlichen Bereitstellung von exponentiell wachsenden und stationären Zellen. Hierzu werden die Zellen in sterilen Kulturflaschen zu je 40 ml mit einer Anfangskonzentration von 1×10^5 Zellen/ml in A₂-Medium inkubiert. In 48 Stunden vermehren sich die Zellen um einen Faktor 6 (6 bis 7) auf 7×10^5 Zellen/ml. In diesem Zustand werden die Zellen abzentrifugiert und erneut mit einer Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml in frischem A₂-Medium resuspendiert.

Für die Versuche wurden die Zellen zum Zeitpunkt $t = 72$ h dieser kontinuierlichen Passage entnommen und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in frischem A₂-Medium in insgesamt 10 ml suspensiert. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich die meisten Zellen in der stationären Phase, wobei sie in frischem Medium wieder in die exponentielle Phase übergehen. Es befindet sich zu Beginn eines Versuchs also eine weitgehend homogene Zellpopulation von stationären Zellen in der Suspension, die aber wieder in die Teilungsphase übergehen. Man kann also davon ausgehen, dass sich während des Versuchs diese Synchronisation wieder verliert und man eine Mischpopulation vorfindet.

Falls der Verdacht auftrat, dass sich bei den über mehrere Monate verteilten Experimenten Veränderungen im Zellwachstum auf die seit vielen Wochen dauernde Passage zurückführen lassen könnten, wurde eine weitere Zellprobe des Zellenarchivs aufgetaut und mit den in der täglichen Passage befindlichen Zellen verglichen. In keinem Fall konnte mit Sicherheit festgestellt werden, dass sich

eine Zelländerung eingestellt hatte. Der hier benutzte Zellstamm hat sich also über die mehrere Monate dauernde Experimentierphase als sehr stabil erwiesen. Für die weiteren Versuche wurde der jeweils neu aufgetaute Zellstamm verwendet.

4.2 Nährmedium für Zellkulturen

Damit sich Säugetierzellen in einer Suspension optimal vermehren können, benötigen sie ein speziell auf ihre Bedürfnisse angepasstes Nährmedium, das alle essentiellen Nährstoffe in idealer Konzentration enthält. Das hier benutzte A₂-Medium, das von Iliakis [99] entwickelt wurde, bietet für die hier verwendeten EAT-Zellen ein optimales Nährstoffverhältnis. Die Komponenten sind:

- Aminosäuren und Glukose (Hauptmetabolite im Stoffwechsel)
- Vitamine
- Salze (Herstellen eines optimalen osmotischen Drucks und pH-Wertes, Bereitstellung anorganischer Ionen)
- Kälberserum (zusätzliche Metabolite, Hormone und Wachstumsfaktoren)
- Natriumbikarbonat und HEPES-Puffer (für einen optimalen pH-Wert im Brutschrank und in Normalatmosphäre)
- Antibiotika und Fungizone

Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Komponenten wird in Tab. 1 angegeben.

Die Konzentration von Natriumbikarbonat ist so gewählt, dass sich im Brutschrank bei der für die Zellvermehrung optimalen Temperatur von 37°C ein ebenfalls optimaler pH-Wert von 7,4 ergibt. HEPES-Puffer sorgt dafür, dass sich der pH-Wert auch bei Manipulationen mit der Zellsuspension, wie z.B. beim Pipettieren oder Zentrifugieren, nicht verändert [100]. Die zugefügten Antibiotika und Fungizone schützen die Zellen vor Bakterien- und Pilzinfektionen, wobei sie in der gewählten Konzentration keinen Einfluss auf die Zellvermehrung haben.

Tabelle 1: Zusammensetzung des A₂-Mediums

Aminosäuren und Glukose	mg/dl	mmol/l
L-Arginin HCL	3032	0,144
L-Cystin	17,29	0,072
L-Histidin HCL	13,75	0,288
L-Isoleucin	37,76	0,288
L-Leucin	37,76	0,288
L-Lysin HCL	52,61	0,288
L-Methionin	10,74	0,072
L-Phenylalanin	23,77	0,144
L-Threonin	34,30	0,288
L-Tryptophan	5,88	0,029
L-Tyrosin	26,08	0,144
L-Valin	33,74	0,288
L-Glutamin	292,00	2,00
Glukose (Monohydrat)	5350	27,0
Vitamine		
Biotin	0,01	
Cholin Cl	1,5	
i-Inositol	1,5	
Nicotinamid	0,5	
Ca-Pantothenat	0,5	
Pyridoxal HCL	0,5	
Riboflavin	0,5	
Thiamin HCL	1,0	
Folsäure	10,0	
Vitamin B ₁₂	1,5	
Salze		
NaCl	4091	70
KCl	254	3,4
MgCl ₂ x 6H ₂ O	15	0,07
KH ₂ PO ₄	82	0,6
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	190	1,06
CaCl ₂ x 2H ₂ O	15	0,1
Phenolrot	12	
Kälberserum	100 ml/l	
Natriumbikarbonat		
NaHCO ₃	3024	36
HEPES-Puffer		
HEPES	4766	20
Antibiotika und Fungizone		
Penicillin	100 IE	
Streptomycin	100 IE	
Amphotericin B	2,5	
Destilliertes H ₂ O	200 ml/l	

4.3 Bestimmung des Zellüberlebens

4.3.1 Makrokolonietest / Clonogenic assay

Mit dem Makrokolonietest kann der Anteil überlebender klonogener Zellen bestimmt werden. Man kann also in einer Zellpopulation die vitalen Zellen von den letal geschädigten Zellen unterscheiden.

Dabei werden die Zellen aus einer Zellsuspension nach geeigneter Verdünnung gut voneinander getrennt, aber räumlich fixiert auf einen Nähragar aufgebracht, der ihre Vermehrungsfähigkeit nicht einschränkt. Neben den behandelten Zellen (nach Bestrahlung oder Inkubation mit einem Chemotherapeutikum) wird immer eine Kontrolle von unbehandelten Zellen mitgeführt.

Alle vitalen Zellen erzeugen dann nach etwa zehn Tagen (Verdopplungszeit der EAT-Zellen ca. 12-15 h) je eine kleine, mit bloßem Auge sichtbare Zellkolonie mit etwa 1 bis 2 mm Durchmesser. Die Nährstoffkonzentration im Agar ist so gewählt, dass bei etwa 200 Kolonien pro Platte nach 10 Tagen keine weitere Zellvermehrung erfolgt. Somit kann man nach ca. 10 Tagen die erzeugten Kolonien auszählen und die Konzentration der ursprünglich vorhandenen vitalen Zellen ermitteln.

Wenn Zellen durch Bestrahlung letale Strahlenschäden in der DNA erleiden, können sie noch einige Male den Zellzyklus durchlaufen und sich vermehren, bevor sie sterben. Ein sichtbare Kolonie im Nähragar können sie aber nicht mehr bilden.

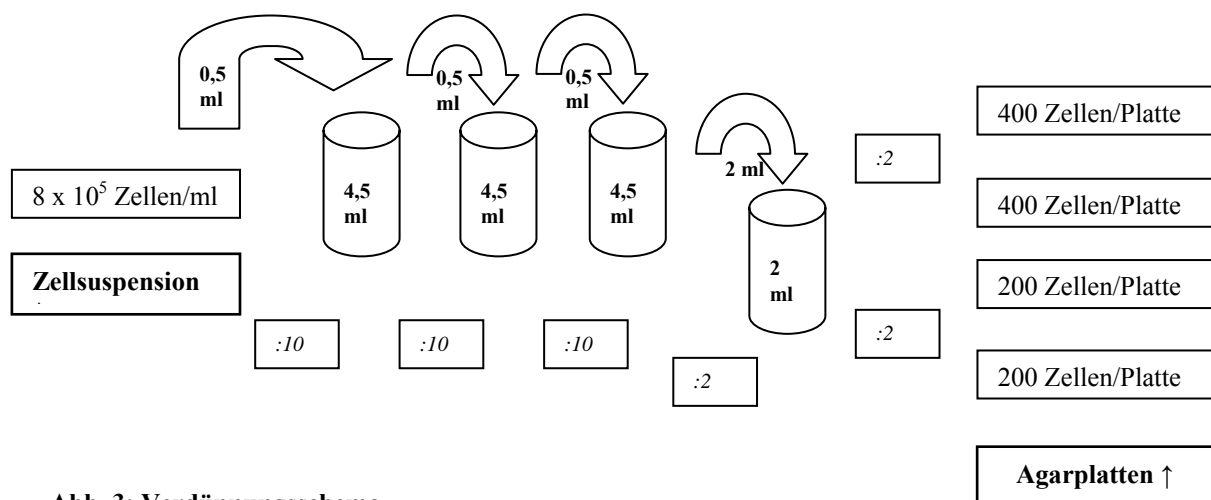


Abb. 3: Verdünnungsschema

4.3.2 *Praktische Durchführung des Tests*

Die Durchführung des Makrokolonietests gliedert sich in vier Hauptschritte, die hier ausführlich beschrieben werden sollen:

1) Herstellen von Nähragarplatten (Grundagar)

Für die Agarlösung werden 4,3 g Agarpulver in 400 ml destilliertes Wasser gegeben und 20 Minuten bei 120°C im Autoklav gekocht und sterilisiert, wobei eine gelartige Lösung entsteht. Die Lösungen werden in einem Wärmeschrank bei $T = 60^\circ\text{C}$ aufbewahrt und stehen so eine Woche zum Herstellen von Nähragar zur Verfügung. Vor jedem Experiment werden die Lösungen frisch hergestellt, Reste nach einer Woche verworfen.

Des Weiteren wird zweifach konzentriertes A_2 -Medium benötigt, das man im Verhältnis 1:1 mit der Agarlösung mischt. Dabei sollte das A_2 -Medium auf ca. 30°C vorgewärmt und der Agar auf ca. 50°C abgekühlt werden, damit beim Mischen eine Nähragarlösung mit ca. 40°C entsteht. Bei dieser Temperatur bleibt der Agar noch flüssig, kann problemlos auf die Platten aufgebracht werden und die Bestandteile des Nährmediums werden weder zerstört noch deaktiviert.

Dieser Nähragarlösung werden nun noch mit 20 Gy bestrahlte, abgetötete EAT-Zellen in einer Konzentration von $1 \times 10^4/\text{ml}$ zugesetzt, die als „Feeding-Layer“ bezeichnet werden. Zwar ist die Anzahl und Größe der von den EAT-Zellen erzeugten Makrokolonien unabhängig vom „Feeding-Layer“, aber dennoch scheint er den Einfluss kleiner Schwankungen im Nährstoffmilieu des Nähragars herabzusetzen und wurde deshalb stets dem Nähragar zugesetzt. Der so entstandene Nähragar wird auch als Grundagar bezeichnet.

Zur Herstellung der Nähragarplatten werden je 6 ml der Nähragarlösung in Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm pipettiert. Bei Raumtemperatur erstarrt die Nähragarlösung in ca. 2-4 Minuten. Wenn der Nähragar homogen fest ist, werden die Platten in einen Brutschrank mit 37°C und 6% CO_2 gebracht, wo sie bis 24 Stunden vor einem Experiment aufbewahrt werden können.

Das Ansetzen der Platten einen Tag vor dem Experiment hat theoretisch den Vorteil, dass eventuelle bakterielle Infektionen schon vor der eigentlichen Versuchsdurchführung erkannt werden können und dass sich Stoffwechselprodukte des „Feeding-Layers“ homogen verteilen können. Praktisch hat sich gezeigt, dass die Zellen auf frisch vor dem Experiment hergestellten Nähragarplatten gleichermaßen gute Makrokolonien bilden. Daher wurden die Platten im Hinblick auf die mögliche Bildung von Schimmel, die bei diesen Versuchen das größere Problem darstellte, an jedem Versuchstag frisch hergestellt.

2) Beschichten der Platten mit Zellen in Nähragar (Überschichtungsagar)

Für die Agarlösung werden 2,3 g Agarpulver in 200 ml destilliertes Wasser gegeben und 20 Minuten bei 120°C im Autoklav gekocht und sterilisiert. Auch diese gelartige Lösung wird im Wärmeschrank bei $T = 60^\circ\text{C}$ aufbewahrt, vor jedem Experiment neu hergestellt und nach einer Woche verworfen.

Die auf etwa 50°C abgekühlte Agarlösung wird ebenso zur Herstellung des Überschichtungsagars im Verhältnis 1:1 mit vorgewärmtem zweifach-konzentriertem A₂-Medium gemischt.

Von dieser Nähragarlösung werden je 3 ml in Reagenzgläser gefüllt. Diese werden in einen Thermoblock mit $T = 40^\circ\text{C}$ gestellt, damit der Agar während der Arbeitsschritte flüssig bleibt. In geschlossenen Reagenzgläsern kann der pH-Wert von 7,4 in Laborluft für ca. 1 Stunde konstant gehalten werden.

Jeder zu testenden Zellsuspension werden zunächst 50 µl entnommen, mit gleichen Teilen Methylenblau gefärbt und unter dem Lichtmikroskop mittels Thoma-Zählkammer die Zellkonzentrationen bestimmt. Je nach Konzentration wird die zu testende Zellsuspension mit A₂-Medium in der Verdünnungsreihe so verdünnt, dass später 400, bzw. 200 Makrokolonien auf jeder Agarplatte erwartet werden können. Im letzten Verdünnungsschritt werden 1,5 ml der Zellsuspension in die mit 3 ml Nähragarlösung gefüllten Reagenzröhrchen gegeben und sanft aber gut vermischt. Dann werden 3 ml dieser Nähragarlösung mit den Zellen entnommen und je 1,5 ml auf zwei vorbereitete Platten mit Grundagar pipettiert. Der Überschichtungsagar verteilt sich mit den Zellen gleichmäßig über den Nährboden und erstarrt nach wenigen Minuten. Nach etwa 10 Minuten bei Raumtemperatur werden die fertigen Platten in den Brutschrank mit 37°C und 6% CO₂ gestellt und 10 bis 14 Tage inkubiert.

3) Inkubieren der Platten

Der Brutschrank begast die Zellen kontinuierlich mit 6% CO₂ und hält eine Temperatur von 37°C aufrecht. Am Boden des Schrankes ist eine Wasserschicht, die die Luft für den Nähragar und die Zellschicht im Überschichtungsagar hinreichend feucht hält und Dampfverluste beim Öffnen des Brutschrankes ausgleicht.

Temperaturschwankungen, wie sie beim Öffnen des Schrankes auftreten, können vernachlässigt werden, da pro Experiment in der Regel mehrere Hundert Platten im Schrank dicht beieinander stehen und deren Wärmekapazität die Schwankungen abfangen kann.

