

Ursachen der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität-
Einfluss der individuellen genetischen Ausstattung, des oxidativen
Stresses und der Metabolisierung

D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Annegret Reichwagen, geb. Metzger

geboren am 24.01.1979

in Halle/S.

Mainz, 2012

1 Inhaltsverzeichnis

Inhalt

1	Inhaltsverzeichnis	2
2	Danksagung	8
3	Einleitung	9
3.1	Wirkung von Anthrazyklinen	9
3.2	Nebenwirkungen.....	10
3.3	Ursachen der Kardiotoxizität.....	11
3.4	Allgemeine Strategien zur Vermeidung von Spätfolgen.....	14
3.4.1	Verbesserung der Selektivität der Chemotherapeutika	14
3.4.2	Berücksichtigung der individuellen genetischen Situation bei der Entstehung von Spätschäden	15
3.4.3	Verbesserung der Darreichungsform	15
3.5	Strategien zur Vermeidung der Anthrazyklin-induzierten Herztoxizität	16
3.5.1	Modifikation der Applikationsschemata	16
3.5.2	Neuere Anthrazykline	16
3.5.3	Komedikation mit protektiv wirksamen Substanzen	16
3.6	Zusammenfassung der Strategien zur Vermeidung der Anthrazyklin-induzierten Herztoxizität	17
3.7	Dexrazoxan.....	17
3.7.1	Wirkungsmechanismus von Dexrazoxan	17
3.7.2	Therapeutische Wirksamkeit.....	18
3.7.3	Nebenwirkungen der Dex-Therapie	19
3.7.4	Zusammenfassung über das Kardiopräventivum Dexrazoxan.....	20
4	Ziele dieser Arbeit	21
4.1	Doxorubizin-induzierter oxidativer Stress	21
4.1.1	Oxidativer Stress in der Zellkultur	21
4.1.2	Oxidativer Stress in verschiedenen Mäusestämmen	21
4.2	Unterschiede in der Dox-Metabolisierung bei verschiedenen Mäusestämmen	22
4.3	Ricover60-Studie	22
5	Material.....	23
5.1	Chemikalien, Enzyme, Kits und Medien.....	23
5.2	Gebrauchsmaterialien	25
5.3	Geräte	25
5.4	Software.....	26
6	Methoden	27
6.1	Zellkultur	27
6.1.1	HTETOP- und HT1080-Zellen	27
6.1.2	Kultivierung und Erhalt der HTETOP-/ HT1080-Zelllinie.....	27
6.1.3	Vorbereitung der HTETOP-/HT1080-Zellen für die Versuche	27
6.2	GSH-Versuche.....	27
6.2.1	Probenvorbereitung	27
6.2.2	Messprinzip zur Bestimmung des totalen Glutathions.....	28
6.2.3	Versuchsaufbau zur Bestimmung des Gesamtglutathions	28
6.2.4	Versuchsaufbau zur Bestimmung des oxidierten Glutathions (GSSG)	29
6.3	Nachweis von oxidativem Stress mittels H ₂ DCFDA.....	30
6.3.1	Messprinzip	30
6.3.2	Versuchsaufbau	30

6.4	Nachweis von oxidativem Stress (insbesondere Superoxid) durch die Quantifizierung von DHE mittels HPLC	31
6.4.1	Messprinzip	31
6.5	Nachweis des Zellüberlebens mittels des MTT-Assays	32
6.5.1	Testprinzip	32
6.5.2	Herstellung des MTT-Mastermix	32
6.5.3	Versuchsaufbau	32
6.5.4	Auswertung	32
6.6	Bestimmung der LDH-Konzentration im Medium	33
6.6.1	Testprinzip	33
6.6.2	Versuchsaufbau	33
6.7	Microarray (High-density oligonucleotide Microarray)	33
6.7.1	Probenvorbereitung	33
6.7.2	Auswertung der Microarray-Daten	34
6.8	Quantifizierung von Dox und seiner Metabolite in verschiedenen Geweben der Maus mittels HPLC	35
6.8.1	Allgemeines Prinzip der Hochleistungs-Flüssigchromatographie	35
6.8.2	Nachweis von Dox und seiner Metabolite mittels HPLC	35
6.8.3	Behandlungsplan der Mäuse und anschließende Gewebeaufarbeitung für die HPLC	37
6.8.4	Behandlungsplan der HTETOP-Zellen und anschließende Gewebeaufarbeitung für die HPLC-Messung	38
6.8.5	Validierung der Methode zur quantitativen Bestimmung von Dox, Doxol und Doxon	38
6.8.6	Herstellung der Stammlösungen (Referenzsubstanzen)	41
6.9	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	43
6.10	Ricover60-Studie	43
6.10.1	Studiendesign	43
6.10.2	Ziele unserer Arbeitsgruppe	43
6.10.3	Erfassung und Beurteilung der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz	44
6.10.4	Beschaffung aller benötigten Blutproben für die Genotypisierung	46
6.10.5	NT-proBNP-Bestimmung	46
6.10.6	Identifizierung von genetischen Polymorphismen, die für eine Anthrazyklin-induzierte Herzinsuffizienz prädestinieren	48
6.10.7	Isolation genomischer DNA	49
6.10.8	DNA-Sequenzierung	49
7	Ergebnisse	52
7.1	Quantitative Bestimmung von Dox und seiner Metabolite im Blut, Herz und in der Leber von verschiedener Mäusestämme sowie die Bestimmung des oxidativen Stresses in den Herzen der Mäuse	52
7.1.1	Behandlung der C57BL/6- und Balb/c-Mäuse mit 12 mg Dox je kg Körpergewicht	52
7.1.2	Behandlung verschiedener Mäusestämme mit 3 mg Dox je kg Körpergewicht	60
7.1.3	Bestimmung des oxidativen Stresses in den Mäuseherzen durch die Messung des GSH / GSSG-Gehaltes unter Verwendung von DTNB	65
7.2	Einfluss des oxidativen Stresses auf die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Toxizität in den HTETOP-Zellen	69
7.2.1	Messungen mit dem Fluoreszenzmarker H ₂ DCFDA	69
7.2.2	HPLC-Bestimmung des Superoxidgehaltes in den HTETOP-Zellen unter Verwendung von DHE	73

7.2.3	Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehaltes unter Verwendung von DTNB	75
7.3	Untersuchungen zur Genexpression mittels Microarray	83
7.4	Bestimmung der Überlebensrate der HTETOP-Zellen mit Hilfe des MTT-Assays	85
7.5	Bestimmung der Zellmembranintegrität durch die Messung von LDH	87
7.6	Bestimmung der Dox-Konzentration in den HTETOP-Zellen durch HPLC-Messungen	89
7.7	Bestätigung der in der NHLB-Studie identifizierten Assoziationen zwischen Dox-induzierter Kardiotoxizität und genetischen Varianten von MRP1 und MRP2 sowie der NAD(P)H-Oxidase	90
7.7.1	Erfassung und Beurteilung der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz	90
7.7.2	Bestimmung des NT-proBNP-Wertes zur Verifizierung der Herzinsuffizienz	92
7.7.3	Identifizierung von genetischen Polymorphismen	97
7.7.4	Kardiotoxizitätsanalyse	98
7.7.5	Multivariate Kardiotoxizitätsanalyse	106
7.7.6	Metaanalyse zwischen unserer Studie und der von Wojnowski et al. aus dem Jahr 2005 [20]	107
8	Diskussion	108
8.1	Ursachen der unterschiedlichen Empfindlichkeit der C57BL/6- und Balb/c-Mäuse auf die Gabe von Dox	108
8.1.1	HPLC-Untersuchungen nach der Injektion von 12mg Dox je kg Körpergewicht (akute Toxizität)	108
8.1.2	HPLC-Untersuchungen nach der Injektion von 3 mg Dox je kg Körpergewicht (chronische Toxizität)	112
8.1.3	Einfluss des oxidativen Stresses auf die unterschiedliche Empfindlichkeit beider Mäusestämme gegenüber Dox	113
8.1.4	Modulationsmöglichkeiten und Ursachen des Dox-induzierten oxidativen Stresses	114
8.2	Einfluss des oxidativen Stresses auf die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Toxizität in den HTETOP-Zellen	115
8.2.1	Untersuchungen zum Zellüberleben nach der Gabe von Dox	115
8.2.2	Beschreibung des Dox-induzierten oxidativen Stresses in den HTETOP-Zellen	118
8.2.3	Ursachen für die Dox-induzierte Veränderung des GSH / GSSG-Haushaltes in den HTETOP-Zellen	119
8.2.4	Modulation des oxidativen Stresses in den HTETOP-Zellen	121
8.2.5	Einfluss der Topo II α auf den Dox-induzierten oxidativen Stress	123
8.3	Beeinflussung des oxidativen Stresses durch die Veränderung der Genexpression in den HTETOP-Zellen	125
8.3.1	Glutathion-S-Transferasen (GST)	125
8.3.2	SOD	127
8.3.3	cFOS	128
8.3.4	Xanthindehydrogenase (XDH)	128
8.3.5	Thioredoxinreduktase 1	129
8.3.6	Monoaminoxidase A	129
8.4	Bedeutung genetischer Polymorphismen für die Entstehung von kardialen Schäden nach Dox	130
8.4.1	Kardiotoxizitätsanalyse am Studienkollektiv der Ricover60-Studie	130
8.4.2	Bewertung der Metaanalyse	135
9	Ausblick	137

10	Zusammenfassung	138
11	Anhang	139
	11.1 Zusammensetzung des „Blutprobenkits“	139
	11.2 Arztansreiben für die akuten Fälle.....	140
	11.3 Arztansreiben für die chronischen Fälle	142
	11.4 Arztansreiben für die Kontrollen	144
	11.5 Begleitbogen.....	146
	11.6 Patienteninformation	147
	11.7 Einverständniserklärung	148
	11.8 Ergebnisse aus den NT-proBNP-Bestimmungen	149
	11.9 Kriterien aus der Datenbankabfrage	152
	11.10 Identifizierung von Herzscheiden.....	153
	11.11 Ergebnisse der Genotypisierung.....	163
	11.12 Detaillierte Darstellung der Zuordnung Fall /Kontrolle	171
	11.13 Diverse HPLC-Chromatogramme	180
	11.14 Übersichtsdarstellung zum oxidativen Stress in den HTETOP-Zellen	181
12	Literatur	183
13	Abbildungsverzeichnis	196
14	Tabellenverzeichnis	198
15	Abkürzungsverzeichnis	199

„Das Glück besteht nicht darin, daß du tun kannst, was du willst, sondern darin, daß du immer willst, was du tust.“ von Leo Nikolajewitsch Tolstoi, russischer Schriftsteller, 1828-1910

2 Danksagung

Ganz nach dem Motto von Tolstoi habe ich versucht, die vorliegende Dissertation anzufertigen. Dies wäre mir aber nicht gelungen, hätte ich nicht die Unterstützung von zahlreichen Kollegen, Freunden und der Familie gehabt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Leszek Wojnowski, der mir das Thema zur Promotion gestellt hat und mich bei fachlichen Fragen stets unterstützt hat. Aber auch durch die gemeinsamen Diskussionen erhielt ich von ihm wertvolle Anregungen zur Durchführung meiner Arbeit. Nicht zu letzt möchte ich mich herzlich für die fortwährende angenehme Zusammenarbeit bei der Anfertigung meiner Dissertation bedanken.

Für die freundliche Aufnahme am Institut für Klinische Pharmakologie in Mainz und in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Leszek Wojnowski möchte ich mich bei allen Mitarbeitern bedanken. Besonders bei Frau Ute Gödtel-Armbrust bedanke ich mich herzlich, dass sie mich in alle Bereiche des Labors und insbesondere in die Zellkultur sehr gut eingearbeitet hat. Besonders danke ich Ihr aber dafür, dass sie mich mit ihrer stets freundlichen und fröhlichen Art in der aufregenden Schlussphase meiner Arbeit so gut unterstützt und aufgemuntert hat. Auch bei Shiwei Deng bedanke ich mich herzlich, dass sie mich bei der Auswertung der Microarraydaten so gut unterstützt hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Platt möchte ich mich für die freundliche Unterstützung und die wertvollen Ratschläge während der Arbeit an der HPLC bedanken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Andreas Daiber, dem Leiter der Arbeitsgruppe für Molekulare Kardiologie der 2. Medizinischen Klinik und Poliklinik in Mainz, der für mich die HPLC-Untersuchungen zur Bestimmung der DHE-Konzentrationen durchgeführt hat.

Herrn Prof. Pfreundschuh gilt mein Dank, dass ich Patientendaten der Ricover60-Studie verwenden durfte, um die Assoziationen zwischen diversen genetischen Polymorphismen und dem Auftreten der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität zu untersuchen. Bei Frau Tanja Rixecker und Frau Viola Pöschel aus dem Studiensekretariat in Bad Homburg möchte ich mich herzlich bedanken, dass Sie mich bei der Beschaffung der erforderlichen Blutproben der Ricover60-Studie so freundlich unterstützt haben. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Toliat aus dem Cologne Center for Genomics der Universität Köln, der die Genotypisierungen von unseren gesammelten DNA-Proben durchgeführt hat. Auch bei Herrn Dr. Mladen Tzvetkov aus der Klinischen Pharmakologie in Göttingen möchte ich mich herzlich für die Geschlechtsbestimmung unserer gesammelten DNA-Proben bedanken, mit der wir die Richtigkeit unseres genetischen Materials prüfen konnten. Mein besonderer Dank gebührt auch Frau Dr. Marita Ziepert aus dem Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie in Leipzig, die für mich das Matching der Ricover60-Proben durchgeführt und mich in zahlreichen statistischen Fragestellungen sowie bei der Prüfung und Bewertung der Patientendaten so gut unterstützt hat. Bei Herrn Markus Kreuz aus dem Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie in Leipzig bedanke ich mich herzlich für die Durchführung der Univariaten und Multivariaten Analyse sowie für die Erstellung der dazugehörigen Grafiken, mit der wir für einige Genotypen eine Korrelation zur Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität nachweisen konnten.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem NGFN, die meine Arbeiten am Institut für Pharmakologie mit finanziert haben.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meinem Mann Jens für die immerwährende liebevolle Unterstützung bedanken, der mir in der sehr intensiven Zeit mit unseren Kindern Till und Hanna immer wieder Freiräume geschaffen hat, um an meiner Dissertation zu arbeiten.

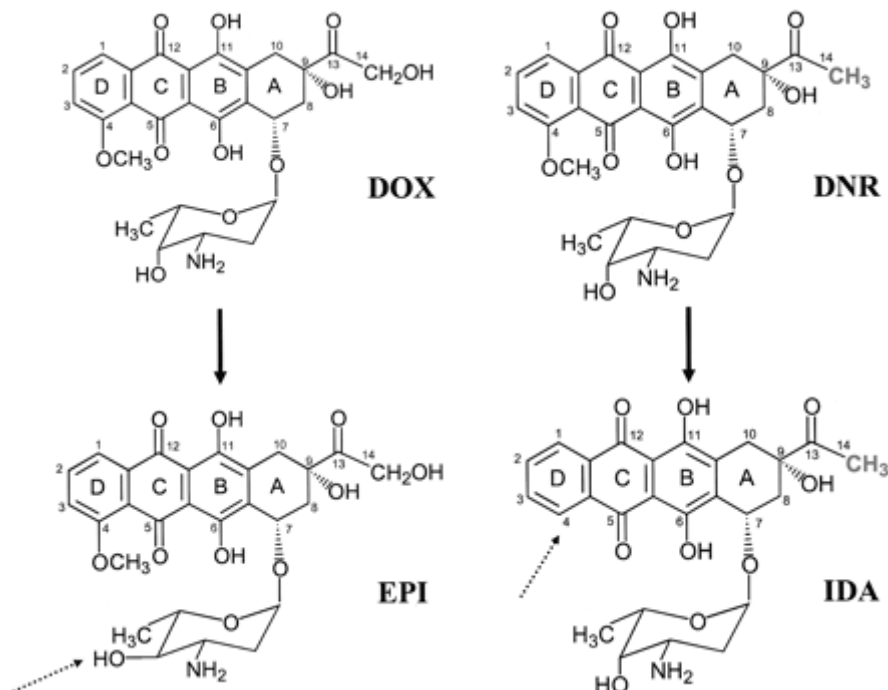
3 Einleitung

Die zunehmende Effizienz von Tumorthérapien führt zu einer stetig ansteigenden Lebenserwartung der Patienten. Dadurch wächst das Interesse an den potentiellen Spätfolgen der einzelnen Chemotherapeutika. Besonders bei der Therapie mit Anthrazyklinen ist mit schwerwiegenden Spätfolgen zu rechnen [1]. Da sich diese Arbeit hauptsächlich mit der Erforschung der Anthrazyklin-induzierten Nebenwirkungen beschäftigt, soll im Folgenden ein Überblick über die Gruppe der Anthrazykline gegeben werden.

Seit den 60er Jahren werden Anthrazykline (z.B. Doxorubizin, Daunorubizin, Epirubizin u. a.) aufgrund ihrer sehr guten Antitumoreigenschaften gegen ein breites Spektrum solider und hämatologischer Tumore (z.B. Mammakarzinome und Non Hodgkin Lymphome) eingesetzt. Sie werden dabei vorwiegend in einer Kombinationstherapie eingesetzt und gehören auch heute noch zu den wirksamsten Chemotherapeutika, die für die Antitumorthérapie zur Verfügung stehen.

Das Grundgerüst der Anthrazykline besteht aus einem Anthrachinon-Ringsystem, an das ein weiterer Ring linear anneliert ist. An diesem annelierten Ring ist ein Aminozucker wie zum Beispiel Daunosamin glykosydisch gebunden (siehe Abb. 1).

Abb. 1: Strukturen von Doxorubizin (DOX), Daunorubizin (DNR), Epirubizin (EPI) und Idarubizin (IDA) aus Minotti et al. [2]



3.1 Wirkung von Anthrazyklinen

Die Antitumor-Wirkung der Anthrazykline setzt sich vermutlich aus verschiedenen Komponenten zusammen. Ein wichtiger Effekt ist die Anthrazyklin-induzierte Hemmung der Topoisomerase II, wodurch ein spaltbarer DNA-Komplex entsteht [3]. Dadurch wird die DNA-Replikation behindert. Es kommt zu Störungen der Strangtrennung / -entwindung so-

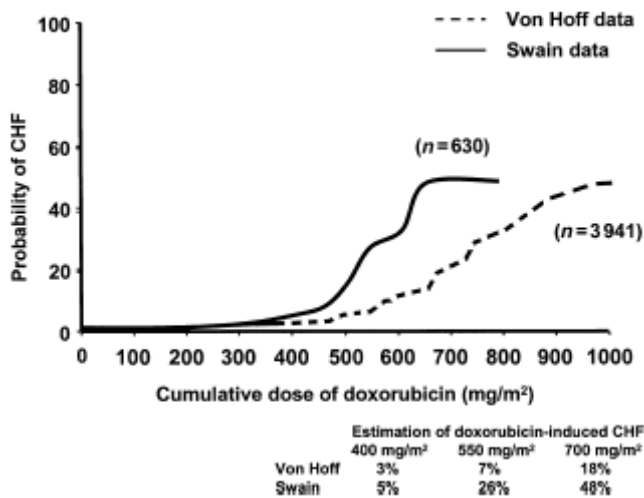
wie der Reparatur von Strangbrüchen [4]. Dies führt letztlich zur Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose). Als weitere Ursachen für die Antitumor-Wirkung der Anthrazykline werden die DNA-Interkalation und die DNA-Alkylierung postuliert [1]. Aber auch die Entstehung von freien Radikalen durch die enzymatische Reduktion der Anthrazykline unter Beteiligung diverser Oxidasen, Reduktasen und Dehydrogenasen, tragen einen entscheidenden Anteil an der Antitumorwirkung bei [5, 6]. Neben anderen Effekten führen die freien Radikale zu einer Schädigung der Zellmembranen und zu DNA-Crosslinkings, wodurch die Zellen am weiteren Wachstum gehindert werden. Auf zellulärer Ebene lässt sich eine Anreicherung der Anthrazykline in den Mitochondrien feststellen [7]. Infolge dessen kommt es zu einer Beeinflussung der Atmungskette. Die mitochondriale ATPase wird gehemmt und es findet eine partielle Entkoppelung statt, bei der der Protonengradienten ohne die Gewinnung von ATP abgebaut wird [8]. Als Zeichen für die bereits einsetzende Apoptose kann anschließend ein Anschwellen der Mitochondrien beobachtet werden. Außerdem führen die Anthrazykline zu einer Reduktion der Phosphokreatinmenge (=ATP-Speicherform) und zu Veränderungen der Phosphofruktokinase-Aktivität, wodurch die Glucoseverwertung eingeschränkt wird [7]. Aber auch eine Hemmung der Fettsäureoxidation und die Senkung der AMPK-Expression wurden in diesem Zusammenhang beobachtet. Die eingesetzte Anthrazyklindosis entscheidet darüber, ob in den Zellen eine Apoptose (bei niedrigen Anthrazyklindosen) oder eine Nekrose ausgelöst wird.

3.2 Nebenwirkungen

Neben den üblichen unerwünschten Arzneimittelwirkungen für Zytostatika wie z.B. Nausea, Emesis, Neutropenie oder Haarausfall, ist die wohl folgenschwerste Nebenwirkung der Anthrazykline die dosisabhängige irreversible Schädigung des Herzens. Da sich diese Arbeit mit den Ursachen der Kardiotoxizität beschäftigt, soll im Folgenden näher auf diese Nebenwirkung eingegangen werden. Das Auftreten von kardialen Schäden führt gelegentlich zu einem Therapieabbruch und häufig zu einer wesentlichen Einschränkung in der optimalen chemotherapeutischen Dosis. Die kardiale Toxizität wird je nach ihrem zeitlichen Auftreten in akute Toxizität (Stunden bis Tage nach initialer Gabe) und chronische Toxizität (Monate bis Jahre nach der Chemotherapie) unterteilt [1]. Die akute Toxizität äußert sich meist als eher harmlose Arrhythmie. Diese ist nur selten lebensbedrohlich und kann meistens durch Gabe von Antiarrhythmika unterbrochen werden. Häufiger und wesentlich gefährlicher ist die chronische Form der Kardiotoxizität, die mit einer irreversiblen Schädigung des Myokards einhergeht. Es kommt zum Verlust von Kardiomyozyten und Myofibrillen, was dazu führt, dass der linke Ventrikel mit der Zeit dilatiert [2]. Gleichzeitig wurde eine Abnahme der Wanddicke sowie eine starke Fibrosierung beobachtet, die zu einer eingeschränkten Kontraktilität des Herzens führt. Diese chronische Form der Kardiotoxizität kann bis zu einem Herzversagen führen.

Das Auftreten einer Herzschrägung hängt von zahlreichen Faktoren ab, wobei die verabreichten Anthrazyklindosen von entscheidender Bedeutung sind. Der besonders steile Prävalenzanstieg der chronischen Herzinsuffizienz nach Dox-Dosen über 550 mg/m² Körperoberfläche in der Von Hoff-Studie [9], führte zu einer Festlegung von kumulativen Maximaldosen für alle Anthrazykline (siehe Abb. 2).

Abb. 2: Kumulative Wahrscheinlichkeit einer Dox-induzierten Herzschiidigung



CHF: congestive heart failure als Funktion der kumulativen Dox-Dosen in 2 Studien (aus Wouters et al. 2005 [10])

Aber auch das Alter, das weibliche Geschlecht, kurze Infusionszeiten, bereits zu Therapiebeginn vorhandene Beeinträchtigungen der Herzfunktion oder gleichzeitige mediastinale Bestrahlung erhöhen das Risiko zur Entwicklung von Herzschiiden [2]. Die Anthrazyklin-induzierte Kardiotoxizität lässt sich jedoch auch bei Einhaltung der anerkannten Höchstdosen und der langsamen intravenösen Applikation nicht vollständig verhindern.

