

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. H. L. Fehm

**Zyto- und angiostatische Effekte der
Oxazaphosphorin-Metabolite
4-Hydroxy-Cyclophosphamid
und 4-Hydroxy-Trofosfamid**

unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Thorsten Klink
aus Kaiserslautern

Lübeck 2006

Erster Berichterstatter:	Professor Dr. med. Thomas Wagner
Zweiter Berichterstatter:	Priv.-Doz. Dr. med. Klaus Wagner
Tag der mündlichen Prüfung:	20.11.2006
Zum Druck genehmigt:	Lübeck, den 20.11.2006

gez. Professor Dr. med. Werner Solbach
– Dekan der Medizinischen Fakultät –

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS.....	1
2	EINLEITUNG.....	1
2.1	TUMORANGIOGENESE.....	1
2.2	OXAZAPHOSPHORINE	5
2.2.1	Cyclophosphamid.....	7
2.2.2	Trofosfamid	8
2.2.3	Antiangiogenese und metronomische Therapiekonzepte.....	9
2.3	FRAGESTELLUNG	11
3	MATERIAL UND METHODEN	13
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	13
3.1.1	Zelllinien und Zellkultur.....	13
3.1.2	Isolation von Endothelzellen (HUVEC).....	15
3.2	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE METHODEN	16
3.2.1	Analyse der Zellzyklusphasen	16
3.2.2	Berechnung der Dauer der Zellzyklusphasen.....	19
3.3	PHOTOMETRISCHE METHODEN	23
3.3.1	Der Kristallviolett-Assay zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von S117, LX1 und HUVEC.....	23
3.3.2	Der Kristallviolett-Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität von Oxazaphosphorinen	24
3.3.3	VEGF-ELISA	26
3.3.4	Proteinbestimmung.....	28
3.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG	29
4	ERGEBNISSE	30

4.1	ZELLWACHSTUM	30
4.2	ZELLZYKLUS.....	32
4.2.1	Anteil der Zellen in der Synthesephase	32
4.2.2	Dauer der Zellzyklusphasen	34
4.3	ZYTOTOXIZITÄT	35
4.3.1	Mafosfamid (4OH-Cyclophosphamid und Mesna).....	35
4.3.2	4OOH-Trofosfamid und Mesna.....	36
4.4	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)	39
4.4.1	VEGF-Produktion von S117, LX1 und HUVEC	39
4.4.2	VEGF-Produktion nach zytostatischer Behandlung	41
4.4.3	VEGF-Produktion in Mischkulturen	42
5	DISKUSSION	44
6	ZUSAMMENFASSUNG	55
7	LITERATURVERZEICHNIS	57
8	ANHANG – ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	70
9	ANHANG – TECHNIK.....	72
9.1	DURCHFLUSSZYTOMETER.....	72
9.2	PHOTOMETER.....	72
10	DANKSAGUNGEN.....	73
11	PUBLIKATIONEN.....	75
12	LEBENS LAUF	76

2 Einleitung

2.1 Tumorangiogenese

Der Energiebedarf menschlicher Zellen wird unter Normalbedingungen vorrangig durch den oxidativen Abbau von Nährstoffen gewonnen. Voraussetzung für die Energiegewinnung durch den aeroben Stoffwechsel ist die Anwesenheit von Substraten, wie Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette – sowie von molekularem Sauerstoff in ausreichenden Konzentrationen. In gesundem Gewebe kann eine ausreichende Sauerstoffversorgung gewährleistet werden, wenn Sauerstoffpartialdrücke (pO_2 -Werte) von 25–65 mmHg vorliegen. Ein solcher Oxygenierungsgrad wird als normoxisch bezeichnet.

Tumore weisen dagegen häufig Gewebeareale auf, in denen hypoxische Bedingungen, d.h. niedrige pO_2 -Werte zwischen 0 und 10 mmHg, herrschen (86). VAUPEL et al. haben diesen Sachverhalt für einige Tumorentitäten dargestellt (117). Zur Kompensation der Hypoxie werden durch Tumorzellen Wachstumsstoffe abgegeben, die das Einsprossen neugebildeter Gefäße verursachen und so auf eine verbesserte Sauerstoff- und Nährstoffversorgung hinwirken. Die unkontrollierte und rasche Proliferation vieler Neoplasien verhindert jedoch meist die Ausbildung eines Gleichgewichtes zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf, da die Neoangiogenese in der Regel verzögert und langsamer einsetzt. Eine unzureichende Vaskularisierung erschwert die Sauerstoffdiffusion aufgrund des zunehmenden Abstandes zwischen Kapillare und den zu versorgenden Zellen. Hypoxische Zustände bestehen somit fort und unterhalten die weitergehende Stimulation der Tumorneovaskularisation. Die ununterbrochenen Proliferationsreize für endotheliale Zellen erschweren die Ausreifung der neu angelegten Gefäße, wodurch die Ausbildung eines geordneten und funktionstüchtigen Kapillarsystems innerhalb des Tumorgewebes beeinträchtigt wird (9,68,69,116).

Zusätzlich kann sich eine verminderte O₂-Transportkapazität bei tumorbedingter Anämie nachteilig auf die Oxygenierung auswirken (115).

Hypoxie ist für die Therapie von Tumorerkrankungen von großer Bedeutung, da sie die Effektivität von sauerstoffabhängigen Zytostatika, wie beispielsweise den Oxazaphosphorinen, oder auch die Wirksamkeit einer Strahlentherapie beeinträchtigen kann (114). Durch Hypoxie werden Veränderungen im Genom neoplastischer Zellen induziert, die eine Resistenzbildung gegenüber Chemo- und Radiotherapien begünstigen und malignes Fortschreiten durch zunehmende Tumoraggressivität, Tumorangiogenese und folglich Metastasierung fördern (115). In dieser Problematik spielt das Tumorsuppressorgen p53 eine entscheidende Rolle. Dieses wird häufig als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da es insbesondere für die genomische Integrität der Zelle eine wichtige Rolle spielt. Mutationen am p53-Gen in Tumorzellen führen zu einer Minderung des p53-vermittelten Abbaus des Hypoxia-Inducible-Factors-1 (HIF-1) (102). HIF-1 fördert die Angiogenese über eine verstärkte Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (16). Ebenso entfällt der stimulierende Effekt des p53 auf die Produktion des Angiogeneseinhibitors Thrombospondin-1 (84). Es resultiert ein Ungleichgewicht zugunsten der proangiogenetischen Faktoren.

Seit mehr als drei Jahrzehnten ist die Notwendigkeit einer suffizienten Gefäßversorgung für das Wachstum von Tumoren sowie für die Ausbildung von Metastasen bekannt. Im Jahre 1972 bewiesen GIMBRONE et al. dieses Erfordernis, indem sie Tumorfragmente in Hornhäute von Kaninchenaugen implantierten und im Folgenden beobachteten, wie neugebildete Kapillaren in die normalerweise avaskulären Korneae einwuchsen. Die neovaskularisierten Tumorimplantate nahmen stetig an Größe zu, wogegen in einem anderen Experiment gezeigt wurde, daß die Tumore eine Größe von 0,4 mm nicht überschreiten konnten, wenn die Annäherung von Kapillaren an das Tumorgewebe verhindert wurde. Eine Erklärung für diesen Zusammenhang fanden BREM et al., HOLMGREN et al. sowie

PARANGI et al. durch den Nachweis von ausgedehnten Nekrosen und durch verstärkte Induktion von Apoptose bei Tumorzellen mit mangelhafter Gefäßversorgung (18,71,96).

Beim Erwachsenen tritt die Angiogenese beispielsweise beim weiblichen Reproduktionszyklus oder bei der Wundheilung in Erscheinung, ansonsten befinden sich Gefäßzellen in den nicht-proliferativen Phasen des Zellzyklus. Diese Ruhephasen können jedoch unterbrochen werden, wenn – wie zuvor beschrieben – durch Tumorzellen die Neoangiogenese induziert wird. Dieser Vorgang ist sehr komplex und wurde von verschiedenen Autoren, u. a. AUERBACH et al., COCKERILL et al. und FOLKMAN zusammengefaßt (5,27,44). Ohne eine eigene Gefäßversorgung können Tumore nur eine Größe von 1-2 mm im Durchmesser erreichen. Diese Größenordnung entspricht der Distanz, in der Sauerstoff und Nährstoffe per Diffusion zur Zelle transportiert werden können (45). Wächst der Tumor weiter an, so entsteht eine lokale Gewebshypoxie, die normalerweise, durch Induktion der Apoptose, zum Zelltod führen würde. Damit ein Tumor diese diffusionsbedingte Größenbegrenzung überschreiten kann, wird durch Abgabe von endothelialen Wachstumsfaktoren die Ausbildung eines eigenen Gefäßsystems veranlaßt. Neovaskularisation fördert das Tumorwachstum in zweierlei Hinsicht: Einerseits führt die Perfusion des malignen Gewebes zu einer verbesserten Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, andererseits stimulieren umgekehrt die neu gebildeten Endothelzellen die Proliferation der angrenzenden Tumorzellen durch Abgabe von Wachstumsfaktoren.

Die meisten menschlichen Tumoren leiten zu Beginn ihres Wachstums noch keine Angiogenese ein. Sie bleiben zunächst klein oder in-situ, unter Umständen bis zu Jahren nach ihrem Entstehen. Findet jedoch zu einem nicht vorhersehbaren Zeitpunkt der „Angiogenic Switch“ statt, wird die Vaskularisierung eingeleitet und der Tumor beginnt, sich auszubreiten (46). Die molekularbiologischen Vorgänge des „Angiogenic Switch“ sind noch sehr unklar. Fest steht jedoch, daß die Angiogenese sowohl durch endogene

Aktivatoren als auch Inhibitoren reguliert wird. Es ist davon auszugehen, daß normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Aktivatoren und Inhibitoren vorliegt, und der „Angiogenic Switch“ erfolgt, sobald sich dieses Gleichgewicht zugunsten der Aktivatoren verschiebt (46).

Doch wie können wachsende Tumoren in dieses Gleichgewicht eingreifen? Studien haben gezeigt, daß Tumorzellen in der Lage sind, die notwendigen Faktoren für das Aussprossen von neuen Kapillaren selbst bilden zu können. Die bekanntesten und bedeutendsten tumorassoziierten Angiogenesefaktoren sind bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ein Überblick über wichtige Faktoren der Tumorangiogenese ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Übersicht einiger endogener Angiogeneseaktivatoren und -inhibitoren

Aktivator	Inhibitor
VEGF	Thrombospondin-1
bFGF	Endostatin
Angiopoietin-1	Angiostatin
Interleukin-8	Vasostatin
TNF- α	Angiopoietin-2
Hepatocyte Growth Factor	

VEGF ist einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für die Neubildung von Blutgefäßen (40). Es handelt sich bei der am häufigsten vorkommenden Isoform VEGF₁₆₅ um ein Heparin bindendes, homodimeres Glykoprotein von 45 kDa (41). Physiologisch spielt VEGF eine wichtige Rolle bei der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklung (25,39), bei Skelettwachstum, enchondraler Knochenbildung (51) sowie beim Ovarialzyklus (99). Aber auch auf pathologische Zustände nimmt VEGF Einfluß. VEGF stimuliert die Neoangiogenese von Tumoren (33,43), ebenso wie intraoculäre Neovaskularisationen

bei diabetischer Retinopathie (1,88). Darüber hinaus wird VEGF mit entzündlichen Erkrankungen (33) und dem Hirnödem (81) in Verbindung gebracht.

Der Hauptstimulus für eine verstärkte VEGF-Expression durch Tumorzellen und das angrenzende Stroma (40) ist ein reduzierter Sauerstoffpartialdruck (86,115,129). SHWEIKI et al. beobachteten in Experimenten eine gesteigerte VEGF-Expression in hypoxischen, inneren Schichten von avaskulären Tumorsphäroiden. Diese Überexpression ließ nach, sobald die Sphäroide in oxygeniertes Medium überführt wurden (109).

In-vitro verhindert VEGF über seinen Rezeptor VEGFR-2 die Apoptose von Endothelzellen (50). In-vivo wirkt VEGF auf vaskuläre Endothelzellen und Lymphgefäßzellen mitogen, wobei sich die VEGF-Abhängigkeit dieser Zellen mit der Gefäßreifung, durch Anlagerung von Perizyten, mindert (9). Die Gefäßpermeabilität wird durch VEGF über eine Down-Regulation von Adhäsionsmolekülen gesteigert (127). Es kommt dadurch zu einem Anstieg des interstitiellen Druckes, was sich nachteilig auf den Sauerstoff- und Nährstoffversorgung auswirkt (121). NO-vermittelt erfolgt eine Vasodilatation (40). Die modulierenden Effekte von VEGF betreffen hauptsächlich Endothelzellen, zumal diese die einzigen Zellen sind, die dauerhaft VEGF-Rezeptoren exprimieren. Darüber hinaus konnten NAMIKI et al. nachweisen, daß VEGF in äußerst geringen Mengen auch durch Endothelzellen produziert wird (93).

2.2 Oxazaphosphorine

Zu den heute gebräuchlichen Oxazaphosphorin-Zytostatika gehören die Substanzen Cyclophosphamid, Ifosfamid und Trofosfamid. Unter den antineoplastischen Wirkstoffen zählen sie, neben Chlorambucil, Busulfan und einigen weiteren, zu den alkylierenden Substanzen, den ältesten und am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika (113). Ihr Ursprung liegt im Senfgas, das als biologische Waffe im ersten Weltkrieg eingesetzt

wurde, und von dessen toxischen Auswirkungen auf den Menschen durch KRUMBHAAR und KRUMBHAAR im Jahre 1919 berichtet wurde. Ihre Erkenntnisse wurden zusammengefaßt im Jahre 1958 von KARNOFSKI wiedergegeben, der die Auswirkungen der nahe verwandten Stickstoff-Lost Verbindungen in der Behandlung von Neoplasien erforschte (75). Stickstoff-Lost gilt als Prototyp der alkylierenden Zytostatika. Abbildung 1 gibt eine Übersicht über den chemischen Aufbau der Oxazaphosphorine und zeigt ihre Strukturähnlichkeit zu den Ausgangssubstanzen:

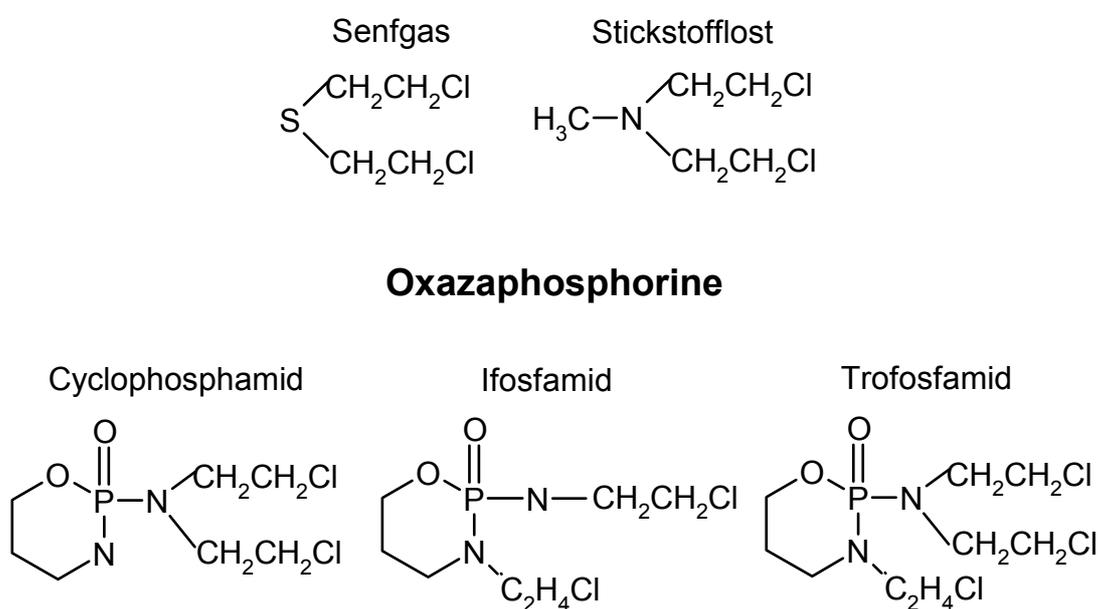


Abbildung 1 Chemotherapeutika aus der Gruppe der Oxazaphosphorine sowie deren Ausgangssubstanzen

Alkylantien sind chemisch labil und neigen dazu, hochreaktive Alkyl-Reste abzuspalten. Diese bilden an elektronenreichen, nukleophilen Stellen von Proteinen kovalente Bindungen aus, wobei bevorzugt Reaktionen mit Schwefel-, Stickstoff-, Sauerstoff- oder Phosphoratomen eingegangen werden. An der DNA ist bevorzugt die Base Guanin am Stickstoffatom an Position 7 (N₇), und weniger häufig an O₆ und N₁, betroffen. Die Bindungen erfolgen jedoch in einer ungleichmäßigen Verteilung. Zum einen werden bestimmte Basensequenzen bevorzugt gebunden, zum anderen können, bei Betrachtung der Tertiärstruktur, internukleosomale DNA-Abschnitte (sog. Linker-Regions), an denen

DNA nicht um Histone gewunden ist, verbesserte Angriffspunkte für alkylierende Substanzen bieten (24,37,38,61). Die bifunktionelle, kovalente DNA-Bindung der Alkylantien führt auf verschiedenen Wegen zum Zelltod. Dieser tritt mit dem DNA-Transkriptions- bzw. DNA-Replikationsversuch der Zelle ein. Es entstehen Strangbrüche und Cross-links durch Vernetzungen innerhalb eines Stranges oder Quervernetzungen zwischen komplementären Strängen, Basendeletionen und Ringöffnungen werden verursacht, sodaß die geschädigte DNA nicht mehr als Replikationsvorlage dienen kann (113).

2.2.1 Cyclophosphamid

Im Jahre 1930 entdeckten SELIGMAN et al., daß eine Vielzahl von soliden Tumoren das Enzym Phosphoamidase überexprimieren (106). Mit dieser Entdeckung, so hofften sie, ließe sich ein besonders nebenwirkungsarmes Zytostatikum zur Behandlung maligner Erkrankungen finden. Dieses müßte in einer nicht-toxischen, inaktiven Form zu verabreichen sein, und erst lokal, von der tumoreigenen Phosphoamidase in die zytotoxische, aktive Form überführt werden. Diese Überlegung aufgreifend, entdeckte wenig später der deutsche Wissenschaftler Norbert BROCK den Wirkstoff Cyclophosphamid mit ausgezeichneten zytostatischen Eigenschaften im Tierversuch (4,85). Klinische Experimente bestätigten im folgenden die zuvor gefundene Wirksamkeit auf Krebserkrankungen (54,80,94). Man fand jedoch bald darauf heraus, daß die Aktivierung des Cyclophosphamid nicht im Tumor, sondern, durch Cytochrom P-450 abhängige Oxidasen, in der Leber stattfindet. Durch hepatische Transformation entsteht das gewebebegänige 4-Hydroxycyclophosphamid (4OH-Cyclophosphamid) und Aldophosphamid. Die 4OH-Metaboliten zerfallen entweder spontan in den zytotoxisch wirksamen Metaboliten Phosphoramid-Lost und in Acrolein, oder sie werden durch die Aldehyd-Dehydrogenase abgebaut (28). Dabei wird dem bifunktionellen Phosphoramid-Lost die alkylierenden Eigenschaften zugeschrieben, während Acrolein renal ausgeschieden und daher für hämorrhagische Zystitiden im Zusammenhang mit einer Cyclophosphamid-Therapie

verantwortlich gemacht wird. Zur Prävention von Nebenwirkungen erhalten Patienten, neben einer hinreichenden Flüssigkeitszufuhr, das Medikament Mesna, das als SH-Gruppen Donator schädigende Acrolein-Moleküle abfängt. Cyclophosphamid kann oral oder intravenös verabreicht werden. Seine Plasmahalbwertszeit beträgt 4 bis 6,5 Stunden (6), die von 4OH-Cyclophosphamid weniger als 3 Minuten (72).

Cyclophosphamid wird bei einer Vielzahl von malignen Erkrankungen eingesetzt. Darüberhinaus wird es bei rheumatischen Erkrankungen angewendet und dient als Immunsuppressivum. Als Teil einer Kombinationschemotherapie wird es bei Non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphomen, Leukämien, Mamma- und Bronchial-Karzinomen, beim Multiplen Myelom sowie bei Sarkomen verabreicht. Ebenso dient es zur Hoch-Dosis-Therapie von Lymphomen und soliden Tumoren (2,34,35,52,63).