Nach ca. 10 bis 14 Tagen sind die Makrokolonien der vitalen Zellen aufgewachsen und können ausgezählt werden. Um das Auszählen zu erleichtern,

kann man die Platten einige Stunden zuvor aus dem Brutschrank nehmen, damit sich die Agarschicht verfestigt und beim Schwenken der Platten nicht verrutscht.

4) Auszählen der Makrokolonien

Die Agarplatten werden zum Auszählen umgedreht und von unten durchleuchtet. Mit einem elektronischen Zählstift wird jede Kolonie mit einem Punkt markiert und dabei automatisch mit dem Zähler erfasst. Pro Versuchspunkt wurden bei den Experimenten 4 bis 6 Agarplatten ausgezählt. Die Verdünnung der Zellsuspensionen war so gewählt, dass sich ca. 300 bis 400 auf jeder Platte befanden, der stochastische Fehler beim Auszählen betrug somit ca. 4%.

Am Ende jeder Verdünnungsreihe erfolgte noch eine weitere Verdünnung um einen Faktor 2, so dass hier 150 bis 200 Kolonien auf den Platten erwartet werden konnten. Damit kann überprüft werden, ob das Wachstum der Zellen auf der Agarplatte von der Anzahl der Zellen pro Platte abhängt. So lässt sich feststellen, ob es Fehler bei der Herstellung des Nähragars oder der Platten gibt.

Durch das Auszählen der Makrokolonien erhält man die Angehrate der unbehandelten Zellen der Kontrolle, die sogenannte plating efficiency (PE) und die Überlebensrate der behandelten Zellen, die sogenannte surviving fraction (SF).

Die PE errechnet sich aus den gezählten Makrokolonien und den mittels Zählung unter dem Mikroskop und den Faktoren der Verdünnungsreihe errechneten ausgeplatteten Zellen (hier meist 200 oder 400):

$$PE = \frac{\text{Anzahl Makrokolonien}}{\text{Anzahl ausgeplattete Zellen}}$$

Nicht alle unbehandelten Zellen bilden eine Kolonie. Das kann zum einen daran liegen, dass ein bestimmter Anteil der Zellen beim Aufbringen des Zellagars zerstört wird, zum anderen daran, dass bei der Bestimmung der Zellkonzentration in der Suspension mittels Anfärben und Auszählen in der Thoma-Zählkammer, nach der sich die Verdünnung richtet, schon avitale Zellen erfasst werden.

In der Regel lag die PE bei den hier durchgeführten Experimenten bei 0,35 – 0,4, d.h. 35 bis 40 % der ausgeplatteten unbehandelten Zellen bildeten eine Makrokolonie.

Die SF der behandelten Zellen erhält man, indem man die Angehrate der behandelten Zellen durch die PE der Kontrolle dividiert:

$$SF = \frac{PE \text{ der behandelten Zellen}}{PE \text{ der Kontrolle}}$$

Man erhält somit das Überleben der behandelten Zellen relativ zur Kontrolle.

4.4 Bestrahlungsgerät

Zur Bestrahlung wurde das Blutbestrahlungsgerät CIS IBL 437C verwendet, das mit zwei ¹³⁷Cs-Quellen ausgestattet ist. Das Gerät wird neben der routinemäßigen Bestrahlung von Blutkonserven auch zur Bestrahlung von Zellkulturen verwendet, wobei die verwendete Dosis bei Blutkonserven vielfach höher ist als die bei Zellkulturen (25 vs. 2 Gy). Die leichte Handhabbarkeit und seine weitgehend uneingeschränkte Verfügbarkeit prädestinieren das Gerät für die Anwendung in der biomedizinischen Grundlagenforschung.

Nach Angabe des Herstellers betrug die Dosis in der Mitte des vollständig mit Wasser gefüllten Behälters am 30. Juni 1994 6,68 Gy. Veranschlagt man eine Halbwertszeit von 30,15 a, so erhält man durch Anwendung des Zerfallsgesetzes für den Zeitraum der Bestrahlungen in diesem Experiment eine Dosisleistung von 0,0908 Gy/s. Durch einen Trommelmechanismus wird der zylindrische Bestrahlungsbehälter in Bestrahlungsposition geschwenkt und rotiert dort mit 18 Umdrehungen pro Minute.

Die gewünschte Bestrahlungsdosis wird über die Einstellung der Bestrahlungsdauer in vollen Sekunden vorgenommen. Für eine gewünschte Dosis von 2 Gy wurden beispielsweise 22 s eingestellt, in dieser Zeit rotiert der Bestrahlungsbehälter 6,6 Mal.

Für die Bestrahlung der Zellsuspensionen in verschlossenen Reagenzgläsern wurde eine Halterung für maximal 4 Reagenzgläser aus Plexiglas hergestellt, die genau in die zylindrischen Bestrahlungsbehälter passt und gewährleistet, dass die Proben an gleicher Position im Behälter stehen. Dies ist insofern wichtig, als dass die Dosis im luftgefüllten bestrahlten Zylinder zentral etwas höher ist als peripher. Insgesamt ist die Dosisverteilung in den peripheren Bereichen des Zylinders in Luft aber annähernd homogen und Schwankungen wurden daher vernachlässigt.

Anzumerken ist, dass die Dosis im luftgefüllten Zylinder bei einer Bestrahlungszeit von 22 s zentral 127% der Dosis im wassergefüllten Zylinder beträgt. Bei einer eingestellten Solldosis von 2 Gy werden also tatsächlich

2,54 Gy verabreicht. Dieser Effekt ist auf die fehlende Schwächung des Wassers zurückzuführen [101].

Bei diesen Experimenten wurde keine manuelle Manipulation dieser Abweichung vorgenommen, da entsprechende Messwerte für die äußeren Bereiche des Zylinders noch nicht vorhanden sind. Sämtliche Proben aller Experimente wurden mit der nach Herstellerangaben vorgegebenen entsprechenden Zeit bestrahlt und sind untereinander daher vergleichbar.

4.5 Chemotherapeutikum

Das bei den Experimenten verwendete Paclitaxel stammt von der Firma Mayne. Dabei enthält eine Durchstechflasche mit 5 ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung 30 mg Paclitaxel, 2635 mg Macroglyceroleserinoleat (Cremophor[®]EL) 49,7 Vol-% Ethanol und Zitronensäure.

Das Konzentrat wurde mit der Infusionslösung NaCl der Firma Braun auf eine Konzentration von 1 µmol/l verdünnt und lichtgeschützt im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt. Um die gewünschte Konzentration Paclitaxel in den verschiedenen Zellsuspensionen zu erreichen, wurde jeweils die geeignete Menge des verdünnten Konzentrates entnommen und vorsichtig unter ständigem sanften Schwenken in die Zelllösung getropft.

4.6 Versuchsablauf

Für alle Experimente standen die EAT-Zellen aus der kontinuierlichen Passage bereit (Kap. 4.1.3). Diese wurden vor den Experimenten in entsprechender Menge vermehrt, 3 Tage vor Versuchsbeginn ein letztes mal passagiert und somit zum Zeitpunkt $t = 72\text{h}$ der Passage entnommen und auf die gewünschte Anfangskonzentration von 1×10^5 Zellen/ml mit frischem A₂-Medium verdünnt.

Jeweils 10 ml dieser Zellsuspension wurden in kleine Zellkulturflaschen gefüllt. Bei jedem Experiment wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt und die Ergebnisse der behandelten Proben relativ zu ihrer Kontrolle ausgewertet. Ebenso wurden neben der unbehandelten Kontrolle alle „Einfachkontrollen“ mitgeführt. Das bedeutet, dass zu jedem Zeitpunkt der Bestrahlung und Paclitaxelzugabe zuvor unbehandelte Kontrollen eine dieser beiden Behandlungen erfuhren, damit sich das Überleben bei alleiniger Radio- oder Chemotherapie mit dem bei Radiochemotherapie direkt vergleichen lässt. Mit Hilfe dieser Kontrollen lässt sich dann eine Aussage über synergistische oder additive Effekte treffen.

Den Proben, die mit Paclitaxel inkubiert wurden, wurde langsam und vorsichtig unter ständigem sanften Schwenken die entsprechende Menge Paclitaxel zugeführt.

Die Zellsuspensionen der Proben, die bestrahlt wurden, wurden zu diesem Zweck nach sanftem Aufschütteln in verschließbare Reagenzgläser überführt und mit der jeweiligen Dosis im Blutbestrahlungsgerät (Kap. 4.4) bestrahlt. Danach wurden die Suspensionen zur weiteren Inkubation in frische Zellkulturflaschen gefüllt.

Während eines Messzeitpunktes wurden die Zellsuspensionen so kurz wie möglich an Raumluft belassen, um Verschiebungen des pH-Wertes zu vermeiden. Die Messung des Anteils der vitalen Zellen erfolgte stets mittels Makrokolonietest (Kap. 4.3.1).

4.6.1 Kontrollen und Dosiswirkungskurven

In der ersten Versuchsphase wurden die Dosiswirkungskurven für die Bestrahlung mit 1, 2, 3, 4 und 5 Gy, sowie für die Inkubation mit 10, 25, 50 und 100 nmol/l Paclitaxel und 1 und 2,5 ml/l Cremophor[®]EL/Ethanol bestimmt, um eventuelle zytostatische Effekte des letzteren aufspüren oder ausschließen zu können.

Anhand dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Versuche jeweils eine Dosis von 2 Gy und eine Konzentration von 25 nmol/l Paclitaxel festgelegt, mit der alle weiteren Experimente durchgeführt wurden. Diese Werte wurden deshalb so gewählt, weil die jeweiligen Überlebensraten der Zellen hoch genug waren, um beide Effekte nachweisen zu können.

4.6.2 Experimente mit kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel

Den Proben wurden hier zum Zeitpunkt t Paclitaxel in einer Konzentration von 25 nmol/l beigesetzt und bis zum Ende des Versuchs zum Zeitpunkt $t = 96$ h in der Zellsuspension gelassen. Der Zeitpunkt t ist der jeweilige Abstand der Paclitaxelzugabe zur Bestrahlung.

Dabei gibt es zwei Versuchsschemata:

- a) Alle Proben erhielten zum Zeitpunkt $t = 0$ ihre Dosis Paclitaxel und wurden nach 0, 3, 6, 9, 12, 24 oder 48 Stunden mit 2 Gy bestrahlt. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 24, 48, 72$ und 96 Stunden wurde das Überleben mit dem Makrokolonietest bestimmt. Als Kennzeichnung für die Reihenfolge wird im folgenden Text $P \rightarrow B$ (Paclitaxel \rightarrow Bestrahlung) verwendet.
- b) Alle Proben wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 2 Gy bestrahlt. Jeweils 3, 6, 9, 12, 24 oder 48 Stunden nach Bestrahlung wurde ihnen 25 nmol/l Paclitaxel zugesetzt. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 24, 48, 72$ und 96 Stunden wurde das Überleben mit dem Makrokolonietest bestimmt. Als Kennzeichnung für die Reihenfolge wird im folgenden Text $B \rightarrow P$ (Bestrahlung \rightarrow Paclitaxel) verwendet.

Pro Experiment wurden immer die gleichen zeitlichen Abstände untersucht, damit die Ergebnisse nicht von sich eventuell leicht unterscheidenden Zellsuspensionen zwischen verschiedenen Versuchen beeinflusst werden.

4.6.3 Experimente mit zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel

- c) Alle Proben erhielten zum Zeitpunkt $t = 0$ Paclitaxel in einer Konzentration von 25 nmol/l und wurden nach 0, 3, 6, 9, oder 12 Stunden mit 2 Gy bestrahlt. Direkt nach der Bestrahlung wurden die Proben zentrifugiert, der Überstand verworfen und die abzentrifugierten Zellen in frischem A_2 -Medium resuspendiert. Somit ist der Abstand zur Bestrahlung auch gleichzeitig die Dauer der Inkubation mit Paclitaxel. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 24, 48, 72$ und 96 Stunden wurde das Überleben mit dem Makrokolonietest bestimmt. Als Kennzeichnung für die Reihenfolge wird im folgenden Text $P_w \rightarrow B$ (Paclitaxel mit auswaschen \rightarrow Bestrahlung) verwendet.
- d) Alle Proben wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ mit 2 Gy bestrahlt. Jeweils 3, 6, 9, oder 12 Stunden nach Bestrahlung wurde ihnen 25 nmol/l Paclitaxel zugesetzt. Da auch hier der Abstand zur Bestrahlung der Dauer der Inkubation mit Paclitaxel entspricht, wurden die Proben nach weiteren 3, 6, 9, oder 12 Stunden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in frischem A_2 -Medium resuspendiert. Zu den Zeitpunkten $t = 0, 24, 48, 72$ und 96 Stunden wurde das Überleben mit dem Makrokolonietest bestimmt. Als Kennzeichnung für die Reihenfolge wird im folgenden Text $B \rightarrow P_w$ (Bestrahlung \rightarrow Paclitaxel mit auswaschen) verwendet.

5 Resultate

5.1 Kontrollen und Dosiswirkungskurven

Wie schon in Kap. 4.3.2 beschrieben, zeigten die Zellen der Kontrolle eine PE von 35 bis 40%.

In der ersten Versuchsphase ergab sich weiterhin bei der Bestimmung des Überlebens der mit 2 Gy bestrahlten Proben eine SF von $(27,1 \pm 1,4)\%$, die in den Experimenten der zweiten Versuchsphase bei den mit 2 Gy bestrahlten Proben mit durchschnittlich $(32,1 \pm 2,8)\%$ etwas höher lag. Das Überleben nahm als Funktion steigender Bestrahlungsdosis ab und ist in Abb. 4 dargestellt.

Die Proben, die die in den Versuchen benötigte Menge von 0,75 und 1,88 $\mu\text{g/ml}$ Lösungsvermittler Cremophor[®]EL/Ethanol enthielten, zeigten keine signifikante Veränderung des Überlebens (SF von $(95,5 \pm 0,2)\%$ bei 1 ml/l und $(97,5 \pm 6,0)\%$ bei 2,5 ml/l). Deshalb wurde in den folgenden Versuchen auf diese Kontrollen verzichtet. Cremophor[®]EL hat in der Mischung mit Ethanol in diesen Konzentrationen keinen nennenswerten zytostatischen Effekt. Die SF dieser Proben ist in Abb. 5 dargestellt.