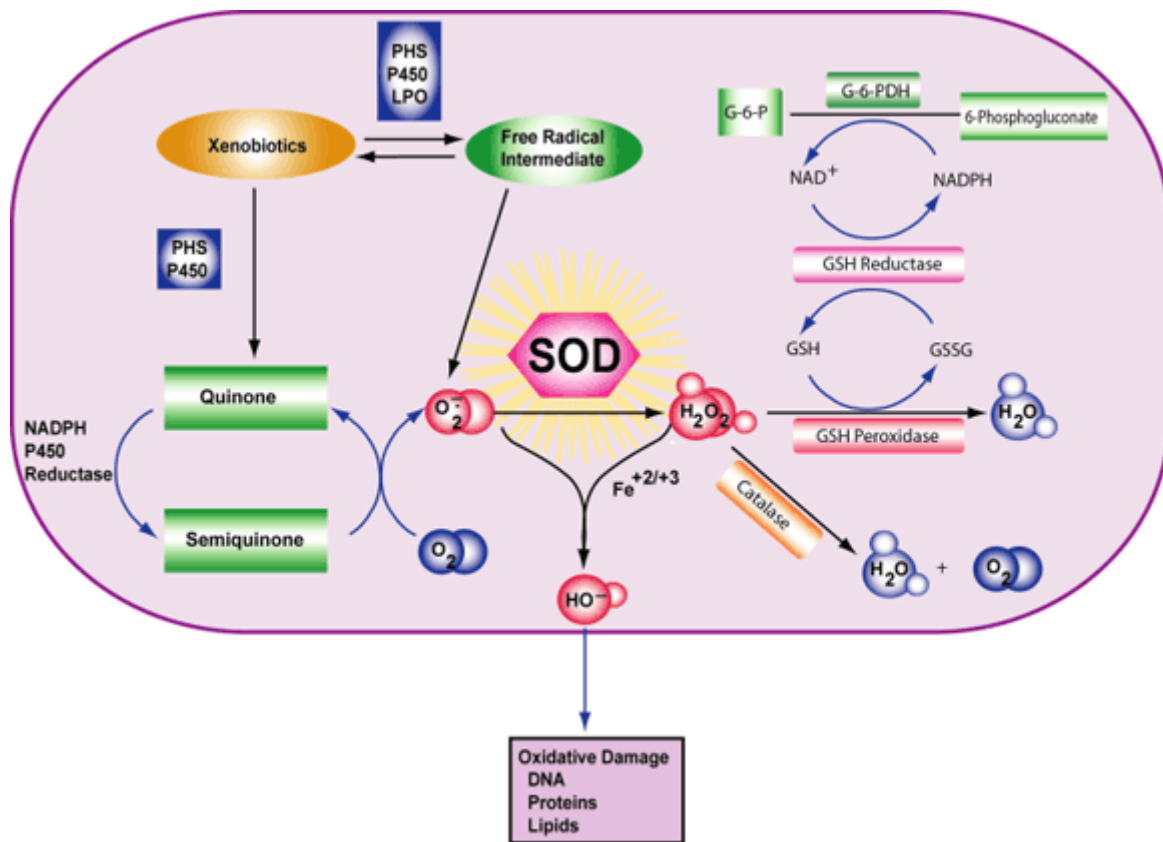
Besonders auffällig ist, dass die Inzidenz der Anthrazyklin-induzierten Kardiomyopathien drastisch ansteigt, je länger der Nachbeobachtungszeitraum im Anschluss an die Gabe von Anthrazyklinen gewählt wurde [11]. Nach vier bis fünf Jahren wiesen 18 Prozent der Patienten kardiale Funktionsabnormalitäten auf, wohingegen nach mehr als zehn Jahren Beobachtungszeit sogar 38 Prozent der Patienten betroffen waren [12]. Dies gilt insbesondere auch für Patienten, die als Kinder mit Anthrazyklinen behandelt wurden. Innerhalb dieser Gruppe konnte nach Beobachtungszeiten von mindestens 15 Jahren und einer Dosis > 500 mg/m² eine Inzidenz von 71% subklinischer und klinischer Kardiotoxizitäten beobachtet werden [11]. Diese Daten machen deutlich, dass es bei der Gabe von Anthrazyklinen zu einer stark verzögerten Manifestation der chronischen Herzschiiden kommt. Umso entscheidender wird die Suche nach kardiopräventiven Maßnahmen. Dennoch gibt es trotz intensiver Bemühungen nur wenige Möglichkeiten um die kardiale Sicherheit von Anthrazyklinen zu verbessern [1].

3.3 Ursachen der Kardiotoxizität

Die genauen molekularen Ursachen für die Anthrazyklin-induzierten Herzschiidigungen konnten bislang noch nicht abschließend identifiziert werden. Man geht davon aus, dass die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [9, 12-14] eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung der Kardiomyopathie spielen. Durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können diverse Schiiden an lebenden Zellen verursacht werden. ROS sind entweder freie Radikale, reaktive Anionen oder Moleküle, die durch den enthaltenen Sauerstoff die Bildung freier Radikale provozieren können bzw. durch freie Radikale chemisch aktiviert werden. Die bekanntesten ROS sind das Hydroxylradikal, Superoxid, Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Peroxynitrit. In lebenden Zellen entstehen die meisten ROS während der Atmungskette. Aber

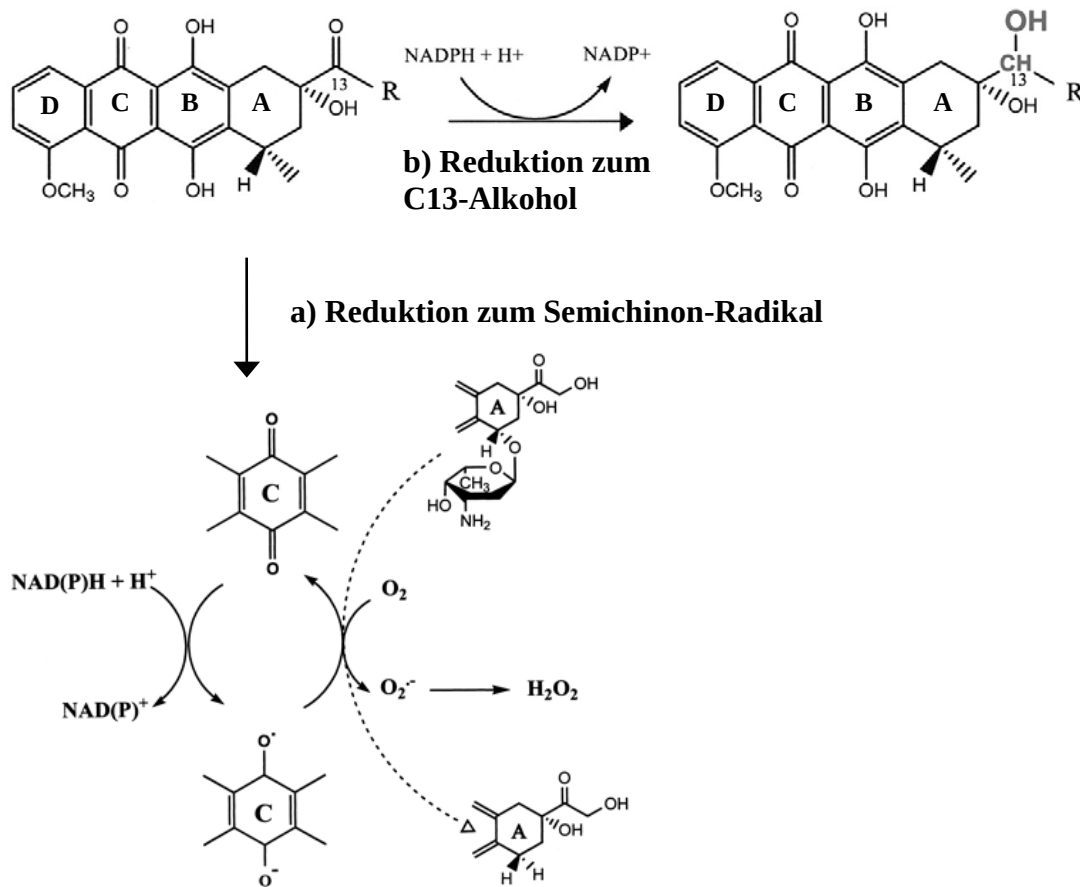
auch während der peroxisomalen Oxidation der Fettsäuren, der Metabolisierung von xenobiotischen Substanzen durch das mikrosomale Cytochrom P450-System, der Stimulation der Phagozytose durch Pathogene oder Lipopolysaccharide, durch den Argininstoffwechsel und gewebsspezifische Enzyme kann die Bildung von ROS stimuliert werden. Unter normalen Bedingungen ist die Zelle in der Lage, die reaktiven Sauerstoffspezies abzubauen und so die Entstehung von Schäden zu verhindern (siehe Abb. 3). Hierbei spielen die Enzyme Superoxiddismutase (SOD), die die Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid katalysiert, die Katalase (CAT), welche die Umwandlung von H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff katalysiert und die Glutathion-peroxidase, welche die Umwandlung von H_2O_2 in Wasser katalysiert, eine entscheidende Rolle.

Abb. 3: Übersicht zur Entstehung und Beseitigung von oxidativem Stress in der Zelle (aus [15])



Bei den Anthrazyklinen ist vor allem deren Chinonringsystem an der Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt [1, 2]. Dieses kann leicht Elektronen aufnehmen. Dabei entsteht zunächst ein Semichinonradikal. Die Wiederherstellung der Chinonstruktur erfolgt durch Übertragung des ungepaarten Elektrons auf molekularen Sauerstoff, wobei Superoxid entsteht. Dieser Redoxzyklus kann sich mehrfach wiederholen, sodass aus einem Anthrazyklinmolekül eine Vielzahl an Superoxidradikalen gebildet werden können. Das Semichinonradikal kann jedoch auch die Bindung zwischen dem Ring A und dem Zuckerrest oxidieren und so das 7-Desoxy-Aglykon bilden. Dieses lipophile Aglykon kann sich in die Zellmembranen einlagern und somit in direkter Nähe zu empfindlichen Zielstrukturen der Zelle Superoxid bilden (siehe Abb. 4).

Abb. 4: Mögliche Mechanismen für die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität aus Kruger et al. [1]



Aus dem entstandenen Superoxid können a) weitere radikale Sauerstoffspezies (ROS), wie das hochreaktive Hydroxylradikal oder b) reaktive Stickstoffverbindungen (RNS) wie das Peroxynitrit gebildet werden. Diese vermehrt entstehenden freien Radikalen können mit zellulären Makromolekülen (wie die DNA, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, Membranlipide oder Proteine) in Wechselwirkung treten, wodurch diese verändert bzw. unwirksam werden. So wurde nach der Gabe von Anthrazyklinen eine verstärkte Lipidperoxidation, eine Beeinflussung der Genexpression, Veränderungen von Proteinaktivitäten und Schädigungen der DNA beobachtet, welche letztlich die Membranen schädigen und zur Einleitung der Apoptose führen können [16]. Neben der enzymatischen Bildung von ROS/RNS durch die NADH-Dehydrogenase, die Cytochrom P450-Reduktase oder die Xanthinoxidase existiert auch ein nicht enzymatischer Weg. Anthrazykline sind in der Lage Fe^{3+} zu komplexieren. Das Fe^{3+} kann durch Glutathion in Fe^{2+} reduziert werden. Der so entstandenen Anthrazyklin- Fe^{2+} Komplex kann zum Fe^{3+} -Komplex rückoxidiert werden, wobei Superoxid aus molekularem Sauerstoff gebildet wird [2].

Neben der reinen Induktion von ROS, wird ebenfalls die niedrige Konzentration an endogenen, antioxidativ wirksamen Enzymen (Dismutasen und Katalasen) in den Kardiomyozyten für die Entstehung der Kardiomyopathie verantwortlich gemacht. Hierdurch können sich die Kardiomyozyten schlechter vor dem erhöhten oxidativem Stress schützen. Außerdem ist bekannt, dass Kardiomyozyten langsamer proliferieren, wodurch der schädigende Einfluss der ROS noch verstärkt werden könnte [17]. Um den Einfluss des oxidativen Stresses auf die Kardiotoxizität beurteilen zu können, muss berücksichtigt werden, dass oxidativer Stress hauptsächlich in Zellkulturversuchen nachgewiesen wurde und zwar besonders nach der Gabe

von supraklinischen Anthrazyklindosen. Ferner existieren Studien, in denen keine Zunahme des oxidativen Stresses durch Anthrazyklingabe beobachtet werden konnten. Eine weitere Studie zeigte, dass es einen Unterschied in der ROS-Produktion zwischen isolierten und kultivierten Kardiomyozyten gibt [18]. Es ist somit immer noch ungeklärt, ob unter klinisch relevanten Anthrazyklin-Konzentrationen freie Radikale gebildet werden [19].

Neben dem oxidativen Stress existieren weitere Theorien über die Ursachen der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität. Die erste Theorie macht Veränderung in der Genexpression für die Entstehung der Toxizität verantwortlich. Es fiel auf, dass einige Patienten keine Herzinsuffizienz entwickeln, obwohl sie zum Teil deutlich höhere Dosen als die kumulative Maximaldosis erhielten. Andere Patienten hingegen weisen schon nach sehr niedrigen kumulativen Dosen deutliche Herzschiäden auf. Es gibt bereits erste Hinweise darauf, dass bestimmte Genpolymorphismen die Entstehung einer Kardiomyopathie begünstigen. So konnten in einer klinischen Studie Polymorphismen der NAD(P)H-Oxidase identifiziert werden, die mit einem verstärkten Auftreten von Herzschiäden assoziiert waren. Die NAD(P)H-Oxidase wiederum ist an der zellulären Superoxid-Produktion beteiligt, wodurch sich die Theorie bezüglich des oxidativen Stresses weiter erhärten ließe. Die Befunde aus der klinischen Studie konnten auch in einem Mausmodell bestätigt werden [20]. Ein für die gp91phox-Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase defizienter Mausstamm war vor einer Dox-induzierten Herzschiädigung geschützt. Die wenigen bislang bekannten Kandidatengene [20, 21], die mit dem Auftreten von kardialen Schiäden nach der Gabe von Anthrazyklinen korrelieren, können aber bestenfalls einen Teil der genetischen Prädisposition erklären. Zusätzlich muss ihre klinische Relevanz in weiteren Studien bestätigt werden. Die genauere Kenntnis über diese Gene wäre jedoch von enormer Bedeutung für die Patienten. Es könnte schon vor Therapiebeginn abgeschätzt werden, ob eine Herzschiädigung durch die Gabe von Anthrazyklinen zu erwarten ist. Somit bestünde die Möglichkeit, auch vermeintliche Risikopatienten mit diesen hochwirksamen Zytostatika zu behandeln. In einer weiteren Theorie wird der C13-Alkohol für die ausgeprägte Toxizität verantwortlich gemacht. Er entsteht bei der Metabolisierung der Anthrazykline (Abb. 4). Die vierte Theorie postuliert Störungen des Calcium- und Eisenhaushaltes in den Myozyten. Aber auch Einschränkungen in der Energiegewinnung der Zellen könnten für die Kardiotoxizität der Anthrazykline verantwortlich sein. Die letzte Theorie geht von Veränderungen der Membranstrukturen aus, zum Beispiel durch die Bindung der Anthrazykline an negativ geladene Phospholipide- wie z.B. das Cardiolipin.

Bislang konnten die Hauptursachen für die Anthrazyklin-induzierten Herzschiädigungen noch nicht abschließend identifiziert werden. Möglicherweise tragen alle Faktoren gemeinsam zur Kardiotoxizität bei oder potenzieren sich sogar gegenseitig. Ferner konnte bislang nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob an der Entstehung der akuten und der chronischen Kardiotoxizität die gleichen molekularen Mechanismen beteiligt sind.

3.4 Allgemeine Strategien zur Vermeidung von Spätfolgen

3.4.1 Verbesserung der Selektivität der Chemotherapeutika

Viele der älteren Chemotherapeutika wirken auf alle sich schnell teilenden Zellen. Durch den Einsatz von gezielt Tumorgewebe schädigenden Zytostatika, soll die Nebenwirkungsrate auf normales Gewebe reduziert werden. In den letzten Jahren wurden zahlreiche neue Medikamente entwickelt, die sich Besonderheiten des Tumors zu Nutze machen. So hemmt z.B. ein Antikörper gegen Her2-Rezeptoren (Trastuzumab) selektiv das Wachstum von Brusttumorzellen, die vermehrten Her2 auf ihren Zelloberflächen tragen [22].

Weitere Angriffspunkte der selektiven Chemotherapeutika sind die Signalübertragung (z.B. durch Tyrosinkinasehemmer), die „Tumorennährung“ (z.B. durch Angiogenesehemmer) und

die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen [23]. Zahlreiche weitere Zielstrukturen (siehe Tab. 1) stehen derzeit in vorklinischer und klinischer Prüfung.

Tab. 1: Mögliche Zielstrukturen zur Steigerung der Tumorselektivität (nach [24])

Angriffspunkte	Auswahl an Zielstrukturen
Angiogeneseregulation	VEGF, Angiopoetin, HIF (Hypoxia-inducible Factor)
Apoptoseregulation	p53, NFκB (Nuclear Factor kappa B) , bcl-2
Onkogene	Ras, raf, jun, fos, Kinasen
Proliferationsregulation	EGF (Epidermal Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor)
Zellzyklusregulation	Cycline, Cyclinabhängige Kinasen (CDK), mitotische Kinasen

3.4.2 Berücksichtigung der individuellen genetischen Situation bei der Entstehung von Spätschäden

Auch die Berücksichtigung der individuellen genetischen Ausstattung der Patienten kann dazu beitragen, den Einsatz der Chemotherapeutika nebenwirkungsärmer werden zu lassen. Durch die Bestimmung von „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNP) kann bereits heute der Therapieerfolg bzw. die zu erwartenden Nebenwirkungen vorhergesagt werden. Zum Beispiel konnten für 5-Fluorouracil (5-FU) und 6-Mercaptopurin (6-MP) SNP identifiziert werden, die mit dem Auftreten einer erhöhten Toxizität korrelieren. Weitere Kausalzusammenhänge zwischen dem Vorhandensein bestimmter Genvarianten und dem Auftreten von Nebenwirkungen im Anschluss an eine Chemotherapie werden derzeit erforscht (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Pharmakogenetische Varianten die mit dem Auftreten einer Chemotherapie-Toxizität korrelieren (nach [24])

Substanz	Enzym	Mutation
6-Mercaptopurin	Thiopurin-Methyltransferase (TPMT)	TPMT*2 TPMT*3A TPMT*3C
5-Fluorouracil (5-FU)	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD)	DPYD*2A DPYD*9A
Irinotecan	UDP-Glucuronosyl-transferase-1A1	Insertion in Promotor und SNP
Methotrexat+ 5-FU	Methylentetrahydrofolat-reductase	C677T

3.4.3 Verbesserung der Darreichungsform

Auch durch die Optimierung der Darreichungsform kann die Chemotherapie in einigen Fällen nebenwirkungsärmer gestaltet werden. So konnte am Beispiel von Dox gezeigt werden, dass liposomal „verpacktes“ Dox weniger herzscheidigend ist als das „unverpackte“ Dox [25]. Es gibt derzeit auch erste Bestrebungen, die toxischen Therapeutika mittels spezifischer Erkennungsmoleküle gezielt zum Ort des Geschehens zu transportieren.

3.5 Strategien zur Vermeidung der Anthrazyklin-induzierten Herztoxizität

Trotz intensiver Forschung zur Vermeidung der Anthrazyklin-induzierten Herztoxizität gibt es bislang noch keine Möglichkeit, die Herzschiiden komplett zu verhindern. Es scheint jedoch, dass sich die molekularen Ursachen für die Kardiotoxizität von denen für die Antitumorwirkung verantwortlichen Mechanismen unterscheiden. Damit wäre es prinzipiell möglich, das Herz vor den schädigenden Einflüssen der Anthrazykline zu schützen, ohne dabei auf die antineoplastische Wirksamkeit verzichten zu müssen.

Bislang wurden 4 Wege zur Minimierung der Anthrazyklin-induzierten Herztoxizität erforscht [1]. Man fokussierte sich dabei auf die Beschränkung der verabreichten Dosis (siehe Absatz 3.2), die Modifikation der Applikationsschemata, die Entwicklung neuer Anthrazyklinderivate und die Komedikation von protektiven Substanzen.

3.5.1 *Modifikation der Applikationsschemata*

Es konnte gezeigt werden, dass die erreichten Plasmaspitzenpiegel nach der Applikation von Anthrazyklinen einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung der Kardiotoxizität aufweisen [26, 27]. Bei einer Infusionsbehandlung über einen Zeitraum von 6 - 96 h wurden weit weniger kardiale Schiiden verursacht, als bei sonst üblichen 15 minütigen Bolusapplikationen. Allerdings erhöht sich bei der langsamen Applikation der Anthrazykline die Inzidenz der anderen Nebenwirkungen wie z.B. Mukositis, Knochenmarkssuppression und die Gefahr einer Paravasation. Die bislang einzige Möglichkeit, eine niedrige kardiale Anthrazyklinkonzentration zu erreichen, stellt die Gabe von liposomal verpackten Anthrazyklinen dar. Tatsächlich konnte dadurch die Rate kardialer Schiiden gesenkt werden. Allerdings stiegen durch diese Therapie sowohl die Neutropenierate als auch die Kosten pro Behandlung an. Zudem fehlen Langzeitdaten, ob durch die Gabe von liposomalen Anthrazyklinen die chronische Kardiotoxizität verhindert werden kann [28, 29].

3.5.2 *Neuere Anthrazykline*

Es wurden zahlreiche neue Anthrazykline entwickelt, um die kardiale Toxizität von Dox / DNR zu senken, allerdings mit eher geringem Erfolg. Zum Beispiel kann von Epi (2. Generation der Anthrazykline) zwar eine größere kumulative Maximaldosis als bei Dox verabreicht werden, das kardiale Risiko bei Dox-äquivalenten Dosen bleibt jedoch bestehen [30].

3.5.3 *Komedikation mit protektiv wirksamen Substanzen*

Durch die simultane Verabreichung sowohl von ACE-Hemmern [31-36] als auch von β -Blockern [33, 37-40] mit den Anthrazyklinen konnten in Tierversuchsstudien ein kardioprotektiver Effekt nachgewiesen werden. Jedoch stehen größere klinische Studien zur Beurteilung des präventiven Potentials bislang aus. Da die Hauptursache der Anthrazyklin-induzierten Herzschiidung die Entstehung von oxidativem Stress zu sein scheint, wurden zahlreiche Antioxidantien oder Radikal-Scavenger (wie Vitamin A, C und E oder N-Acetylcystein) getestet [1]. Diese konnten jedoch das Auftreten der kardialen Toxizität weder verhindern noch verzögern [26, 41, 42]. Die geringe Schutzwirkung liegt vermutlich daran, dass nur eine der vielen möglichen Ursachen für die Herzschiidung aufgehoben wurde.

Dexrazoxan (Dex) stellt das einzige derzeit verfügbare Präparat dar, was zur Prävention der Anthrazyklin-induzierten Herzschiidung zugelassen ist. In zahlreichen Studien wurden die kardioprotektiven Eigenschaften von Dex nachgewiesen. Dabei konnte Dex sowohl vor den Anthrazyklin-induzierten morphologischen als auch den funktionellen Veränderungen des

Herzens schützen. Da in dieser Arbeit Dex eine besondere Bedeutung zukommt, soll in Abschnitt 3.7 näher auf diese Substanz eingegangen werden.

3.6 Zusammenfassung der Strategien zur Vermeidung der Anthrazyklin-induzierten Herztoxizität

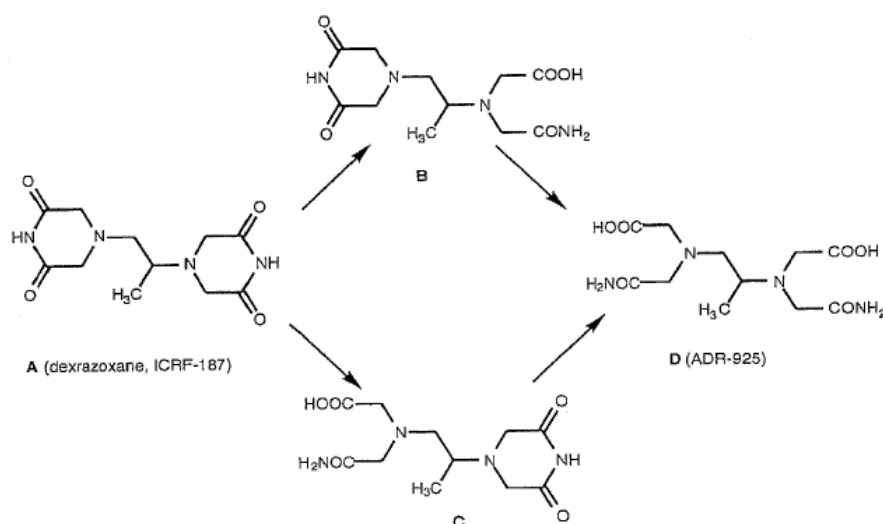
Trotz intensiver Forschungen konnte mit den meisten Präventionsmaßnahmen die Kardiotoxizität der Anthrazykline nicht verhindert werden. Möglicherweise existieren stärkere mechanistische Überlappungen zwischen den tumortoxischen Reaktionen der Anthrazykline und den kardiotoxischen Wirkungen, als bislang angenommen. Dadurch würde die Senkung der Kardiotoxizität mit einer Einschränkung der Antitumorwirkung einhergehen. Die einzigen klinisch relevanten Möglichkeiten zur Minimierung der Herztoxizität sind gegenwärtig die liposomale Gabe von Anthrazyklingen [43], die langsame intravenöse Applikation (>6 h) [44] und der Einsatz von Dex [45].

3.7 Dexrazoxan

3.7.1 Wirkungsmechanismus von Dexrazoxan

Bisher ist nur wenig über den Wirkmechanismus von Dex bekannt. Man weiß, dass Dex ein Eisenchelator ist, der schnell in die Zellen eindringt und zu einer EDTA-ähnlichen Struktur hydrolysiert wird (siehe Abb. 5). Neben der Komplexierung von Eisenionen werden auch andere Kationen wie z.B. Calciumionen gebunden. Der Metabolit ADR 925 (zweifach offene Ringform) und nicht Dex selbst, hat sich hierbei als der eigentliche Eisenchelator erwiesen [46].