2.2.2 Trofosfamid

Die antineoplastische Aktivität von Trofosfamid wurde erstmals 1967 am Yoshida Aszites Sarkom bei Ratten gezeigt (20), erste klinischen Erfahrungen folgten 1970 durch DRINGS et al. (32). Trofosfamid besitzt, bei gleichem Wirkmechanismus, eine stärkere Lipophilie als Cyclophosphamid, und wird deshalb ausschließlich auf oralem Wege verabreicht (19). Wie bei Cyclophosphamid handelt es sich auch hier um eine inaktive Vorstufe, die zum Teil, über eine Cytochrom P450 abhängige Hydroxylierung am ringständigen C₄ Kohlenstoff, in den biologisch aktiven Metaboliten 4OH-Trofosfamid umgewandelt wird (119). Zusätzlich wird Trofosfamid zu einem großen Teil zu Ifosfamid und zu einem geringen Teil zu Cyclophosphamid metabolisiert (19,66,101). Die weiteren Metabolisierungsschritte entsprechen den der übrigen 4OH-Oxazaphosphorinen: 4OH-Trofosfamid zerfällt spontan zu Trofosfamid-Lost und Acrolein, 4OH-Cyclophosphamid – wie oben dargestellt – zu Phosphoramid-Lost und Acrolein und 4OH-Ifosfamid zu Ifosfamid-Lost und Acrolein. Aus Ifosfamid entsteht zusätzlich 2- und 3-Dechloro-

ethylifosfamid, bei deren Umwandlung das zytostatisch wirksame Nebenprodukt Chloracetaldehyd gebildet wird (17,22,83).

Trofosfamid zeigte bei zahlreichen malignen Erkrankungen eine gute Wirksamkeit und war teilweise, bei milder Toxizität, Cyclophosphamid überlegen (119). Die Myelotoxizität gilt als häufigste, dosislimitierende und dosisabhängige Nebenwirkung. Urotoxizität wird bei Trofosfamid seltener beobachtet als bei den anderen Oxazaphosphorinen. Für die orale Erhaltungstherapie beim Non-Hodgkin-Lymphom hat sich die tägliche Einnahme von 3 x 50 mg als gut tolerabel für Patienten erwiesen (126).

Die effektive, orale Verabreichungsform und die gute Verträglichkeit des Trofosfamid erlauben einen bevorzugten Einsatz im ambulanten Bereich. Bisher wurde Trofosfamid in Studien bei Mamma-, Ovarial- und Bronchialkarzinomen, bei Weichteilsarkomen und bei Non-Hodgkin Lymphomen (11,65,73,79,119,125) eingesetzt.

2.2.3 Antiangiogenese und metronomische Therapiekonzepte

In den 60er Jahren zeigten präklinische Studien die höchsten Heilungsraten in der Tumorthherapie, wenn maximal tolerable Dosen (MTD) des Zytostatikums verabreicht wurden (110). Die MTD ist die Höchstdosis eines Medikaments, die ohne Auswirkung auf das Überleben und ohne schwere Nebenwirkungen verabreicht werden kann. In der Onkologie gilt beispielsweise eine Leukopenie vom WHO-Grad II (2.000–3.000/ μ l) als Grenzwert (119). Als nachteilig erweisen sich, bei Verabreichung derart hoher Dosen, die darauf folgenden ausgedehnten Therapiepausen, die zur Regeneration des gesunden Gewebes erforderlich sind. Während dieser Pausen erholen sich nicht nur gesunde Gewebe, sondern auch die genomisch instabilen und zu Mutationen neigenden Tumorzellen. Dabei wird durch Selektion die Ausbildung von Medikamentenresistenzen erleichtert, und die Ansprechraten bei Chemotherapien sinken zum Teil erheblich (7).

In Kenntnis der für das Tumorwachstum notwendigen Angiogenese, richteten KERBEL et al. und BOEHM et al. ihr Augenmerk auf die genomisch stabilen Gefäßendothelzellen, von denen sie eine Resistenzbildung nicht erwarteten (15,77). Um deren Wachstum im Tumorgefäßbett effektiv zu unterdrücken, entwickelten BROWDER et al. einen antiangiogenetischen Therapieplan für Cyclophosphamid, bei dem die Chemotherapie in kürzeren Intervallen, ohne die längeren Pausen verabreicht wurde. Für dieses Vorgehen scheiden viele andere Zytostatika, wie z.B. Anthracycline, Taxane und Vincaalkaloide aufgrund ihrer erheblichen kumulativen Toxizität aus. In der Studie von BROWDER et al. konnte eine erhöhte Apoptoserate der Endothelzellen erzielt werden, wovon im Folgenden auch das Wachstum resistenter Tumorzellen gehemmt wurde (21). Im tierexperimentellen Vergleich zeigte sich ein Vorteil dieser anti-angiogenetischen gegenüber der konventionellen Therapie. Das Tumorwachstum des chemosensitiven Lewis-Lungenkarzinom ließ sich über den gesamten Therapie- und Beobachtungszeitraum unterdrücken, und sogar bei dem chemoresistenten Lewis-Lungenkarzinom war lange anhaltende Wachstumsunterdrückung möglich. Durch Zugabe des Angiogeneseinhibitors TNP-470 konnte eine komplette Remission des resistenten Tumors erzielt werden.

Diese Resultate sind sehr vielversprechend für die Tumorthherapie, in der die Resistenzbildung einen großen Einfluß auf die Prognose und die Überlebenschancen der Patienten ausübt. Das von BROWDER et al. entwickelte Konzept, konventionelle Zytostatika zur Hemmung der Gefäßbildung einzusetzen, wurde mittlerweile von mehreren Wissenschaftlern aufgegriffen, und wird aufgrund der frequenten und kontinuierlichen Verabreichungsweise mit geringeren Einzeldosen als „metronomische Therapie“ bezeichnet (48,58).

2.3 Fragestellung

Die experimentell nachgewiesene Wirksamkeit metronomischer Chemotherapien, mit dem Ziel, Tumorstadium durch Hemmung der Tumorangio-genese zu unterdrücken, eröffnen hoffnungsvolle, neue Wege in der Behandlung maligner Erkrankungen. Vorteile metronomischer Therapieschemata können dabei in einem verbesserten Ansprechen und in einem verminderten Auftreten von schweren Nebenwirkungen liegen.

Ziel dieser Studie war, die in-vivo festgestellte anti-angiogenetische Wirkweise des alkylierenden Oxazaphosphorinzytostatikums Cyclophosphamid bei metronomischer Therapie durch in-vitro Untersuchungen zu untermauern, und diese mit der angiostatischen Effektivität des möglicherweise ebenfalls geeigneten, oral applizierbaren Trofosfamid zu vergleichen. Zur Zeit gibt es nur sehr wenige Studien, in denen die angiostatischen Auswirkungen von Cyclophosphamid in-vitro untersucht wurden. Zu Trofosfamid liegen bisher, außer den eigenen, keine weiteren in-vitro Untersuchungen vor. Zeitgleich zu den hier vorgelegten in-vitro Ergebnissen konnten wir eine angiostatische Potenz des Trofosfamid bei metronomischer Gabe im Tierexperiment nachweisen.

Die Versuchsreihen in dieser Arbeit wurden an den histogenetisch unterschiedlichen, menschlichen Tumorzelllinien S117 (Weichteilsarkom) und LX-1 (Bronchialkarzinom) sowie an menschlichen Endothelzellen aus der Nabelschnur (HUVEC) durchgeführt. Die in-vitro Experimente erfolgten sowohl unter normoxischen (20% O₂), als auch unter hypoxischen (1% O₂) Bedingungen. Zum Vergleich von Tumor- und Endothelzellen wurde das Proliferationsverhalten von Einzel- und Mischkulturen durch Analysen des Zellwachstums und des Zellzyklus untersucht. Außerdem wurde die Zytotoxizität von 4OH-Cyclophosphamid und 4OH-Trofosfamid auf Tumor- und Endothelzellen bestimmt. Abschließend wurde das Vorkommen des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in

zytostatisch behandelten und unbehandelten Einzel- und Mischkulturen von Tumor- und Endothelzellen ermittelt.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zelllinien und Zellkultur

Zelllinien

In den Experimenten wurden die humanen Tumorzelllinien „S117“, ein polymorph-kerniges Sarkom der Schilddrüse (nicht publiziert, in-vitro etabliert von H. Lörke, 1985) sowie „LX1“ (3), ein nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, verwendet. Beide Tumorzelllinien wurden von der Firma „Cell Lines Service“, Heidelberg bezogen. Des Weiteren wurden endotheliale Zellen aus der menschlichen Nabelschnurvene, HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), eingesetzt. Diese wurden uns freundlicherweise von Dr. med. K. Eggers (Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik II der Universität zu Lübeck, unter Leitung von Dr. med. Remppis) zur Verfügung gestellt.

Kultivierung

Die Kultivierung der Zellen erfolgte - soweit nicht anders angegeben - normoxisch, bei 20 % O₂, 5 % CO₂, 37 °C und 98 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Fa. Heraeus, Kendro Laboratory Products, Langenselbold). Für beide Tumorzelllinien wurde RPMI1640 Medium (Fa. Cambrex, Versviers, Belgien) verwendet. Bei den Endothelzellen wurde ein spezielles „Endothelial Cell Growth Medium“ (ECGM; Fa. Promo Cell, Heidelberg) eingesetzt. Die Medien wurden wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2 Zusammensetzung der Kulturmedien

Medium für	Komponente	Volumen
S117 und LX1	RPMI 1640	450 ml
	FKS (10%)	50 ml
	Penicillin/Streptomycin (500x)	1 ml
HUVEC	ECGM	450 ml
	FKS (10%)	50 ml
	Supplement Mix	2 ml
	(mit 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamycin)	

Bei Kulturbeginn wurden 10^6 Zellen in 20 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen und in Kulturflaschen (75cm²; Fa. Nunc, Wiesbaden) ausgebracht. Darin wuchsen die verwendeten Zellen als Monolayerkulturen.

Experimente unter hypoxischen Bedingungen wurden bei einem konstanten Sauerstoffpartialdruck von 7 mmHg (1 % O₂ vol/vol) im Inkubator (Modell 3319, Forma Scientific, Thermo Life Sciences, Egelsbach) durchgeführt. Die Temperatur betrug 37 °C bei Wasserdampfsättigung und 5 % CO₂.

Subkultivierung

Zum Aufrechterhalten eines gleichmäßigen Wachstums durfte die Zelldichte in den Kulturflaschen eine Subkonfluenz nicht überschreiten, weshalb alle 2-6 Tage neue Passagen in geringerer Zelldichte ausgebracht werden mußten. Dabei wurde zunächst das alte Nährmedium aus der Kulturflasche abgesaugt, und der mit Zellen besiedelte Flaschenboden mit 10 ml NaCl (0,9 %) gespült. Danach wurde je nach Zelltyp soviel der 0,05 prozentigen Trypsin-Lösung (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe) hinzugefügt, daß die gesamte Kulturfläche gleichmäßig bedeckt wurde. Nach einer Einwirkzeit von 5 Minuten bei 37 °C lösten sich die Zellen von der Oberfläche. Nach Zusatz von 4 ml Medium wurde die Zellsuspension in Falcon-Röhrchen aufgenommen und zentrifugiert. Die Endothel-

zellen wurden 8 Minuten bei 1000 U/min (=173 x g) zentrifugiert, die Tumorzellen 5 Minuten bei 1300 U/min (=292 x g) (Zentrifuge „Sepatech Megafuge 1.0, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Langenselbold). Das Zellpellet wurde anschließend, nach Absaugen des Überstandes, in frischem Medium resuspendiert und auf mehrere Kulturflaschen verteilt. Diese wurden im Brutschrank wie oben beschrieben inkubiert.

3.1.2 Isolation von Endothelzellen (HUVEC)

Die Endothelzellen wurden aus der Vena umbilicalis menschlicher Nabelschnüre gewonnen. Sie werden in der Fachliteratur als „Human Umbilical Vein Endothelial Cells“, abgekürzt „HUVEC“, bezeichnet. Freundlicherweise stellte uns die Arbeitsgruppe von Dr. med. Remppis mehrere Zellpools zur Verfügung, worin Endothelzellen von jeweils fünf verschiedenen Nabelschnüren enthalten waren.

Die Methode der Zellisolierung stützt sich auf das im Jahre 1973 von JAFFE et al. beschriebene Isolationsverfahren, das im Folgenden zusammengefaßt wird (74): Möglichst wenige Stunden nach der Geburt muß mit der Isolation begonnen werden, indem die Nabelschnurvene zunächst auf Perforationen überprüft wird. Ist die Nabelschnurvene unverletzt, wird eine Knopfkanüle an der Querschnittsöffnung in die Vena umbilicalis eingeführt, vorgeschoben und mit einer Kocher-Klemme fixiert. Das kanülierte Ende wird daraufhin an einem Stativ aufgehängt und die Vene mit 20 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zur Entfernung von Blutresten durchgespült. Nun erfolgt der enzymatische Ablösevorgang der venösen Endothelzellen: Das untere Ende der Nabelschnur wird ebenfalls abgeklemmt und die Vene prall mit einer Enzymlösung, bestehend aus 120 I.U. Dispase in 40 ml DMEM, gefüllt. Damit Dispase optimal wirken und die Zellen aus der Venenwand herauslösen kann, muß die gefüllte Nabelschnur 30 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert werden. Im Anschluß wird die Nabelschnur zur Erhöhung der Zellausbeute vorsichtig massiert. Nach Entfernung einer

Klemme wird die Enzymlyösung mit den darin befindlichen, aus dem Gewebsverband abgelösten Zellen aufgefangen und in Kulturflaschen ausgebracht.

3.2 Durchflußzytometrische Methoden

3.2.1 Analyse der Zellzyklusphasen

Zellen besitzen bei Eintritt in die G₁-Phase des Zellzyklus einen zweifachen (2C) Desoxyribonukleinsäure-(DNA-)Gehalt. Während der folgenden Synthese-Phase (S-Phase) wird der DNA-Gehalt verdoppelt bis die Zellen in der darauf folgenden G₂- und auch in der frühen Mitose-Phase einen vierfachen (4C) DNA-Gehalt aufweisen. Je nach Fortschritt der S-Phase weisen Zellen einen DNA-Gehalt zwischen 2C und 4C auf (siehe hierzu auch Abbildung 2).

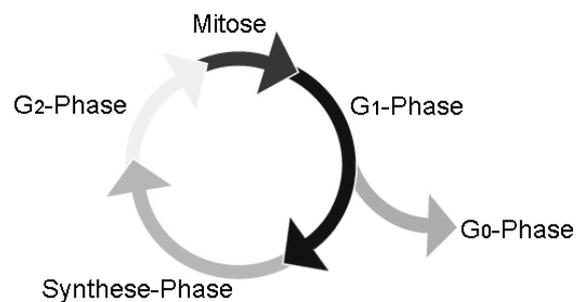


Abbildung 2 Phasen des Zellzyklus

Intrazelluläre, doppelsträngige DNA kann durch 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) markiert, und bei einer Absorptionswellenlänge von 675 nm durchflußzytometrisch erfaßt werden. Die Intensität der Fluoreszenz verhält sich direkt proportional zum DNA-Gehalt der einzelnen Zelle. Auf diese Weise kann jede untersuchte Zelle einer Zellzyklusphase zugeordnet werden, wodurch es möglich wird, beim Betrachten einer ganzen Population Information über deren Proliferationsverhalten zu erhalten (56,70,105).

Durchführung

Die folgende Versuchsanordnung wurde sowohl unter normoxischen, als auch unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in PetriPerm®-Schalen (Ø 50 mm; Fa. InVitro Systems & Services, Göttingen) kultiviert. Diese besitzen

einen gasdurchlässigen Membranboden, wodurch kultivierten Zellen ein optimales Sauerstoffangebot zugeführt werden kann (97).

In jede PetriPerm®-Schale wurden 1×10^6 Zellen ausgesät. Nach 72 Stunden Wachstum wurden die adhärenen Zellen durch Trypsin-Zugabe (Fa. Gibco BRL, Karlsruhe) vom Schalenboden gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 200 µl PBS (Fa. Biochrom, Berlin) resuspendiert und 1 ml der zuvor hergestellten Dimethylsuberimidat- (DMS-) Fixationslösung hinzugegeben (59,62):

Tabelle 3 Zusammensetzung der DMS-Fixationslösung

Vor jedem Versuch wurde eine frische Fixationslösung angesetzt, indem 1 ml der Stocklösung zu 10 ml der Pufferlösung gegeben wurde.

Komponente	Menge/Volumen
<u>Stock-Lösung:</u>	
Dimethylsuberimidat Pulver (Fa. Sigma, Deisenhofen)	100 mg
in Methylformamid (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)	1 ml
<u>Puffer-Lösung:</u>	
TRIS (Fa. Sigma, Deisenhofen)	600 mg
und Na ₂ SO ₄ (Fa. Fluka, Buchs, Schweiz)	1000 mg
in Aqua dest.	100 ml

Die Zellen wurden 5 Minuten bei -20 °C fixiert und nach einmaligem Waschen in 100 µl PBS resuspendiert. Zur Denaturierung der DNA wurden 1 ml 2M Salzsäure (Fa. Merck, Darmstadt) hinzugefügt, dann wurden die Zellen 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (104). Nach Zentrifugieren wurde der Überstand vollständig abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml Borax (0,1M, Fa. Sigma, Deisenhofen) gelöst und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und abschließenden Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 1 ml PBS gelöst und in FACS-Röhrchen überführt. In Verdunkelung wurden der Zellsuspension 20 µl 7-AAD (1mg/2ml PBS, Fa. Sigma, Deisenhofen) hinzugefügt und diese für die Dauer von einer Stunde unter Lichtausschluß bis zur Messung aufbewahrt.

Am Durchflußzytometer (Modell „FACScan“, Becton Dickinson, New York, USA) erfolgte die Untersuchung der vorbereiteten Zellen. Pro Versuchsansatz wurden zwischen 10 000 und 15 000 Zellen untersucht.

Auswertung

Nach Erfassung der durchflußzytometrischen Daten wurden die Zellzyklusphasen mit Hilfe der Software „Cylchred 1.0.2“ (CytonetUK, Cardiff, England) analysiert. Die automatisierte Berechnung der Phasenanteile stützt sich auf Algorithmen von ORMEROD et al. (95). Abbildung 3 zeigt beispielhaft die Auswertung der Daten:

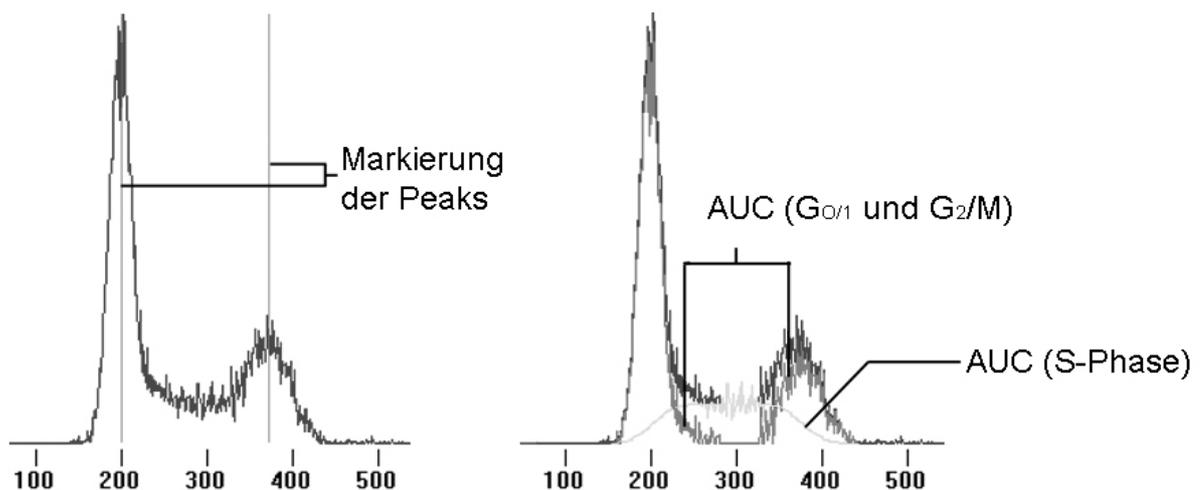


Abbildung 3 Bildschirmausgabe der Software „Cylchred 1.0.2“ zur Analyse des Zellzyklus

Die *x*-Achse stellt das Ausmaß der DNA-Fluoreszenz dar; *y*-Werte entsprechen der Zellzahl / *x*-Wert.

