

**Aus der
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie Rostock**

**Direktor:
Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt**

**„Zellbiologische Untersuchungen
zur Wirkung ionisierender Strahlung unter Einfluss von
Irinotecan vs. Oxaliplatin, jeweils als Monotherapie sowie in
Kombination mit 5-Fluorouracil“**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von

Marie-Louise Fleischer
geboren am 26.04.1984 in Freiberg

Rostock 2015

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Guido Hildebrandt
Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie,
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar
Rudolf-Zenker-Institut für Experimentelle Chirurgie,
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Herr PD Dr. med. Gunther Klautke
Klinik für Radioonkologie,
Klinikum Chemnitz gGmbH

Datum der Einreichung: 02. Dezember 2015

Datum der Verteidigung: 24. Mai 2016

meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das kolorektale Karzinom (KRK).....	1
1.2	Therapieoptionen von Tumorerkrankungen am Beispiel des kolorektalen Karzinoms	4
1.2.1	Radikal chirurgische Therapie	5
1.2.2	Radiotherapie	6
1.2.3	Radiomodulatoren und deren Entwicklung.....	7
1.2.4	Chemotherapie	7
1.2.4.1	5-Fluorouracil (5-FU).....	9
1.2.4.2	Oxaliplatin (OX).....	9
1.2.4.3	Irinotecan (IRI).....	10
1.2.5	Kombinierte Regime	10
1.3	Zielstellung dieser Arbeit	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Arbeitstechniken in der Zellkultur.....	14
2.1.1	HT29-Zellen.....	14
2.1.2	Ausfrieren der Tumorzellen	14
2.1.3	Tumorzellkultivierung	15
2.1.4	Zellzahlbestimmung.....	16
2.2	Wirkstoffe.....	16
2.2.1	5-Fluorouracil (5-FU)	16
2.2.2	Oxaliplatin	17
2.2.3	Irinotecan Monohydrochlorid (Irinotecan HCL).....	17
2.2.4	Ansetzen der Stammlösungen (SL) und der Verdünnungsreihen	18
2.3	Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger	19
2.4	Wachstumskurven	20
2.4.1	Das Testprinzip	20
2.4.2	Allgemeine Durchführung	20
2.4.3	Wachstumskurven mit einmaliger Wirkstoffzugabe von 5-FU, Oxaliplatin oder Irinotecan.....	21
2.5	Koloniebildungstests (KBT).....	22
2.5.1	Das Testprinzip	22
2.5.2	Allgemeine Durchführung	22
2.5.3	Koloniebildungstests mit 5-FU-, Oxaliplatin- und Irinotecan-Zugabe	24
2.6	EZ4U-Test	26
2.6.1	Das Testprinzip	26
2.6.2	Allgemeine Durchführung	26
2.7	BrdU-Test	28
2.7.1	Das Testprinzip	28
2.7.2	Allgemeine Durchführung	28
2.8	γ -H2AX-Test.....	30
2.8.1	Das Testprinzip	30
2.8.2	Allgemeine Durchführung	30
2.8.3	Testauswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie	31
2.9	Verwendete Materialien, Medien, Zusätze und Geräte.....	32

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Wachstum.....	36
3.1.1	Wachstum unter nativen Bedingungen	36
3.1.2	Wachstum unter Wirkstoff-Zugabe.....	37
3.1.2.1	Wachstum bei einmaliger 5-Fluorouracil-Zugabe.....	38
3.1.2.2	Wachstum bei einmaliger Oxaliplatin-Zugabe	40
3.1.2.3	Wachstum bei einmaliger Irinotecan-Zugabe.....	42
3.2	Klonogenes Überleben	44
3.3	Metabolische Aktivität	50
3.4	Zellproliferation.....	58
3.5	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	64
4	DISKUSSION	68
4.1	Wachstum.....	68
4.1.1	Wachstum unter nativen Bedingungen	68
4.1.2	Wachstum bei einmaliger 5-FU-Zugabe	69
4.1.3	Wachstum bei einmaliger Oxaliplatin-Zugabe	69
4.1.4	Wachstum bei einmaliger Irinotecan-Zugabe	71
4.2	Klonogenes Überleben	71
4.3	Metabolische Aktivität	75
4.4	Zellproliferation.....	78
4.5	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	80
5	ZUSAMMENFASSUNG	83
6	AUSBLICK.....	85
7	THESEN.....	87
8	TABELLENVERZEICHNIS	89
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90
10	LITERATURVERZEICHNIS	92

DANKSAGUNG

ANHANG

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Abkürzungsverzeichnis

	Bestrahlung
°C	Grad Celsius
5-FU	5-Fluorouracil
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate
Abb.	Abbildung
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia RAD3-related
BrdU	5-Bromo-2-desoxyuridin
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder Serum Albumin)
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsuloxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNA-PKs	DNA-Proteinkinasen
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	und andere
etc.	et cetera
evtl.	eventuell
F	Fluorouracil
F-dUMP	Fluordesoxyuridylat
FOL	Folinsäure
FBS	Foetal Bovine Serum (fetales Rinderserum)
GHz	Gigahertz
Gy	Gray
h	Stunden
H2A	Histon
H2AX	Phosphorylierte Histonvariante

HCL	Hydrochlorid
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom
i. d. R.	in der Regel
igG	Immunglobulin G
inkl.	inklusive
IRI	Irinotecan
Kap.	Kapitel
KBT	Koloniebildungstest
KRK	Kolorektales Karzinom
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minuten
mKRK	metastasiertes kolorektales Karzinom
ml	Milliliter
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
o. g.	oben genannt
OX	Oxaliplatin
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerasen
PBS	Phosphate buffered Saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PE	Plating efficiency bzw. Plattiereffizienz
PTGE	pulsed-field gel electrophoresis
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SL	Stammlösung
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
Tab.	Tabelle
UICC	Union internationale contre le cancer
UMP	Uridinmonophosphat
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche

WHO	World Health Organisation
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5- ((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
z. B.	zum Beispiel
zzgl.	zuzüglich

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom (KRK)

Das kolorektale Karzinom gilt bei Männern nach Prostata- und Lungenkrebs als dritthäufigste, bei Frauen nach dem Mammakarzinom als zweithäufigste Krebsneuerkrankung in Deutschland (ROBERT-KOCH-INSTITUT UND GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2013). In der Auswertung des deutschen Krebsregisters werden unter KRK alle Formen von Dickdarm- und Analkrebs zusammengefasst. Auf der krebspezifischen Todesursachenstatistik befindet sich der Krebs des Darmes bei Männern mit 11,4 % gleich hinter den am häufigsten zum Tode führenden bösartigen Neubildungen der Bronchien und der Lunge. Beim weiblichen Geschlecht gilt Darmkrebs nach den karzinomatösen Erkrankungen von Brust und Lunge als dritthäufigste zum Tode führende Krebserkrankung innerhalb der Bundesrepublik Deutschland. Die altersstandardisierten Erkrankungsraten zeigten sich zuletzt bei beiden Geschlechtern leicht rückläufig (ROBERT-KOCH-INSTITUT UND GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E.V., 2013). Basierend auf besserer Diagnostik, Früherkennung, Therapie und Aufklärung der Bevölkerung ist auch die Sterblichkeit in allen Altersgruppen rückläufig. Innerhalb der letzten 10 Jahre ist die altersstandardisierte Mortalität in Deutschland um ca. 20 % gesunken. Trotz der positiven Entwicklung auf diesem Gebiet lagen die Krebserkrankungen mit einem Anteil von 45,8 % insgesamt (geschlechterunspezifisch) in der Todesursachenstatistik Deutschlands weiterhin hinter den kardiovaskulären Erkrankungen mit 57 % an zweiter Stelle (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2012).

Da Darmkrebs in vielen Fällen bis in ein spätes Stadium hinein oft unbemerkt für die Betroffenen bleibt und die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ab dem 50. Lebensjahr deutlich ansteigt (BIRKNER *et al.*, 2003), empfehlen und übernehmen die Krankenkassen ab dem 50. Lebensjahr die jährliche digitale rektale Untersuchung, sowie die Durchführung eines Tests zum Nachweis okkulten Blutes im Stuhl, welches ein erster Hinweis für eine noch unentdeckte und zu diesem Zeitpunkt noch symptomlose Erkrankung sein kann.

Mehrere Untersuchungen haben belegt, dass der immunhistochemische Nachweis okkulten Blutes im Stuhl die Detektionsrate von Adenomen und Karzinomen erhöht (ALLISON *et al.*, 1996; FLITCROFT *et al.*, 2012; RAGENEL *et al.*, 2013; GARBORG *et al.*, 2013).

Ab dem 55. Lebensjahr besteht Anspruch auf eine vollständige endoskopische Untersuchung des Dickdarmes. Die Koloskopie besitzt von allen Maßnahmen zur Früherkennung des KRK die höchste Sensitivität und Spezifität und gilt daher als Goldstandard. So werden pro Jahr bis zu zweimal mehr Darmkrebskrankungen diagnostiziert, als noch zu Anfang der 80er Jahre (DEUTSCHE KREBSHILFE E. V., 2009). Ein weiterer Ansatz ist der Nachweis Karzinom-assoziiertes DNS-Veränderungen im Stuhl (IMPERIALE, 2012; IMPERIALE *et al.*, 2014). Bislang liegen allerdings keine Daten prospektiver Studien zum Einfluss dieser Art von Testung auf die Inzidenz und Mortalität des KRKs vor. Natürlich richten sich die Maßnahmen und der Zeitpunkt der Vorsorge nach den Begleiterkrankungen und evtl. vorhandenen genetischen Dispositionen. Zur Gruppe dieser genetischen Dispositionen gehören die familiäre adenomatöse Polyposis, das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC), auch als Lynch-Syndrom bezeichnet, und das kolorektale Karzinom in der Familienanamnese. In ca. 10 % der Fälle liegt eine genetische Disposition zu Grunde, bei welcher typische Mikrosatelliteninstabilitäten auftreten und zu einer Mutation verschiedenster DNA-Reparatur-Gene führen können. Bei Verdacht auf das Vorliegen einer solchen Veranlagung stehen familiäre Screeninguntersuchungen zur Verfügung. Auch langjährig bestehende chronisch entzündliche Darmerkrankungen, insbesondere die Colitis ulcerosa mit dem Nachweis von high-grade intraepithelialen Neoplasien, stellen ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von bösartigen Geschwülsten des Darmes dar (GYDE *et al.*, 1988; EKBOM *et al.*, 1990). Bei Risikopatienten sollte aus diesem Grunde jährlich eine hohe Koloskopie mit der Entnahme von Stufenbiopsien erfolgen.

Aber nicht nur genetische Faktoren, auch andere Ätiologien, z. B. Ernährungsgewohnheiten, wie ein hoher Fettanteil, ein reduzierter Ballaststoffanteil und fleischreiche Kost werden in der Literatur schon seit geraumer Zeit als Einflussfaktoren auf die Darmkrebsentstehung diskutiert (ALEKSANDROVA *et al.*, 2013).

Wie im oberen Abschnitt bereits erwähnt, gibt es keine zuverlässigen Frühsymptome, sodass bei Diagnosestellung bereits ein fortgeschrittenes Stadium vorliegen kann. Als Stadieneinteilung maligner Tumoren dient auch beim kolorektalen Karzinom die TNM-Klassifikation. Hierbei steht „T“ für das Ausmaß der Primärtumorinfiltration, „N“ für das Fehlen bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen und „M“ für evtl. bestehende Fernmetastasen. Aus den Angaben des beim Staging ermittelten TNM-Stadiums kann eine Stadieneinteilung nach der Union internationale contre le cancer (UICC) vorgenommen werden, welche eine Aussage zur Prognose erlaubt und den weiteren Therapieverlauf bestimmt. So zeigte eine Auswertung der GEKID Cancer Survival Working Group für den

Zeitraum von 2002 bis 2006 eine relative, altersadaptierte 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) von 89,5 % bei lokal begrenzten Stadien (ohne Lymphknotenmetastasen). Für lokal fortgeschrittene Stadien (Lymphknotenmetastasen vorhanden) ergab sich eine 5-JÜR von 65,4 %. Für metastasierte Stadien lag die 5-JÜR bei 14,9 % (MAJEK et al., 2012).

Die Dukes Klassifikation, ein 1932 durch den britischen Pathologen Cuthbert Dukes eingeführtes Einteilungsschema des kolorektalen Karzinoms nach Infiltrationstiefe, Lymphknoten- und Fernmetastasierung, wird zunehmend von der Stadieneinteilung der UICC abgelöst und ist in der folgenden Abb. 1 dargestellt.

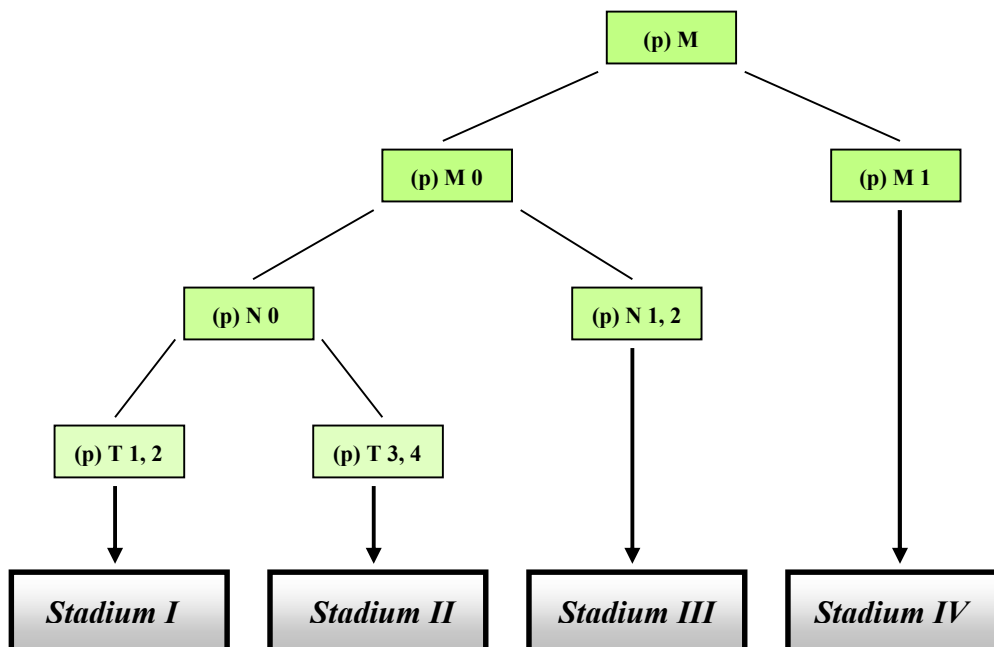


Abb. 1: Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms nach der UICC-Klassifikation (nach SIEWERT, 2007). (p): postoperative histopathologische Klassifikation, T: Primärtumorausdehnung, N: Lymphknotenmetastasen, M: Fernmetastasierung.

1.2 Therapieoptionen von Tumorerkrankungen am Beispiel des kolorektalen Karzinoms

Unter Berücksichtigung der Lokalisation, der Histologie und der Ausdehnung der Neoplasie sowie des Allgemeinzustandes des Patienten wird - wie bei anderen Tumorentitäten auch - zwischen einer Behandlung mit kurativer bzw. palliativer Zielsetzung unterschieden. Eine Behandlung im Rahmen der kurativen Option strebt die vollständige Heilung der Tumorerkrankung an, sofern eine prätherapeutische Diagnostik - das sogenannte Staging - eine realistische Heilungschance einräumt. Im Rahmen der kurativen Zielsetzung unterscheidet sich weiterhin der neoadjuvante vom adjuvanten Therapieansatz. Neoadjuvant bedeutet in diesem Zusammenhang, dass dem operativen Eingriff z. B. eine Chemo- bzw. Radiotherapie vorausgeht, um den primär nicht operablen Tumor zu verkleinern und somit ein kuratives Vorgehen zu ermöglichen. Die im Anschluss an die vollständige operative Entfernung der bösartigen Neubildung angewandte ergänzende Therapie zur Reduktion eventueller Mikrometastasen und somit zur Verbesserung der Prognose wird als adjuvante Therapie bezeichnet. Sowohl die neoadjuvante als auch die adjuvante systemische Radio- und/oder Chemotherapie werden zur Stärkung der kurativen Zielstellung durchgeführt, um das Risiko eines Lokalrezidivs und eventueller Fernmetastasen zu verringern, die 5-Jahres-Überlebensrate zu erhöhen bzw. eine organerhaltende chirurgische Intervention möglich zu machen. Da beispielsweise im Falle eines Rektumkarzinoms wahlweise immer die schonendere sphinktererhaltende Operationstechnik angestrebt wird, wird heute im klinischen Alltag die neoadjuvante, d. h. präoperative Therapie innerhalb der kurativen Zielsetzung verfolgt. Die Indikation für eine neoadjuvante Radio-/Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms ergibt sich dann, wenn aufgrund des erfolgten Stagings der Tumor ein hohes Lokalrezidivrisiko bietet, oder nur fraglich die Resektion im Gesunden möglich ist. Im Gegensatz dazu ist die Palliativbehandlung ausgerichtet auf die Linderung von Schmerzen und die Beherrschung von anderen, durch die fortgeschrittene Erkrankung verursachten Krankheitsbeschwerden. Im Falle des Kolonkarzinoms beschränkt sich die Palliativtherapie z. B. auf das Anlegen einer Umgehungsanastomose bzw. eines Anus praeter naturalis, gekoppelt mit einer schmerzlindernden Therapie nach dem Stufenschema der World Health Organisation (WHO).

Voraussetzung für die Erläuterung der unterschiedlichen Therapieoptionen am Beispiel des kolorektalen Karzinoms ist weiterhin dessen differenzierte Betrachtung in das Kolonkarzinom und das Rektumkarzinom. Ausschlaggebend hierfür ist die Lokalisation des Tumors im

Verhältnis zur Anokutanlinie. In Europa liegt die Grenzmarke bei einer Distanz von 16 cm zwischen dem aboralen Tumorrand und der Anokutanlinie (FIELDING *et al.*, 1991). Bestimmt wird dieser Abstand unter Verwendung eines starren Rektoskopes im Rahmen einer Koloskopie. Beide Tumorentitäten haben vieles gemein, z. B. dass es sich in 90 % der Fälle histopathologisch um ein Adenokarzinom handelt. Adenokarzinome gehen aus entdifferenzierten Drüsen der Darmschleimhaut hervor. Lokalisiert ist diese Art von Tumor zu ca. 50 % im Rektum, zu etwa 30 % im Sigma und zu 10 % im Coecum bzw. Colon ascendens (HEROLD *et al.*, 2010). Auch die für diese Arbeit verwendete HT29-Zelllinie wurde aus einem humanen Adenokarzinom isoliert.

1.2.1 Radikal chirurgische Therapie

Zwar stellt die chirurgische Resektion die entscheidende Komponente in der Therapie des kolorektalen Karzinoms dar und eine vollständige Heilung, d. h. eine Kuration ist nur durch die vollständige Entfernung des tumortragenden Darmabschnittes möglich, aber seit der Einführung der beiden hochwirksamen Zytostatika Oxaliplatin und Irinotecan hat sich die Prognose der von einem KKR betroffenen Patienten nachweislich deutlich verbessert. Wo früher nur der palliative Weg beschritten werden konnte, ergeben sich nun seit geraumer Zeit durch die Einführung von Kombinations-Therapieregimen neue neoadjuvante sowie adjuvante Möglichkeiten zur Therapie von Darm-Neoplasien. So ist es möglich geworden, im Vorfeld der angestrebten Operation eine verbesserte Ausgangssituation für den Patienten zu erzielen. Dies wird in diesem Zusammenhang auch als sogenanntes „Downstaging“ bezeichnet. Somit ist es realisierbar, einen zuvor aufgrund seiner Ausdehnung nicht resektablen Tumor in einem solchen Maß zu reduzieren, dass seine Entfernung in sano erzielt werden kann. Das Ausmaß der Resektion richtet sich nach der Lokalisation der Neoplasie im Colon und dessen durch die Blutversorgung vorgegebenen Lymphabflussgebiet. Ebenfalls konnte durch mehrere Studien gezeigt werden, dass sowohl Oxaliplatin als auch Irinotecan im Anschluss an eine durchgeführte Therapie mit 5-Fluorouracil/Folinsäure die mediane Überlebenszeit verlängert (SALTZ, 2000; GIACCHETTI *et al.*, 2000; DOUILLARD *et al.*, 2000; KOHNE *et al.*, 2003). Dies bedeutet also, dass eine additiv durchgeführte Radio- und/oder Chemotherapie, innerhalb einer palliativen Ausgangssituation, das mediane Überleben der Patienten durch eine Verlangsamung der Tumorprogression verlängern kann.

Da alle in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffe in der Klinik ihren Einsatz beim fortgeschrittenen, d. h. metastasierten KKR (mKKR) finden, soll weniger auf die

operationstechnischen Verfahren, als vielmehr auf die chemo- und strahlentherapeutischen Varianten eingegangen werden.

1.2.2 Radiotherapie

50 - 60 % aller Patienten, die an Krebs erkrankt sind, unterziehen sich im Verlauf ihrer Erkrankung einer Strahlentherapie. Bei ca. 50 % der Betroffenen, die nach einem definierten Zeitraum von 5 Jahren ohne Rezidiv oder Metastasen als geheilt gelten, ist die Strahlentherapie alleinige Methode der Wahl, oder in Kombination mit anderen Therapieverfahren ein Teil der Behandlung (DEUTSCHE KREBSHILFE E.V., 2009).

Die Radiotherapie wird zur Behandlung des Rektumkarzinoms – auch in Kombination mit Chemotherapie – eingesetzt, da das Risiko eines Lokalrezidivs hoch ist. Beim Kolonkarzinom findet die Bestrahlung nur in Ausnahmefällen Anwendung (Lymphabfluss- und Tumorrandgebiet), da diese Art von Tumoren eher zur Metastasenbildung in anderen Organen neigen und eine das Nachbargewebe schonende Anwendung der Bestrahlung durch die Lokalisation des Kolons kaum möglich ist.

Ionisierende Strahlung kann an der Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid, DNA) eine Vielzahl von Veränderungen verursachen. Basenschäden (Basenmodifikationen, Basenverluste), DNA-Quervernetzungen, DNA-Protein-Vernetzungen, Veränderungen von Zuckermolekülen, Brüche von Wasserstoffbrücken und Mehrfachereignisse, die sogenannten bulky lesions können entstehen. Die DNA-Strangbrüche können weiter in Einzel- und Doppelstrangbrüche unterschieden werden, deren Anzahl proportional zur Strahlendosis zunimmt (SAUER, 2010). Diese durch ionisierende Strahlung hervorgerufenen Strahlenschäden können einerseits über Kernstöße und Ionisation erfolgen, indem für das Zellüberleben wesentliche Biomoleküle geschädigt werden (direkte Strahlenwirkung). Andererseits können Zellbestandteile aber auch über chemische Reaktionen mit Produkten der Wasserradiolyse verändert werden. Dabei zerfällt ein Wassermolekül unter Abgabe eines Bindungselektrons in ein reaktives Wasser-Ion. Dieses zerfällt in ein Hydroxid-Ion und ein freies hochtoxisches Wasserstoffradikal, welches dann über Radikalkettenreaktionen sekundär Zellbestandteile schädigen kann. Da Biomoleküle einen sehr hohen Wasseranteil aufweisen, werden sie besonders häufig im Rahmen der indirekten Strahlenwirkung geschädigt (ERBAR, 1995).

Einen entscheidenden Einfluss auf die Strahlensensibilität von Zellen hat der Zellzyklus. Am empfindlichsten sind die Zellen in der M-Phase und der G₂-Phase. Die größte Resistenz

gegenüber Strahlung findet sich in S-Phase-Zellen. Handelt es sich um eine lange G1-Phase, so sind die Zellen anfangs erneut strahlenresistent, werden aber zunehmend strahlensensibler (HALL, 1994). Bereits 1921 wurde von Holthusen die Beobachtung gemacht, dass Sauerstoff die Strahlenempfindlichkeit von Zellen erhöht. Bei Strahlen mit niedrigem linearem Energietransfer (LET) wie Röntgen- oder Elektronenstrahlen sind gut oxygenierte Zellen im Gegensatz zu hypoxischen Zellen um den Faktor 2 - 3 strahlensensibler. Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff die Peroxidbildung begünstigt wird (Sauerstoffeffekt). Dies führt zu einer sekundären Schädigung der DNA. Diese Schädigung kann wiederum zum Untergang der Zelle führen.

1.2.3 Radiomodulatoren und deren Entwicklung

Wie bereits unter Abschnitt 1.2.2 erwähnt, ist nicht allein die Strahlendosis ausschlaggebende Komponente für den Strahleneffekt. Ebenfalls entscheidend sind die Art der Strahlen und das vorherrschende Milieu, welchem das Objekt der Strahlung ausgesetzt ist. Ein wichtiger Gesichtspunkt dieser Arbeit war, dass der Effekt der Strahlung auf unterschiedliche Art durch antineoplastisch wirksame Substanzen beeinflussbar ist. So können verschiedene Wirkstoffe auf eine gleichzeitig durchgeführte Radiotherapie einen unabhängigen, additiven, supraadditiven oder antagonistischen Effekt haben (BLEEHEN, 1973). Substanzen, die simultan zur Bestrahlung Einsatz finden und so das Ausmaß der Strahlenwirkung herabsetzen, werden als Radioprotektoren bezeichnet. Eingesetzt werden radioprotektive Substanzen zur Reduktion strahleninduzierter Nebenwirkungen am Normalgewebe. Für diese Arbeit waren Wirkstoffe, welche einen die Strahlenwirkung verstärkenden Effekt haben, von Bedeutung.

1.2.4 Chemotherapie

Grundsätzlich finden Chemotherapeutika Anwendung zur medikamentösen Behandlung von Krebserkrankungen, aber auch von Infektionskrankheiten. Chemotherapeutika lassen sich nach ihrem Mechanismus in zytotoxisch und zytostatisch wirksame Substanzen unterteilen. Zytostatika hemmen die Zellproliferation und führen über diesen Mechanismus dazu, dass das Tumorwachstum zum Erliegen kommt. Zytotoxisch wirksame Substanzen hingegen bewirken über das Absterben der Zellen eine Verminderung der Zellzahl und somit im besten Falle eine Reduktion der Tumormasse. Das gewünschte Ziel - der Zelltod - kann auf verschiedenen Wegen erreicht werden. So lassen sich die Chemotherapeutika nach ihren unterschiedlichen

Wirkungsweisen klassifizieren. Antineoplastisch wirksame Substanzen können durch Alkylierung, Platin-Bindungen, Interkalierung und Topoisomerase-Hemmung die DNA schädigen und somit schwerwiegende Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel haben. Auch eine Hemmung der Synthese von DNA-Bausteinen und die Einschleusung falscher Bausteine können zum Untergang der Zellen führen. Ebenfalls zum Einsatz kommen sogenannte „Spindelgifte“ wie Vinca-Alkaloide oder Taxane, die durch Interferenzen mit den Mikrotubuli der Mitosespindel die Zellproliferation hemmen.

Die Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome hat sich in den vergangenen Jahren durch den Einsatz von Oxaliplatin, Irinotecan und anderer Substanzen stark verändert. Auch die hormonelle Therapie, sowie die Verwendung monoklonaler Antikörper trugen zu großen Fortschritten auf diesem Gebiet bei. Sowohl 5-Fluorouracil (5-FU) als auch Oxaliplatin und Irinotecan haben sich kombiniert in verschiedenen Therapieregimen und einzeln zur Therapie des KKR etabliert und bewährt. Jedes dieser drei Chemotherapeutika ist einer anderen Wirkstoffgruppe zugehörig und besitzt einen jeweils anderen Wirkmechanismus. Die Entscheidung darüber, welcher der Einzelwirkstoffe bzw. welches Wirkstoffregime verwendet wird, ist individuell verschieden und von einer Vielzahl von Faktoren abhängig. Die S3-Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft geben einen Überblick über die verschiedenen Therapieempfehlungen. Nebenerkrankungen, das Alter und der aktuelle körperliche Zustand des Patienten, das Tumorstadium und die Anzahl bereits durchlaufener Therapieverfahren, d. h. ob es sich um eine first- bzw. second-line Therapie handelt, spielen dabei eine entscheidende Rolle. Auch eventuell auftretende Nebenwirkungen beeinflussen die Wahl des Therapieregimes in einem wichtigen Maße.

Wie bereits im Abschnitt zur radikalen chirurgischen Therapie beschrieben, spielt auch in Bezug auf die optimale antineoplastische Behandlung eine entscheidende Rolle, ob es sich um ein Kolon- oder Rektumkarzinom handelt.

Im Hinblick auf das KKR findet die Strahlentherapie nur zur Behandlung des Rektumkarzinoms Anwendung, sodass sich diese Arbeit auch primär auf dieses bezieht.

Nach den aktuellen S3-Leitlinien der deutschen Krebsgesellschaft ist im UICC-Stadium II und III (siehe Abb. 1) die neoadjuvante Radio- oder Radiochemotherapie indiziert. Standard für die adjuvante Therapie des Rektumkarzinoms ist die kombinierte Radiochemotherapie.

In der simultanen Radiochemotherapie kommen sowohl Oxaliplatin, Irinotecan und 5-FU einzeln und in Kombination zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss dieser Wirkstoffe bzw. deren Kombination auf die zelluläre Strahlensensibilität *in vitro* getestet.

1.2.4.1 5-Fluorouracil (5-FU)

Als sogenannter Pyrimidinantagonist lässt sich das Zytostatikum 5-FU der Gruppe der Antimetabolite zuordnen. Dieser gehören weiterhin die Folsäureantagonisten (z. B. Methotrexat) und die Purinantagonisten (z. B. Azathioprin) an. Gemeinsamkeit dieser Wirkstoffgruppe ist, dass sie natürlichen Metaboliten des Organismus in ihrer chemischen Struktur ähnelt, aber aufgrund ihrer Affinität zu Enzymen im Rahmen der Biosynthese von Nucleinsäuren deren Stoffwechselweg hemmt und somit zu einer Fehlfunktion bis hin zum Absterben der Zelle führen kann. Die Wirkung der sogenannten Antimetabolite lässt sich als zyklusabhängig und phasenspezifisch beschreiben, da sie ihre Wirkung hauptsächlich in der S-Phase des Zellzyklus entfalten. Zu diesem Zeitpunkt besteht ein erhöhter Bedarf an Nucleinsäuren zur DNA-Synthese. Im Falle von 5-FU ist dieser fälschlicherweise stattfindende Einbau in die RNA/DNA nur möglich, da das Zytostatikum Strukturähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin (DNA-Nucleotide) beziehungsweise Uracil (RNA-Nucleotid) besitzt. Die als Folge durch den fehlerhaften Einbau entstehende DNA ist funktionsunfähig.

Darüber hinaus greift 5-FU auch auf anderen Ebenen in die RNA- bzw. DNA-Synthese ein. So hemmt 5-FU *in vivo* nach Umwandlung in seine aktive Form Fluordesoxyuridylat (F-dUMP) die Thymidylat-Synthase irreversibel, mit der Folge, dass die Methylierung von Deoxyuridyl-Säure zu Thymidyl-Säure unterbunden wird (PINEDO & PETERS, 1988) und konsekutiv auch die DNA-Synthese und -reparatur gehemmt werden (SOTOS *et al.*, 1994; HEIDELBERGER *et al.*, 1958; DOLLERY, 1991b). Dieser inhibitorische Effekt führt dazu, dass nicht mehr genug Pyrimidine für die DNA-Synthese bereitgestellt werden können und ein Fortbestehen bzw. die Proliferation der Zelle unmöglich wird.

1.2.4.2 Oxaliplatin (OX)

Dieser Wirkstoff ist eine antineoplastisch wirksame Substanz, welche der dritten Generation der Platinderivat-Gruppe zugehörig ist (MISSET *et al.*, 2000). Oxaliplatin ist neben 5-Fluorouracil und Folsäure Bestandteil des zur Therapie des kolorektalen Karzinoms zugelassenen FOLFOX-Schemas. Gemein ist dieser neuen Gruppe von Platinderivaten, dass deren Platin-Atom mit 1,2-Diaminocyclohexan und einer Oxalatgruppe komplexiert ist. (EXTRA & MARTY *et al.*, 1998). Der genaue Wirkmechanismus von Oxaliplatin ist noch nicht restlos geklärt. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die bei der Biotransformation des Wirkstoffs entstehenden Metaboliten mit der DNA der Zellen interagieren. Dieser Effekt hat

Inter- und Intrastrangquervernetzungen der DNA zur Folge, welche zum Abbruch der DNA-Synthese und somit zu einem zytotoxischen Effekt führen. Oxaliplatin wird *in vivo* weitgehend biotransformiert und zum Großteil über die Niere ausgeschieden. Nach Beendigung der beim FOLFOX4-Schema (vgl. Kap. 1.2.5) verabreichten zweistündigen Infusion ist die Ausgangssubstanz nicht mehr im Plasma nachweisbar (GOLF, 2009). Oxaliplatin ist zugelassen zur adjuvanten Therapie des fortgeschrittenen Kolorektalen Karzinoms im UICC-Stadium III und zeigte sich in *In-vivo*-Studien ebenfalls wirksam gegen Magenkrebs-, Brustkrebs-, Nierenzellkarzinom- und Sarkomzellen (RAYMOND *et al.*, 1998).

1.2.4.3 Irinotecan (IRI)

Diese Substanz stellt ein semisynthetisches Derivat von Camptothecin dar, eines in der Pflanze *Camptotheca acuminata* vorkommenden Alkaloids. Durch die Anlagerung von Irinotecan und seinen aktiven Metaboliten SN-38 an den Komplex aus Topoisomerase I und DNA wird verhindert, dass zuvor entstandene DNA-Einzelstrangbrüche repariert werden (LAMOND *et al.*, 1996; OMURA *et al.*, 1997). Dies wiederum führt zu einem Arrest der Zellen in der strahlensensiblen G2-Phase (TAMURA *et al.*, 1997) und somit zur Apoptose der Zelle (CHEN *et al.*, 1999). Der aktive Metabolit SN-38 besitzt eine 1000-fach höhere inhibitorische Wirkung auf die Topoisomerase I als Irinotecan (KAWATO *et al.*, 1991).

1.2.5 Kombinierte Regime

Wo vor einigen Jahren noch einzelne Chemotherapeutika allein Anwendung fanden, gibt es mittlerweile eine Vielzahl unterschiedlichster Therapieregime, die in Kombination die Wirksamkeit bei verschiedensten Tumorentitäten im Vergleich zur Monotherapie erhöhen. So werden im Falle des metastasierten KRK (mKRK) fluoropyrimidinbasierte Kombinationsregime mit Oxaliplatin und/oder Irinotecan in Form der Standardtherapieschemata FOLFOX 4 und FOLFIRI eingesetzt, wobei die Namensgebung sich auf die jeweiligen Wirkstoffkombinationen bezieht: OX = Oxaliplatin, IRI = Irinotecan, F = Fluorouracil, FOL = Folsäure. FOLFOX 4 gilt mittlerweile als Standard für die adjuvante Chemotherapie bei Darmkrebs und findet neben FOLFIRI ebenfalls Anwendung in der Palliativtherapie des mKRK. Tabelle 1 und 2 geben einen Überblick über die Verabreichungsschemata beider Chemotherapeutikaregime. Nach der Verabreichung gelten jeweils zwölf Tage als Erholungsphase bevor ein erneuter Zyklus beginnt.

Tab. 1: FOLFOX4-Verabreichungsschema.

Wirkstoff	Dosierung	Applikationsart	Tag
Folinsäure	200 mg/m ²	Infusion (2 h)	Tag 1 + 2
5-Fluorouracil	400 mg/m ²	i. v. (Bolus)	Tag 1 + 2
5-Fluorouracil	600 mg/m ²	Infusion (22 h)	Tag 1 + 2
Oxaliplatin	85 mg/m ²	Infusion (2-(6) h)	Tag 1

Tab. 2: FOLFIRI-Verabreichungsschema.

Wirkstoff	Dosierung	Applikationsart	Tag
Folinsäure	200 mg/m ²	Infusion (2 h)	Tag 1 + 2
5-Fluorouracil	400 mg/m ²	i. v. (Bolus)	Tag 1 + 2
5-Fluorouracil	600 mg/m ²	Infusion (22 h)	Tag 1 + 2
Irinotecan	180 mg/m ²	Infusion (1,5 h)	Tag 1

Alle großen Phase-III-Studien der letzten Jahre zeigten eine Verbesserung der Ansprechraten und des progressionsfreien Überlebens unter der Verwendung der Kombinationschemotherapie (5-FU + Oxaliplatin bzw. 5-FU + Irinotecan) im Vergleich zur Monotherapie bestehend aus Fluoropyridin (DE GRAMONT *et al.*, 2000; KOHNE *et al.*, 2005).

In zwei der drei großen Irinotecan-basierten Behandlungsstudien stellte sich zudem ein signifikanter Überlebensvorteil unter der Kombinationschemotherapie gegenüber der flouopyridinbasierten Monotherapie heraus (DOUILLARD *et al.*, 2000; SALTZ *et al.*, 2000).

Wo früher bei Patienten im Stadium IV ausschließlich ein palliatives Therapieziel galt, ist deutlich geworden, dass bei 25 % dieser Patienten mit synchron hepatisch metastasiertem kolorektalem Karzinom ein kuratives Potential besteht.