Das Überleben der Proben, die kontinuierlich mit Paclitaxel inkubiert wurden, nahm mit steigender Paclitaxeldosis ab, wie in der Abb. 6 dargestellt ist. Die mit 25 nmol/l Paclitaxel inkubierte Probe zeigte eine SF von $(9,1 \pm 1,4)\%$. In den Experimenten der zweiten Versuchsphase lag die SF mit $(13,9 \pm 5,7)\%$ etwas höher. Ein Grund dafür könnte sein, dass es sich stets um ein Gemisch von Zellen in stationärer und Teilungsphase handelte, wobei sich keine Aussage über den jeweiligen Anteil treffen lässt. Die Standardabweichung ist mit 5,7 % deshalb hoch, weil die SF dieser Probe bei den verschiedenen Versuchen zwischen ca. 9 % und 20 % schwankte.

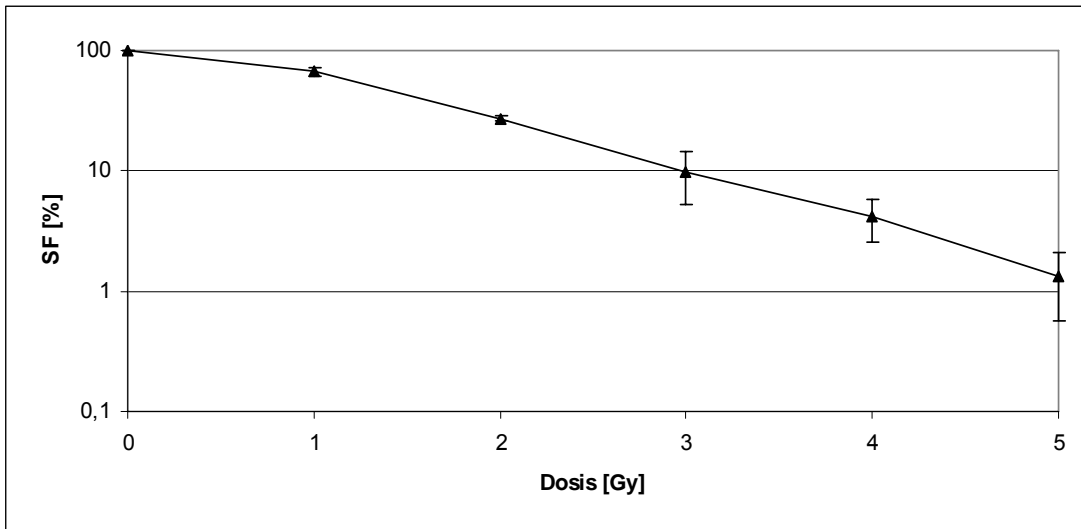


Abb. 6: Dosiswirkungskurve bei zunehmender Bestrahlungsdosis

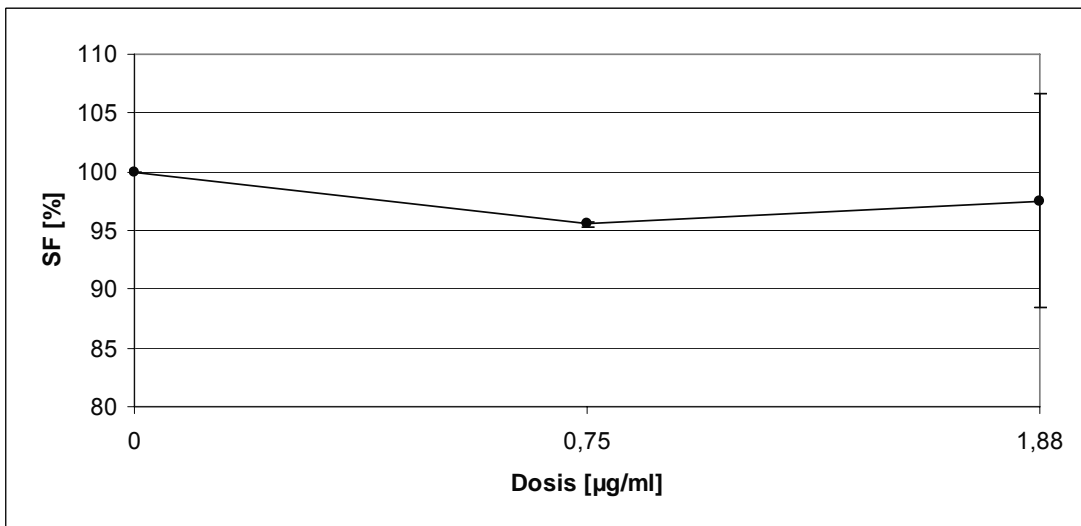


Abb. 6: Dosiswirkungskurve bei zunehmender Dosis des Lösungsvermittlers Cremophor®EL und Ethanol

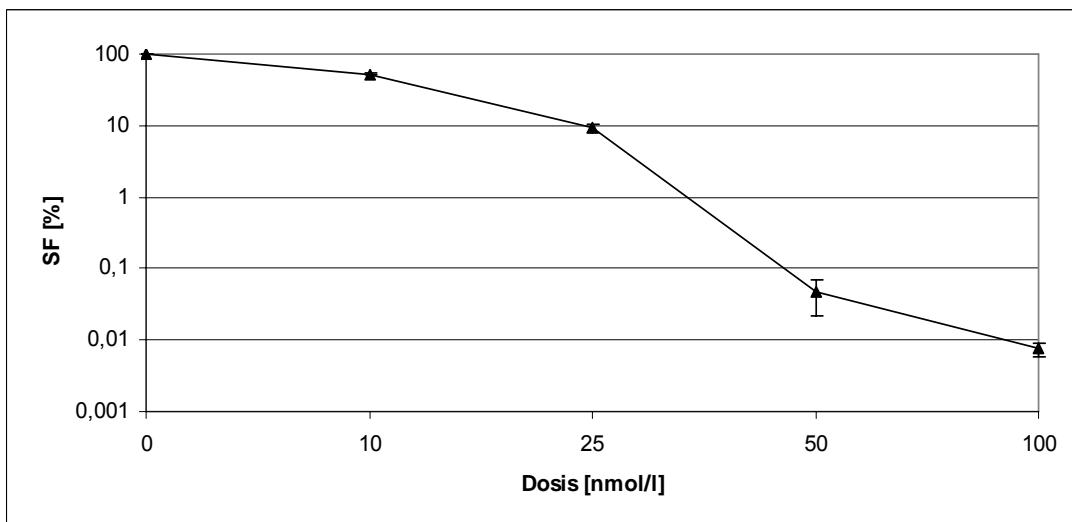


Abb. 6: Dosiswirkungskurve bei zunehmender Dosis von Paclitaxel

5.2 Experimente mit kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel

Wie im Methodenteil Kap. 4.6.2 beschrieben, wurden hier die Effekte bei Zeitabständen von 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden zwischen Bestrahlung und Inkubation mit Paclitaxel untersucht.

5.2.1 Experimente mit 3, 6, 9 und 12 Stunden Abstand

Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen 7 - 10 dargestellt. Dabei werden auch die SF der Einfachkontrollen gezeigt. Auf die Darstellung der unbehandelten Kontrolle wurde verzichtet, da ihre SF immer 100% beträgt. Man kann erkennen, dass die SF bei jedem zeitlichen Abstand bei der Reihenfolge $P \rightarrow B$ geringer ist als bei $B \rightarrow P$.

Bei einem Abstand von 3 Stunden beträgt die SF bei $B \rightarrow P$ ($3,9 \pm 1,2\%$) und bei $P \rightarrow B$ ($3,5 \pm 0,4\%$). Dieser Unterschied ist so gering, dass die Reihenfolge hier noch unerheblich zu sein scheint. Die SF der korrespondierenden Proben unterscheidet sich zunehmend bis zum Abstand von 9 Stunden und liegt bei 12 Stunden wieder näher beieinander. Bei einem Abstand von 9 Stunden ist die SF bei $P \rightarrow B$ mit ($1,2 \pm 0,5\%$) nicht nur am geringsten, sie unterscheidet sich auch am deutlichsten von der dazugehörigen zuerst bestrahlten Probe $B \rightarrow P$ ($4,63 \pm 2,29\%$). Bei einem Abstand von 12 Stunden liegen die SF mit ($7,9 \pm 2,6\%$) bei $B \rightarrow P$ und ($5,3 \pm 0,5\%$) bei $P \rightarrow B$ wieder höher.

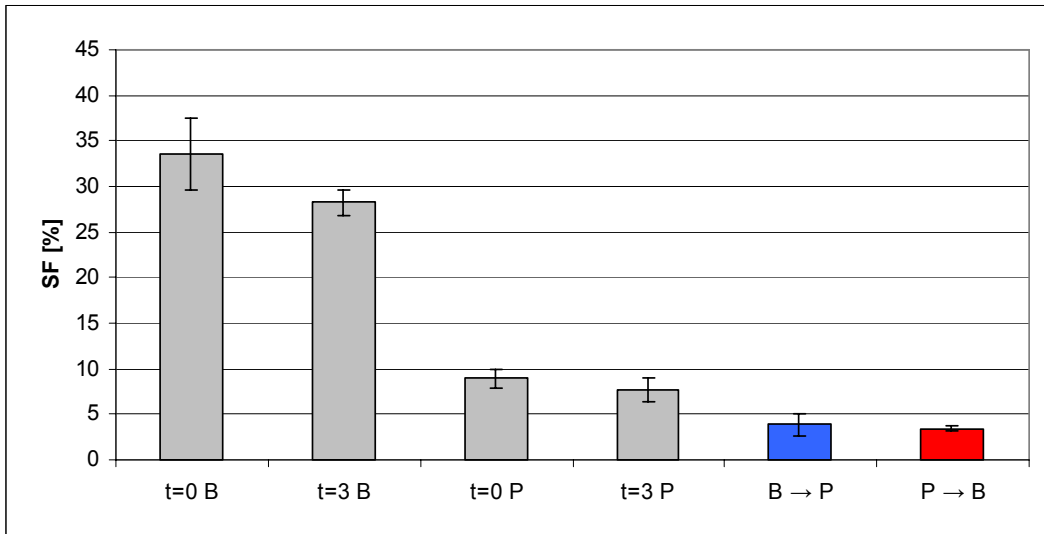


Abb. 7: Überlebensrate [SF] bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 3 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

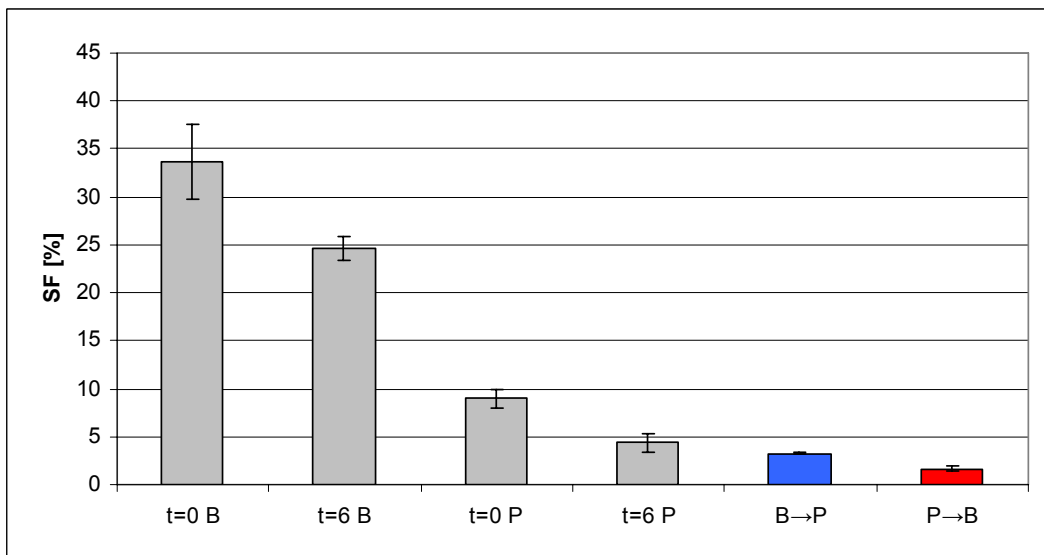


Abb. 8: Überlebensrate [SF] bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 6 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

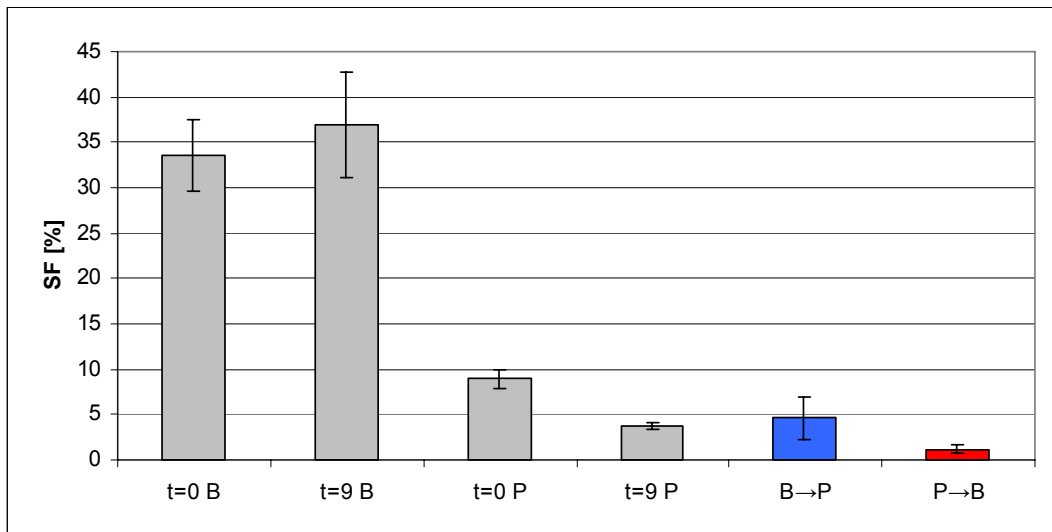


Abb. 9: Überlebensrate [SF] bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 9 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

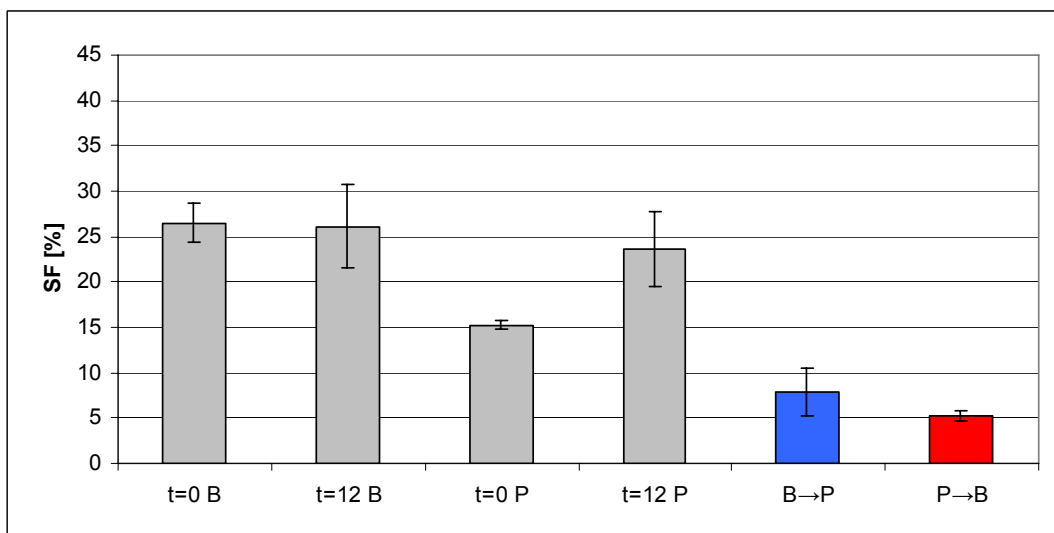


Abb. 10: Überlebensrate [SF] bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 12 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

5.2.2 Experimente mit 24 und 48 Stunden Abstand

Die Resultate sind in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt. Zunächst kann man erkennen, dass die SF der 24 und 48 Stunden später bestrahlten Kontrolle höher liegt als die der zum Zeitpunkt $t = 0$ bestrahlten Probe. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass mit der Zeit ein immer größerer Teil der Zellen in die stationäre und somit strahlenunempfindlichere Phase übergeht.