Linkes Histogramm: Zunächst müssen die Peaks der Kurve durch Linien markiert werden. Der Schnittpunkt der linken Peak-Markierung mit der *x*-Achse entspricht dem mittleren *x*-Wert der Zellen in der G_0/G_1 -Phase, der Schnittpunkt der rechten entspricht dem mittleren *x*-Wert der Zellen in der G_2+M -Phase. Die *x*-Werte der Zellen in der S-Phase liegen zwischen den beiden Schnittpunkten.

Rechtes Histogramm: Nach diesen Voreinstellungen berechnet das Programm die Flächen unterhalb des linken und rechten Peaks sowie des dazwischen liegenden Kurvenabschnitts (engl.: area under the curve, AUC). Der prozentuale Anteil der Zellen in der Synthese-Phase läßt sich durch die Relation des Teilflächeninhaltes „AUC (S-Phase)“ zum Gesamtflächeninhalt $AUC (G_{0/1}+S+G_2/M)$ errechnen.

3.2.2 Berechnung der Dauer der Zellzyklusphasen

BEGG et al. und WHITE et. al. entwickelten ein Schätz-Verfahren, womit die Dauer der Zellzyklusphasen S und G₂+M (T_s , T_{G_2+M}) sowie der potentiellen Verdoppelungszeit (T_{pot}) berechnet werden kann (8,122,123,124).

Die Zellen müssen dazu 30 Minuten mit 5-Bromo-2-desoxyuridin (BrdU), welches während der Synthese-Phase anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, inkubiert werden. Nach der Inkubation mit BrdU werden die Zellen weitere sechs Stunden kultiviert. Nach dieser Wachstumsphase werden, durch Bindung fluoreszierender BrdU-Antikörper an zuvor inkorporiertes BrdU, die Zellen markiert, die sich während der halbstündigen BrdU-Behandlung in der Synthese-Phase befanden. Gleichzeitig erfolgt eine Markierung der DNA mit 7-AAD.

Analytisches Prinzip

Die analytische Methode der oben aufgeführten Autoren stützt sich auf drei Größen, die durch das Durchlaufen des Zellzyklus bestimmt werden:

- Die erste Größe ist der Anteil der BrdU-markierten Zellen (labelled), die zum Zeitpunkt der Messung ($t = 6 \text{ h}$) noch keine Mitose eingegangen sind (undevided).
→ $f^{lu}(t)$
- Die zweite Größe ist der Anteil der BrdU-markierten Zellen (labelled), die sich bereits geteilt haben (devided).
→ $f^{ld}(t)$
- Als dritte Größe wird der mittlere 7-AAD-Fluoreszenzwert (=DNA-Fluoreszenz) der BrdU-markierten (labelled) Zellen benötigt.
→ \bar{F}_L

Zusätzlich ist der Mittelwert der DNA-Fluoreszenz der Zellen in G₁- und G₂+M-Phase (\bar{F}_{G_1} und \bar{F}_{G_2+M}) erforderlich, um den „Relative Movement“-Wert (RM(t)) der Zellen in der S-Phase zu bestimmen:

$$RM(t) = \frac{\bar{F}_L - \bar{F}_{G1}}{\bar{F}_{G2+M} - \bar{F}_{G1}}$$

„Relative Movement“ quantifiziert den Synthesefortschritt von Zellen in der S-Phase, wobei dieser in Relation zur Gesamtdauer der S-Phase angegeben wird.

- zu Beginn der S-Phase: $RM(t) = 0 \%$
- am Ende der S-Phase: $RM(t) = 100 \%$

Folgende Formeln werden für die Berechnung von T_s , $T_{G2/M}$ und T_{pot} bei einer vermuteten exponentiellen Wachstumsrate c verwendet:

$$T_s = \frac{v}{c}$$

$$T_{G2/M} = t + \frac{\ln\left(\frac{1 - f^{ld}(t)}{2}\right)}{c}$$

$$T_{pot} = \frac{\ln(2)}{c}$$

- Voraussetzung: $T_s > t = 6 \text{ h} > T_{G2+M}$
- d.h. $f^{ld}(t) > 0$ und $RM < 100 \%$

Die in den Formeln aufgeführten Variablen v , c und θ lassen sich wie folgt berechnen:

$$v \equiv \ln\left(\frac{1 + f^{lu}(t)}{1 - f^{ld}(t)/2}\right)$$

$$c = \frac{v - 2 \cos\left(\frac{\theta - 2\pi}{3}\right) - 1}{t}$$

$$\theta = \arccos\left[1 - \frac{3vf^{lu}(t)(1 - RM(t))}{1 + f^{lu}(t)}\right]$$

BrdU-Inkorporation

Zur Durchführung dieser Versuchsreihe wurden jeweils 1×10^6 Zellen in einer Kulturflasche mit 75 cm^2 Adhäsionsfläche kultiviert. Nach 72 Stunden Anzucht wurde mit der BrdU-Inkorporation begonnen. Nach Entfernen des verbrauchten Mediums wurden die Zellen mit $60 \mu\text{l}$ BrdU-Lösung in 20 ml Medium ($30 \mu\text{M}$) für 30 Minuten unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Zur Herstellung der BrdU-Lösung wurden 31 mg BrdU (Fa. Sigma, Deisenhofen) in 10 ml PBS (Fa. Biochrom, Berlin) gelöst. Nach Abnahme des Überstandes wurde der Kulturboden zweimal mit PBS gespült und nach Zugabe von 20 ml Medium erfolgte eine abschließende Inkubation von 6 Stunden unter normoxischen Bedingungen. Diese Versuchsreihe wurde nicht unter hypoxischen Bedingungen durchgeführt, da durch mehrmalig notwendiges Öffnen des Hypoxieinkubators eine konstante O_2 -Konzentration von 1% nicht hätte gewährleistet werden können.

Durchführung

Die vorbereitenden Arbeitsschritte entsprechen der in Absatz 3.2.1 beschriebenen DNA-Färbung mit 7-AAD. Zusätzlich zu diesen Arbeitsschritten wurden bei diesem Verfahren $20 \mu\text{l}$ des Anti-BrdU-FITC-Antikörpers (Klon F7210; Fa. DakoCytomation, Hamburg) zugesetzt. Danach wurden die Proben eine Stunde unter Lichtausschluß bis zur Messung aufbewahrt. Am Durchflußzytometer (Modell „FACScan“, Fa. Becton Dickinson, New York, USA) wurden $10\,000$ bis $15\,000$ Zellen pro Versuchsansatz untersucht. Aus den erhobenen Daten wurden anhand der Formeln (siehe Seite 20) T_s , $T_{G2/M}$ und T_{pot} berechnet.

Zur besseren Anschaulichkeit sind in der folgenden Abbildung 4 die durchflußzytometrisch erhobenen Daten beispielhaft dargestellt. Zur Gerätesteuerung des „FACScan“ wurde die Software „CellQuest 3.1f“ (Fa. Becton Dickinson, New York, USA) verwendet. Zur Verarbeitung der Daten kam das Programm „WinMDI 2.8“ (Joseph Trotter, The Scripps Institute, La Jolla, CA, USA) zum Einsatz.

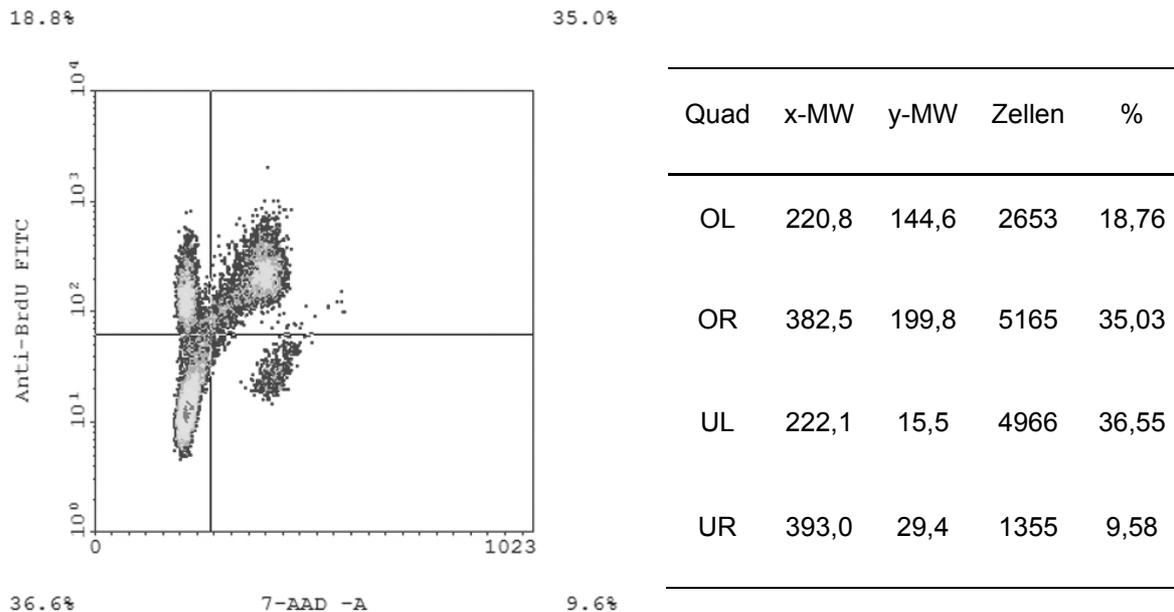


Abbildung 4 Bildschirmausgabe der Software „WinMDI 2.8“

Das Diagramm zeigt auf der x-Achse die DNA-Fluoreszenz, also den 7-AAD-Gehalt. Auf der y-Achse wird das Ausmaß der BrdU-Antikörperbindung erfaßt. Die Diagrammpunkte entsprechen je nach Farbe niedriger (dunkelgrau) bis hoher (hellgrau) Zelldichte.

Das Platzieren des Quadrantenkreuzes muß so erfolgen, daß eine eindeutige Trennung der Subpopulationen subjektiv nachvollziehbar ist. Die Zellen im linken oberen Quadranten entsprechen $f^{ld}(t)$, d.h. sie haben BrdU inkorporiert und sind innerhalb der sechsständigen Kultivierung eine Mitose eingegangen. Die Zellen im rechten oberen Quad-

ranten entsprechen $f^{lu}(t)$, d.h. sie wurden ebenfalls markiert, sind aber noch keine Mitose eingegangen.

In der Tabelle sind die, nach Platzieren des Kreuzes, berechneten Quadranteninformationen dargestellt.

OL: oberer linker Quadrant
 OR: oberer rechter Quadrant
 UL: unterer linker Quadrant
 UR: unterer rechter Quadrant
 x-MW: mittlerer x-Wert
 y-MW: mittlerer y-Wert

3.3 Photometrische Methoden

3.3.1 Der Kristallviolett-Assay zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von S117, LX1 und HUVEC

Kristallviolett (N-hexamethylpararosanilin) ist ein Farbstoff, der in Nuclei von Zellen nachweisbar ist, die vor Durchführung der im Folgenden beschriebenen Versuchs- und Fixationsmethode vital waren. Der aufgenommene Farbstoff kann durch Zugabe von Essigsäure aus den Zellkernen wieder herausgelöst werden. Im Experiment entsteht dadurch eine Farblösung, deren Intensität photometrisch bestimmt wird und deren Extinktionswerte mit der vorliegenden Zellzahl korrelieren (82).

Durchführung

Für jede Zelllinie wurden pro Versuch acht PetriPerm®-Schalen (Ø 35 mm; Fa. InVitro Systems & Services, Göttingen) benötigt, wovon vier unter normoxischen und vier unter hypoxischen Bedingungen inkubiert wurden. Die Messungen erfolgten nach 24, 48, 72 und 96 Stunden. Zu Beginn wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 2 ml Medium ausgesät. Zu den oben genannten Meßzeitpunkten wurde die Inkubation je einer Zellkultur unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen beendet. Die folgenden Versuchsschritte wurden mit beiden Schalen parallel durchgeführt:

Zunächst wurden die Zellen durch Zugabe von 150 µl Glutaraldehyd (11 % vol/vol; Fa. Sigma, Deisenhofen) 15 Minuten fixiert. Nach Absaugen und dreimaligem Waschen mit Aqua dest. erfolgte eine 5-10 minütige Trocknungsphase in deren Anschluß die Zellen mit 1,25 ml der Kristallviolettlösung während 20 Minuten bei 500 U/min auf dem Plattenrüttler bei Raumtemperatur gefärbt wurden. Zur Herstellung der 0,1 %igen Färbelösung wurden 100 mg Kristallviolett-Pulver (Fa. Sigma, Deisenhofen) in 100 ml 0,2 M Morpholinoethansulfonsäure- (MES-) Puffer (pH 6,0; Fa. Gerbu, Gaiberg) gelöst. Nach Absaugen der Farblösung und fünfmaligem Waschen erfolgte eine weitere Trocknungsphase von 5-10 Minuten. Anschließend wurde der gebundene Farbstoff durch

Zugabe von 1,25 ml Essigsäure (10 % vol/vol; Fa. Merck, Darmstadt) aus den Zellkernen herausgelöst und zur photometrischen Messung auf eine 96er-Mikrotiterplatte überführt. Als Leerwert dienten 100 µl Essigsäure. Die Extinktionswerte wurden bei 590 nm Wellenlänge mit dem Mikrotiterplatten-Photometer „Multiskan RC“ (Fa. Dynex Technologies, Chantilly, VA, USA) gemessen und durch Subtraktion des Leerwertes korrigiert.

3.3.2 Der Kristallviolett-Assay zur Untersuchung der Zytotoxizität von Oxazaphosphorinen

Das im vorigen Abschnitt beschriebene Prinzip der Kristallviolett-Färbung nach KUENG et. al. hat sich nicht nur für Untersuchungen des Wachstumsverhaltens, sondern auch für Zytotoxizitätsuntersuchungen bewährt (82). In dieser Versuchsreihe wurden 96-well Lumox®-Mikrotiterplatten (Fa. InVitro Systems & Services, Göttingen) verwendet, die, ebenso wie PetriPerm®-Schalen, mit einem gasdurchlässigen Membranboden ausgestattet sind (97).

Vorbereitung

Für jede Zelllinie wurden sechs Mikrotiterplatten vorbereitet: Zwei Platten für die unbehandelten Kontrollen jeweils unter Norm- und Hypoxie, und insgesamt vier weitere für die beiden Zytostasebehandlungen jeweils unter Norm- und Hypoxie. Zunächst wurden Zellsuspensionen von 3×10^4 Zellen/ml Medium vorbereitet, wovon im Folgenden je 100 µl, also 3.000 Zellen in die vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert wurden. Für die Kontrolle wurden – ebenso wie für jeden Konzentrationsschritt – 6×3.000 Zellen ausgesät. Um das Verdunsten des Mediums gering zu halten wurden je 100 µl Medium in die Randvertiefungen pipettiert. Die Zellen wurden nach Ausbringen 24 Stunden, unbehandelt, unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen inkubiert.

Behandlung

Vor Beginn der Behandlung wurden Zytostatikalösungen der aktivierten Oxazaphosphorinmetaboliten in Konzentrationen von 2,5; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 60 und 80 $\mu\text{mol/l}$ Medium hergestellt. Da Mafosfamid (Fa. Baxter Oncology, Frankfurt) in Medium zu gleichen Anteilen in 4OH-Cyclophosphamid und Mesna zerfällt, wurde – zur besseren Vergleichbarkeit – bei Gabe von 4OOH-Trofosfamid (Fa. Baxter Oncology, Frankfurt) äquimolar Mesna (Urometixan®, Asta Medica) hinzugefügt. Die Ansätze für die unter

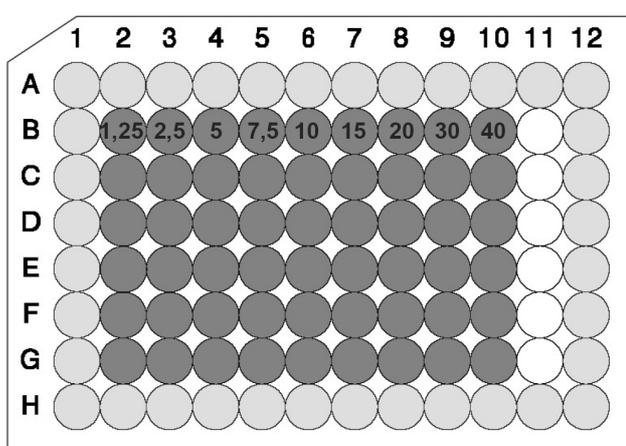


Abbildung 5 Kristallviolett-Assay

Pipettierschema für die Zytotoxizitätsuntersuchungen. Die Randwells wurden mit Medium befüllt (hellgrau); Sechs Einzelwerte pro Konzentration (dunkelgrau) wurden gemittelt.

Hypoxie inkubierten Zellen wurden mit Stickstoff begast.

Es wurden in sechs Vertiefungen jeweils 100 μl der vorbereiteten Zytostatikakonzentration hinzugefügt (siehe Abbildung 5). Im Medium lagen nun folgende Endkonzentrationen vor: 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10; 15; 20; 30 und 40 nmol/ml. Der Kontrolle wurden 100 μl Medium pro Vertiefung hinzugefügt. Daraufhin

wurden die Zellen weitere 48 Stunden unter Norm- bzw. Hypoxie inkubiert.

Kristallviolett-Färbung

Die Zellen wurden durch Zugabe von je 20 μl Glutaraldehyd (11 % vol/vol; Fa. Sigma Deisenhofen) 15 Minuten fixiert. Nach Absaugen und dreimaligem Waschen mit Aqua dest. erfolgte eine 5-10 minütige Trocknungsphase in deren Anschluß die Zellen mit je 100 μl der 0,1 %igen Kristallviolett-Farblösung (Herstellung wie im vorigen Abs. 3.3.1 beschrieben) für 20 Min. versetzt wurden. Nach Absaugen der Farblösung und fünfmaligem Waschen erfolgte eine weitere Trocknungsphase von 5-10 Minuten.

Anschließend wurde der während der Färbephase gebundene Farbstoff durch Zugabe von je 100 µl Essigsäure (10 % vol/vol) aus den Zellkernen herausgelöst. Eine Vertiefung enthielt 100 µl der Essigsäure als Leerwert. Die optische-Dichte-Werte wurden bei 590 nm gemessen und durch Subtraktion des Leerwertes korrigiert. Die prozentuale Angabe des Zellüberlebens wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Zellüberleben [\%]} = \frac{\overline{OD}(\text{Zytostasekonzentration})}{\overline{OD}(\text{Kontrolle})} \times 100$$

3.3.3 VEGF-ELISA

Zur Bestimmung der VEGF-Konzentration in den Kulturüberständen wurde der Immunoassay „Quantikine®“ (Fa. R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) verwendet. Nach dem „Sandwich-Verfahren“ wird das zu untersuchende Medium in die Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben, wobei die Kunststoffoberflächen der Vertiefungen mit Fab-Bindungsstellen monoklonaler VEGF-Antikörper überzogen sind. Diese Antikörper binden die in der Probe enthaltenen VEGF-Proteine. Nach Entfernen ungebundenen Materials durch Waschen wird gebundenes VEGF-Protein mit einem zweiten Antikörper inkubiert, an den das Enzym „Meerrettich-Peroxidase“ kovalent gekoppelt ist. Nach einem erneuten Waschvorgang wird ein farbloses Substrat, bestehend aus Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin in die Vertiefungen gegeben, wodurch über den Sekundärantikörper eine Farbreaktion hervorgerufen wird. Als Maß für die Substratumwandlung und damit für die VEGF-Konzentration des Mediums wird die optische Dichte der Farblösung herangezogen.

Versuchsreihen

1. Zunächst wurde VEGF in Medien normoxisch und hypoxisch kultivierter Tumor- und Endothelzellen nachgewiesen. Dazu wurden 5×10^4 Zellen in 2 ml Medium in

PetriPerm®-Schalen (Ø 35 mm; Fa. InVitro Systems & Services, Göttingen) ausgebracht. Nach 24, 48 und 72 Stunden erfolgte die Abnahme der zu untersuchenden Überstände. Um die ermittelte VEGF-Produktion von unterschiedlich proliferierenden Kulturen miteinander vergleichen zu können, wurde außerdem die Proteinkonzentration in den Versuchsproben bestimmt (siehe folgendes Kapitel 3.3.4).