Abb. 5: Hydrolyseschema von Dex aus Hasinoff et al. [46]



Als eine der Ursachen der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität wird die Bildung freier Sauerstoffradikale angesehen. Deren Bildung ist teilweise eisenabhängig, weshalb der Einsatz von Eisenchelatoren interessant wurde. Der derzeit postulierte Wirkmechanismus von Dex besteht in der Komplexierung von freien und Anthrazyklin-gebundenen Eisenionen. Es gibt jedoch erste Hinweise darauf, dass an den kardioprotektiven Eigenschaften des Dex noch andere Mechanismen beteiligt sein müssen, als die alleinige Chelatisierung von Eisen [46, 47].

Hasinoff et al. konnten zeigen, dass Dex selbst eine schlechte Bindungskapazität für Eisenionen aufweist. Hingegen besitzen seine Metaboliten eine wesentlich stärkere Bindungskapazität für Eisenionen. Bemerkenswert hierbei war, dass die Applikation der reinen Metabolite zu keiner Kardioprotektion führte, wohingegen für Dex die Kardioprotektion nachgewiesen ist [46].

Ein weiterer bekannter Wirkmechanismus von Dex besteht in der Inhibition der DNA-Topoisomerase II. Aufgrund dieser Eigenschaft sollte es ursprünglich selbst als Antitumor-Medikament eingesetzt werden. Da jedoch die antineoplastische Effizienz von Dex zu gering war, wurde dieses Einsatzgebiet von Dex nicht weiter untersucht. Es ist jedoch auffällig, dass sowohl die Anthrazykline (z.B. Dox) als auch Dex die gleiche Zielstruktur haben - die DNA-Topoisomerase II. Sie hemmen dieses Enzym lediglich in unterschiedlichen Stadien seiner Interaktion mit der DNA [48]. Dex arretiert die N-terminale Klammer des Enzyms und hemmt gleichzeitig die ATPase-Aktivität. Die Anthrazykline sorgen dafür, dass der „spaltbare Komplex“ stabilisiert wird, was zu einem vermehrten DNA-Abbruch führt [4, 48-51]. Auch bei der Hemmung der Topoisomerase II gibt es, ähnlich wie bei der Chelatisierung der Eisenionen, Unterschiede zwischen Dex und seinen Metaboliten. Während Dex selbst ein sehr guter Topoisomerase II-Hemmer ist, konnte für die Metaboliten keine Hemmung der Topoisomerase II nachgewiesen werden. Diese neuen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der kardioprotektive Einfluss von Dex möglicherweise neben der Chelatisierung von Eisen auch durch die Verhinderung der Anthrazyklin-induzierten und Topoisomerase II-vermittelten DNA-Strangbrüche zustande kommen könnte [49, 52, 53].

Ob Dex zusätzlich zu den oben beschriebenen Wirkmechanismen Gene differentiell regulieren kann und wenn ja welche, ist bislang nur bruchstückhaft erforscht.

3.7.2 Therapeutische Wirksamkeit

Sowohl in der großen Studie von Swain et al [54, 55], als. auch in einigen anderen klinischen Studien wurden die kardioprotektiven Eigenschaften von Dex untersucht. In der Cochrane-Metaanalyse von 2005 wurden die zahlreichen Studien zusammengefasst. Es konnte eindeutig eine starke Reduktion des Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizitätsrisikos (bezogen auf klinische und subklinische Herzinsuffizienzsymptome) durch die Gabe von Dex (Odds Ratio = 0,28; KI: 0,18–0,42; $p < 0,00001$) belegt werden (siehe Abb. 6).

Abb. 6: Ergebnisse der Chochrane-Metaanalyse aus [1]

TABELLE		
Einfluss von Dexrazoxan auf die kardiiale Protektion und den klinischen Verlauf bei Doxorubicin- oder Epirubicin-behandelten Krebspatienten		
Studien-Endpunkte (statistischer Test)	Metaanalyse	
	van Dalen et al. (23) 1 013 Patienten	Seymour et al. (e41) 1 070 Patienten
klinisches Herzversagen (RR) ^{*1}	0,18 ^{*4}	n.a.
klinisches + subklinisches Herzversagen (RR) ^{*1}	0,28 ^{*4}	0,24 ^{*4}
objektive Antwortrate (RR) ^{*2}	0,88	0,92
progressionsfreies Überleben (HR) ^{*3}	1,13	n.a.
Überleben insgesamt (HR) ^{*3}	1,07	n.a.

Dargestellt sind die Resultate zweier Metaanalysen (in Anlehnung an [24], in denen die Daten von jeweils 6, zum Teil überlappenden, randomisierten und kontrollierten Studien zum Vergleich der Therapie mit Dexrazoxan versus ohne Dexrazoxan analysiert wurden; „Überleben“ bezieht sich auf die Grunderkrankung (Krebs).

RR, relatives Risiko; HR, Hazard-Funktion; n.a., nicht analysiert.

^{*1}, RR < 1 bedeutet einen Vorteil durch Dexrazoxan

^{*2}, RR < 1 bedeutet einen Vorteil gegenüber nicht mit Dexrazoxan behandelten Patienten

^{*3}, HR > 1 bedeutet, dass das Ereignis in nicht mit Dexrazoxan behandelten Patienten wahrscheinlicher ist

^{*4}, $p < 0,0005$

Aus: Cvetkovic RS, Scott LJ: Dexrazoxane: a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy. Drugs 2005; 65: 1005–24; mit freundlicher Genehmigung von Wolter Kluwer Health, Chester, Großbritannien.

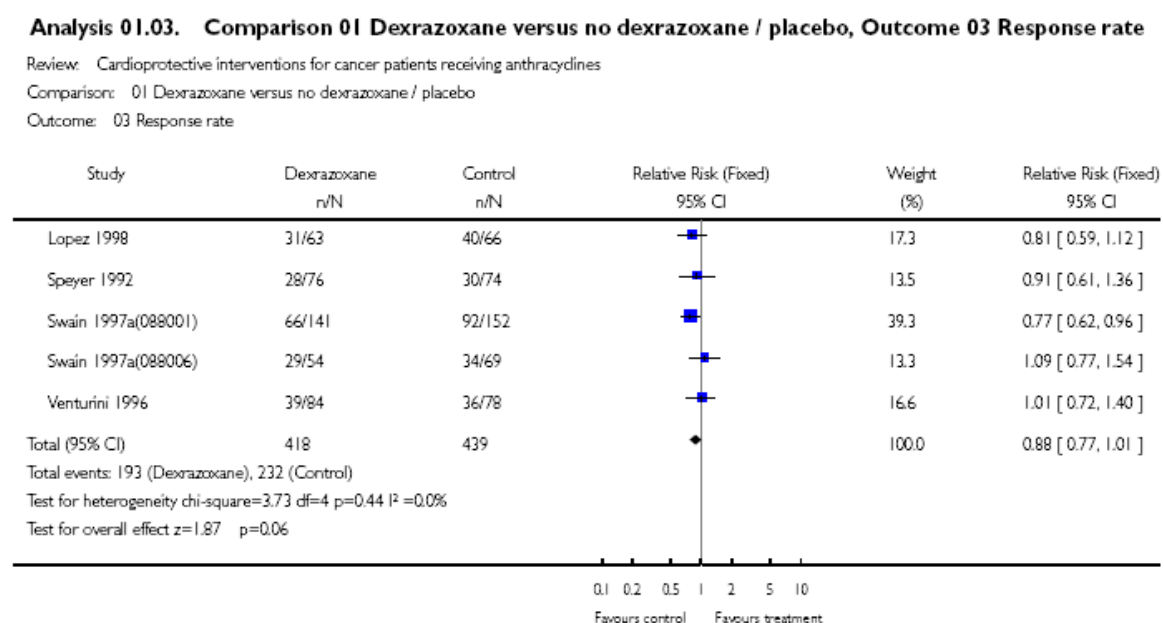
Ebenso wie 2005 konnte in der aktualisierten Version der Metaanalyse von 2009 [45] der kardioprotektive Effekt von Dex eindeutig bestätigt werden. Durch die Gabe von Dex ist es möglich, die maximale kumulative Dosis der Anthrazykline zu überschreiten, ohne damit die Inzidenz von kardialen Schäden zu erhöhen [12, 56]. Daher wird Dex besonders bei Patienten eingesetzt, die größere Anthrazyklindosen für eine effiziente Tumorbehandlung benötigen und für Patienten mit hohem Risiko zur Entstehung von kardialen Schäden nach der Gabe von Anthrazyklinen (siehe Fachinformation Zinecard und [12, 57]). Außerdem scheint Dex das Fortschreiten bereits bestehender Herzprobleme, durch die Gabe von Anthrazyklinen verhindern zu können [12, 54, 57-59]. Dadurch wird auch für diese Risikopatienten die Behandlung mit Anthrazyklinen möglich. Durch die Behandlung mit Dex konnten signifikant mehr Chemotherapiezyklen mit insgesamt größeren kumulativen Anthrazyklindosen, im Vergleich zur alleinigen Anthrazyklingabe verabreicht werden [12]. Generell erhofft man sich durch die Verringerung der Anthrazyklin-induzierten Herzscha'den, eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten zu erreichen.

3.7.3 Nebenwirkungen der Dex-Therapie

Im Allgemeinen wird die Verabreichung von Dex gut vertragen. Es wurde lediglich ein Anstieg der Neutropenie- und / oder Thrombozytopenierate beobachtet. Ansonsten führt Dex weder zu häufigeren noch zu schwereren Nebenwirkungen, als sie durch die alleinige Gabe der Anthrazykline zu erwarten wäre. Zudem waren alle Nebenwirkungen reversibel.

Es besteht jedoch nach wie vor Uneinigkeit darüber, ob Dex die Tumorresponse beeinträchtigt. In der 1. Studie von Swain et al. wurde eine signifikant geringere Response in der Dex-Gruppe gezeigt. Allerdings war die Beurteilung der Response innerhalb dieser Studienpopulation (fortgeschrittene Lungenkarzinome) schwierig. Eine weitere konfirmatorische Studie derselben Gruppe von Swain et al., konnte trotz der Verwendung des gleichen Therapieprotokolls keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Regression oder anderen Tumorresponsekriterien zwischen der Dex- und der Placebogruppe feststellen. Auch die Cochrane-Metaanalyse 2005 [60] (siehe Abb. 7) konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede der Tumorresponse in der Dex-Gruppe und der Placebogruppe feststellen.

Abb. 7: Einfluss von Dex auf die Tumorresponse aus [60]



Dennoch gibt es Hinweise darauf, dass die Beeinträchtigung der Tumorresponse durch Dex nicht restlos ausgeschlossen werden kann (odds ratio: 0,88; Konfidenzintervall 95% von 0,77-1,01; $p=0,06$). Die Autoren der Cochraneanalyse merkten an, dass die Bestimmung der Tumorresponse einer großen Variabilität der Beobachter unterlag. Einzig in der Studie von Speyer et al. [12] und der von Lopez et al. [61] wurden mindestens 2 Beobachter zur Bewertung der Tumorresponse eingesetzt. In dieser Metaanalyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Dex- und der Kontrollgruppe im Bezug auf das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben festgestellt werden. In der Reevaluierung der Metaanalyse von 2008 [45] wurde ebenfalls der Verdacht auf eine eingeschränkte Tumorresponse durch Dex nicht bestätigt (RR 0.89, 95% CI 0.78 bis 1.02, $p = 0.08$). Dennoch veröffentlichte die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (AKdÄ) 2010 einen „Roten Handbrief“, in dem sie vor der Gefahr von Zweitmalignomen bei Kindern durch die Gabe von Dex warnt. Die Warnung stützt sich auf 2 Studien, von denen eine erst 2010 veröffentlicht wurde [62, 63]. Die 1. Studie von Tebbi et al. weist jedoch nach Meinung des Autors Lipshultz, der sich ebenfalls intensiv mit Dex beschäftigt, einige Mängel in der Aussagekraft auf [64]. Lipshultz merkte an, dass in der Studie von Tebbi et al. generell nur 10 Zweitmalignome von insgesamt 478 eingeschlossenen Patienten nachweisbar waren. Vergleicht man jedoch alle Patienten dieser Studie, so konnte weder beim Fisher exakt Test noch bei der Time to event-Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen den Dex behandelten und – unbehandelten Patienten nachgewiesen werden. Lediglich bei der starken Adjustierung der Daten (auf Rasse, Alter, Geschlecht der Patienten) lassen sich Hinweise auf eine erhöhte Zweitmalignomrate nach der Gabe von Dex finden.

3.7.4 Zusammenfassung über das Kardiopräventivum Dexrazoxan

Die kardioprotektiven Effekte von Dex wurden in zahlreichen Studien nachgewiesen, sodass diese als gesichert gelten können. Dennoch bestehen einige Kontroversen bei der Anwendung von Dex. So konnte zum Einen die Frage nach der Beeinträchtigung der Tumorresponse immer noch nicht abschließend geklärt werden. Hierfür wäre es wünschenswert, die Bewertung von mindestens zwei unabhängigen Beobachtern vornehmen zu lassen. Möglicherweise könnten auch neuere Diagnosemethoden wie zum Beispiel die Positron-Emissions-Tomographie (PET) weitere Erkenntnisse liefern. Außerdem ist bislang unklar, ob Dex auch bei erwachsenen Patienten die stark verzögert auftretende Herzinsuffizienz verhindern oder einschränken kann. 2010 konnte in einer Studie von Lipshultz et al. [65] mit Kindern gezeigt werden, dass durch die Gabe von Dex auch 5 Jahre nach Abschluss der Dox-Therapie signifikant weniger Herzscheiden nachweisbar waren, im Vergleich zu der alleinigen Therapie mit Dox. Auch die Tatsache, dass Dex zwar das Auftreten der Anthrazyklin-induzierten Nebenwirkung am Herzen verhindert, dies aber keinen Einfluss auf das progressionsfreie Intervall oder das Gesamtüberleben haben soll, ist bislang ungeklärt. Auch die Tatsache, dass der genaue Wirkmechanismus von Dex bislang noch nicht vollständig geklärt ist und nur ein kleiner Teil der Tumore auf einen möglicherweise positiven Einsatz von Dex untersucht worden ist, trägt mit dazu bei, dass Dex bislang eher zurückhaltend verordnet wird.

4 Ziele dieser Arbeit

4.1 Doxorubizin-induzierter oxidativer Stress

Die Arbeit gliederte sich in drei Bereiche. Im ersten Teil wurde der Einfluss des oxidativen Stresses auf die Anthrazyklin-induzierten Toxizität untersucht. Für hohe Dosen an Doxorubizin (Dox) konnte die Entstehung von oxidativem Stress bereits eindeutig nachgewiesen werden. Hingegen existieren für niedrige, aber klinisch relevante Dox- Dosen immer noch widersprüchliche Angaben. Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss der oxidative Stress bei klinisch relevanten Dosierungen spielt. Für unsere Versuche standen sowohl Zelllinien als auch verschiedenen Knockout-Mäusestämme zur Verfügung.

4.1.1 Oxidativer Stress in der Zellkultur

In den Zellkulturexperimenten sollte der oxidative Stress nach der Gabe von klinisch relevanten Dox-Dosen ermittelt werden. Außerdem sollte durch verschiedene Komedikationen versucht werden, den Dox-induzierten oxidativen Stress zu beeinflussen. Dabei waren zwei Substanzen von besonderem Interesse: Dex und Doxycyclin (DOXY).

Dex ist ein bekanntes Kardiopräventivum, für dessen herzschildende Wirkung hauptschildlich die Verhinderung des oxidativen Stresses durch Chelatisierung von Eisen verantwortlich gemacht wird (siehe Absatz 3.7). Jedoch ist bekannt, dass Dex zuschildlich die Topoisomerase II α hemmt. Daher stellte sich die Frage, ob die Topoisomerase II α an der Entstehung des oxidativen Stresses beteiligt ist. Durch den Einsatz von DOXY, mit dem die Topoisomerase II α - Expression in den von uns untersuchten Zellen moduliert werden kann, sollte der Einfluss der Topoisomerase II α nher erforscht werden. Besonders interessant war hierbei die Frage, ob Dex trotz fehlender Topoisomerase II α den Anthrazyklin-induzierten oxidativen Stress verhindern kann.

Neben diesen Untersuchungen sollte die Frage beantwortet werden, ob die beobachteten Effekte durch Verinderungen in der Genexpression erklrt werden knnen. Mittels Microarray-Untersuchungen sollten differentiell regulierte Gene identifiziert, die an der Entstehung und Entgiftung von ROS beteiligt sind. Ebenso sollte untersucht werden, ob Dex den Dox-induzierten oxidativen Stress mglicherweise dadurch minimiert, indem es die differentiell regulierten Gene wieder in den Ausgangszustand ubefhrt.

4.1.2 Oxidativer Stress in verschiedenen Mausestammen

Neben den reinen Zellkulturexperimenten sollte der Einfluss des oxidativen Stresses auf die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Herzschaden an diversen Mausestammen untersucht werden. Mause stellen fr die Untersuchung der Kardiomyopathie einen idealen Modellorganismus dar. Ihre Herzen weisen groe morphologische und genetische Ubereinstimmungen zum menschlichen Herzen auf. In den Mause ist auch die Art der Herzschadigung vergleichbar mit der beim Menschen verursachten Herzschadigung. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich im Herzgewebe von Mause nach der Gabe von klinisch relevanten Dox-Dosen oxidativer Stress induzieren lasst und wenn ja, wodurch er sich beeinflussen lasst. Insgesamt standen fr diese Arbeit 2 Wildtyp-Mausestamme (C57BL/6 und Balb/c) und 2 Knockout-Mausestamme (gp91 und nNOS) zur Verfugung. In der Diplomarbeit von Silvia Seifert [66] konnte gezeigt werden, dass die beiden Wildtypmausestamme C57BL/6 und Balb/c erhebliche Unterschiede in der Sensibilitat auf Dox aufwiesen. Daher sollte herausgefunden werden, ob unterschiedliche Konzentrationen an ROS im Herzen, die Ursache hierfr darstellt. Mit den gp91-Knockoutmausen konnte der Mechanismus der ROS-Bildung nher untersucht werden. In diesen Mause wurde eine Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase, die

gp91 ausgeschaltet, wobei die NAD(P)H-Oxidase ein wichtiges Superoxid-produzierendes Enzym ist. Für einige ihrer Genvarianten konnte bereits ein Zusammenhang mit der Dox-induzierten Kardiotoxizität hergestellt werden. Sollte durch das Ausschalten der gp91-Untereinheit eine veränderte ROS-Konzentration im Herzen nachweisbar sein, ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass die NAD(P)H-Oxidase an der Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität beteiligt ist.

4.2 Unterschiede in der Dox-Metabolisierung bei verschiedenen Mäusestämmen

Silvia Seifert konnte in ihre Diplomarbeit [66] zeigen, dass die C57BL/6-Mäuse bereits 4 Wochen nach der Dox-Therapie eine deutliche Einschränkung der linksventrikulären Funktion aufwiesen, während in den Balb/c kein Unterschied zur Ausgangsfunktion festgestellt werden konnte. Aus diesem Grunde wurde von ihr zunächst der Einfluss der Gene auf diese unterschiedliche Sensitivität gegenüber Dox untersucht. Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnten verschiedene Gene (so z.B. das *Carp*-Gen) identifiziert werden, die entweder zwischen den Stämmen Balb/c und C57BL/6 konstitutionell unterschiedlich exprimiert waren oder durch Dox in nur einem Stamm reguliert wurden.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob neben der differentiellen Genregulation und den Untersuchungen zum oxidativen Stress (siehe 4.1.2) möglicherweise auch Unterschiede in der Dox-Metabolisierung zwischen den beiden Wildtyp-Mäusestämmen vorliegen. Hierfür sollten Dox und seine Metabolite mittels HPLC-Messungen im Herzen, im Blut und in der Leber quantifiziert werden. Um Ergebnisse von klinischer Relevanz zu erhalten, sollten Behandlungsdosen verwendet werden, die der humanen Antitumorthherapie entsprechen.

4.3 Ricover60-Studie

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss der individuellen genetischen Ausstattung auf die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Herzschiidigung untersucht. Zu diesem Zweck sollten aus der Ricover60-Studie Patienten identifiziert werden, die wiihrend oder im Anschluss an die Doxorubizin-haltige Chemotherapie Herzschiiden entwickelten. Anschließend sollte das Blut von den Patienten mit (=Fiihle) und ohne Herzschiiden (=Kontrollen) angefordert und auf Auffiihligkeiten des genetischen Materials untersucht werden. Die zugrunde liegende Arbeit stellt hierbei die Publikation von Wojnowski et al. [20] dar. In dieser konnten genetische Assoziationen festgestellt werden, die mit einer hiiheren Inzidenz an kardialen Schiiden korrelierten. Besonders auffiihlig waren Polymorphismen in den CYBA-, RAC2- und NCF4-Genen, die allesamt fiiur Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase kodieren, aber auch Polymorphismen in den Genen der Anthrazyklin-Transporter MRP1 und MRP2 konnten in dieser Studie identifiziert werden. Sollten sich diese SNP bei den Patienten der Ricover60-Studie verifizieren lassen, kiihnte dazu beigetragen werden, dass sich zukiihnftige Risikopatienten leichter identifizieren lassen. Die Triiiger dieser Genvarianten kiihnten dann eine anthrazyklinfreie Chemotherapie (falls vorhanden) oder aber eine Anthrazyklin-Therapie in Kombination mit Kardioprotektiva erhalten und wiihren nicht mehr dem erhiihten Risiko einer Herzschiidigung ausgesetzt. Diiuber hinaus werden aus der Identifizierung der priiidisponierenden Genvarianten genauere Kenntnisse iiber die zugrunde liegende Pathophysiologie gewonnen, was zur Entwicklung von weiteren kardioprotektiven Verfahren fiihren kiihnte. Da in dieser Studie ein sehr groiiues Patientenkollektiv eingeschlossen wurde, lieiiue sich auch die klinische Relevanz der beobachteten Assoziationen iiberpriiufen.

5 Material

5.1 Chemikalien, Enzyme, Kits und Medien

Die Standard-Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Herstellern Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

Aceton	VWR, Darmstadt
Acetonitril	VWR, Darmstadt
Ammoniumsulfat	VWR, Darmstadt
Antimycin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford Farbreagenz	Bio-Rad, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Applichem, Darmstadt
Daunorubizin (DNR)	Pfizer, Berlin
Dexrazoxan	Novartis, Nürnberg
Dihydroxyethidium (DHE)	Sigma-Aldrich, Steinheim
5,5-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure	Roth, Karlsruhe
2,3-Dimethoxy-1-Naphthoquinone (DMNQ)	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Doxorubizin (Adriamycin [®])	Pfizer, Berlin
Doxorubizinol	Ellen Bruns, Abteilung Klinische Pharmakologie, Göttingen
Doxorubizinon	Ellen Bruns, Abteilung Klinische Pharmakologie, Göttingen
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure 40%	VWR, Darmstadt
Ethanol	VWR, Darmstadt
Fetal bovin serum (FCS)	Perbio, Bonn
Gibco Dulbecco's Minimalmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Gibco non essential amino acid	Invitrogen, Karlsruhe
Gibco sodium pyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
Glutathionethylester	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glutathion oxidiert	Roth, Karlsruhe
Glutathion reduziert	Roth, Karlsruhe
Glutathionreduktase	Calbiochem, Darmstadt
2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H ₂ DCFDA)	Molecular Probe

Wasserstoffperoxid 35% (H ₂ O ₂)	Roth, Karlsruhe
Hank's buffered salt solution (HBSS)	PAA, Pasching, Österreich
Salzsäure (HCL 10%ig)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	VWR, Darmstadt
Kaliumjodid	VWR, Darmstadt
L-Buthionine-Sulfoximine (BSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lactatdehydrogenase (LDH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	VWR, Darmstadt
Milliporewasser	Eigenherstellung
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetra= zoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Roth, Karlsruhe
N-Acetyl-Cystein	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NAD(P)H-Tetranatrium-salz	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Roth, Karlsruhe
NaNO ₂	Roth, Karlsruhe
L-2-Oxothiazolidine-4-Carbonsäure (OTZ)	Roth, Karlsruhe
Pegylierte Superoxiddismutase (PegSOD)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pegylierte Katalase (PegCAT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin	PAA, Pasching, Österreich
Streptomycin	PAA, Pasching, Österreich
5-Sulfosalicylsäure dihydrat 15%ig	Roth, Karlsruhe
Trifast-Kit	PeqLab, Erlangen
Tris HCL pH 7,4	Roth, Karlsruhe
Triton x 100	Appllichem, Darmstadt
Trypsin	Invitrogen, Karlsruhe
Vitamin C	Roth, Karlsruhe
Zinksulfat (ZnSO ₄)	Appllichem, Darmstadt

5.2 Gebrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Küvetten UVette 0030106300	Eppendorf, Hamburg,
Falcon Röhrchen 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Falcon Röhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
HPLC Röhrchen Rollrand Mikroflasche 6x32mm konisch	CZT, Kriftel
HPLC Röhrchen Kappen Snap on Kappen, PE klar, Si/PTFE	CZT, Kriftel
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt, Nürmbrecht-Rommelsdorf
Nitrile Handschuhe	Ansell, München
HPLC UV-Lampe	Merck, Darmstadt
HPLC-Säulen Chromatographische Säule: LiCrospher® 100 RP-8 -Säule (HPLC-Cartridge 125-4, endcapped (5µm) Vorsäule: LiChroCART® 4-4, LiChrospher® 100CN (5µm)	Merck, Darmstadt
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nürmbrecht-Rommelsdorf
96-Well Platten	Greiner, Frickenhausen

5.3 Geräte

HPLC – Pumpe Intelligent Pump 301	Flom, Tokyo, Japan
Autosampler AS-950	Jasco, Groß-Umstadt
UV-Detektor Intelligent Fluorescence Detector FP-920	Jasco, Groß-Umstadt
Degasser 964	Gilson, Bad Camberg
Photometer Uvikon 941	Kontron Instr., Neufahrn
Biophotometer 6313	Eppendorf, Hamburg
Biofuge Pico	Kendro, Berlin
Rotin 35R	Hettich, Tuttlingen

Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
pH Meter inoLab pH Level 1	VWR, Darmstadt
Waage BL1500	Sartorius, Göttingen
440-33N Kompaktwaage	Kern, Balingen-Frommern
Wippschüttler ST5	CAT, Staufen
Wärmeschränk	Kendro, Berlin
Schüttel-Wärmeschränk	Bibby Sterilin, Staffordshire
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Photometer	Tecan, Crailsheim
Ultraschallbad	Branson, Dietzenbach
Ultrathurax	IKA, Staufen
Vortex genie 2	Scientific Industrie Inc., New York, USA
Laminar flow Box	Berner, Elmshorn
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Fluorimeter/Luminometer	
CO ₂ -water jacketed inkubator	Nuaire US Autoflow

5.4 Software

PRISM (Statistische Auswertungen)	Graphpad, San Diego, USA
Sigma Plot (Michaelis-Menten Kinetiken)	Sigma Plot, Systat, Erkrath
SPSS (Statistik-Auswertung)	SPSS GmbH, München
Clarity Lite (HPLC-Auswertung)	DataApex, Prag, Tschechien

6 Methoden

6.1 Zellkultur

6.1.1 HTETOP- und HT1080-Zellen

Die meisten Experimente wurden mit der HTETOP- Zelllinie durchgeführt. Diese stammt ursprünglich von einer humanen Fibrosarkomzelllinie, den HT1080-Zellen ab. Die HT1080-Zellen wurden von der Gruppe um Andy Porter et al. [67] derart modifiziert, dass die Proteinexpression der zellulär vorhandenen Topoisomerase II alpha (Topo II α) reversibel durch die Gabe von Doxycyclin (DOXY) gehemmt werden kann. Die sonstigen Effekte von DOXY, neben der Hemmung der Topo II α , konnten an der Ursprungszelllinie der HTETOP-Zellen, nämlich den HT1080-Zellen untersucht werden.