Bei diesen größeren Abständen zwischen Bestrahlung und Inkubation mit Paclitaxel zeigt sich ebenso bei der Reihenfolge $P \rightarrow B$ eine geringere SF als bei $B \rightarrow P$. Die SF der zuerst bestrahlten Probe ist bei einem Abstand von 6 Stunden am kleinsten, nimmt mit größer werdenden Abständen kontinuierlich zu und liegt bei einem Abstand von 24 h bei $(9,1 \pm 2,4)\%$ und bei 48 h bei $(20,3 \pm 1,5)\%$. Der zytotoxische Effekt dieser Reihenfolge nimmt also mit größerem zeitlichen Abstand deutlich ab. Dagegen liegen die SF der Proben mit $P \rightarrow B$ mit Ausnahme der 12-Stunden-Probe deutlich unter 5 %. Bei einem Abstand von 24 h liegt die SF bei $(3,2 \pm 1,1)\%$ und bei 48 h bei $(4,3 \pm 1,1)\%$.

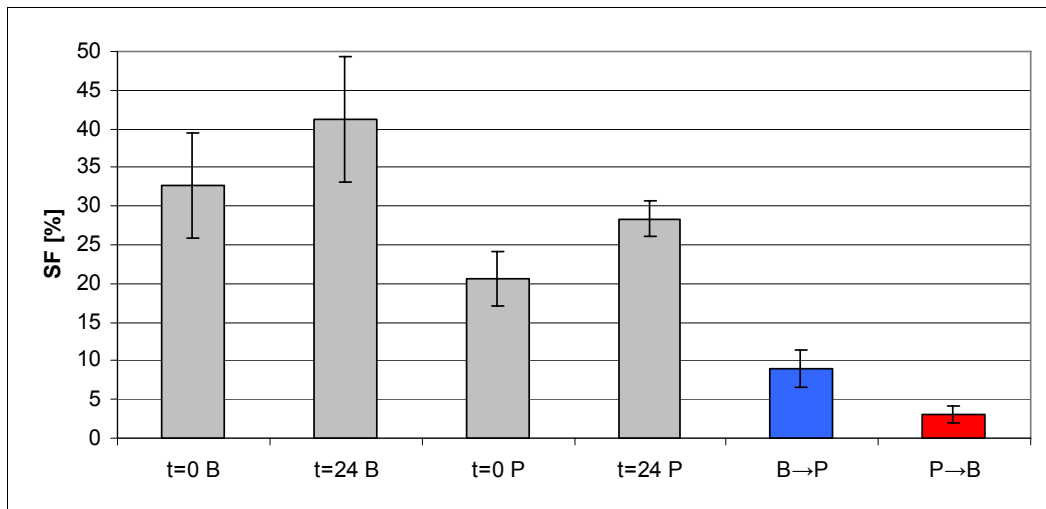


Abb. 11: Überlebensrate [SF] bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 24 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

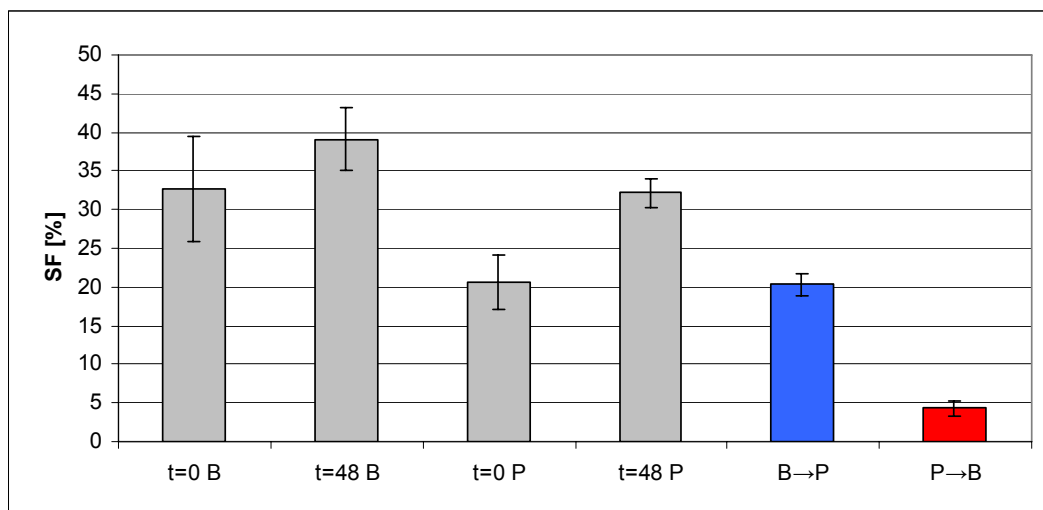


Abb. 12: Überlebensrate [SF] bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 24 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

5.3 Experimente mit zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel

Wie im Methodenteil Kap. 4.6.3 beschrieben, wurden hier die Zeitabstände von 3, 6, 9 und 12 Stunden zwischen Bestrahlung und Inkubation mit Paclitaxel untersucht. Dabei wurde jeweils nach 3, 6, 9 und 12 Stunden das Chemotherapeutikum Paclitaxel aus der Zellsuspension ausgewaschen.

5.3.1 Experimente mit 3, 6, 9 und 12 Stunden Abstand

Bei den Experimenten mit Einwirkzeiten des Paclitaxels zwischen 3 und 12 Stunden lässt sich erst ab einer Inkubationszeit von 9 Stunden ein sicherer zytotoxischer Effekt desselben nachweisen. Bei Einwirkzeiten von 3 und 6 Stunden und damit Zeitabständen von 3 und 6 Stunden zwischen Bestrahlung und Paclitaxelgabe zeigten die mit beiden Noxen behandelten Proben ein Überleben in der Größenordnung wie die lediglich bestrahlten Kontrollproben. Die Kontrollproben, die nur für 3 bzw. 6 Stunden mit Paclitaxel inkubiert wurden, zeigten eine SF zwischen etwa 93 und 95 % bzw. 88 und 91 %. Der geringe zytotoxische Effekt der über 6 Stunden inkubierten Probe ließ sich bei der Probe, die noch dazu bestrahlt wurde, nicht nachweisen.

Bei einer Inkubationszeit von 9 und 12 Stunden und somit einem Abstand von 9 und 12 Stunden zwischen Bestrahlung und Paclitaxelgabe lässt sich schon ein sicherer zytotoxischer Effekt desselben nachweisen. Das Überleben der mit beiden Noxen behandelten Probe unterscheidet sich klar von dem der nur bestrahlten und dem der nur mit Paclitaxel behandelten Probe. Ebenso kann man feststellen, dass auch hier die Reihenfolge $P_w \rightarrow B$ günstiger als $B \rightarrow P$ in Bezug auf ein möglichst geringes Überleben ist.

Dennoch kann man bei diesen Inkubationszeiten nicht den zytotoxischen Effekt erreichen, wie er bei kontinuierlicher Inkubation zu sehen ist. Die Zellen sind offensichtlich in der Lage, nach Entfernung des Chemotherapeutikums aus dem Nährmedium das schon aufgenommene Paclitaxel wieder auszuschleiden, wenn sie noch nicht durch eine Mitosephase gegangen sind.

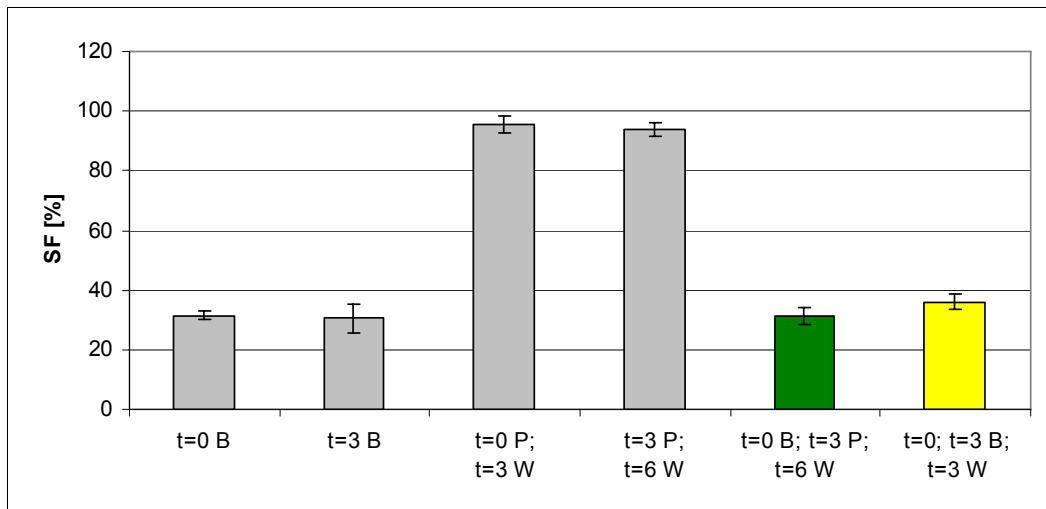


Abb. 13: Überlebensrate [SF] bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 3 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

W: Auswaschen des Paclitaxels

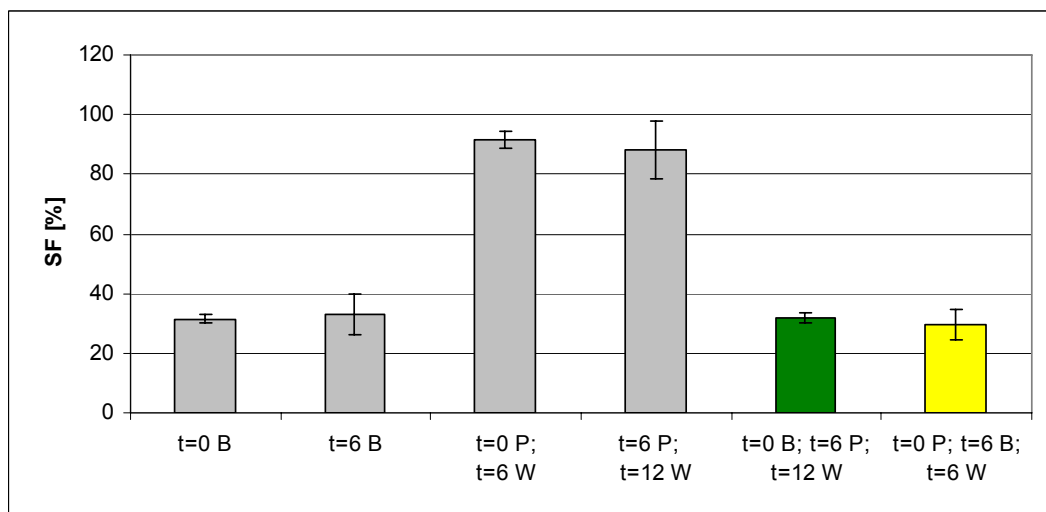


Abb. 14: Überlebensrate [SF] bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 6 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

W: Auswaschen des Paclitaxels

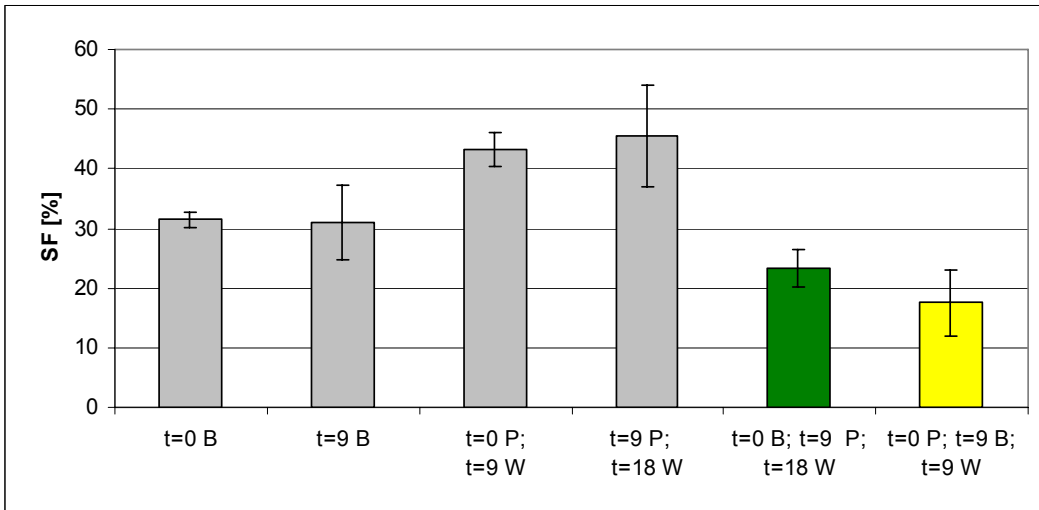


Abb. 15: Überlebensrate [SF] bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 9 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

W: Auswaschen des Paclitaxels

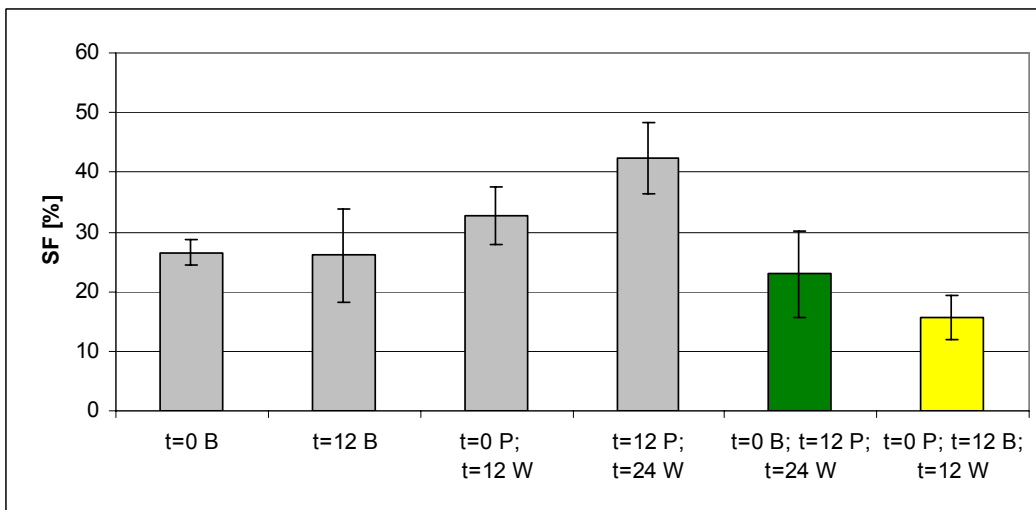


Abb. 16: Überlebensrate [SF] bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 12 Stunden zwischen beiden Behandlungen.