2. In einem folgenden Experiment wurden die Tumorzellen, nach 24 Stunden norm- bzw. hypoxischer Inkubation, mit der zuvor bestimmten IC_{50} von Mafosfamid bzw. 4OOH-Trofosfamid und Mesna (Urometixan®; Fa. Baxter Oncology, Frankfurt) für weitere 48 Stunden behandelt. Danach wurden VEGF-Konzentrationen im Medium ermittelt.

3. In der dritten Versuchsreihe wurden Tumor- und Endothelzellen gemeinsam kultiviert.

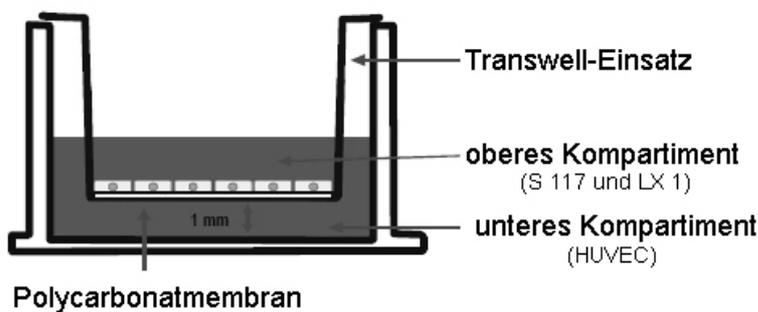


Abbildung 6 Transwell® Polycarbonatmembran-Platte zur Co-Kultur von Tumor- und Endothelzellen

Tumorzellen wurden in das obere Kompartiment ausgebracht, Endothelzellen in das untere. Mikroporen in der Polycarbonatmembran haben eine Größe von 3 µm und sind für die im Medium gelösten Wachstumsfaktoren, wie VEGF, durchlässig.

Zur Co-Kultur wurden 6-Loch Polycarbonatmembran-Platten (Transwell®, Porengröße 3,0 µm, Corning Costar Inc., New York, USA) verwendet (Siehe Abbildung 6). Es wurden jeweils 4×10^4 Zellen in die, durch die Membran abgetrennten, Kompartimente ausgebracht und mit ECGM in Norm- bzw. Hypoxie kultiviert.

Zuvor waren Unterschiede im Tumorzellwachstum bei vergleichender Anwendung von RPMI 1640 und ECGM ausgeschlossen worden. Nach 72 Stunden wurde das gemeinsame Medium auf den Gehalt an VEGF untersucht.

Durchführung und Messung

Nach Vorbereitung der Reagenzien und der VEGF-Standardverdünnungen wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte 50 µl der „Assay Diluent“-Lösung gegeben. Dazu wurden je 200 µl der Standardverdünnung sowie 200 µl des zu untersuchenden Kulturmediums pipettiert. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Vertiefungen dreimal ausgewaschen und mit 200 µl der Konjugat-Lösung wieder befüllt. Es folgte eine weitere Inkubation von zwei Stunden. Danach wurde die Flüssigkeit entfernt und die Mikrotiterplatte gespült. Es wurden 200 µl der Substrat-Lösung hinzugegeben, welche 20 Minuten unter Lichtausschluß einwirkte. Abschließend wurde durch Zugabe von 50 µl der Stop-Lösung die Reaktion beendet und die Mikrotiterplatte direkt am Photometer bei 450 nm gemessen. Die optischen Dichtewerte konnten nach Erstellen einer Standardkurve als Konzentrationen (ng/l) angegeben werden.

3.3.4 Proteinbestimmung

Die mittels ELISA erfaßten VEGF-Konzentrationen wurden unter Berücksichtigung der Zellproteinkonzentration der untersuchten Probe angegeben:

$$\frac{x \text{ ng VEGF} / 1 \text{ Medium}}{1 \text{ g Protein} / 1 \text{ Medium}}$$

Durchführung

Zur Proteinbestimmung wurde der „DC Protein Assay“ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) verwendet, der auf einem von LOWRY et al. entwickelten Verfahren basiert (87,98). Nach Abnahme des Überstandes zur VEGF-Bestimmung, wurden die PetriPerm®-Schalen zweimal mit PBS gespült. Dann wurden je 200 µl PBS in die Schalen gegeben, die Zellen mit einem Schaber von der Oberfläche gelöst und in Falconröhrchen überführt. Mittels Ultraschallsonde wurden die Proben lysiert und unverzüglich auf Eis

gelagert. Als nächstes wurde eine Protein-Standardreihe mit Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 g/l vorbereitet. In eine 96-Loch Mikrotiterplatte wurden zunächst Duplikate von 5 µl des Standards pipetiert, dann Duplikate von 5 µl der zu untersuchenden Proben. Danach wurden den Vertiefungen je 25 µl einer Lösung aus „Reagenz A“, einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung, und „Reagenz S“ im Verhältnis 20:1 hinzugegeben. Anschließend wurden pro well 200 µl der „Reagenz B“, einer Folinlösung, hinzugefügt und die Platte nach vorsichtigem Rütteln bei einer Wellenlänge von 630 nm am Photometer gemessen. Nach Erstellen einer Standardkurve konnten anhand der Extinktionswerte Konzentrationen (g/l) angegeben werden.

3.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertungen wurden die Programme „GraphPad Prism 4.0“ (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) und „Primer of Biostatistics“ (S. Glantz, McGraw Hill, OH, USA) herangezogen. Anhand der Dosis-Wirkungskurven für 4OH-Cyclophosphamid und 4OH-Trofosamid wurden zunächst die für eine statistische Auswertung aussagekräftigeren IC₅₀-Werte berechnet, die Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte dann mit dem non-parametrischen, zweiseitigen Wilcoxon-Matched-Pairs-Test (47). Für die Auswertung von Zellwachstum, Zellzyklus und VEGF-Bildung kamen die non-parametrischen Tests nach Kruskal-Wallis und Mann-Whitney-Wilcoxon zum Einsatz. P-Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Zellwachstum

Um die Frage der Sauerstoffabhängigkeit im Wachstumsverhalten von S117, LX1 und HUVEC zu untersuchen, wurden die Zellkulturen über einen Zeitraum von maximal 96 Stunden in normoxischer (20% O₂) oder hypoxischer (1% O₂) Atmosphäre inkubiert. Das Zellwachstum wurde alle 24 Stunden mittels Kristallviolett färbung untersucht. Die Diagramme in der Abbildung 7 zeigen das Wachstumsverhalten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.

Sowohl bei den Tumorzellen S117 und LX1, als auch bei den Endothelzellen HUVEC zeigte sich spätestens nach 96 Stunden Kultivierung ein Wachstumsvorteil der normoxischen Kultur. Die Extinktionswerte bei hypoxisch kultivierten Endothel- und Tumorzellen betragen dann zwischen 46% und 66% der Meßwerte von normoxisch kultivierten Zellen. Trotz weitgehender Sauerstoffabwesenheit war kein Wachstumsstillstand zu verzeichnen. Die maximalen OD-Werte lagen allerdings bei Endothelzellen deutlich niedriger als bei den Tumorzellen.

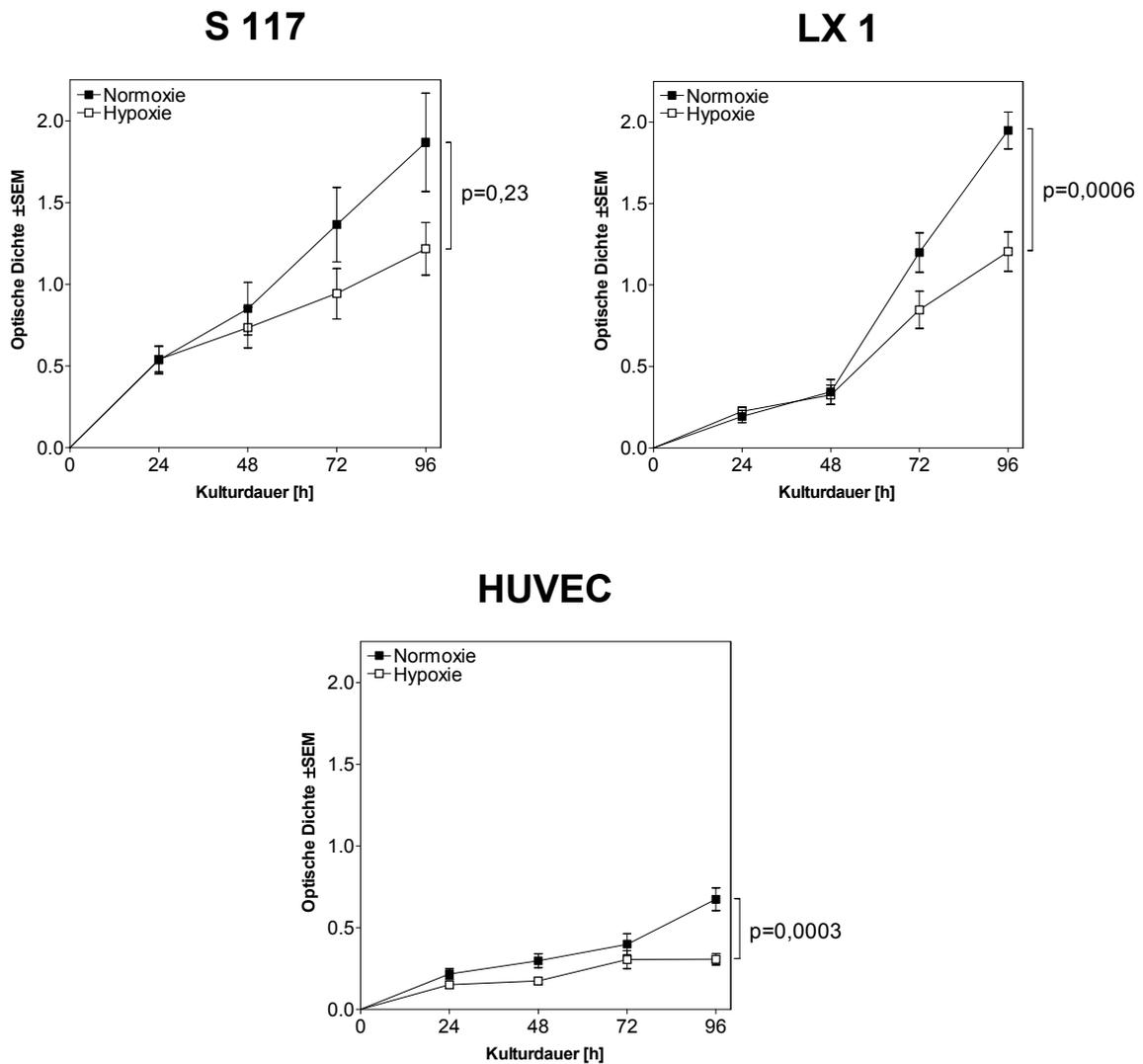


Abbildung 7 Charakterisierung des Zellwachstums verschiedener Zelllinien mit dem Kristallviolett-Assay

Unterschiede des Zellwachstums bei norm- (20% O₂) und hypoxischer (1% O₂) Kultur im Verlauf über 96 Stunden. Die Zunahme der optischen Dichte entspricht einem Anstieg der Zellzahl. Es ist dabei zu beachten, daß, bei gleichen OD-Werten der verschiedenen

Zelllinien, die absolute Zellzahl unterschiedlich sein kann. Die Messungen erfolgten im Intervall von 24 Stunden. (Mittelwerte ± Standardfehler, n = 10 Experimente, durchgeführt in Hexaplikaten)

4.2 Zellzyklus

4.2.1 Anteil der Zellen in der Synthesephase

Um den Einfluß des Sauerstoffgehaltes auf das Proliferationsverhalten näher zu untersuchen, wurden die Zellzyklen von S117-, LX1- und HUVEC-Kulturen nach Inkubation in Norm- und Hypoxie durchflußzytometrisch analysiert. In Abbildung 8 wird der prozentuale Anteil der Zellen in der Synthesephase dargestellt.

Bei den Sarkomzellen befand sich sowohl unter norm- als auch unter hypoxischen Bedingungen der größte Zellanteil in Synthesephase. Dieser betrug bei Normoxie 46 % und bei Hypoxie 36%. Die Lungenkarzinomzellen reagierten auf Hypoxie durch eine Abnahme des S-Phasen-Anteils von 40 % auf 25 %. Die Anteile der Endothelzellen in S-Phase waren mit 21 % unter Normoxie und 16 % unter Hypoxie niedriger als bei den Tumorzellen.

Bei den Tumorzelllinien S117 und LX1 bestanden signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen Norm- und Hypoxie im Anteil der Zellen in der Synthese-Phase. Dagegen ergab sich bei den Endothelzellen keine Signifikanz.

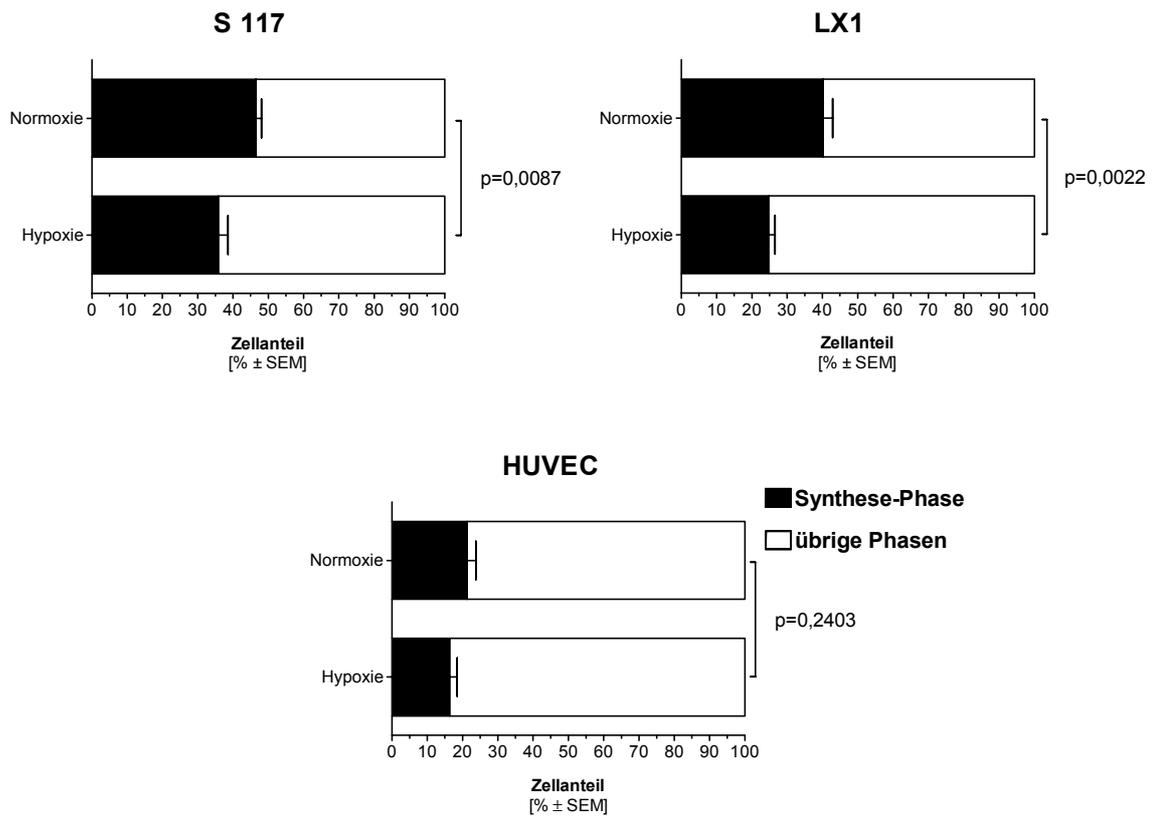


Abbildung 8 Analyse des Zellzyklus von Tumor- und Endothelzellen

Die Diagramme zeigen den Anteil der Tumor- und Endothelzellen in der Synthesephase in Relation zum gesamten Zellzyklus. Die Analysen erfolgten durch Markierung der DNA mit 7-AAD nach 72 Stunden normoxischer (20%

O₂) und hypoxischer Inkubation (mittlere Prozentwerte ± Standardfehler, n = 6 Experimente aus Messungen von jeweils mindestens 10.000 Einzelzellen).

4.2.2 Dauer der Zellzyklusphasen

Um das Proliferationsverhalten von Zellen zu charakterisieren, spielt neben der Bestimmung der prozentualen Anteile der Zyklusphasen auch deren Dauer eine wichtige Rolle. Nach Inkorporation von BrdU wurden mittels durchflußzytometrischer Untersuchung die Dauer der Synthesephase (T_S) der G₂/M-Phase ($T_{G2/M}$) und potentielle Verdoppelungszeit (T_{pot}) für die normoxisch inkubierten Zellkulturen berechnet. In der Abbildung 9 sowie in Tabelle 4 werden T_S und T_{pot} dargestellt.

Trotz der Unterschiede im prozentualen S-Phasenanteil differierten die errechneten S-Phasen-Zeiten nur gering. Zwischen LX1 und HUVEC ließen sich hier signifikante Unterschiede finden. Die potentielle Verdoppelungszeit war bei LX1-Zellen deutlich kürzer als bei S117 und HUVEC. Zwischen S117 und HUVEC bestand hier kein signifikanter Unterschied.

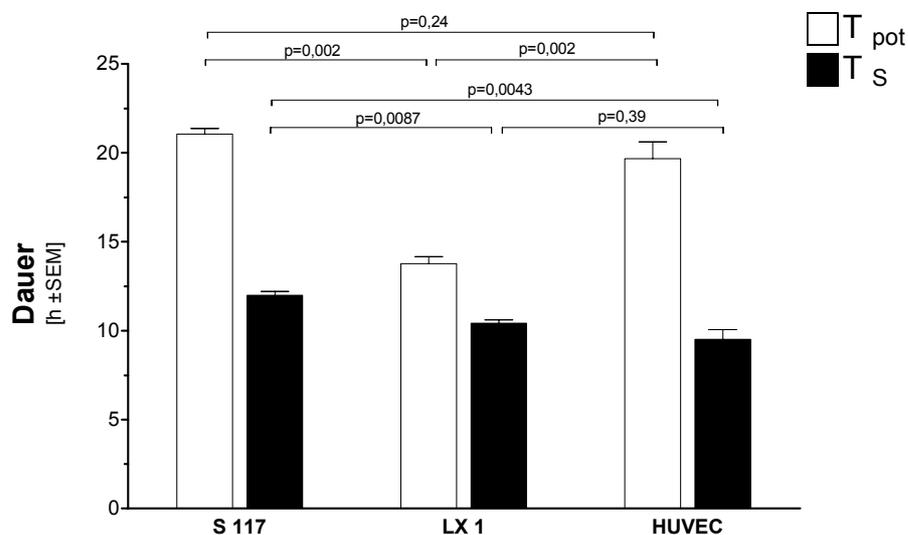


Abbildung 9 Dauer der Zellzyklusphasen

Das Diagramm zeigt die potentielle Verdopplungszeit (T_{pot}) und die Dauer der Synthese-Phase (T_S) von Tumor- und Endothelzellen nach 72 Stunden normoxischer

(20% O₂) Inkubation. (Mittelwerte ± Standardfehler, n = 6 Experimente aus Messungen von mindestens 10.000 Zellen)

Tabelle 4 Dauer der Zellzyklusphasen

Mittlere Dauer [h] der Synthesephase (T_S), der G₂/M-Phase (T_{G2M}) und der potentiellen Verdopplungszeit (T_{pot}) nach 72 Stunden Inkubation unter normoxischen Bedingungen (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=6).

Zelllinie	T_S	T_{G2M}	T_{pot}
S117	11,9 \pm 0,6	4,9 \pm 0,3	21,1 \pm 0,8
LX1	10,4 \pm 0,5	3,1 \pm 0,4	13,8 \pm 1,0
HUVEC	9,5 \pm 1,3	3,8 \pm 0,5	19,7 \pm 2,3

4.3 Zytotoxizität

Nach 24 Stunden norm- oder hypoxischer Vorinkubation wurden die Zellkulturen mit ansteigenden Konzentrationen von Mafosfamid bzw. 4OOH-Trofosfamid und Mesna behandelt. Da Mafosfamid in wässriger Lösung zu gleichen Teilen in den biologisch aktiven Metaboliten 4OH-Cyclophosphamid und in Mesna zerfällt, wurde zu 4OOH-Trofosfamid äquimolar Mesna hinzugegeben. 4OOH-Trofosfamid wird zu 4OH-Trofosfamid reduziert. Die Wirksamkeit der Zytostatika wurde nach 48 Stunden Behandlung mit dem Kristallviolett-Assay untersucht. Die folgenden Abbildungen 10 und 11 zeigen die Konzentrations-Wirkungskurven unter norm- und hypoxischen Bedingungen.