6.1.2 Kultivierung und Erhalt der HTETOP-/ HT1080-Zelllinie

Sowohl die HTETOP-Zellen, als auch die HT1080-Zellen wurden in Dulbecco's Minimalmedium (DMEM) kultiviert, welches mit 10% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS), 0,5% Penicillin/Streptomycin, 1% Pyruvat und 5% nicht essentiellen Aminosäuren supplementiert wurde. Damit die Zellen über mehrere Zellpassagen verwendet werden können und genügend Zellen für die Versuche zur Verfügung standen, wurden sie in eine 75 cm² große Zellkulturflasche ausgesät (3x10⁴ Zellen /ml). Nach 3 Tagen waren die Zellen konfluent und konnten geerntet werden. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 10 ml PBS gewaschen (da das im Medium vorhandene FCS das Trypsin inaktivieren würde). Anschließend wurde 1 ml Trypsin (0,05%) auf die Zellen gegeben und für 1 min im Inkubator einwirken gelassen. Durch leichtes Klopfen an die Zellkulturflasche konnten die Zellen von der Oberfläche abgelöst werden. Der Ablöseerfolg wurde stets unter dem Mikroskop beurteilt. Waren alle Zellen erfolgreich abgelöst, wurde die Trypsinwirkung durch Zugabe von 5 ml Medium abgestoppt. 1 ml der so erhaltenen Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche überführt, mit 19 ml Medium versetzt und im Inkubator bei 37°C und 10% CO₂-Sättigung bis zum nächsten Splitten der Zellen gelagert.

6.1.3 Vorbereitung der HTETOP-/HT1080-Zellen für die Versuche

Für alle Versuche wurden die Zellen zwischen der 10. und der 40. Zellpassage verwendet. Nach dem Ernten (siehe 6.1.2) wurden die Zellen unter Verwendung einer Neubauerkammer ausgezählt. Hierfür wurden 20 μ l der Zellsuspension in die Kammer pipettiert. Durch das Auszählen der 4 Quadranten konnte die Zellzahl bestimmt werden. Generell wurden 29000 Zellen je cm² Wachstumsfläche ausgesät. Nachdem die Zellen für 24 Stunden im Inkubator bei 10% CO₂-Sättigung und 37°C anwachsen konnten, standen sie für die unterschiedlichen Experimente zur Verfügung.

6.2 GSH-Versuche

6.2.1 Probenvorbereitung

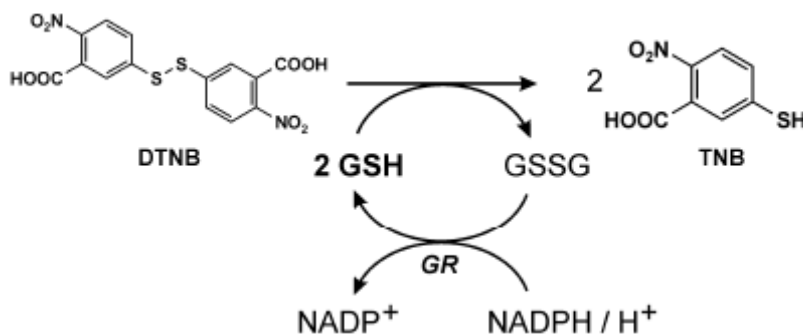
Die HTETOP-/HT1080-Zellen wurden je nach Versuchsteil für 24 h mit DOXY in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml, für 1 h mit 10 mM GSH-Ethylester, oder für 30 min mit 100 μ M Dex vorbehandelt. Nach der Präinkubationsphase folgte eine 24 stündige Behandlung mit Dox. Im Anschluss daran wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Hiernach wurden die Zellen mit einem Lysispuffer für 20 min bei 4°C lysiert. Der

Lysispuffer enthielt 200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 1% Triton X 100 und 10 µl HaltTM Protease Inhibitor single use Cocktail pro 1 ml Lysispuffer. Die so entstandenen Zelllysate wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und bei 4°C mit 4000 × g für 5 min zentrifugiert. 10 µl des Überstandes (=Überstand 1) wurden entnommen und für die spätere Gesamtproteinbestimmung nach Bradford verwendet (siehe 6.9). Da Proteine die GSH-Bestimmung stören würden, wurden 160 µl des Überstandes mit 40 µl 6,5% 5-Sulfosalicylsäurelösung versetzt und 30 min auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 4000 × g für 15 min. Der so entstandene Überstand (=Überstand 2) wurde für die quantitative Bestimmung des totalen Glutathions, als auch für das GSSG (oxidierte Form) verwendet.

6.2.2 Messprinzip zur Bestimmung des totalen Glutathions

Dem Testprinzip liegt die Umwandlung von GSH in GSSG in Gegenwart von DTNB zugrunde. DTNB (5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoesäure)), auch als Ellmann's Reagenz bekannt, wurde zur Detektion von Thiolgruppen entwickelt. DTNB und GSH reagieren in einem ersten Schritt zu 2 Molekülen 2-Nitro-5-thiobenzoessäure (TNB) und Glutathiondisulfid (GSSG). In einem zweiten Reaktionsschritt wird sowohl das neu gebildete, als auch das bereits in den Zellen vorhandene GSSG durch die Glutathionreduktase in Anwesenheit des Cofaktors NADPH zum GSH reduziert und die Reaktion beginnt von Neuem. (siehe Abb. 8)

Abb. 8: Mechanismus der Glutathionbestimmung



Somit besteht zwischen GSH und GSSG ein Reaktionszyklus, bei dem kontinuierlich TNB (welches gelb gefärbt ist) gebildet wird. Die Zunahme der TNB-Konzentration konnte durch die Messung der Absorption bei 412 nm nachvollzogen werden. Der Anstieg der Absorption je Minute war dabei umso steiler, je mehr Glutathion (GSH und GSSG) intrazellulär vorhanden war.

Durch die enzymatische Umwandlung von GSSG wird sichergestellt, dass mit dieser Methode selektiv Glutathion erfasst wird, während die anderen natürlich vorkommenden Thiole nicht miterfasst werden.

6.2.3 Versuchsaufbau zur Bestimmung des Gesamtglutathions

Die Methode zur quantitativen Bestimmung des intrazellulären Glutathions unter Verwendung von DTNB wurde erstmalig 1965 von Owens und Belcher [68] beschrieben und später von Tietze [69] modifiziert. Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Bestimmung von GSH und GSSG steht in Anlehnung an die Arbeit von Vandeputte et al. [70]. Aus einer 20 µM GSH-Stammlösung (Lagerung bei -80°C für maximal 8 Tage) wurden täglich frisch die unterschiedlichen Verdünnungen (0,09-0,7 nmol GSH je Ansatz) für die Kalibriergerade hergestellt. Für die Verdünnung wurde eine 0,5 prozentige 5-Sulfosalicylsäurelösung verwendet.

Für die eigentliche Vermessung der Proben wurde ein Mastermix (Mastermix 1) hergestellt. Dieser bestand aus 8 ml DTNB-Stammlösung (10 mM), 13,6 ml NADPH-Stammlösung (2 mM) und 58,4 ml Pufferlösung 1 (143 mM NaH_2PO_4 , 6,3 mM EDTA, pH 7,5). Die Glutathionreduktaselösung wurde täglich frisch auf 8,5 Einheiten / ml mit Pufferlösung 1 verdünnt. Sowohl die Kalibrierproben, als auch die zu messenden Zellproben und der Mastermix 1 wurden bis zur Überführung in die Mikrotiterplatte auf Eis gelagert. Von jeder zu untersuchenden Probe wurden 3 separate Ansätze pipettiert. In jedes Well der 96 Well-Platte wurden entweder 20 μl einer Blindprobe (bestehend aus 0,5 prozentiger 5-Sulfosalicylsäurelösung) oder 20 μl der jeweiligen Verdünnungen der Kalibrierreihe oder 12 μl der Zellüberstände (siehe Probenvorbereitung, Überstand 2) vorgelegt. Anschließend wurde mit Pufferlösung 1 auf 40 μl aufgefüllt. Erst nachdem alle Proben in die 96-Well Platte pipettiert waren, erfolgte die Zugabe von 200 μl Mastermix 1. Hierfür wurde eine 8- Kanal-Multipette verwendet, damit keine Zeitverzögerungen entstehen und somit alle Proben genau 5 min bei Raumtemperatur inkubiert werden konnten. Die enzymatische Reaktion wurde gestartet, indem 40 μl der Glutathionreduktaselösung je Well mittels einer 8- Kanal-Multipette pipettiert wurde. Direkt im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung alle 2 min für insgesamt 30 min bei 412 nm in einem Tecan-Elisa-Reader. Da unter diesen Bedingungen kontinuierlich TNB gebildet wird, erhielt man einen Anstieg der Absorption im Verlauf der Zeit. Die Anstiege der einzelnen Kalibrierverdünnungen wurden zu einer Kalibriergerade zusammengefasst. Über den Anstieg der Kalibriergerade konnte der Gesamtgehalt an Glutathion in einer Probe errechnet werden. Der Anstieg der GSSG Kalibriergeraden ist dabei doppelt so steil wie der der GSH Kalibriergeraden, da aus 1 mol GSSG im Verlaufe der Reaktion 2 mol GSH gebildet werden. Der GSH-Gehalt der Probe wurde rechnerisch ermittelt, indem von dem gemessenen Gesamt-Glutathiongehalt der doppelte GSSG-Gehalt (da aus 1 GSSG-Molekül 2 GSH-Moleküle entstehen) subtrahiert wurde (Quantifizierung von GSSG siehe 6.2.4). Die Endkonzentration je Well betrugen 0,73 mM DTNB, 0,24 mM NADPH und 1,2 IE/ml Glutathionreduktase.

6.2.4 Versuchsaufbau zur Bestimmung des oxidierten Glutathions (GSSG)

Bevor GSSG detektiert werden konnte, musste das in einer Probe vorhandene GSH mittels 2-Vinylpyridin maskiert werden. Hierzu wurden in einem Eppendorf-Gefäß 96 μl des Zellüberstandes (siehe Probenvorbereitung, Überstand 2) mit 59,2 μl Pufferlösung 1 und mit 4,8 μl 2-Vinylpyridin versetzt. Für die Bestimmung der Blankwerte und der Kalibrierverdünnungen wurden jeweils 80 μl der GSSG-Kalibrierverdünnungen oder 80 μl der 0,5 prozentigen 5-Sulfosalicylsäurelösung (als Blankwert) mit 75,2 μl Pufferlösung 1 und mit 4,8 μl 2-Vinylpyridin versetzt. Jeder Ansatz wurde unter stetigem Schütteln für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 40 μl des Gemisches in 3 Wells einer 96-Well-Platte überführt. Nachdem alle zu messenden Proben in die Mikrotiterplatte pipettiert wurden, erfolgte die Zugabe von 200 μl Mastermix 1. Hierfür wurde aus den gleichen Gründen wie bei der GSH-Bestimmung eine 8- Kanal- Multipette verwendet. Im Anschluss wurde die gesamte Platte für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde gestartet, indem 40 μl der Glutathionreduktaselösung mittels einer 8- Kanal- Multipette je Well pipettiert wurde. Direkt im Anschluss erfolgte die Absorptionsmessung alle 2 min für insgesamt 30 min bei 412 nm in einem Tecan-Elisa-Reader.

6.3 Nachweis von oxidativem Stress mittels H₂DCFDA

6.3.1 Messprinzip

2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) ist die am häufigsten verwendete Substanz zur Detektion von intrazellulären ROS. H₂O₂ und Peroxynitrit werden direkt erfasst, während Superoxid nur durch die Reaktion mit Peroxiden bzw. Peroxidradikalen indirekt erfasst werden kann. Nach Aufnahme in die Zelle werden durch intrazelluläre Esterasen die Acetatgruppen des H₂DCFDA hydrolysiert, wodurch der Fluoreszenzfarbstoff in der Zelle lokalisiert bleiben soll. Das nicht fluoreszierende Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF) wird durch ROS zum fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert [71]. Durch die Anregung bei 485 nm kann die Fluoreszenz von DCF bei einer Emissionswellenlänge von 525 nm detektiert werden [72, 73]. Aus der Publikation von Narine Sarvazyan von 1996 [74] war bekannt, dass die Emissionsspektren zwischen DCF und Dox zu einem gewissen Teil überlappen. Um Messinterferenzen zu vermeiden, wurde die Anregungswellenlänge von 485 nm und die Emissionswellenlänge von 530 nm zur Quantifizierung verwendet. Die quantitative Messung von ROS mit H₂DCFDA ist jedoch mit einigen Schwierigkeiten behaftet. Neben der Autooxidation von H₂DCF ist bekannt, dass O₂^{•-} und H₂O₂ durch die Reaktion von H₂DCF mit Peroxiden oder mit intrazellulären Peroxidasen gebildet werden können [75]. Außerdem kann die kurze intrazelluläre Retentionszeit der oxidierten Form (DCF) eine Beurteilung des oxidativen Stress-Status der Zelle erschweren.

6.3.2 Versuchsaufbau

Für diese Versuchsserien wurden 10 000 HTETOP-Zellen je Well einer 96-Well Platte ausgesät. Es folgte eine 24 stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und einem 10 prozentigen CO₂-Gehalt, um ein optimales Anwachsen der Zellen zu gewährleisten. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für 24 h mit pegylierter SOD (Endkonzentration je Well: 100 U/ml), pegylierter Katalase (Endkonzentration je Well: 200 U/ml), DOXY (Endkonzentration je Well: 1 µg/ml), DOXY+SOD oder DOXY+Katalase präinkubiert. Nach Abschluss der Präinkubation wurde das Medium abgesaugt und jedes Well mit je 100 µl HBSS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl H₂DCFDA-Mastermix (bestehend aus 1 Teil H₂DCFDA-Lösung (1 mM) und 99 Teile HBSS) per Well pipettiert und die ganze Platte bei 37°C im Brutschrank für 30 min inkubiert. Es folgte ein vorsichtiges Abgießen des überstehenden Mediums (um die Zellen durch das Absaugen mit der Pasteurpipette nicht zu schädigen). Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl HBSS-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen und mit den jeweiligen Substanzen (verwendete Dox-Lösungen je Well: 0,01; 0,1; 1; 10; 100 µM; Positivkontrollen: 100 µM H₂O₂; 10 µM DMNQ) behandelt. Nach Zugabe der Dox-Lösungen wurden die Zellen sofort vermessen. Das Fluoreszenzsignal wurde alle 5 min für insgesamt 2 h aufgezeichnet. Die Anregungswellenlänge betrug 485 nm. Es wurden jeweils 10 Lichtblitze pro Well ausgesendet. Bei der Emissionswellenlänge von 530 nm wurde der Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Für die Auswertung wurde der Fluoreszenzanstieg gegenüber dem gemessenen Basiswert je Behandlungsgruppe ermittelt. Dabei wurde der erste gemessene Wert als 100% definiert. Von allen weiteren Werten wurde der Ausgangswert subtrahiert. Von dieser Differenz wurde der prozentuale Anteil am Ausgangswert ermittelt. Je Versuchsansatz wurden 3 Negativkontrollen (jede bestehend aus 3 isolierten Wells) verwendet. Für die 1. Negativkontrolle erhielten die Zellen keine H₂DCFDA-Präinkubation, sondern wurden ausschließlich mit Dox behandelt. Dadurch konnte unter den gewählten Versuchsbedingungen der Dox-abhängige Fluoreszenzanstieg gemessen werden. Jeder Fluoreszenzanstieg der darüber hinausgeht, kann der Bildung von DCF zugeordnet werden. Mit der

2. Negativkontrolle wurde der oxidative Stress im Ruhezustand der Zellen erfasst. Hierfür wurden die Zellen nach der Präinkubation mit H₂DCFDA ausschließlich mit HBSS behandelt. Dadurch konnte der Dox-induzierte oxidativen Stress vom Hintergrundsignal der Zellen (oxidatives Stresssignal im Ruhezustand der Zellen) unterschieden werden. Mit der letzten Negativkontrolle sollte ermittelt werden, ob die Zellen eine Eigenfluoreszenz besitzen, die die Messung mit H₂DCFDA stören könnte. Hierfür wurden die Zellen ausschließlich mit HBSS behandelt. Als Positivkontrolle wurden je 3 Wells mit H₂DCFDA präinkubiert und anschließend mit 100 µM Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder 10 µM DMNQ versetzt. Da durch diese Behandlung ein massiver oxidativer Stress in den Zellen ausgelöst wird, sollte ein Anstieg des Fluoreszenzsignals zu beobachten sein. Somit konnte gewährleistet werden, dass das Testsystem unter den gewählten Bedingungen funktioniert.

Für die Versuche mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen 30 min mit H₂DCFDA inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das überstehende Medium vorsichtig abgegossen und die Zellen entweder mit 100 µM Dox, HBSS oder 100 µM H₂O₂ behandelt. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit unter Lichtausschluss erfolgte die mikroskopische Fluoreszenzmessung (Anregungswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 530 nm) (Ausnahme: bei 100 µM H₂O₂ wurde zusätzlich 5 min. nach Inkubationsbeginn gemessen).

Die Herstellung von H₂DCF erfolgte nach der Methode von Cathcard [76]. Hierfür wurden 0,5 ml einer 1 M H₂DCFDA-Lösung (in DMSO) mit 2 ml einer 0,01 N NaOH-Lösung versetzt und 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 ml einer 25 mM NaH₂PO₄ -Lösung sowie die lichtgeschützte Lagerung auf Eis.

6.4 Nachweis von oxidativem Stress (insbesondere Superoxid) durch die Quantifizierung von DHE mittels HPLC

6.4.1 Messprinzip

Entsteht durch die Behandlung mit Dox oxidativer Stress in den Zellen, so wird Dihydroxyethidium (DHE) oxidiert zu 2-Hydroxyethidium (2-HE) bzw. Ethidium (E). Alle 3 Formen können mittels HPLC quantifiziert werden. Die beiden oxidierten Formen können unterschiedlichen ROS-Arten zugewiesen werden. Dabei wird 2-HE vorwiegend mit intrazellulär vorhandenem Superoxid in Verbindung gebracht. Hingegen kann E durch unterschiedliche ROS gebildet werden und stellt somit einen allgemeinen Indikator für oxidativen Stress dar. Da Dox ein ähnliches Fluoreszenzspektrum wie DHE besitzt (ähnliche Anregungs- und Emissionswellenlängen) war es unmöglich, DHE durch reine fluorimetrische Messungen nachzuweisen. Erst durch die chromatographische Auftrennung (mittels HPLC), bei der beide Substanzen unterschiedliche Retentionszeiten aufwiesen, konnten selektiv DHE und seine Metabolite bestimmt werden.

Für unsere Versuche wurden HTETOP-Zellen in kleine Petrischalen (Durchmesser 6,5 cm) ausgesät. Wie bei allen anderen Versuchen wurde auch hier 24 Stunden gewartet, um den Zellen genügend Zeit zum Anwachsen zu geben. Anschließend erhielten die Zellen für 30 min Antimycin (Endkonzentration: 20 µg/ml Medium) (=Positivkontrolle) und 50 µM DHE bzw. Dox verschiedener Konzentrationen (0,1; 1 und 10 µM) und 50 µM DHE oder ausschließlich 50 µM DHE (zur Bestimmung des Grundgehaltes an ROS in der Zelle). Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Zellen 2x mit je 5 ml PBS gewaschen. Da für die HPLC-Messung keine Tenside in der Probe sein durften, konnte die Ablösung der Zellen von der Platte nicht wie üblich mit Triton erfolgen. Stattdessen wurde auf jede Petrischale 1000 µl einer Mischung aus Acetonitril und PBS (50:50 v/v) gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Schabers von der Schale abgelöst. Die gesamte Zellsuspension wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, gründlich gemischt und auf Eis für je 2 min mit dem Ultraschallstab behandelt. Um

alles HE / DHE von den Zellfragmenten ablösen zu können, wurde jedes Gefäß für 10 min gründlich gemischt. Abschließend erfolgte die Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min. Der klare Überstand wurde in ein HPLC-Vial überführt und von Herrn Prof. Dr. Andreas Daiber mittels HPLC vermessen. Die Durchführung der Bestimmung erfolgte in Anlehnung an [77]. 50 µl Probe wurden auf eine C18-Nucleosil 100-3 (125×4) Säule aufgetragen. Das Fließmittel bestand aus Acetonitril und 25 mM Citratpuffer (pH-Wert: 2.2). Die Flussrate betrug 1 ml / min. Die Stoffgemische wurden durch eine Gradientenelution aufgetrennt. Die Detektion von DHE erfolgte durch eine Absorptionsmessung bei 355 nm, während 2-HE und Ethidium durch die Messung der Fluoreszenz detektiert wurden (Anregungswellenlänge: 480 nm, Emissionswellenlänge: 580 nm).

6.5 Nachweis des Zellüberlebens mittels des MTT-Assays

6.5.1 Testprinzip

MTT ist ein gelbes wasserlösliches Tetrazoliumsalz. Ausschließlich lebende Zellen können den Tetrazolring mit Hilfe von mitochondrialen Dehydrogenasen aufspalten [78]. Dadurch entsteht aus dem löslichen gelben MTT das unlösliche purpurfarbene Formazan, welches mittels Absorptionsmessung nachgewiesen werden kann. Mit Hilfe des MTT-Assays können somit lebende von toten Zellen unterschieden werden [79].

6.5.2 Herstellung des MTT-Mastermix

MTT (Sigma, Deutschland) wurde in HBSS gelöst (Endkonzentration: 5 mg/ml) und durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Bis zum Gebrauch wurde diese Stocklösung bei -20°C gelagert. Kurz vor Gebrauch wurde ein Mastermix, bestehend aus 1 Teil MTT-Stocklösung mit 10 Teilen HBSS hergestellt.

6.5.3 Versuchsaufbau

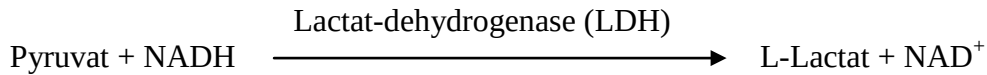
Die Zellen wurden in eine 96-Well-Platte, wie im Abschnitt „Zellkultur“ (6.1) beschrieben, ausgesät und anschließend für 24 h mit steigenden Konzentrationen an Dox bzw. 2 mM BSO oder für 2 h mit 100 µM H₂O₂ behandelt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgegossen, um eine Zellzerstörung durch Absaugen des Mediums mit der Pasteurpipette zu vermeiden. Jedes Well wurde anschließend mit 200 µl HBSS gewaschen und danach mit 110 µl Mastermix versetzt. Nach einer 2 stündigen Inkubationszeit wurde der Mastermix vorsichtig abgegossen und die Zellen mit 100 µl HBSS je Well gewaschen. Durch Zugabe von 150 µl DMSO je Well wurden sowohl die Zellen lysiert, als auch das unlösliche Formazan in Lösung gebracht. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte 1 min im Tecan-Gerät geschüttelt, um eine homogene Verteilung des Formazans zu gewährleisten. Die Absorption wurde bei 540 nm gemessen. Um Absorptionseffekte der Mikrotiterplatte nicht mitzuerfassen, wurde zusätzlich bei 650 nm gemessen und diese Absorption von der Absorption bei 540 nm subtrahiert. Von jeder Probe wurden Dreifachwerte gemessen.