Wie bereits unter Kap. 1.2.3 beschrieben, kann die simultane Gabe eines Chemotherapeutikums bzw. mehrerer Chemotherapeutika in Kombination, zusätzlich zu einer Strahlentherapie, eine Verstärkung des zytotoxischen Effektes auf Tumorzellen zur Folge haben. Dies aufgreifend, findet im Rahmen des kolorektalen Karzinoms die Radiochemotherapie Anwendung beim Rektumkarzinom in den UICC-Stadien II und III. Die

neoadjuvante als auch die adjuvante Radiochemotherapie sollen nach den aktuellen S3-Leitlinien bislang ausschließlich eine Fluorouracil-gestützte Monochemotherapie enthalten. Zur Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms haben sich bereits Kombinations-Chemotherapieregime bestehend aus Oxaliplatin in Addition mit 5-FU bzw. Irinotecan zuzüglich 5-FU klinisch etabliert, sodass nun auch ein Einsatz der beiden Chemotherapeutika Oxaliplatin und Irinotecan kombiniert mit der leitliniengerechten Monochemotherapie bestehend aus 5-FU als weiterer Zusatz zur Bestrahlung im Rahmen der Radiochemotherapie des Rektumkarzinoms denkbar wäre und zu diskutieren ist. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Oxaliplatin bzw. Irinotecan in Kombination mit ionisierender Strahlung mit und ohne 5-FU-Einfluss präklinisch untersucht.

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Bislang gilt im Falle des kolorektalen Karzinoms (KRK) UICC-Stadium II und III die kombinierte Fluorouracil-gestützte Radiochemotherapie als Standard der adjuvanten Behandlung. Kombinationschemotherapieregime ohne gleichzeitige Radiatio werden derzeit erst im Falle eines metastasierten kolorektalen Karzinoms (mKRK) ab UICC-Stadium IV angewandt. Im Falle des Kolonkarzinoms findet eine Bestrahlung nur in Ausnahmefällen statt. Die kombinierte Anwendung von Chemotherapeutika nach dem FOLFOX-, FOLFIRI- sowie FOLFOXIRI-Schema erfolgt ausschließlich beim Vorliegen eines mKRK.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels *In-vitro*-Studien die Wirkung von Oxaliplatin bzw. Irinotecan unter ionisierender Strahlung mit und ohne 5-FU auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Anhand dieser Experimente wurden Aussagen zu ggf. signifikanten Unterschieden des bereits in mehreren Studien beschriebenen strahlensensibilisierenden Effektes von Oxaliplatin bzw. Irinotecan, jeweils +/- 5-FU, erwartet, um eine Aussage über die Sinnhaftigkeit einer zukünftigen kombinierten Chemotherapeutikaaanwendung zzgl. zur Radiatio machen zu können. Hierfür wurde die Wirkung oben genannter Wirkstoffe einzeln sowie als Kombinationswirkstoffregime Oxaliplatin + 5-FU bzw. Irinotecan + 5-FU auf die Darmkrebszelllinie HT29 unabhängig und in Kombination mit Bestrahlungsdosen von 2 - 8 Gy untersucht. Zur Beurteilung des Wachstums der Tumorzellpopulation fanden Wachstumsversuche Anwendung. Gleichzeitig wurde das klonogene Überleben in Koloniebildungstests untersucht. Zytotoxizitäts- und Proliferationstests kamen ebenso zum Einsatz wie immunhistochemische Untersuchungen zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen im Rahmen des γ -H2AX-Testes.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeitstechniken in der Zellkultur

2.1.1 HT29-Zellen

Die aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig stammenden und für die Versuche verwendeten HT29-Zellen (Abb. 2) besitzen die Fähigkeit zum kontinuierlich adhären, also der Matrix anhaftenden, Wachstum. Isoliert wurde die HT29-Zelllinie 1964 von Fogh und Trempe aus dem Epithel eines kolorektalen Adenokarzinoms (FOGH *et al.*, 1980). Die Tumorzellen besitzen durch eine fehlende Kontakthemmung die Eigenschaft, bei längerer Kultivierung in mehreren Schichten als Multilayer proliferieren zu können. Aus diesem Grunde wurde für die experimentellen Ansätze Zellen mit einer unter 80 %igen Konfluenz gewählt.

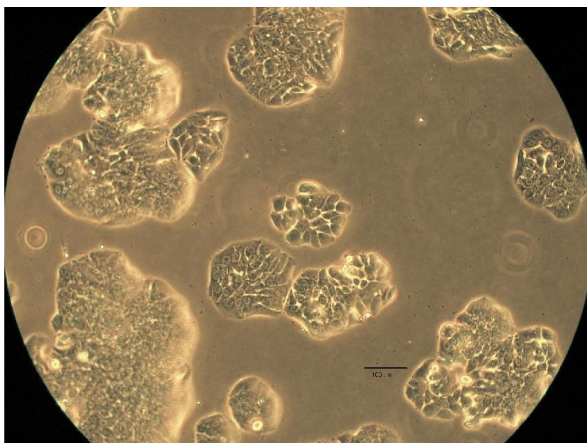


Abb. 2: Mikroskopische Darstellung der HT29-Zellen. Subkultivierung in T25-Kulturflaschen. Kulturmedium entfernt, mit 3 ml PBS befeuchtet. 100x-Vergrößerung mit Phasenkontrastmikroskop.

2.1.2 Ausfrieren der Tumorzellen

Gelagert wurden die HT29-Zellen in der Tiefkühltruhe bei -152°C . Konserviert wurden die Tumorzellen in einem aus 70 % Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20 % Fetal Bovine Serum (FBS) bestehenden Kryomedium. Das verwendete DMSO als penetrierendes Gefrierschutzmittel verhindert dabei die Kristallbildung des Mediums. Dieser kryoprotektive Effekt auf die Zellen beruht dabei auf der vollständigen Penetration von DMSO in die Zelle. Folglich kann die osmotische

Zelldehydrierung verhindert werden. Zum Ausfrieren wurden die in Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen zügig im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, unter der Sterilbank in ein Falconröhrchen überführt und schonend mit vorgewärmtem FBS-enthaltendem Kulturmedium verdünnt. Anschließend wurden die HT29-Zellen bei 1250 rpm über 5 min zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml frischem FBS-haltigem Kulturmedium gelöst. Es folgte die Einsaat in zwei Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm². Danach erfolgte die Inkubation der HT29-Zellen für 24 h im Begasungsbrutschrank bei einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C, gefolgt von einem vollständigen Mediumwechsel nach 24 h zur Entfernung abgestorbener Zellen und des verbliebenen DMSO.

2.1.3 Tumorzellkultivierung

Zur Kultivierung der für sämtliche Versuche der Arbeit genutzten HT29-Zellen fanden je nach benötigter Zellzahl Konzentrationen von 1×10^6 , $0,5 \times 10^6$, $0,25 \times 10^6$ und $0,125 \times 10^6$ Zellen/25 cm² Kulturflaschen Anwendung. Inkubiert wurden die Zellen bei 37 °C im Begasungsbrutschrank bei 5 % CO₂ in DMEM, angereichert mit 10 % FBS sowie 1 % Penicillin/Streptomycin. Wie bereits zuvor erwähnt, wurden alle experimentellen Untersuchungen mit Zellen durchgeführt, die ≤ 80 % konfluent waren. Vor Erreichen dieser Zelldichte erfolgte die Passagierung. Dafür wurde der Zellrasen einmalig mit 4 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach kurzer Einwirkzeit von etwa 30 sec zur Reinigung der Zellkultur wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und anschließend mit 2 ml 0,05 %igem Trypsin/EDTA für 5 min im Begasungsbrutschrank bei 37 °C inkubiert. Aufgrund der proteolytischen Wirkung des Trypsins, welches als Protease im Verdauungstrakt vorkommt, lösen sich die adhärenen Zellen vom Flaschenboden und liegen danach vereinzelt vor. Grund dafür ist die Spaltung extrazellulärer Proteine, die Bestandteil von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen sind (POLAK-CHARCON & BEN-SHAUL, 1979). EDTA (Ethylendiamintetraacetat) als Komplexbildner unterstützt die beiden oben beschriebenen Prozesse durch die Eigenschaft, zweiwertige Kationen, wie Ca²⁺, binden zu können. Gleichzeitig wirkt EDTA stabilisierend auf Membranproteine und hemmt Adhäsionsmoleküle reversibel. Nach erfolgter Inkubation mit Trypsin/EDTA wurde unter Verwendung des Lichtmikroskops die erfolgreiche Ablösung der Zellen vom Flaschenboden kontrolliert und anschließend die Reaktion mit 8 ml FBS-haltigem Medium zum Stillstand gebracht. Zudem wurden die Zellen mehrmals durchmischt, mit dem Ziel noch

zusammenheftende Zellen voneinander zu lösen. Es folgte die Überführung der Zellsuspension in ein 50 ml-Falconröhrchen und dessen fünfminütige Zentrifugation bei 1250 rpm und 24 °C. Nachfolgend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, das verbliebene Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Medium gelöst und zusätzlich mehrmals resuspendiert um die Zellen zu vereinzeln. Im nächsten Schritt wurde die Zellzahl, wie unter Abschnitt 2.1.4 beschrieben, ermittelt. Entsprechend der gewählten, oben genannten Zelldichte erfolgte anschließend die Einsaat der Zellen in 5 ml Medium enthaltende T₂₅-Flaschen.

2.1.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Z2-Coulter-Counters der Firma Beckmann Coulter (Krefeld, Deutschland) bestimmt. Zur Durchführung wurde die jeweilige Zellsuspension gut resuspendiert und im Anschluss 1:50 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt. In Anlehnung an die Tumorzellgröße wurde die zu zählende Zell- bzw. Partikelgröße am Gerät manuell auf 8 - 30 µM eingestellt. Nach erfolgter Reinigung der Kapillare mit destilliertem Wasser wurde das Coulter-Gefäß mit dem zu messenden Inhalt auf der dafür vorgesehenen Stelle des Gerätes platziert und die Kapillare eingetaucht. Durch das Ansaugen passierten die Zellen (elektrisch nicht leitende Teilchen) die Kapillaröffnung. Auf zwei gegenüberliegenden Seiten dieser Öffnung sind Elektroden befestigt. Durch die Widerstands- bzw. Leitfähigkeitsänderung im Bereich der Kapillaröffnung bei Einstrom der Zellen kann so ein Strom- oder Spannungsimpuls gemessen werden. Mit Hilfe der Frequenz dieser Änderung kann die Zellzahl und unter Berücksichtigung der Amplitude die Zellgröße bestimmt werden. Angegeben wurde die vom Z2-Coulter-Counter ermittelte Hochrechnung als Zellzahl pro ml.

2.2 Wirkstoffe

2.2.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-Fluorouracil gehört zur Gruppe der Antimetabolite. Als sogenanntes Pyrimidinanalogon wird es als „falsches Substrat“ bei der Replikation in die RNA/DNA einer Zelle eingebaut. Von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH in einer Braunflasche geliefert, wurde das pulverförmige Agens bei 2 - 8 °C im Kühlschrank gelagert. 5-FU besitzt ein Molekulargewicht von 130,08 g/mol und die Summenformel C₄H₃FN₂O₂.

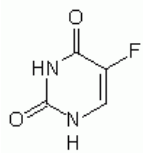


Abb. 3: Strukturformel von 5-Fluorouracil.

2.2.2 Oxaliplatin

Die verwendete zytostatisch wirkende Substanz Oxaliplatin (Abb. 3) wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) in einer Braunflasche geliefert. Dabei lag Oxaliplatin in Pulverform vor. Die Lagerung des dicht verschlossenen Behältnisses erfolgte nach Angaben des Herstellers im Kühlschrank bei 2 - 8 °C. In Deutschland wird Oxaliplatin unter den Handelsnamen Bendaplatin®, Croloxat®, Eloxatin®, Medoxa®, sowie diverser anderer Generika vertrieben. Der antineoplastische Wirkstoff besitzt eine molekulare Masse von 397,29 g/mol und die Summenformel $C_8H_{14}N_2O_4Pt$. Das Ansetzen der Stammlösung (5 mM) erfolgte wie unter 2.2.4 beschrieben mit Aqua ad iniectabilia. Die aliquotierte und im Tiefkühlschrank gelagerte Stammlösung wurde kurz vor der Wirkstoffzugabe je nach gewünschter Konzentration mit Aqua ad iniectabilia verdünnt (siehe Tab. 3 und 4).

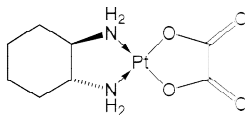


Abb. 4: Strukturformel von Oxaliplatin.

2.2.3 Irinotecan Monohydrochlorid (Irinotecan HCL)

Irinotecan ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Topoisomerase-I-Inhibitoren. Produziert und geliefert wurde die pulverförmige Substanz, als Irinotecan-Monohydrochlorid (Abb. 4) mit der Summenformel $C_{33}H_{38}N_4O_6-HCl$, von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Das Molekulargewicht von Irinotecan HCL beträgt 623,14 g/mol. Aufbewahrt wurde das weiße Plastikfläschen entsprechend dem Sicherheitsdatenblatt des Herstellers bei 2 - 8 °C im Kühlschrank.

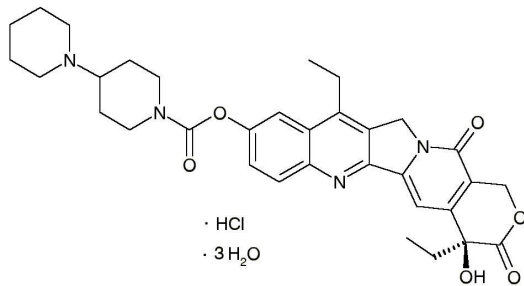


Abb. 5: Strukturformel von Irinotecan-Monohydrochlorid.

2.2.4 Ansetzen der Stammlösungen (SL) und der Verdünnungsreihen

Alle drei verwendeten Wirkstoffe lagen in Pulverform vor. Zur Herstellung der 5 mM Stammlösung wurde die entsprechende Menge an Wirkstoff abgewogen.

Oxaliplatin:	1 M = 397,29 g/ml → 5 mM = 1,98 mg/ml
Irinotecan HCL:	1 M = 623,14 g/ml → 5 mM = 3,12 mg/ml
5-FU:	1 M = 130,08 g/ml → 5 mM = 0,65 mg/ml

Anschließend erfolgte die Lösung des Pulvers mit Hilfe des Vortexers in vorher kurzzeitig erwärmtem Aqua ad iniectabilia (B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Um Schaumbildung zu vermeiden wurde hierfür eine niedrige Geschwindigkeitsstufe gewählt. Erst nach vollständigem Auflösen des Pulvers wurde die Stammlösung in Eppendorfgläser alliquotiert und bei -18 °C im Gefrierschrank gelagert. Zur Durchführung der Versuche wurde die Stammlösung kurzzeitig im Wasserbad erwärmt, vorsichtig geschwenkt und die entsprechende Wirkstoffmenge den Tumorzellen zugegeben. Zum Erhalt der Wirkstoffkonzentrationen 20 µM, 10 µM, 5 µM und 2 µM wurde die 5 mM Stammlösung der Wirkstoffzugabe vorausgehend mit Aqua ad iniectabilia verdünnt. Die jeweiligen Wirkstoffmengen wurden je Experiment mit Hilfe eines Verdünnungskreuzes bestimmt (Tab. 3 und 4).

Tab. 3: Übersicht der pipettierten Wirkstoffmengen je Konzentration für die Wachstumskurven, bestimmt mittels Verdünnungskreuz.

Finale Wirkstoffkonzentration im Ansatz	Pipettiertes Volumen pro ml Kulturmedium (Verdünnung der Stammlösung) für die Wachstumskurve
2 µM	4 µl (SL 1:10)
5 µM	10 µl (SL 1:10)
10 µM	20 µl (SL 1:10)
20 µM	40 µl (SL 1:10)
50 µM	10 µl
100 µM	20 µl
200 µM	40 µl

Tab. 4: Übersicht der pipettierten Wirkstoffmengen je Konzentration für die Koloniebildungstests, XTT-Tests, BrdU-Tests und den γ -H2AX-Test, bestimmt mittels Verdünnungskreuz.

Finale Wirkstoffkonzentration	Pipettiertes Volumen pro ml Kulturmedium (Verdünnung der Stammlösung)			
	Koloniebildungstest	XTT-Test (EZ4U)	BrdU-Test	γ -H2AX-Test
20 µM Oxaliplatin	200 µl (SL 1:10)	80 µl (SL 1:100)	80 µl (SL 1:100)	40 µl (SL 1:10)
20 µM Irinotecan	200 µl (SL 1:10)	80 µl (SL 1:100)	80 µl (SL 1:100)	40 µl (SL 1:10)
2 µM 5-FU	20 µl (SL 1:10)	8 µl (SL 1:100)	8 µl (SL 1:100)	4 µl (SL 1:10)
Endvolumen (Wirkstoff + Medium)	5000 µl/T25-Flasche	200 µl/Well	200 µl/Well	1000 µl/Kammer

2.3 Bestrahlung mittels Linearbeschleuniger

Zur Bestrahlung der Tumorzellen kam der Linearbeschleuniger Siemens Oncor Expression (Healthcare Sector Siemens AG, Erlangen) zum Einsatz. Die HT29-Zellen befanden sich während der Bestrahlung in Zellkulturflaschen (Koloniebildungstest), Wellplatten (Wachstumskurven, EZ4U-Zytotoxizitätstest, BrdU-Zellproliferationstest) oder auf Objektträgern (Immunhistochemische Untersuchung). Für die Versuche wurden

Strahlungsdosen von 0 Gy (Kontrolle), 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy verwendet. Sie ergaben sich durch eine unterschiedlich lange Bestrahlungsdauer. Die Dosisleistung lag bei 3,75 Gy/min.

Ein Linearbeschleuniger besteht aus einem Injektor, einem bei 3 GHz schwingenden elektrischen Hochfrequenzfeld und einem aus wassergekühltem Metall gebildeten Bremsstrahltarget. Der Injektor erzeugt negativ geladene Elektronen, welche mit Hilfe des elektrischen Hochfrequenzfeldes auf einer linearen Strecke beschleunigt werden. Am Ende dieser Strecke werden die ultraschnellen Teilchen durch ihr Auftreffen auf das Wolframtarget abrupt abgebremst. Dabei entstehen durch Energieumwandlungsprozesse Photonen (ultraharte Röntgenstrahlung; SAUER, 1998) mit einer Energie von 6 MeV (feststehende Maximalenergie). Durch ein aus Blei bestehendes Kollimatorsystem wurde das Strahlenbündel auf die gewünschte Feldgröße begrenzt, in der sich eine Plexiglasscheibe mit den zu bestrahlenden Tumorzellen befand.

2.4 Wachstumskurven

2.4.1 Das Testprinzip

Die Durchführung von Wachstumskurven diente der Beobachtung des Wachstums von Zellpopulationen unter bestimmten Bedingungen. Der charakteristische Wachstumsverlauf einer spezifischen Zelllinie kann unter nativen Bedingungen (Abschnitt 3.1.1), d. h. ohne die Zugabe von Agenzien untersucht werden. Ebenso ist es möglich, einer Zellkultur nach ihrer Subkultivierung verschiedene Substanzen zuzusetzen und unter diesem Einfluss deren Wachstum zu analysieren.

2.4.2 Allgemeine Durchführung

Für die Wachstumsversuche wurden Zellkulturen verwendet, deren Konfluenz bei weniger als 80 % lag. Nach dem Lösen der Zellen vom Flaschenboden mittels Trypsin/EDTA wurde mit Hilfe des Z2-Coulter-Counters die Zellzahl bestimmt (Abschnitt 2.1.4). Es folgte die Einsaat der Tumorzellen in 24er Wellplatten, mit einer Fläche von 1,9 cm² je Well. Bei der nativen Wachstumskurve ohne Wirkstoffzugabe fanden die Zelldichten 5 x 10³, 1 x 10⁴ und 2 x 10⁴ Zellen/Well Anwendung. Die native Wachstumskurve umfasste sieben Zähltag. Pro Tag wurden jeweils drei Wells je Zellzahl bestimmt. Für die Versuchsansätze mit Wirkstoffzugabe

wurden 1×10^4 Zellen/Well eingesät, da sich diese Zelldichte im Vorfeld als vorteilhaft erwiesen hatte. Inkubiert wurden die Zellen in 1 ml Medium (ggf. inklusive Wirkstoff). Erfolgte eine Wirkstoffzugabe, so fand diese 24 h nach Einsaat statt.

Zur Auswertung und graphischen Darstellung aller durchgeführten Versuche dieser Arbeit wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft, Redmond/Washington, USA) verwendet. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Tests.

2.4.3 Wachstumskurven mit einmaliger Wirkstoffzugabe von 5-FU, Oxaliplatin oder Irinotecan

Wie in den Vorversuchen der nativen Wachstumskurve ermittelt, wurde eine Zellzahl von 1×10^4 Zellen/Well in fünf 24er-Wellplatten ausgesät. 5-FU, Oxaliplatin bzw. Irinotecan wurden dabei jeweils in Konzentrationen von 0 μM (Kontrolle), 2 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 50 μM , 100 μM und 200 μM getestet und als Triplikat ausgezählt. Für die Wachstumskurven wurde eine Laufzeit von fünf Zähltagen gewählt. Am Tag 0 erfolgte die Einsaat der 1×10^4 Zellen/Well nach Abtrypsinierung und Ermittlung der Zellzahl mittels Z2-Coulter-Counter. Nach einer Inkubationszeit von 24 h (Tag 0) wurde der Wirkstoff in der entsprechenden Konzentration zugesetzt. Zuvor wurde die entsprechende Menge an Medium, äquivalent der Wirkstoffmenge, die im Anschluss zugesetzt wurde, abgenommen. Nach der Zugabe von 5-FU fand während des gesamten Versuches kein Mediumwechsel statt. Der Mediumwechsel beim Irinotecan-Ansatz erfolgte nach einer Inkubationszeit von 1,5 h, für den Oxaliplatin-Ansatz 2 h nach Wirkstoffzugabe. Über vier weitere Tage wurde dann die Zellzahl bestimmt (siehe Abb. 6). Die Zellzahlbestimmung erfolgte dabei wie unter Absatz 2.1.4 beschrieben.

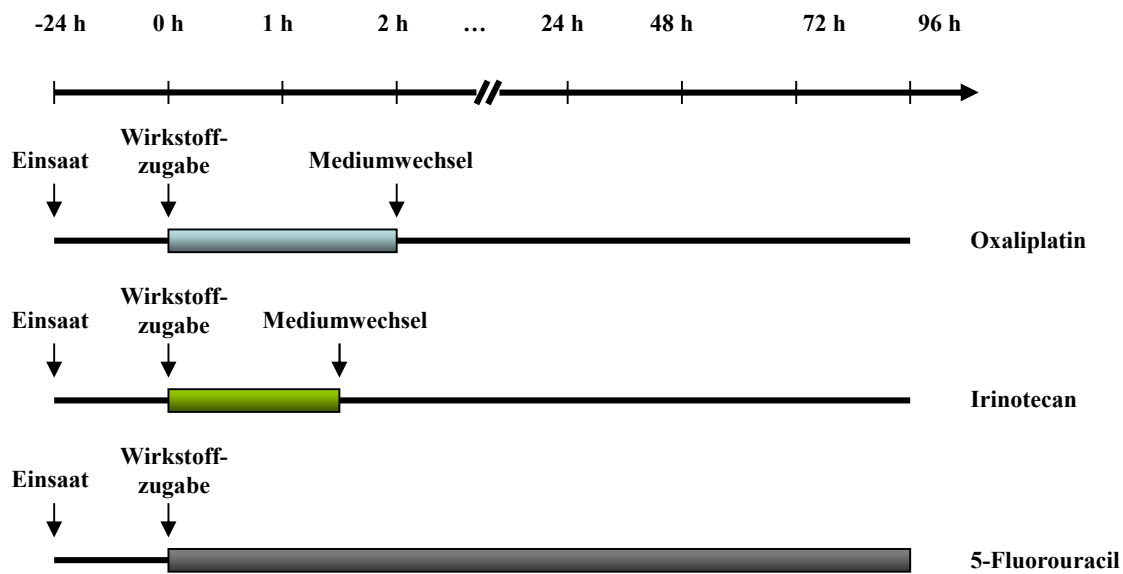


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der Wachstumskurven mit den verwendeten Wirkstoffen, sowie den Einsaat-, Zugabe- und Inkubationszeiten (Skizze in Anlehnung an KJELLSTRÖM *et al.*, 2005).

2.5 Koloniebildungstests (KBT)

2.5.1 Das Testprinzip

Mit Hilfe von Koloniebildungstests kann das klonogene Überleben nach einem toxischen Ereignis, z. B. nach Chemotherapeutika-Gabe, Bestrahlung bzw. anderen wachstumshemmenden Faktoren bestimmt werden (PUCK & MARCUS, 1956). Dieser Überlebenstest gilt derzeit als methodischer Goldstandard für derartige *In-vitro*-Untersuchungen in der Strahlenbiologie.

2.5.2 Allgemeine Durchführung

Zur Auswertung der Tests zum klonogenen Überleben ist die Berechnung der Plating Efficiency bzw. Plattiereffizienz (PE) und der Überlebensfraktion notwendig.

Die PE ergibt sich dabei aus der Anzahl der Zellen (Klone), die fähig sind innerhalb eines bestimmten Inkubationszeitraumes eine Kolonie zu bilden. Eine Kolonie ist mit dem bloßen Auge sichtbar und muss aus mindestens 50 Zellen bestehen, um als solche gewertet zu werden. Die PE ist ein Maß für das Zellüberleben und wird wie folgt berechnet:

$$PE = \frac{\text{Anzahl der gezählten Kolonien}}{\text{Anzahl der eingesäten Zellen pro Flasche}}$$

Mit Hilfe der PE lässt sich die Überlebensfraktion für eine bestimmte Bestrahlungsdosis und Wirkstoffkonzentration ermitteln.

$$\text{Überlebensfraktion} = \frac{PE \text{ mit Radiatio}}{PE \text{ ohne Radiatio}}$$

Daraus ergibt sich eine Überlebensfraktion der Kontrolle von 1 oder 100 %. Halblogarithmisch in einem Diagramm aufgetragen entsteht so eine Zellüberlebenskurve, die eine Dosis-Effekt-Beziehung darstellt.

Der allgemeine Aufbau der Koloniebildungstests ist nachfolgend in Abb. 7 dargestellt.

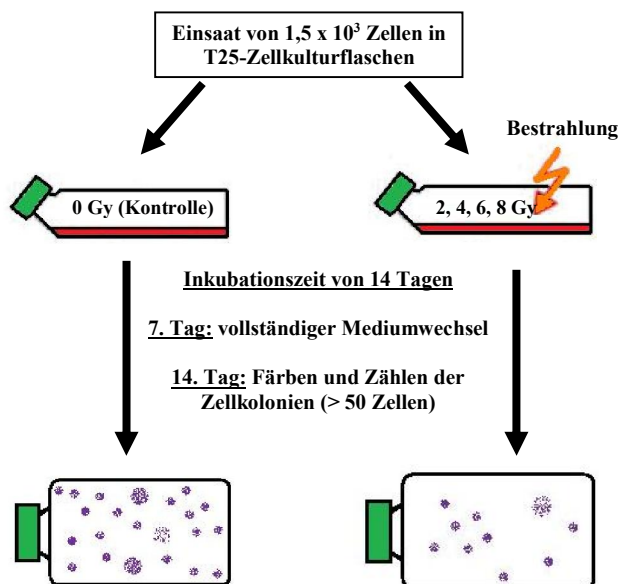


Abb. 7: Allgemeiner Aufbau der Koloniebildungstests, die einzelnen Wirkstoffregime und deren Zugabe- und Inkubationszeiten vernachlässigend.

Aus den Wachstumskurven hervorgegangen, wurden sowohl bei Oxaliplatin als auch bei Irinotecan Konzentrationen in Höhe von 20 µM und 50 µM im Koloniebildungstest untersucht. Die Entscheidung fiel auf eine 20 µM-Konzentration. Bei 5-FU wurde eine

Konzentration von 2 μM sowie 5 μM getestet. Für alle nachfolgenden Koloniebildungstests wurde die 2 μM -Konzentration präferiert, da ihre proliferationshemmende Wirkung nicht so stark ausgeprägt war, dass durch eine zusätzliche Bestrahlung nur noch wenige bis gar keine Zellen überleben könnten.

2.5.3 Koloniebildungstests mit 5-FU-, Oxaliplatin- und Irinotecan-Zugabe

Für alle durchgeführten Koloniebildungstests wurden fünf Wirkstoffregime verwendet, die jeweils bei 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy und 8 Gy bestrahlt wurden und bei 0 Gy (Kontrolle) unbestrahlt blieben (Abb. 8). Zusätzlich wurde jeweils ein Kontrollansatz ohne Wirkstoffzugabe mitgeführt. Alle Ansätze erfolgten als Duplikate.

Untersucht wurde der Einfluss folgender Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen:

- 1) 20 μM Oxaliplatin + 2 μM 5-FU
- 2) 20 μM Oxaliplatin
- 3) 20 μM Irinotecan + 2 μM 5-FU
- 4) 20 μM Irinotecan
- 5) 2 μM 5-FU

Die einzelnen Wirkstoffregime sind in nachfolgender Abb. 8 aufgeführt.

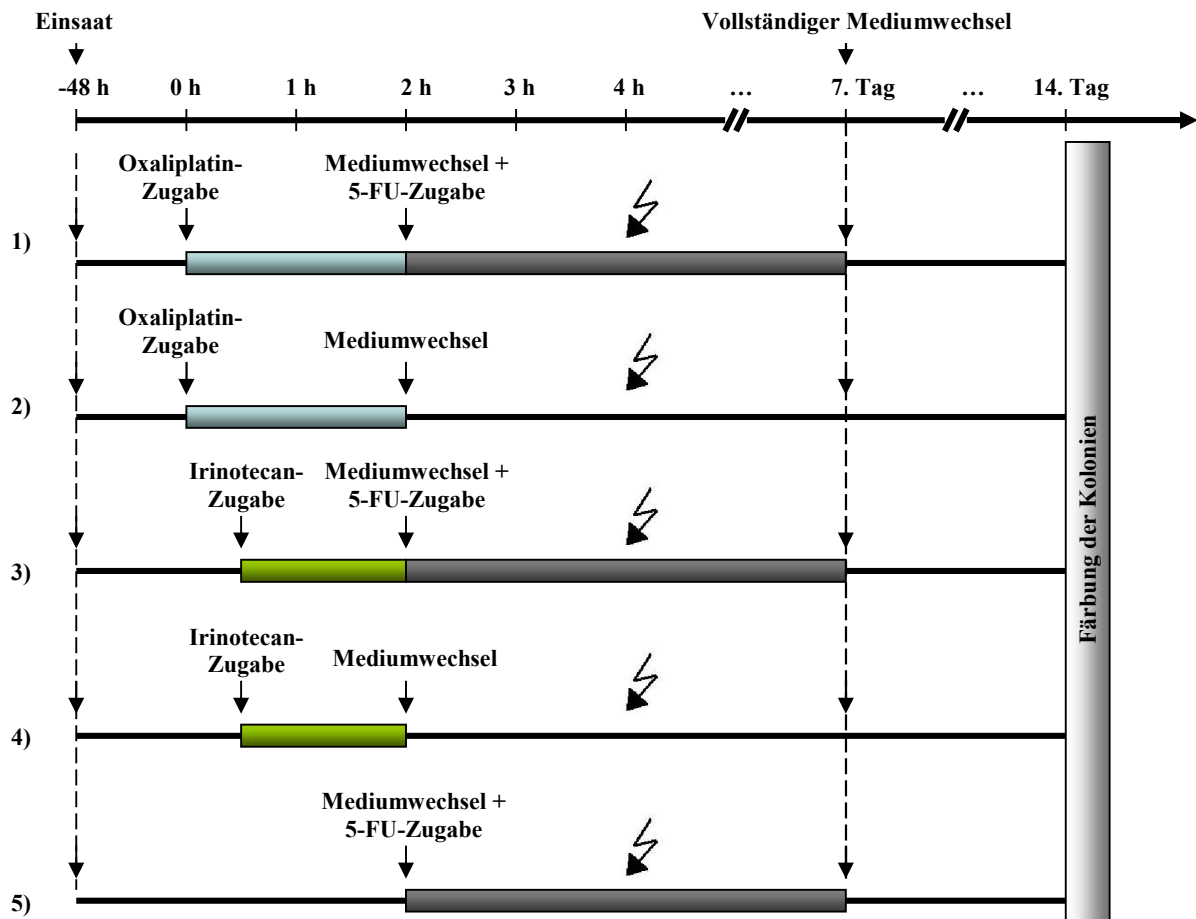


Abb. 8: Schematische Darstellung des Koloniebildungstest-Versuchsaufbaus mit den verwendeten Wirkstoffregimen, dem Zeitpunkt von Einsaat, Bestrahlung, Mediumwechsel und Auswertung, sowie Zugabe- und Inkubationszeiten (Skizze in Anlehnung an KJELLSTRÖM *et al.*, 2005).

48 h vor der Bestrahlung erfolgte wie in Abb. 8 skizziert die Einsaat von $1,5 \times 10^3$ Zellen/T₂₅-Flasche. Analog zur klinischen Anwendung erfolgte am Tag 2, 4 h vor der Bestrahlung die Zugabe von Oxaliplatin, 3,5 h vor der Bestrahlung die Irinotecan-Zugabe. Nach einer Inkubationszeit von 2 h für Oxaliplatin und 1,5 h für Irinotecan wurde 2 h vor der Bestrahlung das Medium vollständig gewechselt und gleichzeitig 5-FU hinzugegeben. Erst am Tag 7 erfolgte ein kompletter Mediumwechsel. Die Fixierung und Färbung der gebildeten Kolonien wurde am Tag 14 durchgeführt. Dafür wurden die Kolonien mit 70 %igem, vergälltem Ethanol fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und anschließend am Mikroskop die Anzahl der gebildeten Kolonien ausgezählt.

2.6 EZ4U-Test

2.6.1 Das Testprinzip

Mithilfe dieses Tests kann die Zytotoxizität einer Testsubstanz durch die metabolische Aktivität der verwendeten Zellen ermittelt werden. Das Testprinzip basiert darauf, dass lebende Zellen die Eigenschaft besitzen, Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate reduzieren zu können. Dies geschieht allerdings nur bei Zellen mit intakten Mitochondrien. Bei toten Zellen mit inaktiven Mitochondrien ist das intrazelluläre Enzym Succinat-Dehydrogenase nicht mehr funktionsfähig, welches für die Umwandlung der Formazanderivate verantwortlich ist. In der Folge kommt es zu einer verminderten Reduktionsrate der Testsubstanz und damit zur Abnahme der Absorption.

Beim EZ4U-Test (Biomedica Medizinprodukte GmbH KG, Wien) handelt es sich um einen Tetrazoliumreduktionstest, der sich am klassischen MTT-Test orientiert. Anders als beim MTT-Test ist das gebildete Formazan jedoch wasserlöslich und zeitaufwendige Zwischenschritte zum Lösen des Substrates können vermieden werden.

2.6.2 Allgemeine Durchführung

Angelehnt an die Koloniebildungstests wurden für die EZ4U-Tests ebenfalls fünf Wirkstoffregime zuzüglich des Kontrollansatzes untersucht (Abb. 9):

- 1) 20 μ M Oxaliplatin + 2 μ M 5-FU
- 2) 20 μ M Oxaliplatin
- 3) 20 μ M Irinotecan + 2 μ M 5-FU
- 4) 20 μ M Irinotecan
- 5) 2 μ M 5-FU

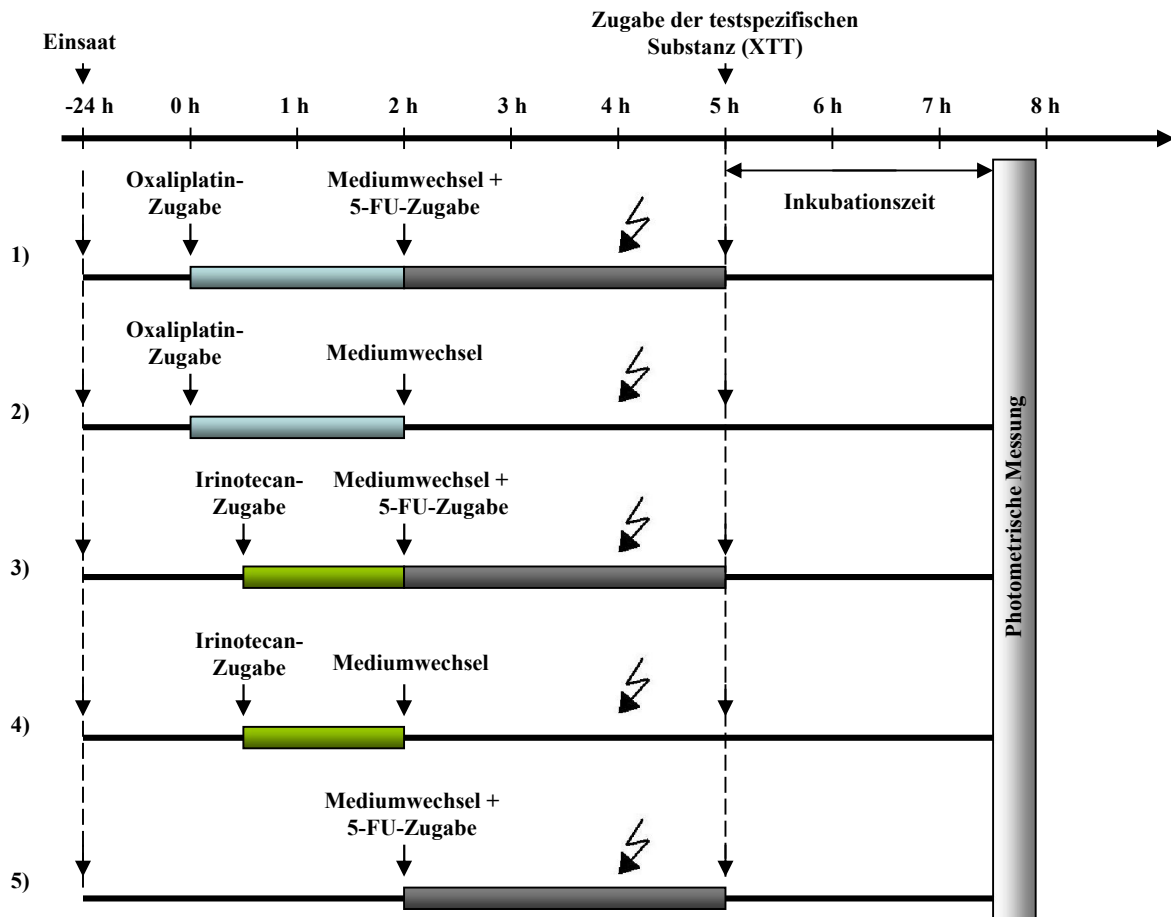


Abb. 9: Schematische Darstellung des EZAU-Versuchsaufbaus mit den verwendeten Wirkstoffregimen, dem Zeitpunkt von Einsaat, Bestrahlung, Mediumwechsel und Auswertung, sowie Zugabe- und Inkubationszeiten (Skizze in Anlehnung an KJELLSTRÖM *et al.*, 2005).