4.3.1 Mafosfamid (4OH-Cyclophosphamid und Mesna)

Bei Verabreichung von 4OH-Cyclophosphamid unter normoxischen Bedingungen lassen sich die Verläufe der Dosis-Wirkungskurven der Endothel- und Tumorzellen kaum voneinander unterscheiden. Insbesondere zwischen Endothel- und Lungenkarzinomzellen sind bei höheren Wirkstoffkonzentrationen, zwischen 15 und 40 μ mol/l, Überschneidungen der Kurven zu erkennen. In diesem Bereich reagierten Sarkomzellen empfindlicher. Zwischen den ermittelten IC₅₀-Werten der Tumor- und Endothelzellen bestehen keine signifikanten Unterschiede (p=0,539; siehe Tabelle 5 und Abbildung 10 A).

Eine deutliche und signifikante Sauerstoffabhängigkeit der Chemosensitivität der Zelllinien zeigte sich nur bei den Endothelzellen. Die IC_{50} war bei den HUVEC unter Hypoxie fast um den Faktor 2,3 höher, d.h. diese Zellen zeigten unter Hypoxiebedingungen eine erhebliche geringere Zytostatikaempfindlichkeit (siehe Tabelle 5 und Abbildung 10 B).

Tabelle 5 IC_{50} von Mafosfamid (4OH-Cyclophosphamid+ Mesna)

Mittelwerte [$\mu\text{mol/l}$] und Standardabweichungen der extrapolierten IC_{50} -Werte, p-Werte (Normoxie vs. Hypoxie), n=8

Zelllinie	Normoxie	Hypoxie	p-Wert
S117	8,96 \pm 2,47	9,43 \pm 3,9	0,844
LX1	13,43 \pm 7,43	15,46 \pm 6,8	0,3837
HUVEC	9,90 \pm 2,68	23,07 \pm 11,04	0,023

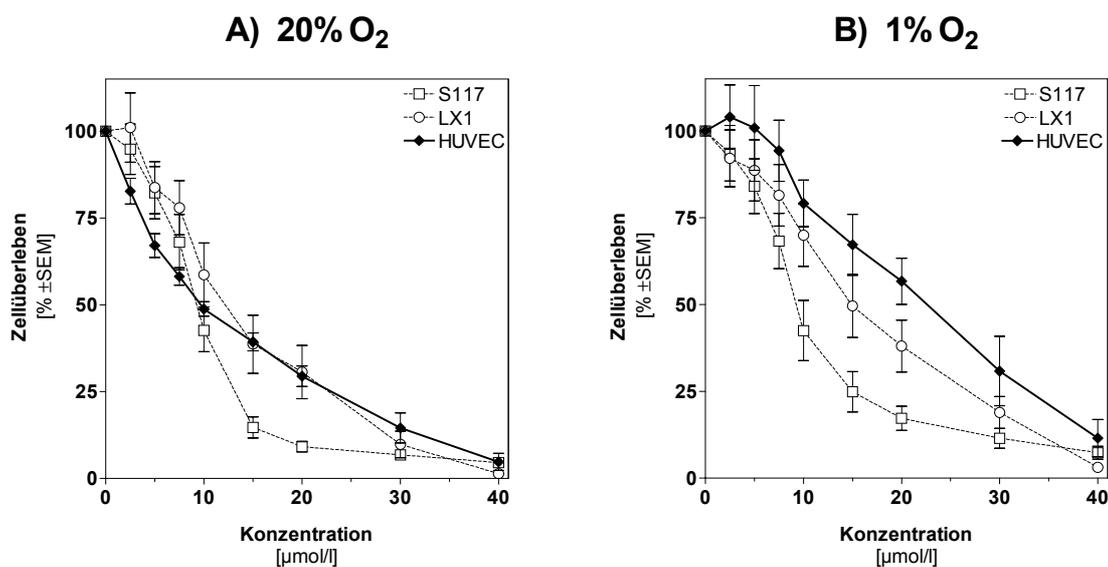


Abbildung 10 Zytotoxizität von Mafosfamid

Die Abbildungen zeigen die Dosis-Wirkungskurven von Mafosfamid, das in wässriger Lösung zu gleichen Teilen in 4OH-Cyclophosphamid und Mesna zerfällt. Die Untersuchungen erfolgten nach 48 Stunden Behandlung unter normoxischen (A) und hypoxischen (B)

Bedingungen mit dem Kristallviolett-Assay. Zuvor waren die Zellen 24 Stunden in entsprechender Atmosphäre angezchtet worden. (Mittelwerte \pm Standardfehler, n=8 Experimente, durchgeführt in Hexaplikaten)

4.3.2 4-OOH-Trofosfamid und Mesna

Bei Betrachtung der Konzentrations-Wirkungskurven fällt auf, daß die Tumorzelllinien S117 und LX1 von 4OOH-Trofosfamid in vergleichbarem Ausmaß gehemmt wurden wie bei Anwendung von Mafosfamid. Beim Vergleich der IC_{50} bestehen bei den Tumorzellen sowohl unter Norm- als auch unter Hypoxie keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Zytostatika (S117 $p=0,897$, LX1 $p=0,425$).

Dagegen wiesen die Endothelzellen sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen eine signifikant höhere Sensitivität für 4OOH-Trofosfamid im Vergleich zu 4OH-Cyclophosphamid auf ($p<0,001$). Während sich die IC_{50} -Werte von 4OH-Cyclophosphamid und 4OOH-Trofosfamid bei den Tumorzellen nicht signifikant unterscheiden, wurden bei den Endothelzellen durch die Anwendung von 4OOH-Trofosfamid signifikant niedrigere IC_{50} -Werte ermittelt.

Unter Hypoxie war bei den Endothelzellen die IC_{50} von 4OOH-Trofosfamid um Faktor 3,4 höher als unter Normoxie. Die Sensitivität der Endothelzellen scheint hier durch hypoxische Inkubation stärker abzunehmen als bei Mafosfamid, dennoch war die IC_{50} von 4OOH-Trofosfamid, wie oben dargestellt, signifikant niedriger.

In Normoxie ist die IC_{50} bei Endothelzellen signifikant niedriger als bei Tumorzellen ($p=0,013$). Hypoxisch kultivierte Endothelzellen reagierten ähnlich sensitiv wie Lungenkarzinomzellen vom Typ LX1 ($p=0,742$; siehe Tabelle 6 und Abbildung 11).

Tabelle 6 IC₅₀ von 4OOH-Trofosamid und Mesna

Mittelwerte [$\mu\text{mol/l}$] und Standardabweichungen der extrapolierten IC₅₀-Werte, p-Werte (Normoxie vs. Hypoxie), n=8

Zelllinie	Normoxie	Hypoxie	p-Wert
S117	9,01 \pm 2,96	8,5 \pm 2,96	0,078
LX1	10,03 \pm 3,72	14,22 \pm 4,18	0,016
HUVEC	3,73 \pm 4,04	12,52 \pm 5,92	0,023

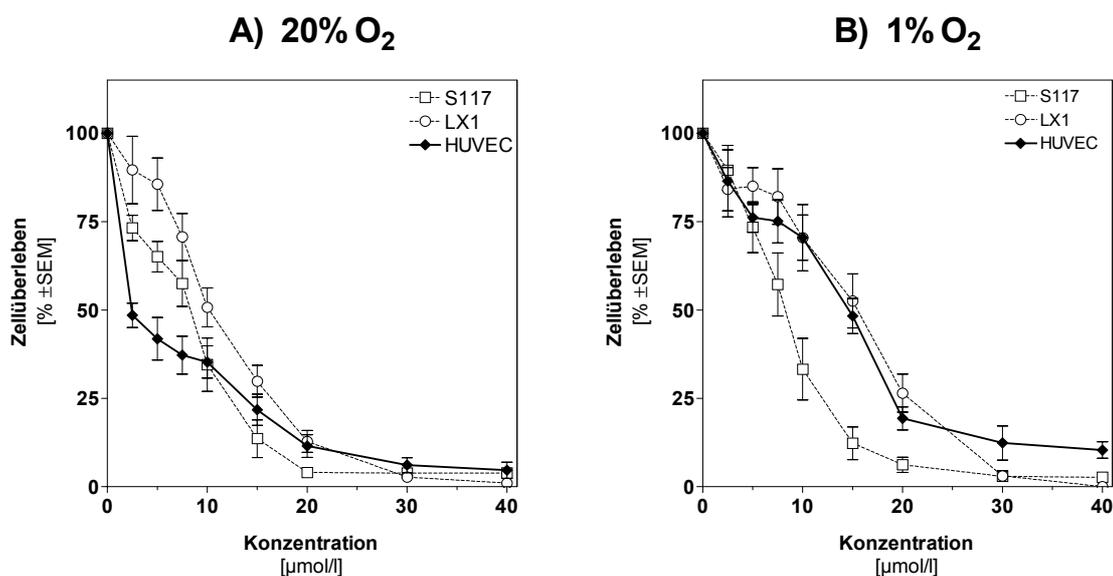


Abbildung 11 Zytotoxizität von 4OH-Trofosamid und Mesna

Die Abbildungen zeigen die Dosis-Wirkungs-kurven von 4OOH-Trofosamid, aus dem in wässriger Lösung 4OH-Trofosamid, der biologisch aktive Metabolit, hervorgeht. Zum Vergleich mit Mafosamid wurde äquimolar Mesna hinzugefügt. Die Untersuchungen erfolgten nach 48 Stunden Behandlung unter normoxischen (A) und hypoxischen (B) Be-

dingungen mit dem Kristallviolett-Assay. Zuvor waren die Zellen 24 Stunden in entsprechender Atmosphäre angezchtet worden. (Mittelwerte \pm Standardfehler, n=8 Experimente, durchgeführt in Hexaplikaten)

4.4 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

4.4.1 VEGF-Produktion von S117, LX1 und HUVEC

Der Einfluß einer verminderten Oxygenierung auf die Expression von VEGF durch Tumor- und Endothelzellen mittels ELISA untersucht. Dabei wurden die VEGF-Konzentrationen in den Mediumüberständen normoxischer und hypoxischer Zellkulturen nach 24, 48 und 72 Stunden bestimmt.

Bei den Tumorzellkulturen betragen die VEGF-Konzentrationen unter Hypoxie ein Vielfaches der Meßwerte im Vergleich zu normoxischer Kultur. Unterschiede zwischen Norm- und Hypoxie waren bereits nach 24 Stunden festzustellen und nahmen im Verlauf weiter zu. In den Überständen der S117-Zellkulturen waren die größten VEGF-Konzentrationen nachzuweisen, bei den LX1-Kulturen lagen wesentlich geringere Mengen vor. Bei den Endothelzellkulturen konnte in den ersten 48 Stunden, unabhängig der Oxygenierung, kein VEGF nachgewiesen werden. Nach 72 Stunden fanden sich äußerst geringe Konzentrationen in den Überständen, mit geringfügig größeren Werten bei hypoxischer Kultur (siehe Tabelle 7 und Abbildung 12).

Tabelle 7 VEGF-Konzentrationen im Mediumüberstand

*VEGF-Konzentrationen [ng/l] bezogen auf eine Proteinkonzentration von 1g/l, nach 72 Stunden Kultur in Norm- bzw. Hypoxie, * p-Werte nicht dargestellt bei n=2.*

Zelllinie	Normoxie	Hypoxie	p-Wert
S117	3360 ±500,7	9905 ±872,1	*
LX1	83 ±3,5	299 ±7,7	*
HUVEC	3,5 ±0,6	6,3 ±5,5	*

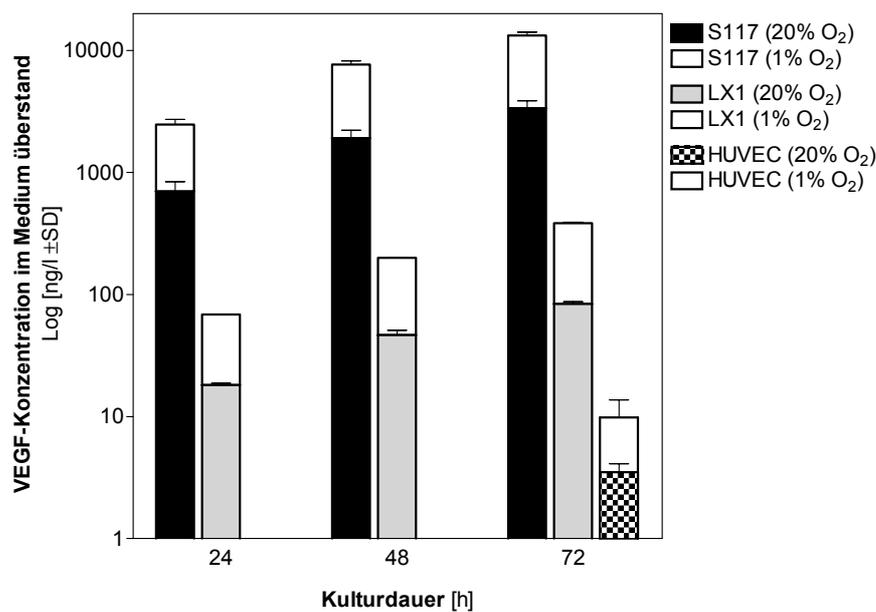


Abbildung 12: VEGF-Produktion von S117, LX1 und HUVEC

VEGF-Konzentrationen [ng/l] im Mediumüberstand un behandelter Zellkulturen nach 24, 48 und 72 Stunden norm- und hypoxischer Kultur. Die Konzentrationen beziehen sich auf eine Proteinkonzentration von 1g/l. Nach 24 und 48

Stunden wurde VEGF im Medium der HUVEC nicht nachgewiesen. (Mittelwerte \pm Standardabweichung, n = 2 Experimente, durchgeführt in Duplikaten)

4.4.2 VEGF-Produktion nach zytostatischer Behandlung

Um den Einfluß einer zytostatischen Behandlung auf die Expression von VEGF durch Tumorzellen zu untersuchen, wurden die Zellkulturen nach 24 Stunden Vorinkubation über 48 Stunden in Norm- bzw. Hypoxie mit der entsprechenden IC₅₀ von 4OH-Cyclophosphamid und 4OOH-Trofosamid behandelt. Ein deutlicher Einfluß der zytostatischen Behandlung auf die VEGF-Expression konnte in keiner Gruppe nachgewiesen werden (siehe Abbildung 13).

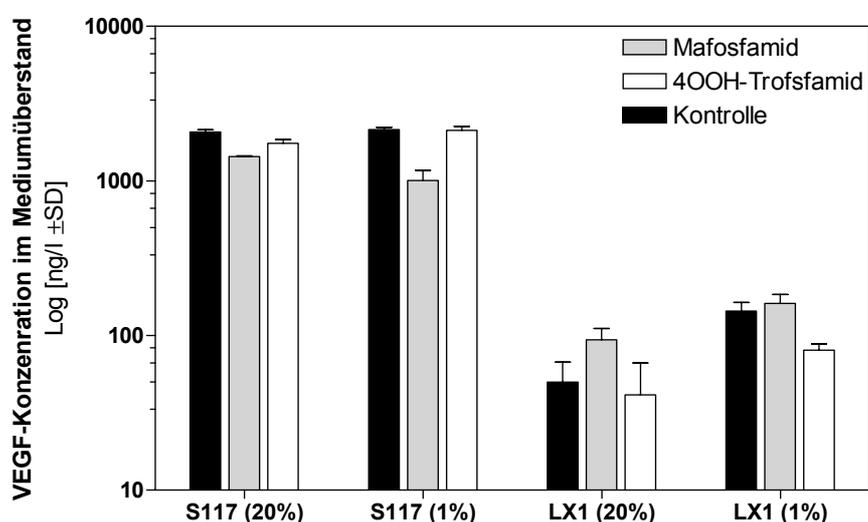


Abbildung 13: VEGF-Produktion von Tumorzellen nach zytostatischer Behandlung.

VEGF-Konzentrationen [ng/l] in den Mediumüberständen von S117 (n=2) und LX1 (n=3) nach 48 Stunden Zytostasebehandlung mit den IC₅₀-Werten der aktivierten Oxazaphosphorinmetaboliten Mafosamid (4OH-Cyclophosphamid+Mesna) und Trofosamid (4OOH-Trofosamid+Mesna) unter norm- bzw. hypoxi-

schen Bedingungen. Meßwerte für HUVEC (n=2) wurden nicht abgebildet, da sich auch in dieser Versuchsreihe VEGF nicht im Medium nachweisen ließ. Der Behandlung ging eine 24 stündige Vorinkubation unter Norm- und Hypoxie voraus. (Mittelwerte ± Standardabweichung, durchgeführt in Duplikaten)

4.4.3 VEGF-Produktion in Mischkulturen

Da in-vivo Tumor- und Endothelzellen nebeneinander vorliegen, wurden abschließend die Zellproliferation und die VEGF-Expression vergleichend an Einzel- und Mischkulturen von Tumor- und Endothelzellen durchgeführt. Nach 72 Stunden norm- und hypoxischer Inkubation, wurde das Zellwachstum mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt und die VEGF-Konzentrationen in den Überständen mittels ELISA bestimmt.

Wie auch in vorherigen Experimenten gezeigt wurde, waren die größten VEGF-Konzentrationen in den Überständen hypoxisch kultivierter Tumorzellen nachweisbar. Diese lagen auch hier bei den Sarkomzellen S117 um ein Vielfaches höher als bei den Lungenkarzinomzellen LX1. Wurden die Tumorzelllinien gemeinsam mit Endothelzellen kultiviert, wurden reduzierte VEGF-Konzentrationen in den Überständen festgestellt. Diese Verminderung war bei den S117-Kulturen stärker ausgeprägt als bei LX1-Kulturen, höhere VEGF-Konzentrationswerte bei Hypoxie wurden aber auch hier bei S117 und LX1 festgestellt. Die gemessenen Zellzahlen der HUVEC waren bei Mischkultur geringer als bei Einzelkultur. Die Tumorzellzahlen schienen bei Mischkultur unter Normoxie anzusteigen und bei Hypoxie abzufallen (siehe Abbildung 14).