6.5.4 Auswertung

Von der gemessenen Absorption bei 540 nm wurde die Absorption bei 650 nm subtrahiert. Hiervon wurde anschließend der Blankwert (= Eigenabsorption des MTT-Mastermix) abgezogen. Um den Anteil der lebenden Zellen errechnen zu können, wurde die Netto-Absorption ($A_{540} - A_{650} - A_{\text{Blank}}$) der behandelten Zellen mit der Netto-Absorption der Kontrollzellen (=100%) ins Verhältnis setzt.

6.6 Bestimmung der LDH-Konzentration im Medium

6.6.1 Testprinzip



Unter Verbrauch von NADH wird während dieser Reaktion Pyruvat in Lactat umgewandelt. Die Konzentration von NADH kann mittels Absorptionsmessung bei 340 nm bestimmt werden. Da im Verlauf der Reaktion NADH verbraucht wird, beobachtet man ein Absinken der Absorption. Je höher der Gehalt an LDH in der untersuchten Probe ist, desto stärker wird die Absorption gesenkt.

6.6.2 Versuchsaufbau

Für unsere Versuche wurden die HTETOP-Zellen in 6-Well Platten ausgesät und für 24 h mit Dox behandelt. Zusätzlich erhielt ein Teil der Zellen eine Präinkubation mit DOXY (Endkonzentration: 1 µg/ml) für 24 h bzw. mit Dex (Endkonzentration: 100 µM) für 30 min. Nach Abschluss der Dox-Therapie wurden 30 µl aus dem überstehenden Medium (=Probe 1) entnommen. Um den gesamten LDH-Gehalt je Probe bestimmen zu können, wurde anschließend in das Medium 20 µl Lysispuffer (Endkonzentration je Well: 0,1% Triton) gegeben. Der gesamte LDH-Gehalt wurde benötigt, um den prozentualen Anteil des extrazellulären LDH ermitteln zu können. Für die vollständige Lyse der Zellen wurde die Zellkulturplatte bei 4°C unter Lichtausschluss für 20 min geschüttelt. Der Erfolg der Zelllyse wurde mikroskopisch geprüft. Anschließend wurden 30 µl aus dem Zelllysate entnommen (=Probe 2). Als Positivkontrolle für einen funktionsfähigen LDH-Versuch galt ein deutliches Signal nach der Zelllyse.

Von jedem Ansatz wurde Probe 1 und 2 jeweils mit 1000 µl Reaktionsmix (6,2 mM Na-Pyruvat und 0,24 mM NADH in einem 50 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ – Puffer (pH: 7,5)) versetzt und anschließend gut homogenisiert (mittels Vortexer). Danach wurde sofort die Absorption bei 340 nm bestimmt. Nach exakt 3 min wurde erneut die Absorption bestimmt. Je höher die Differenz zwischen den beiden Messwerten war, umso mehr LDH ist in der untersuchten Probe enthalten. Abschließend wurde der prozentuale Anteil des extrazellulären LDH-Gehaltes an dem Gesamt-LDH-Gehalt ermittelt.

6.7 Microarray (High-density oligonucleotide Microarray)

6.7.1 Probenvorbereitung

Bei der Behandlung der HTETOP-Zellen mit a) Dox, b) mit Dox und Dex oder c) mit Dox und DOXY sind Veränderungen in der Genexpression zu erwarten. Um klären zu können, ob diese Veränderung in der Genexpression bei der Entstehung von ROS eine Rolle spielt, wurden Microarray-Experimente durchgeführt.

Um möglichst vertrauenswürdige Ergebnisse zu erzielen, wurden je Behandlungsgruppe 3 Versuchsansätze aus verschiedenen Zellpassagen eingesetzt. Jeder Versuchsansatz beinhaltete seinerseits 3 verschiedene Wells, in denen die Zellen ausgesät und behandelt wurden. Die Zellen wurden mit 1 µM Dox, 1 µM Dox + 100 µM Dex oder 1 µM Dox + 1 µg/ml DOXY für 24 h behandelt. Dabei wurde Dex 30 min und DOXY 24 h vor der Dox-Therapie verabreicht. Unter Verwendung des Kits Trifast wurde die RNA von jeder Probe entsprechend den Herstelleranweisungen isoliert. Die RNA-Proben einer Behandlungsgruppe wurden gepoolt und durch reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Aus der cDNA wurde anschließend

cRNA hergestellt, welche nach der Reinigung, Fragmentierung und der Biotinylierung auf den Human Genome U133 Plus 2.0 Array GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA) hybridisiert wurde. Dieser Chip enthält rund 45000 Probe Sets, wodurch rund 38500 menschliche Gene erfasst werden können.

Die oben beschriebenen Prozesse wurden insgesamt dreimal durchgeführt, sodass je Behandlungsgruppe 3 voneinander unabhängig hergestellte Chips zur Verfügung standen. Alle Chips wurden gescannt und die Rohdaten wurden durch das GeneChip Operating System (GCOS) 1.4. bearbeitet.

6.7.2 Auswertung der Microarray-Daten

Damit die Auswertung eines Chips vertrauenswürdige Ergebnisse liefert, wurden zahlreiche Qualitätskontrollen eingefügt. So musste das Verhältnis von Aktin 3' zu Aktin 5' kleiner als 3 und GAPDH 3'/5' ≤ 3 sein. Das Hintergrundsignal sollte ≤ 100 sein und die Schwankung des „Scaling factor“ sollte kleiner als Faktor 3 sein. Außerdem musste in jedem Chip die Kontrolle „bioB“ sichtbar sein. In unseren Experimenten stimmten alle Qualitätskontrollen mit den Vorgaben überein.

Der durch das GCOS 1.4 produzierte „Detection call“ war ein weiterer Parameter, um ein Probe Set als detektierbar zu werten. Jedes Probe Set wurde als „Present call“, „Absent call“ oder „Marginally detected“ eingestuft, je nachdem, wie hoch der p-Wert bei der Detektion war. In allen Chips, die von uns gemessen wurden, betrug der Anteil der „Present calls“ je Chip 38-46 %. Um das Hintergrundsignal von den gemessenen Werten abziehen und die Chips untereinander normalisieren zu können, wurden die Rohdaten in das R-Programm geladen, welches mit dem Affymetrix-Package (<http://www.bioconductor.org/>) installiert wurde [80]. Für die Normalisierung wurden die RMA (robust multiarray analysis)-Methoden angewandt, welche bereits durch Irizarry et al. [81] beschrieben worden sind. Diese Methode wird für die Normalisierung anhand der Probenwerte empfohlen [81].

Die normalisierten Daten wurden anschließend gefiltert. Für die Auswertung der Microarraydaten wurden nur solche Probe Sets verwendet, bei denen die „Present calls“ in mindestens 2 der 3 gemessenen Chips je Behandlungsgruppe nachweisbar waren. Dadurch blieben 28180 Probe Sets für unsere Auswertungen.

Folgende Kriterien mussten erfüllt sein, damit ein Gen als differentiell exprimiert eingestuft wurde: Zunächst musste sich das Expressionslevel des zu untersuchenden Transkripts um mehr als Faktor 2 von dem der Kontrolle unterscheiden (2 fache Erhöhung bzw. Erniedrigung des Wertes) und zwar in allen 3 Chips je Behandlungsgruppe. Außerdem wurden die Behandlungsgruppen untereinander mit Hilfe des zweiseitigen ungepaarten t-Tests verglichen. Für die Berechnung wurde die SAM-Methode (significance analysis of microarrays) angewandt. Diese benutzt Abweichungen zwischen den einzelnen Wiederholungsexperimenten, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren [82]. Nur wenn die FDR (die Rate der falsch positiven Werte) kleiner als 1 % war, wurde das jeweilige Gen als differentiell exprimiert eingestuft. Um die so identifizierten Gene bzw. Transskripte biologischen Pathomechanismen zuzuordnen zu können, wurden die Daten in das NETAFFX analysis center (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>) geladen und mit den dort hinterlegten Genen verglichen. Für die funktionelle Gen-Cluster Analyse der differentiell exprimierten Gene bzw. Transkripte und die Identifizierung von übergeordneten biologischen Prozessen wurde die Internetdatenbank DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) verwendet [83].

6.8 Quantifizierung von Dox und seiner Metabolite in verschiedenen Geweben der Maus mittels HPLC

6.8.1 Allgemeines Prinzip der Hochleistungs-Flüssigchromatographie

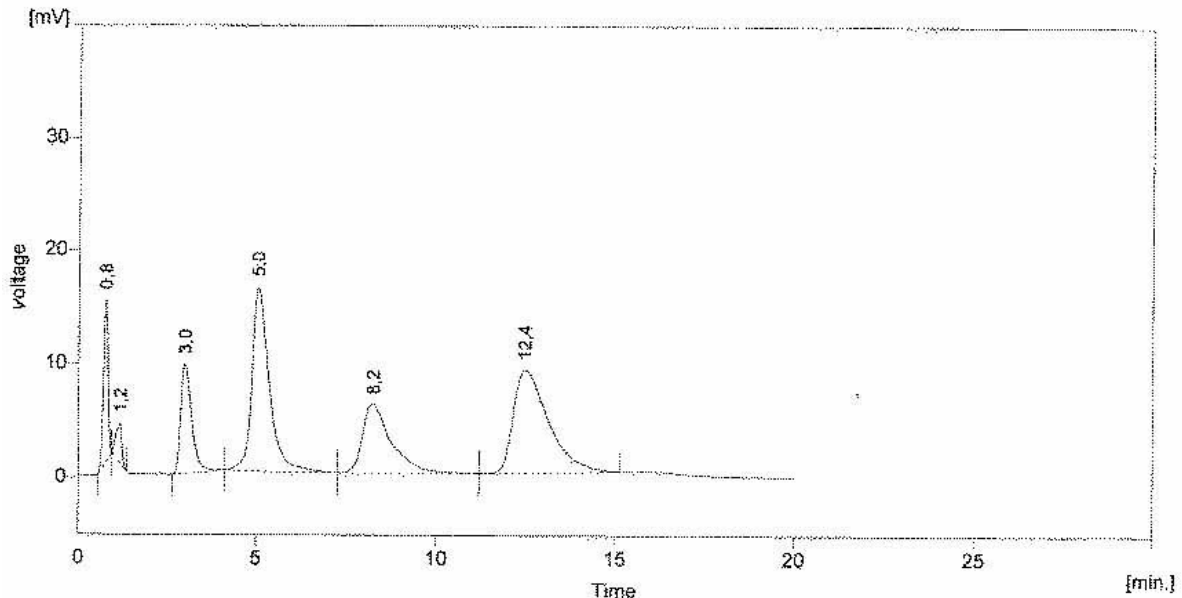
Das Verfahren der Hochleistungs-Flüssigchromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) wird zur Auftrennung eines Stoffgemisches und zur anschließenden quantitativen Bestimmung einzelner Bestandteile verwendet. Für die Auftrennung des Stoffgemisches sind Verteilungs- und Adsorptionsvorgänge zwischen der stationären und der mobilen Phase verantwortlich. Alle Bestandteile eines Stoffgemisches werden gemäß ihrer Polarität unterschiedlich stark an die stationäre Phase gebunden. Je nach Elutionskraft des Fließmittels und der chemischen Struktur des Analyten werden diese unterschiedlich schnell von der stationären Phase abgelöst und in Richtung des Detektors transportiert. Hierdurch findet eine Auftrennung des Substanzgemisches statt. Die Zeit, die zwischen dem Auftragen der Substanz und der Vermessung durch den Detektor vergeht, bezeichnet man als Retentionszeit. Anhand der Retentionszeiten (die mit den jeweiligen Reinsubstanzen verglichen werden können) ist eine Identifizierung von einzelnen Substanzen des Stoffgemisches möglich. Aber auch durch die Auswahl des Detektortypes können chemisch-physikalische Eigenschaften (wie zum Beispiel die Absorption einer bestimmten Wellenlänge und die anschließende Emission einer anderen) zur Identifizierung der Einzelbestandteile beitragen. Für den quantitativen Nachweis einzelner Bestandteile wird in der Regel ein interner Standard dem zu untersuchenden Material zugesetzt. Der interne Standard muss folgende Eigenschaften aufweisen: Er darf sich definitiv nicht im Stoffgemisch befinden, er muss eine ähnliche aber dennoch deutlich vom Analyten unterscheidbare Retentionszeit aufweisen, er darf durch die Probenaufbereitung oder die Wahl des Säulenmaterials/des Fließmittels nicht verändert werden, er darf nicht mit den zu untersuchenden Bestandteilen interagieren, er muss in genau definierten Mengen zugesetzt werden und auch das Detektorsignal muss direkt proportional zur eingesetzten Menge sein. Um mit Hilfe des internen Standards eine Quantifizierung des zu untersuchenden Analyten vorzunehmen, wird die Fläche des Peaks (**Area Under the Curve**) des zu untersuchenden Stoffes ins Verhältnis mit der Fläche des internen Standards gesetzt.

6.8.2 Nachweis von Dox und seiner Metabolite mittels HPLC

Zum Nachweis von Dox und seiner Metabolite wurde ein HPLC-System, bestehend aus einem automatischen Probengeber, einer Hochdruckpumpe der ein Degasser vorgeschaltet war, und einem Fluoreszenzdetektor verwendet. Neben der chromatographischen Säule LiCrospher® 100 RP-8 -Säule wurde eine Vorsäule LiChroCART® zur Abtrennung von Verunreinigungen und zum Schutz der Hauptsäule verwendet. Da Dox und seine Metabolite lipophil sind, eignet sich diese Umkehrphasen-Chromatographie (bei der die stationäre Phase durch Veretherung der Silanolgruppen lipophile Eigenschaften aufweist) besonders gut. Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch von Ammoniumacetatpuffer (25 mM, pH 4,6) und Acetonitril im Verhältnis 77:23. Dem gesamten Fließmittel wurde abschließend Triethanolamin (0,05% v/v) zugesetzt. Triethanolamin ist notwendig, um die trotz des Veretherungsprozesses immer noch frei vorliegenden Silanolgruppen abzuschirmen und so die Trennschärfe zu erhöhen. Vor jeder Messserie wurde das Fließmittel filtriert (die maximal erlaubte Partikelgröße betrug 0,5 µm) und mittels Ultraschall für 15 min entgast. Es erfolgte eine isokratische Elution. Bei einer Flussrate von 1,5 ml/min der mobilen Phase wurden 50,0 µl aufbereitetes Probenvolumen auf die Säule gegeben. Es wurden generell nur hochreine Substanzen in die HPLC-Anlage injiziert, um die Stabilität der Basislinie zu gewährleisten. Die Detektion von Dox und seiner Metabolite erfolgte im Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 595 nm. Die Empfindlichkeit des Detektors betrug 1000 nA. Ein optimales Peak- und Peaktrennverhalten der

Analyten wurde bei diesen Parametern erreicht. Durch die Hydrophilie des Fließmittels wurden zuerst die hydrophilen Bestandteile des Gemisches (z.B. Doxorubizinol (Doxol)) und später die lipophileren Bestandteile (z.B. Doxorubizin (Dox) und Doxorubizinon (Doxon)) eluiert. Die Retentionszeiten (Rt) betrugen für Doxol 3,0 min, für Dox 5,0 min und für Doxon 8,2 min. Die gesamte Elutionsdauer betrug 20 min (siehe Abb. 9).

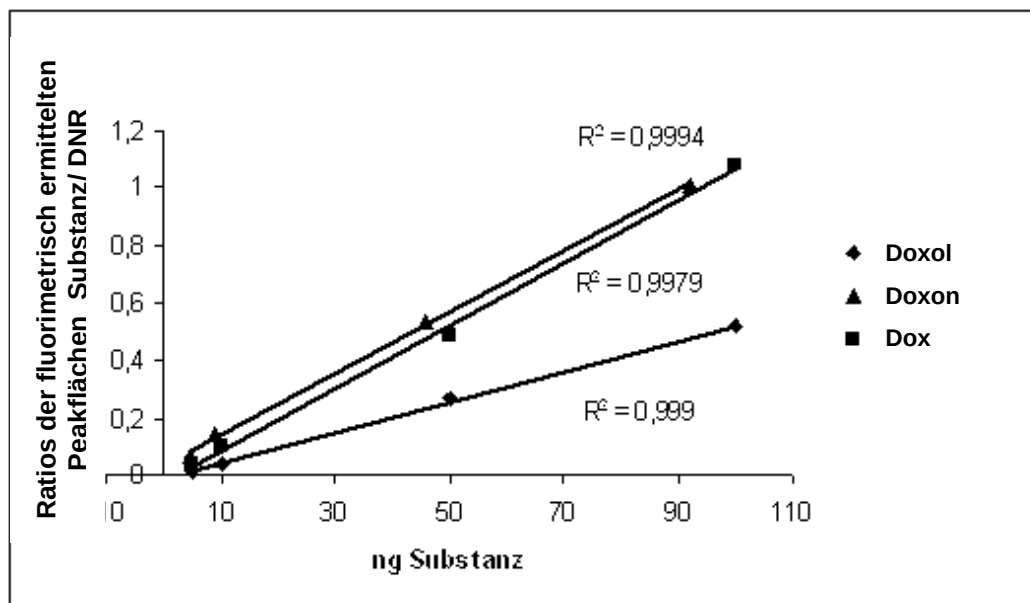
Abb. 9: Beispielchromatogramm aus dem Blut von unbehandelten C57BL/6-Mäusen



Kurz vor der HPLC-Analyse wurde der Mix gesamt (bestehend aus Dox, Doxol und Doxon) zugesetzt. Peakretentionszeiten (in min): 3,0: Doxol; 5,0: Dox; 8,2: Doxon; 12,4: DNR (=interner Standard)

Jedem HPLC-Probendurchlauf wurden neben 4 Kalibratoren je Substanz 5-100 ng, eine aufgearbeitete Blut, Herz- oder Lebergewebsprobe von unbehandelten Mäusen, eine Leerprobe, welche nur mit internem Standard versetzt wurde, sowie mindestens 2 zufällig im Lauf verteilte Qualitätskontrollproben verschiedener Konzentrationen hinzugefügt. Stellvertretend ist eine typische Kalibrierreihe mit dem Korrelationskoeffizienten für Dox von 0,9979, für Doxon von 0,9994 und für Doxol von 0,999 dargestellt (siehe Abb. 10). Die Linearität der Kalibriergeraden war somit in dem gewählten Bereich gegeben.

Abb. 10: Kalibriergerade am Beispiel der Blutbestimmung



Für jeden Messtag wurde eine neue Kalibriergerade erstellt, um Schwankungen im Lösungsmittel und damit auch bei den Retentionszeiten auszugleichen. Die Kalibratoren durften eine 15 prozentige Abweichung von dem theoretischen Wert aufzeigen. Die Auswertung der Qualitätskontrollen entschied darüber, ob ein Probendurchlauf angenommen oder verworfen wurde. Für die Auswertung wurden die Flächen unterhalb des Substanzpeaks (Dox, Doxol, Doxon) durch die Fläche des Internen Standards (DNR) dividiert. Anschließend wurde die sich daraus ergebende Ratio in die Kalibriergeradengleichung eingesetzt. Somit konnte die absolute Menge des Analyten in der Probe errechnet werden. Später erfolgte die Kalkulation mit Hilfe des Integrationsprogramms Clarity Lite®.

6.8.3 Behandlungsplan der Mäuse und anschließende Gewebeaufarbeitung für die HPLC

Die Tiere waren zwischen 8 und 12 Wochen alt. Den Tieren wurden insgesamt je eine Dosis Dox à 3 oder 12 mg/kg Körpergewicht (KG) intraperitoneal (i.p.) injiziert. Die Dox-Stamm-lösung aus der Apotheke (2 mg/ml) wurde dabei so mit isotonischer NaCl-Lösung verdünnt, dass maximal 120 µl i.p. injiziert wurden. Die Injektion erfolgte ohne Betäubung. Ein Teil der mit 3 mg/kg KG behandelten Tiere erhielt nach 1 Woche eine weitere Dox-Injektion. Außerdem erhielt ein Teil der mit 3 mg/kg KG Dox behandelten C57BL/6-Mäuse zusätzlich eine Prätherapie mit Dex (30 mg/kg KG). Dex wurde jeweils eine halbe Stunde vor der Dox-Gabe i.p. verabreicht. Die Dex-Dosis wurde, äquivalent zur Dosierung beim Menschen, als ein Zehntel der Dox-Dosis gewählt. Nach genau definierten Zeiten (30 min, 1 h, 6 h, 24 h und 3 Tagen) wurden jeweils 5 Mäuse mittels Cervixdislokation getötet.

Direkt im Anschluss erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des Herzens (bei der Behandlung mit 3 mg Dox je kg KG) bzw. durch Punktion der Augenvene (bei der Behandlung mit 12 mg Dox je kg KG). Danach wurden die Leber und das Herz entnommen, das Herz halbiert und alle Organteile zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde alles in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung für die HPLC-Untersuchungen und zur Ermittlung des ROS-Gehaltes bei -80°C gelagert.

Um den Gehalt an Dox und seiner Metabolite bestimmen zu können, wurden die Organteile aufgetaut, gründlich trocken getupft und in ein Eppendorf-Gefäß genau eingewogen. An-

schließlich wurde das gesamte Herz beziehungsweise ein Leberstück von ungefähr 100 mg in 500 µl PBS unter Eiskühlung mittels Ultraturax® zerkleinert. Um zu gewährleisten, dass das Gewebe vollständig aufgeschlossen wurde und bei der Zerkleinerung keine zu große Hitze entsteht, wurde insgesamt 30 sek homogenisiert und 15 sek gewartet, ehe der nächste Homogenisationsschritt begann. Insgesamt wurde dieser Prozess viermal wiederholt. Von den so entstandenen Homogenisaten wurden jeweils 50 µl in ein frisches Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 6 µl einer DNR-Lösung 10 mg/ml (interner Standard) versetzt. Wie in der Arbeit von Andersen et al. [84] erfolgte die Zugabe von 5,6 µl einer 40 prozentigen wässrigen ZnSO₄-Lösung und 56 µl Methanol, um die Proteine zu präzipitieren. Die Eppendorf-Gefäße wurden gut mit einem Vortexer® geschüttelt. Durch die anschließende Zentrifugation in der Zentrifuge (Biofuge® fresco von Heraeus) bei 15000 x g für 10 min konnte das Proteinpellet abgetrennt werden. 100 µl des Überstandes wurden in ein HPLC-Vial überführt. Für die Herstellung der Kalibrierproben wurden unbehandelte Mäuseorgane verwendet. Nach dem Homogenisationsschritt wurden 50 µl des Homogenates mit genau definierten Mengen Dox und dessen Metaboliten versetzt. Wie bei den eigentlichen Proben erfolgten auch hier die Zugabe des internen Standards und die anschließende Proteinfällung.

6.8.4 Behandlungsplan der HTETOP-Zellen und anschließende Gewebeaufarbeitung für die HPLC-Messung

Für diese Versuche wurden 280 000 HTETOP-Zellen pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät. Die Zellen wurden anschließend im Inkubator bei 37°C und 10% CO₂-Gehalt für 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit Dox (Endkonzentration: 1 µM und 100 µM) für 30, 60 min, 2 h, 6 h und 24 h behandelt. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde das jeweilige Medium in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 600 x g für 5 min, um die im Medium schwimmenden Zellen abzutrennen. Aus dem Überstand wurde der extrazelluläre Dox-Gehalt analog zu den Mäusegewebeproben bestimmt.

Nach Abnahme des überstehenden Mediums für die Messung der extrazellulären Dox-Konzentration wurden die Zellen mit PBS gespült und durch Zugabe von 0,2 ml Trypsin je Schale vom Plattenboden abgelöst. Nach 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml frischen HTETOP-Mediums abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde danach mit 1 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Abschließend erfolgte die Resuspendierung in 500 µl PBS. 100 µl davon wurden für die Zellzählung verwendet und 400 µl für die Bestimmung der intrazellulären Dox-Konzentration.

6.8.5 Validierung der Methode zur quantitativen Bestimmung von Dox, Doxol und Doxon

An die Validierung der analytischen Methode wurden zahlreiche Anforderungen gestellt [85, 86]. Essentielle Parameter sind der Nachweis von Präzision, Richtigkeit, Selektivität, Sensitivität, Reproduzierbarkeit und Stabilität. Sie ermöglichen Aussagen zur Verlässlichkeit einer Methode und zur Sicherheit der erstellten Analysenergebnisse.

Zu Beginn wurde die Reinheit der mobilen Phase Ammoniumacetatpufferlösung / Acetonitril (77:23, v:v) über einen Detektionszeitraum von 20 min bestimmt. Das Elutionsmittel entsprach den hohen analytischen Anforderungen, da sein Chromatogramm (siehe Absatz 11.13 Abb. 63 im Anhang) frei von Störsignalen war. Zur Bestimmung der Retentionszeiten von Dox, Doxon und Doxol wurden die Substanzen jeweils in mobiler Phase aufgenommen und in das HPLC-Gerät injiziert (Retentionszeiten siehe 6.8.2). In einem weiteren Schritt wurden die

Chromatogramme einer aufbereiteten Plasma-, Herz- und Leberprobe aufgezeichnet. Voraussetzung für die optimale Detektion von Dox und seiner Metabolite war, dass keine Störsubstanzen die Detektion der Analyten im Retentionsbereich von 2 min bis 10 min behinderten. Die Abb. 64 und Abb. 65 im Anhang zeigen exemplarisch am Beispiel eines unbehandelten Balb/c-Mäuseherzens, dass diese Voraussetzung gegeben war.

Zur Erstellung einer Kalibrierreihe wurden zu Beginn eines Messtages 5,0; 10,0; 50,0 und 100,0 ng Doxol, Dox und 4,6; 9,2; 46 und 92 ng Doxon zu unbehandelten Mäuseherz- oder Mäuseleberhomogenaten beziehungsweise zum murinen Blut zugesetzt und genauso aufgearbeitet wie die restlichen Proben. Als Qualitätskontrollen wurden die Kalibrierproben mit 5 und 50 ng verwendet.

Um zu gewährleisten, dass die Messungen über den gesamten Messzeitraum präzise und richtig sind, wurde die Interday-Variabilität bestimmt. Hierfür wurden 4 verschiedene Kalibrierproben (5, 10, 50, 100 ng) der Kalibriergeraden über mindestens 6 Tage gemessen. Aus den Ergebnissen wurden die Standardabweichungen, die Richtigkeit und der Variationskoeffizient errechnet. (siehe Tab. 3). Die gemessenen Werte durften für die Richtigkeit um maximal 15% von den tatsächlich eingesetzten Konzentrationen an Dox, Doxol und Doxon abweichen. Für das LOQ (limit of quantification) wurde die zulässige Abweichung vom tatsächlichen Wert von maximal 20% festgelegt.

Für die Präzision sollten die ermittelten Variationskoeffizienten kleiner als 15% sein, ausgenommen davon war das LOQ, sein Variationskoeffizient sollte nicht größer als 20% sein. Die Auswertung erfolgte anhand des Integrationsprogramms Clarity light, dabei wurden die Kalibrierreihen durch Lineare Regression ermittelt.

Tab. 3: Nachweis der Validierungsparameter für Präzision und Richtigkeit

A) Eingesetzte Menge an **Doxol** (ng/Kalibrierprobe)

Nr.	Interday-Assay				Intraday-Assay	
	5	10	50	100	5	50
1	5,00	10,61	49,87	99,09	4,87	50,06
2	5,01	10,01	50,24	95,46	4,97	49,26
3	5,03	8,61	51,96	100,29	4,68	49,75
4	5,05	9,10	50,48	99,94	5,29	48,97
5	4,97	9,78	50,44	99,08	5,08	50,26
6	5,03	10,47	47,92	100,64		
7	4,97	8,90	52,01			
8	5,35	10,86	48,40			
9	4,98	9,83	50,20			
10	5,04		49,91			
11	4,98		50,11			
Anzahl	11	9	11	6	5	5
Mittelwert	5,04	9,80	50,14	99,08	4,98	49,66
Standardabweichung	0,11	0,79	1,23	1,88	0,23	0,54
Richtigkeit (%)	100,73	97,97	100,28	99,08	99,53	99,32
Variationskoeffizient (%)	2,18	8,07	2,45	1,90	4,62	1,09

B) Eingesetzte Menge an **Dox** (ng/Kalibrierprobe)

Nr.	Interday-Assay				Intraday-Assay	
	5	10	50	100	5	50
1	5,01	11,47	49,63	101,22	5,07	50,61
2	5,02	10,04	50,15	109,58	5,00	49,84
3	4,99	10,10	46,89	99,03	4,99	50,15
4	5,00	9,44	49,87	101,46	4,99	49,48
5	5,01	9,45	51,41	101,70	4,99	50,33
6	5,00	10,57	46,75	100,80		
7	5,01	11,12	47,19			
8	4,99	11,02	48,16			
9	5,00	9,46	50,04			
10	5,00		50,09			
11	5,01		50,14			
Anzahl	11	9	11	6	5	5
Mittelwert	5,00	10,30	49,12	102,30	5,01	50,08
Standard-abweichung	0,01	0,78	1,59	3,69	0,04	0,44
Richtigkeit (%)	100,07	102,98	98,24	102,30	100,16	100,17
Variations-koeffizient (%)	0,15	7,61	3,23	3,61	0,75	0,87

C) Eingesetzte Menge an **Doxon** (ng/Kalibrierprobe)

Nr.	Interday-Assay				Intraday-Assay	
	4,6	9,2	46	92	4,6	46
1	4,60	9,44	46,05	89,92	4,72	46,72
2	4,58	9,44	46,01	79,65	4,48	45,88
3	4,59	7,77	51,04	90,64	4,66	46,03
4	4,63	8,78	46,10	91,64	4,58	45,39
5	3,81	8,64	48,86	91,18	4,57	45,94
6	4,62	10,12	46,56	93,30		
7	4,61	9,82	46,87			
8	4,62	10,50	43,85			
9	4,61	7,62	46,06			
10	4,61		45,99			
11	4,60		45,82			
Anzahl	11	9	11	6	5	5
Mittelwert	4,53	9,13	46,65	89,39	4,60	45,99
Standard-abweichung	0,24	1,00	1,86	4,91	0,09	0,48
Richtigkeit (%)	90,68	91,26	93,31	89,39	100,00	91,98
Variations-koeffizient (%)	5,31	10,97	3,98	5,49	2,00	1,04

Zur Bestimmung der Intraday-Variabilität wurden 2 verschiedene Kalibrierproben (5 und 50 ng) der Kalibriergeraden an einem Tag fünfmal hintereinander gemessen und anschließend die Standardabweichung, die Richtigkeit und der Variationskoeffizient der Messung bestimmt. Der Vertrauensbereich der Kalibrierreihe konnte auf 5-100 ng festgelegt werden, da dieser Bereich eine ausreichende Linearität aufwies und die ermittelten Werte für Präzision und Richtigkeit den analytischen Anforderungen entsprachen.

Die Wiederfindung wurde bestimmt, indem die entsprechende Menge Dox, Doxol und Doxon in der mobilen Phase direkt auf die Säule gegeben und vermessen wurden. Die jeweils ermittelten Peakflächen der untersuchten Proben entsprachen 100%. Am selben Tag wurden unbehandelte Plasmaproben mit denselben Mengen Dox, Doxol und Doxon versetzt und anschließend aufgearbeitet. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Peakflächen nach der Aufarbeitung an den Peakflächen ohne Aufarbeitung errechnet. Die Wiederfindungsrate wurde sowohl von Dox als auch von Doxol und Doxon bestimmt. (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Wiederfindungsraten von Dox, Doxol, und Doxon nach der Aufarbeitung von Plasma

eingesetzte Mengen (ng/ Ansatz)	5	10	50	100
Wiederfindung Doxol (%)	83.8	74.9	88.5	89.0
Wiederfindung Dox (%)	83.7	73.6	103.1	68.1

eingesetzte Mengen (ng/ Ansatz)	4.6	9.2	46	92
Wiederfindung Doxon (%)	72.0	97.2	99.6	137.9

Die Wiederfindungsrate besitzt jedoch nur theoretischen Charakter, da bei jeder Probenvermessung 4 Kalibrierproben zur gleichen Zeit gemäß dem gleichen Protokoll aufgearbeitet wurden. Das bedeutet, dass selbst wenn ein Teil der zugesetzten Menge an Dox, Doxol, oder Doxon durch die Aufarbeitung verloren ginge, dies auch in den Kalibrierproben in gleichem Umfang stattfindet und somit die Richtigkeit der Ergebnisse dennoch gewährleistet werden kann.

Das Detektionslimit (limit of detection, LOD) beschreibt die kleinste nachweisbare Menge des Analyten die zuverlässig detektiert werden kann. Sein Chromatogramm-Peak entspricht dem Dreifachen des Grundrauschens der Basislinie und wurde für Dox bei 0,1 ng, für Doxol bei 1,1 ng und für Doxon bei 2,2 ng je Ansatz festgelegt. Hierfür wurden insgesamt 5 voneinander unabhängige Kalibrierreihen erstellt und gemessen. Jede Kalibrierreihe bestand aus 7 kontinuierlich ansteigenden Volumina des Mix gesamt (0,01; 0,1; 1; 2; 4,5; 9; 45 und 90 µl) (siehe 6.8.6), die zu 50 µl fetalem Kälberserum pipettiert und entsprechend den obigen Vorgaben aufgearbeitet wurden. Für jede Kalibrierprobe wurde sowohl die Standardabweichung, als auch der Variationskoeffizient bestimmt. Das LOQ ist die niedrigste Probenmenge, die mit einer Richtigkeit **und** Präzision von $\pm 20\%$ bestimmt werden kann. Es wurde für Dox bei 2,2 ng, für Doxol bei 2,2 ng und für Doxon bei 4,6 ng je Ansatz festgelegt.

6.8.6 Herstellung der Stammlösungen (Referenzsubstanzen)

Doxorubizin-HCl (Dox) und Daunorubizin-HCl (DNR) wurden als fertige Lösungen (2 mg/ml) aus der Universitätsapotheke Mainz bezogen (Adriamycin[®] und DNR[®]). Doxorubizinol (Doxol) und Doxorubizinon (Doxon) wurden von Ellen Bruns (Abteilung Kli-

nische Pharmakologie, Universität Göttingen) für die Experimente zur Verfügung gestellt. Die Stammlösungen wurden durch Verdünnung der Ausgangslösungen (siehe Tab. 5) hergestellt.

Tab. 5: Stammlösungen für Dox, Doxol und Doxon sowie für den internen Standard (IS) DNR

Substanz	Ausgangslösung	Verdünnung	Endkonzentration Stammlösung
Dox	2 mg/ml in Wasser (Adriamycin®)	1:200 mit Wasser	10 µg/ml
Doxol	1 mg/ml in Wasser	1:100 mit Wasser	10 µg/ml
Doxon	13,8 µg/ml in Methanol	1:3 mit Wasser	4,6 µg/ml
DNR (IS)	2 mg/ml in Wasser (Daunorubizin®)	1:200 mit Wasser	10 µg/ml

Aus den Stammlösungen von Dox und den Metaboliten Doxol und Doxon wurden Mix-Lösungen hergestellt, um später ein einfaches Ansetzen der Kalibrierreihen zu ermöglichen. Die Herstellung der Mixlösungen ist der Tab. 6 zu entnehmen. Für eine Kalibrierreihe wurden jeweils 4,5; 9,0; 45,0 und 90 µl des Mix gesamt zu 50 µl eines unbehandelten Mäuseherz-/Mäuseleberhomogenates beziehungsweise Mäuseblutes pipettiert und anschließend wie die anderen Proben aufgearbeitet.

Tab. 6: Mix-Lösungen zur Herstellung der Kalibrierreihen

	Herstellung von 1800µl Mix gesamt-Lösung (Dox+Doxol+Doxon)
Mix 1	200 µl der Dox-Stammlösungen ad 600 µl Fließmittel
Mix 2	200 µl der Doxol-Stammlösungen ad 600 µl Fließmittel
Mix 3	400 µl der Doxon-Stammlösungen ad 600 µl Fließmittel
Mix gesamt	600 µl Mix1 + 600 µl Mix2 + 600 µl Mix3, gut vortexen und in Aliquots zu 180 µl einfrieren

6.9 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Zur quantitativen Bestimmung von löslichen Proteinen wurde die Methode nach Bradford angewandt. Hierbei wurden die löslichen Proteine mit Coomassie Brilliant Blue eingefärbt. Von den zu vermessenden Proben wurde ein Aliquot mit Wasser verdünnt, bis der Proteingehalt zwischen 1-5 µg je 100 µl lag. 100 µl dieser Verdünnung wurden in eine 96-Well Platte pipettiert, mit 100 µl Farbreagenz (Bio-Rad Protein Assay) versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes wurde eine Kalibrierreihe erstellt, bei der 0 bis 6 µg Protein je 100 µl Wasser (hergestellt aus entfetteter BSA-Lösung) vermessen wurden. Um Fehler in der Proteinquantifizierung zu vermeiden, die durch Interaktionen des Probenpuffers mit dem Farbreagenz hervorgerufen werden können, wurde jeder Kalibrierprobe eine äquivalente Menge gleichbehandelten Probenpuffers zugesetzt, wie zur Herstellung der 100 µl-Probenverdünnung benötigt wurde. Die Bradford-Methode wird durch SDS gestört, weshalb ein SDS-freier Lysispuffer zum aufspalten der Zellmembranen hergestellt wurde (siehe GSH-Versuche 6.2.1).

6.10 Ricover60-Studie

6.10.1 Studiendesign

Die Ricover60-Studie ist eine 2x2 armige, offene, multizentrische prospektive randomisierte Phase III Studie. Von Juli 2000 bis Juni 2005 wurden insgesamt 1309 Patienten im Alter von 61 bis 80 Jahren eingeschlossen, die an einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom im Stadium I bis IV erkrankt waren. Die Patienten erhielten randomisiert entweder 6 oder 8 Zyklen einer Chemotherapie mit Cyclophosphamid, Doxorubizin, Vincristin und Prednison (CHOP14) mit oder ohne die 6-8 malige Gabe des monoklonalen CD20 Antikörper Rituximab (R) in 14 täglichen Abständen. Daher ergaben sich folgende Studienarme:

- CHOP-14, 6 Zyklen
- CHOP-14, 8 Zyklen
- R-CHOP-14, 6 Zyklen
- R-CHOP-14, 8 Zyklen

Bei ausgedehnter Primärmanifestation (bulky disease) und/oder extranodalen Lymphomen erhielten diese Patienten zusätzlich eine Strahlentherapie. Im Anschluss an die Chemo- bzw. Strahlentherapie fand eine Nachbeobachtung der Patienten statt. Die minimale Beobachtungszeit nach Abschluss der Rekrutierung betrug 3 Jahre.

Das primäre Ziel dieser Studie bestand darin, die Wirksamkeit des CHOP-14 Therapieprotokolls zu verbessern. Dies sollte durch die zusätzliche Gabe des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab und / oder die Erhöhung der Zykluszahl von 6 auf 8 Chemotherapiezyklen erfolgen. Die Wirksamkeit wurde an der Zeit bis zum Therapieversagen (time to treatment failure = TTTF) beurteilt. Als sekundäre Ziele sollten die kompletten Remissionsraten (CR-Raten), die Rate primärer Progresse, das Überleben, die Tumorkontrolle, das krankheitsfreie Überleben, sowie kurz- und langfristige Toxizitäten, Parameter zur Gesundheitsökonomie und zur Analyse der Rezidive nach Strahlentherapie in den 4 Studienarmen vergleichend untersucht werden.

6.10.2 Ziele unserer Arbeitsgruppe

Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich im Rahmen dieser Studie mit der Erfassung der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz und der Identifizierung von genetischen Polymor-

phismen, die für die Entstehung einer solchen Herzinsuffizienz prädestinierend wirken können.

Aus früheren Studien existieren bereits erste Hinweise darauf, dass die individuelle genetische Ausstattung der Patienten einen Einfluss auf die Entstehung einer Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz haben könnte. Dennoch waren nur wenige Gene bekannt, die mit einer erhöhten Rate von Herzscheiden in Verbindung gebracht werden konnten [20]. Diese bereits bekannten Gene sollten auf ihre klinische Relevanz in dem Ricover60- Patientenkollektiv untersucht werden.

6.10.3 Erfassung und Beurteilung der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz

Nachdem die Patientenrekrutierung für die Ricover60-Studie abgeschlossen war, wurde eine Datenbankabfrage durchgeführt (Kriterien aus der Datenbankabfrage siehe Anhang Tab. 18). Somit lagen Informationen über den Gesundheitszustand der Patienten zu Beginn der Studie, während der einzelnen Chemotherapiezyklen / Bestrahlungszyklen als auch für jeden Nachbeobachtungstermin vor. Ferner wurden die Zwischenauswertungsbögen, die Meldebögen über schwere unerwünschte Ereignisse, der Todesbogen, als auch die übergeordneten Bemerkungsfelder der Ärzte, der Eingabe und die interkurrenten Erkrankungen auf mögliche Hinweise über eine Herztoxizität untersucht.

Die Bewertung der Herztoxizität erfolgte separat für jede der 3 Studienphasen

- I: vor Beginn der Studie (Prätherapiebogen)
- II: während der Chemotherapie (hierzu wurden sowohl die eigentlichen Chemotherapiebögen der Zyklen 1-8 als auch die Bewertungen der Zwischenauswertungsbögen 1 und 2 und die eventuell vorhandenen Bestrahlungsbögen gezählt)
- III: Nachbeobachtung im Anschluss an die Chemotherapie (Folgebögen 1-12).

Da für die Beurteilung der Herzinsuffizienz ausschließlich die Eintragungen aus den Fragebögen herangezogen werden konnten und nur vereinzelt die Ergebnisse einer speziellen Herzdagnostik (z.B. Echokardiographieuntersuchungen, Bestimmung des NT-proBNP-Wertes, Belastungstests) zur Verfügung standen, wurden **alle** Hinweise auf eine Herzscheiden in die Auswertung mit einbezogen.

Auswertung der Dokumentationsbögen der Phase I

In der Phase I sind die Patienten mit jeder Art von Hinweisen auf eine bestehende Herzscheiden als „sicherer Herzscheiden“ eingestuft worden. In den Dokumentationsbögen war die direkte Bewertung eines Patienten als „Herzinsuffizienz-Patient“ zu finden, aber auch Eintragungen wie zum Beispiel Hypertonus, Herzschrömmacherträger und Digitalisanwender wurden als Hinweis auf eine bestehende Herzscheiden gewertet. (vollständige Kriterien, die als Hinweis für Herzscheiden gewertet wurden siehe Anhang, Identifizierung von Herzscheiden Tab. 19, Spalte 1)

Auswertung der Dokumentationsbögen der Phase II+III

In den Phasen II und III wurde separat für jeden Dokumentationsbogen der kardiale Status der Patienten bewertet. Sämtliche Hinweise auf Herzscheiden wurden unterteilt in A) sichere Hinweise auf Herztoxizität und B) unsichere, aber wahrscheinliche Hinweise auf Herztoxizität. Wurde bei einem Patienten mindestens ein Kriterium aus der Identifizierung von Herzscheiden Tab. 19 (siehe Anhang) dokumentiert, ist er als „sicherer Herzscheiden“ eingestuft worden. Bestand nur der Verdacht auf eine vorliegende Herzscheiden (ausschließlich Kriterien aus der Tab. 20 siehe Anhang wurden dokumentiert), ist der Patient in die Gruppe der

„unsicheren Herzschrden“ einsortiert worden. Waren f#r einen Patienten weder Kriterien aus der Identifizierung von Herzschrden Tab. 19 noch aus der Tab. 20 dokumentiert, so wurde dieser eingruppiert als „sicher kein Herzschrden“.

Ein einmaliger Hinweis auf eine Herzschrddigung reichte aus, um den betreffenden Patienten f#r die gesamte Phase als herzschrddigten Patienten zu charakterisieren. Somit konnte sowohl f#r jeden einzelnen Patienten, als auch f#r die Studienpopulation als Ganzes eine Aussage #ber die Inzidenz und das erstmalige Auftreten der Herzschrden gemacht werden.

Auswertung der #bergeordneten Dokumentationsb#gen

Zus#tzlich zu den oben aufgef#hrten 3 Studienphasen waren Dokumentationsb#gen vorhanden, die #bergreifend #ber alle Studienphasen wirkten. Zu diesen geh#ren die 2 Dokumentationsb#gen #ber schwere unerw#nschte Ereignisse (SUE) und der Todesbogen. Ein Patient wurde auf diesen B#gen als herzschrddigt definiert, sobald er mindestens ein Kriterium aus der Identifizierung von Herzschrden Tab. 19 oder Tab. 20 aufwies.

Im Normalfall konnten die auf den Todes- und SUE-B#gen vermerkten Herzschrden auch auf den jeweiligen Therapieb#gen (Chemotherapieb#gen, Folgeb#gen etc.) wiedergefunden werden. F#r die Einsortierung dieser Patienten mit einer doppelten Dokumentation der Herzschrden in eine der 3 Studienphasen, wurden ausschlie#lich die regul#ren Therapieb#gen f#r die Auswertung herangezogen. Die wenigen Patienten (n=15), die **ausschlie#lich** in den SUE- / Todesb#gen Hinweise auf Herzschrden aufwiesen, konnten nur anhand der Datumsangabe auf den SUE- / Todesb#gen einer Studienphase einsortiert werden. Je nachdem, ob sich das Datum des SUE- / Todesbogens w#hrend oder nach dem Abschluss der Chemotherapie befand, wurden die Herzschrden des betreffenden Patienten in die Studienphase II oder III einsortiert. Zur besseren #bersicht wurden diese Patienten gesondert in den Diagrammen in den Abb. 49 und Abb. 50 dargestellt.

Zus#tzlich hatten in dieser Studie sowohl der behandelnde Arzt als auch die Person, welche die Daten in die Datenbank #bertrug bzw. kontrollierte, die M#glichkeit, auf dem jeweiligen Therapiebogen eine zusammenfassende Einsch#tzung #ber den Gesundheitszustand des Patienten vorzunehmen. Bei einigen wenigen Patienten (n=6) fanden sich **ausschlie#lich** in diesen „Bemerkungsfeldern“ Hinweise auf eine Herzschrddigung (Anmerkungen aus den Bemerkungsfeldern der #rzte: siehe Anhang Tab. 21 ; Anmerkungen aus den Bemerkungsfeldern der Eingabe: siehe Tab. 22). Diese Patienten wurden, wie die anderen herzschrddigten Patienten, in die jeweilige Gruppe (sichere F#lle und unsichere F#lle) und die jeweilige Studienphase (I-III) einsortiert.

Eingruppierung der F#lle in akute und chronische Toxizit#t

Neben der Unterteilung der F#lle in a) sicher herzschrddigte Patienten und b) Patienten, bei denen eine Herzschrddigung zu vermuten ist, wurden alle sicheren F#lle unterteilt in akute und chronische F#lle. Patienten die nur w#hrend der Chemotherapie (Phase II) Herzprobleme aufwiesen, wurden als „akute F#lle“ klassifiziert. Ein Patient wurde in unserer Auswertung dann ein „chronischer Fall“, wenn bei ihm erstmalig auf den Chemotherapie- **und** den Folgeb#gen (Studienphase II+III) bzw. nur auf den Folgeb#gen (Studienphase III) Herzprobleme festgestellt werden konnten. Die Patienten, bei denen die Herzprobleme nur in den #bergeordneten Dokumentationsb#gen nachzuweisen waren, wurden datumsabh#ngig zu den chronischen bzw. akuten F#llen gerechnet. Hierf#r wurde zun#chst die zeitliche Differenz des Todes- / bzw. SUE-Datums zum Beginn der Chemotherapie ermittelt. Betrug die Differenz zum Beginn der Chemotherapie weniger als 130 Tage (was ungef#hr die Dauer von 6-8 Wochen Chemotherapie und die anschließende Dauer der Strahlentherapie umfasst), wurde das Herzereignis als Begleiterscheinung der Chemotherapie gewertet und der Fall als akuter Fall einsortiert. Waren mehr als 130 Tage zwischen der Chemotherapie und dem Herzereignis, wurde die Schrddigung als Sp#tfolge gewertet und der Fall als chronischer Fall einsortiert. Lagen

mehrere Datumsangaben für Herzschäden vor, wurde die Differenz zum Todesdatum ermittelt. Betrug die Differenz weniger als 200 Tage, wurde das Todesdatum zur Eingruppierung des Falles als akut oder chronisch maßgeblich herangezogen. Betrug die Differenz mehr als 200 Tage, wurde der Fall als vermutlich chronischer Fall klassifiziert.

6.10.4 Beschaffung aller benötigten Blutproben für die Genotypisierung

Von allen identifizierten Patienten mit Herzschäden sollten ausschließlich die Gruppe der „sicheren Herzschäden“ für unsere weiteren Untersuchungen verwendet werden. Patienten, die bereits vor Beginn der Studie Herzprobleme aufwiesen, wurden in unsere Untersuchungen nicht mit einbezogen, da wir ausschließlich die Chemotherapie-induzierten Herzschäden erfassen wollten. Von allen akuten und chronischen Fällen sowie von den Kontrollen (=Patienten die sicher keine Herzscheidung aufwiesen) wurden Blutproben für die Genotypisierung gesammelt. Die Sammlung der Blutproben erfolgte in 3 zeitlich versetzten Sammlungsaktionen. Die 1. Blutprobensammlung fand 2003 in Göttingen statt. Nach Abschluss der Patientenrekrutierung und der Auswertung aller verfügbaren Patientendaten sollte in der 2. Sammlung das Blut von allen „chronischen Fällen“, die in der Sammlung von Göttingen fehlten, besorgt werden. Die Kontrollen sollten aus den bereits 2003 gesammelten Proben ausgewählt werden. Um jedoch einen umfassenderen Einblick auf den Zusammenhang von bestimmten genetischen Polymorphismen auf die Entstehung von Herzschäden zu bekommen, sollte in einer dritten und letzten Sammlungsaktion ebenfalls das Blut von den „akuten Fällen“ sowie von allen noch fehlenden Kontrollen besorgt werden. Hierfür wurden „Blutentnahmekits“ (siehe Anhang 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5, 11.6, 11.7) vorbereitet und an das Studiensekretariat in Bad Homburg verschickt. Frau Tanja Rixecker aus dem Studiensekretariat in Bad Homburg fand für alle benötigten Patientennummern die behandelnden Ärzte heraus und adressierte die Blutentnahmekits an die Patienten. Dadurch konnte von zahlreichen Patienten das Blut beschafft werden. Die erhaltenen Blutproben wurden bei 2000 x g abzentrifugiert. Sowohl das Plasma als auch die festen Blutbestandteile wurden in frische Eppendorfgefäße überführt, beschriftet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Nachdem die Blutprobensammlung beendet war, wurde aus dem Plasma der Patienten der NT-proBNP-Wert bestimmt. Dieser diente zur Kontrolle, um die Eingruppierung als Fall- bzw. Kontrollpatient zu untermauern. Dabei deuten erhöhte Werte auf eine bestehende Herzinsuffizienz hin.