Nach der Zellzahlbestimmung erfolgte die Einsaat von 1×10^4 Zellen/Well in 96er-Wellplatten mit einem Endvolumen von $200 \mu\text{l/Well}$. Wie aus Abb. 9 zu entnehmen, erfolgten anschließende Wirkstoffzugaben und Mediumwechsel nach einem wirkstoff- und ansatzspezifischen Zeitschema. Die Bestrahlung der Zellen schloss sich bei allen Versuchsansätzen 28 h nach der Einsaat an. Die Absorptionsmessungen zur Bestimmung der metabolischen Aktivität erfolgten 1 h, 24 h bzw. 48 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt. Die Inkubationszeit nach Zugabe des testspezifischen Substrates (XTT), die zur erläuterten Farbreaktion führte, betrug jeweils 2,5 h. Während dieser Zeitspanne inkubierten die Zellen bei 37°C im Begasungsbrutschrank. Die anschließende Absorptionsmessung mittels ELISA-Reader erfolgte bei der Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

2.7 *BrdU-Test*

2.7.1 Das Testprinzip

Der BrdU-Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ist ein kolorimetrischer *In-vitro*-Zellproliferationstest. Dieser Test beruht darauf, dass während der DNA-Synthese (S-Phase des Zellzyklus) statt der Pyrimidinbase Thymidin das Pyrimidinanalogon 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) in proliferierende Zellen eingebaut wird. Somit kann das Proliferationsverhalten von Zellen in Kultur indirekt über ihre DNA-Synthese nachgewiesen werden. Das inkorporierte BrdU wird mittels ELISA mit einem spezifischen Antikörper immunologisch bestimmt. Je höher der Grad der Zellschädigung ist, desto niedriger ist die Menge an inkorporiertem BrdU in der neu synthetisierten DNA.

Die Testdurchführung erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers.

2.7.2 Allgemeine Durchführung

Analog den Koloniebildungstests wurden folgende Versuchsansätze durchgeführt (Abb. 10):

- 1) 20 μ M Oxaliplatin + 2 μ M 5-FU
- 2) 20 μ M Oxaliplatin
- 3) 20 μ M Irinotecan + 2 μ M 5-FU
- 4) 20 μ M Irinotecan
- 5) 2 μ M 5-FU

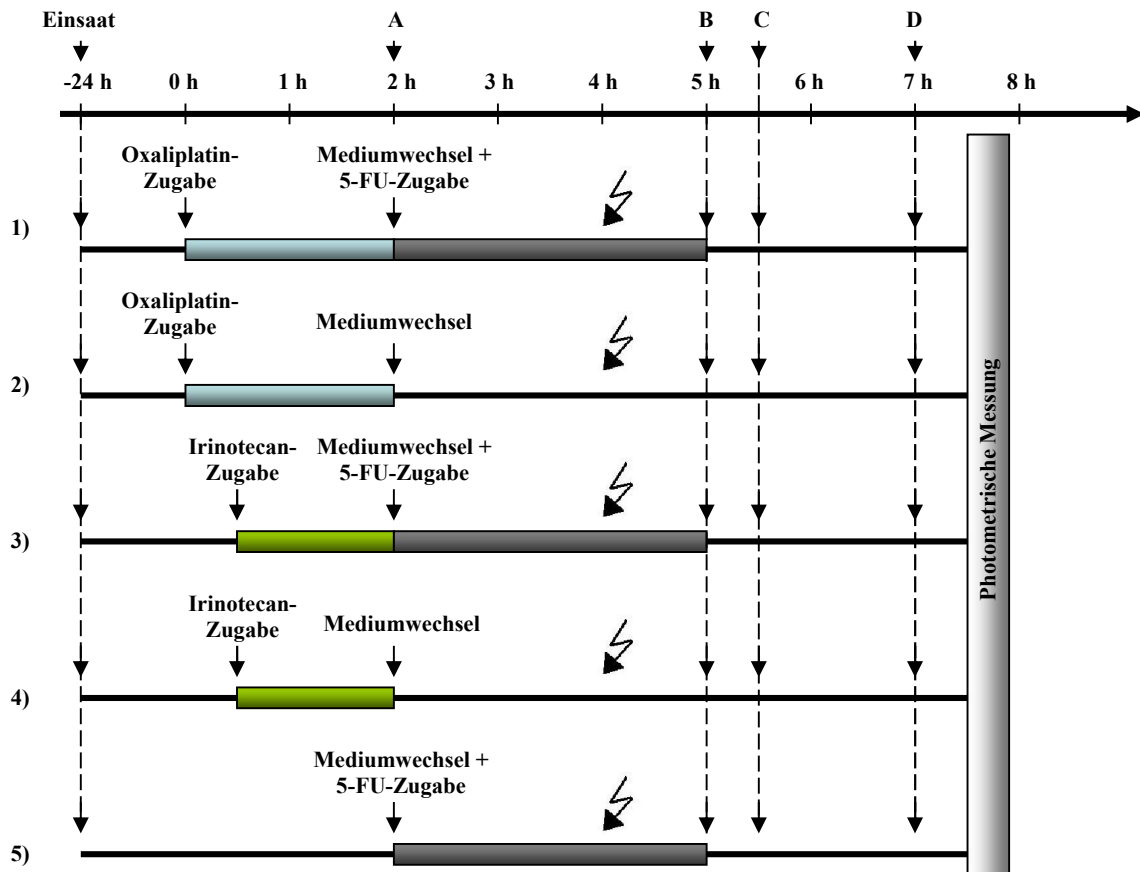


Abb. 10: Schematische Darstellung des BrdU-Versuchsaufbaus mit den verwendeten Wirkstoffregimen, dem Zeitpunkt von Einsaat, Bestrahlung, Mediumwechsel, Zugabe der BrdU-Lösung (A), Fixierung der Zellen mittels FixDenat-Lösung (B), Zugabe des BrdU-Antikörpers (C), Waschung der Zellen + Substratzugabe (D) und Auswertung, sowie Zugabe- und Inkubationszeiten (Skizze in Anlehnung an KJELLSTRÖM *et al.*, 2005).

Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, erfolgte die Einsaat der Tumorzellen in eine 96er-Lochplatte. In Vorversuchen betrug die Einsaatdichte der Zellen zunächst 1×10^3 Zellen/Well. Da die Absorptionswerte sehr niedrig waren, wurden die Folgeversuche mit 2×10^3 Zellen/Well durchgeführt. 24 h nach der Einsaat fanden die Wirkstoffzugaben und Mediumwechsel nach dem in Abb. 10 dargestellten Zeitschema statt. Die BrdU-Lösung wurde 26 h nach der Einsaat, zum Zeitpunkt des Mediumwechsels hinzugegeben (A). Jeweils 1 h, 24 h und 48 h nach der Bestrahlung erfolgte die Fixierung der Zellen (B). 30 min nach der Fixierung wurde jeweils der BrdU-Antikörper zugesetzt (C) und anschließend bei Raumtemperatur für 90 min auf den Zellen belassen. Abschließend erfolgten das Waschen und die sich anschließende Substratzugabe (D). Eine ausreichende Farbentwicklung trat nach 30 min ein und die Reaktion wurde mit $25 \mu\text{l}$ Schwefelsäure abgestoppt.

Die Absorptionsmessungen erfolgten mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm jeweils 1 h, 24 h bzw. 48 h nach der Bestrahlung. Es erfolgte eine Achtfachbestimmung je Ansatz und Versuch.

2.8 γ -H2AX-Test

2.8.1 Das Testprinzip

Durch Bestrahlung können verschiedene Typen von DNA-Schäden, wie z. B. DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt werden. Dabei handelt es sich um Brüche zwischen der Bindung des Zucker-Phosphat-Gerüsts und somit der Unterbrechung der Basenpaarung beider Stränge der DNA-Doppelhelix. Sofern die Reparatur unterbleibt, kann dies zum Untergang der Zelle führen. Bereits ein DNA-Doppelstrangbruch kann den Tod einer Zelle bewirken (OLIVE, 1998). Mit Hilfe des γ -H2AX-Assays können die DNA-Doppelstrangbrüche sichtbar gemacht werden. Zentrale Bedeutung für diesen Versuch besitzt das H2A-Histon, welches ein universeller Bestandteil des Chromatins ist und ubiquitär im Genom als Variante H2AX vorliegt. Der Versuch basiert auf der Detektion eines phosphorylierten Serin-Restes (Position 139) des H2AX-Histons (ROGAKOU *et al.*, 1998), welcher nach Erkennen eines DNA-Doppelstrangbruchs durch die Zelle entsteht.

2.8.2 Allgemeine Durchführung

Zur Einsaat der Zellen fanden Objektträger mit einer kleinen Kammer Anwendung. Die Einsaatdichte betrug 1×10^4 Zellen/ml. Das definitive Endvolumen der als Wachstumsfläche dienenden Kammer lag bei 1 ml. Nach einer Inkubationszeit von 48 h erfolgte die Wirkstoffzugabe dem Zeitschema der Koloniebildungstests entsprechend (vgl. Abb. 8). Ebenso fanden die identischen Wirkstoffregime und -konzentrationen Anwendung. Die Bestrahlung schloss sich wie bei den KBTs der Wirkstoffzugabe am gleichen Tag an. Die Fixierung der Zellen erfolgte nach unterschiedlicher Reparaturzeit, sowohl 60 min als auch 24 h nach der Bestrahlung. Nach dem Abgießen des Mediums wurden dazu die Plastikkammern zunächst vorsichtig mit Hilfe eines Schiebers vom Objektträger gelöst. Anschließend wurden die Zellen in einer Küvette mit PBS gespült, mit 2 %iger Formaldehydlösung in PBS für 15 min unter dem Abzug fixiert und im Anschluss mit PBS

gewaschen. Alle weiteren Arbeitsschritte fanden im Dunkeln statt. Um die Kernmembranen zur Vorbereitung auf die sich anschließenden Schritte zu permeabilisieren, wurden die Zellen für 5 min auf Eis mit einer 0,2 %igen TritonX®-100-Lösung in PBS und BSA behandelt. Anschließend folgte die Blockierung mit 3 %igem BSA und die Zugabe des Primärantikörpers (Tab. 5).

Tab. 5: Übersicht der für den γ -H2AX-Test verwendeten Antikörper zzgl. deren Verdünnung.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-Phospho-Histone H2AX (Ser1 39)	Alexa Fluor 594® goat antimouse IgG
Verdünnung 1:100 (PBS + 1 % BSA + 0,5 % Tween)	Verdünnung 1:600 (PBS + 1 % BSA + 0,5 % Tween)

Der Primärantikörper wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut, auf den Objektträger aufgetragen, mit einem Plastik-Deckgläschen abgedeckt und für 1 h in einer feuchten Kammer auf den Zellen belassen. Es schloss sich die dreimalige Waschung mit einer Lösung bestehend aus PBS, BSA (1 %) und Tween20 (0,5 %) an. Zeitgleich erfolgte die Vorbereitung des Sekundärantikörpers (Tab. 5), der kurz anzentrifugiert und ebenfalls auf Eis aufgetaut wurde, um ihn im nächsten Schritt auf die Zellen auftragen zu können und die Objektträger für 1 h in einer feuchten Kammer zu belassen. Entfernt wurde der Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen für je 15 min mit PBS und 0,5 %igem Tween20. Im letzten Schritt wurden 15 μ l DAPI/Antifade auf die Zellen pipettiert, der Objektträger mit einem Deckglas versehen und an den Rändern versiegelt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Abschließend wurde der Objektträger getrocknet und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag fand die mikroskopische Auswertung statt.

2.8.3 Testauswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der gefärbten Zellpräparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Im ersten Schritt wurden mit einem Ölimmersionsobjektiv bei einer 400-fachen Vergrößerung die blauen Zellkerne aufgesucht, um im zweiten Schritt die rot leuchtenden „Foci“ mit einer 1000-fachen Vergrößerung einstellen zu können. Hierfür wurden die in Tab. 6 aufgeführten Filter genutzt.

Tab. 6: Übersicht der zur Fluoreszenzmikroskopie genutzten Filter.

Markierung	Fluoreszenz	λ Anregung [nm]	λ Emission [nm]
Sekundärantikörper Alexa Fluor® 594	rot	590	617
DAPI/Antifade	blau	358	461

Bei der Auswertung wurden pro Versuchsansatz die „Foci“ von 50 Zellkernen ausgezählt. Hieraus wurde der jeweilige Mittelwert berechnet. Zur Fotodokumentation wurde zusätzlich die Kamera Kappa DX 40 C genutzt.

2.9 Verwendete Materialien, Medien, Zusätze und Geräte

Zellkulturmedien und Zusätze

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG seromed®, Berlin
Foetal Bovine Serum (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Subkultivierung und Zellzahlbestimmung

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
Phosphate buffered Saline (PBS) – Dulbecco	Biochrom AG seromed®, Berlin
Trypsin/EDTA (0,05 % und 0,25 %)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Isoton-Lösung	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld

Verbrauchsmaterial

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
Falconröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nalgene® Labware, VWR International GmbH, Darmstadt

Zellkulturflaschen (T ₂₅)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger mit Kammer (chamber slides), LAB-TEK® II	Nalge Nunc Int., Naperville, USA
Glas-Deckgläschen, 60 mm	Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig
Plastik-Deckgläschen, Thermanox®	Nalge Int. NUNC Brand Products, Rochester (NY), USA
24er/96er Wellplatten	TPP (Techno Plastic Products AG), Trasadingen, Schweiz

Wirkstoffe

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
5-Fluorouracil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Irinotecan-Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Oxaliplatin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Geräte

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
Begasungsbrutschrank I	Zapf Instruments, Sarstedt
Begasungsbrutschrank II	Varolab® GmbH, Giesen
Sterilbank	Zapf Instruments, Sarstedt
Phasenkontrast-Mikroskope Eclipse	Nikon, Düsseldorf
4er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)	Nikon, Düsseldorf
10er Objektiv (Plan Fluor 4x/0.13 PhLDL)	Nikon, Düsseldorf
Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Tiefkühltruhe Ultra Flow	Sanyo, Ewald Innovationstechnik GmbH, Bad Nenndorf
Zentrifuge I, Hettich Universal 16 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen

Zentrifuge II, Hettich Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co KG, Tuttlingen
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Eisbad 1-6031	neolab®, Heidelberg
pH-Meter CG 841	Schott AG, Hofheim
Magnetrührer variomag®	Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG, Bonn
Waage I, sartorius BP 61 S	Sartorius AG, Göttingen
Waage II, sartorius BL 600	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Digitalcamera	Kappa DX 40C, Gleichen
Irfan View	© by irfan skiljan, 2010
ELISA-Reader, anthos zenyth 340 r	anthos Microsysteme GmbH
Multichannelpipette I, Eppendorf research 100	Eppendorf GmbH, Hamburg
Multichannelpipette II, Eppendorf reseach pro	Eppendorf GmbH, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Eclipse	Nikon, Düsseldorf

Chemikalien und Lösungen

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
1 M Schwefelsäure	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Rostock
NaCl (137 mM)	Mallinckrodt baker, Deventer, Holland
KH ₂ PO ₄ (2 mM)	Merck KGaA, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (10 mM)	Merck KGaA, Darmstadt
KCl (2,7 mM)	Merck KGaA, Darmstadt
Formaldehyd (2 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tween®20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mab, Primärantikörper (Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139))	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
Mab, Sekundärantikörper (Alexa Fluor 594)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DAPI/Antifade (0,1 µg/ml)	MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege

Lösungsmittel

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Fixierung und Färbung

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
Ethanol (70 %), vergällt	Zentralapotheke, Universitätsmedizin Rostock
Kristallviolett-Lösung (1 %)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Testkits

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Bezugsquelle:</u>
EZ4U-Zellproliferations und Zytotoxizitäts-Testkit	Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien
Cell Proliferation ELISA-Immunoassey, BrdU	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

3 Ergebnisse

3.1 Wachstum

Mittels Wachstumskurven kann das Wachstum verschiedener Zellpopulationen unter bestimmten Bedingungen beobachtet und deren charakteristische Wachstumskinetik dargestellt werden. Das Zellwachstum lässt sich i. d. R. in vier Phasen gliedern, die Lag-, Log-, Plateau- und Absterbephase. Auf diese wird im weiteren Verlauf anhand der Darstellung der Versuchsergebnisse ausführlich eingegangen.

3.1.1 Wachstum unter nativen Bedingungen

Zur Untersuchung der charakteristischen Wachstumskinetik der HT29-Zellen wurden zunächst native Wachstumskurven aufgenommen. Hierfür wurden drei verschiedene Einsaatdichten genutzt. Diese lagen bei 5×10^3 Zellen/ml, 1×10^4 Zellen/ml und 2×10^4 Zellen/ml. In Abb. 11 sind die nativen Wachstumskurven der eingesäten Zellzahlen dargestellt.

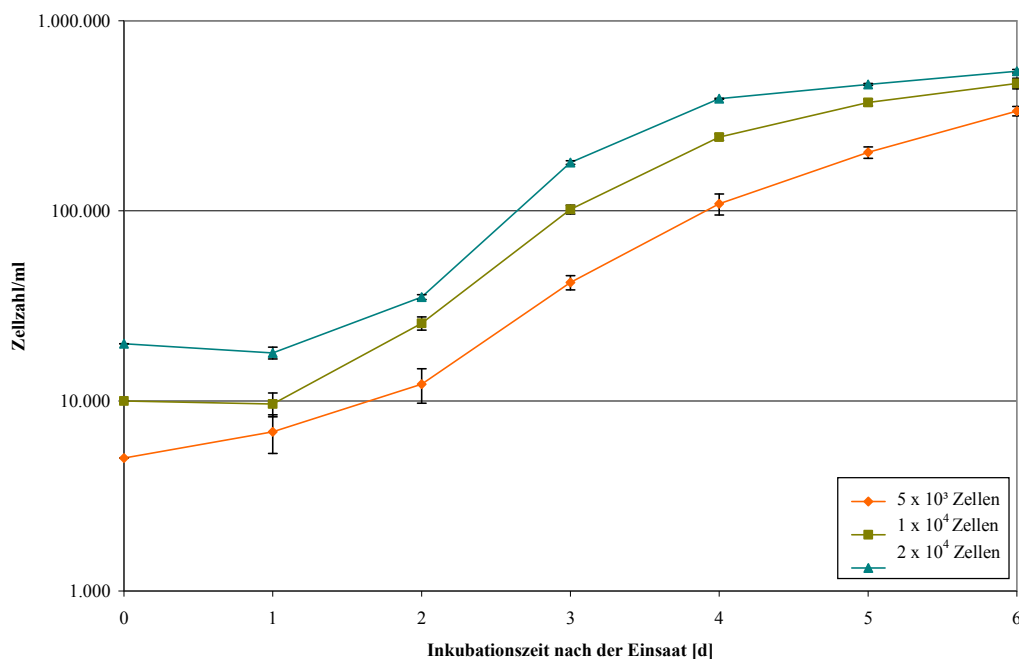


Abb. 11: Wachstum der HT29-Zellen ohne Wirkstoffzugabe, bei unterschiedlichen Einsaatdichten ohne Mediumwechsel. Dargestellt sind MW \pm SD (n = 3).

Abb. 11 sind zwei der vier Wachstumsphasen zu entnehmen. Das Zellwachstum unterteilt sich in vier charakteristische Phasen. Bei der ersten Phase handelt es sich um die sogenannte Lag- oder Latenzphase. In jener ist nur eine äußerst schwache Zellproliferation zu verzeichnen, da sich die in neues Medium überführten Zellen nach ihrer Trypsinierung erst an die nun herrschenden Umgebungsbedingungen anpassen und erneut an die Matrix anheften müssen, um sich anschließend erneut teilen zu können. Bei den HT29-Zellen war die Lag-Phase sehr gering ausgeprägt (Abb. 11). Nur bei den Einsaatdichten von 5×10^3 sowie 1×10^4 Zellen stellte sie sich bis Tag 1 dar. Im Anschluss an die Latenzphase traten die Tumorzellen in die Log-Phase ein. Dies ist die Phase des exponentiellen Wachstums, d. h. die Wachstumsrate, also die Zunahme der Zellmasse in einer bestimmten Zeit ist konstant. Für jede der drei Einsaatdichten hielt die Log-Phase bis zum 6. Tag an. Nach einer gewissen Zeit nimmt die Proliferation der Zellen charakteristischerweise wieder ab, bis die Proliferationsrate der Sterberate entspricht. Dieser Zustand ist kennzeichnend für die stationäre Phase bzw. Plateauphase, in der die Zellmasse konstant bleibt. Eingeleitet wird diese durch die Anreicherung von toxischen Abfallprodukten, oder/und den Verbrauch essentieller Nährstoffe im Medium. Diese stationäre Phase kann man durch einen Mediumwechsel im Versuchsablauf hinauszögern. Übersteigt die Sterberate die Wachstumsrate, so tritt die letzte der vier Phasen ein, die Absterbephase. Die absolute Zellzahl nimmt ab, die Zellpopulation wird kleiner. Für die HT29-Zellen konnten diese beiden charakteristischen letzten Phasen bei einer Versuchslaufzeit von sechs Zähltagen nicht nachgewiesen werden.

Es sollte Beachtung finden, dass der Zellrasen nur sehr erschwert mittels 0,25 % Trypsin/EDTA vom Flaschenboden zu lösen war und dies mit steigender Proliferation zunahm.

3.1.2 Wachstum unter Wirkstoff-Zugabe

Um den Einfluss der drei Wirkstoffe Oxaliplatin, Irinotecan sowie 5-FU auf das Proliferationsverhalten der HT29-Zellen beurteilen zu können, wurden Wachstumskurven unter Wirkstoffzugabe angefertigt. Im Vergleich mit der nativen Kontrolle konnte damit beurteilt werden, in welchem Maße das Wachstum der Zellen durch den jeweiligen Wirkstoff beeinflusst wurde. Die Zugabe der einzelnen Wirkstoffe erfolgte dabei einmalig jeweils 24 h nach der Einsaat. In Anlehnung an das klinische Procedere wurden die Zellen jeweils unterschiedlich lange mit dem jeweiligen Wirkstoff inkubiert.

3.1.2.1 Wachstum bei einmaliger 5-Fluorouracil-Zugabe

Zur Untersuchung des Zellwachstums der HT29-Zellen in Abhängigkeit von 5-FU wurden ebenfalls sieben unterschiedliche Wirkstoffkonzentrationen zzgl. des Kontrollansatzes gewählt. Die Beurteilung der spezifischen Wachstumskinetik erfolgte anhand der unter Abb. 12 dargestellten Ergebnisse. Insgesamt wurden drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

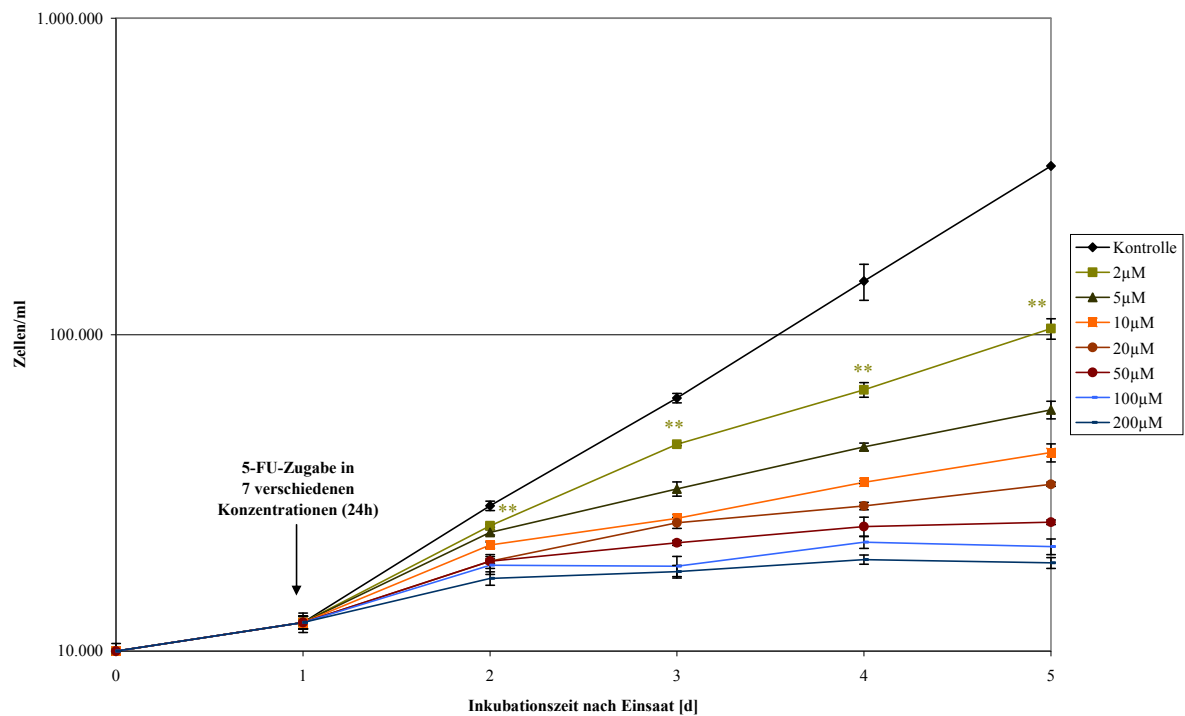


Abb. 12: Zellpopulation der HT29-Zellen bei einmaliger 5-FU-Zugabe 24 h nach der Einsaat ohne anschließenden Mediumwechsel; Einsaatdichte: 1×10^4 Zellen/Well. Dargestellt sind berechnete MW \pm SD (n = 3). ** p \leq 0,01 zur Kontrolle (in der jeweiligen Farbe der entsprechenden Wirkstoffkonzentration).

Abb. 12 ist zu entnehmen, dass die Zellpopulation abhängig von der verwendeten 5-FU-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle kontinuierlich kleiner wurde. Am vierten Tag schien sie sich für die hohen Wirkstoffkonzentrationen von 50 μM , 100 μM und 200 μM auf einen konstanten Wert einzustellen. Bereits ab dem zweiten Tag nach der Einsaat konnte eine signifikante Wachstumsverzögerung verzeichnet werden ($p \leq 0,01$), die mit fortschreitender Inkubationszeit an Ausprägung und Signifikanz zunahm.

Über die zugehörigen Zellpopulationsverdopplungszeiten unter Zugabe von 5-FU gibt Tab. 7 eine Auflistung.

Tab. 7: Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten aus den Wachstumskurven der HT29-Zellen bei einmaliger 5-FU-Zugabe, ohne Mediumwechsel. Die Einsaatdichte betrug 1×10^4 Zellen/ml; n. b. = nicht bestimmbar.

Zellpopulationsverdopplungszeiten [h] und Absterbezeiten [h]						Mittelwerte [h] (1. - 5. Tag)
	0. - 1. Tag	1. - 2. Tag	2. - 3. Tag	3. - 4. Tag	4. - 5. Tag	
Kontrolle	79,75	19,59	21,24	19,55	19,86	20,06
2μM	79,75	23,65	28,03	41,99	37,37	32,76
5μM	79,75	25,37	52,61	54,54	61,61	48,53
10μM	79,75	29,53	85,62	63,52	76,84	63,88
20μM	79,75	37,32	59,56	136,13	105,29	84,57
50μM	79,75	37,37	124,05	140,62	523,13	206,29
100μM	79,75	39,97	n. b.	95,44	521,49	n. b.
200μM	79,75	51,92	334,05	190,56	n. b.	315,28

Wie in Tab. 7 sichtbar, lag die durchschnittliche Verdopplungszeit der Kontrolle bei 20,06 h. Die Zellpopulationsverdopplungszeit, von der Einsaat bis zum ersten Tag, lag mit 79,75 h deutlich über dem sich durchschnittlich aus der nativen Wachstumskurve ergebenden Mittelwert von 20,06 h. Dementsprechend war die Zellpopulationsverdopplungszeit (Tag 0 - Tag 1) der HT29-Zellen innerhalb dieses Versuchsaufbaus um 58,7 h verlängert. Wie bereits aus der Abb. 11 zu entnehmen, ist dieses verlängerte Wachstum mit der sogenannten Lag- bzw. Latenzphase zu erklären. Innerhalb dieser Zeitspanne müssen sich die Zellen zur Vorbereitung auf eine Proliferation nach ihrer Abtrypsinierung erneut an die Matrix anheften.

3.1.2.2 Wachstum bei einmaliger Oxaliplatin-Zugabe

Für die Untersuchung der Proliferation von HT29-Zellen unter dem Einfluss der antineoplastisch wirksamen Substanz Oxaliplatin wurden sieben verschiedene Wirkstoffkonzentrationen zzgl. des Kontrollansatzes in insgesamt drei voneinander unabhängigen Versuchen getestet. Die Beurteilung der Wachstumskinetik erfolgte mit Hilfe der in Abschnitt 3.1 beschriebenen charakteristischen Wachstumsphasen, anhand der in Abb. 13 dargestellten Wachstumskurven.

In Anlehnung an das klinische Vorgehen zur Therapie des mKRRK erfolgte 2 h nach der Zugabe von Oxaliplatin ein vollständiger Mediumwechsel, um ausschließlich die bis zu diesem Zeitpunkt aufgetretene Wirkung des Zytostatikums zu erfassen.

Wie unter 2.3.1 beschrieben, unterliegt Oxaliplatin einer Biotransformation und ist *in vivo* nach der Infusionsdauer von 2 h nicht mehr im Plasma nachweisbar. Um die *In vitro*- den *In vivo*-Bedingungen anzupassen, wurden die HT29-Zellen in allen Experimenten dieser Arbeit ebenfalls für 2 h Oxaliplatin ausgesetzt (siehe Tab. 1).

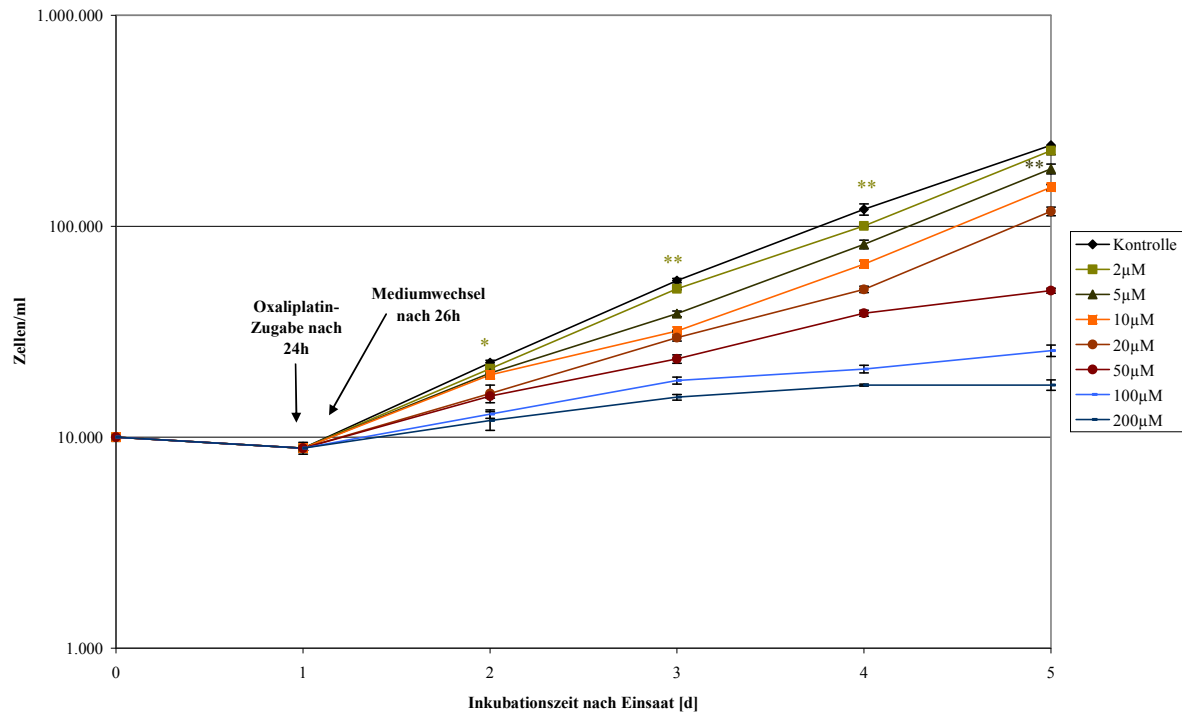


Abb. 13: Zellpopulation der HT29-Zellen bei einmaliger Oxaliplatin-Zugabe 24 h nach der Einsaat und anschließendem Mediumwechsel 1,5 h nach Wirkstoffzugabe; Einsaatdichte: 1×10^4 Zellen/ml. Dargestellt sind MW \pm SD (n = 3). ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle, * $p \leq 0,05$ zur Kontrolle (in der jeweiligen Farbe der entsprechenden Wirkstoffkonzentration).

In Abb. 13 ist eine Wirkung von Oxaliplatin auf das Wachstum der Zellen ab dem 2. Tag zu beobachten. Die Wirkung äußerte sich in einer konzentrationsabhängigen Wachstumshemmung der HT29-Zellen, wobei mit steigender Dosis auch die hemmende Wirkung verstärkt wurde. Ein signifikantes Ergebnis im Hinblick auf einen wachstumshemmenden Effekt von Oxaliplatin lag bereits ab Tag 2 vor. Eine vollständige Stagnation des Wachstums unter Zugabe von Oxaliplatin konnte nicht verzeichnet werden. Dieser Zustand galt für alle Konzentrationen an allen Zähltagen des Experiments, mit einer Ausnahme. So konnte an Tag 5 unter Zugabe der geringsten Konzentration an Oxaliplatin (2 µM) kein signifikantes Ergebnis in Bezug auf die Kontrolle nachgewiesen werden. Unter Verwendung von 5 µM Oxaliplatin zeigte sich ein deutlicher Effekt gegenüber der Kontrolle.

Die Zellpopulationsverdopplungszeiten dienen als weitere gute Möglichkeit die Wachstumskinetik einer Zellpopulation beurteilen zu können. Tab. 8 gibt einen Überblick über die Zellpopulationsverdopplungszeiten in Abhängigkeit der verschiedenen Inkubationszeiten.

Tab. 8: Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten aus den Wachstumskurven der HT29-Zellen bei einmaliger Oxaliplatin-Zugabe, mit vollständigem Mediumwechsel 2 h nach Wirkstoffzugabe. Die Einsaatdichte betrug 1×10^4 Zellen/ml; n. b. = nicht bestimmbar.

Zellpopulationsverdopplungszeiten [h] und Absterbezeiten [h]						Mittelwerte [h] (1. - 5. Tag)
	0. - 1. Tag	1. - 2. Tag	2. - 3. Tag	3. - 4. Tag	4. - 5. Tag	
Kontrolle	140,03	17,84	18,57	21,38	23,75	20,39
2μM	140,03	19,19	19,06	24,24	20,25	20,68
5μM	140,03	20,29	25,71	21,96	20,21	22,04
10μM	140,03	20,82	34,70	22,85	19,82	24,55
20μM	140,03	27,94	27,22	31,62	19,52	26,58
50μM	140,03	29,34	40,97	33,27	67,65	42,81
100μM	140,03	44,73	45,44	132,77	82,89	76,46
200μM	140,03	55,25	65,34	125,93	n. b.	n. b.

Bei Betrachtung der errechneten Zellpopulationsverdopplungszeiten war ein wachstumshemmender Effekt auf die HT29-Zellen unter dem Einfluss von Oxaliplatin nachweisbar. Dieser war, wie aus Tab. 8 ersichtlich, konzentrationsabhängig. Das stärkste Zellwachstum war für die Kontrolle und die Versuchsansätze 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M zwischen dem 1. und dem 2. Tag zu verzeichnen. Eine charakteristische Log-Phase konnte somit nicht nachgewiesen werden. Auch für die Oxaliplatinkonzentrationen von 5 μ M bis 20 μ M lag das stärkste Wachstum der Zellpopulationen zwischen Tag 4 - 5. Eine Plateauphase war demzufolge nur für eine Wirkstoffkonzentration von 200 μ M Oxaliplatin zu verzeichnen.

3.1.2.3 Wachstum bei einmaliger Irinotecan-Zugabe

Um die Wachstumskinetik der HT29-Zellen unter Einfluss des DNA-Topoisomerase I-Hemmers Irinotecan zu untersuchen, wurden wie bei Oxaliplatin und 5-FU auch bei Irinotecan Konzentrationen zwischen 2 - 200 μ M gewählt und drei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt. Die Tumorzellen wurden dem klinischen FOLFIRI-Standardschema (siehe Tab. 2) entsprechend für 1,5 h mit Irinotecan inkubiert. Danach erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in der Abb. 14 dargestellt.