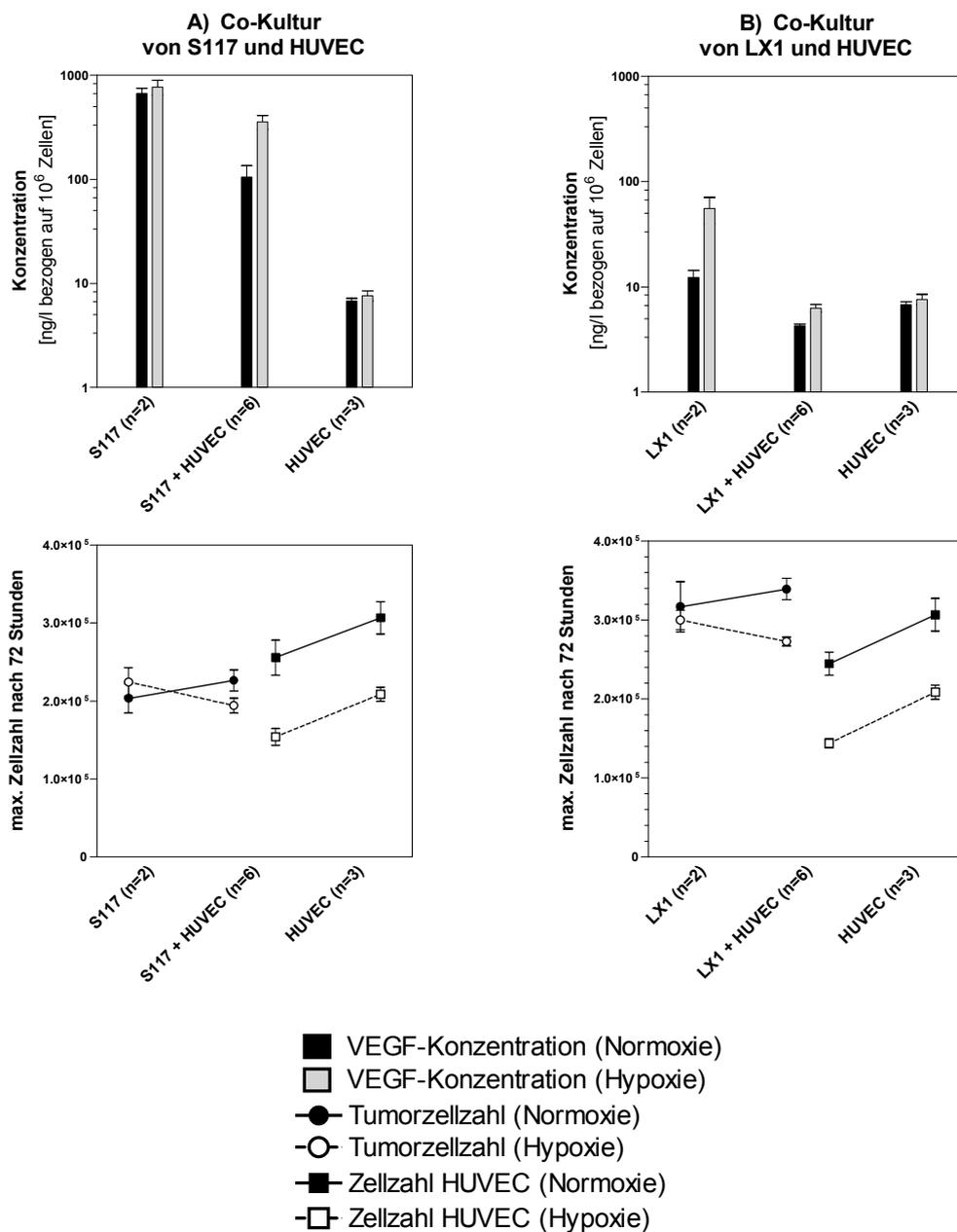


Abbildung 14 VEGF-Produktion und Proliferation im Vergleich zwischen Einzel- und Mischkulturen

Die nach 72 Stunden in den Überständen ermittelten VEGF-Konzentrationen [ng/l bezogen auf 10⁶ Zellen] sind als Säulen in den oberen, und die Zellzahlen als Punkte in den unteren Diagrammen dargestellt. Einzel- und Misch-

kulturen von S117 und HUVEC (A) sowie von LX1 und HUVEC (B). (Mittelwerte ± Standardfehler, für n siehe Diagramm)

5 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war, den Einfluß der Oxazaphosphorin-Zytostatika Cyclophosphamid und Trofosfamid in-vitro auf Tumor- und Endothelzellen zu untersuchen. Ergänzend zu parallel vorgenommenen in-vivo Untersuchungen galt es, vermutete angiostatische Effekte dieser Wirkstoffe zu untermauern.

Die angiostatische Wirksamkeit des Cyclophosphamid wurde bei metronomischer, also bei niedrig dosierter und kontinuierlicher Gabe in verschiedenen tierexperimentellen Studien beschrieben (21,89,100,111). BROWDER et al. haben metronomische Therapie-schemata im Jahre 2000 als Alternative zur üblicherweise höher dosierten Stoßtherapie entwickelt, wodurch es Ihnen gelang, die Hemmbarkeit der Tumorangiogenese an nicht-menschlichen Tumoren durch konventionelle Chemotherapeutika, wie Cyclophosphamid, zu demonstrieren (21). Die sonst erforderlichen, längeren, therapiefreien Intervalle zur Regeneration des gesunden Gewebes können dabei entfallen, wodurch ein Wiederauftreten der Tumorzellproliferation und eine Ausbildung von Resistenzen gegen die verabreichten Zytostatika verhindert werden kann. KERBEL und BOEHM et al. erklärten die Vorteile der metronomischen Therapie durch eine Fokusänderung von der genomisch instabilen und zu Resistenzen neigenden Tumorzelle zur genomisch stabilen Endothelzelle (15,76). Durch die Applikation der Zytostatika werden zunächst Endothelzellen in ihrer Proliferation gehemmt, was nachfolgend zu einer Inhibition der Tumorprogression führt. In der Studie von BROWDER et al. konnten eine erhöhte Apoptoserate der Endothelzellen im Tumorgewebe, eine erhöhte Apoptoserate der cyclophosphamid-resistenten Tumorzellen und schließlich eine Langzeitsuppression des Tumorwachstums erzielt werden, die mit dem konventionellen Stoß-Therapieschema nicht erreicht werden konnte (21). Die metronomisch dosierte und anti-angiogenetisch wirksame Therapie zeigte also nicht nur den Vorteil eines besseren Ansprechens, sondern

verhinderte zusätzlich die Resistenzentwicklung in den behandelten Tumoren. Zudem lag die Toxizität metronomischer Therapien unter der von konventionellen Therapien. In einer tierexperimentellen Studie von EMMENEGGER et al. blieben Nebenwirkungen, bis auf eine anhaltende Lymphopenie, aus. Ebenso traten Wundheilungsstörungen trotz metronomischer Therapie nicht auf (36).

Trotz dieses neuartigen Therapiekonzeptes und aussichtsvollen Therapieverläufen im Tierexperiment, liegen nur wenige grundlegende in-vitro Kenntnisse vor, mit denen das Zustandekommen der verbesserten Anti-Tumorwirkung bei der metronomischen Chemotherapie hinreichend erklärt werden könnte. Über Erkenntnisse zu wichtigen Aspekten, wie beispielsweise der in Tumoren stets vorliegenden Hypoxie oder Änderungen im Zellzyklus sowie deren Auswirkungen auf Endothel- und Tumorzellen bei der anti-angiogenetischen Therapie, wurde bisher wenig berichtet.

Für das Cyclophosphamid-Analogon Trofosfamid liegen bisher keine Erkenntnisse über angiostatische Effekte in-vitro vor. Wie in der Einleitung beschrieben, liegt die Annahme nahe, daß Trofosfamid, wegen seiner Wirksamkeit bei oraler Gabe und wegen seiner geringen Toxizität, möglicherweise bei Verabreichung in einer metronomischen Dauertherapie besser geeignet sei als Cyclophosphamid. In Tierexperimenten, die gleichzeitig zu den hier vorliegenden Versuchen durchgeführt worden waren, konnte unsere Arbeitsgruppe vielversprechende Ergebnisse bei Verabreichung von Trofosfamid in metronomischer Dosierung erzielen. Unsere Ergebnisse lassen daher eine gute angiostatische Potenz des Trofosfamid vermuten (111). Die metronomische Chemotherapie verursachte in unseren Tierversuch eine Hemmung der Tumorprogression über den gesamten Therapiezeitraum und bewirkte eine deutliche Reduktion der Gefäßdichte im anschließend untersuchten Tumorgewebe. Die Toxizität des Trofosfamid auf die behandelten Tiere war äußerst gering.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Proliferationsverhalten von Endothel- und Tumorzellen unter norm- und hypoxischen Bedingungen untersucht. Versuchsreihen zum Zellwachstum sowie Zellzyklusanalysen wurden durchgeführt, und die Zytotoxizität der aktivierten Oxazaphosphorinmetabolite 4OH-Cyclophosphamid und 4OOH-Trofosfamid wurde bestimmt. Die VEGF-Expression wurde unter verschiedenen Oxygenisierungsgraden, bei zytostatischer Behandlung und bei gemischter Kultivierung von Endothel- und Tumorzellen überprüft.

Als Endothelzellmodell diente die Zelllinie „HUVEC“, isoliert aus menschlichen Nabelschnurvenen. Aufgrund ihrer proliferativen Eigenschaften eignen sich HUVEC gut für die Tumorangio-geneseforschung. Als humanes Tumormodell kamen Weichteilsarkomzellen vom Typ „S117“ und Bronchialkarzinomzellen vom Typ „LX1“ zum Einsatz. Sie sind unterschiedlichen histogenetischen Ursprungs und bieten sich aufgrund ihrer verschiedenen Merkmale bezüglich Proliferation und Expression von VEGF für vergleichende Experimente an.

Bei den vorliegenden Untersuchungen zum Zellwachstum lagen unter normoxischen Bedingungen erwartungsgemäß höhere Proliferationsraten bei allen Zelllinien als unter hypoxischen Bedingungen vor. Die Zellzahlen lagen bei den Tumorzellen um ein Vielfaches über den der Endothelzellen. Interessanterweise zeigten nicht nur Tumorzellen, sondern auch Endothelzellen die Fähigkeit, sich an reduzierte Sauerstoffpartialdrücke anzupassen und weiter zu proliferieren. Aufgrund ihrer eingeschränkten Fähigkeit zur Apoptose können sich Tumorzellen resistent gegenüber hypoxischen Zuständen erweisen. Für Endothelzellen erscheint dies allerdings ungewöhnlich, da gesunde Zellen, bei derart ausgeprägt hypoxischen Zuständen, normalerweise die Apoptose einleiten. Die vorliegenden Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Zellwachstum und Zellzyklus zeigen, daß die hier verwendeten Endothelzellen eine physiologisch sinnvoll erscheinende Ausnahme zu bilden scheinen.

SKIKUZUDA et al. haben gezeigt, daß Endothelzellen in der Lage sind, sich durch Herunterregulation der von ihnen synthetisierten Proteinkinase C (PKC) an chronisch hypoxische Zustände zu adaptieren (107). Eine verminderte PKC-Expression verhindert speziell bei endothelialen Zellen den nicht-apoptotischen Zelltod. Unter verschiedenen Isoenzymen der PKC, von denen insbesondere die PKC- α und PKC- δ als Mediatoren für Stoffwechselveränderungen bei Endothelzellen gelten, zeigten letztere die zuvor beschriebenen Auswirkungen. In einer anderen Studie von SKIKUZUDA et al. wurde gezeigt, daß die Aktivität der PKC- δ durch erhöhte Konzentrationen von VEGF gesenkt werden kann (108). Diese Aktivitätsminderung kommt durch eine rezeptorunabhängige Stimulation der Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) durch die VEGF-Moleküle zustande. Durch erhöhte NO-Konzentrationen wird eine frühzeitige „Gefäßreifung“ im Sinne einer Gefäßstabilisierung verhindert. Endothelzellen aus „unreifen“ Gefäßen oder Mikrogefäßen unterscheiden sich in ihrer Physiologie von Endothelzellen aus großen, stabilisierten Gefäßen. Die Unterschiede betreffen u. a. den Membranrezeptor CD36, an den der endogene Angiogeneseinhibitor Thrombospondin-1 (TSP-1) bindet. TSP-1 inhibiert die Angiogenese über eine Hemmung der Endothelzellproliferation, -migration und Tubulusformation und wirkt zudem proapoptotisch (29). BOCCI et al. fanden heraus, daß durch metronomisch verabreichte Chemotherapien Konzentrationsanstiege von TSP-1 im Blut behandelter Mäuse verursacht wurden (12). HAMANO et al. haben diesen Effekt unlängst bestätigt (55). Sie zeigten jedoch auch, daß es sich dabei jedoch nur um einen geringen Beitrag zur anti-angiogenetischen Wirkweise einer metronomischen Chemotherapie handelt. Eine solche indirekte, aber selektive Wirkweise der konventionellen Zytostatika trifft jedoch, aufgrund der zuvor erläuterten Expression von CD36, nur auf Mikrogefäß-Endothelien zu.

In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine anhaltende Proliferation der Endothelzellen bei hypoxischer Kultur auch durch Analyse des Zellzyklus bestätigt werden. Dies äußerte sich durch einen annähernd gleichen Anteil an Endothelzellen in der

Synthese-Phase (S-Phase) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen. HARRINGTON et al. haben gezeigt, daß erhöhte PKC- δ -Werte den Zellzyklus von kapillären Endothelzellen beeinflussen (60). Durch eine direkte Interaktion der PKC- δ mit cyclin-cyclin-abhängigen Kinase-/Inhibitor-Komplexen werden Eintritt und Abschluß der S-Phase reguliert. Dadurch kommt es bei Endothelzellen zu einer Erhöhung des S-Phasenanteils. Der Anteil an Tumorzellen in der S-Phase übertraf den Anteil an HUVEC deutlich, bei Hypoxie war jedoch eine deutliche Abnahme des Tumorzellanteils zu verzeichnen. Dies kann ein schlechteres Ansprechen von behandelten Tumoren erklären, bei denen hypoxische Zustände vorherrschen, da bestimmte Zytostatika bevorzugt auf Zellen in der S-Phase wirken.

Für eine exakte Interpretation des Zellzyklus ist die alleinige Angabe der prozentualen Phasenanteile nicht ausreichend. Vielmehr sind hier Informationen über Phasendauer und Verdopplungszeit wünschenswert. Die Methode der Bestimmung von Phasenzeiten ist jedoch wesentlich aufwendiger. Diese wurde nur unter normoxischen Bedingungen durchgeführt, da eine Oxygenierung hypoxisch inkubierter Kulturen während der Versuchsdurchführung unvermeidbar gewesen wäre. Trotz der deutlichen prozentualen Unterschiede im S-Phasenanteil lag die Dauer der S-Phase (T_s) bei allen Zelllinien in einem vergleichbaren zeitlichen Rahmen. Dieser Zeitraum ist für die Effektivität vieler Zytostatika von Bedeutung. Man muß beachten, daß eine Vergrößerung des prozentualen S-Phasenanteils nicht nur eine verstärkte Zellproliferation bedeuten kann, sondern auch durch eine verlängerte S-Phasendauer verursacht werden kann. Daher würden sich Untersuchungen zum Einfluß der PKC- δ nicht nur auf die prozentuale Zyklusphasenverteilung, sondern besonders auf Änderungen der Phasendauer unter Normoxie und Hypoxie anbieten.

Als weiteren Untersuchungsaspekt des Zellzyklus zeigten sich in der potentiellen Verdopplungszeit (T_{pot}) keine signifikanten Unterschiede zwischen Sarkom- und Endothel-

zellen, wogegen T_{pot} bei Lungenkarzinomzellen deutlich geringer war. Die kürzere Verdopplungszeit der LX1-Zellen äußerte sich im Vergleich in Form erhöhter Zellzahlen.

Das Versuchsprinzip der Kristallviolett-färbung wurde auch bei den Zytotoxizitätstests angewandt. Während es bei den Tumorzelllinien durch Änderungen des pO_2 nicht zu signifikanten Sensitivitätsunterschieden bezüglich der hydroxylierten Cyclophosphamid- und Trofosfamidmetaboliten kam, wurde die Sensitivität der Endothelzellen durch Hypoxie deutlich beeinträchtigt. Unter normoxischen Bedingungen wurden Endothelzellen insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich stärker durch Zytostatika gehemmt als Tumorzellen. Diese größere Sensitivität ging allerdings bei hypoxischer Atmosphäre verloren, was eine wichtige klinische Relevanz hat, da die meisten Tumoren ein ausgeprägtes Sauerstoffdefizit aufweisen. Dies würde dafür sprechen, daß kleine, gut oxygenierte Tumore besser auf eine metronomische Therapie zur Angiogeneseinhibition ansprechen. Die Ausführungen von MILLER et al. und DREVS et al., Endothelzellen seien durchweg sensitiver als Tumorzellen, konnte in diesen Versuchreihen, unter dem Aspekt der Hypoxie, nicht nachvollzogen werden (31,92). BOCCI et al. beschrieben Späteffekte, sogenannte „Protracted Effects“ durch die es bei einer, der metronomischen Therapie entsprechenden, niedrig dosierten Langzeitgabe von Zytostatika zu einer selektiven Endothelzellinhibition kommen kann (13).

Der Vergleich der zytotoxischen Wirkung von hydroxyliertem Cyclophosphamid und Trofosfamid zeigte keine signifikanten Unterschiede bei beiden Tumorzelllinien. Endothelzellen reagierten jedoch sensitiver auf Trofosfamid, was auf einen möglichen Vorteil bei einer anti-angiogenetischen Dauertherapie hinweisen könnte.

Für die Anti-Angiogenese spielen Kenntnisse über das VEGF-Protein, in seiner Funktion als Hauptaktivator für physiologische oder pathologische Neovaskularisationen, eine zunehmend wichtigere Rolle. Studien haben gezeigt, daß eine VEGF-Überexpression bei

zahlreichen Tumoren mit einer schlechten Prognose verbunden ist. In dieser Arbeit wurden zytostatisch unbehandelte Zellkulturen nach normoxischer bzw. hypoxischer Inkubation mittels ELISA auf VEGF-Expression untersucht. In den Kulturüberständen konnten bei beiden Tumorzelllinien nach hypoxischer Kultur um etwa dreifach erhöhte VEGF-Konzentrationen gegenüber normoxischer Kultur gefunden werden. CHAO et al. haben bei Weichteilsarkomen eine Korrelation zwischen VEGF-Konzentration und dem Tumor-Grading festgestellt (26). In den vorliegenden Versuchsreihen lagen bei den Weichteilsarkomzellen S117 die höchsten VEGF-Konzentrationen vor. GRAEVEN et al. bestätigten, daß bei high-grade Sarkomen vielfach erhöhte VEGF-Spiegel vorliegen und, daß diese mit einer schlechten Prognose verbunden sind (53). Für nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome beschrieben HAN et al. ein schlechteres Outcome bei Überexpression von VEGF (57). Erhöhte VEGF-Spiegel in den Kulturen des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms LX-1 geben auch die hier vorliegenden Resultate wieder.

Bei beiden Tumorzelllinien wurden selbst unter normoxischen Bedingungen hohe VEGF-Konzentrationswerte in den Überständen festgestellt. Dagegen konnten bei den Endothelzellen erst nach 72 Stunden Kultur äußerst geringe Mengen VEGF nachgewiesen werden. Diese Meßergebnisse könnten einerseits durch Vorliegen von nicht endothelialen Zellen in der HUVEC-Kultur begründet sein. Einzelne endothelumgebende Zellen, wie Fibroblasten können bei der enzymatischen Isolation mit den Endothelien aus der Nabelschnurvene herausgelöst werden und in der späteren Kultur vorhanden sein. In den selbst angelegten Kulturen ist dies, trotz durchflußzytometrischer Überprüfung auf Reinheit mittels CD31-Antikörper, nicht auszuschließen. Andererseits ist NAMIKI et al. der Beweis gelungen, daß auch Endothelzellen in äußerst geringen Mengen VEGF, im Sinne einer autokrinen Stimulation, exprimieren (93).

Von einem autokrinen Stimulationsweg sind jedoch nicht nur Endothelzellen betroffen vor, da entsprechende VEGF-Rezeptoren ebenso auf zahlreichen Tumorarten gefunden wurden (30). Die Bedeutung dieser Feststellungen wird aktuell untersucht. Die Vermutung liegt nahe, daß durch die VEGF-Expression die Tumorproliferation nicht nur durch Angiogenesestimulation gefördert wird, sondern auch direkt, durch Stimulation von tumorzellständigen VEGF-Rezeptoren. ZHU et al. haben gezeigt, daß durch eine Unterbrechung dieser autokrinen Schleife ein Stillstand des Tumorwachstums und eine Tumorzellapoptose bei bestimmten Leukämien hervorgerufen wird (128).

Um einen möglichen Einfluß der zytostatischen Therapie auf die Expression von VEGF zu untersuchen, wurden Tumorzellen mit der IC_{50} von 4OH-Cyclophosphamid und 4OOH-Trofosamid behandelt. Ein signifikanter Einfluß ließ sich allerdings nicht ableiten. Daher stellt die VEGF-Proteinsynthese vermutlich keinen Angriffspunkt bei einer metronomischen Therapie mit herkömmlichen Zytostatika dar, so daß die Hemmung der Angiogenese vielmehr durch einen direkten zytotoxischen Effekt auf endotheliale Zellen zu erklären wäre.