6.10.5 NT-proBNP-Bestimmung

Die Bestimmung des NT-proBNP erfolgte im Institut für Klinische Chemie der Universität Mainz. Die NT-proBNP-Werte wurden mittels Elektrochemilumineszenz mit einem Analysensystem von Roche (Elecsys) ermittelt.

NT-proBNP entsteht als „Spaltprodukt“ bei der Bildung von BNP. Das abgespaltene Fragment NT-proBNP ist biologisch nicht aktiv und hat im Blut eine Halbwertszeit von 60-120 min, während BNP als biologisch aktives Hormon nur eine Halbwertszeit von 20 min besitzt. NT-proBNP wird ausschließlich im Herzen gebildet. Prinzipiell können beide Substanzen als Marker für eine bestehende Herzinsuffizienz eingesetzt werden, im Blut liegt jedoch die Konzentration an NT-proBNP um ein bis zwei Größenordnungen über der des BNP. Die intraindividuellen Schwankungen der NT-proBNP-Werte sind gering und NT-proBNP zeigt eine bessere *in-vitro*-Stabilität als BNP. Durch die Stabilität von NT-proBNP für 7 Tage bei Raumtemperatur [78], konnte eine Verfälschung des Ergebnisses durch den Transport der Blutproben ausgeschlossen werden. Auch scheint NT-proBNP für die Detektion der Herzinsuffizienz besser geeignet zu sein als BNP [87], da NT-proBNP nur bei erhöhter linksventri-

kulärer Ejektionfraktion (LVEF) ausgeschüttet wird. BNP hingegen kann außer bei erhöhtem Herzwandstress auch bei anderen Arten der Herzscheidigungen ausgeschüttet werden. Patienten, bei denen ein Hypertonus festgestellt wurde, besaßen normale NT-proBNP-Werte. Jedoch wurde mit zunehmendem Schweregrad der Herzinsuffizienz eine signifikante Erhöhung der NT-proBNP-Werte beobachtet [88].

Ohne Herzinsuffizienz.:	10,8 ± 1,3 pmol/ l
NYHA 1:	88 ± 15 pmol/ l
NYHA 2:	111 ± 12 pmol/ l
NYHA 3:	236 ± 43 pmol/ l

Liegt neben der Herzinsuffizienz eine Dyspnoe vor (wobei die Dyspnoe eine häufige Folge der Herzinsuffizienz darstellt) können die NT-proBNP Werte deutlich höher als 500 pg/ml sein. Durch die Bestimmung des NT-proBNP-Wertes kann damit die symptomatische **und** asymptomatische Herzinsuffizienz effizient vorhergesagt werden. Liegen die gemessenen NT-proBNP- Werte unterhalb von 125 pg/ml Plasma (<75 Jahre) und 450 pg/ml Plasma (>75 Jahre) [89] kann die Herzinsuffizienz sicher ausgeschlossen werden. Außerdem kann der NT-proBNP-Wert verwendet werden, um die Effizienz der Herzinsuffizienztherapie zu bewerten. Nach der 2. Therapiewoche sollte der Wert um mindestens 36% des Ausgangswertes gesenkt werden. Gelingt dies, ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines akuten Herzereignisses gering [90].

Es bestehen jedoch auch einige Nachteile, bei der Verwendung von NT-proBNP als Marker für die Herzinsuffizienz. Mit zunehmendem Alter steigt der NT-proBNP-Wert auch bei ansonsten herzgesunden Menschen an (siehe Abb. 11).

Abb. 11: Altersabhängiger Anstieg der NT-proBNP Werte bei gesunden Menschen (ng/L) [87]

	Male 45–54	Female 45–54	Male 55–64	Female 55–64	Male 65+	Female 65+
Median	19,5	48	17	61	42	83,5
Mean	25,9	60,9	24,1	78,8	62,4	111
95%	75,8	152	71,2	186	157	265
n	76	90	37	45	20	22

Bei Frauen wurden meist höhere Werte beobachtet als bei Männern. Die NT-proBNP Werte sinken, je höher der Hämoglobinspiegel ist. Dennoch scheinen die unterschiedlichen Hämoglobinspiegel zwischen Männern und Frauen nicht die Ursache für die unterschiedlichen NT-proBNP-Werte zu sein [91]. Liegen erhöhte NT-proBNP-Werte vor, kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass eine systolische Dysfunktion mit erhöhtem LVEDP vorliegt [92]. Umgekehrt wiesen aber nur 17% der Patienten mit LVEDP erhöhte NT-proBNP-Werte auf. Was bedeutet, dass nicht alle erhöhten LVEDP durch die Messung der NT-proBNP-Werte entdeckt werden können. Damit kann je nach Studie mit der Messung des NT-proBNP-Wertes [88, 93-95] eine Sensitivität von ca. 70-86% jedoch nur eine Spezifität von 65% erreicht wurde [95]. Das bedeutet: Mit 86 prozentiger Wahrscheinlichkeit weist ein Patient mit einem hohen NT-proBNP-Wert eine Herzscheidigung auf (Sensitivität), jedoch kann nur mit 65 prozentiger Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass ein Patient mit einem niedrigen NT-proBNP-Wert, tatsächlich keine Herzscheidigung aufweist (Spezifität). Außerdem sind die NT-proBNP-Werte abhängig von der Komorbidität des Patienten sowie von einer bestehenden Arzneimitteltherapie und sowohl die Nieren als auch vaskuläre Rezeptoren und Endopeptidasen sorgen für die Eliminierung aus dem Blut.

Es lässt sich zusammenfassen, dass NT-proBNP zur Identifizierung der Herzinsuffizienz gut geeignet ist, jedoch nicht als alleiniges Diagnosekriterium eingesetzt werden sollte.

6.10.6 Identifizierung von genetischen Polymorphismen, die für eine Anthrazyklin-induzierte Herzinsuffizienz prädestinieren

Nachdem keine weiteren Blutproben aus den verschiedenen Sammelaktionen zu erwarten waren, wurde von Frau Dr. Math. Marita Ziepert, Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie, das Matching der Proben durchgeführt. Von insgesamt 263 identifizierten Fall- und Kontrollpatienten konnte die DNA beschafft werden. Hiervon gehören 15 Patienten in den Studienteil der T-Zell-Lymphompatienten. In die Hauptauswertung der Ricover60-Studie [96] gingen ausschließlich die Patientenpopulation der CD20+ B-Zell-Lymphompatienten ein. Um später jedoch noch die Möglichkeit zu haben, die Daten gemeinsam oder getrennt nach B- und T-Zell-Lymphompatienten auswerten zu können, wurden die T-Zell-Lymphompatienten ebenfalls genotypisiert. Das Matching erfolgte jedoch getrennt nach Patienten mit B- und T-Zell-Lymphomen. Die Matchingkriterien waren das Geschlecht (m/w), das Alter (Gruppe 1: 61-65, Gruppe 2: 66-70, Gruppe 3: 71-75 und Gruppe 4: >76) und die randomisierte Zykluszahl (6 vs. 8). Es wurde dabei absichtlich die randomisierte Zykluszahl und nicht die tatsächlich verabreichte Zyklusanzahl verwendet, um nicht Patienten, die wegen diverser Toxizitäten vorzeitig die Chemotherapie abbrechen, in der gleichen Matchinggruppe wie die Patienten zu haben, die gut auf die Chemotherapie ansprachen und sich regulär in diesem Chemotherapiezyklus befanden. Wenn man für die B-Zell-Lymphompatienten die Fälle (n=59) mit den Kontrollen (n=189) vergleicht, findet man große Diskrepanzen in Bezug auf das Geschlecht (ca. 10%) und auf die Anzahl der Zyklen (Patienten mit 8 randomisierten Zyklen: 20% mehr bei den Fallpatienten). Damit wurde ein Matching unbedingt erforderlich. Um ein sonst in Studienauswertungen übliches 1:3 Matching zu realisieren, fehlten in unserem Patientenkollektiv 20 Kontrollpatienten. Der Versuch statt der 3 Matchingkriterien nur nach Geschlecht und Zykluszahl zu matchen, schlug fehl. Trotz dieser Einschränkung fehlten immer noch 15 Kontrollpatienten und auch die Balance zwischen den Gruppen wurde schlechter. Daher wurde in unserer Studie nur ein 1:2 Matching nach den 3 Kriterien (Geschlecht, Alter (4 Gruppen) und der randomisierten Zykluszahl) realisiert. Im Matching wurden bevorzugt die Kontrollen verwendet, von denen NT-proBNP Werten (= Marker für die Herzschädigung) vorhanden waren. Reichten diese nicht aus, wurden auch Kontrollen ohne den Laborwert in den Matchingprozess einbezogen. Von den 98 gematchten Kontrollen (wovon 94 B-Zell-Lymphompatienten sind) war von 57 Proben der NT-proBNP-Wert vorhanden. Die durch das Matching erreichte Balance ist sehr gut:

	Fall	Kontrolle
Geschlecht: weiblich	55%	51%
Med. Alter	68J	67J
8 Zyklen (randomisiert)	65%	62%

Zu den insgesamt 3 Fällen mit T-Zell-Lymphomen konnten nur 4 Patienten gematcht werden (2 T-NHL und 2 B-NHL). Jedoch war bei der gemeinsamen Betrachtung der B und T-Zellpatienten die Balance in Bezug auf die Matchingkriterien genauso gut, wie bei den B-Zellpatienten allein.

Auch die drei Gruppen: akuter Fall, chronischer Fall und Kontrollen sind sehr gut in Bezug auf die Matchingkriterien balanciert. So ist auch eine separate Auswertung der akuten und chronischen Fälle möglich. Jedoch werden hierfür extrem große Unterschiede benötigt, um eine genügend hohe Power beim Testen zu haben.

Die kumulativen Dosiskurven für das tatsächlich verabreichte Dox sind nahezu deckungsgleich zwischen der Fall und Kontrollgruppe (siehe Absatz 7.7.1). Ebenso besteht zwischen den Gruppen kein Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben.

Im Gegensatz zu der Studienpublikation von Pfreundschuh et al. [96] wurde in unserer Auswertung ein Fortschreiten der Erkrankung nicht zensiert und nicht protokollgerechte zusätzliche CHOP-Zyklen mitgezählt. Alle Patienten, die in das Matching eingeschlossen wurden, sind in Tab. 24 im Anhang aufgeführt.

Außerdem wurde geprüft, ob zwischen den Gruppen Unterschiede in der Bestrahlung vorhanden waren. Aus dem RX-Bogen war ersichtlich, ob Patienten einen Bulk in Lokalisation 8 (=mediastinal) aufwiesen und daher mit hoher Wahrscheinlichkeit mediastinal bestrahlt wurden, oder ob die Bestrahlung eher allgemein und nicht notwendigerweise mediastinal lokalisiert war. Der Hintergrund für diese Kontrolle lag darin, dass bereits Untersuchungen existieren, die eine Korrelation von mediastinaler Bestrahlung mit einem erhöhten Auftreten von Kardiotoxizitäten nachweisen konnten [97-99]. In unserer Auswertung sollten jedoch ausschließlich die Dox-induzierten Kardiotoxizitäten und nicht die durch andere Risikofaktoren provozierte Herztoxizität untersucht werden.

Da die Bestrahlung lediglich als Spätfolge eine Herzschädigung auslösen kann, wurde ausschließlich die Bestrahlungsinzidenz zwischen den Kontrollen und den chronischen Fällen kontrolliert. Von diesen wurden insgesamt 51 Patienten bestrahlt, davon jedoch keiner am Pericard / Mediastinum. Unter den chronischen Fällen wurden 10 von 28 Patienten bestrahlt (Inzidenz von 35,7%) und unter den Kontrollen 41 von 95 (Inzidenz von 43,2%). Damit bestehen zwischen den chronischen Fällen und den Kontrollen bezüglich der Bestrahlungsinzidenz keine relevanten Unterschiede. Betrachtet man das gesamte Studienkollektiv, so ist die Bestrahlungsinzidenz zwischen den Fällen und den Kontrollen ebenfalls ähnlich (3% bei den Kontrollen versus 2% bei den Fällen).

Bei der Betrachtung der Power, die man mit dieser Fallzahl erreicht (n=150 B-Zell-Patienten), liegt diese ungefähr in der Größenordnung des CYBA Effektes der Publikation von Wojnowski et al. [20]. So kann man z.B. Odds Ratios von 2,4 (25% vs. 45%) mit einer Power von 71% aufdecken. Die Fallzahl spielt dabei eher eine untergeordnete Rolle, jedoch ist die Größenordnung des Odds Ratios entscheidend. (Bsp.: bei 15% Unterschied des Effekts beträgt die Power lediglich 46%. Bei 180 Kontrollen statt 100, wäre die Power 79% statt 71% um 20% Unterschied aufzudecken.)

Nachdem das Matching abgeschlossen war, wurde von allen vorhanden sicheren Fällen (akut und chronisch) sowie den zugeordneten Kontrollen die genomische DNA aus dem Blut der Patienten isoliert. Zusätzlich wurde von allen Kontrollen, die einen normalen NT-proBNP-Wert aufwiesen, aber im Matching nicht ausgewählt wurden, die DNA isoliert.

6.10.7 Isolation genomischer DNA

Genomische DNA wurde mit Hilfe des Quiamp DNA-Blood Midi/Maxi Kit der Firma Qiagen entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert.

6.10.8 DNA-Sequenzierung

In unseren Untersuchungen sollten die genetischen Varianten von Dox-Transportern (MRP1, MRP2) sowie der NAD(P)H-Oxidase (RAC2, CYBA und NCF4) verifiziert werden, die bereits in der NHLB-Publikation mit einer erhöhten Inzidenz für Herzschäden assoziiert waren. Herr Dr. Toliat aus der Universität Köln (Cologne Center for Genomics (CCG)) führte für uns die Genotypisierung mittels Pyrosequenzierung im PSQ HS96A System durch. Die von ihm eingesetzten PCR-Primer (siehe Tab. 7) wurden mit der Software Primer SNP Design Version 1.01 (Biotage AB, Uppsala, Schweden) ausgewählt.

Die PCRs wurden in einem Reaktionsvolumen von 15 µl durchgeführt. Je Ansatz kamen 6 ng genomische DNA, 10 mM dNTP, 10 µM von jedem vorwärts und rückwärts abschreibenden PCR-Primer, 5 U/µl Taq Polymerase und 1,5 µl MgCl₂ (25 mM) zum Einsatz. Zusätzlich wurde ein interner Primer verwendet. Jede Probe wurde 1 fach mit Annealing-Puffer (20 mmol/l Tris-Acetat, 2 mmol/l Mg(Acetat)₂) und 2 fach mit Bindungswaschpuffer II pH 7.6 10 mmol/l Tris-HCl, 2 M NaCl, 1 mmol/l EDTA, 0,1% Tween 20) verdünnt. Außerdem erfolgte je Well die Zugabe von Streptavidin Sepharose Beads (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden), 0.2 M NaOH und 70% Ethanol. Anschließend wurde der PSQ HS96A SNP reagent kit (Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden) angewendet. Die Auswertung der Proben erfolgte unter Verwendung der Pyrosequenzierungs-Software (Pyrosequencing AB, Uppsala, Schweden).

Da insgesamt 3 Blutsammelaktionen durchgeführt wurden, sollte sichergestellt werden, dass es zu keiner Verwechslung der Probennummern im Laufe der Zeit gekommen war. Dafür standen uns von 8 Patienten sowohl aus der Sammelaktion von 2003 als auch von der aus 2008 Blut zur Verfügung. Da das genetische Muster über die Zeit konstant bleibt, konnte die Kontinuität der Proben überprüft werden.

Tab. 7: Primersequenzen und PCR-Bedingungen für den Pyrosequencing™ assay

SNP rs#ncbi	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')	Internal primer (5'–3')	PCR Bedingungen
RAC2 rs13058338	*GAGGCCTGGCCCTAGAAT	TCCTTTCTCACCCCCAAGT	CTGGGTTCCTTGAATG	95°C 5min, 45x(95°C 15s, 59°C 30s, 72°C 15s) 72°C 5min, hold at 4°.
NCF4 rs1883112	AATAAAGGTGGGGCTTGA	* CTCAGTTGGGTATCAGAAGC	GGTCACAAGACACCCT	95°C 5min, 45x(95°C 15s, 55°C 30s, 72°C 15s) 72°C 5min, hold at 4°.
MRP1 rs45511401	*AGCCAGGTGTGTTGTGTC	AGAGCAGGGACGACTTTC	ACCACGGCCACCAAAG	95°C 5min, 45x(95°C 15s, 55°C 30s, 72°C 15s) 72°C 5min, hold at 4°.
CYBA rs4673	GTTTTGTGGGAGGAAAGAGG	*CGGCCCCGAACATAGTAATTC	CCCCAGGGGACAG	95°C 5min, 45x(95°C 15s, 60°C 30s, 72°C 15s) 72°C 5min, hold at 4°.
MRP2 rs8187694	GCAGCGATTTCTGAAACACA	*CCTCCCACCGCTAATATCAA	TTCTGAAACACAATGAGG	95°C 5min, 45x(95°C 15s, 60°C 30s, 72°C 15s) 72°C 5min, hold at 4°.
MRP2 rs8187710	TGGTCCTAGACAACGGAAG	*CTAACCCATGGGGCCTTCT	CAACGGGAAGATTATAGAG	95°C 5min, 45x(95°C 15s, 60°C 30s, 72°C 15s) 72°C 5min, hold at 4°.

* biotinylierter Primer

7 Ergebnisse

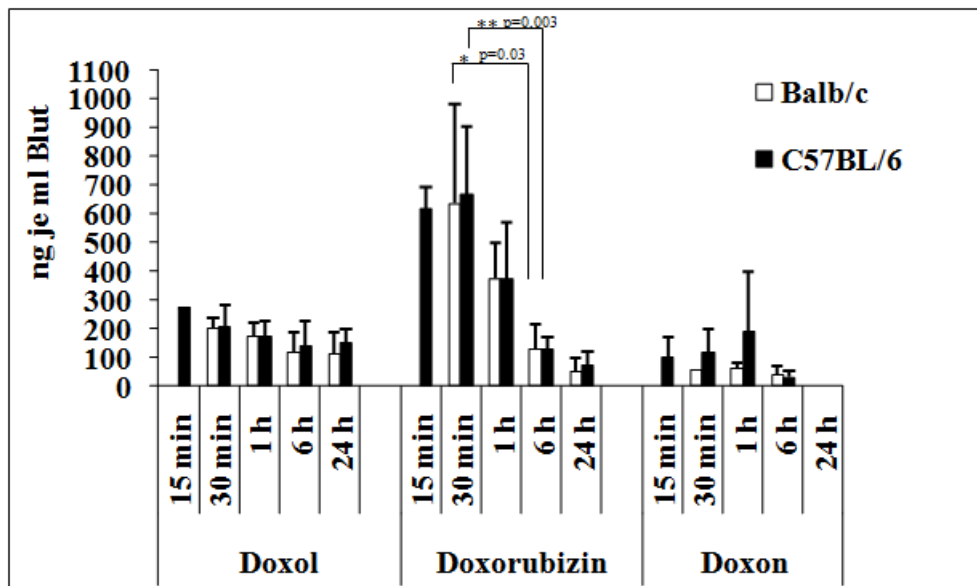
7.1 Quantitative Bestimmung von Dox und seiner Metabolite im Blut, Herz und in der Leber von verschiedener Mäusestämmen sowie die Bestimmung des oxidativen Stresses in den Herzen der Mäuse

In der Diplomarbeit von Silvia Seifert [66] konnte gezeigt werden, dass die beiden Wildtypmäusestämme C57BL/6 und Balb/c erhebliche Unterschiede in der Sensibilität auf Dox aufwiesen. In der vorliegenden Arbeit sollte jetzt untersucht werden, ob die unterschiedliche Sensitivität dieser beiden Mäusestämme auf Dox durch eine unterschiedliche Art der Metabolisierung erklärt werden kann. Hierzu wurden erneut C57BL/6- und Balb/c-Mäuse mit Dox behandelt und anschließend aus dem Blut, den Lebern und den Herzen die Dox-, Doxol- und Doxonkonzentrationen mittels HPLC quantifiziert.

7.1.1 Behandlung der C57BL/6- und Balb/c-Mäuse mit 12 mg Dox je kg Körpergewicht

In der ersten Versuchsserie wurden sowohl C57BL/6, als auch Balb/c-Mäuse mit 12 mg Dox pro kg KG behandelt. Diese hohe Dosis wurde gewählt, um die akute Toxizität von Dox untersuchen zu können und gleichzeitig die Unterschiede zwischen den beiden Stämmen zu verdeutlichen. Nach definierten Zeitpunkten wurden die Mäuse getötet und sowohl das Herz, die Leber als auch durch Punktion der Augenarterie das Blut entnommen. Nach Aufarbeitung der Gewebe wurden HPLC-Messungen durchgeführt. Es konnte bereits 30 min nach der i.p. Injektion ein kontinuierlicher Abfall der Dox-Konzentration im Blut gezeigt werden (siehe Abb. 12).

Abb. 12: HPLC-Untersuchungen des Blutes nach der Gabe von 12 mg Dox je kg KG



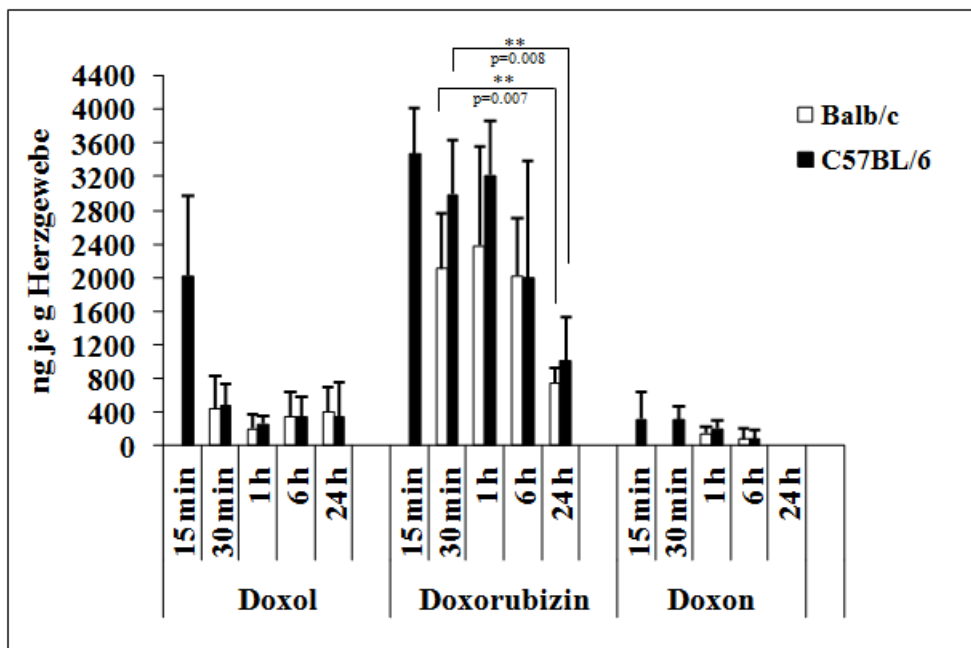
Je Zeitpunkt und Stamm wurde von je 4 Mäusen der Mittelwert der Dox-, Doxol- und Doxon-Konzentration im Blut dargestellt. (Ausnahme: für den 6 h-Wert der Balb/c-Mäuse standen nur 3 Mäuse zur Verfügung; für den 15 min Wert wurden nur 3 C57BL/6-Mäuse und keine Balb/c-Mäuse behandelt). Der Fehlerindikator ist als Standardabweichung dargestellt.