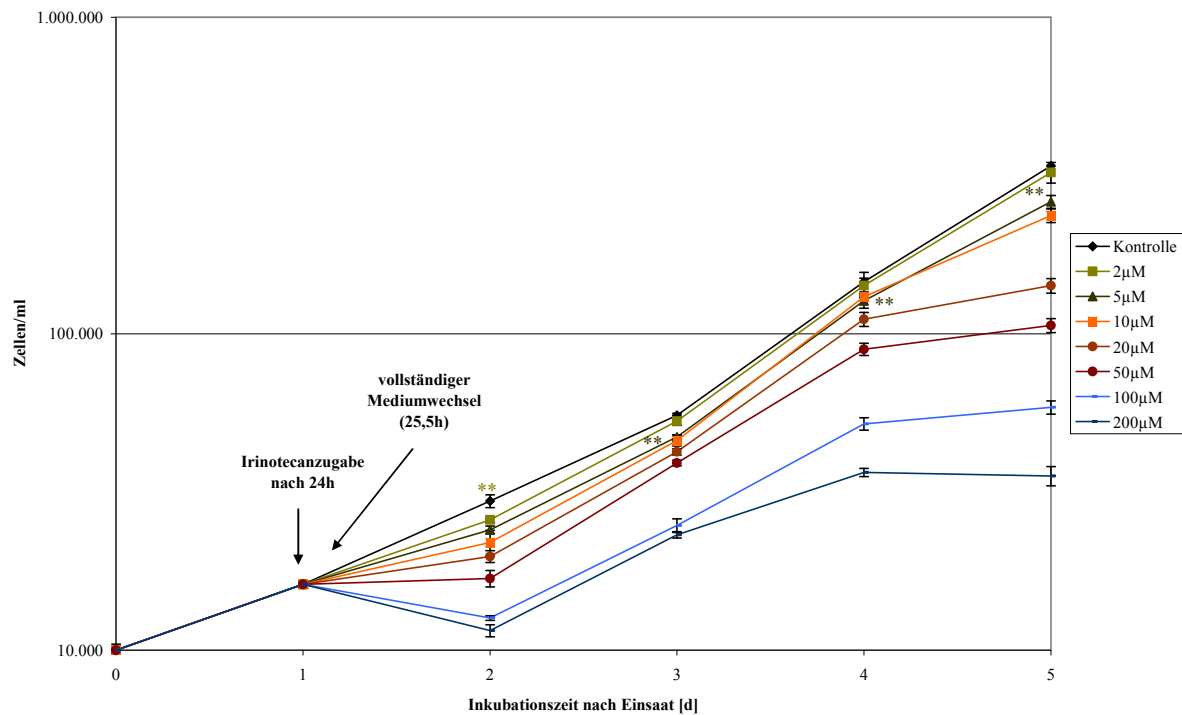


Abb. 14: Zellpopulation der HT29-Zellen bei einmaliger Irinotecan-Zugabe 24 h nach der Einsaat und anschließendem Mediumwechsel 1,5 h nach Wirkstoffzugabe; Einsaatdichte: 1×10^4 Zellen/ml. Dargestellt sind MW \pm SD (n = 3). ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle (in der jeweiligen Farbe der entsprechenden Wirkstoffkonzentration).

Aus Abb. 14 wird deutlich, dass die Wachstumskurven der Kontrolle sowie der Irinotecan-Konzentration von 2 μ M und 5 μ M bis zum fünften Zähltag ähnlich verliefen. Ab einer Wirkstoffkonzentration von 2 μ M Irinotecan war mit Beginn des zweiten Zähltages eine Wachstumshemmung zu verzeichnen.

Nach der Zugabe von Irinotecan kam es zu einer annähernden Stagnation des Zellwachstums bei einer Konzentration von 50 μ M. Irinotecan-Konzentrationen von 100 μ M bis 200 μ M führten sogar zu einer abfallenden Zellzahl/ml. Unter Zugabe von 100 μ M Irinotecan sank die Zellzahl/ml um 22 % von Tag 1 auf Tag 2; bei einer Konzentration von 200 μ M sogar um 29 % im Vergleich zum Vortag. Das bedeutet, die Summe der proliferierenden Tumorzellen lag unterhalb des Wertes der absterbenden Zellen.

Auch hier wurden die Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten berechnet, um die Wachstumskinetik der Tumorzellen unter der Zugabe von Irinotecan besser beurteilen zu können. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten aus den Wachstumskurven der HT29-Zellen bei einmaliger Irinotecan-Zugabe, mit vollständigem Mediumwechsel 1,5 h nach Wirkstoffzugabe. Die Einsaatdichte betrug 1×10^4 Zellen/ml.

Zellpopulationsverdopplungszeiten [h] und Absterbezeiten [h]						Mittelwerte [h] (1. - 5. Tag)
	0. - 1. Tag	1. - 2. Tag	2. - 3. Tag	3. - 4. Tag	4. - 5. Tag	
Kontrolle	34,72	27,47	26,68	17,12	19,69	22,74
2μM	34,72	35,46	23,18	16,85	20,20	23,92
5μM	34,72	41,91	24,63	16,79	23,07	26,60
10μM	34,72	54,52	22,46	15,91	28,11	30,25
20μM	34,72	82,11	21,84	17,23	68,21	47,35
50μM	34,72	38,87	19,80	20,10	96,27	131,21
100μM	34,72	-67,96	24,70	22,51	138,75	29,50
200μM	34,72	-49,44	23,88	36,66	-660,14	-162,26

Tab. 9 zeigt deutlich, dass die Zellpopulationsverdopplungszeit von der Einsaat bis zum ersten Tag mit 34,72 h über dem sich für die native Wachstumskurve ergebenden Wert von 20,06 h lag. Somit war die Zellpopulationsverdopplungszeit (Tag 0 - Tag 1) der HT29-Zellen innerhalb dieses Versuchsaufbaus um 13,66 h verlängert.

3.2 Klonogenes Überleben

Mittels Koloniebildungstest kann die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber ionisierender Strahlung untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit diente dieses Testverfahren zudem zur Charakterisierung der Strahlenwirkung auf die HT29-Zellen unter Einfluss der antineoplastisch wirksamen Substanzen Oxaliplatin, Irinotecan und 5-FU einzeln sowie in Kombination. In dieser Arbeit wurden fluoropyrimidinbasierende Kombinationsregime mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan untersucht, da diese bereits in der Erstlinientherapie des mKRK erfolgreich angewendet werden, allerdings ausschließlich ohne den gleichzeitigen Einsatz einer Strahlentherapie.

Bei den HT29-Zellen wurde das Zellüberleben nach der Wirkstoffzugabe anhand der unter Abb. 7 und Abb. 8 dargestellten Zeitschemata untersucht. Abb. 15 spiegelt das Zellüberleben der HT29-Zellen unter Einfluss von 20 μ M Oxaliplatin und 20 μ M Irinotecan im Vergleich und in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis in normierter Form wider. Diese Normierung der Überlebensfraktionen bei 0 Gy und die damit einhergehende Verschiebung der Kurve nach

oben ist notwendig, um eine evtl. vorhandene Strahlensensibilisierung der Tumorzellen zu erkennen.

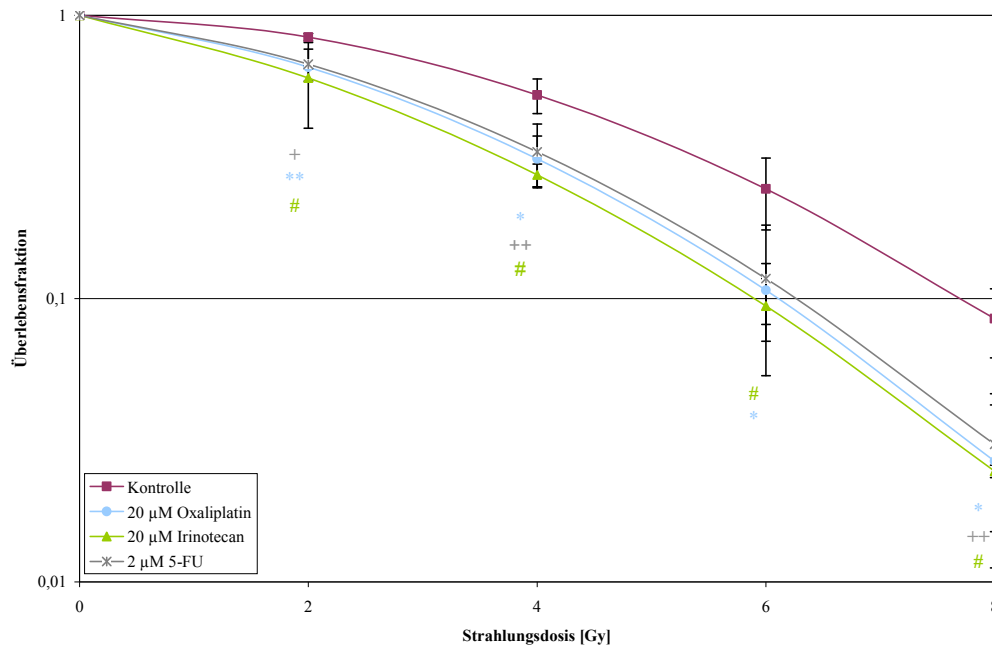


Abb. 15: Normierte Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen ohne Wirkstoffzugabe sowie unter Einfluss von 5-FU (2 h), Oxaliplatin (4 h) bzw. Irinotecan (3,5 h) mit einem vollständigen Mediumwechsel 2 h vor der Bestrahlung. Normierte MW \pm SD (n = 3). 5-FU: + $p \leq 0,05$ bzw. ++- $p \leq 0,01$ zur Kontrolle; Oxaliplatin: * $p \leq 0,05$ bzw. ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle; Irinotecan: # $p \leq 0,05$ zur Kontrolle.

Zur besseren Übersicht sind in Abb. 15 die Überlebensfraktionen in Abhängigkeit von der Strahlungs-dosis für nur vier der sechs Versuchsansätze abgebildet (inkl. Kontrolle). Für die entstandenen Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen zeigt sich ein typischer Kurvenverlauf. Dies heißt, die Zellüberlebenskurve beginnt mit einer breiten Schulter, um dann in einen linearen bzw. exponentiellen Teil überzugehen. Da bei niedriger Strahlendosis prozentual weniger Strahlenschäden auftreten, gibt die Breite der Schulter Auskunft über die Reparaturfähigkeit der Zellen. Aus dem Diagramm wird eine starke Verminderung der Koloniebildungsfähigkeit der Zellen bei höheren Strahlendosen deutlich. Zudem geht aus der Abbildung hervor, dass die Überlebenskurven der Zellen unter Einfluss von Oxaliplatin bzw. Irinotecan stärker abfallen, als die der Kontrolle. Die Überlebensfraktion der Kontrolle nahm von 1 (0 Gy) über 0,84 (2 Gy), 0,53 (4 Gy) und 0,24 (6 Gy) auf 0,089 unter der höchsten Bestrahlungs-dosis von 8 Gy ab. Dagegen nahmen die Überlebensfraktionen des Oxaliplatin- und Irinotecan-Ansatzes stärker ab. Für Oxaliplatin fiel die Überlebensfraktion von 1 bei 0 Gy

über 0,66 (2 Gy), 0,32 (4 Gy) und 0,09 (6 Gy) auf 0,03 bei 8 Gy. Die Überlebensfraktion von Irinotecan sank von 1 (0 Gy) auf 0,60 (2 Gy), 0,28 (4 Gy) und 0,10 (6 Gy) auf 0,02 bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy.

Durch den größer werdenden Abstand zwischen den Überlebenskurven der Kontrolle und den Kurven der beiden mit Wirkstoff behandelten Zellen ist von einer strahlensensibilisierenden Wirkung sowohl von 20 μ M Oxaliplatin, als auch von 20 μ M Irinotecan auszugehen. Dieser Effekt war signifikant für alle Strahlendosen.

Ebenfalls zu erkennen war, dass bis zu einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy die Überlebensfraktionen unter Irinotecan-Zugabe niedriger waren als die unter Oxaliplatin-Zugabe. Bei 6 Gy kehrte sich dieser Effekt um und die Überlebensfraktion der Zellen unter Einfluss von Irinotecan lag mit 0,1052 um 0,0119 über jener Überlebensfraktion nach Oxaliplatin-Zugabe. Ein signifikanter Unterschied der beiden Versuchsansätze war jedoch für keine der Bestrahlungsdosen zu erfassen.

In Abb. 16 ist das Zellüberleben der HT29-Zellen unter Verwendung von Oxaliplatin + 5-FU sowie Irinotecan + 5-FU im Vergleich dargestellt. Es handelt sich dabei um eine normierte Darstellung.

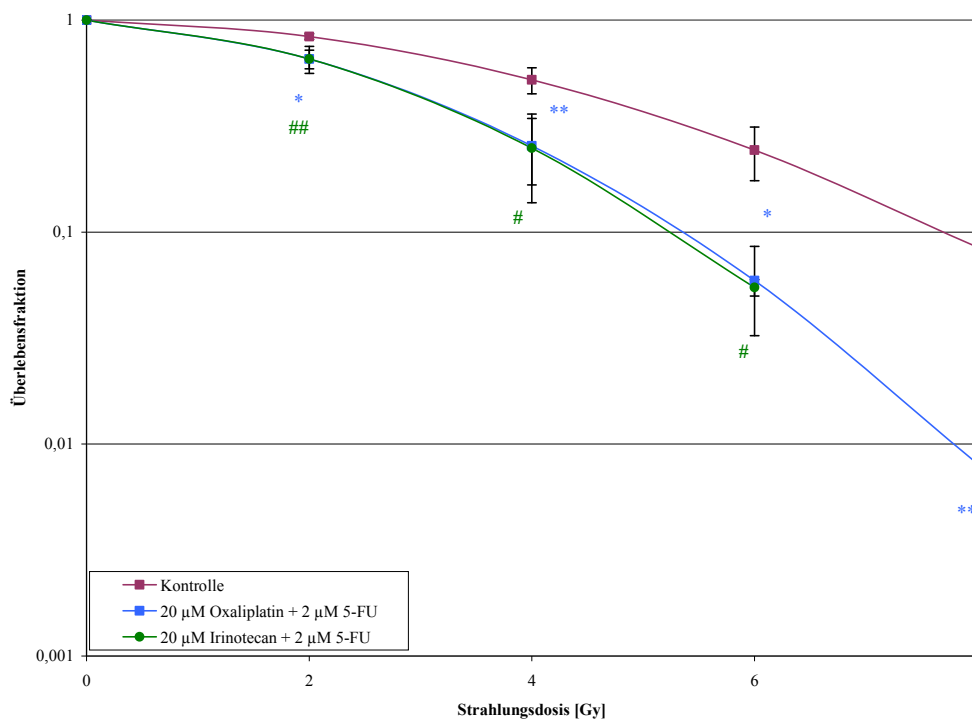


Abb. 16: Auf 1 normierte Zellüberlebenskurve der HT29-Zellen bei der Zugabe von jeweils 20 μ M Oxaliplatin (4 h) + 2 μ M 5-FU (2 h), sowie 20 μ M Irinotecan (3,5 h) + 2 μ M 5-FU (2 h) mit einem vollständigen Mediumwechsel 2 h vor dem Bestrahlungszeitpunkt. Normierte MW \pm SD (n = 3). Oxaliplatin + 5-FU : * $p \leq 0,05$ bzw. ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle. Irinotecan + 5-FU: # $p \leq 0,05$ bzw. ## $p \leq 0,01$ zur Kontrolle.

In Abb. 17 sind erneut zur besseren Übersicht die Überlebensfraktionen von nur drei der durchgeführten sechs Versuchsansätze (inkl. Kontrolle) dargestellt. Dabei handelt es sich um die Ansätze Kontrolle, Oxaliplatin + 5-FU und Irinotecan + 5-FU, welche normiert und in Abhängigkeit von der Strahlendosis aufgetragen wurden. Auch aus Abb. 17 ist der typische Verlauf der Zellüberlebenskurven ersichtlich, der sich im Bereich der niedrigen Strahlendosen durch eine mehr oder weniger breite Schulter auszeichnet und im Bereich der höheren Dosen in einen exponentiellen Verlauf übergeht. Das Überleben der mit Wirkstoff behandelten Zellen nahm deutlich stärker ab als das der Kontrolle. Wie bereits Abb. 16 zu entnehmen, nahm die Überlebensfraktion der Kontrolle auf 0,089 unter der höchsten Bestrahlungsdosis von 8 Gy ab.

Das Überleben der mit einer Wirkstoffkombination von 20 μ M Oxaliplatin + 2 μ M 5-FU behandelten Zellen fiel von 1 unter unbestrahlten Bedingungen auf 0,68 (2 Gy), 0,23 (4 Gy) und 0,08 (6 Gy) auf nur noch 0,01 bei 8 Gy. Unter der Zugabe von 20 μ M Irinotecan + 2 μ M 5-FU nahm das Zellüberleben stetig ab von 1 (0 Gy) über 0,63 (2 Gy), 0,25 (4 Gy) auf 0,05 (6 Gy). Bei einer Strahlendosis von 8 Gy waren keine Kolonien mehr zählbar und somit kein Zellüberleben mehr nachweisbar. Der größer werdende Abstand zwischen der Kontroll-Überlebenskurve und den Wirkstoff-Überlebenskurven macht den strahlensensibilisierenden Effekt unter Zugabe der Chemotherapeutikakombinationen deutlich. Für jede der Strahlendosen handelte es sich dabei um eine signifikante Wirkung im Vergleich zur Kontrolle.

Für die Bestrahlungsdosen für 2 Gy, 6 Gy und 8 Gy ergab sich für Irinotecan + 5-FU eine niedrigere Überlebensfraktion als für Oxaliplatin + 5-FU.

Bei der Bestrahlungsdosis von 2 Gy bestand ein Unterschied von 0,041, um den sich die beiden Wirkstoffansätze unterschieden. Die Zellen des Oxaliplatin-5-FU-Ansatzes hatten hierbei mit 0,679 die höhere Überlebensfraktion. Für 6 Gy lag die Differenz bei 0,029, für 8 Gy ergab sich ein Differenzwert von 0,006. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Wirkstoffansätzen ließ sich unter keiner der Strahlendosen ausmachen.

Zum besseren Vergleich aller Experimente sind nochmals die Plattiereffizienzen in Tab. 10 und das Zellüberleben in Abb. 17 graphisch als Übersicht aller Versuche zusammengefasst dargestellt.

Tab. 10: Plattiereffizienz der HT29-Zellen in Abhängigkeit vom jeweiligen Wirkstoffregime und den verschiedenen Bestrahlungsdosen (0 Gy - 8 Gy). Versuchsdauer 14 Tage (n = 3).

Plattiereffizienz [MW ± SD in %]	Bestrahlungsdosis [Gy]				
	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy	8 Gy
Kontrolle	48,92 ± 6,28	41,09 ± 4,71	25,53 ± 2,89	11,43 ± 3,43	4,28 ± 0,93
20 µM Oxaliplatin	30,43 ± 1,79	20,10 ± 0,92	9,64 ± 1,42	2,81 ± 0,65	1,06 ± 0,42
20 µM Irinotecan	35,23 ± 4,95	21,05 ± 9,97	9,78 ± 0,5	3,65 ± 0,31	0,70 ± 0,14
2 µM 5-FU	30,43 ± 3,63	21,55 ± 3,22	9,16 ± 2,91	3,80 ± 2,00	0,95 ± 0,37
20 µM Oxaliplatin + 2 µM 5-FU	12,50 ± 0,06	8,49 ± 1,23	2,89 ± 1,12	0,97 ± 0,33	0,08 ± 0,02
20 µM Irinotecan + 2 µM 5-FU	15,08 ± 5,3	9,45 ± 2,38	3,75 ± 0,26	0,73 ± 0,19	0,00 ± 0,00

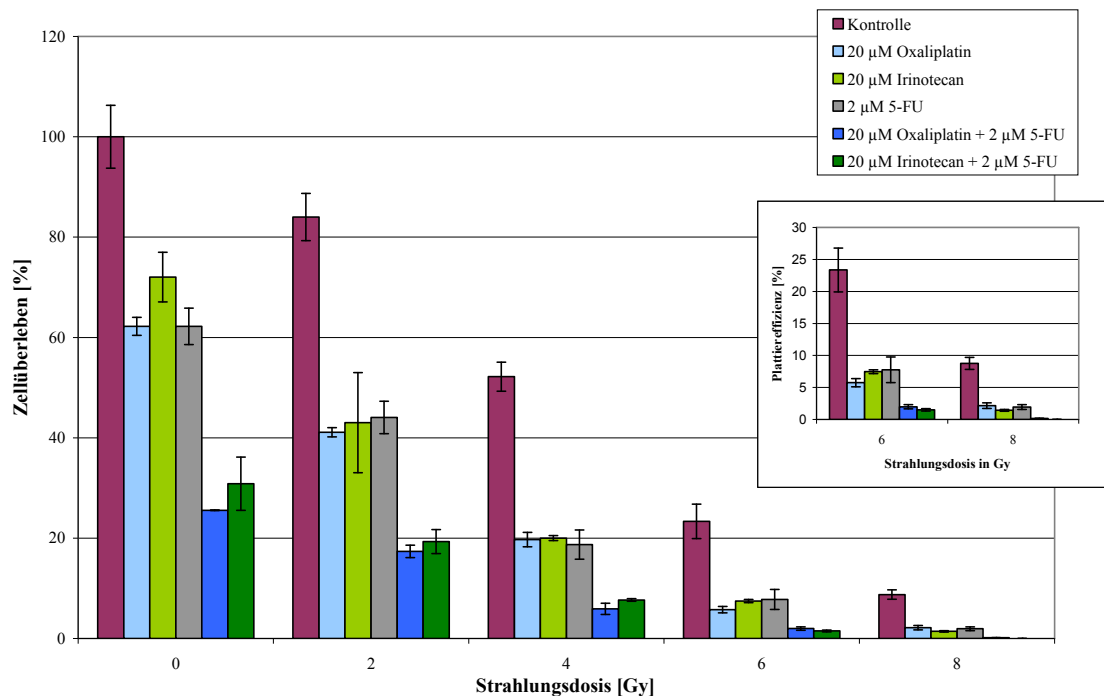


Abb. 17: Zellüberleben aus allen durchgeführten Koloniebildungstests der HT29-Zellen mit den sechs verschiedenen Versuchsansätzen normiert auf 100 % (= Kontrolle, 0 Gy, kein Wirkstoff); die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten bestimmt (n = 3).

Aus der Tab. 10 wird ersichtlich, dass die PE für die Kontrolle (0 Gy) mit 48,92 % der höchsten Koloniebildungsfähigkeit innerhalb des Experimentes entsprach. Das heißt, ohne Einfluss von Bestrahlung und Wirkstoff waren von $1,5 \times 10^3$ eingesäten HT29-Zellen 48,92 % fähig eine Kolonie (≥ 50 Zellen) zu bilden. Ein Wert von 12,5 % unter der kombinierten Zugabe von 20 μM Oxaliplatin + 2 μM 5-FU stellte bei 0 Gy die niedrigste Plattiereffizienz dar. Bis zu einer Strahlendosis von 4 Gy wiesen die Zellen unter Kombination von Oxaliplatin + 5-FU mit einem Wert von 2,9 % stets die geringste PE auf. Für die Oxaliplatin-5-FU-Kombination ergab sich eine PE der Zellen von 12,5 % (0 Gy) und 8,5 % (2 Gy). Ab einer Strahlendosis von 6 Gy, zeigte sich die niedrigste Plattiereffizienz von 0,73 % (6 Gy) und 0 % (8 Gy) für die Wirkstoffkonzentration bestehend aus 20 μM Irinotecan + 2 μM 5-FU. Unter Zugabe von Irinotecan + 5-FU waren unter der genutzten Einsaatdichte bei einer Strahlendosis von 8 Gy also keine Kolonien mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu lag die Plattiereffizienz der HT29-Zellen unter der Zugabe von 20 μM Oxaliplatin + 2 μM 5-FU für 6 Gy bei 9,7 % und für 8 Gy bei 0,78 %.

Tab. 10 zeigt außerdem, dass die Plattiereffizienz der Zellen unter der Zugabe von 20 μM Irinotecan ab einer Strahlendosis von 6 Gy stets geringer war als die PE der Tumorzellen unter der 20 μM Oxaliplatin-Zugabe. Im Rahmen aller getesteten Wirkstoffregime nahm die PE mit steigender Strahlendosis ab. Bereits unter unbestrahlten Bedingungen war unter Wirkstoffzugabe im Verhältnis zu den ohne Wirkstoffzusatz behandelten Tumorzellen ein signifikanter Effekt nachweisbar.

Aus Abb. 17 wird deutlich, dass die PE der HT29-Zellen mit steigender Strahlungsdosis kontinuierlich abnahm. Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls für die Tumorzellen die unbestrahlt blieben und ausschließlich mit einem Einzelwirkstoff bzw. Wirkstoffregimen behandelt wurden.

3.3 Metabolische Aktivität

Die Chemotherapeutika 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan einzeln bzw. in Kombination hemmen über verschiedene Mechanismen in unterschiedlichem Maße die Zellproliferation. Werden Zellen ionisierender Strahlung ausgesetzt, hat dies ebenfalls einen Effekt auf deren metabolische Aktivität. Mit Hilfe des EZ4U-Tests sollte dieser antineoplastische Effekt auf die Darmkrebszellen durch die Ermittlung o. g. metabolischer Aktivität untersucht werden. Der Zytotoxizitätstest zielte auf mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Wirkstoffregimen ab, sollte aber auch Ergebnisse darüber liefern, ob sich signifikante Unterschiede im Hinblick auf die metabolische Aktivität der HT29-Zellen unter der radiochemotherapeutischen Kombinationsbehandlung zeigen würden. Die Ergebnisse und Unterschiede, die sich aus den verschiedenen Versuchsansätzen ergaben, sind je nach Inkubationszeit von 1 h, 24 h und 48 h in den Abb. 18, 19 und 20 dargestellt.

Die mittels ELISA-Reader gemessene Extinktion aller Ansätze wurde auf die Werte des Kontrollansatzes (unbehandelte Zellen, 0 μ M, 0 Gy; 100 %) normiert.

Die Ergebnisse 1 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt sind in Abb. 18 dargestellt.

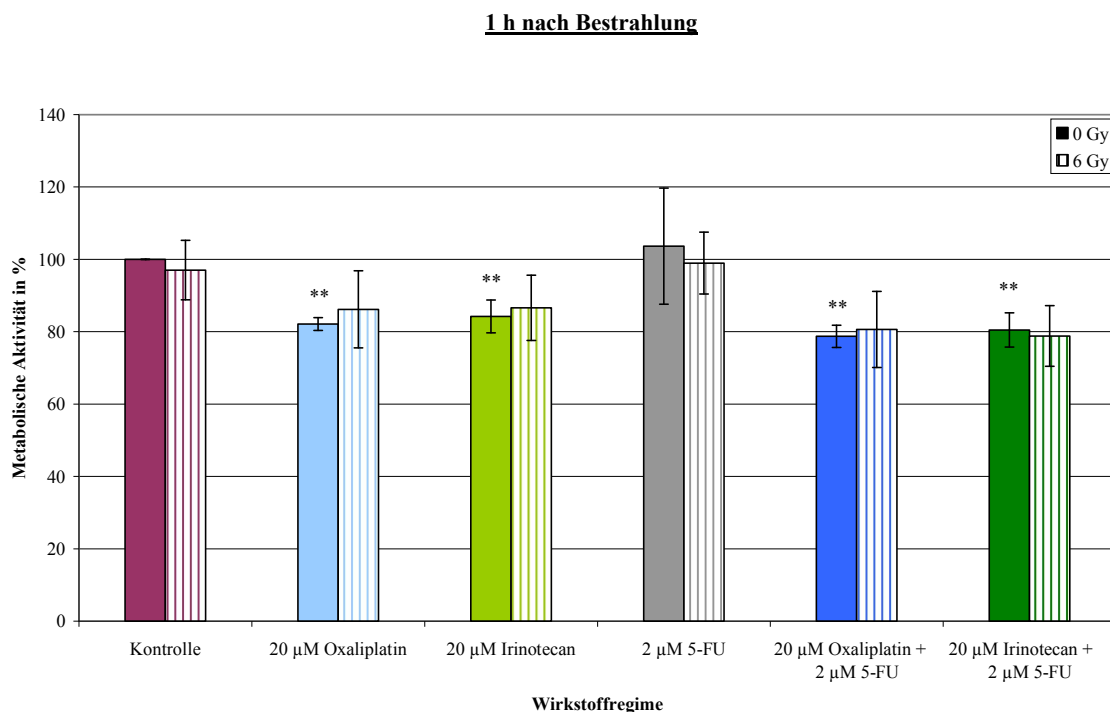


Abb. 18: Metabolische Aktivität der HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy, fünf verschiedene Wirkstoffregime zzgl. der unbehandelten Kontrolle (100 %) im Vergleich. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Darstellung von MW \pm SD (n = 5). ** p \leq 0,01 zur Kontrolle (0 Gy).

Eine Stunde nach dem Bestrahlungszeitpunkt lag die metabolische Aktivität der HT29-Zellen unbestrahlt und unter alleiniger Zugabe von 5-FU höher, als bei einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy (Abb. 18). Dieser Effekt war ebenfalls beim Kontrollansatz, sowie unter der Kombinationszugabe von Irinotecan + 5-FU zu verzeichnen. Wurden die Krebszellen alleine mit Irinotecan bzw. Oxaliplatin behandelt und blieben gleichzeitig unbestrahlt, war die metabolische Aktivität mit $p \leq 0,01$ signifikant niedriger, als die des unbestrahlten Kontrollansatzes.

Unter alleiniger Irinotecan- bzw. Oxaliplatinzugabe war die Zellvitalität bei 6 Gy gegenüber der Zellvitalität bei 0 Gy erhöht. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem bestrahlten bzw. unbestrahlten Ansatz ließ sich in diesem Zusammenhang jedoch nicht ausmachen. Signifikant mit einem Wert von $p \leq 0,01$ waren ebenfalls die beiden unbestrahlten Kombinationsansätze Irinotecan + 5-FU bzw. Oxaliplatin + 5-FU gegenüber der Kontrolle bei 0 Gy.

Ein deutlicher Effekt in Bezug auf die Zellvitalität bei 6 Gy gegenüber der Zellvitalität bei 0 Gy ließ sich für keines der untersuchten Wirkstoffregime nachweisen.

Für die Kombination der beiden Wirkstoffe Oxaliplatin und Irinotecan mit 5-FU gegenüber der Behandlung mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan als Monopräparat ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität bei 0 Gy und 6 Gy. Ohne Bestrahlung zeigte sich unter 5-FU-Zugabe die höchste Zellvitalität. Die metabolische Aktivität überschritt die der Kontrolle um 3,63 %.

Nach einer Inkubationszeit von 24 h im Anschluss an den Bestrahlungszeitpunkt erfolgte ebenfalls eine Analyse der metabolischen Aktivität (Abb. 19).

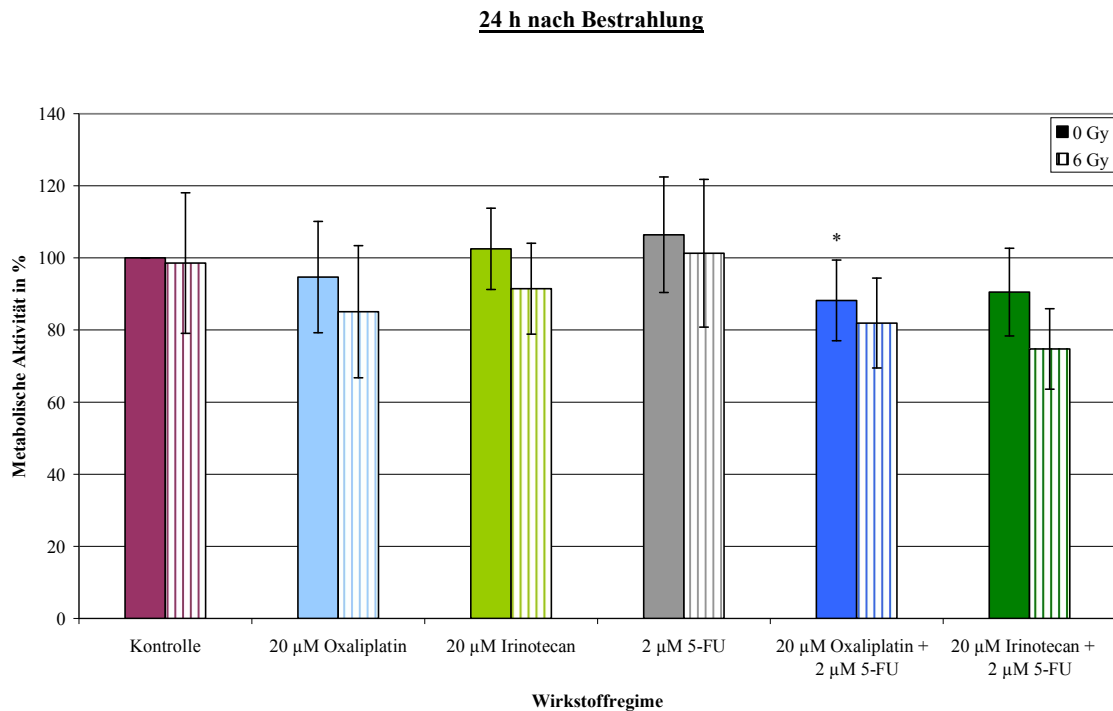


Abb. 19: Metabolische Aktivität der HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy, fünf verschiedene Wirkstoffregime zzgl. der unbehandelten Kontrolle (100 %) im Vergleich. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Darstellung von $MW \pm SD$ ($n = 5$). * $p \leq 0,05$ zur Kontrolle (0 Gy).

Aus der Abb. 19 geht hervor, dass sich für die HT29-Zellen 24 h nach der Bestrahlung die größte metabolische Aktivität unter der Zugabe von 5-FU ergab. Dies galt sowohl für den unbestrahlten, als auch den bestrahlten Versuchsansatz. Damit lag die metabolische Aktivität der Zellen 24 h nach der Radiatio unter der Zugabe von 5-FU mit einem Wert von 106 % (0 Gy) über dem Kontrollwert, wie bereits bei der Messung 1 h nach der Bestrahlung (Abb. 18). Die metabolische Aktivität der bestrahlten Zellen war für alle Versuchsansätze (einschließlich der Kontrolle) jeweils niedriger als bei 0 Gy. Signifikante Resultate ließen sich hinsichtlich der Versuchsbedingungen bei 0 Gy im Vergleich zu 6 Gy nicht nachweisen. Nur den unbestrahlten Ansatz Oxaliplatin + 5-FU der Kontrolle bei 0 Gy gegenüberstellend, zeigte sich ein signifikanter Effekt ($p < 0,05$).

Abschließend wurde in einem letzten Versuchsansatz 48 h nach dem Zeitpunkt der Bestrahlung eine Absorptionsmessung durchgeführt. Abb. 20 gibt einen Überblick über die Ergebnisse.

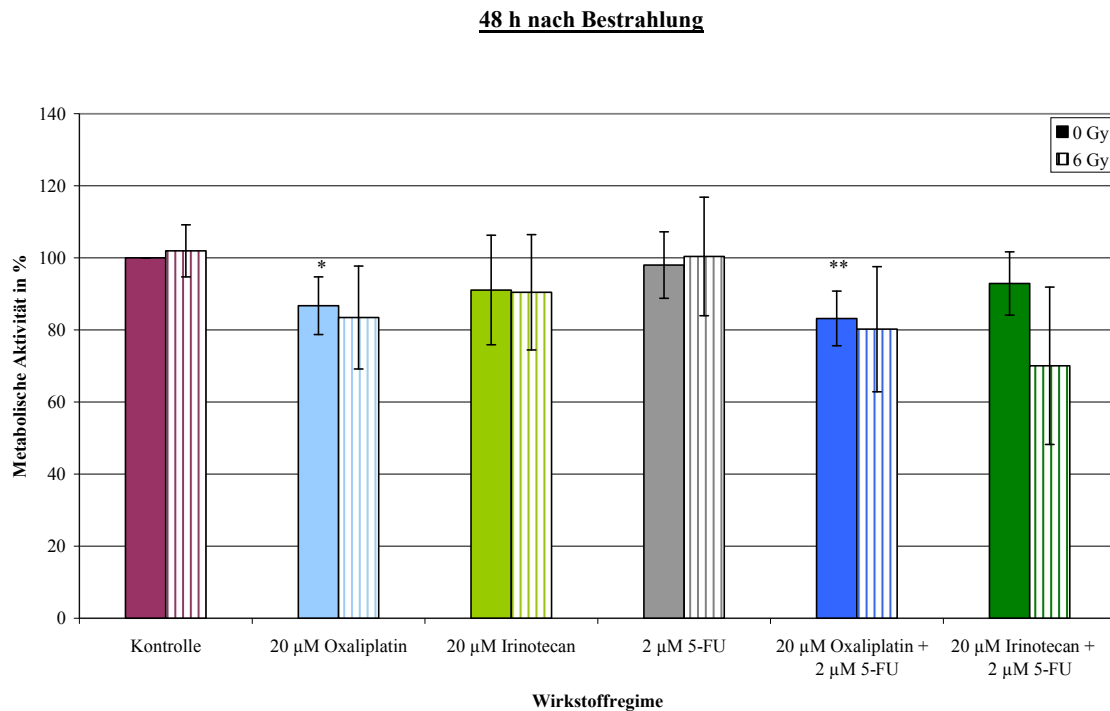


Abb. 20: Metabolische Aktivität der HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy, fünf verschiedene Wirkstoffregime zzgl. der unbehandelten Kontrolle (100 %) im Vergleich. Einsaatdichte 1×10^4 Zellen/Well. Darstellung von MW \pm SD (n = 5). * $p \leq 0,05$ zur Kontrolle (0 Gy); ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle (0 Gy).

In Diagramm 20 wird deutlich, dass sich der Kontroll- und der 5-FU-Ansatz 48 h nach der Bestrahlung erneut ähnelten (siehe auch Abb. 18 und Abb. 19). Bei beiden Wirkstoffregimen war die metabolische Aktivität der Krebszellen unter der Bestrahlungsdosis von 6 Gy höher als bei 0 Gy. Im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 µM, 0 Gy) waren signifikante Unterschiede in der metabolischen Aktivität der Zellen für die unbestrahlten Ansätze unter Einfluss von Oxaliplatin ($p < 0,05$) sowie Oxaliplatin + 5-FU ($p < 0,01$) nachweisbar. Signifikante Unterschiede der Zellviabilität, 0 Gy und 6 Gy vergleichend, zeigten sich auch hier nicht (vgl. Abb. 18 und 19). 48 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt lag die metabolische Aktivität bei 6 Gy, wie bereits in den o. g. Messungen (1 h und 24 h) berichtet, unter dem Einfluss von 5-FU am höchsten; gefolgt von den Ansätzen mit Irinotecan (92,6 %), Oxaliplatin (76,0 %), Oxaliplatin + 5-FU (75,3 %) und Irinotecan + 5-FU (73,5 %).