Abschließend wurden Tumor- und Endothelzellen gemeinsam kultiviert, um die in-vivo Proliferationsbedingungen modellhaft nachzustellen. Die Kulturgefäße hatten zwei Kulturböden, die durch eine permeable Membran die Zirkulation des gemeinsamen Mediums und der darin gelösten Nährstoffe zuließ. Hier wurden Zellwachstum und VEGF-Expression nach 72 Stunden gemessen. Die zur Kontrolle durchgeführten Messungen an Einzelzellkulturen waren mit den vorigen Untersuchungen vereinbar. Bei Mischkultur von Tumor- und Endothelzellen wurden niedrigere VEGF-Konzentrationswerte bei S117 und LX-1 sowohl bei normoxischer als auch bei hypoxischer Inkubation gefunden. Hier ist zu erwägen, daß von Tumorzellen gebildetes VEGF von VEGF-Rezeptoren der HUVEC gebunden wird und somit im ELISA nicht mehr erfasst wird. Gleichzeitig lagen signifikant niedrigere Zellzahlen bei HUVEC vor,

während bei beiden Tumorzelllinien die Tendenz zu höheren Werten bei Normoxie und zu niedrigeren Werten bei Hypoxie zu beobachten war. Zur Interpretation der Ergebnisse sind folgende Punkte zu beachten: In den Co-Kulturen lagen doppelte Ausgangszellzahlen im Vergleich zur Einzelkultur vor, wobei in beiden Fällen gleichviel Volumen an Medium zugegeben wurde. Dies war für den späteren Vergleich der Konzentrationen des in erster Linie von Tumorzellen produzierten VEGF notwendig. Niedrigere Zellzahlen der HUVEC in Co-Kultur können daher in einem stärkeren Verbrauch des Nährmediums durch Tumorzellen sowie durch ein vermehrtes Anfallen von toxischen Stoffwechselprodukten begründet sein. Das gleichzeitige Vorliegen von HUVEC schien das Wachstum von Tumorzellen bei normoxischer Inkubation zu stimulieren und bei Hypoxie zu beeinträchtigen, wobei aber keine deutliche Signifikanz zu zeigen war. Die Diskussion zeigt, daß vielfältige gegenseitige Beeinflussungen möglich sind und eine Übertragung von in-vitro Verhältnissen auf in-vivo Bedingungen äußerst schwierig ist.

Die vorliegenden Ergebnisse liefern Erkenntnisse für das Verständnis der Wirkweise metronomischer Chemotherapien mit Oxazaphosphorinen und weisen auf neuere Gesichtspunkte in der Angiogeneseforschung hin, die bisher wenig berücksichtigt wurden. Insbesondere ist in anderen in-vitro Arbeiten die entscheidende Rolle der Tumorphypoxie im Zusammenhang mit den hier vorgestellten, anti-angiogenetischen Therapiekonzepten vernachlässigt worden. Aufgrund der hier vorgelegten Resultate ist zu anzunehmen, daß die im Tierversuch gezeigte Hemmung der Tumorangiogenese durch Oxazaphosphorine hauptsächlich durch zytotoxische Effekte auf Endothelzellen zustande kommt. Gleichwohl handelt es sich hier um in-vitro Modelle, die nicht uneingeschränkt auf die in-vivo Situation bei Tier und Mensch übertragen werden können. Es wird deutlich, dass gerade bei Untersuchungen zum Tumorwachstum und der gegenseitigen Beeinflussung von Tumor- und Endothelzellen die Zellkultur den Tierversuch nicht voll ersetzen kann.

In dieser Arbeit werden Erkenntnisse für eine metronomische Therapie mit Trofosfamid vorgelegt, die Hinweise darauf geben, daß Trofosfamid möglicherweise vorteilhafter einsetzbar ist als das häufiger verwendete Cyclophosphamid. Trofosfamid wird in Deutschland schon seit Jahren in der oralen Dauertherapie kontinuierlich und niedrig dosiert verabreicht, wodurch sein angiostatisches Potential – ohne therapeutische Absicht im Sinne einer Angiogeneseinhibition – möglicherweise ausgenutzt wurde. Zumindest lassen die gute Wirksamkeit bei geringer Toxizität dies vermuten.

Die metronomische Therapie zeigt gegenüber der konventionellen Therapie, mit Verabreichung maximal tolerabler Dosen in Intervallen (MTD-Therapie) experimentell und neuerdings auch klinisch untersuchte Vorteile (21,89,100,103,111). Der Vorteil der anti-angiogenetisch wirksamen, metronomischen Verabreichung liegt hauptsächlich in zytotoxischen Effekten auf die genomisch stabilen, nicht zu Resistenzen neigenden Endothelzelle. In letzter Zeit haben Studien aber auch gezeigt, daß die Angiogeneseinhibition auch auf verschiedenen anderen Wegen erreicht werden kann. Insbesondere wurden Kombinationstherapien von metronomisch dosierten, konventionellen Zytostatika mit neuentwickelten, direkten Angiogeneseinhibitoren vorgestellt. Der humane, monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) ist aktuell Bestandteil einiger klinischer Studien und wurde kürzlich in Deutschland und Europa zur Therapie des Kolonkarzinoms zugelassen (42,120). In diesem Zusammenhang spielen auch präklinisch getestete Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren (Anti-VEGFR-2) eine zukünftige therapeutische Rolle (23,67,78). Als weitere Kombinationsmöglichkeit bei metronomischer Therapie bieten sich die, nunmehr auf dem Arzneimittelmarkt eingeschränkt zugelassenen COX-2 Inhibitoren an, deren Zielprotein, die Cyclooxygenase-2, eng mit der VEGF-Expression korreliert (49,90). VOGT et al. haben vorteilhafte Ergebnisse in einer klinischen Anti-Angiogenese-Studie mit einer Kombination von Trofosfamid, Rofecoxib und Pioglitazone präsentiert (118).

Als weitere Zelltypen, neben den Endothelzellen, gerieten neuerdings auch Perizyten oder „Smooth muscle cells“ in den Fokus anti-angiogenetischer Therapiekonzepte. VEGFR-Inhibitoren sind in frühen Angiogenesestadien zwar effektiv, jedoch verlieren Endothelzellen bei Gefäßreifung, durch Umlagerung von Perizyten, ihre VEGF-Abhängigkeit. An diesem Punkt kann durch Hemmung der PDGFR-Tyrosinkinase auch an ausgereiften Tumorgefäßen angegriffen werden, da es durch eine Unterbrechung des von Endothelzellen initiierten PDGF-Kreislaufes zu einer Destabilisierung und zu einem Auseinanderbrechen der malignen Neovaskularisation kommt (10,64).

Die neuen metronomischen Therapiekonzepte bieten Tumorpatienten deutliche Vorzüge. Sie sind nicht mit dem Ziel entwickelt worden, eine Heilung maligner Erkrankungen herbeizuführen, sondern um das Überleben der Patienten mit fortgeschrittenen und therapieresistenten Tumorerkrankungen zu verlängern und um das Leiden von Patienten durch eine reduzierte Therapietoxizität zu lindern. Aber nicht nur die abgeschwächten Nebenwirkungen, sondern auch die praktikable orale Verabreichungsmodalität im ambulanten Bereich erhöhen die Compliance und verschaffen dem Patienten mehr Lebensqualität. Aber auch aus pharmakoökonomischer Sicht bieten sich metronomische Therapieschemata an, wie in einer aktuellen Studie von BOCCI et al. für die palliative Therapie von metastasierten Mamma-Karzinomen nachgewiesen wurde (14). Auf der 95. Jahrestagung der American Assoziation for Cancer Research visionierte der bekannte Tumorangiogeneseforscher Judah FOLKMAN: „ Vielleicht werden wir irgendwann die Möglichkeit haben, Tumorerkrankungen bei Risikopersonen durch prophylaktische Einnahme von anti-angiogenetischen Wirkstoffen vorzubeugen, ähnlich, wie Aspirin zur Herzinfarktprophylaxe verabreicht wird.“

6 Zusammenfassung

In der modernen internistischen Onkologie bemüht man sich zunehmend, die Inhibition der Tumorangiogenese zu einem festen Bestandteil neuer Chemotherapien zu etablieren. Aktuelle Studien zeigen, daß herkömmliche Chemotherapeutika wie das Oxazaphosphorinzytostatikum Cyclophosphamid ein angiostatisches Potential aufweisen, das bei einer niedrig dosierten, kontinuierlichen Verabreichung ausgenutzt werden kann. Dieser sogenannten metronomischen Therapie werden deutliche Vorteile in Hinblick auf Wirksamkeit, Einfluß auf Resistenzbildung und Toxizität zugesprochen.

Allerdings sind die bisherigen in-vitro Erkenntnisse unzureichend, um die gezeigten anti-angiogenetischen Effekte nachvollziehen zu können. Entsprechende Untersuchungen an humanen Zellen eines Weichteilsarkoms, eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms und an menschlichen Endothelzellen, auch unter den wichtigen Aspekten der Tumorphoxie und der Synthese des für die Angiogenese essentiellen Wachstumsfaktors VEGF, sind Gegenstand dieser Arbeit. In-vitro Resultate für eine metronomische Therapie mit dem Cyclophosphamid-Analogon Trofosfamid werden außerdem vorgelegt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß sich sowohl Tumor- als auch Endothelzellen an ausgeprägt hypoxische Zustände, wie sie in den meisten Tumoren vorliegen, anpassen können und weiter proliferieren. Bei Einsatz der hydroxylierten Oxazaphosphorinmetaboliten reagierten Endothelzellen unter normoxischen Bedingungen deutlich sensitiver als die verwendeten Tumorzellen. Diese Sensitivitätsunterschiede waren bei hypoxischer Kultur nicht festzustellen. Die Annahme, Endothelzellen seien durch niedrigere Zytostatikadosen stärker hemmbar als Tumorzellen, kann zwar unter normoxischen, nicht aber unter hypoxischen Bedingungen bestätigt werden. Die Zytotoxizität von 4OH-Cyclophosphamid und 4OOH-Trofosfamid auf Tumorzellen war

vergleichbar. Dagegen war 4OOH-Trofosamid bei Endothelzellen unter Norm- und Hypoxie stärker wirksam, wodurch ein vorteilhafter Einsatz von Trofosamid in der angiostatischen Therapie resultieren könnte. Erhöhte VEGF-Konzentrationen waren bei beiden Tumorzelllinien nicht nur unter hypoxischen, sondern auch unter normoxischen Bedingungen nachweisbar. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in einer VEGF-vermittelten autokrinen Stimulation der Tumorzellen durch tumorzellständige VEGF-Rezeptoren. Die zytostatische Behandlung der Zellkulturen hatte keinen signifikanten Einfluß auf die VEGF-Expression.

Zusammenfassend ist davon auszugehen, daß die vorteilhaften Ergebnisse metronomischer Therapien mit Cyclophosphamid und Trofosamid auf angiostatischen Effekten beruhen, die überwiegend durch eine zytotoxische Wirkung auf Endothelzellen verursacht werden. Eine Hemmung der Tumorangiogenese konnte in Tierexperimenten unserer Arbeitsgruppe durch eine Abnahme der Gefäßdichte innerhalb des Tumorgewebes gezeigt werden. Die vorliegenden in-vitro Untersuchungen liefern Erkenntnisse für metronomische Therapiekonzepte mit Cyclophosphamid und Trofosamid.

7 Literaturverzeichnis

- 1) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE:
Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders
N.Engl.J.Med. (331) 1480-1487, 1994
- 2) Aisner J, Whitacre MY, Budman DR, Propert K, Strauss G, Van Echo DA, Perry M:
Cisplatin, doxorubicin, cyclophosphamide, and etoposide combination chemotherapy for small-cell lung cancer
Cancer Chemother.Pharmacol. (29) 435-438, 1992
- 3) Anderson WK:
Activity of bis-carbamoyloxymethyl derivatives of pyrroles and pyrrolizines against human tumor xenografts in nude mice
Cancer Res. (42) 2168-2170, 1982
- 4) Arnold H, Bourseaux E, Brock N:
Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat
Nature (181) 931, 1958
- 5) Auerbach W, Auerbach R:
Angiogenesis inhibition: a review
Pharmacol.Ther. (63) 265-311, 1994
- 6) Bagley CM, Jr., Bostick FW, DeVita VT, Jr.:
Clinical pharmacology of cyclophosphamide
Cancer Res. (33) 226-233, 1973
- 7) Bailar JC, III, Gornik HL:
Cancer undefeated
N.Engl.J.Med. (336) 1569-1574, 1997
- 8) Begg AC, McNally NJ, Shrieve DC, Karcher H:
A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample.
Cytometry (6) 620-626, 1985
- 9) Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E:
Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal
J.Clin.Invest (103) 159-165, 1999

- 10) Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D:
Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors
J.Clin.Invest (111) 1287-1295, 2003
- 11) Blomqvist C, Wiklund T, Pajunen M, Virolainen M, Elomaa I:
Oral trofosfamide: an active drug in the treatment of soft-tissue sarcoma
Cancer Chemother.Pharmacol. (36) 263-265, 1995
- 12) Bocci G, Francia G, Man S, Lawler J, Kerbel RS:
Thrombospondin 1, a mediator of the antiangiogenic effects of low-dose metronomic chemotherapy
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (100) 12917-12922, 2003
- 13) Bocci G, Nicolaou KC, Kerbel RS:
Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs
Cancer Res. (62) 6938-6943, 2002
- 14) Bocci G, Tuccori M, Emmenegger U, Liguori V, Falcone A, Kerbel RS, Del TM:
Cyclophosphamide-methotrexate 'metronomic' chemotherapy for the palliative treatment of metastatic breast cancer. A comparative pharmacoeconomic evaluation
Ann.Oncol. () , 2005
- 15) Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS:
Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance
Nature (390) 404-407, 1997
- 16) Boehm-Viswanathan T:
Is angiogenesis inhibition the Holy Grail of cancer therapy?
Curr.Opin.Oncol. (12) 89-94, 2000
- 17) Borner K, Kisro J, Bruggemann SK, Hagenah W, Peters SO, Wagner T:
Metabolism of ifosfamide to chloroacetaldehyde contributes to antitumor activity in vivo
Drug Metab Dispos. (28) 573-576, 2000
- 18) Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D, Patz A:
Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous
Cancer Res. (36) 2807-2812, 1976
- 19) Brinker A, Kisro J, Letsch C, Bruggemann SK, Wagner T:
New insights into the clinical pharmacokinetics of trofosfamide
Int.J.Clin.Pharmacol.Ther. (40) 376-381, 2002
- 20) Brock, N.
Pharmakologische Untersuchungen mit N-Chlorethyl-phosphorsäure-ester-diamiden
Proc. 5th Int.Congr.of Chemotherapy, Wien, Österreich ,1967

- 21) Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J:
Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer
Cancer Res. (60) 1878-1886, 2000
- 22) Bruggemann SK, Kisro J, Wagner T:
Ifosfamide cytotoxicity on human tumor and renal cells: role of chloroacetaldehyde in comparison to 4-hydroxyifosfamide
Cancer Res. (57) 2676-2680, 1997
- 23) Bruns CJ, Shrader M, Harbison MT, Portera C, Solorzano CC, Jauch KW, Hicklin DJ, Radinsky R, Ellis LM:
Effect of the vascular endothelial growth factor receptor-2 antibody DC101 plus gemcitabine on growth, metastasis and angiogenesis of human pancreatic cancer growing orthotopically in nude mice
Int.J.Cancer (102) 101-108, 2002
- 24) Bubleby GJ, Ogata GK, Dupuis NP, Teicher BA:
Detection of sequence-specific antitumor alkylating agent DNA damage from cells treated in culture and from a patient
Cancer Res. (54) 6325-6329, 1994
- 25) Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A:
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele
Nature (380) 435-439, 1996
- 26) Chao C, Al-Saleem T, Brooks JJ, Rogatko A, Kraybill WG, Eisenberg B:
Vascular endothelial growth factor and soft tissue sarcomas: tumor expression correlates with grade
Ann.Surg.Oncol. (8) 260-267, 2001
- 27) Cockerill GW, Meyer G, Noack L, Vadas MA, Gamble JR:
Characterization of a spontaneously transformed human endothelial cell line
Lab Invest (71) 497-509, 1994
- 28) Colvin M, Padgett CA, Fenselau C:
A biologically active metabolite of cyclophosphamide
Cancer Res. (33) 915-918, 1973
- 29) Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP:
CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells
J.Cell Biol. (138) 707-717, 1997
- 30) Decaussin M, Sartelet H, Robert C, Moro D, Claraz C, Brambilla C, Brambilla E:
Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its two receptors (VEGF-R1-Flt1 and VEGF-R2-Flk1/KDR) in non-small cell lung carcinomas (NSCLCs): correlation with angiogenesis

- and survival**
J.Pathol. (188) 369-377, 1999
- 31) Drevs J, Fakler J, Eisele S, Medinger M, Bing G, Esser N, Marme D, Unger C:
Antiangiogenic potency of various chemotherapeutic drugs for metronomic chemotherapy
Anticancer Res. (24) 1759-1763, 2004
- 32) Drings P, Allner R, Brock N, Burkert H, Fischer M, Folsch E, Gerhartz H, Gotzky P, Hoppe I, Kanzler G, Klein HO, Mainzer K, Martin H, Obrecht P, Palme G, Paulisch H, Riegg H, Schubert JC, Treske U, Weise W, Willems D, Wilmanns H, Witte S, Wohlenberg H:
Erfahrungen mit neuartigen N-Lost/Phosphamidestern
Dtsch.Med.Wochenschr. (95) 491-497, 1970
- 33) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM:
Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis
Am.J.Pathol. (146) 1029-1039, 1995
- 34) Eder JP, Antman K, Peters W, Henner WD, Elias A, Shea T, Schryber S, Andersen J, Come S, Schnipper L, .:
High-dose combination alkylating agent chemotherapy with autologous bone marrow support for metastatic breast cancer
J.Clin.Oncol. (4) 1592-1597, 1986
- 35) Eder JP, Elias A, Shea TC, Schryber SM, Teicher BA, Hunt M, Burke J, Siegel R, Schnipper LE, Frei E, III, .:
A phase I-II study of cyclophosphamide, thiotepa, and carboplatin with autologous bone marrow transplantation in solid tumor patients
J.Clin.Oncol. (8) 1239-1245, 1990
- 36) Emmenegger U, Man S, Shaked Y, Francia G, Wong JW, Hicklin DJ, Kerbel RS:
A comparative analysis of low-dose metronomic cyclophosphamide reveals absent or low-grade toxicity on tissues highly sensitive to the toxic effects of maximum tolerated dose regimens
Cancer Res. (64) 3994-4000, 2004
- 37) Enright H, Miller WJ, Hays R, Floyd RA, Hebbel RP:
Preferential targeting of oxidative base damage to internucleosomal DNA
Carcinogenesis (17) 1175-1177, 1996
- 38) Enright HU, Miller WJ, Hebbel RP:
Nucleosomal histone protein protects DNA from iron-mediated damage
Nucleic Acids Res. (20) 3341-3346, 1992
- 39) Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW:
Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene
Nature (380) 439-442, 1996

- 40) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J:
The biology of VEGF and its receptors
Nat.Med. (9) 669-676, 2003
- 41) Ferrara N, Henzel WJ:
Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells
Biochem.Biophys.Res.Comm. (161) 851-858, 1989
- 42) Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W:
Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy
Biochem.Biophys.Res.Comm. (333) 328-335, 2005
- 43) Ferrara N, vis-Smyth T:
The biology of vascular endothelial growth factor
Endocr.Rev. (18) 4-25, 1997
- 44) Folkman J:
Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease
Nat.Med. (1) 27-31, 1995
- 45) Folkman J:
Incipient angiogenesis
J.Natl.Cancer Inst. (92) 94-95, 2000
- 46) Folkman J, Hanahan D:
Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis
Princess Takamatsu Symp. (22) 339-347, 1991
- 47) Gardner SN:
A mechanistic, predictive model of dose-response curves for cell cycle phase-specific and - nonspecific drugs
Cancer Res. (60) 1417-1425, 2000
- 48) Gasparini G:
Metronomic scheduling: the future of chemotherapy?
Lancet Oncol. (2) 733-740, 2001
- 49) Gately S, Li WW:
Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy
Semin.Oncol. (31) 2-11, 2004
- 50) Gerber HP, Dixit V, Ferrara N:
Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells
J.Biol.Chem. (273) 13313-13316, 1998