B: Bestrahlung

P: Paclitaxelzugabe

W: Auswaschen des Paclitaxels

6 Diskussion

Interpretation der Resultate bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel

Grundsätzlich zeigen die Versuche Überlebensraten, die von der Reihenfolge der Behandlungen abhängig sind. Dabei zeigte die Reihenfolge P → B stets ein günstigeres Ergebnis in Bezug auf ein möglichst geringes Überleben der Zellen. Dies weist auf einen synergistischen Effekt hin, da bei lediglich additivem und damit voneinander unabhängigen Effekten gleiche Überlebensraten zu erwarten wären. Der synergistische Effekt lässt sich durch den schon in Kap. 2.3.4 erwähnten Wirkmechanismus des Paclitaxel erklären. Durch das Paclitaxel werden die Zellen in der G₂/M-Phase blockiert. Die für die Reparatur von Strahlenschäden notwendigen Enzyme sind in dieser Phase inaktiv, weshalb die Zellen besonders strahlenempfindlich sind.

Der Synergismus zeigt sich erst bei einem Abstand von 6 Stunden. Bei kürzerer Inkubationszeit ist die Reihenfolge der Behandlung nicht entscheidend. Da bei einem Abstand von 3 Stunden die Überlebensrate unabhängig von der Reihenfolge ist, bei der Probe B → P die Reparatur der Strahlenschäden aber noch nicht abgeschlossen ist, lässt sich folgern, dass Paclitaxel keinen Einfluß auf den Reparaturmechanismus hat.

Betrachtet man nun die verschiedenen zeitlichen Abstände zwischen Paclitaxelzugabe und Bestrahlung, so lässt sich bei 9 Stunden das geringste Überleben messen. Die Zellen werden hier offenbar hinreichend lange mit Paclitaxel inkubiert, so dass der wie in Kap. 2.3.1 beschriebene mitosestörende Effekt am ausgeprägtesten ist. Zusätzlich wird der größte Teil der Zellen in den G₂/M-Block gebracht, somit die Strahlensensibilität der Zellpopulation maximiert und damit der strahlensensibilisierende Effekt des Paclitaxels optimiert.

Bei der für ein geringes Überleben ungünstigeren Reihenfolge B → P zeigt sich eine mit größerem zeitlichen Abstand zunehmende Überlebensrate. Eine Erklärung dafür ist, dass mit fortschreitender Zeit die Anzahl der Teilungen bis zum Erreichen der stationären Phase abnehmen und damit die ebenso die Wahrscheinlichkeit, dass Paclitaxel während der Mitose seinen zytotoxischen Effekt entfalten kann.

Interpretation der Resultate bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel

Wie bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel zeigt sich auch hier eine von der Reihenfolge abhängige Überlebensrate. Das Überleben der Zellen, die bis zur Bestrahlung mit Paclitaxel inkubiert wurden, ist tendenziell niedriger als bei umgekehrter Reihenfolge. Das Überleben bei Inkubationszeiten und Abständen von 3 und 6 Stunden unterscheidet sich zwar nicht, aber ab 6 Stunden zeigt sich die Tendenz eines geringeren Überlebens bei der Reihenfolge $P_w \rightarrow B$. Auch für dieses Ergebnis ist der oben beschriebene Mechanismus des G_2/M -Blocks verantwortlich.

Unabhängig von diesem Einfluss der Reihenfolge ist ein besseres Ergebnis bei steigender Inkubationsdauer zu verzeichnen. Dafür können zwei Erklärungen herangezogen werden. Zum Einen steigt die Konzentration von Paclitaxel in der Zelle und damit der Anteil der betroffenen Mikrotubuli, zum Anderen erhöht sich mit verlängerter Anwesenheit des Chemotherapeutikums die Wahrscheinlichkeit, bei der Teilungsphase der Zellen zu wirken.

Generell muss darauf hingewiesen werden, dass sämtliche Überlebensraten bei zeitlich begrenzter Inkubation deutlich höher liegen als bei kontinuierlicher Wirkung. Daraus lässt sich folgern, dass die Zellen in der Lage sind, nach beendeter Disposition das Paclitaxel wieder auszuschleiden oder abzubauen.

Bezüglich möglicher Therapieformen sollte dieses Ergebnis für die Festlegung der Infusionsdauer bedacht werden. Rosenthal [44] erreichte bei kontinuierlicher Infusion mit Paclitaxel nicht nur strahlensensibilisierende Serumspiegel, sondern konnte auch das Auftreten und Ausmaß von Nebenwirkungen reduzieren.

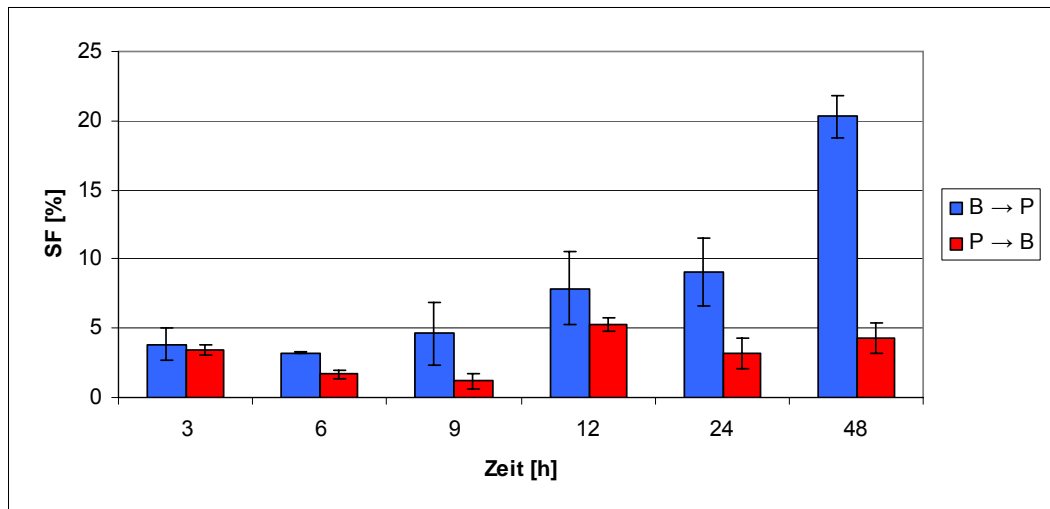


Abb. 15: Darstellung der Überlebensraten [SF] bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und verschiedenen Zeitabständen zwischen beiden Behandlungen zum direkten Vergleich.

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe
P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

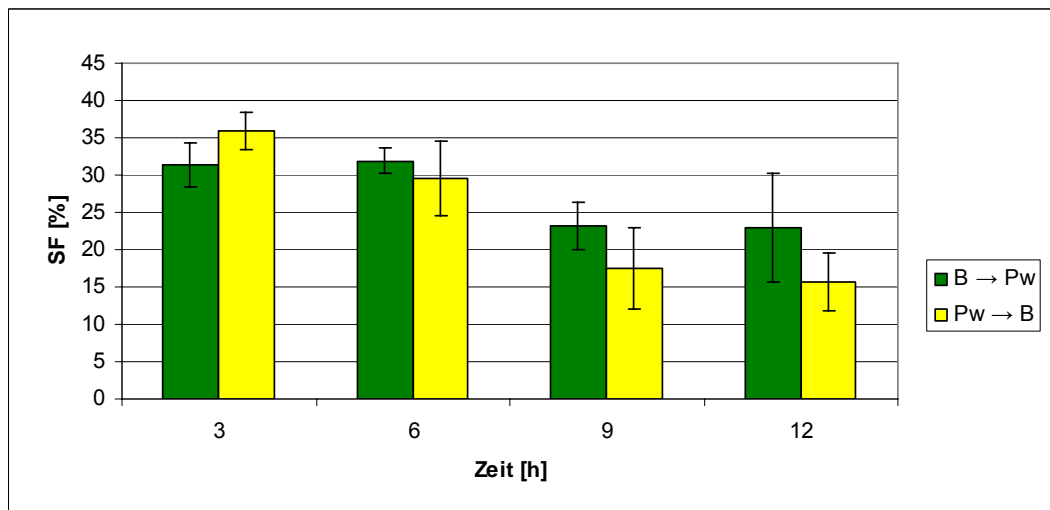


Abb. 16: Darstellung der Überlebensraten [SF] bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel und verschiedenen Zeitabständen zwischen beiden Behandlungen zum direkten Vergleich.

B → P_w: Bestrahlung gefolgt von zeitlich begrenzter Paclitaxelzugabe
P_w → B: Zeitlich begrenzte Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

Effekte: synergistisch oder additiv?

Geht man davon aus, dass beide Behandlungsarten unabhängig und nacheinander ihre Wirkung in der Zelle entfalten, so lässt sich aus dem Überleben der mit nur einer Noxe behandelten Zellen (aus den Einfachproben) das Überleben errechnen, das bei einem additiven Effekt zu erwarten wäre.

Die Berechnung wird anhand von folgendem Beispiel dargestellt: bei der Probe mit kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel und einem Abstand von 12 Stunden zeigte die inkubierte und bestrahlte Probe $P \rightarrow B$ eine SF von $(5,3 \pm 0,5)\%$. Die nur mit Paclitaxel inkubierte Probe (P bei $t=0$) zeigte eine SF von $(15,2 \pm 0,4)\%$ und die nur bestrahlte Probe (B bei $t=12$) eine SF von $(26,1 \pm 4,6)\%$. Dabei ergibt sich eine berechnete SF_b von $0,152 \times 0,261 = 4,0\%$.

Bei den Abständen von 3 und 6 Stunden liegen die SF der Proben sehr nahe an den SF_b . Die Ergebnisse der Proben erreichen also die Werte, die man bei additiven Effekten erwarten würde. Man kann hier also nicht von einem synergistischen Effekt sprechen. Dieses Ergebnis ist konsistent mit den im oberen Diskussionsteil aufgeführten Argumenten und gilt sowohl für die kontinuierliche, als auch für die zeitlich begrenzte Inkubation mit Paclitaxel.

Bei kontinuierlicher Inkubation sind die Überlebensraten der Proben bei den Abständen von 9, 24 und 48 Stunden und der Reihenfolge $P \rightarrow B$ niedriger als die jeweils berechneten SF_b . Die zytotoxische Wirkung ist offensichtlich stärker ausgeprägt als es die additive Kombination hätte vermuten lassen. Dies spricht für einen synergistischen Effekt, der sich ab einem Abstand von 9 Stunden zwischen Beginn der Inkubation mit Paclitaxel und Bestrahlung beobachten lässt. Ebenso wie im oberen Teil kann also auch mit dieser Argumentation auf einen strahlensensibilisierenden Einfluß des Paclitaxels geschlossen werden.

Im Gegensatz dazu erreichten die Werte bei $P_w \rightarrow B$ bei den Abständen von 9 und 12 Stunden nicht einmal die SF_b . Wie oben erwähnt zeigt sich zwar die Tendenz zu einem Synergismus, da die Werte bei $P_w \rightarrow B$ niedriger sind als die bei $B \rightarrow P_w$. Da dieser Unterschied aber noch innerhalb der Fehlerbereiche liegt und die Werte höher als die der SF_b sind, kann man in dieser Arbeit bei einer zeitlich begrenzten Inkubation von bis zu 12 Stunden auf keinen Synergismus und damit auf keinen strahlensensibilisierenden Effekt des Paclitaxels schließen.

Die Ergebnisse bei einem Abstand von 12 Stunden und kontinuierlicher Inkubation lassen keine Synergie erkennen, da die SF der Proben höher sind als die SF_b . Auf der Basis der bekannten Wirkmechanismen konnte dafür keine Erklärung gefunden werden, weshalb Unregelmäßigkeiten in der Versuchsdurchführung als Grund in Betracht gezogen werden müssen. So wurde der Abstand von 12 Stunden in einem eigenen Versuchsansatz untersucht. Im Gegensatz dazu wurden die Ergebnisse für 3, 6 und 9 Stunden in einem und die

für 24 und 48 Stunden in einem Versuchsblock ermittelt. Auch wenn vor jedem Versuch gleiche Voraussetzungen geschaffen wurden, lassen sich leichte Unterschiede der verwendeten Materialien und Durchführung nicht ausschließen und können als mögliche Erklärung herangezogen werden.

Die Ergebnisse bei $B \rightarrow P$ und $B \rightarrow P_w$ sind nicht nur regelmäßig schlechter als bei umgekehrter Reihenfolge, sondern erreichen ebenso regelmäßig nicht die für additive Wirkung zu erwartenden SF_b . Eine ähnliche Beobachtung hat Sui [102] an drei verschiedenen Zelllinien gemacht, was damit begründet wurde, dass Bestrahlung zu einem vorübergehenden G2-Block führt, der die Auswirkung der zytotoxischen Effekte des Paclitaxels verhindert.