Abb. 21 zeigt nochmals zusammengefasst den direkten Vergleich der metabolischen Aktivität der Zellen bei Irinotecan- bzw. Oxaliplatinzugabe unter dem Einfluss ionisierender Strahlung.

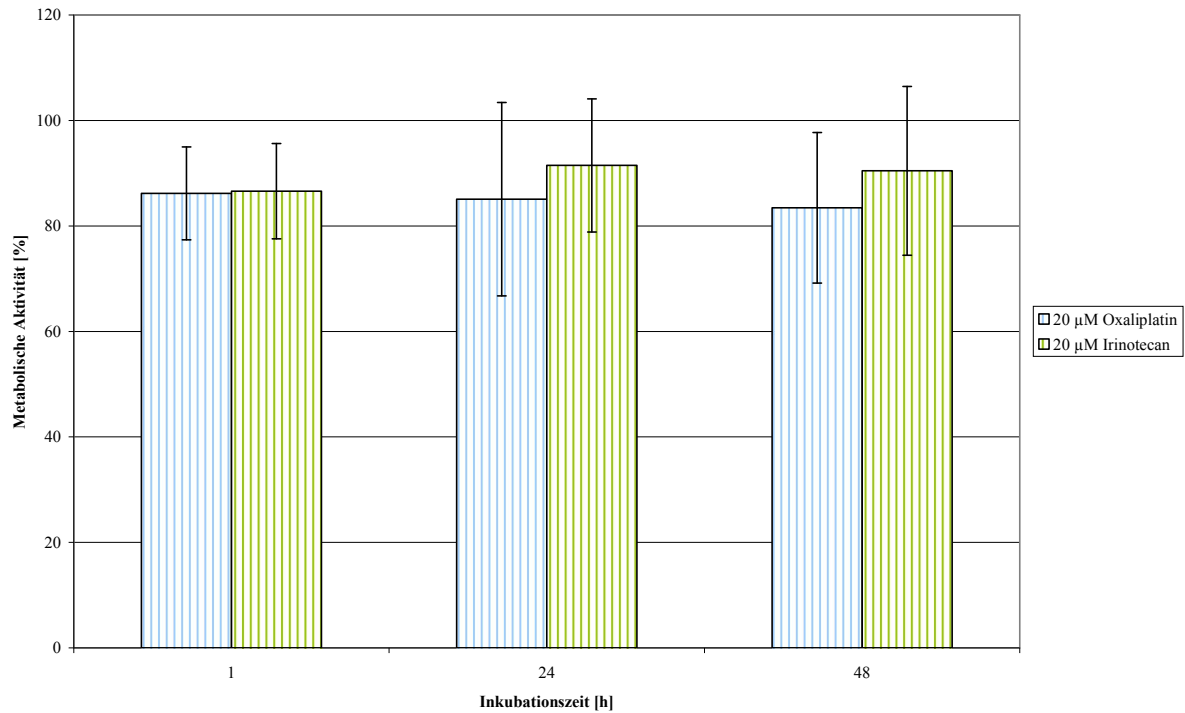


Abb. 21: Die metabolische Aktivität der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime Oxaliplatin und Irinotecan. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Wie aus den vorangehenden Abbildungen 18 - 20 ersichtlich ergab sich für keines der untersuchten Wirkstoffregime ein signifikanter Effekt auf die metabolische Aktivität, egal ob die Krebszellen bestrahlt wurden oder unbestrahlt blieben.

Im Hinblick darauf, ob sich ein Unterschied in der Wirkung von Oxaliplatin vs. Irinotecan jeweils in Kombination mit 5-FU unter einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy auf die HT29-Zellen ergab, zeigt das Diagramm 22 deutlich, dass zu keinem der drei Messzeitpunkte ein signifikanter Effekt vorlag.

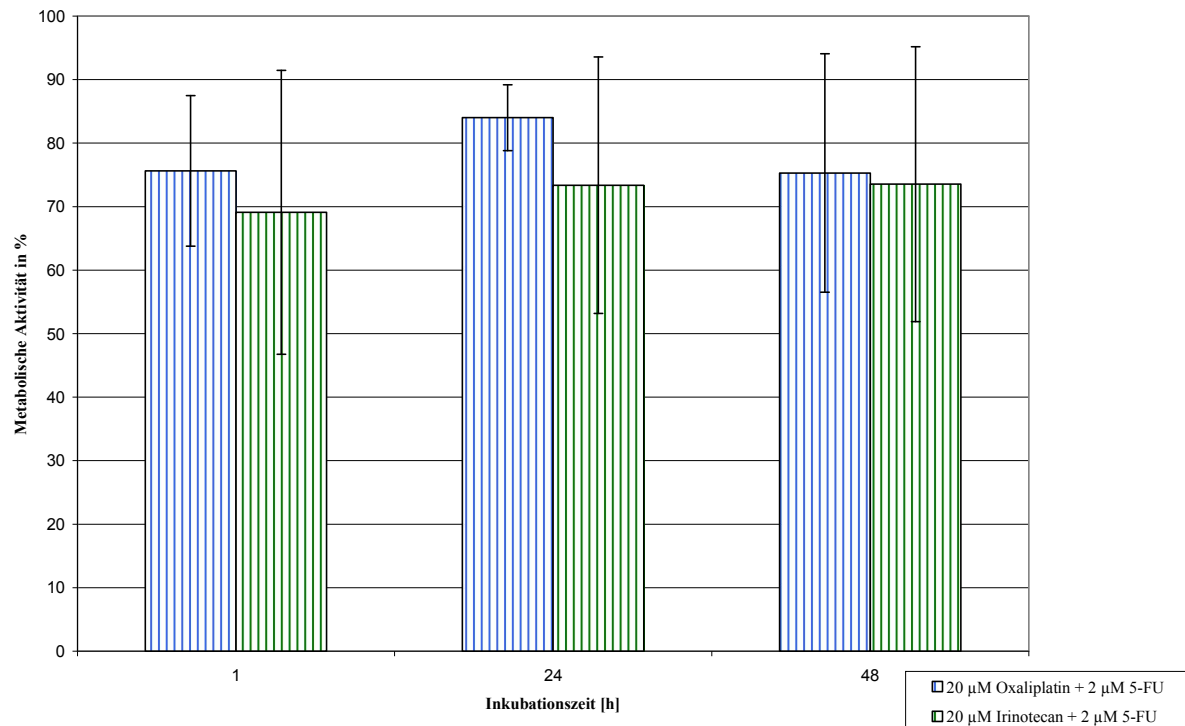


Abb. 22: Die metabolische Aktivität der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime Oxaliplatin + 5-FU und Irinotecan + 5-FU. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Nach den aktuellen S3-Leitlinien wird zur Therapie des KRK im UICC-Stadium II und III zusätzlich zur Bestrahlung ausschließlich eine Fluorouracil-gestützte Monochemotherapie angewandt. Im Hinblick auf die klinische Relevanz (siehe Kap. 1.3) sind in Abb. 23 nochmals übersichtlich die gemessenen metabolischen Aktivitäten der bestrahlten Tumorzellen für die drei Regime Oxaliplatin, 5-FU sowie Oxaliplatin + 5-FU aufgetragen. Dabei finden alle drei Messzeitpunkte nach der Bestrahlung Berücksichtigung (1 h, 24 h und 48 h).

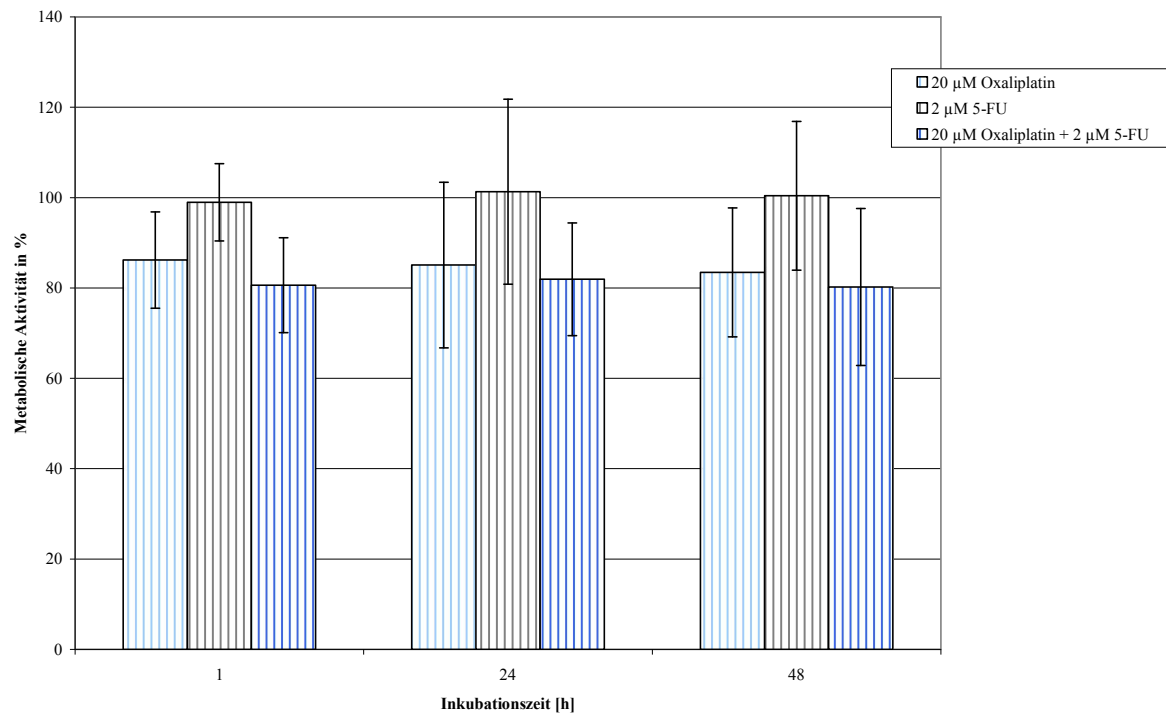


Abb. 23: Metabolische Aktivität [%] der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime Oxaliplatin, 5-FU und Oxaliplatin + 5-FU. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Aus Abb. 23 wird deutlich, dass es unter gleichzeitiger Bestrahlung der Zellen zwischen den drei Wirkstoffregimen Oxaliplatin, 5-FU bzw. Oxaliplatin + 5-FU zu keinem der drei Messzeitpunkte einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die metabolische Aktivität gab.

Angelehnt an Abb. 23 erfolgt nun nachfolgend in Abb. 24 der Vergleich zwischen Irinotecan, 5-FU und dem Kombinationsregime Irinotecan + 5-FU, ebenfalls nach den Inkubationszeiten von 1 h, 24 h und 48 h und unter einer Bestrahlungsdosis von 6 Gy.

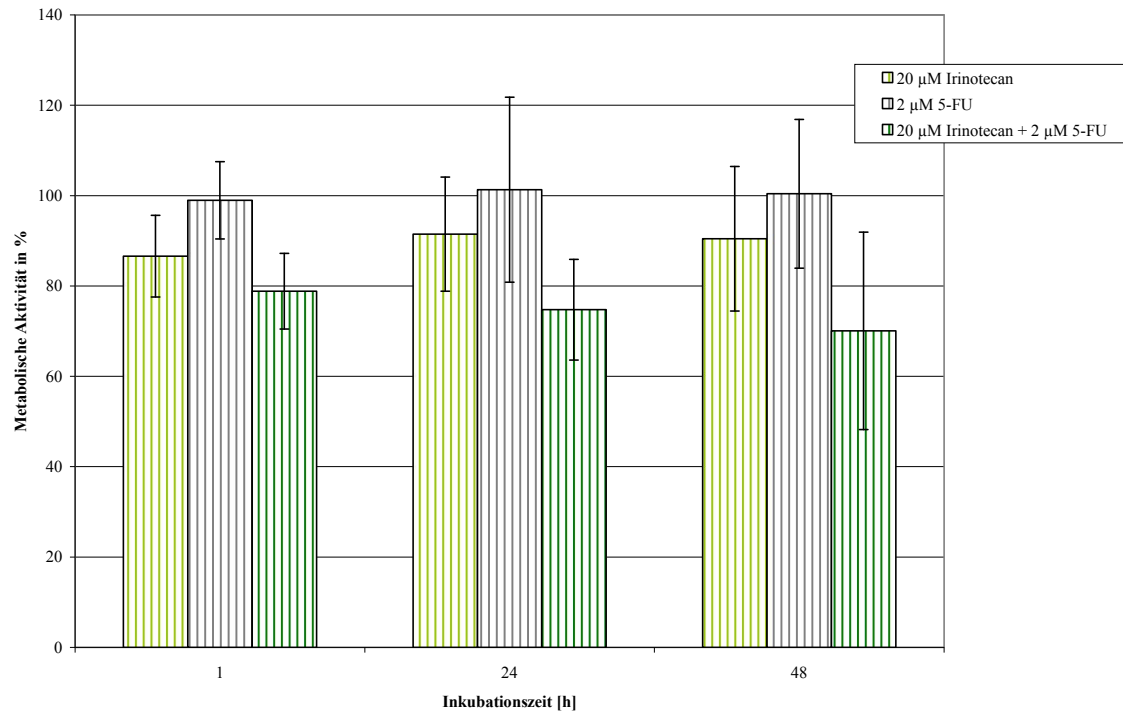


Abb. 24: Metabolische Aktivität [%] der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime 5-FU, Irinotecan und Irinotecan + 5-FU. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Wie bereits für die Wirkstoffregime in Abb. 23 beobachtet, zeigte sich im Vergleich von Irinotecan, 5-FU bzw. Irinotecan + 5-FU ebenfalls zu keinem der drei Messzeitpunkte ein signifikanter Effekt auf die metabolische Aktivität der HT29-Zellen unter Radiatio (siehe Abb. 24).

3.4 Zellproliferation

Als Verfahren zur Untersuchung der Proliferationsfähigkeit von HT29-Zellen unter Einfluss der verschiedenen Wirkstoffregime und Bestrahlungsbedingungen, fand der BrdU-Test Anwendung. Aus den folgenden Abb. 25 - 27 sind die Verhältnisse zwischen den Syntheseleistungen der Zellen unter den einzelnen Wirkstoffregimen bei 0 Gy bzw. 6 Gy zu entnehmen. Die Proliferation wurde dabei anhand des BrdU-Einbaus in die HT29-Zellen 1 h (Abb. 25), 24 h (Abb. 26) und 48 h (Abb. 27) nach dem Bestrahlungszeitpunkt bestimmt, da jeweils zu den o. g. Zeitpunkten die Proliferation der Zellen durch deren Fixierung gestoppt wurde.

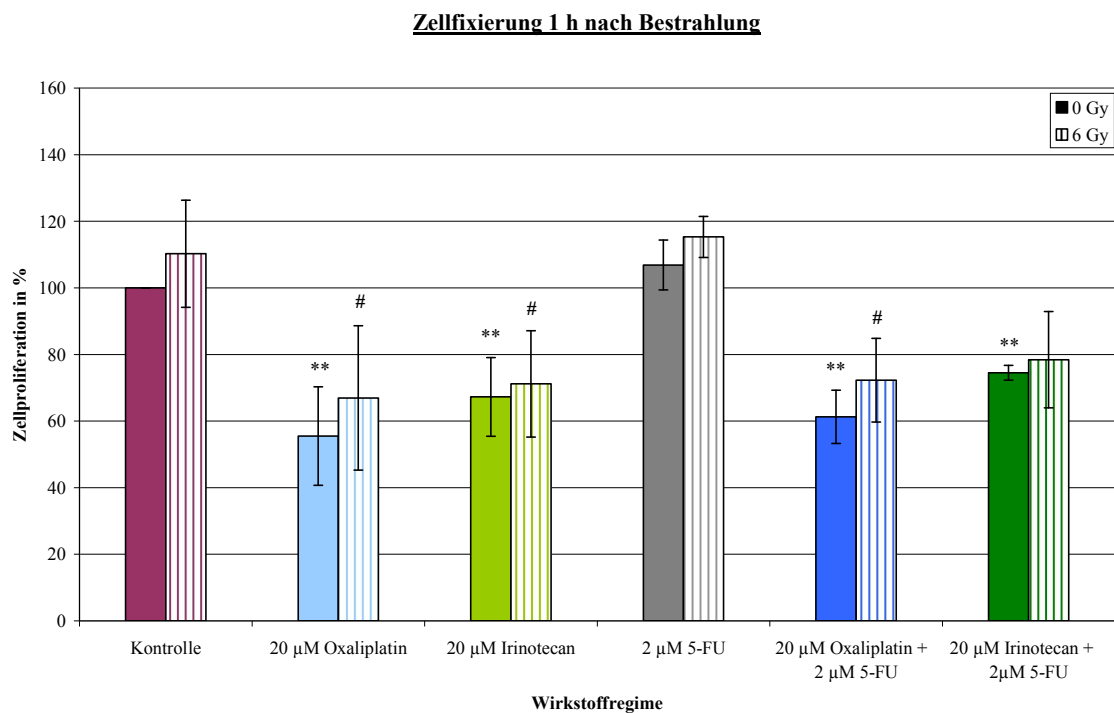


Abb. 25: BrdU-Einbau in die HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy, 1 h nach der Bestrahlung, fünf verschiedene Wirkstoffregime zzgl. der Kontrolle im Vergleich. BrdU-Einbauzeit 2,5 h. Einsaatdichte 2×10^3 Zellen/Well. Normierung auf die Kontrolle (Zellen ohne Wirkstoff, 0 Gy) = 100 %. Darstellung von MW \pm SD (n = 3). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle (0 µM, 0 Gy); # $p \leq 0,05$ zur Kontrolle (0 µM, 6 Gy).

Nach einer Inkubationszeit von 1 h war bei allen bestrahlten Ansätzen eine erhöhte BrdU-Einlagerung gegenüber den unbestrahlten Zellen zu beobachten (Abb. 25). Die Differenz zum jeweiligen unbestrahlten Ansatz reichte dabei von 3,9 % (20 µM Irinotecan) bis 11,45 % (20 µM Oxaliplatin). Eine signifikante Erhöhung der BrdU-Inkorporation (im Vergleich zu den unbestrahlten Ansätzen) und eine damit einhergehende Zunahme der

Proliferationskapazität ließ sich jedoch nach der einstündigen Inkubationszeit für keines der Wirkstoffregime nachweisen.

In der Gegenüberstellung von Kontrolle (0 μ M, 0 Gy) und den Versuchsansätzen unter Wirkstoffzugabe zeigte sich für alle chemotherapeutisch behandelten Regime - mit Ausnahme des 5-FU-Ansatzes - eine signifikante Proliferationsabnahme ($p \leq 0,1$).

Bei 6 Gy konnte unter der Zugabe von Irinotecan, Oxaliplatin und Oxaliplatin + 5-FU eine signifikante Reduktion des BrdU-Einbaus in die DNA der Tumorzellen gegenüber den bestrahlten Kontrollzellen (0 μ M, 6 Gy) beobachtet werden ($p \leq 0,05$).

Signifikante Ergebnisse in Bezug auf die Zellproliferation bei 0 Gy vs. 6 Gy ließen sich nicht nachweisen.

Einen Überblick über die erfolgte BrdU-Inkorporation für die fünf Wirkstoffregime zzgl. der Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 24 h gibt die Abb. 26.

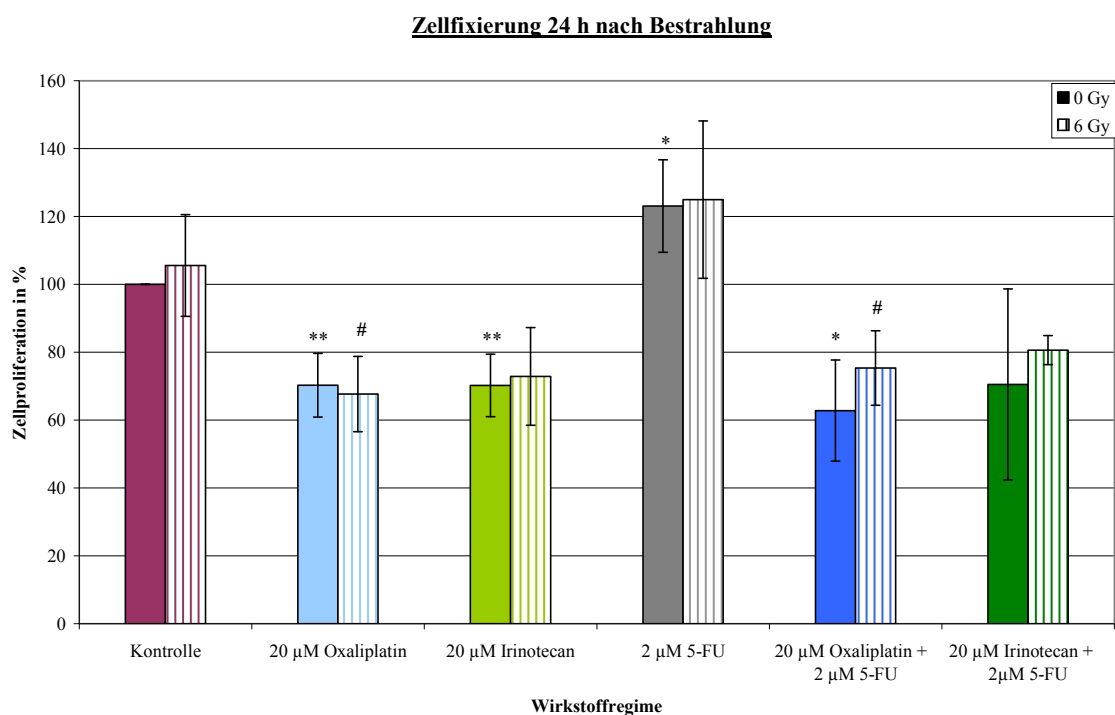


Abb. 26: BrdU-Einbau in die HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy, 24 h nach der Bestrahlung, fünf verschiedene Wirkstoffregime zzgl. der Kontrolle im Vergleich. BrdU-Einbauzeit 2,5 h. Einsaatdichte 2×10^3 Zellen/Well. Normierung auf die Kontrolle (Zellen ohne Wirkstoff, 0 Gy) = 100 %. Darstellung von MW \pm SD (n=4). * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle (0 μ M, 0 Gy); # $p \leq 0,05$ zur Kontrolle (0 μ M, 6 Gy).

Beginnend mit den unbestrahlten Versuchsansätze (Zellfixierung nach 24 h) war zu beobachten, dass im Vergleich zur Kontrolle (0 μ M, 0 Gy) alle Ansätze - bis auf das Kombinationsregime Irinotecan + 5-FU - einen signifikanten Effekt zeigten (Abb. 26). Dabei wiesen die Tumorzellen unter Zugabe von 5-FU eine erhöhte BrdU-Inkorporation und somit eine erhöhte Proliferationskapazität gegenüber der Kontrolle auf. Unter Oxaliplatin, Irinotecan und Oxaliplatin + 5-FU konnte ein verminderter BrdU-Einbau und damit eine reduzierte Zellproliferation nachgewiesen werden.

Bei 6 Gy ergab sich eine signifikante Abnahme der Tumorzellproliferationsrate unter Zugabe von Oxaliplatin allein bzw. in Kombination mit 5-FU ($p \leq 0,05$) gegenüber dem bestrahlten, wirkstoffunabhängigen Kontrollansatz.

Die bestrahlten mit den unbestrahlten Versuchsansätzen vergleichend, fand sich auch nach einer Inkubationszeit von 24 h bei keinem der sechs Ansätze ein signifikantes Ergebnis.

Die folgende Abb. 27 gibt die mittels BrdU-Test gemessene Proliferationskapazität [%] der HT29-Zellen 48 h nach der Bestrahlung in Abhängigkeit vom jeweiligen Versuchsansatz wider.

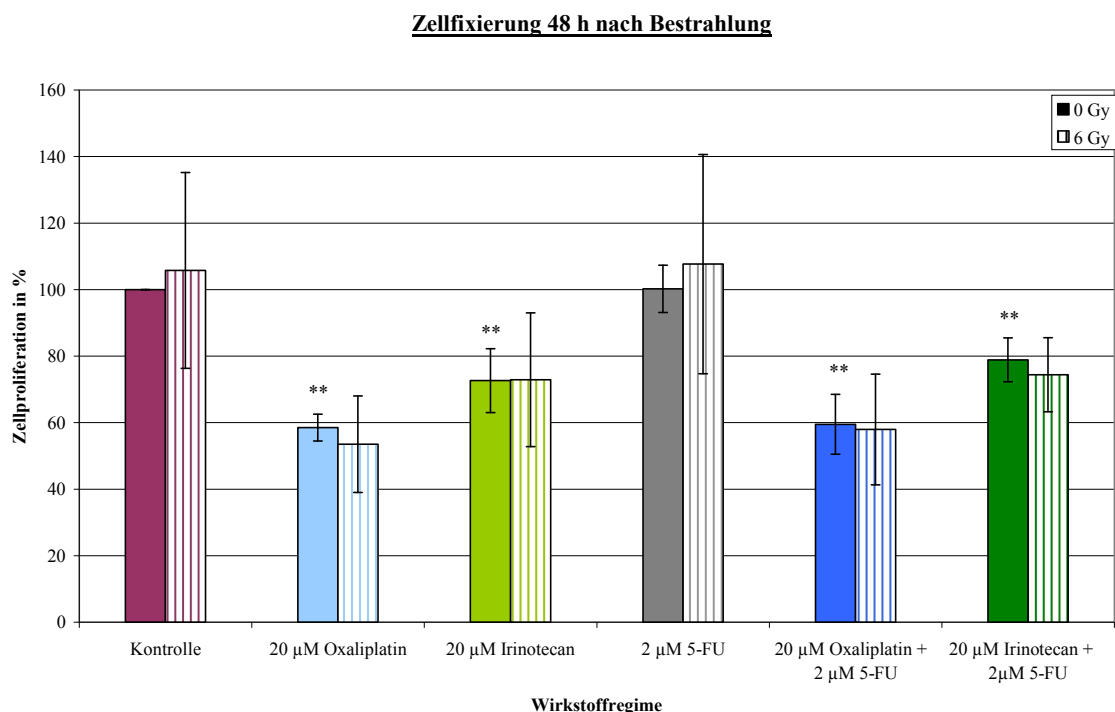


Abb. 27: BrdU-Einbau in die HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy, 48 h nach der Bestrahlung, mit fünf verschiedenen Wirkstoffregimen zzgl. der Kontrolle im Vergleich. BrdU-Einbauzeit 2,5 h. Einsaatdichte 2×10^3 Zellen/Well. Normierung auf die Kontrolle (Zellen ohne Wirkstoff, 0 Gy) 100 %. Darstellung von MW \pm SD (n = 4). ** $p \leq 0,01$ zur Kontrolle (0 Gy).

Auch nach 48 h war zu beobachten, dass unter unbestrahlten Bedingungen die Zugabe von Oxaliplatin und Irinotecan allein bzw. jeweils + 5-FU in einen signifikant verringerten BrdU-Einbau im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 μM , 0 Gy) resultierte. Unter der Behandlung mit Oxaliplatin sowie Irinotecan ließ sich eine geringere BrdU-Inkorporation im Vergleich zu deren jeweiligen Kombination mit 5-FU bei 0 Gy und bei 6 Gy nachweisen, welche allerdings nicht signifikant war. Die HT29-Zellen, die mit 5-FU alleine behandelt wurden, zeigten weder bei 0 Gy noch bei 6 Gy eine relevante Abnahme der Zellproliferation gegenüber des wirkstofffreien Kontrollansatzes. Auch ließ sich bei keinem Wirkstoffregime ein signifikanter Unterschied zwischen bestrahltem und unbestrahltem Ansatz nachweisen.

Wie bereits den Abb. 25 - 27 zu entnehmen, ergab sich kein signifikanter Unterschied für die Zellproliferation der bestrahlten HT29-Zellen zu der unbestrahlten Vergleichsgruppe.

In Abb. 28 wird nochmals übersichtlicher die Proliferationskapazität der HT29-Zellen unter Oxaliplatin- bzw. Irinotecan-Zugabe im zeitlichen Verlauf dargestellt.

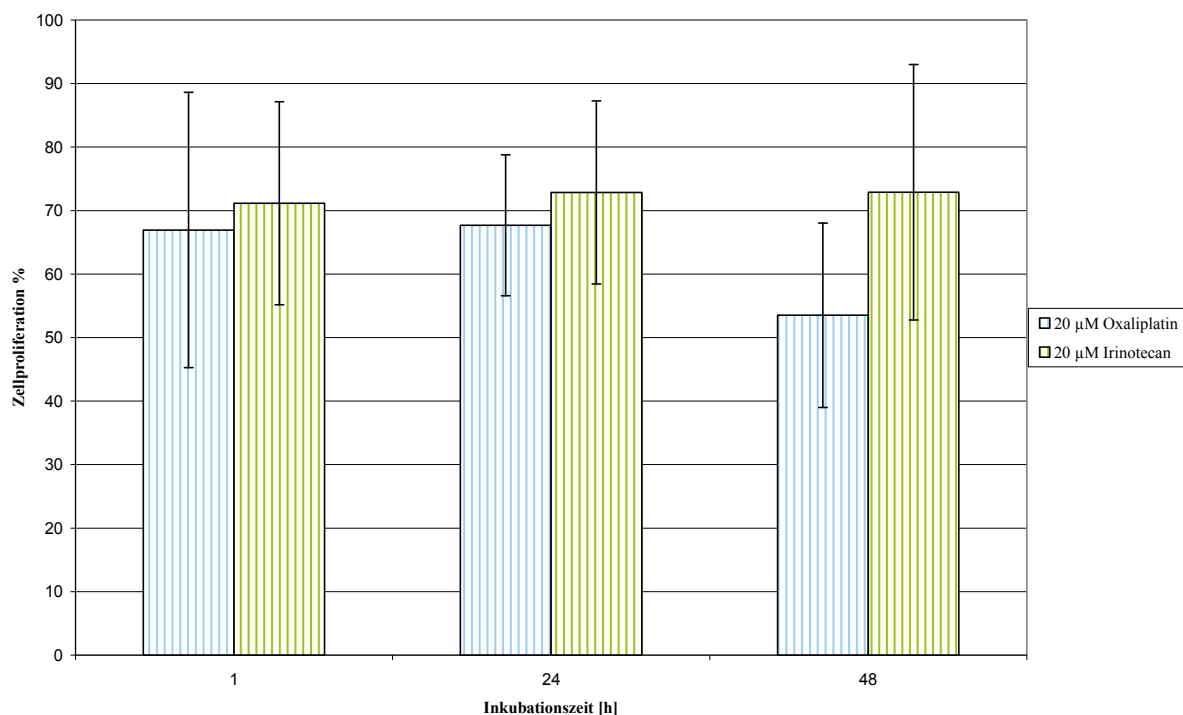


Abb. 28: BrdU-Einbau der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime Oxaliplatin und Irinotecan. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

Im Hinblick auf einen möglichen Unterschied in der Wirkung von Oxaliplatin vs. Irinotecan auf die bei 6 Gy bestrahlten HT29-Zellen zeigt das Diagramm 28, dass der BrdU-Einbau der

mit Irinotecan inkubierten gegenüber den mit Oxaliplatin behandelten Zellen (insbesondere nach einer Inkubationszeit von 48 h) höher war, ein signifikanter Effekt im Vergleich beider Wirkstoffe allerdings nicht vorlag.

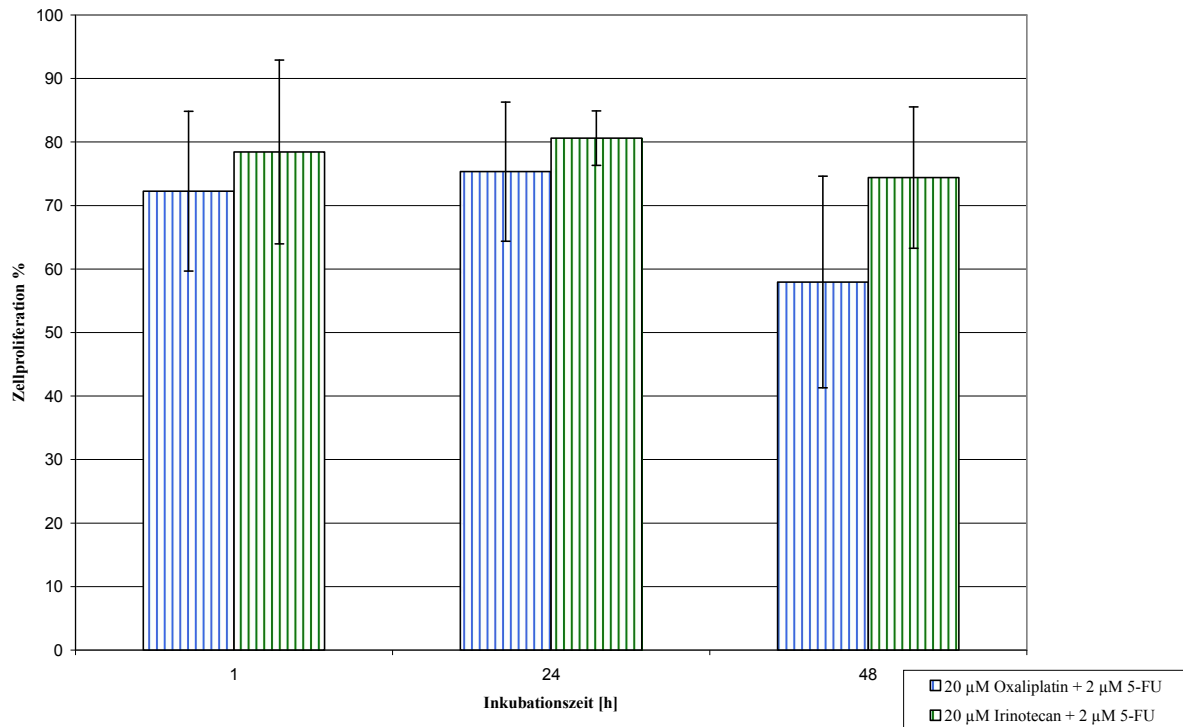


Abb. 29: BrdU-Einbau der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime Oxaliplatin + 5-FU und Irinotecan + 5-FU. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

In den folgenden Balkendiagrammen (Abb. 30 und 31) wurde die Zellproliferation [%] der bestrahlten HT29-Zellen unter der Zugabe von Oxaliplatin +/- 5-FU (Abb. 30) bzw. Irinotecan +/- 5-FU (Abb. 31) aufgetragen.

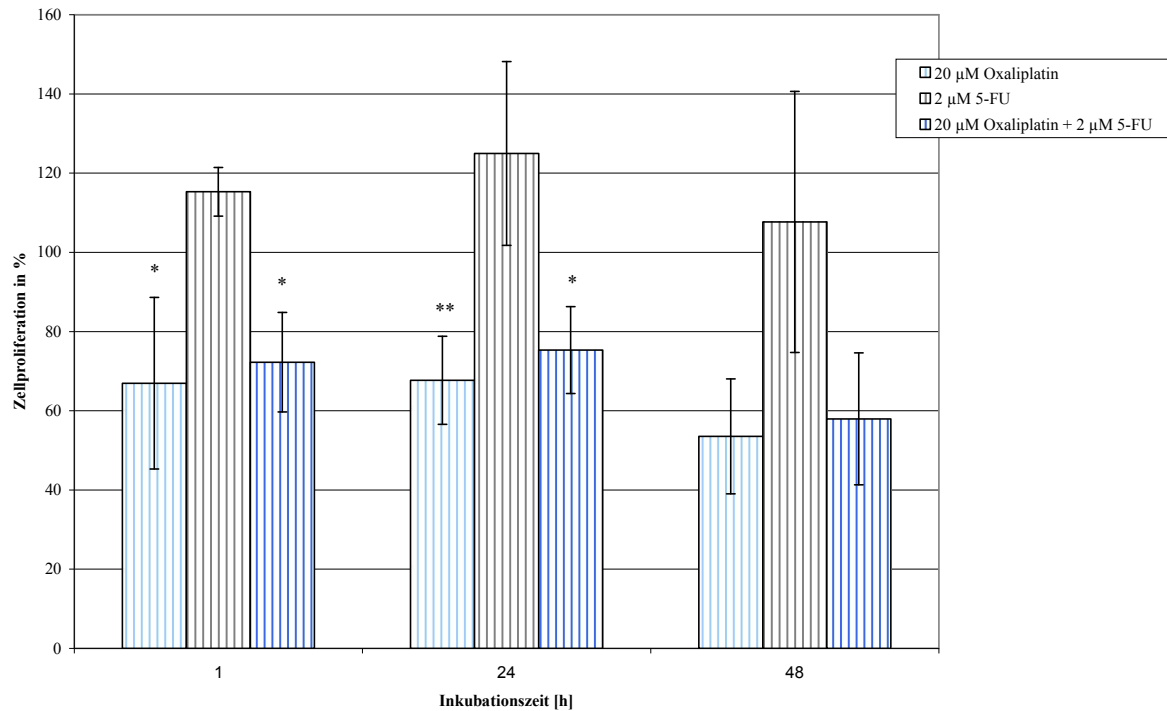


Abb. 30: BrdU-Einbau der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime 5-FU, Oxaliplatin und Oxaliplatin + 5-FU. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt. * $p \leq 0,05$ zu 5-FU, ** $p \leq 0,01$ zu 5-FU.

Abweichend zu den Ergebnissen der metabolischen Aktivität innerhalb der EZ4U-Tests (Abb. 23), geht aus der Abb. 30 eine signifikante Minderung der Tumorzellproliferation unter der Zugabe von Oxaliplatin (1 h: $p \leq 0,05$; 24 h: $p \leq 0,01$) sowie Oxaliplatin + 5-FU (1 h: $p \leq 0,05$; 24 h: $p \leq 0,05$) gegenüber 5-FU als Einzelwirkstoff hervor. 48 h nach der Bestrahlung ließ sich allerdings kein signifikanter Effekt der beiden o. g. Wirkstoffregime gegenüber der 5-FU-Einzelgabe mehr nachweisen.