- 51) Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N:
VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation
Nat.Med. (5) 623-628, 1999
- 52) Glossmann JP, Josting A, Diehl V:
New treatments for Hodgkin's disease
Curr.Treat.Options.Oncol. (3) 283-290, 2002
- 53) Graeven U, Andre N, Achilles E, Zornig C, Schmiegel W:
Serum levels of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in patients with soft-tissue sarcoma
J.Cancer Res.Clin.Oncol. (125) 577-581, 1999
- 54) Haar H, Marshall G, Bierman H, Steinfeld J:
The influence of cyclophosphamide upon neoplastic diseases in man
Cancer Chemother.Rep. (6) 41-51, 1960
- 55) Hamano Y, Sugimoto H, Soubasakos MA, Kieran M, Olsen BR, Lawler J, Sudhakar A, Kalluri R:
Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression
Cancer Res. (64) 1570-1574, 2004
- 56) Hammers HJ, Kirchner H, Schlenke P:
Ultraviolet-induced detection of halogenated pyrimidines: simultaneous analysis of DNA replication and cellular markers
Cytometry (40) 327-335, 2000
- 57) Han H, Silverman JF, Santucci TS, Macherey RS, d'Amato TA, Tung MY, Weyant RJ, Landreneau RJ:
Vascular endothelial growth factor expression in stage I non-small cell lung cancer correlates with neoangiogenesis and a poor prognosis
Ann.Surg.Oncol. (8) 72-79, 2001
- 58) Hanahan D, Bergers G, Bergsland E:
Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice
J.Clin.Invest (105) 1045-1047, 2000
- 59) Hand AR, Hassell JR:
Tissue fixation with diimidoesters as an alternative to aldehydes. II. Cytochemical and biochemical studies of rat liver fixed with dimethylsuberimidate
J.Histochem.Cytochem. (24) 1000-1011, 1976
- 60) Harrington EO, Loffler J, Nelson PR, Kent KC, Simons M, Ware JA:
Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle

- progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells**
J.Biol.Chem. (272) 7390-7397, 1997
- 61) Hartley JA, Gibson NW, Kohn KW, Mattes WB:
DNA sequence selectivity of guanine-N7 alkylation by three antitumor chloroethylating agents
Cancer Res. (46) 1943-1947, 1986
- 62) Hassell J, Hand AR:
Tissue fixation with diimidoesters as an alternative to aldehydes. I. Comparison of cross-linking and ultrastructure obtained with dimethylsuberimidate and glutaraldehyde
J.Histochem.Cytochem. (22) 223-229, 1974
- 63) Hayes DM, Pajak TF, Rege V, Falkson G, Spurr CL, Silver RT, Nissen NI, Harley JB, Cuttner J, Glidewell O, Holland JF:
Combination chemotherapy for non-Hodgkin lymphomas: a ten year follow-up study
Med.Pediatr.Oncol. (6) 23-38, 1979
- 64) Hellstrom M, Gerhardt H, Kalen M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C:
Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis
J.Cell Biol. (153) 543-553, 2001
- 65) Helsing MD:
Trofosfamide as a salvage treatment with low toxicity in malignant lymphoma. A phase II study
Eur.J.Cancer (33) 500-502, 1997
- 66) Hempel G, Krumpelmann S, May-Manke A, Hohenlochter B, Blaschke G, Jurgens H, Boos J:
Pharmacokinetics of trofosfamide and its dechloroethylated metabolites
Cancer Chemother.Pharmacol. (40) 45-50, 1997
- 67) Hicklin DJ, Ellis LM:
Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis
J.Clin.Oncol. (23) 1011-1027, 2005
- 68) Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ:
Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF
Science (284) 1994-1998, 1999
- 69) Holash J, Wiegand SJ, Yancopoulos GD:
New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF
Oncogene (18) 5356-5362, 1999
- 70) Holm M, Thomsen M, Hoyer M, Hokland P:
Optimization of a flow cytometric method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdUrd incorporation into normal and malignant hematopoietic

- cells**
Cytometry (32) 28-36, 1998
- 71) Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J:
Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression
Nat.Med. (1) 149-153, 1995
- 72) Hong PS, Srigratsanapol A, Chan KK:
Pharmacokinetics of 4-hydroxycyclophosphamide and metabolites in the rat
Drug Metab Dispos. (19) 1-7, 1991
- 73) Horvath V, Hartlapp JH, Hegewisch-Becker S, Feyerabend T, Fischer v. Weikersthal L, Illiger HJ, Jäger E, Peters SO, Reichardt P, Uthgenannt D, Weber K, Wagner T, Wiedemann G, Zschaber R:
Oral trofosfamide in elderly and/or heavily pretreated patients with metastatic lung cancer
Onkologie. (23) 341-344, 2000
- 74) Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR:
Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria
J.Clin.Invest (52) 2745-2756, 1973
- 75) Karnofsky D:
Summary of results obtained with nitrogen mustard in the treatment of neoplastic disease
Ann.N.Y.Acad.Sci. (68) 899-914, 1958
- 76) Kerbel RS:
Tumor angiogenesis: past, present and the near future
Carcinogenesis (21) 505-515, 2000
- 77) Kerbel RS:
Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents
Bioessays (13) 31-36, 1991
- 78) Klement G, Huang P, Mayer B, Green SK, Man S, Bohlen P, Hicklin D, Kerbel RS:
Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts
Clin.Cancer Res. (8) 221-232, 2002
- 79) Kollmannsberger C, Brugger W, Hartmann JT, Maurer F, Bohm P, Kanz L, Bokemeyer C:
Phase II study of oral trofosfamide as palliative therapy in pretreated patients with metastatic soft-tissue sarcoma
Anticancer Drugs (10) 453-456, 1999

- 80) Korst DR, Clifford G, Fowler W, Louis J, Will J, Wilson HE:
Multiple myeloma II. Analysis of Cyclophosphamide therapy in 165 patients
JAMA (189) 758-762, 1964
- 81) Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, Fukui M:
VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct
Stroke (27) 1865-1872, 1996
- 82) Kueng W, Silber E, Eppenberger U:
Quantification of cells cultured on 96-well plates
Anal.Biochem. (182) 16-19, 1989
- 83) Kurowski V, Wagner T:
Comparative pharmacokinetics of ifosfamide, 4-hydroxyifosfamide, chloroacetaldehyde, and 2- and 3-dechloroethylifosfamide in patients on fractionated intravenous ifosfamide therapy
Cancer Chemother.Pharmacol. (33) 36-42, 1993
- 84) Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Calaoagan JM, Chen EY, Knapp AM, Yun Z, Denko NC, Giaccia AJ:
Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor
Clin.Cancer Res. (6) 2941-2950, 2000
- 85) Lane M:
The effectiveness of cyclophosphamide (cytoxan) against well established transplanted rodent tumors
Cancer Res. (20) 1269-1273, 1960
- 86) Leo C, Giaccia AJ, Denko NC:
The hypoxic tumor microenvironment and gene expression
Semin.Radiat.Oncol. (14) 207-214, 2004
- 87) Lowry O, Rosenbrough NJ, Farr A, Randall R:
Protein measurement with the Folin phenol reagent
J.Biol.Chem. (193) 265-275, 1951
- 88) Malecaze F, Clamens S, Simorre-Pinatel V, Mathis A, Chollet P, Favard C, Bayard F, Plouet J:
Detection of vascular endothelial growth factor messenger RNA and vascular endothelial growth factor-like activity in proliferative diabetic retinopathy
Arch.Ophthalmol. (112) 1476-1482, 1994
- 89) Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, Bohlen P, Hicklin DJ, Bergers G, Kerbel RS:
Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water
Cancer Res. (62) 2731-2735, 2002

- 90) Masferrer JL, Koki A, Seibert K:
COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents
Ann.N.Y.Acad.Sci. (889) 84-86, 1999
- 91) Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Haskard DO:
Human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells show heterogeneity in response to PKC activation
Am.J.Physiol (273) C1233-C1240, 1997
- 92) Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW, Jr.:
Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics
J.Clin.Oncol. (19) 1195-1206, 2001
- 93) Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffinhal T, Varticovski L, Isner JM:
Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells
J.Biol.Chem. (270) 31189-31195, 1995
- 94) Nissen-Meyer R, Host H:
A comparison between the hematological side effects of cyclophosphamide and nitrogen mustard
Cancer Chemother.Rep. (9) 51-55, 1960
- 95) Ormerod MG, Payne AW, Watson JV:
Improved program for the analysis of DNA histograms
Cytometry (8) 637-641, 1987
- 96) Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D:
Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (93) 2002-2007, 1996
- 97) Pauwels PJ, Abarca J, Trouet A:
Cultivation of rat cerebellar cells under conditions of optimal oxygen supply
Neurosci.Lett. (43) 309-314, 1983
- 98) Peterson GL:
Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall
Anal.Biochem. (100) 201-220, 1979
- 99) Phillips HS, Hains J, Leung DW, Ferrara N:
Vascular endothelial growth factor is expressed in rat corpus luteum
Endocrinology (127) 965-967, 1990
- 100) Pietras K, Hanahan D:
A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose "chemo-switch" regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer
J.Clin.Oncol. (23) 939-952, 2005

- 101) Preiss R, Baumann F, Stefanovic D, Niemeyer U, Ponisch W, Niederwieser D:
Investigations on the pharmacokinetics of trofosfamide and its metabolites-first report of 4-hydroxy-trofosfamide kinetics in humans
Cancer Chemother.Pharmacol. (53) 496-502, 2004
- 102) Ravi R, Mookerjee B, Bhujwala ZM, Sutter CH, Artemov D, Zeng Q, Dillehay LE, Madan A, Semenza GL, Bedi A:
Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha
Genes Dev. (14) 34-44, 2000
- 103) Rozados VR, Sanchez AM, Gervasoni SI, Berra HH, Matar P, Graciela SO:
Metronomic therapy with cyclophosphamide induces rat lymphoma and sarcoma regression, and is devoid of toxicity
Ann.Oncol. (15) 1543-1550, 2004
- 104) Sasaki K, Adachi S, Yamamoto T, Murakami T, Tanaka K, Takahashi M:
Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA
Cytometry (9) 93-96, 1988
- 105) Schmid I, Ferbas J, Uittenbogaart CH, Giorgi JV:
Flow cytometric analysis of live cell proliferation and phenotype in populations with low viability
Cytometry (35) 64-74, 1999
- 106) Seligman AM, Nachlas MM, Manheimer LH, Friedman OM, Wolf G:
Development of new methods for the histochemical demonstration of hydrolytic intracellular enzymes in a program of cancer research
Ann.Surg. (130) 333, 1949
- 107) Shizukuda Y, Helisch A, Yokota R, Ware JA:
Downregulation of protein kinase delta activity enhances endothelial cell adaptation to hypoxia
Circulation (100) 1909-1916, 1999
- 108) Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA:
Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity
Circ.Res. (85) 247-256, 1999
- 109) Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E:
Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A (92) 768-772, 1995
- 110) Skipper HE, Schabel FM, Jr., Wilcox WS:
Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia
Cancer Chemother.Rep. (35) 1-111, 1964

- 111) Stolting S, Klink T, Bela C, Engels C, Wagner T:
Metronomic scheduling of trofosfamide chemotherapy in human NSCLC xenografts highly increases therapeutic efficacy compared to conventional scheduling by inhibition of angiogenesis
Int.J.Clin.Pharmacol.Ther. (42) 652-653, 2004
- 112) Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ:
Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro
J.Immunol. (148) 78-83, 1992
- 113) Teicher BA:
Pharmacology of Cancer Chemotherapy: Antitumor Alkylating Agents
in De Vita, V. T., Hellman, S. und Rosenberg, S. A.: Cancer. Principles & Practice of Oncology
Seite 405 bis 418
5. Auflage, Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, 1997
- 114) Teicher BA, Holden SA, Menon K, Hopkins RE, Gawryl MS:
Effect of hemoglobin solution on the response of intracranial and subcutaneous 9L tumors to antitumor alkylating agents
Cancer Chemother.Pharmacol. (33) 57-62, 1993
- 115) Vaupel P, Harrison L:
Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response
Oncologist. (9 Suppl 5) 4-9, 2004
- 116) Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P:
Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review
Cancer Res. (49) 6449-6465, 1989
- 117) Vaupel P, Thews O, Kelleher DK, Hoekel M:
Current status of knowledge and critical issues in tumor oxygenation. Results from 25 years research in tumor pathophysiology
Adv.Exp.Med.Biol. (454) 591-602, 1998
- 118) Vogt T, Hafner C, Bross K, Bataille F, Jauch KW, Berand A, Landthaler M, Andreesen R, Reichle A:
Antiangiogenetic therapy with pioglitazone, rofecoxib, and metronomic trofosfamide in patients with advanced malignant vascular tumors
Cancer (98) 2251-2256, 2003
- 119) Wagner A, Hempel G, Boos J:
Trofosfamide: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the oral treatment of cancer
Anticancer Drugs (8) 419-431, 1997

- 120) Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A:
Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro
Angiogenesis. (7) 335-345, 2004
- 121) West CM, Cooper RA, Loncaster JA, Wilks DP, Bromley M:
Tumor vascularity: a histological measure of angiogenesis and hypoxia
Cancer Res. (61) 2907-2910, 2001
- 122) White RA, Meistrich ML, Pollack A, Terry NH:
Simultaneous estimation of T(G2+M), T(S), and T(pot) using single sample dynamic tumor data from bivariate DNA-thymidine analogue cytometry
Cytometry (41) 1-8, 2000
- 123) White RA, Terry NH, Baggerly KA, Meistrich ML:
Measuring cell proliferation by relative movement. I. Introduction and in vitro studies
Cell Prolif. (24) 257-270, 1991
- 124) White RA, Terry NH, Meistrich ML, Calkins DP:
Improved method for computing potential doubling time from flow cytometric data
Cytometry (11) 314-317, 1990
- 125) Wiedemann G, Zschaber R, Hegewisch-Becker S, Reichardt P, Weber K, Uthgenannt D, Löwenstrom O, Jäger E, Freund M, Seeger R, Feller AC, Merz H, Hartlapp JH, Wagner T, Illiger HJ:
Two oral trofosfamide schedules in elderly patients with refractory Non-Hodgkin's lymphomas
Onkologie. (22) 134-138, 1999
- 126) Wist E, Risberg T:
Trofosfamide in non-Hodgkin's lymphoma. A phase II study
Acta Oncol. (30) 819-821, 1991
- 127) Zebrowski BK, Yano S, Liu W, Shaheen RM, Hicklin DJ, Putnam JB, Jr., Ellis LM:
Vascular endothelial growth factor levels and induction of permeability in malignant pleural effusions
Clin.Cancer Res. (5) 3364-3368, 1999
- 128) Zhu Z, Hattori K, Zhang H, Jimenez X, Ludwig DL, Dias S, Kussie P, Koo H, Kim HJ, Lu D, Liu M, Tejada R, Friedrich M, Bohlen P, Witte L, Rafii S:
Inhibition of human leukemia in an animal model with human antibodies directed against vascular endothelial growth factor receptor 2. Correlation between antibody affinity and biological activity
Leukemia (17) 604-611, 2003
- 129) Ziemer LS, Koch CJ, Maity A, Magarelli DP, Horan AM, Evans SM:
Hypoxia and VEGF mRNA expression in human tumors
Neoplasia. (3) 500-508, 2001

8 Anhang – Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
AUC	Area Under the Curve
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMS	Dimethylsüberimidat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Flourescence Analysing Cell Sorter
FKS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
HIF	Hypoxia Inducible Factor
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
MTD	Maximum Tolerable Dose
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Plateled Derived Growth Factor
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
S-Phase	Synthese-Phase
TSP-1	Thrombospondin-1

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	World Health Organization

9 Anhang – Technik

9.1 Durchflußzytometer

Durchflußzytometrische Untersuchungen wurden am „FACScan“ der Firma „Becton Dickinson“ durchgeführt.

Technische Daten:

Laser: Argon-Ionen Laser, Wellenlänge 488 nm, 15 mW

Durchflußrate: 12 µl/min (±3 µl/min)

Verwendete Filter:

FL1: 530 nm (± 15 nm), verwendet für Anti-BrdU-FITC (525 nm)

FL2: 585 nm (± 21 nm), verwendet für Anti-CD31 PE (578 nm)

FL3: 650 nm (low-pass), verwendet für 7-AAD (675 nm)

Gerätesteuerung/Software:

Die Steuerung des „FACScan“ erfolgt durch das Computerprogramm „Cell Quest“, Version 3.1f der Firma „Becton Dickinson“.

9.2 Photometer

Photometrische Messungen wurden am Mikrotiterplattenphotometer „Multiskan RC“ der Firma „Dynex Technologies“ durchgeführt.

Technische Daten:

Verwendete Filter:

Kristallviolett-Färbung 595 nm

VGEF-ELISA 450 nm

Proteinbestimmung 630 nm

Gerätesteuerung/Software:

„Revelation“, Version 4.22 der Firma „Dynex“.

10 Danksagungen

Bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Thomas Wagner, Leiter des Bereiches Hämatologie und Onkologie, Medizinische Klinik I an der Universität zu Lübeck, möchte ich mich sehr herzlich für das interessante Thema dieser Dissertation, und die Möglichkeit zur Arbeit in den Laboren der Abteilung bedanken. Die engagierte Betreuung und professionelle Anleitung zur wissenschaftlichen Tätigkeit haben mir, sowohl während des experimentellen Teils, als auch während der Erstellung meines Manuskriptes, sehr geholfen. Für die persönliche Unterstützung und Förderung bei der Veröffentlichung von Inhalten dieser Arbeit bin ich sehr dankbar.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Monica Vollmert für die Einweisung in die Arbeitsmethoden der Zellkultur und die erfahrene Betreuung meiner experimentellen Tätigkeiten. Ihre freundliche Unterstützung war mir stets sehr hilfreich.

Meiner lieben Kommilitonin Christine Bela danke ich sehr herzlich für verlässliche Freundschaft und schöne Erinnerungen an die gemeinsame Studien- und Forschungszeit. Ihre Doktorarbeit liefert tierexperimentelle Erkenntnisse zum hier behandelten Thema.

Dr. rer. nat. Stefanie Stölting danke ich vielmals für die nützlichen Ratschläge beim Erstellen des Manuskripts.

Mein weiterer Dank gilt:

- allen Beteiligten an den gemeinsamen Publikationen, die durch Mitarbeit und konstruktive Kritik zum Gelingen beigetragen haben.
- Dr. med. Jan Marxsen für die thematische Einführung und die statistische Hilfe.

- Professor Dr. med. Schlenke und seinen Mitarbeiter/-innen aus dem Institut für Immunologie sowie Frau Barbara Weitzner, die mich freundlicherweise in die Durchflußzytometrie eingearbeitet haben.
- Dr. med. Kai Eggers für die Präparation der Endothelzellen.
- Professor Dr. med. Wolfgang Jelkmann für die Nutzung des Hypoxie-Inkubators im Institut für Physiologie.

11 Publikationen

Inhalte der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Vortrag:

- Jahrestagung der Central European Society for Anticancer Research
Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Juni 2002
„In-vitro und in-vivo Untersuchungen zur angiostatischen Potenz einer niedrig dosierten Dauertherapie mit Trofosfamid (Ixoten)“

Posterpräsentationen:

- Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO)
München, Oktober 2002
„Trofosfamide equally inhibits tumor and endothelial cell growth in-vitro and in-vivo„
- Jahrestagung der American Assoziation for Cancer Research
Orlando, Florida, USA, April 2004
“Metronomic scheduling of trofosfamide chemotherapy in human NSCLC xenografts highly increases therapeutic efficacy compared to conventional scheduling by inhibition of angiogenesis”

Fachzeitschriften:

- Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. (42) 652-653, 2004
Stoelting S, Klink T, Bela C, Engels C, Wagner T:
“Metronomic scheduling of trofosfamide chemotherapy in human NSCLC xenografts highly increases therapeutic efficacy compared to conventional scheduling by inhibition of angiogenesis”
- J. Cancer Res. Clin. Onc. (132) 643-652, 2006
Klink T, Bela C, Stoelting S, Peters SO, Broll R, Wagner T:
„Metronomic trofosfamide inhibits progression of human lung cancer xenografts by exerting anti-angiogenic effects“

12 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Thorsten Klink
Anschrift: Schauenburger Straße 64, 24118 Kiel
Geburtstag: 02.10.1978
Geburtsort: Kaiserslautern



Schule und Ausbildung:

1984 – 1988 Grundschule Homburg/Saar
1988 – 1997 Saarpfalz-Gymnasium Homburg/Saar
1997 Allgemeine Hochschulreife
1997 Ausbildung zum Rettungssanitäter an der Rettungsdienstschule des DRK in Mainz
1997 – 1998 Zivildienst im Rettungsdienst, DRK-Rettungswache Homburg/Saar

Studium:

1998 – 2005 Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
Herbst 2000 Ärztliche Vorprüfung
2001 Beginn der Doktorarbeit in der Klinik für Innere Medizin I, unter Anleitung von Professor Dr. med. Thomas Wagner
Herbst 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2004 – 2005 Praktisches Jahr an der Universität Bern - Schweiz (Innere Medizin), an der University of Toronto - Kanada (Radiologie) und an der Universität zu Lübeck (Radiologie und Chirurgie)
Sommer 2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation