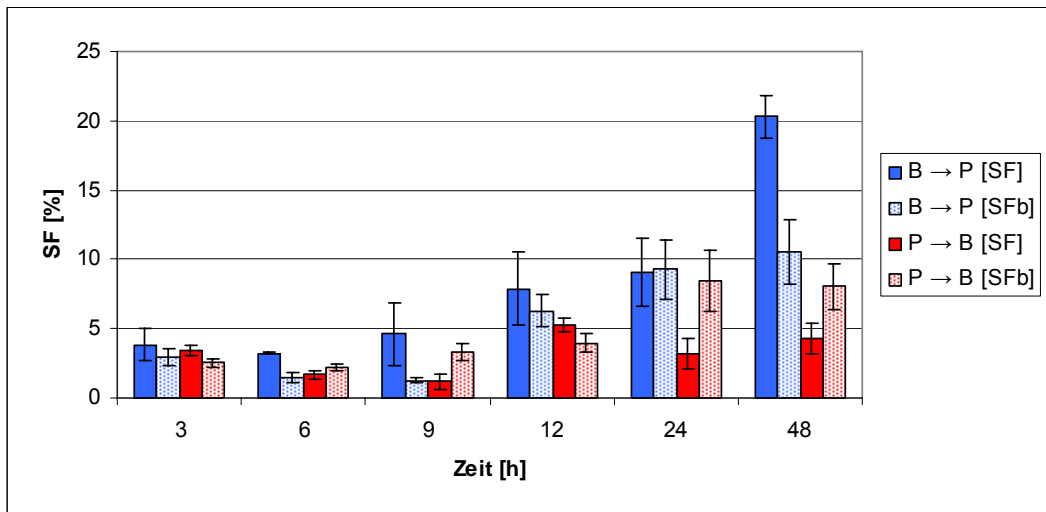


Abb. 17: Vergleich der experimentell ermittelten Überlebensraten [SF] der Proben mit den errechneten Überlebensraten [SF_b] der Einfachproben bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel.

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

	3h		6h		9h		12h		24h		48h	
	B→P	P→B	B→P	P→B	B→P	P→B	B→P	P→B	B→P	P→B	B→P	P→B
SF der Proben [%]	3,86 ± 1,2	3,46 ± 0,36	3,23 ± 0,05	1,66 ± 0,26	4,63 ± 2,29	1,12 ± 0,54	7,87 ± 2,64	5,27 ± 0,51	9,07 ± 2,43	3,16 ± 1,1	20,3 ± 1,5	4,29 ± 1,05
SF_b der Einfachproben [%]	2,95 ± 0,62	2,53 ± 0,33	1,47 ± 0,35	2,21 ± 0,29	1,26 ± 0,19	3,31 ± 0,66	6,29 ± 1,20	3,97 ± 0,71	9,27 ± 2,13	8,47 ± 2,20	10,5 ± 2,31	8,04 ± 1,61

Tabelle 2: Experimentell ermittelte [SF] und errechnete [SF_b] Überlebensraten.
Graphische Darstellung in Abb. 17

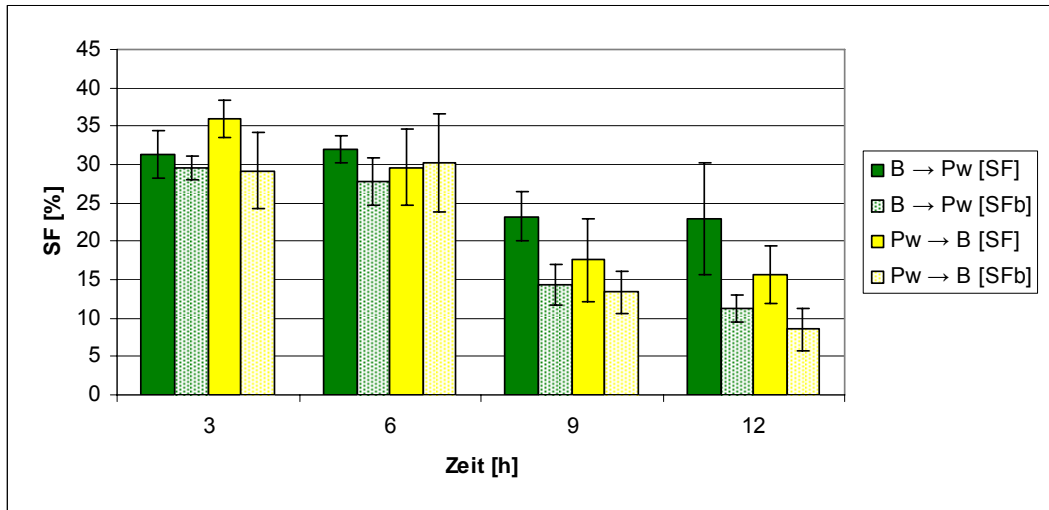


Abb. 18: Vergleich der experimentell ermittelten Überlebensraten [SF] der Proben mit den errechneten Überlebensraten [SF_b] der Einfachproben bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel.

B → P: Bestrahlung gefolgt von Paclitaxelzugabe

P → B: Paclitaxelzugabe gefolgt von Bestrahlung

	3h		6h		9h		12h	
	B→P _w	P _w →B	B→P _w	P _w →B	B→P _w	P _w →B	B→P _w	P _w →B
SF der Proben [%]	31,36 ± 3,03	35,95 ± 2,48	31,89 ± 1,75	29,57 ± 4,96	23,26 ± 3,17	17,55 ± 5,48	22,98 ± 7,3	15,68 ± 3,77
SF_b der Einfachproben [%]	29,54 ± 1,48	29,14 ± 4,95	27,78 ± 3,06	30,22 ± 6,35	14,33 ± 2,72	13,35 ± 2,80	11,24 ± 1,80	8,57 ± 2,83

Tabelle 3: Experimentell ermittelte [SF] und errechnete [SF_b] Überlebensraten.
Graphische Darstellung in Abb. 18

Allgemeiner Teil

Der strahlensensibilisierende Effekt von Paclitaxel wurde bisher in vielen Studien an unterschiedlichen Zelllinien untersucht. Neben der Einwirkzeit wurden verschiedene Dosen und Abstände zur Bestrahlung variiert und Zellzyklusverschiebungen gemessen. Dabei konnten die meisten Arbeitsgruppen die strahlensensibilisierende Wirkung nicht bestätigen. So konnte Stromberg [103] an seinen drei Zelllinien MCF-7, DUT-145 und HT-29 mit Bestrahlung nach Inkubation mit Paclitaxel bei sämtlichen Doses-Zeit-Kombinationen einen primär additiven Effekt nachweisen. Zusätzlich war der G2-Block selbst nach 24-stündiger Inkubation nicht eindeutig. Die Ergebnisse von Preisler [104] an vier Brustkrebs-Zelllinien zeigten ebenfalls maximal additive Wirkung. Nur bei MCF-7-Zellen war der Effekt im Gegensatz zur Studie von Stromberg stärker als additiv, wobei die Werte nicht signifikant waren. Pradier [105] untersuchte den strahlensensibilisierenden Effekt von Paclitaxel an den drei asynchronen Zelllinien ZMK-1, MCF-7 und CaSki. Auch hier ließ sich keine eindeutige synergistische Wirkung feststellen und ein G2-Block war nur bei den ZMK-1-Zellen nachweisbar. Die Gruppe um Jaakkola [106] konnte bei unterschiedlichen Paclitaxelkonzentrationen bei vier Plattenepithelzelllinien ebenfalls nur einen additiven Effekt bestätigen. Leonard [107] testete die Wirkung von Paclitaxel an zwei Plattenepithelzelllinien und konnte bei höheren Dosen einen synergistischen Effekt des Chemotherapeutikums mit Bestrahlung feststellen.

Anhand dieser Datenlage muß auch weiterhin ein allgemeiner strahlensensibilisierender Effekt des Paclitaxels kritisch betrachtet werden. Neben der Abhängigkeit von Konzentration und Inkubationsdauer scheint diese Wirkung auch äußerst zelllinienspezifisch zu sein und macht damit pauschale Aussagen unmöglich. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten EAT-Zellen zeigen wiederum Hinweise auf eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit unter Paclitaxeinfluss. Dabei muß berücksichtigt werden, dass durch die bereits beschriebenen Unregelmäßigkeiten in der Durchführung, besonders aber durch die geringe statistische Aussagekraft und die asynchrone Zellpopulation die hier gefundenen Hinweise ähnlich kritisch zu bewerten sind.

Weiterhin ungeklärt bleibt die Rolle des G2-/M-Blocks im Rahmen der Strahlensensibilisierung. Selbst bei Hinweisen auf einen Synergismus scheint die Theorie des G2-/M-Blocks keine ausreichende Begründung zu sein. Im Hinblick darauf muß die Grundvoraussetzung der strahlensensibilisierenden Wirkung von Paclitaxel durch den G2-/M-Block, auf der auch diese Arbeit aufbaut, als möglicher, keinesfalls aber als gesicherter oder einziger Mechanismus betrachtet werden.

Obwohl weitere Untersuchungen zur Klärung der offenen Fragen notwendig sind, können die drei hier gefundenen Kernaussagen als zuverlässig eingestuft werden. Diese sind die klare Überlegenheit der Reihenfolge P → B, der optimale zeitliche Abstand von 9 Stunden zwischen beiden Behandlungen sowie die Verbesserung des Ergebnisses durch kontinuierliche Inkubation mit dem gewählten Chemotherapeutikum.

Für die Verwendung der gewonnenen Erkenntnisse in der klinischen Praxis bietet sich die Möglichkeit, die derzeit meist verwendeten 1- bis 3-Stunden-Infusionen ein- bis dreimal pro Woche durch 24-Stunden-Infusionen über 5-7 Tage zu ersetzen, um damit den therapeutischen Nutzen zu steigern und zusätzlich die auftretenden Nebenwirkungen zu reduzieren.

7 Zusammenfassung

Die kombinierte Radiochemotherapie erzielt bei vielen Tumorerkrankungen höhere Remissionsraten als eine Monotherapie. Jedoch ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob dieser gesteigerte Effekt auf einer Addition der Wirkungen zweier unabhängiger Einzelbehandlungen beruht, oder ob es sich um einen Synergismus, also eine wechselseitige Verstärkung, handelt. Weiterer Klärungsbedarf besteht beim Einfluß der Reihenfolge und des zeitlichen Abstands zwischen Bestrahlung und Applikation des Chemotherapeutikums auf den Therapieerfolg.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in dieser Arbeit Ehrlich-Aszites-Tumorzellen (EAT) unterschiedlich lange mit 25 nmol/l Paclitaxel inkubiert und mit verschiedenem zeitlichen Abstand entweder vorher oder nachher einmalig mit γ -Strahlung mit einer Dosis von 2 Gy bestrahlt. Als Vergleichsparameter diente das Überleben der Zellen, das mit dem Makrokolonietest bestimmt wurde.

Bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

- Das Überleben ist bei Inkubation mit Paclitaxel gefolgt von Bestrahlung ($P \rightarrow B$) immer geringer als bei Bestrahlung gefolgt von Inkubation mit Paclitaxel ($B \rightarrow P$).
- Das Überleben nimmt mit zunehmendem zeitlichen Abstand bei $B \rightarrow P$ zu.
- Die Reihenfolge der Applikation ist bis zu einem Abstand von 6 Stunden unerheblich.
- Das Überleben nimmt bis zu einem Abstand von 9 Stunden bei $P \rightarrow B$ ab, danach steigt es wieder.
- Ein Abstand von 9 Stunden zwischen Paclitaxelzugabe und Bestrahlung ist optimal in Bezug auf ein möglichst geringes Überleben.

Bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel ergaben sich folgende Resultate:

- Das Überleben ist bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel gefolgt von Bestrahlung ($P_w \rightarrow B$) außer bei einem Abstand und einer Inkubationsdauer von 3 Stunden geringer als bei Bestrahlung gefolgt von zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel ($B \rightarrow P_w$)
- Mit zunehmender Inkubationsdauer sinkt das Überleben sowohl bei $B \rightarrow P_w$ als auch bei $P_w \rightarrow B$.

- Bei einer Inkubationsdauer von 3 und 6 Stunden und einem Abstand von 3 und 6 Stunden ist die Reihenfolge der Verabreichung beider Noxen unerheblich.
- Mit zunehmender Inkubationsdauer vergrößert sich der Abstand der Überlebensraten zwischen $B \rightarrow P_w$ und $P_w \rightarrow B$.
- Bei zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel mit bis zu 12 Stunden wird bei keiner Probe ein so geringes Überleben erreicht wie bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel.

Bei kontinuierlicher Inkubation mit Paclitaxel konnten von der Reihenfolge abhängige Überlebensraten verzeichnet werden, die auf einen Synergismus schließen lassen, wenn Paclitaxel vor der Bestrahlung angewandt wird. Der in Kap. 2.3.1 beschriebene Wirkmechanismus von Paclitaxel kann diesen synergistischen Effekt erklären. Bei einem Abstand von 9 Stunden ist dieser Effekt am stärksten ausgeprägt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel keinen Einfluß auf die Reparaturvorgänge nach Bestrahlung hat.

Die Versuche mit zeitlich begrenzter Inkubation mit Paclitaxel lassen darauf schließen, dass die Zellen nach beendeter Disposition das Chemotherapeutikum abbauen oder ausscheiden können. Ebenso läßt sich ein Synergismus nicht eindeutig nachweisen.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit und unter Berücksichtigung der Literatur zu diesem Thema (Kap. 6) muß ein allgemeiner strahlensensibilisierender Effekt des Paclitaxels weiterhin kritisch betrachtet werden, da er neben Konzentration und Inkubationsdauer auch von der Zellart abhängt. Die verwendeten EAT-Zellen zeigen eine erhöhte Strahlenempfindlichkeit durch Paclitaxeinfluss. Diese Arbeit hat zu drei als zuverlässig einzustufende Kernaussagen geführt:

- 1) Die Reihenfolge $P \rightarrow B$ ist der umgekehrten Reihenfolge klar überlegen.
- 2) Der optimale zeitliche Abstand liegt bei 9 Stunden.
- 3) Die kontinuierliche Inkubation erzielt bessere Ergebnisse als die zeitliche begrenzte Inkubation.

Überträgt man diese in vitro gewonnenen Resultate auf die klinische Praxis, so ließe sich mit 24-Stunden-Infusionen über 5-7 Tage eventuell nicht nur der therapeutische Nutzen gegenüber den derzeit meist verwendeten 1- bis 3-Stunden-Infusionen ein- bis dreimal pro Woche steigern, sondern auch die auftretenden Nebenwirkungen senken.

8 Summary

Combined radiochemotherapy is known to be more effective regarding the remission of cancer than monotherapy. However, it has not been definitely clarified yet, whether these increased effects are due to the addition of two independent single therapies, or can be attributed to a synergistic mode of action. Furthermore, the importance of the order of application and of the interval between the two treatments has to be ascertained.

In order to find answers to these questions, we incubated Ehrlich-Aszites-Tumourcells (EAT-cells) different periods of time with 25 nmol/l of the chemotherapeutic agent Paclitaxel and applied a single dose of 2 Gy γ -radiation at certain time-schedules either before or after incubation. The surviving fraction (SF) of the EAT-cells was being detected by the clonogenic assay.

Under continuous incubation with Paclitaxel, the following results were obtained:

- The surviving fraction (SF) in the order of application Paclitaxel followed by Radiation ($P \rightarrow R$) is always lower than the SF in the inverse order Radiation followed by Paclitaxel ($R \rightarrow P$).
- The SF increased in the order $R \rightarrow P$ with increasing intervals between the applications.
- The order of application is irrelevant up to an interval of 6 hours.
- Up to an interval of 9 hours, the SF decreases in the order of $P \rightarrow R$. After that, it begins to increase.
- The optimum result occurs at an interval of 9 hours between the application of Paclitaxel and radiation regarding a minimal survival of the EAT-cells.

Under temporally limited incubation with Paclitaxel, the following results were obtained:

- The SF in the order Paclitaxel limited \rightarrow Radiation ($P_1 \rightarrow R$) is always lower than in the inverse order Radiation \rightarrow Paclitaxel limited ($R \rightarrow P_1$), except from an interval and incubating duration of 3 hours.
- With increasing duration of incubation with Paclitaxel, the SF increases in both orders $R \rightarrow P_1$ and $P_1 \rightarrow R$.
- In the interval of 3 and 6 hours and a duration of incubation of 3 and 6 hours, the order of application is irrelevant.
- With increasing duration of incubation, the gap of the SF between $R \rightarrow P_1$ and $P_1 \rightarrow R$ becomes larger.

- Under temporally limited incubation with Paclitaxel up to 12 hours no equally low SF could be reached as was possible with continuous incubation with Paclitaxel.

Under continuous incubation with Paclitaxel we acquired SFs, which were dependent on the order of application, which suggests synergistic effects when Paclitaxel is applied before radiation. The synergistic effect can be explained by the mode of action of Paclitaxel, as is described in chapter 2.3.1. At an interval of 9 hours this effect is most distinctive.

Moreover it could be demonstrated that Paclitaxel does not influence the repair mechanisms after radiation.

The experiments with temporally limited incubation with Paclitaxel lead to the assumption that after exposure to the chemotherapeutic agent EAT-cells are able to either metabolize or excrete Paclitaxel. In addition, no synergistic effect can be definitely verified.

Regarding the results of this thesis and the contemporary literature (chapter 6), a general sensitizing effect of Paclitaxel to radiation has further on to be critically considered. Besides the concentration and duration of incubation, the effects of Paclitaxel are also dependent on the different celltypes. EAT-cells show an increased sensitivity to radiation after the influence of Paclitaxel.

This thesis leads to three reliable conclusions:

- 1) The order $P \rightarrow R$ is clearly superior to the inverse order.
- 2) The optimal interval between Paclitaxel and Radiation is 9 hours.
- 3) Continuous incubation with Paclitaxel shows better results regarding minimal SF than temporally limited incubation.

Referring to the daily routine in hospitals, 1- to 3-hour-infusions one to three times a week, which is the most usual at the moment, should possibly be replaced by 24-hour-infusions five to seven times a week. The therapeutical benefit can be higher and the side-effects can be reduced.

Literaturverzeichnis

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall ME et al.: Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of Taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93:2325-2327
- [2] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 227:556-667
- [3] Bissett D, Kaye SB: Taxol and taxotere – current status and future prospects. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 1228-1231
- [4] Guppy AE, Nathan PD, Rustin GJ: Epithelial ovarian cancer: a review of current management. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2005 Sep;17(6):399-411
- [5] Berkenblit A, Cannistra SA: Advances in the management of epithelial ovarian cancer. *J Reprod Med*. 2005 Jun;50(6):426-38
- [6] Kikuchi Y, Kita T, Takano M, Kudoh K, Yamamoto K: Treatment options in the management of ovarian cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2005 May;6(5):743-54
- [7] du Bois A: Treatment of advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2001 Dec;37 Suppl 9:S1-7
- [8] McGuire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M: Comparison of Combination therapy with paclitaxel and cisplatin versus cyclophosphamide and cisplatin in patients with suboptimal stage II and stage IV ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Semin Oncol*. 1997 Feb;24(1 Suppl 2):S2-13-S2-16
- [9] Piccart MJ, Bertelsen K, James K, Cassidy J et al: Randomized Intergroup trial of Cisplatin-Paclitaxel versus Cisplatin-Cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: Three-year Results. *J Natl Cancer Inst*. 2000 May;3(9) Vol 92:699-708
- [10] du Bois A, Neijit JP, Thigpen JT: First line chemotherapy with carboplatin plus paclitaxel in advanced ovarian cancer – a new standard of care? *Ann Oncol*. 1999;10 Suppl 1:35-41
- [11] Neijit JP, du Bois A: Paclitaxel/Carboplatin for the initial treatment of advanced ovarian cancer. *Semin Oncol*. 1999 Feb;26(1 Suppl 2):78-83
- [12] Neijit JP, Engelholm SA, Tuxen MK, Sorensen PG et al: Exploratory phase II study of paclitaxel and cisplatin versus paclitaxel and carboplatin in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 200 Sep;18(17):3084-92
- [13] Greimel ER, Bjelic-Tadisic V, Pfisterer J, Hilpert F, Daghofer F, du Bois A: Randomized Study of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Ovarian Cancer Study Group comparing quality of life in patients with ovarian cancer treated with cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel. *J Clin Oncol*, 2006 Feb 1;24(4):579-86
- [14] Abu-Rustum NR, Aghajanian C, Barakat RR, Fennelly D, Shapiro FR, Spriggs D: Salvage weekly paclitaxel in recurrent ovarian cancer. *Semin Oncol*. 1997 Oct;24(5 Suppl 15):S15-62-S15-67
- [15] du Bois A, Lück HJ, Buser K, Meerpohl HG, Sessa C, Klaassen U, Meden H, Bochtler H, Diergarten K: Extended phase II study of paclitaxel as a 3-h infusion in patients with ovarian cancer previously treated with platinum. *Eur J Cancer*. 1997 Mar;33(3):379-84

- [16] Parmar MK, Ledermann JA, Colombo N, du Bois A, et al: Paclitaxel plus platinum-based chemotherapy versus conventional platinum-based chemotherapy in women with relapsed ovarian cancer: the ICON4/AGO-OVAR-2.2 trial. *Lancet*. 2003 Jun 21;361(9375):2099-106
- [17] Trimble EL, Adams JD, Vena D, Hawkins MJ et al: Paclitaxel for platinum-refractory ovarian cancer: results from the first 1,000 patients registered to National Cancer Institute Treatment Referral Center 9103. *J Clin Oncol*. 1993 Dec;11(12):2405-10
- [18] Markman M, Hall J, Spitz J, Weiner S, Carson L, Van Le L, Baker M: Phase II trial of weekly single-agent paclitaxel in platinum/paclitaxel-refractory ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2002 May 1;20(9):2365-9
- [19] Buda A, Floriani I, Rossi R, Colombo N, et al: Randomized controlled trial comparing single agent paclitaxel vs epidoxorubicin plus paclitaxel with advanced ovarian cancer in early progression after platinum-based chemotherapy: an Italian Collaborative Study from the Mario Negri Institute, Milan, G.O.N.O group and I.O.R. group. *Br J Cancer* 2004 Jun 1;90(11):2112-7
- [20] Takai N, Utsonumiya H, Kawano Y, Nasu K, Narahara H, Miyakawa I: Complete response to radiation therapy in a patient with chemotherapy-resistant ovarian clear cell adenocarcinoma. *Arch Gynecol Obstet*. 2002 Dec;267(2):98-100
- [21] <http://leitlinien.net/>: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau
- [22] Slamon DJ, Layland-Jones B, Shak S, et al.: Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic reast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-792
- [23] Conlin AK, Seidman AD: Taxanes in breast cancer: an update. *Curr Oncol Rep*. 2007; 9(1): 22-30
- [24] Gralow JR: Optimizing the treatment of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2005; 89 Suppl 1: S9-S15
- [25] Friedrich M, Diesing D, Villena-Heinsen C, et al.: Taxanes in the first-line chemotherapy of metastatic breast cancer: review. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25(1): 66-70
- [26] Sartor CI, Peterson BL, Woolf S, et al: Effect of addition of adjuvant paclitaxel on radiotherapy delivery and locoregional control of node-positive breast cancer: cancer and leukemia group B 9344. *J Clin Oncol* 2005; Jan 1;23 (1): 30-40
- [27] Semrau S, Gerber B, Reimer T, et al: Concurrent radiotherapy and taxane chemotherapy in patients with locoregional recurrence of breast cancer. A retrospective analysis. *Strahlenther Onkol* 2006; 182(10): 596-603
- [28] Cristofanili M, Gonozaletz. Angulo AM, Buzdar AU: Paclitaxel improves the prognoses in estrogen receptor negative inflammatory breast cancer: the M.D. Anderson Cancer Center experience. *Clin Breast Cancer* 2004; 4(6): 415-9
- [29] Hanna YM, Baglan KL, Stromberg JS, et al.: Acute and subacute toxicity associated with concurrent adjuvant radiation therapy and paclitaxel in primary breast cancer therapy. *Breast J* 2002; 8(3): 149-53
- [30] Ellerbroek N, Martino S, Mautner B, et al.: Breast-conserving therapy with adjuvant paclitaxel and radiation therapy: feasibility of concurrent treatment. *Breast J* 2003; 9(2): 74-8

- [31] Burstein HJ, Bellon JR, Galper S, et al.: Prospective evaluation of concurrent paclitaxel and radiation therapy after adjuvant doxorubicin and cyclophosphamid chemotherapy for Stage II or III breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 64(2): 496-504
- [32] Skinner KA, Silberman H, Florentine B, et al.: Preoperative paclitaxel and radiotherapy for locally advanced breast cancer: surgical aspects. *Ann Surg Oncol* 2000; 7(2): 145-9
- [33] Formenti SC, Volm M, Skinner KA, et al.: Preoperative twice-weekly paclitaxel with concurrent radiation therapy followed by surgery and postoperative doxorubicin-based chemotherapy in locally advanced breast cancer: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* 2003; 21(5): 864-70
- [34] Chakravarthy AB, Kelley MC, McLarren B, et al.: Neoadjuvant concurrent paclitaxel and radiation in stage II/III breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(5): 1570-6
- [35] <http://de.wikipedia.org/wiki/Lungenkrebs>
- [36] <http://www.medizin.unikoeln.de/kliniken/innere1/lehre/ws0607/bronchial-karzinomWolf.pdf>
- [37] <http://www.medizin.uni-tuebingen.de/itz/pdfinhal/bronch.pdf>
- [38] Hann CL, Brahmer JR: Second-line Therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2006; 8(4): 243-7
- [39] Simon GR, Bunn PA: Taxanes in the treatment of advanced (stage III and IV) non-small cell lung cancer (NSCLC): recent developments. *Cancer Invest* 2003; 21(1): 87-104
- [40] Feigenberg SJ, Hanlon AL, Langer C, et al.: A phase II study of concurrent carboplatin and paclitaxel and thoracic radiotherapy for completely resected stage II and IIIA non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2(4): 287-92
- [41] Bradley JD, Paulus R, Graham MV, et al.: Phase II trial of postoperative adjuvant paclitaxel/carboplatin and thoracic radiotherapy in resected stage II and IIIA non-small-cell lung cancer: promising long term results of the Radiation Therapy Oncology Group—RTOG 9705. *J Clin Oncol* 2005; 23(15): 3480-7
- [42] Perry MC, Kohman LJ, Bonner JA, et al.: A phase III study of surgical resection and paclitaxel/carboplatin chemotherapy with or without adjuvant radiation therapy for resected stage III non-small-cell lung cancer: Cancer and Leukemia Group B 9734. *Clin Lung Cancer* 2007; 8(4): 268-72
- [43] Wolski MJ, Bhatnagar A, Flickinger JC, et al.: Multivariate analysis of survival, local control, and time to distant metastases in patients with unresectable non-small-cell lung carcinoma treated with 3-dimensional conformal radiation therapy with or without concurrent chemotherapy. *Clin Lung Cancer* 2005; 7(2): 100-6
- [44] Rosenthal DI, Fuller CD, Machtay M, et al.: Phase I study of Paclitaxel given by seven-week continuous infusion concurrent with radiation therapy for locally advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2006; 1(1): 38-45
- [45] Jeremic B, Milicic B, Acimovic L, et al.: Concurrent hyperfractionated radiotherapy and low-dose daily carboplatin and paclitaxel an patients with stage III non-small-cell lung cancer: long-term results of a phase II study. *J Clin Oncol* 2005; 23(6): 1144-51
- [46] Huber RM, Flentje M, Schmidt M, et al.: Simultaneous chemoradiotherapy compared with radiotherapy alone after induction chemotherapy in inoperable stage IIIA or IIIB non-small-cell lung cancer: study CTRT99/97 by the Bronchial Carcinoma Therapy Group. *J Clin Oncol* 2006; 24(27): 4397-404

- [47] Shi A, An T, Zhu G, et al.: Phase I study to determine the MTD of paclitaxel given three times per week during concurrent radiation therapy for stage III non-small cell lung cancer. *Curr Med Res Opin* 2007; 23(5): 1161-7
- [48] Keene KS, Harman EM, Knauf DG, et al.: Five-year results of a phase II trial of hyperfractionated radiotherapy and concurrent daily cisplatin chemotherapy for stage III non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 2005; 28(3): 217-22
- [49] Belani CP, Choy H, Bonomi P, et al.: Combined chemoradiotherapy regimens of paclitaxel and carboplatin for locally advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase II locally advanced multi-modality protocol. *J Clin Oncol* 2005; 23(25): 5883-91
- [50] Tappero JW, Conant MA, Wolfe SF, et al.: Kaposi's sarcoma: epidemiology, histology, clinical spectrum, staging criteria and therapy. *J Am Acad Dermatol* 1993, 28, 371-395
- [51] International Collaboratin on HIV and Cancer: Highly active antiretroviral therapy and incidence of cancer in human immunodeficiency virus-infected adults. *J natl Cancer Inst* 2000; 92: 1823-30
- [52] Friedman-Kein AE, Laubstein L, Marmor M, et al.: Kaposi's sarcoma and pneumocystis pneumonie among homosecual man New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1981; 30: 305-308
- [53] Mocroft A, Kirk O, Clumeck N, Gargalianos-Kakolyris P, Trocha N, Chentsova N, et al.: The changing pattern of Kaposi sarcoma in patients with HIV, 1994-2003: the EuroSIDA Study. *Cancer* 2004; 100(12): 2644-54
- [54] Levine AM, Tuplule A: Clinical aspects and management of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1288-95
- [55] Von Roenn JH: Clinicla Presentations and standard therapy of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Hematol Oncol Clin N Am* 2003; 17: 747-62
- [56] Gill PS, Akil B, Colleti P, et al: Pulmonary Kaposi's sarcoma: clinical findings and results of therapy. *Am J Med* 1989, 87, 57-61
- [57] Krown SE: Clinical Overview: issues in Kaposi's sarcoma therapeutics. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1998; 23: 59-63
- [58] Tirelli U, Spina M, Carbone A, Monfardini S: Neoplastic complications of AIDS. In: Douhami RL, Tannock I, Hohenberger P, Horiot J-C, editors. *Oxford textbook of oncology*. Oxford University Press; 2002. p. 2477-91
- [59] Lee FC, Cooper JS, Mitsuyasu RT: AIDS-related malignancies: Cancer management: a multidisciplinary approach, vol. 5, second ed. Huntington, NY: PRR; 1998. p. 37-63
- [60] Nasti G, Martellota F, Berretta M, Mena M, Fasan M, Di Ferri G, et al.: Impact of highly active antiretroviral therapy on the presenting features and outcome of patients with acquired immuno deficiency dyndrome-related Kaposi sarcoma. *Cancer* 2003; 98: 2440-6
- [61] Martinelli C, Zazzi M, Ambu S, et al.: Complete regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 durin therapy with indinavir. *AIDS* 1998; 12: 1717-9
- [62] Cattelan AM, Calabro ML, Aversa SML, Zanchetta M, Meneghetti A, De Rossi A, et al.: Regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma following antiretroviral therapy with protease inhibitors: biological correlates of clinical outcome. *Eur J cancer* 1999; 51: 1809-15