In Abb. 31 zeigt sich unter der Strahlendosis von 6 Gy für Irinotecan (1 h: $p \leq 0,05$; 24 h: $p \leq 0,05$) bzw. Irinotecan + 5-FU (1 h: $p \leq 0,05$; 24 h: $p \leq 0,05$) ebenfalls eine signifikante Abnahme der Zellproliferation, gegenüber der alleinigen Behandlung mit 5-FU (1 h und 24 h). Nach einer Inkubationsdauer von 48 h blieb ein signifikanter Unterschied aus (siehe dazu auch Abb. 30 – Zellproliferation unter Oxaliplatin +/- 5-FU vs. 5-FU, 48 h))

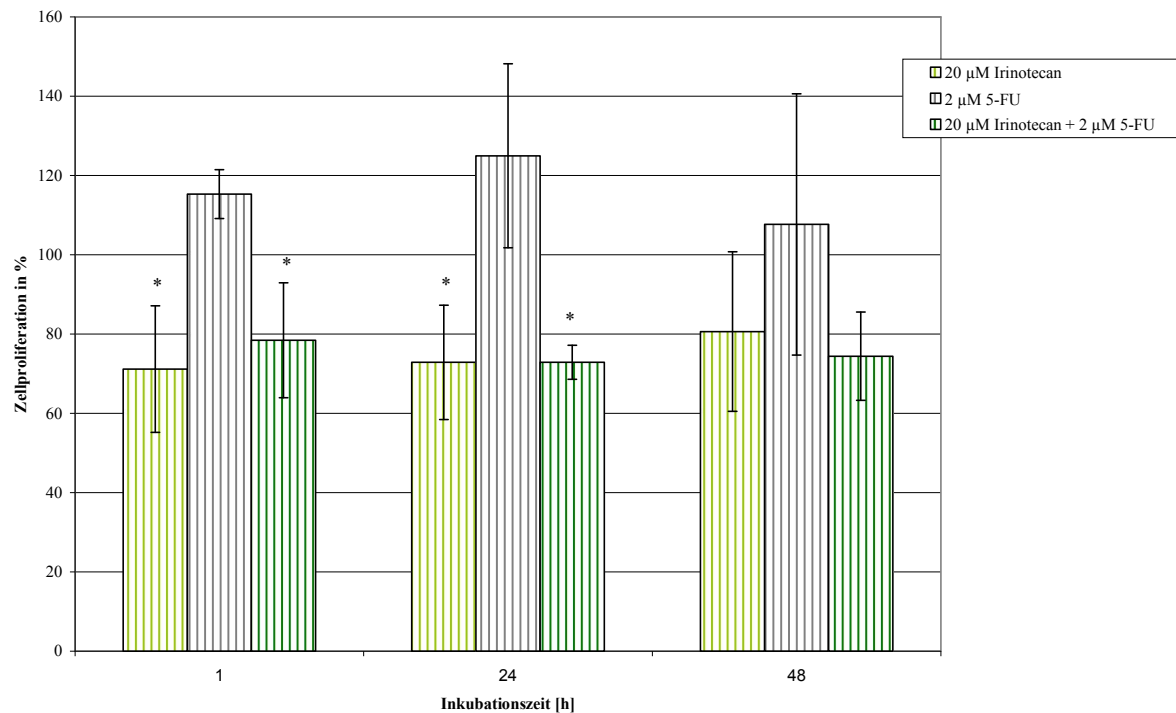


Abb. 31: BrdU-Einbau der HT29-Zellen zu verschiedenen Inkubationszeiten nach der Bestrahlung mit 6 Gy, für die Wirkstoffregime 5-FU, Irinotecan und Irinotecan + 5-FU. Die Standardabweichungen wurden anhand von drei unabhängigen Versuchen ermittelt. * $p \leq 0,05$ zu 5-FU, ** $p \leq 0,01$ zu 5-FU.

3.5 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Durchführung des λ -H2AX-Tests mit abschließender Ermittlung der Anzahl vorhandener residualer Foci je HT29-Zelle verfolgte mehrere Ziele. Zum einen wurde dieses Testverfahren gewählt um zu untersuchen, ob im Hinblick auf die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Wirkstoffregimen zu verzeichnen ist. Gleichzeitig war von Interesse, ob es zu einer Beeinträchtigung der Reparaturkapazität der Zellen nach Schädigung durch ionisierende Strahlung (6 Gy) kommen und ob sich zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Ansätzen ein möglicher Unterschied ausmachen lassen würde. Besondere Aufmerksamkeit richtete sich innerhalb dieser Arbeit darauf, ob sich zwischen dem Oxaliplatin- und dem Irinotecan-Ansatz ein signifikanter Unterschied unter Bestrahlungsbedingungen gegenüber den Ergebnissen bei Verzicht auf die Radiatio zeigen ließe.

Die folgenden Abbildungen 32 und 33 stellen exemplarisch das fluoreszenzmikroskopische Bild dar, das sich nach Präparation der Zellen und Markierung der DNA-Doppelstrangbrüche

mittels zweier monoklonaler Antikörpern zeigte. Die zur Auswertung zu bestimmenden roten Foci sind deutlich zu erkennen und in ihrer Anzahl direkt proportional zur Gesamtsumme der auftretenden residualen DNA-Doppelstrangbrüche (SEDELNIKOVA *et al.*, 2002).

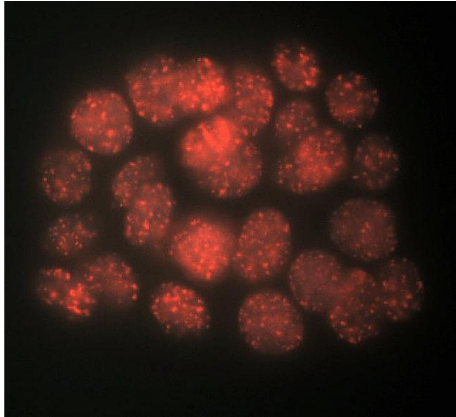


Abb. 32: „Foci“ in HT29-Zellen nach der Bestrahlung mit 6 Gy und einer Reparaturzeit von 1 h. 1000-fache Vergrößerung. Darstellung der DNA-Doppelstrangbrüche als rote „Foci“.

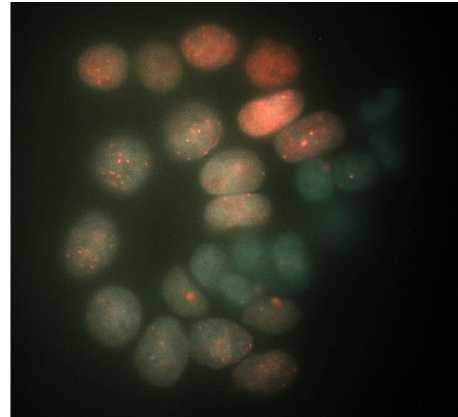


Abb. 33: „Foci“ in HT29-Zellen nach der Bestrahlung mit 6 Gy und einer Reparaturzeit von 24 h. 1000-fache Vergrößerung. Darstellung der Zellkerne blau (DAPI-Färbung) und der DNA-Doppelstrangbrüche als rote „Foci“.

Der Abb. 34 ist die mittlere Anzahl der Foci je HT29-Zelle zu entnehmen. Diese Anzahl ist proportional zur Gesamtzahl der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche je Zelle.

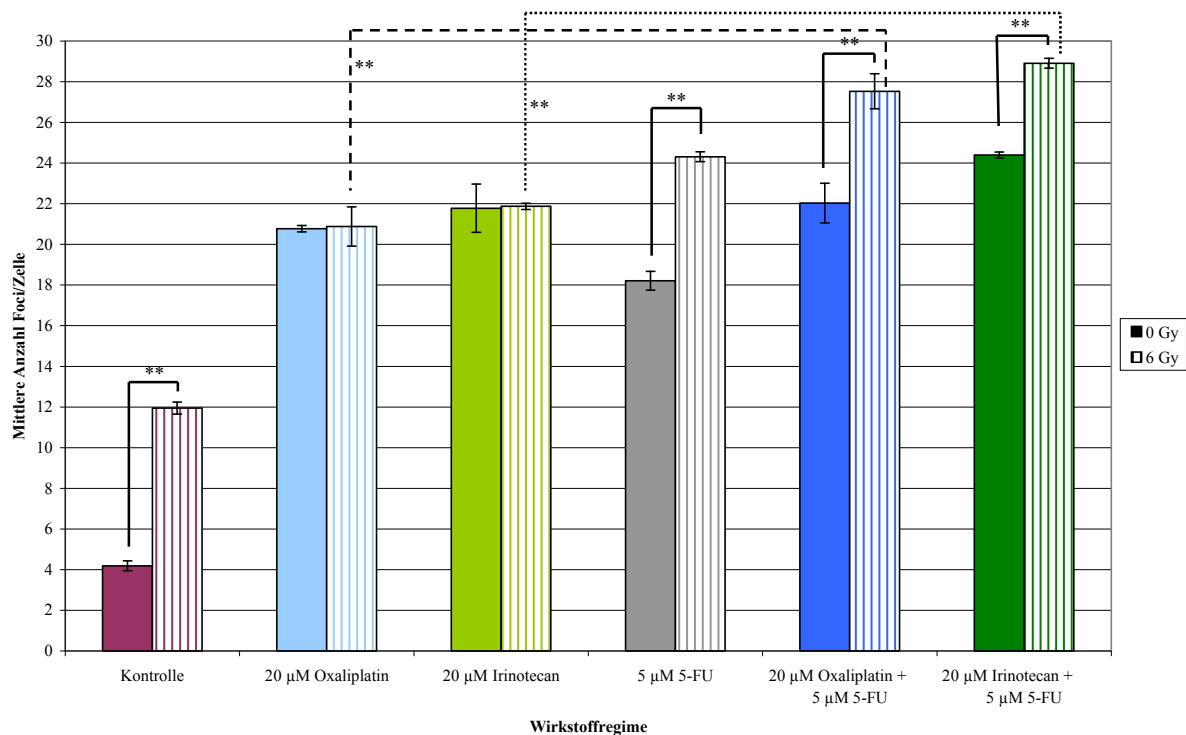


Abb. 34: Mittlere Foci-Anzahl pro HT29-Zelle bei 0 Gy und 6 Gy in Abhängigkeit fünf verschiedener Wirkstoffregime zzgl. der Kontrolle und einer Reparaturzeit von 24 h. Einsatzdichte $1,5 \times 10^3$ Zellen/ml. MW \pm SD (n = 3). ** p \leq 0,01.

Aus Abb. 34 geht hervor, dass bei 0 Gy durchschnittlich 4,2 DNA-Doppelstrangbrüche pro Zelle in den wirkstofffreien HT29-Zellen zu beobachten waren. Ebenfalls ist der Abb. 34 zu entnehmen, dass 24 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt die mittlere Anzahl der residualen Foci pro Zelle unter Radiatio bei jedem der sechs Versuchsansätze höher war, als in den Zellen des unbestrahlten Versuchsansatzes. Der größte Unterschied in der Zahl der DNA-Doppelstrangbrüche zwischen bestrahltem und unbestrahltem Ansatz zeigte sich für die ohne Wirkstoff behandelten Zellen der Kontrolle. Die mittlere Anzahl der Foci/Zelle lag bei 0 Gy mit 4,2 um 65 % unter dem Ergebnis der mit 6 Gy bestrahlten HT29-Zellen mit 11,9 Foci/Zelle. Die zweitgrößte Differenz im Hinblick auf den Vergleich zwischen Bestrahlung und Scheinbestrahlung, zeigte sich bei den Zellen des 5-FU-Versuchsaufbaus. Bei einer Strahlendosis von 6 Gy ließen sich nach der Fluoreszenzfärbung im Mittel 24,3 Foci/Zelle nachweisen. Ohne Bestrahlung lag die Zahl der Foci/Zelle mit 18,2 damit 35,1 % niedriger im Vergleich zum bestrahlten 5-FU-Ansatz.

An dritter Stelle folgte die Wirkstoffkombination Oxaliplatin + 5-FU mit gemittelt 27,5 Foci/Zelle (6 Gy) und 22,0 Foci/Zelle (0 Gy). Für diesen Vergleich ergab sich eine Signifikanz von $p \leq 0,01$. Irinotecan zeigte, die Differenz der Foci-Anzahl pro Zelle betreffend, den kleinsten Unterschied. Nach der Bestrahlung ließen sich gemittelt 28,9 Foci/Zelle (6 Gy) bzw. 24,4 Foci/Zelle (0 Gy) detektieren. Dabei handelte es sich ebenfalls um ein signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,01$).

Im Vergleich der DNA-Doppelstrangbrüche unter der Zugabe von Oxaliplatin und Irinotecan jeweils allein bzw. unter Kombination mit 5-FU zeigt sich ein signifikanter Unterschied. Für beide Kombinationsregime lag eine signifikant erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen im Vergleich zur Einzelwirkstoffgabe vor (siehe Abb. 31, gepunktete und gestrichelte Linie). Der Vergleich zu dem Ansatz mit einer einstündigen Reparaturzeit konnte leider nicht getroffen werden, da 1 h nach der Bestrahlung mehr als 30 DNA-Doppelstrangbrüche zu verzeichnen waren und somit eine sinnvolle Zählung dieser unmöglich war.

Zur besseren Übersicht wurden nochmals die einzelnen Wirkstoffregime der jeweiligen Kontrolle (0 Gy bzw. 6 Gy) in Abb. 35 gegenübergestellt.

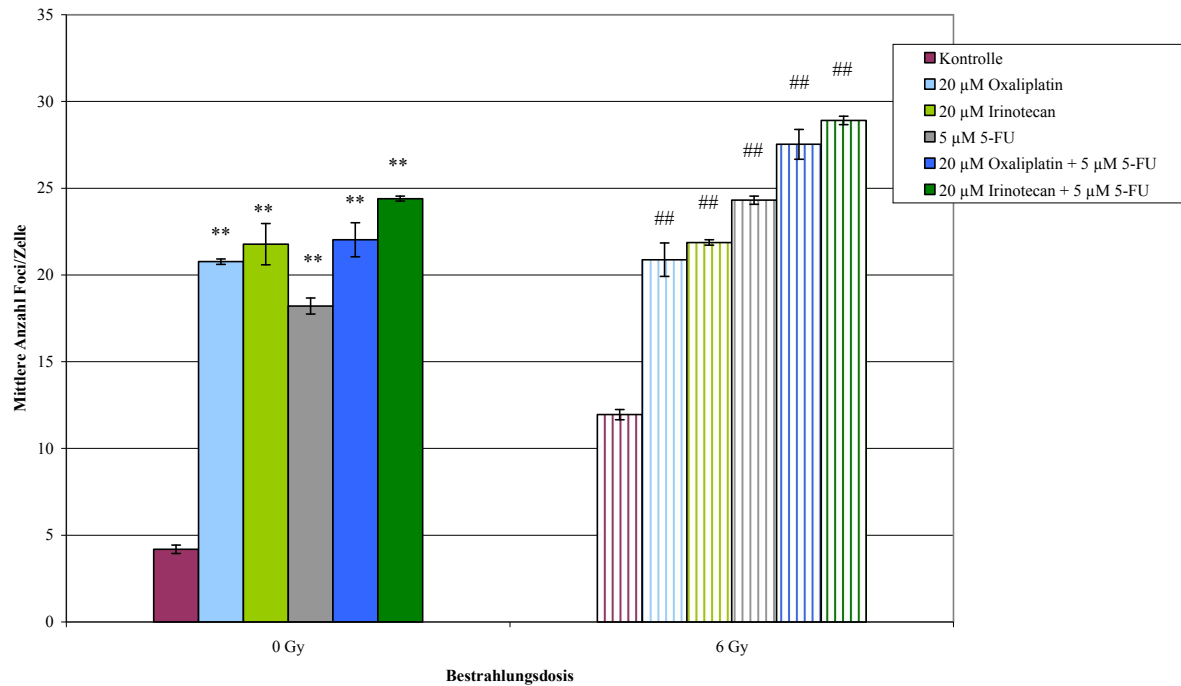


Abb. 35: Mittlere Foci-Anzahl pro HT29-Zelle bei 0 Gy und 6 Gy. Fünf verschiedene Wirkstoffregime im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (0 μM Wirkstoff). Reparaturzeit von 24 h. Einsaatdichte $1,5 \times 10^3$ Zellen/ml. MW \pm SD (n = 3). ** $p \leq 0,01$ im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (0 Gy, 0 μM Wirkstoff). ## $p \leq 0,01$ im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle (6 Gy, 0 μM Wirkstoff).

Unter unbestrahlten als auch bestrahlten Bedingungen ergab sich für die HT29-Zellen ein hochsignifikanter Unterschied zwischen allen verwendeten Wirkstoffregimen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (0 μM, 0 Gy vs. 0 μM, 6 Gy). Die größte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen in den Darmkrebszellen ließ sich unter der Behandlung mit den kombinierten Wirkstoffregimen Irinotecan + 5-FU bzw. Oxaliplatin + 5-FU innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe (+/- Radiatio) ausmachen.

4 Diskussion

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung der im klinischen Alltag bereits verwendeten Chemotherapeutika Oxaliplatin und Irinotecan, jeweils einzeln und in Kombination mit 5-Fluorouracil, im Hinblick auf ihre zytotoxische Wirkung sowie einen evtl. strahlensensibilisierenden Effekt auf die Darmkrebszelllinie HT29.

4.1 Wachstum

4.1.1 Wachstum unter nativen Bedingungen

Das Wachstum der HT29-Zellen konnte durch die Aufnahme einer nativen Wachstumskurve beurteilt werden. Die HT29-Zellen benötigten zur Verdopplung ihrer Zellpopulation im Durchschnitt 21,06 h. Damit lag die Populationsverdopplungszeit der HT29-Zelllinie in etwa im gleichen Bereich wie der von WARE *et al.* (2007) für die HT29-Zellen beschriebene Wert von 24,5 h - 29,8 h. Die in der vorliegenden Arbeit bestimmte Populationsverdopplungszeit der Tumorzellen lag jedoch unter dem durch die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) angegebenen Wert von 40 - 60 h. Ursächlich für die Differenzen können Umgebungsbedingungen, wie z. B. die Zusammensetzung des verwendeten Mediums und das genutzte FBS sein, welches je nach Charge ein unterschiedliches Proliferationspotential bedingen könnte. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Zellpopulationsverdopplungszeit ist der vorherrschende CO₂-Gehalt des Brutschrankes, welcher das Zellwachstum durch eine Veränderung des Medium-pH-Wertes während der Inkubation beeinflussen kann (LINDL, 2002). Auch die Tatsache, ob es sich um eine frühe oder fortgeschrittene Passage der HT29-Zellen handelt, kann das Wachstumsverhalten der Zellen in verschiedene Richtungen beeinflussen. Aus diesem Grunde wurden für diese Arbeit ausschließlich Zellen bis zur 30. Passage verwendet. Letztendlich ist die Zellpopulationsverdopplungszeit abhängig von der Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen. Diese unterscheiden sich sowohl von Spezies zu Spezies, als auch von Individuum zu Individuum (SCHMITZ, 2007).

Die durch die nativen Wachstumsversuche erhaltenen Referenzwerte können nun mit den jeweiligen Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten unter Wirkstoffzugabe verglichen und interpretiert werden.

4.1.2 Wachstum bei einmaliger 5-FU-Zugabe

Im Rahmen der Wachstumsversuche unter 5-FU-Zugabe konnte für die HT29-Zellen eine signifikante Hemmung ab der kleinsten verwendeten Wirkstoffkonzentration von 2 μM (entsprechend 0,26016 $\mu\text{g/ml}$) ab Tag 2 nachgewiesen werden (siehe Abb. 13).

Ein zytotoxischer Effekt unter der Zugabe von 5-FU in einer Konzentration von 5 $\mu\text{M/l}$ wurde bereits für die humanen Darmkrebszelllinien HCT116 (K-ras-Wildtyp) und X3-H83 beschrieben (EL-AWADY *et al.*, 2010).

Im Gegensatz zu den HT29-Zellen hiesiger Arbeit ergab sich in den Untersuchungen von LEE *et al.* (1990) kein signifikanter inhibitorischer Effekt auf das Wachstum der verwendeten humanen Fibroblasten der Tenonschen Kapsel (Teil des Bandapparates der Augen) unter 5-FU-Zugabe vor dem 5. Zähltag. Dabei wurden durch LEE *et al.* Wirkstoffkonzentrationen von 0,0001 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, wobei der inhibitorische Effekt auf das Wachstum ab einer 5-FU-Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ (ca. 7,7 μM , siehe Tab. 11, Anhang) nachweisbar war (5. Zähltag).

4.1.3 Wachstum bei einmaliger Oxaliplatin-Zugabe

Oxaliplatin konnte nachweislich das Wachstum der HT29-Zellen konzentrationsabhängig verlangsamen. So war bereits ab einer Wirkstoffdosis von 2 μM des Platinderivates eine signifikante Proliferationshemmung zu verzeichnen. In der vorliegenden Arbeit wurden Wirkstoffkonzentrationen zwischen 2 μM und 200 μM verwendet. Bei 5 μM sowie 10 μM war zwischen dem 2. - 4. Zähltag eine konzentrationsabhängige Hemmung, allerdings keine vollständige Stagnation des HT29-Zellwachstums zu beobachten und entsprach damit den Beobachtungen von WILLIAM-FALTAOS *et al.* (2007). Die Autoren untersuchten, ob die Wirkung von Oxaliplatin auf die vier unterschiedlichen Tumorzelllinien HT29, MCF7S, A49S und Hela zeitabhängig sei. Hierfür wurden die Zellen für 72 h mit Oxaliplatin inkubiert, danach erfolgte ein vollständiger Mediumwechsel, an welchen sich eine weitere Inkubationszeit von 24 h bzw. 72 h anschloss. Diese Postinkubationszeit wurde gewählt, um untersuchen zu können, ob die Wachstumshemmung als zellzyklusabhängig zu betrachten sei und ob es den Zellen im Anschluss an den G2/M-Arrest gelingen würde den Zellzyklus fortzusetzen oder in die Apoptose einzutreten. Unter der mittleren Oxaliplatindosis von 10 μM zeigte sich, dass die HT29-Zellen bei WILLIAM-FALTAOS *et al.* nach 72 h ihren Zellzyklus fortsetzen konnten.

In der Literatur wurden auch andere Ergebnisse beobachtet. Für HCT116-Zellen ergab sich unter der Behandlung mit 4 μM bzw. 8 μM Oxaliplatin, dass die Tumorzellen einen bis zum 7. Tag andauernden Zellzyklusarrest durchmachen, bevor sie ein erneutes stabiles Wachstum anschließen (HAYWARD *et al.*, 2004). Für eine Wirkstoffkonzentration von 8 μM zeigte sich in der Arbeit von HAYWARD *et al.* zwischen dem 2. und 4. Tag nach der Behandlung mit Oxaliplatin eine Abnahme der Zellzahl und somit eine vollständige Stagnation des Zellwachstums. Die abweichenden Untersuchungsergebnisse könnten zum einen darin begründet sein, dass in der vorliegenden Arbeit und den Untersuchungen von HAYWARD *et al.* unterschiedliche Tumorzelllinien verwendet wurden; zum anderen unterschieden sich die Inkubationszeiten mit Oxaliplatin. Die Inkubationszeit der HCT116-Zellen von HAYWARD *et al.* betrug 24 h, wohingegen die Zellen hiesiger Arbeit nur 2 h mit Oxaliplatin behandelt wurden.

Durch HAYWARD *et al.* wurden neben den HCT116-wt-Zellen (= Wildtyp) ebenfalls p53-, BAX- und p21-negative HCT116-Zellen untersucht. BAX sowie p53 spielen eine wichtige Rolle bei der Einleitung der Apoptose. p53 fungiert als Tumorsuppressor und sorgt als „Wächter des Genoms“ dafür, dass sich Zellen nur dann teilen, sofern deren Erbgut intakt ist. Da dies bei Tumorzellen nicht der Fall ist, induziert p53 einen Zellzyklusarrest sowie die Einleitung der Apoptose. So unterliegt die Expression des Apoptose-Regulator-Proteins BAX der Induktion durch p53. BAX wiederum löst über eine Signalkaskade Caspasen aus und führt so zum programmierten Zelltod (YU *et al.*, 1999). Auch induziert p53 als Transkriptionsfaktor die Produktion des Proteins p21, welches über eine Hemmung des D-Cyclin/CDK4/6- und des Cyclin E/CDK2-Komplexes den Übergang vom G0- in das G1-Stadium und somit den weiteren Zellzyklus hemmt.

Diese Wirkung machten sich HAYWARD *et al.* für ihre Untersuchungen zu Nutze. Zusammenfassend beobachteten die Autoren eine Minderung der Apoptoserate in BAX- sowie p53-negativen Zellen. Als ursächlich für diesen Effekt sahen HAYWARD *et al.* an, dass Oxaliplatin zum einen p53 induziert und zum anderen p53-abhängig zur intrazellulären Akkumulation von BAX sowie p21 führt.

4.1.4 Wachstum bei einmaliger Irinotecan-Zugabe

Für die HT29-Zellen zeigte sich innerhalb dieser Arbeit unter der Zugabe des Topoisomerase-Hemmers Irinotecan eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl. So war eine Wachstumshemmung ab einer Wirkstoffkonzentration von 2 μM Irinotecan mit Beginn des 2. Zähltages zu verzeichnen. Nach der Zugabe von 50 μM Irinotecan kam es zu einer annähernden Stagnation des Zellwachstums; Irinotecan-Konzentrationen von 100 μM bis 200 μM führten zu einer abfallenden Zellzahl/ml.

Auch MANS *et al.* (1999) beschrieben in ihren Untersuchungen eine konzentrationsabhängige Wachstumshemmung auf die humanen Darmkrebszelllinien HT29, SW620 und SNU-C4 unter der Zugabe von Irinotecan, obwohl die Tumorzellen für einen Zeitraum von 24 h mit Irinotecan inkubiert wurden und die Analyse erst nach einem anschließenden Mediumwechsel nach weiteren 48 h erfolgte.

4.2 Klonogenes Überleben

Zur Charakterisierung des durch Bestrahlung verursachten Effektes auf die HT29-Zellen unter gleichzeitiger Chemotherapeutikazugabe bzw. bei Verzicht auf eine solche, wurden Koloniebildungstests mit verschiedenen Regimen durchgeführt. Die dafür genutzten Wirkstoffkonzentrationen lagen bei 2 μM (5-FU) und 20 μM (Oxaliplatin, Irinotecan). Die verwendeten Strahlendosen betragen 0, 2, 4, 6 und 8 Gy.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich im Rahmen der chemotherapeutisch unbehandelten Kontrolle (0 μM) eine Abnahme des Zellüberlebens mit zunehmender Strahlendosis. Die Überlebensfraktion der Kontrolle (0 μM) war von 100 % (0 Gy) über 84,1 % (2 Gy), 52,6 % (4 Gy) und 23,6 % (6 Gy) auf 8,9 % unter der höchsten Bestrahlungsdosis von 8 Gy abfallend.

Die Plattiereffizienz der unbehandelten HT29-Zellen (0 Gy, 0 μM Wirkstoff) der hier angefertigten Arbeit entsprach mit 48,92 % der höchsten Koloniebildungsfähigkeit innerhalb des gesamten Experimentes. Dementsprechend waren ohne Einfluss von Bestrahlung und Wirkstoff von $1,5 \times 10^3$ eingesäten HT29-Zellen 48,92 % fähig, eine Kolonie (≥ 50 Zellen) zu bilden. WARE *et al.* (2007) ermittelten in ihren Untersuchungen für die unbehandelte Kontrolle eine PE von 26,2 - 48,3 % für die HT29-Zellen. Mit einer durchschnittlichem PE

von 48,92 % (SD \pm 6,28 %) in dieser Arbeit konnten die Ergebnisse von WARE *et al.* damit bestätigt werden.

Die strahlendosisabhängige Reduktion der Plattiereffizienz und somit der Koloniebildungsfähigkeit der chemotherapeutisch unbehandelten HT29-Zellen wurde ebenfalls durch DUNNE *et al.* (2003) sowie FOLKVORD *et al.* (2008) beschrieben. Die Überlebensfraktion von $0,84 \pm 0,03$ der bei 2 Gy bestrahlten HT29-Zellen (0 μ M) hiesiger Arbeit lag zwischen den publizierten Überlebensfraktionen von $0,88 \pm 0,02$ (FOLKVORD *et al.*, 2008) und $0,72 \pm 0,29$ (DUNNE *et al.*, 2003). Weiterhin wurde durch FOLKVORD *et al.* ein Rückgang der Überlebensfraktion auf $0,52 \pm 0,03$ unter einer Bestrahlungsdosis von 5 Gy nachgewiesen. Da in den aktuell hier durchgeführten Untersuchungen ausschließlich Strahlendosen von 2, 4, 6 und 8 Gy Verwendung fanden, wurden zur Orientierung die Überlebensfraktionen unter einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy ($0,52 \pm 0,07$) und 6 Gy ($0,23 \pm 0,07$) zum Vergleich herangezogen. Dabei war ersichtlich, dass innerhalb der durchgeführten Untersuchungen in der hier vorliegenden Arbeit bereits bei der niedrigeren Strahlendosis von 4 Gy das klonogene Überleben der Zellen im gleichen Maße gemindert wurde, wie unter der Dosis 5 Gy bei FLATMARK *et al.* beschrieben. Die abweichenden Ergebnisse könnten durch die unterschiedlich gewählten Inkubationszeiten von 14 bzw. 12 Tagen nach dem vollständigen Mediumwechsel bedingt sein. In Anbetracht dessen, dass die Größe der Kolonien von Tag 12 zu Tag 14 besonders stark zunimmt, ist leicht erklärbar, weshalb im Versuchsansatz mit einer Inkubationszeit von zehn Tagen (FOLKVORD *et al.*, 2008) weniger Kolonien gezählt wurden. Ausschließlich die länger inkubierten Ansätze (14 Tage) erreichten die geforderte Anzahl von 50 Zellen, um in den hier vorgestellten Untersuchungen als Kolonie zu gelten.

Neben den Ansätzen mit alleiniger Bestrahlung wurde, wie bereits oben aufgeführt, der Effekt von 5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan sowie deren Kombination (Oxaliplatin + 5-FU, Irinotecan + 5-FU) auf die Strahlensensibilität der HT29 Zellen untersucht. Für alle Wirkstoffregime konnte ein zytotoxischer und ebenfalls ein strahlensensibilisierender Effekt nachgewiesen werden (vgl. Tab. 11). Sowohl in den Versuchsansätzen mit der Zugabe eines einzelnen Wirkstoffes (5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan), als auch in den Ansätzen mit kombinierter Wirkstoffzugabe (Oxaliplatin + 5-FU, Irinotecan + 5-FU), konnte bereits ab einer Strahlungsdosis von 2 Gy eine strahlensensibilisierende Wirkung beobachtet werden.

So ergab sich unter 5-FU-Zugabe ein Abfall der Überlebensfraktion über 100 % (0 Gy), 70,8 % (2 Gy), 30,1 % (4 Gy), 12,5 % (6 Gy) auf 3,1 % (8 Gy). Eine dosisabhängige

Reduktion des Zellüberlebens unter der Zugabe von 5-FU ohne gleichzeitige Bestrahlung wurde durch EL-AWADY *et al.* (2010) bereits für die Darmkrebszelllinie HCT-116 beschrieben.

Auch zeigte sich ein signifikanter Effekt auf die Überlebensfraktion der Tumorzellen unter alleiniger Zugabe des Platinderivates Oxaliplatin ab einer Strahlendosis von 2 Gy. Für Oxaliplatin fiel die Überlebensfraktion von 100 % bei 0 Gy über 66,0 % (2 Gy), 31,7 % (4 Gy) und 9,2 % (6 Gy) auf 3,5 % bei 8 Gy ab.

Die Überlebensfraktion unter der Behandlung mit Irinotecan sank von 100 % bei 0 Gy auf 59,7 % (2 Gy), 27,8 % (4 Gy) und 10,4 % (6 Gy) auf 2,0 % bei einer Bestrahlungsdosis von 8 Gy.

Es zeigte sich, dass bis zu einer Bestrahlungsdosis von 4 Gy die Überlebensfraktionen unter Irinotecan-Zugabe niedriger waren als die unter Oxaliplatin-Zugabe. Bei 6 Gy kehrte sich dieser Effekt um und die Überlebensfraktion der Zellen unter Einfluss von Irinotecan lag mit 10,52 um 1,19 über jener Überlebensfraktion nach Oxaliplatin-Zugabe.

Zusammenfassend konnte für jedes der drei verwendeten Einzelchemotherapeutika ein strahlensensibilisierender Effekt nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied der drei Versuchsansätze untereinander war jedoch für keine der Bestrahlungsdosen zu erfassen.

Ein strahlensensibilisierender Effekt kann verschiedene Ursachen haben. Er kann damit in Verbindung stehen, dass Chemotherapeutika unter anderem die Fähigkeit besitzen Tumorzellen in strahlensensibleren Zellzyklusphasen verweilen zu lassen und die Zellen somit empfindlicher für die Induktion von Strahlenschäden zu machen (SEIWERT *et al.*, 2007). Dass die Strahlenempfindlichkeit der Zellen abhängig von der vorherrschenden Zellzyklusphase ist, ist allgemein bekannt (TERASIMA AND TOLMACH, 1963; DEWEY *et al.*, 1972; OKAYASU *et al.*, 1988;). So zeigte sich z. B. unter der Zugabe von Oxaliplatin für Darmkrebszellen des Typs HCT116 ein unmittelbarer Arrest der Zellen in der G1-Phase, gefolgt von einer Anhäufung der Zellen in der G2/M-Phase (ARANGO *et al.*, 2004; VOLAND *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der Untersuchung von KJELLSTRÖM *et al.* ließen erstmalig vermuten, dass Oxaliplatin ein besserer Radiosensitizer sein könnte als 5-FU. So beschrieben KJELLSTRÖM *et al.* (2005), dass die Ergänzung der Chemotherapie mit Oxaliplatin bzw. 5-FU in Kombination mit ionisierender Strahlung jeweils zu einer Abnahme des Zellüberlebens führte. Zur Ermittlung des strahlensensibilisierenden Effektes der genutzten S1-

Darmkrebszellen wurde hierfür die Zellüberlebensfraktion bei 0 Gy zunächst normiert. KJELLSTRÖM *et al.* beobachteten, dass Oxaliplatin einen stärkeren radiopotenzierenden Effekt auf die S1-Tumorzelllinie hatte als 5-FU (ebenfalls als Monochemotherapeutikum genutzt). Diese Beobachtung unterscheidet sich von den Ergebnissen dieser Arbeit. In den durchgeführten Experimenten zum klonogenen Überleben (vgl. Abb. 15) zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Strahlensensibilisierung zwischen den mit Oxaliplatin- und 5-FU-behandelten Zellen.

Der durch 5-FU-Zugabe verursachte inhibitorische Effekt auf das Überleben der bestrahlten HT29-Zellen wurde durch die Kombination mit Oxaliplatin verstärkt. So kam es zu einem Absinken der Überlebensfraktion unter der Zugabe des kombinierten Wirkstoffregimes (Oxaliplatin + 5-FU) bei gleichzeitiger Bestrahlung um 4,37 % (2 Gy), 23,0 % (4 Gy), 38,9 % (6 Gy) und 80,6 % unter der höchsten Strahlendosis von 8 Gy (siehe Abb. 38, Anhang).

Der deutliche zytotoxische Effekt, der unter der kombinierten Zugabe von Irinotecan und 5-FU zu beobachten war (GRIVICICH *et al.*, 2005), ist vergleichbar mit der nachgewiesenen verminderten Koloniebildungsfähigkeit der HT29-Zellen dieser Arbeit.

Eine Behandlung der HT29-Zellen mit dem Kombinationsregime Irinotecan + 5-FU im Vergleich zu den jeweiligen Wirkstoffen allein (siehe Abb. 37 + 39, Anhang) hatte ein signifikantes Absinken der Überlebensfraktion von 100 % (0 Gy) auf 62,7 % (2 Gy), 24,9 % (4 Gy) und 4,9 % (6 Gy) zur Folge. Wobei unter einer Behandlung der HT29-Zellen mit Irinotecan + 5-FU zzgl. einer simultanen Bestrahlung mit 8 Gy keine Kolonien mehr nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Untersuchungen von GRIVICICH *et al.* (2005). Die Autoren begründeten die verminderte Koloniebildungsfähigkeit damit, dass es unter der Wirkstoffgabe von Irinotecan, gefolgt von 5-FU, zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt. Dieser Effekt wiederum aktiviert die Initiator-Caspase-9 und die Effektor-Caspase-3, welche die Apoptose einleiten. Bereits im Vorfeld zeigten diverse Untersuchungen, dass eine Abnahme des Membranpotentials der Mitochondrien die Einleitung der Apoptose durch eine Freisetzung von Cytochrom C und eine Aktivierung der Effektor-Caspase-3 kennzeichnet (MARCHETTI *et al.*, 1996; HEERDT *et al.*, 1998; SLEE *et al.*, 1999).

Insgesamt konnten die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit einen signifikanten zytotoxischen und strahlensensibilisierenden Effekt der verwendeten Wirkstoffkombination

im Vergleich zu den Einzelregimen belegen. Es war jedoch kein signifikanter Wirkunterschied im Vergleich zwischen Oxaliplatin und Irinotecan bzw. dieser beiden Wirkstoffe in Kombination mit 5-FU zzgl. einer Bestrahlung nachweisbar.

4.3 Metabolische Aktivität

Die metabolische Aktivität der HT29-Zellen wurde in fünf Wirkstoffregimen zzgl. der Kontrolle, Strahlendosen von 0 Gy sowie 6 Gy und insgesamt drei verschiedenen Inkubationszeiten getestet.

Die Auswertung der nach 1 h, 24 h und 48 h gemessenen unbestrahlten Versuchsansätze zeigte im Vergleich zu den Tumorzellen des Kontrollansatzes (0 Gy, 0 μ M) im Hinblick auf die Einzelanwendung der Wirkstoffe eine signifikante Minderung der metabolischen Aktivität der HT29-Zellen von 18 % (1 h; $p \leq 0,01$) und 13 % (48 h; $p \leq 0,05$) durch Oxaliplatin, und 16 % (1 h; $p \leq 0,05$) unter Irinotecan-Zugabe. Dieser Effekt wurde ebenfalls für Rat-1-Zellen (Fibroblasten) beschrieben, für welche unter Irinotecan eine signifikante Reduktion der Viabilität ab einer Wirkstoffdosierung von 50 μ M beobachtet wurde (AKAGI *et al.*, 2008).

Für die alleinige Anwendung von 5-FU zeigte sich nach keiner der drei Messzeitpunkte ein signifikanter zytotoxischer Effekt gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (0 Gy, 0 μ M). Ganz im Gegenteil, die metabolische Aktivität der HT29-Zellen war unter der 5-FU-Zugabe sowohl für den unbestrahlten, als auch für den bestrahlten Ansatz nach 1 h und nach 24 h erhöht gegenüber der Aktivität der Kontrolle.

Für die humanen Darmkrebszelllinien HCT-8 sowie HCT-116 wurde eine Reduktion der Zellviabilität unter der Gabe von Oxaliplatin bzw. 5-FU nach einer Inkubationszeit von 72 h beschrieben (ZHOU *et al.*, 2009). Dabei untersuchten die Autoren in ihrer Arbeit den Einfluss von Oxaliplatin und 5-FU auf die Expression verschiedener microRNAs der HCT-8- und HCT-116-Zellen und somit den Effekt auf die Genregulation dieser Darmkrebszellen. Es wurde eine signifikante Downregulation von sechs möglicherweise als Onkogen agierenden microRNAs (miR-197, miR-191, miR-92a, miR-93, miR-222, miR-1826) beider Tumorzelllinien unter Einfluss von Oxaliplatin bzw. 5-FU und eine ggf. darauf zurückzuführende Minderung der metabolischen Tumorzellaktivität beobachtet.

Wie bereits oben erwähnt zeigte sich die metabolische Aktivität der HT29-Zellen in der hier vorliegenden Arbeit nach 1 h und 24 h erhöht gegenüber der metabolischen Aktivität der Kontrolle unter 5-FU-Zugabe. In der Literatur wurden für S1-Darmkrebszellen auch andere Ergebnisse beobachtet, wonach sich die Zellviabilität mit steigender Wirkstoffkonzentration von 5-FU bzw. Oxaliplatin abnehmend zeigte (KJELLSTRÖM *et al.*, 2005). Weiterhin ergab sich in den Untersuchungen von KJELLSTRÖM *et al.*, dass nach einer Inkubationszeit von 24 h die zum Erreichen derselben Zytotoxizitätstärke benötigte 5-FU-Konzentration ca. 6- bis 14-fach niedriger war als bei einer Inkubationsdauer der S1-Zellen für 1 h. Die Autoren verwendeten für ihre Versuche bei einer Inkubationszeit von 24 h Wirkstoffkonzentrationen von 0 - 10 µg/ml 5-FU. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Wirkstoffkonzentrationen von 0 - 200 µM 5-FU, entsprechend 0 - 0,26 mg/ml (siehe Tab. 11, Anhang) lagen deutlich über den durch KJELLSTRÖM *et al.* genutzten Konzentrationen. Weiterhin erfolgte im Gegensatz zu KJELLSTRÖM *et al.* kein Mediumwechsel während der fünftägigen Inkubationsdauer.

Für die Kombinationsregime stellte sich eine signifikante Minderung der metabolischen Aktivität der Tumorzellen sowohl unter der Zugabe von Oxaliplatin + 5-FU (1 h: $p \leq 0,01$; 24 h: $p \leq 0,05$; 48 h: $p \leq 0,01$), als auch unter Verwendung von Irinotecan + 5-FU (1 h: $p \leq 0,01$) im Vergleich zur Kontrolle (0 Gy, 0 µM) heraus. Dahingegen zeigte sich für die unbestrahlten Versuchsansätze im Vergleich der Einzelwirkstoffregime (Oxaliplatin oder Irinotecan) und deren jeweiliger Kombination mit 5-FU kein signifikanter Effekt auf die metabolische Aktivität.

Für die Versuchsansätze Oxaliplatin, Irinotecan und Oxaliplatin + 5-FU zzgl. Radiatio überstieg die metabolische Aktivität der bei 6 Gy bestrahlten HT29-Zellen 1 h nach der Radiatio die metabolische Tumorzellaktivität des unbestrahlten Vergleichsansatzes (0 Gy, + Wirkstoff) um 4,06 % (20 µM Oxaliplatin), 2,37 % (20 µM Irinotecan) und 1,90 % (20 µM Oxaliplatin + 2 µM 5-FU). Dieser Effekt erscheint auf den ersten Blick ungewöhnlich, könnte allerdings durch die Tumorzellschädigung während der Bestrahlung erklärt werden, in deren Folge eine Stoffwechselaktivierung der HT29-Zellen in Betracht kommt.

Weiterhin blieb auch ein signifikanter Effekt auf die metabolische Aktivität im Vergleich zwischen den Zellen der Ansätze 5-FU bei 0 Gy und bei 6 Gy aus. Auch für Oxaliplatin bzw. Irinotecan ergab sich kein zusätzlicher signifikanter Wirkeffekt unter Strahlenwirkung.

Für keine der drei Inkubationszeiten konnte ein signifikanter Unterschied in der metabolischen Aktivität zwischen den nur mit Oxaliplatin behandelten Zellen gegenüber den mit Irinotecan inkubierten Zellen ausgemacht werden (jeweils unter Verzicht auf Radiatio). Auch die zusätzliche Kombination beider Wirkstoffe mit 5-FU führte zu keinem deutlichen Effekt (ohne Radiatio). Ebenfalls war keine signifikante Differenz der metabolischen Aktivität durch eine zusätzliche Strahlenwirkung auf den Oxaliplatin- verglichen mit dem Irinotecan-Ansatz mit und ohne 5-FU nachweisbar.

KJELLSTRÖM *et al.* (2005) beschrieben einen deutlichen synergistischen zytotoxischen Effekt von Oxaliplatin + 5-FU in Kombination im Vergleich zu Oxaliplatin allein auf die S1-Tumorzelllinie. Auch zeigten frühere Studien *in vivo* und *in vitro* für die Darmkrebszelllinie PC/AA/C1 und die tumorigenen MDCK-Nierenepithelzellen einen deutlichen synergistischen Effekt auf das Überleben sofern Oxaliplatin mit 5-FU kombiniert wurde (FISCHEL *et al.*, 1998), (RAYMOND *et al.*, 1997). Es wird angenommen, dass Oxaliplatin den Komplex aus dem aktiven 5-FU-Metaboliten 5-Fluordesoxiuridinmonophosphat (F-dUMP) und der Thymidylat-Synthase stabilisieren und den Einbau von 5-FU in die RNA beeinflussen könnte. Ein Mechanismus von F-dUMP ist es, an die Thymidylat-Synthase zu binden und diese nachfolgend zu hemmen. Dies führt letztlich dazu, dass die DNA-Synthese und somit die Zellteilung inhibiert werden (FISCHEL *et al.*, 1998).

Ein signifikanter zytotoxischer Effekt unter der Kombination von Oxaliplatin + 5-FU im Vergleich zu Oxaliplatin als Monochemotherapeutikum ließ sich, wie weiter oben beschrieben, in der hier vorliegenden Arbeit nicht nachweisen.

Dies könnte durch die Versuchsergebnisse erklärt werden, die für 5-FU in Kombination mit Cisplatin in der Literatur erhoben wurden. So untersuchten ESAKI *et al.* (1992) den Einfluss von 5-FU auf Cisplatin-induzierte DNA-Veränderungen und die damit einhergehende Zytotoxizität des Platinderivats. ESAKI *et al.* beschrieben eine Verstärkung des zytotoxischen Effektes von Cisplatin auf die HST-1-Plattenepithelkarzinomzelllinie, sofern die Tumorzellen initial mit 5-FU inkubiert und Cisplatin erst im Anschluss hinzugegeben wurde. Betrug das Intervall zwischen den Wirkstoffzugaben 24 h, stellte sich der maximale zytotoxische Effekt ein. Im Gegensatz dazu wurde die Zytotoxizität von Cisplatin vermindert, sofern das Platinderivat zeitlich vor 5-FU zugesetzt wurde. Diese Beobachtungen von ESAKI *et al.* ließen darauf schließen, dass 5-FU die Reparatur der durch Cisplatin verursachten DNA-Veränderungen beeinflusst und so die Zytotoxizität von Cisplatin vermindert haben könnte.

Da in der hier vorliegenden Arbeit die 5-FU-Behandlung erst nach der Oxaliplatin-Zugabe erfolgte (siehe Abb. 9, Material und Methoden), könnte oben beschriebener Effekt bei der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit von Cisplatin und Oxaliplatin durchaus als ursächlich für den fehlenden signifikanten zytotoxischen Effekt auf die HT29-Zellen unter dem Kombinationsregime Oxaliplatin + 5-FU angenommen werden.

4.4 Zellproliferation

Die BrdU-Einlagerung der unbestrahlten Zellen war unter der Zugabe von Oxaliplatin bzw. Irinotecan als Monotherapie gegenüber dem BrdU-Einbau der wirkstofffreien Kontrolle zu jedem der drei Messzeitpunkte signifikant erniedrigt ($p \leq 0,01$). Ursache könnte, wie bereits unter Kap. 4.2 beschrieben, ein G1-Arrest der mit Oxaliplatin behandelten Zellen sein. Dies würde zu einem Absinken des prozentuellen Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase befinden führen. Folglich stünden in der Synthesephase weniger Zellen zum Einbau von BrdU zur Verfügung, sodass sich die Proliferationsfähigkeit reduzieren würde.

Unter Oxaliplatin zeigte sich in der Literatur auch für andere Zellen, wie z. B. die Ovarialkarzinomzelllinie A2780 und die Zelllinien ADDP sowie LoVo-Li eine Akkumulation in einer bestimmten Zellzyklusphase. Die A2780-Zellen arretierten in der G2/M- und die ADDP- bzw. LoVo-Li-Zellen in der G1-Phase (NOORDHUIS *et al.*, 2008).

Auch LI *et al.* (2007) konnten einen inhibitorischen Effekt von Oxaliplatin auf die Proliferation der LoVo-Zelllinie ab einer Wirkstoffkonzentration von 2,5 μM nachweisen. Als ursächlich diskutierten LI *et al.* eine mögliche Hemmung körpereigener Enzyme aus der Gruppe der Poly(ADP-ribose)-Polymerasen (PARP), welche an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Die Hauptwirkung dieser Proteinfamilie besteht darin, mittels Katalyse der ADP-Ribosylierung von Chromatinproteinen, DNA-Reparaturmechanismen zu initiieren. Die Hemmung des Enzyms PARP-1 z. B. führt dazu, dass Brüche in einzelsträngiger DNA nur noch mittels homologer Rekombination behoben werden können. Da in Krebszellen häufig die homologen Rekombinationsmechanismen defekt sind, sterben Tumorzellen durch eine Hemmung von PARP-1 ab. Mittels Westernblot-Analyse konnten LI *et al.* eine dosisabhängige Steigerung der PARP-Spaltung nach der Zugabe von Oxaliplatin in den LoVo-Zellen nachweisen.

Unter Einfluss von 5-FU blieb ein deutlicher Effekt auf die Proliferation der unbestrahlten Zellen gegenüber der Kontrolle (0 μ M, 0 Gy) aus. Doch es ist zu erwähnen, dass die Proliferationsrate der HT29-Zellen unter 5-FU-Zugabe, gegenüber der des Kontrollansatzes, zu jedem Messzeitpunkt erhöht war. Dieser Effekt zeigte sich bereits für die Zellviabilität innerhalb des in Kap. 3.3 ausgewerteten EZ4U-Tests. Auch ähnelt sich der Verlauf der Differenz zwischen den Kontrollzellen (0 μ M, 0 Gy) und der mit 5-FU inkubierten Zellen (0 Gy) beider Testverfahren. Eine Proliferationsdifferenz zwischen der Kontrolle (0 μ M, 0 Gy) und den HT29-Zellen unter 5-FU-Zugabe bei 0 Gy zeigte sich bereits nach einer Zeitspanne von 1 h. Der größte Unterschied ließ sich in beiden Testverfahren nach einer Messzeit von 24 h nachweisen und entwickelte sich zwischen den Messungen 24 h und 48 h nach der Bestrahlung regredient.

Im Vergleich der unbestrahlten Kombinationsregime mit der unbestrahlten Kontrolle zeigte sich eine signifikante Minderung der Zellproliferation unter Oxaliplatin + 5-FU (1 h + 48 h: $p \leq 0,01$; 24 h: $p \leq 0,05$) und Irinotecan + 5-FU (1 h + 48 h: $p \leq 0,01$). Auch dieses Ergebnis spricht für eine deutliche Zellschädigung unter der Zugabe der Wirkstoffkombinationen.

Zwischen bestrahlten und unbestrahlten Versuchsansätzen ergab sich keine deutliche Differenz hinsichtlich ihrer BrdU-Inkorporation. Wie bereits unter Kap. 4.2 beschrieben, können Zellen durch Oxaliplatin in einen G1-Arrest arretiert werden. Dieser nachgewiesene zytotoxische Effekt konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit unter der Zugabe von Oxaliplatin für die HT29-Zellen ebenfalls dargestellt werden. Innerhalb aller Versuchsansätze (0 Gy / 6 Gy, Messung 1 h / 24 h / 48 h nach der Bestrahlung) zeigte sich, dass unter der Zugabe von Oxaliplatin der größte inhibitorische Effekt auf die Zellproliferation im Vergleich zu den anderen verwendeten Wirkstoffregimen auftrat. Diese Beobachtung deckte sich innerhalb dieser Arbeit mit den Resultaten der Wachstumsversuche in der Aussage, dass Oxaliplatin *in vitro* einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die HT29-Zellen zu haben scheint als Irinotecan bzw. 5-FU.

Der für 5-FU in den Wachstumsversuchen (siehe Kap. 3.1.2.1) nachgewiesene zytotoxische Effekt ließ sich innerhalb dieses Zellproliferationstests nicht nachvollziehen.

4.5 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Es gibt eine Vielzahl möglicher Folgeschäden aufgrund der Einwirkung von Bestrahlung und Zytostatika an einer Zelle. DNA-Schäden, wie Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenausfälle, Protein- sowie intramolekulare Vernetzungen und Mehrfachereignisse, die sogenannten bulky lesions, können beobachtet werden. Auch die entstehenden Schäden an der Zell- bzw. Kernmembran und Veränderungen der Zellorganellen, die einen gestörten Protein- und Kohlenhydratstoffwechsel zur Folge haben, können das Auftreten von Mutationen oder den Tod einer Zelle bedingen. Im γ -H2AX-Assay lag das Hauptaugenmerk auf den entstandenen DNA-Doppelstrangbrüchen, die mit Hilfe der Immunhistochemie sichtbar gemacht werden konnten. Im Zentrum dieser Untersuchungen stand die Histonvariante H2AX, welche im Rahmen der strahleninduzierten Reparaturmechanismen phosphoryliert wird. Für die Phosphorylierung ist vor allem die Proteinkinase ATM (ataxia telangiectasia mutated) verantwortlich. Aber auch die Proteinkinase des Typs ATR (ataxia telangiectasia RAD3-related) und andere DNA-PKs (DNA-Proteinkinasen) sind an dem Prozess beteiligt (AN AND HUANG *et al.*, 2010). Interessanterweise ging aus Untersuchungen hervor, dass zwischen der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche und den unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbaren γ -H2AX-Foci eine Korrelation von 1 : 1 besteht (SEDELNIKOVA *et al.*, 2002), sodass sich anhand dieses Testverfahrens die zytotoxischen Effekte unter Strahleneinwirkung als auch unter Chemotherapeutikazugabe gut nachweisen lassen.

Die Fixierung der HT29-Zellen erfolgte 1 h nach dem Bestrahlungszeitpunkt. Diese Zeitspanne wurde gewählt, um die maximale Anzahl an Doppelstrangbrüchen erfassen zu können. Die Grundlage dieser Überlegung fußte auf der Beobachtung, dass die Phosphorylierung von H2AX zu γ -H2AX nach ca. 30 min ihr Maximum erreicht, sich danach eine kurze Plateauphase von ca. 1 h anschließt und es danach zu einer Abnahme von γ -H2AX kommt (MAH AND EL-OSTA *et al.*, 2010). Da die Reparatur allerdings erst nach ca. 24 h abgeschlossen ist, wurde ein weiterer Versuchsansatz mit der Fixierung der Zellen 24 h nach der Bestrahlung durchgeführt. Dieser von MAH AND EL-OSTA im Jahre 2010 beschriebene Effekt konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Jene Zellen, deren Fixierung bereits 1 h nach der Bestrahlung erfolgte, zeigten mehr als 30 Foci/Zelle, sodass ein Auszählen unmöglich war (siehe Abb. 32). Nach einer Reparaturzeit von 24 h hatte sich die Zahl der

DNA-Doppelstrangbrüche der HT29-Zellen deutlich reduziert (siehe Abb. 33), sodass eine Detektion dieser durchgeführt werden konnte.

Wie der Abb. 34 zu entnehmen, zeigte sich, dass die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in den HT29-Zellkernen unter Wirkstoffzugabe stieg. Dies war sowohl unter der Kombination mit Bestrahlung als auch bei der alleinigen Zugabe der einzelnen Wirkstoffe/Wirkstoffkombinationen zu beobachten. Die Analyse der γ -H2AX-Foci zeigte nach vollständigem Abschluss der Reparaturzeit (24 h), dass, wie zu erwarten, bei allen Versuchsansätzen, die mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt wurden, eine höhere Anzahl an Foci pro Zelle vorlag, als in den unbestrahlten Vergleichsansätzen. Der größte prozentuale Unterschied zwischen der Anzahl der detektierten DNA-Doppelstrangbrüche ergab sich dabei für den Kontrollansatz. Dessen mittlere Anzahl an Foci/Zelle lag bei 0 Gy mit 4,2 um 65 % unter dem Ergebnis der mit 6 Gy bestrahlten HT29-Zellen mit 11,9 Foci/Zelle (vgl. Abb. 34). Unter der Zugabe von 5-FU, Oxaliplatin + 5-FU, Irinotecan + 5-FU, Oxaliplatin bzw. Irinotecan wurden entsprechend Zunahmen von 25 %, 20 %, 16 %, 0,5 % und 0,4 % ermittelt. Allerdings ergab sich eine Signifikanz der Ergebnisse gegenüber der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle (Wirkstoffzugabe, 0 Gy) nur bei dem 5-FU-Regime und den kombinierten Zugaben von Irinotecan + 5-FU, sowie Oxaliplatin + 5-FU. Auch konnten bereits ohne Wirkstoffzugabe und beim Verzicht auf Bestrahlung pro HT29-Zelle durchschnittlich vier γ -H2AX-Foci verzeichnet werden (siehe Kap. 3.5). Dies scheint auf den ersten Blick ungewöhnlich, doch diese DNA-Doppelstrangbrüche können als Folge physiologischer Prozesse (Rekombination), ATM-Autoaktivierung und der konstitutiven Erbgutschädigung durch die Tumormaschinerie beschrieben werden (BARTKOVA *et al.*, 2005).

Wie der Abb. 34 ebenfalls zu entnehmen ist, zeigte sich zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tumorzellen, die mit Oxaliplatin behandelt wurden, kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche. Ähnlich dazu stellte sich das Ergebnis der mit Irinotecan inkubierten Zellen bei 0 Gy sowie 6 Gy dar, in dem sich ebenfalls kein signifikanter Effekt feststellen ließ. Dies bestätigen die Ergebnisse der Koloniebildungs-, EZ4U- und BrdU-Tests dieser Arbeit, in welchen sich ebenfalls keine Signifikanz nachweisen ließ (siehe Kap. 3.2, 3.3 und 3.4).

Auch in der Arbeit von ALTMAYER *et al.*, 2010 war die Anzahl der γ -H2AX-Foci und somit die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in den SK-Hep1-Tumorzellen unter der

Kombination von Bestrahlung und Oxaliplatin signifikant erhöht gegenüber der alleinigen Bestrahlung (vgl. Abb. 35). Für die durch ALTMAYER *et al.* mit Oxaliplatin behandelten Zellen zeigte sich die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche durch eine zusätzliche Bestrahlung nicht signifikant verändert gegenüber der alleinigen Monochemotherapie. Dies entspricht ebenfalls den Resultaten der verwendeten HT29-Zellen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt ist das manuelle Auszählen der „Foci“ durch die dreidimensionale Anordnung im Zellkern erschwert. Um diese subjektive Fehlerquelle zu umgehen, ist genaues Arbeiten unabdingbar. Zur Bestätigung der Ergebnisse des γ -H2AX-Tests wäre die Anwendung weiterer Verfahren sinnvoll. In Betracht käme die sogenannte pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Diese Untersuchung basiert auf einer DNA-Größenveränderung beim Vorliegen von DNA-Doppelstrangbrüchen. Zur Durchführung dieser Methode werden allerdings neben Bestrahlungsdosen von über 5 Gy hohe Temperaturen benötigt, die wiederum DNA-Doppelstrangbrüche zur Folge haben können (KINNER *et al.*, 2008).

5 Zusammenfassung

Bislang finden Oxaliplatin und Irinotecan in Kombination mit 5-Fluorouracil (5-FU) Anwendung zur Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Die gleichzeitige Anwendung der Kombinationschemotherapieregime mit einer Strahlentherapie wird dabei nach aktuellen S3-Leitlinien nicht empfohlen. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, anhand der Darmkrebszelllinie HT29 die Wirkung von Oxaliplatin bzw. Irinotecan unter ionisierender Strahlung allein und in der jeweiligen Kombination mit 5-FU zu untersuchen und ggf. einen möglichen Unterschied in deren Wirkung erfassen zu können. Hierzu fanden mehrere *In-vitro*-Methoden Anwendung, deren Ergebnisse eine Aussage über das Wachstumsverhalten, die Koloniebildungs- und Proliferationsfähigkeit sowie die metabolische Aktivität geben sollten. Ein besonderes Augenmerk galt dem Auftreten eines möglichen strahlensensibilisierenden Effektes. In den folgenden Abschnitten werden die Resultate dieser Arbeit zusammengefasst:

- Anhand der Wachstumsversuche konnte eine signifikante Wachstumshemmung der HT29-Zellen unter Einfluss von Oxaliplatin, Irinotecan sowie 5-FU ab einer Wirkstoffkonzentration von jeweils 2 μM gezeigt werden.
- In den Koloniebildungstests konnte ein strahlensensibilisierender Effekt auf die Darmkrebszellen durch 5-FU, Oxaliplatin +/- 5-FU und Irinotecan +/- 5-FU nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich bei 8 Gy, unter der Verwendung von Oxaliplatin + 5-FU im Vergleich zur alleinigen Anwendung von 5-FU, eine signifikante Verstärkung des strahlensensibilisierenden Effektes.
- Unter Radiatio führten innerhalb der EZ4U-Tests weder die Einzelwirkstoffe, noch deren Kombinationen zu einem signifikanten Effekt auf die metabolische Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (6 Gy, 0 μM Wirkstoff).
- Wurden die HT29-Zellen zusätzlich zur Bestrahlung mit Oxaliplatin, Irinotecan sowie Oxaliplatin + 5-FU behandelt, zeigte sich im BrdU-Test eine signifikante Abnahme der Zellproliferation gegenüber der Kontrolle (6 Gy, 0 μM Wirkstoff). Oxaliplatin +/- 5-FU bzw. Irinotecan +/- 5-FU führten zu einer signifikanten Reduktion der Zellproliferation, verglichen mit der 5-FU-Einzelgabe unter ionisierender Strahlung.

- Die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche zeigte sich unter Bestrahlungsbedingungen innerhalb des γ -H2AX-Assays gegenüber der Kontrolle (6 Gy, 0 μ M Wirkstoff) signifikant erhöht für alle fünf Wirkstoffregime. Wurde 5-FU mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan kombiniert, ließ sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der γ -H2AX-Foci-Anzahl nachweisen.
- Im Hinblick auf die klinische Relevanz ließ sich gegenüber der alleinigen Gabe von 5-FU sowohl für Oxaliplatin + 5-FU als auch für Irinotecan + 5-FU in drei der vier Bestrahlung beinhaltenden *In-vitro*-Methoden ein signifikanter Effekt auf die Darmkrebszellen nachweisen (Koloniebildungs-, BrdU- und γ -H2AX-Test - siehe Tab. 14, Anhang).
- Die Gegenüberstellung von Oxaliplatin +/- 5-FU und Irinotecan +/- 5-FU, unter simultaner Bestrahlung, ergab für die HT29-Zelllinie in keinem der angewandten Testverfahren einen signifikanten Unterschied (siehe Tab. 12 und 13, Anhang).
- In Zusammenschau der Ergebnisse kann die simultane Anwendung von Oxaliplatin bzw. Irinotecan zusätzlich zur etablierten 5-FU-gestützten Monoradiochemotherapie durchaus für weitere klinische Studien empfohlen werden.

6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend zeigt sich zur kurativen als auch palliativen Therapie des Rektumkarzinoms eine Ergänzung der Chemotherapie um Oxaliplatin bzw. Irinotecan zur etablierten 5-FU-gestützten Monochemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie als aussichtsreich und kann durchaus für weitere klinische Studien empfohlen werden. Mehrere Phase-III-Studien befassen sich aktuell mit der Integration neuer Substanzen in die Standardbehandlung mit 5-FU. Dazu zählen die CAO/ARO/AIO-04-Studie in Deutschland, die europaweite PETACC-6-Studie sowie die in den USA angelaufenen NSAPB-R04- und E5204-Intergroup-Studien.

Auch erscheint es für weitere vorklinische und klinische Studien sinnvoll, die Strahlentherapie und die in dieser Arbeit verwendeten Wirkstoffregime um zusätzliche Substanzen zu ergänzen.

Mehrere Phase-II-Studien zum Aspekt einer optimierten systemischen bereits präoperativ gegebenen Chemotherapie unter der Kombination von 5-FU oder Capecitabin mit Irinotecan und Oxaliplatin zeigten eine teilweise hohe Rate an pathologischen Komplettremissionen bei nur geringgradiger Steigerung der symptomatischen Toxizität (RODEL AND SAUER, 2007).

Hauptziel der bereits geschlossenen internationalen Phase-III-Studie PETACC-6 ist es, eine Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens unter zusätzlicher Gabe von Oxaliplatin zu Capecitabin bei an Enddarmkrebs erkrankten Patienten im UICC-Stadium II und III nachzuweisen. In der Therapie des KRK spielen monoklonale Antikörper eine zunehmende Rolle, sodass im Ausblick die hier durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen um diese ergänzt werden könnten.

Der monoklonale Antikörper Bevacizumab, welcher den vom Tumor gebildeten proangiogenen Wachstumsfaktor VEGF bindet und somit über eine Vielzahl von Mechanismen antiproliferativ wirkt (BALUK *et al.*, 2005), (MABUCHI *et al.*, 2008), wurde in Kombination mit 5-FU (mit und ohne Irinotecan) in Deutschland zur Erstlinientherapie des mKRK zugelassen. Somit wären die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten *in-vitro*-Untersuchungen ergänzt um Bevacizumab als Angiogenesehemmer zu überdenken.

Auch eine Erweiterung der für die hiesige Arbeit genutzten Chemotherapeutika um sogenannte EGF-Rezeptor-Antikörper wie Cetuximab oder Panitumumab wäre im Hinblick auf eine Verbesserung des antiproliferativen Effektes unter zeitgleicher Radiatio der HT29-Zellen oder anderer Tumorzellen anzustreben. Zwar gibt es derzeit keine Phase-III-Studie, die eine Behandlung des mKRR mit einer Kombination aus FOLFOX und Cetuximab in der Erstlinientherapie stützt, allerdings ist Cetuximab auch in Kombination mit Oxaliplatin bei Patienten mit einem Wildtyp-KRAS exprimierendem Tumor innerhalb der Erstlinientherapie zugelassen.

Für das Infusionale 5-FU/(Folinsäure)-Regime in Kombination mit Mitomycin C ergab sich in einer Phase-III-Studie eine synergistische Wirkung beider Wirkstoffe bei Patienten mit einem KRR oder Magenkarzinom. Ansprechrate und progressionsfreies Überleben waren signifikant für die Mitomycin-Kombination überlegen (ROSS *et al.*, 1997). Identische 5-FU-beinhaltende Radiochemotherapieregime dieser Arbeit könnten somit in weiterführenden Experimenten um Mitomycin C ergänzt werden, um mögliche signifikante Unterschiede des strahlensensibilisierenden und antiproliferativen Effektes von 5-FU alleine und in Kombination mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan auf die HT29-Zellen erkennen und weiter untersuchen zu können.

Die Bestrahlung der Tumorzellen betreffend könnten die zeitlichen Abfolgen und die Anzahl der Bestrahlungen innerhalb der Versuche variiert werden, um einen möglichen Einfluss dieser Faktoren auf die Ergebnisse untersuchen zu können. Weiterhin könnte die Einsaatdichte der HT29-Zellen bei den Koloniebildungstests v. a. innerhalb der Versuche mit den hohen Strahlendosen von 6 bzw. 8 Gy gesteigert werden, um die Koloniezahl zu erhöhen und damit die Validität zu verbessern.

7 Thesen

Oxaliplatin und Irinotecan finden in Kombination mit 5-Fluorouracil (5-FU) Anwendung zur Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms. Ein gleichzeitiger Einsatz der o. g. Kombinationschemotherapieregime zzgl. zu einer Strahlentherapie wird dabei bislang nach aktuellen S3-Leitlinien nicht empfohlen. Ausschließlich das Pyrimidinanalogon 5-FU wird in Kombination mit ionisierender Strahlung zur adjuvanten Therapie des Rektumkarzinoms angewandt.

Mittels verschiedener zellbiologischer *In-vitro*-Methoden wurde die Wirkung von Irinotecan vs. Oxaliplatin jeweils als Monotherapie sowie in Kombination mit 5-FU unter dem Einfluss ionisierender Strahlung an kolorektalen HT29-Tumorzellen untersucht.

Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei, ob sich signifikante Unterschiede des bereits in mehreren Studien beschriebenen strahlensensibilisierenden Effektes von Oxaliplatin bzw. Irinotecan jeweils +/- 5-FU ergeben, um eine Aussage über die Sinnhaftigkeit einer zukünftigen kombinierten Chemotherapeutikaaanwendung zzgl. zur Radiatio machen zu können.

Das Wachstum der HT29-Zellen wurde unter der Zugabe von 5-FU, Oxaliplatin und Irinotecan jeweils ab einer Wirkstoffkonzentration von 2 μM signifikant gehemmt.

Durch die kombinierte Behandlung der HT29-Zellen mit den Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung konnte anhand einer verminderten Koloniebildungsfähigkeit ein strahlensensibilisierender Effekt auf die Darmkrebszellen durch 5-FU, Oxaliplatin +/- 5-FU und Irinotecan +/- 5-FU nachgewiesen werden. Bei 8 Gy ergab sich unter Oxaliplatin + 5-FU im Vergleich zur alleinigen Anwendung von 5-FU eine signifikante Verstärkung des strahlensensibilisierenden Effektes.

Wurden die HT29-Zellen zusätzlich zur Bestrahlung mit Oxaliplatin, Irinotecan sowie Oxaliplatin + 5-FU behandelt, zeigte sich eine signifikante Abnahme der Zellproliferation gegenüber der Kontrolle (6 Gy, 0 μM Wirkstoff).

Die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche war für alle fünf Wirkstoffregime signifikant erhöht gegenüber der bestrahlten Kontrolle (6 Gy, 0 μ M Wirkstoff). Wurde 5-FU mit Oxaliplatin bzw. Irinotecan kombiniert, ließ sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der γ -H2AX-Foci-Anzahl nachweisen.

Gegenüber der alleinigen Gabe von 5-FU ließ sich im Hinblick auf die klinische Relevanz zusammenfassend für Oxaliplatin + 5-FU und Irinotecan + 5-FU in jeweils drei der vier Bestrahlung beinhaltenden *In-vitro*-Methoden ein signifikanter Effekt auf die Darmkrebszellen nachweisen (Koloniebildungs-, BrdU- und γ -H2AX-Test).

Die Gegenüberstellung von Oxaliplatin +/- 5-FU und Irinotecan +/- 5-FU unter simultaner Bestrahlung ergab für die HT29-Zelllinie in keinem der angewandten Testverfahren einen signifikanten Unterschied.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für die Ergänzung der kurativen als auch palliativen Radiochemotherapie des kolorektalen Karzinoms. So kann die simultane Anwendung von Oxaliplatin bzw. Irinotecan zusätzlich zur etablierten 5-FU-gestützten Monoradiochemotherapie durchaus für weitere klinische Studien empfohlen werden.

8 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1:** FOLFOX4-Verabreichungsschema
- Tab. 2:** FOLFIRI-Verabreichungsschema
- Tab. 3:** Übersicht der pipettierten Wirkstoffmengen je Konzentration für die Wachstumskurven
- Tab. 4:** Übersicht der pipettierten Wirkstoffmengen je Konzentration für die Koloniebildungstests, XXT-Tests, BrdU-Tests und den γ -H2AX-Test
- Tab. 5:** Übersicht der für den γ -H2AX-Test verwendeten Antikörper zzgl. deren Verdünnung
- Tab. 6:** Übersicht der zur Fluoreszenzmikroskopie genutzten Filter
- Tab. 7:** Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten der HT29-Zellen bei einmaliger 5-FU-Zugabe
- Tab. 8:** Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten der HT29-Zellen bei einmaliger Oxaliplatin-Zugabe
- Tab. 9:** Durch exponentielle Regressionsanalyse ermittelte Zellpopulationsverdopplungs- und Absterbezeiten der HT29-Zellen bei einmaliger Irinotecan-Zugabe
- Tab. 10:** Plattiereffizienz der HT29-Zellen
- Tab. 11:** Umrechnung Wirkstoffkonzentrationen von 5-FU in μM und mg/ml
- Tab. 12:** Gegenüberstellung von Oxaliplatin und Irinotecan sowie Oxaliplatin + 5-FU und Irinotecan + 5-FU unter Radiatio in allen Bestrahlung beinhaltenden Testverfahren hinsichtlich eines signifikanten Unterschiedes in der Wirkung
- Tab. 13:** Übersicht über signifikante Unterschiede von Oxaliplatin + 5-FU bzw. Irinotecan + 5-FU im Vergleich zu 5-FU alleine unter Aufführung aller Bestrahlung beinhaltenden Testverfahren

9 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Stadieneinteilung des Kolorektalen Karzinoms nach UICC-Klassifikation
- Abb. 2:** Mikroskopische Darstellung der HT29-Zellen
- Abb. 3:** Strukturformel von 5-Fluorouracil
- Abb. 4:** Strukturformel von Oxaliplatin
- Abb. 5:** Strukturformel von Irinotecan-Monohydrochlorid
- Abb. 6:** Time Schedule zur Durchführung der Wachstumsversuche
- Abb. 7:** Schematische Darstellung des Koloniebildungstests
- Abb. 8:** Time Schedule zur Durchführung der Koloniebildungstests
- Abb. 9:** Time Schedule zur Durchführung des XTT-Tests (EZ4U)
- Abb. 10:** Time Schedule zur Durchführung des indirekten Zellproliferationstests (BrdU)
- Abb. 11:** Wachstum der HT29-Zellen unter nativen Bedingungen
- Abb. 12:** Wachstum der HT29-Zellen unter einmaliger 5-Fluorouracil-Zugabe
- Abb. 13:** Wachstum der HT29-Zellen unter einmaliger Oxaliplatin-Zugabe
- Abb. 14:** Wachstum der HT29-Zellen unter einmaliger Irinotecan-Zugabe
- Abb. 15:** Normierte Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen unter jeweiliger Zugabe von 5-FU, Oxaliplatin bzw. Irinotecan zzgl. der Kontrolle
- Abb. 16:** Normierte Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen unter jeweiliger Zugabe von Oxaliplatin + 5-FU bzw. Irinotecan + 5-FU zzgl. der Kontrolle
- Abb. 17:** Plattiereffizienz aller durchgeführten Koloniebildungstests der HT29-Zellen
- Abb. 18:** Metabolische Aktivität der HT29-Zellen bei einer Inkubationszeit von 1 h
- Abb. 19:** Metabolische Aktivität der HT29-Zellen bei einer Inkubationszeit von 24 h
- Abb. 20:** Metabolische Aktivität der HT29-Zellen bei einer Inkubationszeit von 48 h
- Abb. 21:** Metabolische Aktivität der HT29-Zellen unter Oxaliplatin- und Irinotecanzugabe im Vergleich (1 h, 24 h und 48 h)
- Abb. 22:** Metabolische Aktivität der HT29-Zellen unter Zugabe von Oxaliplatin + 5-FU und Irinotecan + 5-FU im Vergleich (1 h, 24 h und 48 h)
- Abb. 23:** Metabolische Aktivität der HT29-Zellen unter Zugabe von 5-FU, Oxaliplatin und Oxaliplatin + 5-FU im Vergleich unter einer Strahlendosis von 6 Gy
- Abb. 24:** Metabolische Aktivität der HT29-Zellen unter Zugabe von 5-FU, Irinotecan und Irinotecan + 5-FU im Vergleich unter einer Strahlendosis von 6 Gy
- Abb. 25:** BrdU-Einbau in HT29-Zellen bei einer Reparaturzeit von 1 h
- Abb. 26:** BrdU-Einbau in HT29-Zellen bei einer Reparaturzeit von 24 h

- Abb. 27:** BrdU-Einbau in HT29-Zellen bei einer Reparaturzeit von 48 h
- Abb. 28:** BrdU-Einbau in HT29-Zellen unter Oxaliplatin- und Irinotecanzugabe im Vergleich (1 h, 24 h und 48 h)
- Abb. 29:** BrdU-Einbau in HT29-Zellen unter Zugabe von Oxaliplatin + 5-FU bzw. Irinotecan + 5-FU im Vergleich (1 h, 24 h und 48 h)
- Abb. 30:** BrdU-Einbau in HT29-Zellen unter Zugabe von 5-FU, Oxaliplatin und Oxaliplatin + 5-FU im Vergleich unter einer Strahlendosis von 6 Gy
- Abb. 31:** BrdU-Einbau in HT29-Zellen unter Zugabe von 5-FU, Irinotecan und Irinotecan + 5-FU im Vergleich unter einer Strahlendosis von 6 Gy
- Abb. 32:** „Foci“ in HT29-Zellen nach der Radiatio (6 Gy) und einer Reparaturzeit von 1 h
- Abb. 33:** „Foci“ in HT29-Zellen nach der Radiatio (6 Gy) und einer Reparaturzeit von 24 h
- Abb. 34:** Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy in Abhängigkeit von fünf Wirkstoffregimen zzgl. der Kontrolle
- Abb. 35:** Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche in HT29-Zellen bei 0 Gy und 6 Gy mit Gegenüberstellung der Wirkstoffregime zur jeweiligen Kontrolle
- Abb. 36:** Normierte Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen unter jeweiliger Zugabe von Oxaliplatin bzw. Oxaliplatin + 5-FU zzgl. der Kontrolle
- Abb. 37:** Normierte Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen unter jeweiliger Zugabe von Irinotecan bzw. Irinotecan + 5-FU zzgl. der Kontrolle
- Abb. 38:** Normierte Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen unter jeweiliger Zugabe von 5-FU bzw. Oxaliplatin + 5-FU zzgl. der Kontrolle
- Abb. 39:** Normierte Zellüberlebenskurven der HT29-Zellen unter jeweiliger Zugabe von 5-FU bzw. Irinotecan + 5-FU zzgl. der Kontrolle

10 Literaturverzeichnis

ADAMS G. E., ASQUITH J.C., WATTS M. E. AND SMITHEN C. E. (1972) Radiosensitization of hypoxic cells *in vitro*: a water-soluble derivative of paranitroacetophenone. *Nat New Biol* 239(88): 23-24.