- [63] Niehues T, Horneff G, Megahed M, et al.: Complete regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma in AIDS. *AIDS* 1999; 13: 1148-9
- [64] Tirelli U, Bernadi D: Impact of HAART on the clinical management of AIDS-related cancers. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1320-4
- [65] Murdaca G, Campelli A, Sett M, et al.: Complete remission of AIDS/Kaposi's sarcoma after treatment with a combination of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors and one non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *AIDS* 2002; 16: 304-4
- [66] Paparizos V, Kyriais KP, Papastamopoulos V, et al.: Response of AIDS-associated Kaposi sarcoma to highly active antiretroviral therapy alone. *J Acq Immu Def Synd* 2002; 30: 257-8
- [67] Bower M, Fox P, Fife K, Gill J, Nelson M, Gazzard B: Highly active antiretroviral therapy prolongs time to treatment failure in Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1999; 13: 2105-11
- [68] Leitch H, Trudeau M, Routy JP: Effect of protease inhibitors-based highly active antiretroviral therapy on survival in HIV-associated Kaposi's sarcoma patients treated with chemotherapy. *HIV Clin Trials* 2003; 4: 107-14
- [69] Holkova B, Takeshita K, Cheng DM, Volm M, Wasserheit C, Demopoulos R, et al.: Effect of highly active antiretroviral therapy on survival in patients with AIDS-associated pulmonary Kaposi's sarcoma treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3848-51
- [70] Gill PS, Wernz J, Scadden DT, et al.: Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin and vincristine in AIDS related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2353-64
- [71] Northfeld DW, Dezube BJ, Thommes JA, Miller BJ, Fischl MA, Friedman-Kein A, et al.: Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase II clinical trial. *J Clin Oncol* 1998; 16: 1445-51
- [72] Stewart JSW, Jabonowski H, Goebel FD, et al.: Randomized comparative trial of pegylated liposomal doxorubicin versus bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 683-91
- [73] Tulpule A, Yung RC, Wernz J, et al.: Phase II trial of liposomal daunorubicin in the treatment of AIDS-related pulmonary Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3369-74
- [74] Sgadari C, Toschi E, Palladino C, et al.: Mechanism of Paclitaxel Activity in Kaposi's sarcoma. *J Immunol* 2000; 165:509-17
- [75] Tulpule A, Groopman J, Saville MW, et al.: Multicenter trial of low-dose paclitaxel in patients with advanced AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Cancer* 2002; 95:147-54
- [76] Gill PS, Tulpule A, Espina BM, et al.: Paclitaxel is safe and effective in the treatment of advanced AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 1999; 17:1876-83
- [77] Welles L, Saville M, Lietzau J, et al.: Phase III trial with dose titration of paclitaxel for the therapy of human immunodeficiency virus-associated kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 1998; 16:1112-21
- [78] Saville MW, Lietzau J, Pluda JM, et al.: Treatment of HIV associated Kaposi's sarcoma with paclitaxel. *Lancet* 1995; 346:26-8
- [79] Blöcher D: Strahleninduzierte DNA-Doppelstrangbrüche in Ehrlich Ascites Tumorzellen und ihre mögliche Bedeutung für das Überleben. Dissertation Fachbereich Physik, Universität Frankfurt am Main, 1981

- [80] Neumüller P: Untersuchungen an der DNA von EAT-Zellen nach UV- und Röntgenbestrahlung mit der Unwinding-Methode. Diplomarbeit Fachbereich Physik, Universität Frankfurt am Main, 1987
- [81] Ogorek B, Bryant PE: Repair of DNA single-strand breaks in X-irradiated yeast. I. Use of the DNA-unwinding method to measure DNA strand breaks. *Mut.Res.* 1985; 146:55-61
- [82] Ueno AM, Lett JT: Deficient repair and degradation of DNA in L5178 SIS cells. *Radiat. Res.* 1979; 79:424-429
- [83] Christensen RC, Tobias CA: Heavy ion-induced single- and double-strand breaks in Φ X 174 replicative form DNA. *Int. J Radiat. Biol.* 1972; 22:457-477
- [84] Hagen U: Current aspects on the radiation induced base damage in DNA. *Radiat. Environment. Biophys.* 1986; 25:261-272
- [85] Herrmann Th, Baumann M: *Klinische Strahlenbiologie – kurz und bündig.* Gustav Fischer Verlag Jena, 1997
- [86] Blöcher D: DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of X-rays. I. Determination of induced breaks by centrifugation at reduced speed. *Int. J Radiat. Biol.* 1982; 42:317-328
- [87] Blöcher D, Pohlit W: DNA double strand breaks in Ehrlich Ascites tumour cells at low doses of X-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks? *Int. J Radiat. Biol.* 1982; 42:329-338
- [88] Frankenberg D, Frankenberg-Schwager M, Blöcher D, Harbich R: Evidence for DNA double strand breaks as the critical lesions in yeast cells irradiated with sparsely or densely ionizing radiation under oxic or anoxic conditions. *Radiat. Res.* 1981; 88:524-532
- [89] Bryant PE: Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using Pvu II and Bam HI: evidence for the double strand break origin of chromosomal aberrations. *Int. J Radiat. Biol.* 1984; 46:57-65
- [90] Bryant PE: Enzymatic restriction of mammalian cell DNA: evidence for double-strand breaks as potentially lethal lesions. *Int. J Radiat. Biol.* 1985; 48:55-60
- [91] Britten RJ, Kohne DE: Repeated sequences in DNA. *Science* 1968; 161:529-540
- [92] Sinclair WK, Morton RA: X-Ray and Ultraviolet sensitivity of synchronized Chinese Hamster cells at various stages of the cell cycle. *Biophys J* 1965 Jan; 5: 1-25
- [93] Paul J: *Zell- und Gewebekulturen.* Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1980
- [94] Karzel K: Über einen in vitro in Suspensionen wachsenden permanenten Stamm von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen. *Med.Pharm.Exp.* 12, 1965:137-144
- [95] Bartsch A: Durchflußzytometrische Analysen der Chromosomen von Zellklonen aus unbestrahlten und bestrahlten Säugetierzellen. Diplomarbeit Fachbereich Physik, Universität Frankfurt am Main, 1989
- [96] Fly JO, Gray HJ: In vitro cultures of the Krebs ascites carcinoma and the Ehrlich-Ascites-carcinoma of mice. *Cancer Res.* 20, 1960: 918
- [97] Smith AU: Cultivation of ovarian granulosa cells after cooling to very low temperatures. *Exp. Cell. Res.* 3, 1952:574

- [98] Scherer WF: Effects of freezing speed and glycerol diluent on 4-5 year survival of HeLa- and L-cells. *Exp. Cell. Res.* 19, 1960:175
- [99] Iliakis G: Kybernetische Untersuchungen über die Strahlenwirkung auf Tumorzellen. Dissertation Fachbereich Physik, Universität Frankfurt am Main, 1978
- [100] Shipman Ch: Evaluation of 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) as a tissue culture buffer. *Proc. Soc. Biol. Med.* 1969; 130: 305-310
- [101] Rudolf F: Arbeitsbericht – TSD-Dosimetrie am Blutbestrahlungsgerät CIS IBL 437C, Oktober 2003; Klinik für Strahlentherapie, Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main
- [102] Sui M, Dziadyk JM, Zhu X, Fan W: Cell cycle-dependent antagonistic interactions between paclitaxel and gamma-radiation in combination therapy. *Clin Cancer Res* 2004; 10(14): 4848-57
- [103] Stromberg JS, Lee YJ, Armour EP, et al.: Lack of radiosensitization after paclitaxel treatment of three human carcinoma cell lines. *Cancer* 1995; 75(9): 2262-8
- [104] Preisler VK, Wück D, Stopper H: Combination of paclitaxel and radiation: genotoxicity in vitro in four mammalian cell lines. *Cancer Lett.* 1999; 145(1-2): 29-33
- [105] Pradié O, Rave-Fränk M, Schmidberger H, et al.: Effects of paclitaxel in combination with radiation on human head and neck cancer cells (ZMK-1), cervical squamous cell carcinoma (CaSki), and breast adenocarcinoma cells (MCF-7). *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(1): 20-7
- [106] Jaakkola M, Rantanen V, Grenman S: In vitro concurrent paclitaxel and radiation of four vulvar squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer* 1996; 77(9): 1940-6
- [107] Leonard CE, Chan DC, Chou TC, et al.: Paclitaxel enhances in vitro radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the head and neck. *Cancer Res.* 1996; 56(22): 5198-204

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt dem emeritierten Direktor der Klinik für Strahlentherapie Herrn Prof. Dr. med. H. D. Böttcher für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Klinik durchführen zu können.

Besonders möchte ich Frau Dr. Jüling-Pohlitz danken, die mich während dieser Arbeit stets sehr gut betreut und immer unterstützt hat. Sie hat mir ermöglicht, die Experimente in Ihrem Labor durchzuführen und stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Julia für ihre fortwährende und liebevolle Unterstützung bedanken. Sie gaben mir jederzeit Halt, haben mir den Rücken gestärkt und waren immer für mich da. Ebenso sehr danke ich meinem Freund Stefan Hanke für seine Ausdauer und Geduld.

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Effekte von Bestrahlung mit Gamma-Strahlen und Chemotherapie mit Paclitaxel auf Ehrlich-Aszites-Tumorzellen“

in der Klinik für Strahlentherapie und Onkologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Böttcher mit Unterstützung durch Frau Dr. Jüling-Pohlitz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

.....
(Ort und Datum)

.....
(Unterschrift)

LEBENS LAUF - JOHANNA KREUZEDER

PERSÖNLICHE INFORMATIONEN

- Geburtsdatum & -ort: 9. Juli 1981 in Offenbach am Main
- Nationalität: deutsch
- Konfession: evangelisch
- Familienstand: ledig

SCHULISCHER WERDEGANG

- 1987 – 1991: Lessingschule, Erzhausen
- 1991 – 2000: Ludwig-Georgs-Gymnasium, Darmstadt

STUDIUM

- 2000 – 2001: Studium der Physik (1 Semester)
Technische Universität Darmstadt
- 2001 – 2007: Studium der Humanmedizin
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Ärztliche Prüfung Herbst 2007
- 2003 – 2004: Zwei Auslandssemester im Fachbereich Humanmedizin an
der Ersten medizinischen Fakultät der Karls-Universität
Prag

PRAKTISCHE ERFAHRUNG

Famulaturen

- August 2004: Herz- und Gefäßchirurgie
II. Chirurgische Klinik der Ersten medizinischen Fakultät
der Karls-Universität Prag
- September 2004: Innere Medizin/Infektiologie
Medizinische Universitätsklinik Innsbruck
- März 2005: Strahlentherapie
Universitätsklinik Frankfurt am Main
- August 2005: Praxis für Allgemeinmedizin
Gemeinschaftspraxis Dr. med. Antje Wacker und
Jörg Wacker, Langen

Praktisches Jahr

August 2006 – Juli 2007

- 1. Tertial: Anästhesie
Städtisches Klinikum Darmstadt
- 2. Tertial: Innere Medizin
Städtisches Klinikum Darmstadt
- 3. Tertial: Chirurgie
Thomayers Lehrkrankenhaus der Karls-Universität Prag

LEBENS LAUF - JOHANNA KREUZEDER

DISSERTATION

- Seit 2005 Promotion: „Effekte von Bestrahlung mit Gamma-Strahlen und Chemotherapie mit Paclitaxel auf Ehrlich-Aszites-Tumorzellen“
Abgabe November 2007, Betreuer Prof. Dr. med. Böttcher
Klinik für Strahlentherapie
Universitätsklinik Frankfurt am Main
- März 2007 Teilnahme am 16. Symposium für experimentelle Strahlentherapie und klinische Strahlenbiologie und Vortrag über oben genannte Promotionsarbeit, Dresden

TÄTIGKEITEN NEBEN DEM STUDIUM

- 1998 – 2003 Aushilfstätigkeit in der dm-Drogerie, Egelsbach
- Sommer 2000 Dreimonatiges Praktikum bei der Gesellschaft für Schwerionenforschung (GSI), Darmstadt
- 2005 – 2006 Aushilfstätigkeit in der Gemeinschaftspraxis für Allgemeinmedizin
Dr. med. Antje Wacker und Jörg Wacker, Langen
- Seit 2002 Dozentin für Biologie, Mikrobiologie und Hämatologie der auszubildenden Krankenschwestern und –pfleger an den Darmstädter Kinderkliniken Prinzessin Margarete

EHRENAMTLICHE TÄTIGKEITEN

- Seit 2000 Betreuerin für Sommer- und Winterfreizeiten von Jugendreisen der Sportjugend Hessen

SPRACHKENNTNISSE

- Deutsch Muttersprache
- Englisch fließend
- Tschechisch fließend
- Französisch Grundkenntnisse
- Latein Latinum
- Altgriechisch Graecum

EDV-KENNTNISSE

- Microsoft Office gute Kenntnisse
- Internet gute Kenntnisse

HOBBIES

- Sport (Triathlon, Aerobic, Wandern, Wintersport)
- Tschechische Literatur und Filme

ERZHAUSEN, 14. FEBRUAR 2008