AKAGI T., FUKAGAWA T., KAGE Y., HIDETO T., MATSUNAGA N., KOYANAGI S., UCHIDA A., FUJII A., IBA, H., IKEMURA T., ARAMAKI H., HIGUCHI S., OHDO S. (2009) Role of Glucocorticoid Receptor in the Regulation of Cellular Sensitivity to Irinotecan Hydrochloride. *J Pharmacol Sci* 109: 265-274.

ALEKSANDROVA K., DROGAN D., BOEING H., JENAB M., BAS BUENO-DE-MESQUITA H., JANSEN E, VAN DUIJNHOFEN F.J., RINALDI S., FEDIRKO V., ROMIEU I., KAAKS R., RIBOLI E., GUNTER M.J., ROMAGUERA D., WESTPHAL S., OVERVAD K., TJONNELAND A., HALKJAER J., BOUTRON-RUAULT M.C., CLAVEL-CHAPELON F., LUKANOVA A., TRICHOPOULOU A., TRICHOPOULUS D., VIDALIS P., PANICO S., AGNOLI C., PALLI D., TUMINO R., VINEIS P., BUCKLAND G., SÁNCHEZ-CRUZ J.J., DORRONSORO M., DIAZ M.J., BARRICARTE A., RAMON QUIROS J., PEETERS P.H., MAY A.M., HALLMANS G., PALMQVIST R., CROWE F.L., KHAW K.T., WAREHAM N., PISCHON T. (2013) Adiposity, mediating biomarkers and risk of colon cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition study. *Int J Cancer* 134(3): 612-21.

ALLISON J.E, TEKAWA I.S., RANSOM L.J., ADRAIN A.L. (1996) A comparison of fecal occult-blood tests for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 334: 155-159.

ALTMAYER A., JUNG A.C., IGNAT M., BENZINA S., DENIS J.-M., GUEULETTE J., NOËL G., MUTTER D., AND BISCHOFF P. (2010) Pharmacological Enhancement of Autophagy Induced in a Hepatocellular Carcinoma Cell Line by High-LET Radiation. *Anticancer Res* 30(2): 303-310.

AN J., HUANG Y.C., XU Q.Z., ZHOU L.J., SHANG Z.F., HUANG B., WANG Y., LIU X.D., WU D.C. AND ZHOU P.K. (2010) DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression. *BMC Mol Biol* 11: 18.

ARANGO D., WILSON A.J., SHI Q., CORNER G.A., ARANES M.J., NICHOLAS C., LESSER M., MARIADASON J.M. AND AUGENLICHT L.H. (2004) Molecular mechanisms of action and prediction of response to oxaliplatin in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 91(11): 1931-1946.

BALUK P., HASHIZUME H., McDONALD D.M. (2005) Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15(1): 102-111.

BARTKOVA J., BAKKENIST C.J., RAJPERT DE MYETS E., SKAKKEBAEK N.E., LUKAS J., SEHESTED M., KASTAN M.B., BARTEK J. (2005) ATM Activation in normal human tissues and testicular cancer. *Cell Cycle* 4(6): 838-845.

BIRKNER B.R. (2003) Evidence-based prevention of colorectal carcinoma. *Dtsch Med Wochenschr* 128(49): 2598-2603.

- BLEEHEEN N.M. (1973) Combination therapy with drugs and radiation. *Br Med Bull* 29(1): 54-59.
- CHEN A. Y., CHOY H. AND ROTHENBERG M.L. (1999) DNA topoisomerase I-targeting drugs as radiation sensitizers. *Oncology* 13(105): 39-46.
- CIVDALLI A., CECIARELLI F., LIVDI E., ALTAVISTA P., CRUCIAINI G., MARCHETTI P. (2002) Radiosensitization by oxaliplatin in a mouse adenocarcinoma: influence of treatment schedule. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52: 1092-1098.
- CORY A.H., OWEN T.C., BARLTROP J.A. AND CORY J.G. (1991) Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3(7): 207-212.
- DE GRAMONT A., FIGER A., SEYMOUR M., HOMERIN M., HMISSI A., CASSIDY J., BONI C., CORTES-FUNES H., CERVANTES A., FREYER G., PAPAMICHAEL D., LE BAIL N., LOUVET C., HENDLER D., DE BRAUS F., WILSON C., MORVAN F. AND BONETTI A. (2000) Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18(16): 2938-2947.
- DEWEY W.C., NOEL J.S. AND DETTOR C.M. (1972) Changes in radiosensitivity and dispersion of chromatin during the cell cycle of synchronous Chinese hamster cells. *Radiat Res* 52(2): 373-394.
- DOLLERY C. (1991b) Fluorouracil. In: *Dollery C (ed.): Therapeutic Drugs*. Churchill Livingstone, Edinburgh; pp. F68-F74.
- DOUILLARD J.Y., CUNNINGHAM D., ROTH A.D., NAVARRO M., JAMES R.D., KARASEK P., JANDIK P., IVESON T., CARMICHAEL J., ALAKL M., GRUIA G., AWAD L. AND ROUGIER P. (2000) Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet* 355(9209): 1041-1047.
- DUNNE A.L., PRINCE M.E., MOTHERSILL C., MC KEOWN S.R., ROBSON T. AND HIRST D.G. (2003) Relationship between clonogenic radiosensitivity, radiation-induced apoptosis and DNA damage/repair in human colon cancer cells. *Br J Cancer* 89(12): 2277-2283.
- ECKHOUSE S. AND SULLIVAN R. (2006) A survey of public funding of cancer research in the European union. *PLoS Med* 3(7): e267.
- EKBOM A., HELMICK C., ZACK M. AND ADAMI H.O. (1990) Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med* 323(18): 1228-1233.
- EL-AWADY R.A., SALEH E.M. AND DAHM-DAPHI J. (2010) Targeting DNA double-strand break repair: is it the right way for sensitizing cells to 5-fluorouracil? *Anticancer Drugs* 21(3): 277-287.
- ESAKI T., NAKANO S., TATSUMOTO T., KUROKI-MIGITA M., MITSUGI K., NAKAMURA M. (1992) Inhibition by 5-fluorouracil of cisdiamminedichloroplatinum(II)-induced DNA interstrand cross-link removal in a HST-1 human squamous carcinoma cell line. *Cancer Res* 52: 6501-6.

EXTRA J.M., MARTY M., BRIENZA S. AND MISSET J.L. (1998) Pharmacokinetics and safety profile of oxaliplatin. *Semin Oncol* 25(5): 13-22.

FIELDING L.P., ARSENAULT P.A., CHAPUIS P.H., DENT O., GATHRIGHT B., HARDCASTLE J.D., HERMANEK P., JASS J.R. AND NEWLAND R.C. (1991) Clinicopathological staging for colorectal cancer: an International Documentation System (IDS) and an International Comprehensive Anatomical Terminology (ICAT). *J Gastroenterol Hepatol* 6(4): 325-344.

FISCHEL J.L., ETIENNE M.C., FORMENTO P., MILANO G. (1998) Search for the optimal schedule for the oxaliplatin/5-fluorouracil association modulated or not by folinic acid: preclinical data. *Clin Cancer Res* 4: 2529-35.

FLITCROFT K.L., IRWIG L.M. CARTER S.M., SALKELD G.P., GILLESPIE J.A. (2012) Colorectal cancer screening: Why immunochemical fecal occult blood tests may be the best option. *BMC Gastroenterol* 12: 183.

FOGH J., ORFEO T., TISO J., SHARKEY F.E., FOGH J.M. AND DANIELS W.P. (1980) Twenty-three new human tumor lines established in nude mice. *Exp Cell Biol* 48(3): 229-239.

FOLKVORD S., FLATMARK K., SEIERSTAD T., ROE K., RASMUSSEN H. AND REE A. H. (2008) Inhibitory effects of oxaliplatin in experimental radiation treatment of colorectal carcinoma: does oxaliplatin improve 5-fluorouracil-dependent radiosensitivity? *Radiother Oncol* 86(3): 428-434.

GARBORG K., HOLME O., LOBERG M., KALAGER M., ADAMI H.O., BRETTHAUER M. (2013) Current status of screening for colorectal cancer. *Ann Oncol* 24: 1963-1972.

GIACHETTI S., PERPOINT B., ZIDANI R., LE BAIL N., FAGGIUOLO R., FOCAN C., CHOLLET P., LLORY J.F., LETOUREAU Y., COUDERT B., BERTHEAUT-CVITKOVIC F., LARREGAIN-FOURNIER D., LE ROL A., WALTER S., ADAM R., MISSET J.L. AND LEVI F. (2000) Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 18(1): 136-147.

GRIVICICH I., REGNER A., DA ROCHA A.B., GRASS L.B., ALVES P.A., KAYSER G. B., SCHWARTSMANN G. AND HENDRIQUES J.A. (2005) Irinotecan/5-fluorouracil combination induces alterations in mitochondrial membrane potential and caspases on colon cancer cell lines. *Oncol Res* 15(7-8): 385-392.

GYDE S.N., PRIOR P., ALLAN R.N., STEVENS A., JEWELL D.P., TRUELOVE S.C., LOFBERG R., BROSTROM O. AND HELLERS G. (1988) Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut* 29(2): 206-217.

HAYWARD R. L., MACPHERSON J. S., CUMMINGS J., MONIA B. P., SMYTH J. F. AND JODRELL D. I. (2004) Enhanced oxaliplatin-induced apoptosis following antisense Bcl-xl down-regulation is p53 and Bax dependent: Genetic evidence for specificity of the antisense effect. *Mol Cancer Ther* 3: 169-178.

HALL E.J. (1994) Molecular biology in radiation therapy: the potential impact of recombinant technology on clinical practice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30(5): 1019-1028.

- HEERDT B.G., HOUSTON M.A., ANTHONY G.M. AND AUGENLICHT L.H. (1998) Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$ (mt)) in the coordination of p53-independent proliferation and apoptosis pathways in human colonic carcinoma cells. *Cancer Res* 58(13): 2869-2875.
- HEIDELBERGER C., GRIESBACH L., MONTAG B., MOOREN D., CRUZ O., SCHNITZER R., GRUNBERG R. (1958) Studies on Fluorinated Pyrimidines. II. Effects on Transplanted Tumors. *Cancer Res* 18: 305-317.
- HESS S., BLACKSTOCK W. (2000) Oxaliplatin: In Vitro an In Vivo Evidence of its Radiation Sensitizing Activity - Pre Clinical Observation Relevant to Ongoing Clinical Trials. 91st annual meeting of the American Association for Cancer research 41: 335.
- IMPERIALE T.F. (2012) Noninvasive screening tests for colorectal cancer. *Dig Dis* 30(2): 16-26.
- IMPERIALE T.F., RANSOHOFF D.F., ITZKOWITZ S.H., LEVIN T.R., LAVIN P., LIDGARD G.P., AHLQUIST D.A., BERGER B.M. (2014) Multi-target stool DNA testing for colorectal-cancer screening. *N Engl J Med* 370: 1287-1297.
- KAWATO J., AONUMA M., HIROTA Y., KUGA H. AND SATO K. (1991) Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res* 51: 4187-4191.
- KINNER A., WU W., STAUDT C., ILIAKIS G. (2008) γ -H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res.* 36(17): 5678-5694.
- KJELLSTRÖM J., KJELLEN E., JOHANSSON A. (2005) In vitro radiosensitization by oxaliplatin and 5-fluorouracil in a human colon cancer cell line. *Acta Oncol* 44: 687-693.
- KOHNE C.H., VAN CUTSEM E., WILS J., BOKEMEYER C., EL-SERAFI M., LUTZ M.P., LORENZ M., REICHARDT P., RUCKLE-LANZ H., FRICKHOFEN N., FUCHS R., MERGENTHALER H.G., LANGENBUCH T., VANHOEFER U., ROUGIERT P., VOIGTMANN R., MULLER L., GENICOT B., ANAK O., NORDLINGER B., R. EUROPEAN ORGANISATION FOR AND G. TREATMENT OF CANCER GASTROINTESTINAL (2005) Phase III study of weekly high-dose infusional fluorouracil plus folinic acid with or without irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer: European Organisation for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40986. *J Clin Oncol* 23(22): 4856-4865.
- KOHNE C.H., WILS J., LORENZ M., SCHOFFSKI P., VOIGTMANN R., BOKEMEYER C., LUTZ M., KLEEBOEG C., RIDWELSKI K., SOUCHON R., EL-SERAFI M., WEISS U., BURKHARD O., RUCKLE H., LICHNITZER M., LANGENBUCH T., SCHEITHAUER W., BARON B., COUVREUR M.L., SCHMOLL H.J., R. EUROPEAN ORGANIZATION OF AND S. TREATMENT OF CANCER GASTROINTESTINAL GROUP (2003) Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer: European organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952. *J Clin Oncol* 21(20): 3721-3728.
- LEE D. A., SHAPOURIFAR-TEHRANI S. AND KITADA S. (1990) The Effect of 5-Fluorouracil and Cytarabine on Human Fibroblasts From Tenon's Capsule. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31: 1848-1855.

LI L., AHMED B., MEHTA K. AND KURZROCK R. (2007) Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther* 6: 1276-1282.

LINDL T. (2002) *Zell- und Gewebekultur, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.*

LAMOND J.P., WANG M., KINSELLA T.J. AND BOOTHMAN D.A. (1996) Radiation lethality enhancement with 9-aminocamptothecin: comparison to other topoisomerase I inhibitors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 36(2): 369-376.

MABUCHI S., TERAJ Y., MORISHIGE K., TANABE-KIMURA A., SASAKI H., KANEMURA M., TSUNETOH S., TANAKA Y., SAKATA M., BURGER R. A., KIMURA T., OHMACHI M. (2008) Maintenance treatment with bevacizumab prolongs survival in an in vivo ovarian cancer model. *Clin cancer res* 14(23): 7781-7789.

MAH L.J., EL-OSTA A. AND KARAGIANNIS T.C. (2010) gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4): 679-686.

MAJEK O., GONDOS A., LANSSEN L., EMRICH K., HOLLECZEK B., KATALINIC A., NENNECKE A., EBERLE A., BRENNER H. AND THE GEKID CANCER SURVIVAL GROUP (2012) Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century. *Brit J Cancer* 106: 1875-1880.

MARCHETTI P., CASTEDO M., SUSIN S.A., ZAMZAMI N., HIRSCH T., MACHO A., HAEFFNER A., HIRSCH F., GEUSKEND M. AND KROEMER G. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 184(3): 1155-1160.

MISSET J.L., BLEIBERG H., SUTHERLAND W., BEKRADDA M. AND AND CVITKOVIC E. (2000) Oxaliplatin clinical activity: a review. *Crit Rev Oncol Hematol* 35(2): 75-93.

NOORDHUIS P., LAAN A.C., VAN DE BORN K., LOSEKOOT N., KATHMANN I. AND PETERS G.J. (2008) Oxaliplatin activity in selected and unselected human ovarian and colorectal cancer cell lines. *Biochem Pharmacol* 76(1): 53-61.

OKAYASU R., BLOECHER D. AND ILIAKIS G. (1988) Variation through the cell cycle in the dose-response of DNA neutral filter elution in X-irradiated synchronous CHO-cells. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53(5): 729-747.

OLIVE P.L. (1998) The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat Res* 150(5): 42-51.

OMURA M., TORIGOE S. AND KUBOTA N. (1997) SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, potentiates the cytotoxic effect of radiation in human colon adenocarcinoma cells grown as spheroids. *Radiother Oncol* 43(2): 197-201.

PINEDO H.M. AND PETERS G.F. (1988) Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6(10): 1653-1664.

POLAK-CHARCON S. AND BEN-SHAUL Y. (1979) Degradation of tight junctions in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci* 35: 393-402.

- PUCK T.T. AND MARCUS P.I. (1956) Action of x-rays on mammalian cells. *J Exp Med* 103(5): 653-666.
- RAYMOND E., BUQUET-FAGOT C., DJELLOUL S., MESTER J., CVITKOVIC E., ALLAIN P. (1997) Antitumor activity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil and the thymidilate synthase inhibitor AG337 in human colon, breast and ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 8: 876-885.
- RAYMOND E., LAWRENCE R., IZBICKA E., FAIVRE S. AND VON HOFF D.D. (1998) Activity of oxaliplatin against human tumor colony-forming units. *Clin Cancer Res* 4(4): 1021-1029.
- ROBERT-KOCH-INSTITUT UND GESELLSCHAFT DER EPIDEMIOLOGISCHEN KREBSREGISTER IN DEUTSCHLAND E. V. (2013) Krebs in Deutschland 2009/2010. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 9. Ausgabe.*
- RODEL C. AND SAUER R. (2007) Integration of novel agents into combined modality treatment for rectal cancer patients. *Strahlenther Onkol* 183(5): 227-35.
- ROGAKOU E.P. AND SEKERI-PATARYAS K.E. (1999) Histone variants of H2A and H3 families are regulated during in vitro aging in the same manner as during differentiation. *Exp Gerontol* 34(6): 741-754.
- ROSS P., NORMANN A., CUNNINGHAM D. (1997) A prospective randomized trial of protracted venous infusion 5-fluorouracil with or without mitomycin C in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 8: 995-1001.
- SALTZ L. (2000) Irinotecan-based combinations for the adjuvant treatment of Stage III colon cancer. *Oncology* 12(14): 47-50.
- SALTZ L. B., COX J.V., BLANKE C., ROSEN L.S., FEHRENBACHER L., MOORE M.J., MAROUN J.A., ACKLAND S.P., LOCKER P.K., PIROTTA N., ELFRING G.L. AND MILLER L.L. (2000) Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 343(13): 905-914.
- SAUER R. (2010) *Allgemeine Onkologie in: Strahlentherapie und Onkologie. 5. Auflage Elsevier GmbH, München pp 21-77.*
- SCHMITZ S. (2007) *Zellbiologische Grundlagen in Der Experimentator: Zellkultur. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH München, pp 7-35.*
- SEDELNIKOVA O.A., ROGAKOU E.P., PANYUTIN I.G. AND BONNER W.M. (2002) Quantitative detection of (125) IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res* 158(4): 486-492.
- SEIWERT T.Y., SALAMA J.K. AND VOKES E.E. (2007) The concurrent chemoradiation paradigm--general principles. *Nat Clin Pract Oncol* 4(2): 86-100.
- SIEWERT J.R. (2007) *Basiswissen Chirurgie, Springer Medizin Verlag Heidelberg, 1. Auflage: Seite 78.*

SLEE E. A., HARTE M.T., KLUCK R.M., WOLF B.B., CASIANO C.A., NEWMAYER D.D., WANG H.G., REED J.C., NICHOLSON D.W., ALNEMRI E.S., GREEN D.R. AND MARTIN S.J. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 144(2): 281-292.

SOTOS G.A., GROGAN L., ALLEGRA C.J. (1994) Preclinical and clinical aspects of biomodulation of 5-fluorouracil. *Cancer Treat Rev* 20 (1): 11-49.

TAMURA K., TAKADA M., KAWASE I., TADA T., KUDOH S., OKISHIO K., FUKUOKA M., YAMAOKA N., FUJIWARA Y. AND YAMAKIDO M. (1997) "Enhancement of tumor radio-response by irinotecan in human lung tumor xenografts. *Jpn J Cancer Res* 88(2): 218-223.

TERASIMA T. AND TOLMACH L.J. (1963) Variations in several responses of HeLa cells to x-irradiation during the division cycle. *Biophys J* 3: 11-33.

VOLAND C., BORD A., PELERAUX A., PENARIER G., CARRIERE D., GALIEGUE S., CVITKOVIC E., JBILO O. AND CASSELLAS P. (2006) Repression of cell cycle-related proteins by oxaliplatin but not cisplatin in human colon cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5(9): 2149-2157.

WARE J.H., ZHOU Z., GUAN J., KENNEDY A.R., KOPELOVICH L. (2007) Establishment of human cancer cell clones with different characteristics: A model for screening chemopreventive agents. *Anticancer Res* 27: 1-16.

YU J., ZHANG L., HWANG P. M., RAGO C., KINZLER K. W. AND VOGELSTEIN B. (1999) Identification and classification of 53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14517-14522.

ZHOU J., ZHOU Y., YIN B., HAO W., ZHAO L., JU W. AND BAI C. (2009) 5-Fluorouracil and oxaliplatin modify the expression profiles of microRNAs in human colon cancer cells *in vitro*. *Oncology reports* 23: 121-128.

Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne

... ein Thema.

Dafür möchte ich mich bei **Herrn PD Dr. G. Klautke** rechtherzlich bedanken,

... die Übernahme des betreuenden Amtes und das Interesse am Fortgang meiner Arbeit. Ein Dankeschön an **Herrn Prof. Dr. G. Hildebrandt**,

... meine motivierte, immer erreichbare und unermüdliche Betreuerin.

Ich bedanke mich von Herzen für die freundliche und intensive Zusammenarbeit, das offene Ohr, die Beantwortung aller Fragen, die wertvollen Anregungen und den berühmten „Tritt“ bei **Frau Dr. K. Manda**,

... die Unterstützung in der Einarbeitungsphase, Ratschläge und Kniffe beim Umgang mit Zellen, Pipetten und Geräten. Ein riesiger Dank geht an das **Team des Zellkulturlabors** für die Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung,

... eine Einführung in das Thema der Statistik und die technischen Gegebenheiten sowie die Durchführung der Bestrahlung. Ein weiterer Dank gilt dem **Team der Physik**,

... den Rückhalt, die Unterstützung und all das, was mit Worten nicht auszudrücken ist. Ich danke **meinen Eltern** und **meinen Freunden**.

Anhang

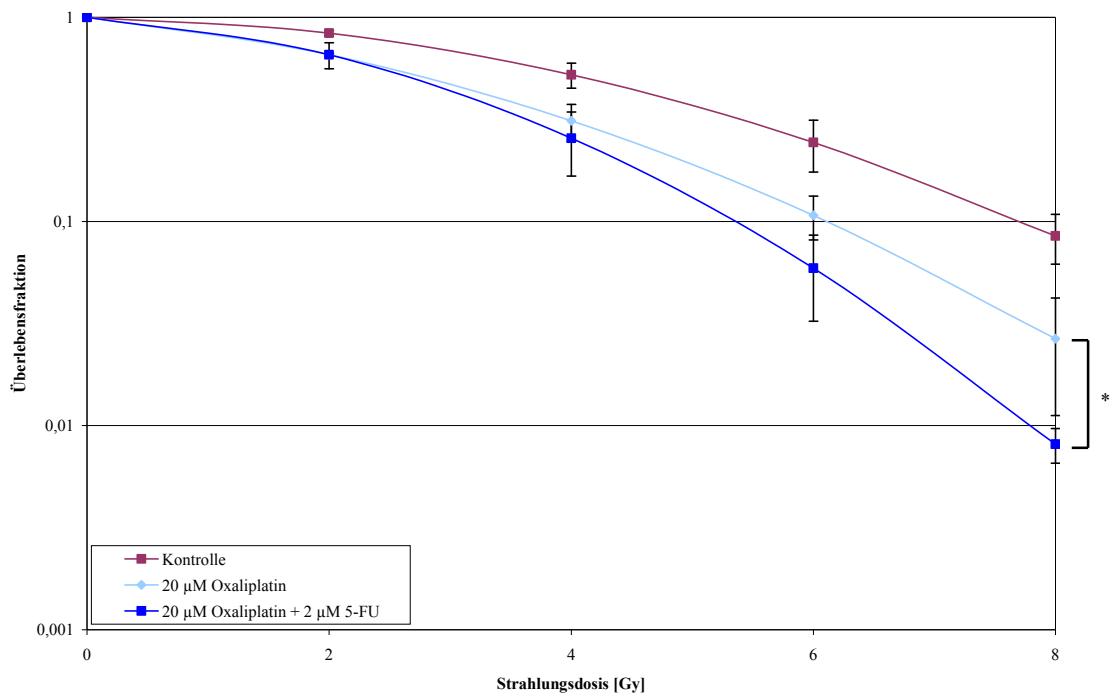


Abb. 36: Auf 1 normierte Zellüberlebenskurve der HT29-Zellen unter Zugabe von 20 μM Oxaliplatin bzw. 20 μM Oxaliplatin + 2 μM 5-FU zzgl. der Kontrolle; mit einem vollständigen Mediumwechsel 2 h vor dem Bestrahlungszeitpunkt. Normierte MW ± SD (n = 3). $p \leq 0,05 = *$ zu Oxaliplatin.

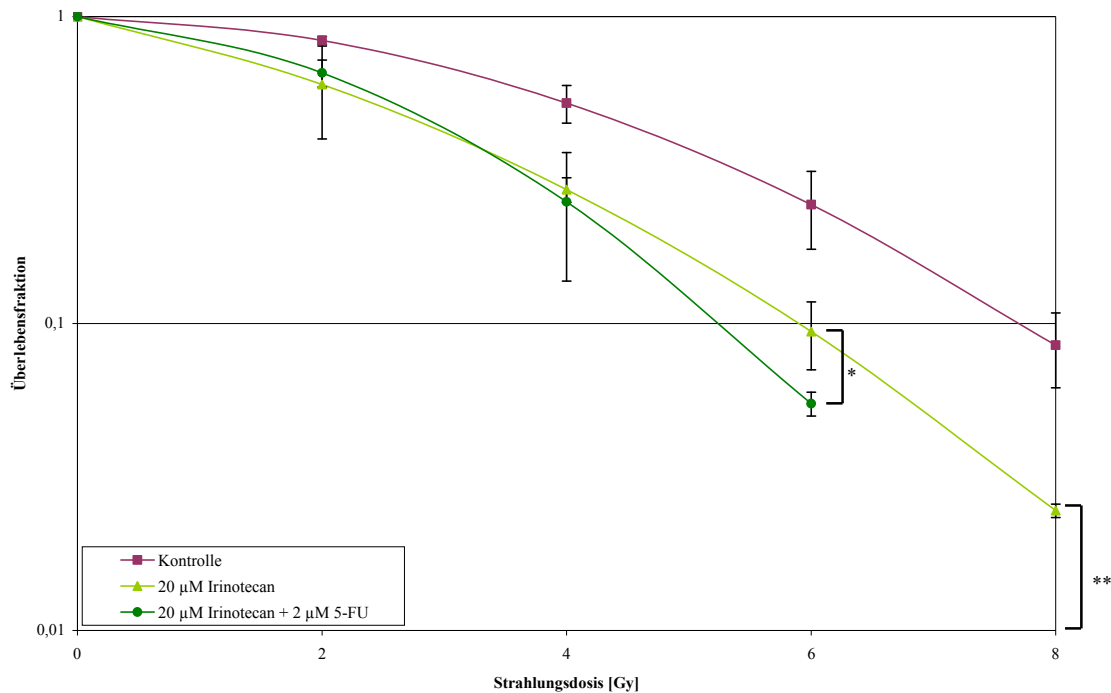


Abb. 37: Auf 1 normierte Zellüberlebenskurve der HT29-Zellen unter Zugabe von 20 μM Irinotecan bzw. 20 μM Irinotecan + 2 μM 5-FU zzgl. der Kontrolle; mit einem vollständigen Mediumwechsel 2 h vor dem Bestrahlungszeitpunkt. Normierte MW ± SD (n = 3). $p \leq 0,05 = *$ zu Oxaliplatin ; $p \leq 0,01 = **$ zu Oxaliplatin.

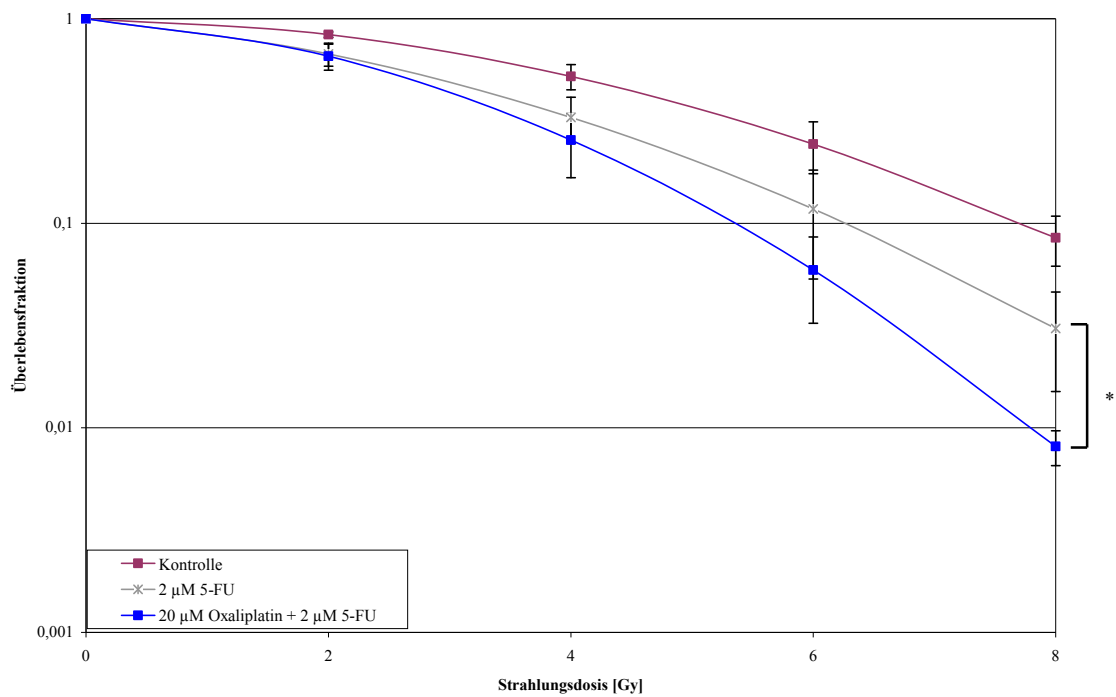


Abb. 38: Auf 1 normierte Zellüberlebenskurve der HT29-Zellen unter Zugabe von 2 μ M 5-FU bzw. 20 μ M Oxaliplatin + 2 μ M 5-FU zzgl. der Kontrolle; mit einem vollständigen Mediumwechsel 2 h vor dem Bestrahlungszeitpunkt. Normierte MW \pm SD (n = 3). $p \leq 0,05 = *$ zu 5-FU.

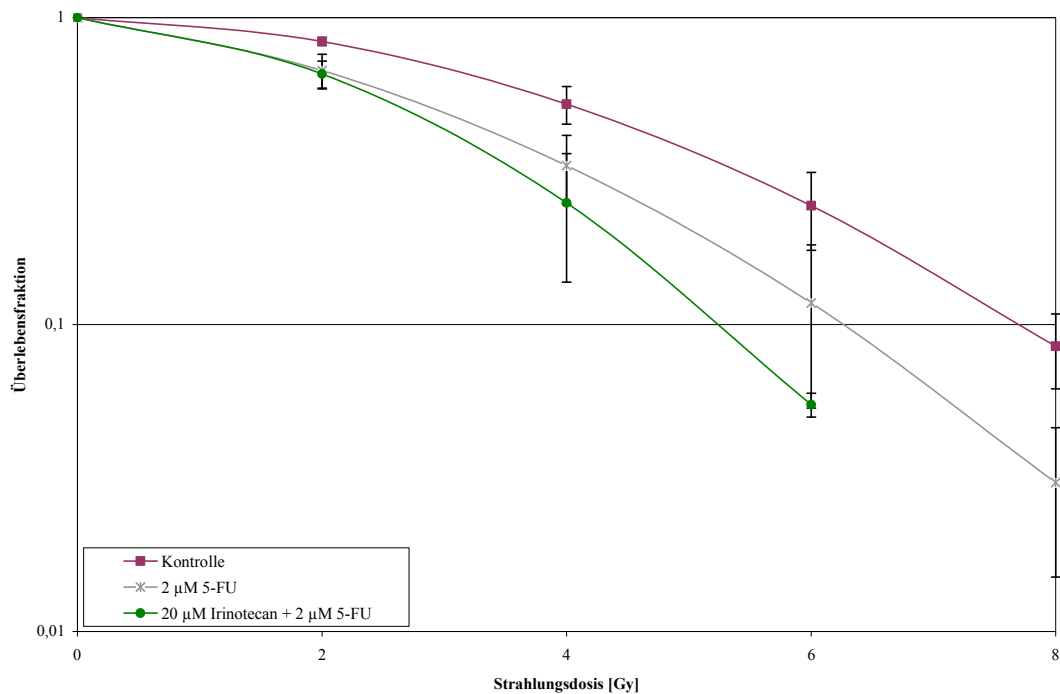



Abb. 39: Auf 1 normierte Zellüberlebenskurve der HT29-Zellen unter Zugabe von 2 μ M 5-FU bzw. 20 μ M Irinotecan + 2 μ M 5-FU zzgl. der Kontrolle; mit einem vollständigen Mediumwechsel 2 h vor dem Bestrahlungszeitpunkt. Normierte MW \pm SD (n = 3).


Tab. 11: Wirkstoffkonzentrationen von 5-FU in μM und mg/ml .

Wirkstoffkonzentration von 5-FU in μM	Wirkstoffkonzentration von 5-FU in $\mu\text{g/ml}$
2	0,26016
5	0,6504
10	1,3008
20	2,6016
50	6,504
100	13,008
200	26,016

Tab. 12: Vergleich der Ergebnisse aus den untersuchten Wirkstoffregimen unter Einfluss von Bestrahlung.

Wirkstoffregime mit 	Oxaliplatin vs. Irinotecan	Oxaliplatin + 5-Fluorouracil vs. Irinotecan + 5-Fluorouracil
Koloniebildungstest	Kein signifikanter Unterschied	Kein signifikanter Unterschied
EZ4U-Test	Kein signifikanter Unterschied	Kein signifikanter Unterschied
BrdU-Test	Kein signifikanter Unterschied	Kein signifikanter Unterschied
γ -H2AX-Test	Kein signifikanter Unterschied	Kein signifikanter Unterschied

Tab. 13: Vergleich der Ergebnisse aus den untersuchten Wirkstoffregimen Oxaliplatin + 5-FU bzw. Irinotecan + 5-FU mit 5-FU als Monochemotherapeutikum unter Radiatio.

Wirkstoff- regime mit 	Oxaliplatin + 5-Fluorouracil vs. 5-Fluorouracil	Irinotecan + 5-Fluorouracil vs. 5-Fluorouracil
Koloniebildungstest Plattiereffizienz	PE signifikant erniedrigt: FOLFOX < 5-FU (2, 4, 6, 8 Gy)	PE signifikant erniedrigt: FOLFIRI < 5-FU (2, 4, 6, 8 Gy)
Koloniebildungstest Überlebensfraktion	ÜF signifikant erniedrigt: FOLFOX < 5-FU (8 Gy)	Kein signifikanter Unterschied
EZ4U-Test	Kein signifikanter Unterschied	Kein signifikanter Unterschied
BrdU-Test	Zellproliferation signifikant erniedrigt: FOLFOX < 5-FU (1 h, 24 h)	Zellproliferation signifikant erniedrigt: FOLFIRI < 5-FU (1 h, 24 h)
γ-H2AX-Test	Anzahl der DNA- Doppelstrangbrüche signifikant erhöht FOLFOX > 5-FU	Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche signifikant erhöht FOLFIRI > 5-FU

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne fremde Hilfe, ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich versichere ausdrücklich sämtliche in der Arbeit verwendete fremde Quellen als solche kenntlich gemacht zu haben. Dies gilt auch für Zeichnungen, Skizzen, bildliche Darstellungen sowie Quellen aus dem Internet. Die vorliegende Dissertation ist in dieser oder anderer Form zuvor weder im Ausland noch im Inland einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Mir ist bewusst, dass Verstöße gegen die Grundsätze der Selbstständigkeit als Täuschung betrachtet und geahndet werden.

Marie-Louise Fleischer
Bonn, den 22. November 2015