*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Bereits 6 h nach der i.p. Injektion war die Dox-Konzentration in beiden Stämmen signifikant niedriger als die Anfangskonzentration. Allerdings konnte auch noch 3 Tage nach der Injektion Dox nachgewiesen werden. Neben Dox konnten in beiden Mäusestämmen zwei weitere Metabolite nachgewiesen werden - Doxorubizinol (Doxol) und Doxorubizinon (Doxon). Während die Maximalkonzentration von Doxol bereits bei dem 1. Messzeitpunkt von 15 min erreicht war, konnte bei Doxon ein deutlicher Anstieg der Konzentration im Verlaufe der Zeit nachgewiesen werden. Doxon erreichte seine maximale Konzentration nach 1 h, die im weiteren Verlauf der Zeit schnell wieder abfiel. Bereits 6 h nach der Injektion waren massive Doxon-Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen sichtbar. Während in den Balb/c-Mäusen noch 68% der Maximalkonzentration an Doxon nachgewiesen werden konnten, war bei den C57BL/6-Mäusen nur noch 15% der Maximalkonzentration vorhanden. Weiterhin ist auffällig, dass die Konzentration beider Metabolite im Plasma der C57BL/6-Mäuse tendenziell höher war als in den Balb/c-Mäusen. Der Zeitpunkt, bei dem die beiden Stämme sich unterscheiden, ist jedoch abhängig vom jeweiligen Metabolit. Bei Doxol konnte erst 6 h nach der Dox-Injektion eine höhere Konzentration in den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden, während bei Doxon bereits ab dem 1. Messzeitpunkt eine höhere Konzentration nachweisbar war. Die Unterschiede zwischen den beiden Stämmen sind jedoch statistisch nicht signifikant und daher nur als Trend anzusehen.

Da in unseren Untersuchungen die Ursache der Kardiotoxizität von Dox näher erforscht werden sollte, wurde neben der Blutanalyse die Konzentration von Dox und seiner Metabolite im Herzgewebe durchgeführt. Bei den C57BL/6-Mäusen war bereits 15 min nach der i.p. Injektion die maximale Dox-Konzentration im Herzgewebe erreicht (siehe Abb. 13).

Abb. 13: HPLC-Untersuchung des Herzens nach der Gabe von 12 mg Dox je kg KG



Je Zeitpunkt wurden 4 Mäuse von jedem Stamm mit 12 mg Dox behandelt (Ausnahme: Für den Messzeitpunkt von 15 min wurden nur 3 C57BL/6-Mäuse und keine Balb/c-Mäuse behandelt). Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung. **: $p < 0,01$

Danach blieb die Dox-Konzentration bis zur Messung nach einer Stunde nahezu konstant um schließlich kontinuierlich abzufallen. Nach 24 h konnten nur noch 29% der Anfangskonzentration von Dox nachgewiesen werden. Bei den Balb/c-Mäusen wurde die maximale Dox-

Konzentration im Herzen erst 1 h nach der i.p. Injektion erreicht. Diese fiel dann bis zur Messung nach 24 h stetig ab. Zu diesem Zeitpunkt konnten nur noch 35% der Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. Im Unterschied zu der Messung im Blut konnte im Herzen erst 24 h (anstelle von 6 h im Blut) nach der i.p. Injektion eine signifikant geringere Konzentration an Dox im Vergleich zur Ausgangskonzentration nachgewiesen werden. Neben Dox konnten im Herzgewebe beider Mäusestämme Doxol und Doxon nachgewiesen werden. Die Doxolkonzentration sank bis zu dem 1 stündigen Messzeitpunkt stark ab. Die Doxolkonzentration war zwischen den beiden Mäusestämmen ähnlich, obgleich in den C57BL/6-Mäusen eine deutlich höhere Konzentration an Dox gemessen wurde. Daraus ergibt sich zu den Zeitpunkten 30 min und 24 h nach der i.p. Injektion ein deutlich höherer prozentualer Anteil von Doxol am Gesamtgehalt (Dox+Doxol+Doxon) in den Balb/c-Mäusen (siehe Tab. 8).

Tab. 8: Prozentualer Anteil der Metabolite am Gesamtgehalt Dox+Doxol+Doxon (je mol Substanz und Zeitpunkt) im Herzgewebe

	Doxol		Doxon	
	Balb/c	C57BL/6	Balb/c	C57BL/6
15 min	n.d.	34.2 %	n.d.	7.0 %
30 min	17.6 %	12.2 %	n.d.	10.5 %
1 h	7.4 %	7.0 %	6.9 %	7.0 %
6 h	14.1 %	14.1 %	4.0 %	4.1 %
24 h	35.4 %	25.2 %	n.d.	n.d.

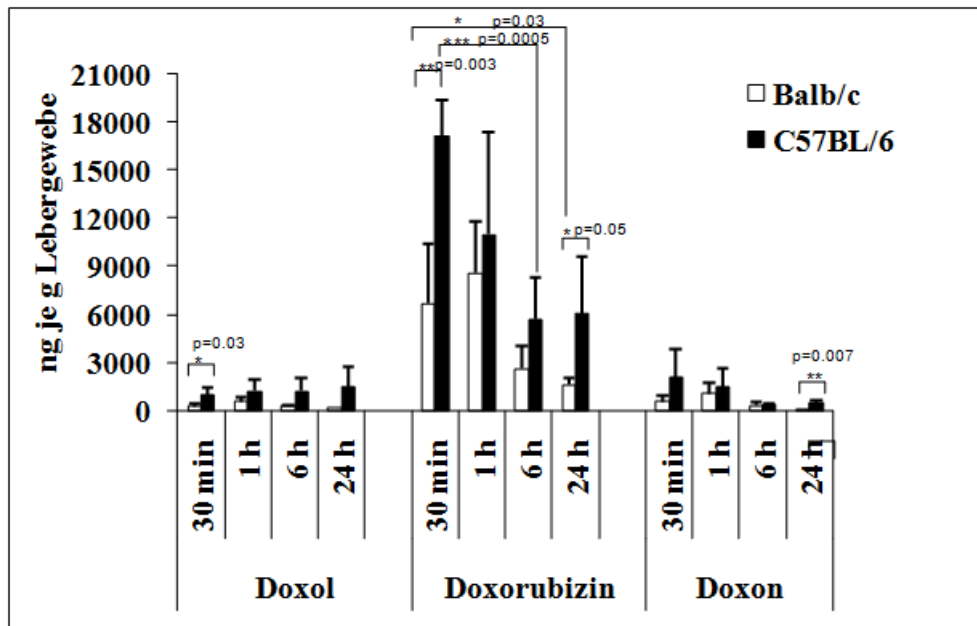
n.d.: nicht detektierbar

Doxon konnte im Herzgewebe der C57BL/6-Mäuse bereits direkt nach der i.p. Injektion nachgewiesen werden (15 min), während es in den Balb/c-Mäusen 1 h dauerte, bevor erstmalig Doxon nachweisbar war. Im Verlauf der Messung wurde dann bei beiden Mäusestämmen ein kontinuierlicher Abfall der Doxonkonzentration im Herzen nachgewiesen.

Vergleicht man die beiden Stämme untereinander, so ist die Konzentration von Dox bis zu dem 24 h Wert in den C57BL/6-Mäusen tendenziell höher. Bei den Metaboliten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mäusestämmen festgestellt werden. In den Herzen beider Mäusestämme wurde prozentual mehr Doxol als Doxon in Bezug auf die Gesamtmenge an Dox+Doxol+Doxon nachgewiesen. Damit konnte im Herzgewebe das Doxol als Hauptmetabolit von Dox identifiziert werden.

Das letzte von uns untersuchte Organ war die Leber. Zu den Zeitpunkten 30 min und 24 h nach der Injektion unterschieden sich die Dox-Konzentration der beiden Stämme signifikant voneinander. In den C57BL/6-Mäusen war bereits 30 min nach der i.p. Injektion die maximale Dox-Konzentration erreicht (siehe Abb. 14).

Abb. 14: HPLC-Untersuchung der Leber nach der Gabe von 12 mg Dox je kg KG



Je Zeitpunkt wurden 4 Mäuse von jedem Stamm mit 12 mg Dox behandelt (Ausnahme: Für den Messzeitpunkt von 6 h standen nur 3 Balb/c-Lebern zur Verfügung). Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

- * $p < 0,05$
- ** $p < 0,01$
- *** $p < 0,001$

Danach fiel die Dox-Konzentration kontinuierlich ab. In den Balb/c-Mäusen dauerte es 1 h, bevor die maximale Konzentration erreicht wurde. Anschließend fiel auch in diesem Mäusestamm die Konzentration kontinuierlich ab. In den Balb/c-Mäusen sank die Dox-Konzentration erst nach 24 h signifikant im Vergleich zur Ausgangskonzentration ab, während bei den C57BL/6-Mäusen bereits 6 h nach der Injektion hochsignifikante ($p < 0,001$) Unterschiede zur Ausgangskonzentration nachgewiesen werden konnten.

Neben Dox wurde in den Lebern beider Mäusestämme Doxol und Doxon nachgewiesen. Dabei war die Leber das einzige Organ, bei dem auch bei den Dox-Metaboliten signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen gezeigt werden konnten. Der Konzentrationsverlauf von Doxol in den C57BL/6-Mäusen unterschied sich stark von dem der Balb/c-Mäuse. In den Balb/c-Mäusen wurde 1 h nach der Injektion die doppelte Konzentration an Doxol im Vergleich zur Ausgangskonzentration nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Messung sank die Doxolkonzentration stetig. Damit entspricht der Konzentrationsverlauf von Doxol dem von Dox. In den C57BL/6-Mäusen wurde im Gegensatz dazu ein stetes ansteigen der Doxolkonzentration über die gesamte Messdauer beobachtet. Da die Dox-Konzentration bei den C57BL/6-Mäusen kontinuierlich über die Zeit absank, konnte gezeigt werden, dass die C57BL/6-Mäuse Dox zu einem größeren Ausmaß zu Doxol verstoffwechseln als die Balb/c-Mäuse (siehe auch Tab. 9). Für das Doxon konnte in der Leber der C57BL/6-Mäuse ein exponentieller Abfall der Konzentration nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde in den Balb/c-Mäusen 1 h nach der Injektion die maximale Doxonkonzentration gemessen. Anschließend sinkt auch in den Balb/c-Mäusen die Doxonkonzentration exponentiell ab.

Vergleicht man die beiden Stämme untereinander, so ist die absolute Konzentration von Dox, Doxol und Doxon in den Lebern der C57BL/6-Mäusen generell höher. Zu zwei Zeitpunkten unterschieden sich die Dox-Konzentrationen in den Lebern der beiden Mäusestämme signifikant voneinander. Die C57BL/6-Mäuse wiesen 30 min und 24 h nach der i.p. Injektion signifikant höhere Dox-Konzentrationen auf als die Balb/c-Mäuse. Bei Doxol wurde bereits nach 30 min ein signifikant höherer Gehalt in den C57BL/6-Mäusen ermittelt, während bei Doxon erst 24 h nach der Injektion ein signifikant höherer Gehalt in den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden konnte.

Betrachtet man die prozentualen Anteile von Doxon und Doxol am Gesamtgehalt (Dox+Doxol+Doxon) des jeweiligen Zeitpunktes fällt auf, dass kurz nach der Injektion beide Mäusestämme Dox ähnlich verstoffwechseln (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Prozentualer Anteil der Metabolite am Gesamtgehalt Dox+Doxol+Doxon (je mol Substanz und Zeitpunkt) in der Leber der Mäuse

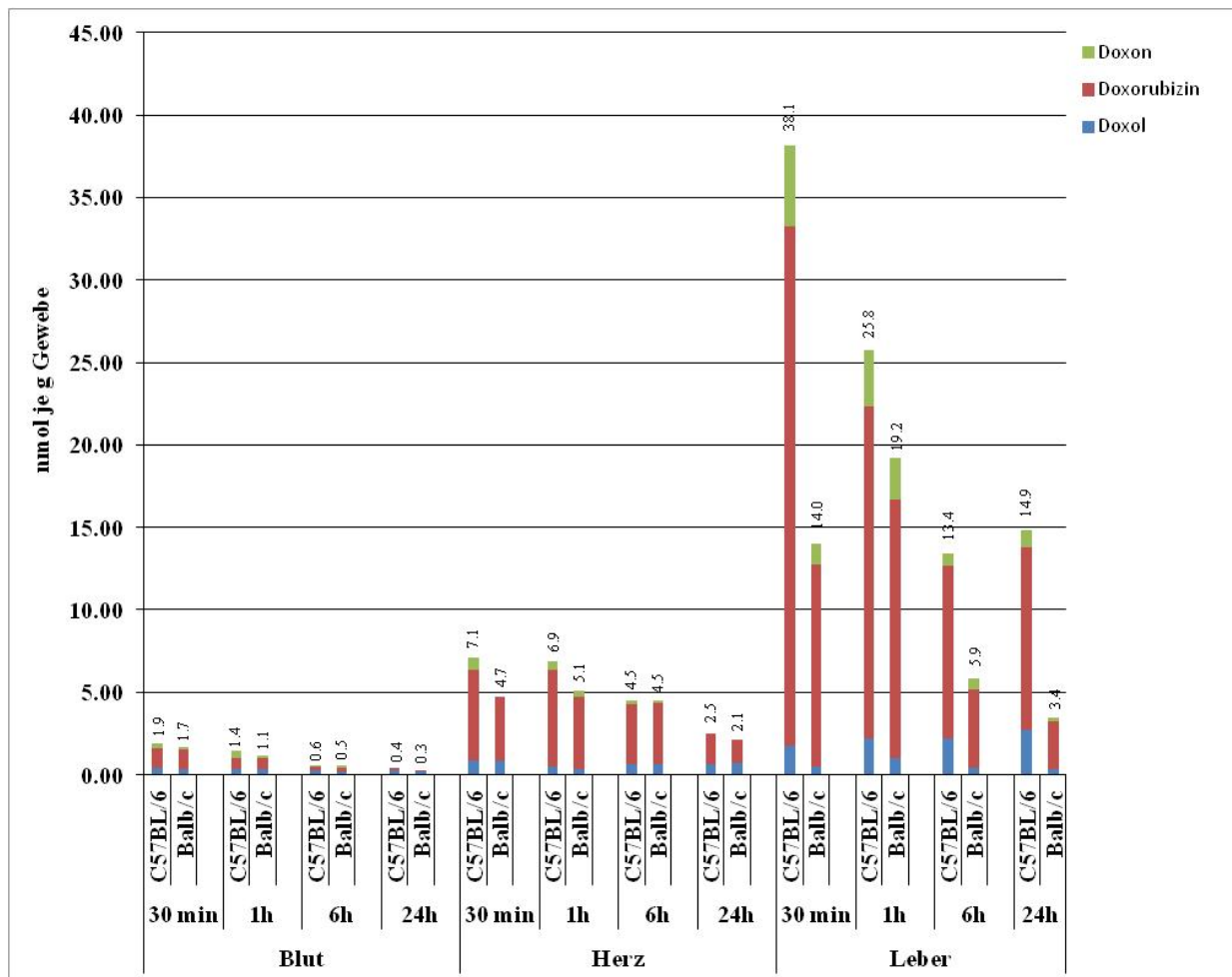
	Doxol		Doxon	
	Balb/c	C57BL/6	Balb/c	C57BL/6
30 min	3.5 %	4.5 %	8.9 %	12.9 %
1 h	5.1 %	8.4 %	12.9 %	13.4 %
6 h	7.6 %	16.5 %	11.4 %	5.8 %
24 h	9.4 %	18.1 %	5.7 %	7.1 %

Dabei wurde in der Leber beider Mäusestämme bis zu 1 h nach Beginn der Messung ein größerer Doxonanteil nachgewiesen, wodurch Doxon zu diesem Zeitpunkt als Hauptmetabolit identifiziert wurde. Jedoch 6 h nach der Injektion unterscheiden sich die Hauptmetabolisierungswege. In den C57BL/6-Mäusen wurde ein 2,5 fach so hoher Doxolanteil gegenüber dem Doxonanteil nachgewiesen, weshalb hier Doxol als Hauptmetabolit nachgewiesen wurde. Hingegen wurde in den Balb/c-Mäusen 6 h nach der Injektion ähnliche Doxol-/Doxonanteile nachgewiesen. Erst nach 24 h lässt sich in beiden Mäusestämmen die vermehrte Bildung von Doxol aus Dox nachweisen. Somit wird Dox in der Leber zunächst in Doxon und erst später in Doxol umgewandelt.

Organübergreifende Betrachtungen

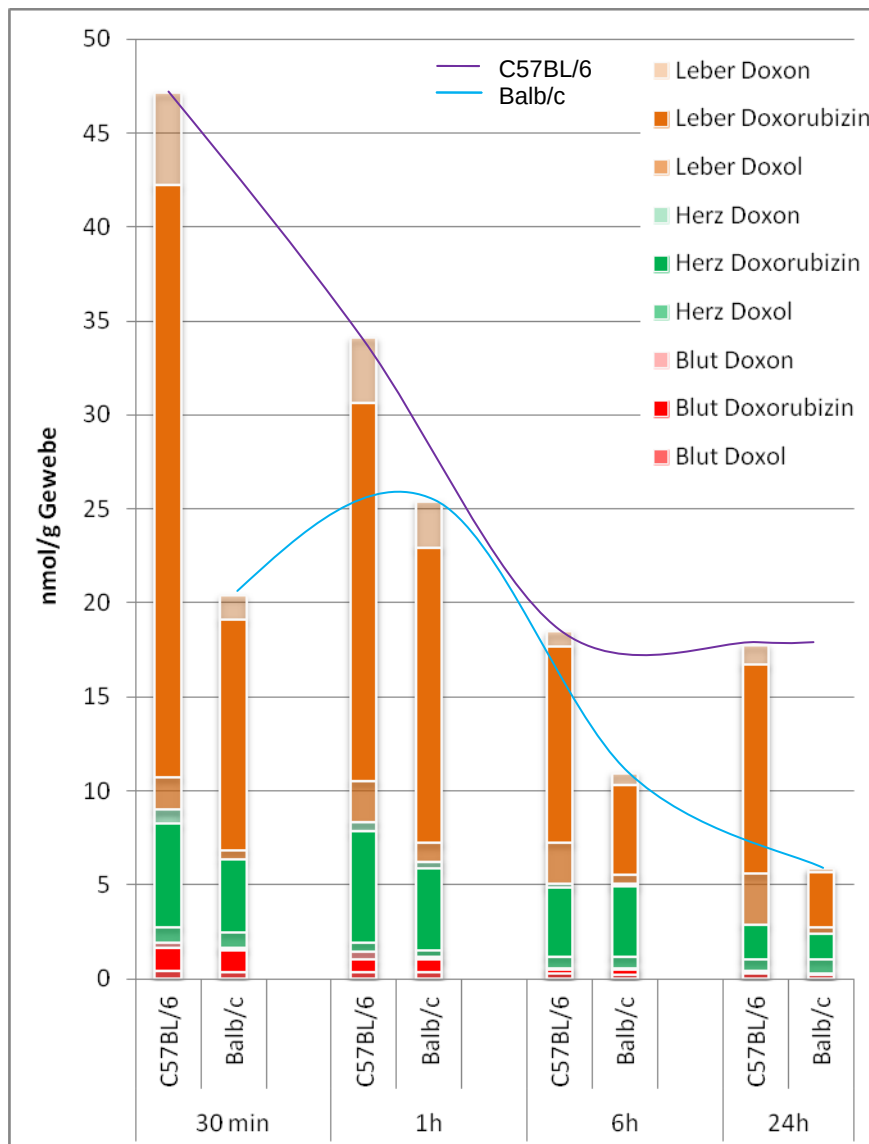
Addiert man je Zeitpunkt und untersuchtes Organ die nachgewiesenen Konzentrationen von Doxol+Dox und Doxon (bezogen auf nmol/g Gewebe) konnte gezeigt werden, dass bei beiden Mäusestämmen ähnliche Gesamtkonzentrationen im Blut vorlagen (siehe Abb. 15).

Abb. 15: Überblick über das Gesamtvorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Organ nach der Injektion von 12 mg Dox je kg KG



Aber bereits im Herz und besonders in der Leber ließen sich deutliche Unterschiede in den Gesamtkonzentrationen nachweisen. Dabei wurden stets höhere Werte in den C57BL/6-Mäusen, als in den Balb/c-Mäusen nachgewiesen (einzige Ausnahme: Herz 6 h: beide Mäusestämme wiesen den gleichen Wert auf). Dies ist besonders unerwartet, da beide Mäusestämme mit exakt den gleichen Mengen Dox behandelt wurden (mögliche Erklärungen siehe Diskussion 8.1.1). Addiert man anschließend die Gesamtkonzentrationen der drei untersuchten Organe je Zeitpunkt, wird der Unterschied zwischen den beiden Mäusestämmen noch deutlicher (siehe Abb. 16). Zu jedem gemessenen Zeitpunkt konnte in den drei untersuchten Organen eine größere Menge von Dox und seinen Metaboliten in den C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen nachgewiesen werden.

Abb. 16: Überblick über das Gesamtvorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Zeitpunkt



Addition der gefundenen Mengen an Dox+Doxol+Doxon (nmol) je g Gewebe. Eine dargestellte Säule entspricht der Gesamtmenge an Dox+Doxol+Doxon in Blut+Herz+Leber.

Außerdem ist auffällig, dass bei den Balb/c-Mäusen die maximal nachweisbare Gesamtkonzentration von Dox+Doxol+Doxon in den drei untersuchten Organen erst 1 h nach der i.p. Injektion nachweisbar war, während sie bei den C57BL/6-Mäusen schon nach 30 min erreicht war (Balb/c $t_{\max}$: 1 h versus C57BL/6 $t_{\max}$: 30 min). Mögliche Ursachen hierfür werden in der Diskussion (siehe 8.1.1) erörtert. Zusätzlich zum Unterschied von $t_{\max}$ ließ sich auch ein Unterschied von $c_{\max}$ zwischen den beiden Mäusestämmen feststellen. So konnte in den Balb/c-Mäusen nur 75% der maximal vorgefundenen Gesamtkonzentration der C57BL/6-Mäuse in den drei untersuchten Organen nachgewiesen werden. Außerdem sinken die Gesamtmengen von Dox und seiner Metabolite in den drei untersuchten Organen der Balb/c-Mäusen schneller im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen (nach 24 h: Balb/c: 23% von $c_{\max}$ versus C57BL/6: 39% von $c_{\max}$).

Aber auch die Summe jeder einzelnen Substanz (Dox, Doxol und Doxon) in den drei untersuchten Organen (z.B. $\text{Dox}_{\text{Herz}} + \text{Dox}_{\text{Leber}} + \text{Dox}_{\text{Blut}}$) ist zu fast allen Zeitpunkten in den

C57BL/6-Mäusen höher als in den Balb/c-Mäusen (siehe Anhang Tab. 25). Häufig waren die in den C57BL/6-Mäusen nachgewiesenen Mengen sogar um mehr als doppelte höher als in den Balb/c-Mäusen.

Betrachtet man anschließend die Verteilung von Dox und seiner Metabolite innerhalb dieser drei untersuchten Organe (siehe Anhang Tab. 25 und Tab. 26) lassen sich ebenfalls Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen feststellen.

Verteilung von Doxol:

Betrachtet man die Verteilung von Doxol innerhalb dieser 3 Organe, konnte gezeigt werden, dass in den C57BL/6-Mäusen der größte Anteil an Doxol in der Leber vorlag, während bei den Balb/c-Mäusen bis auf den 1 h Wert der Hauptteil im Herz detektiert wurde. Außerdem konnte ein steter Anstieg des Doxolanteils am jeweiligen Hauptanreicherungsort (innerhalb der drei untersuchten Organe) nachgewiesen werden (Ausnahme: bei den Balb/c-Mäusen fand dieser Anstieg erst ab dem 1 h-Wert statt). Hingegen sank in allen anderen Organen (C57BL/6: Herz und Blut; Balb/c: Leber und Blut) der Doxolanteil im Verlauf der Messung. Vergleicht man zwischen den beiden Mäusestämmen die Doxolanteile im Blut, so konnte in den Balb/c-Mäusen zu allen Zeitpunkten ein ca. doppelt so hoher Anteil im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Damit waren die Hauptverteilungsräume von Doxol in den Balb/c-Mäusen das Herz und das Blut, während es in den C57BL/6-Mäusen die Leber war.

Verteilung von Dox:

Die Verteilung von Dox in den drei untersuchten Organen ist in beiden Mäusestämmen ähnlich. In beiden Mäusestämmen wurde der größte Dox-Anteil in der Leber festgestellt. Dieser sinkt stetig bis zur Messung nach 6 h um anschließend wieder (um 16% C57BL/6) bzw. 22% (Balb/c) anzusteigen. Genau entgegengesetzt verhält sich der Dox-Anteil im Herzen. Bis 6 h nach der Injektion ist bei beiden Mäusestämmen ein steter Anstieg zu beobachten. Allerdings wurde in den Herzen der C57BL/6-Mäuse ein früherer Anstieg (C57BL/6: 1 h versus Balb/c: 6 h) des Dox-Anteils bezogen auf die Gesamtkonzentration in den drei Organen festgestellt. Außerdem verlief dieser Anstieg weniger steil als in den Balb/c-Mäusen. Im Blut beider Mäusestämme konnte eine kontinuierliche Abnahme des Dox-Anteils bezogen auf die Gesamtmenge Dox im Blut+Herz+Leber nachgewiesen werden. Vergleicht man jedoch die absoluten Dox-Anteile im Blut und Herzgewebe, so sind diese bis auf den 1 h-Wert bei den Balb/c-Mäusen 1,5 - 2 mal so hoch wie in den C57BL/6-Mäusen. Damit lässt sich zusammenfassen, dass für Dox der Hauptverteilungsraum in beiden Mäusestämmen die Leber gefolgt vom Herz und dem Blut identifiziert wurde. Lediglich die absoluten Werte unterschieden sich in den beiden Mäusestämmen.

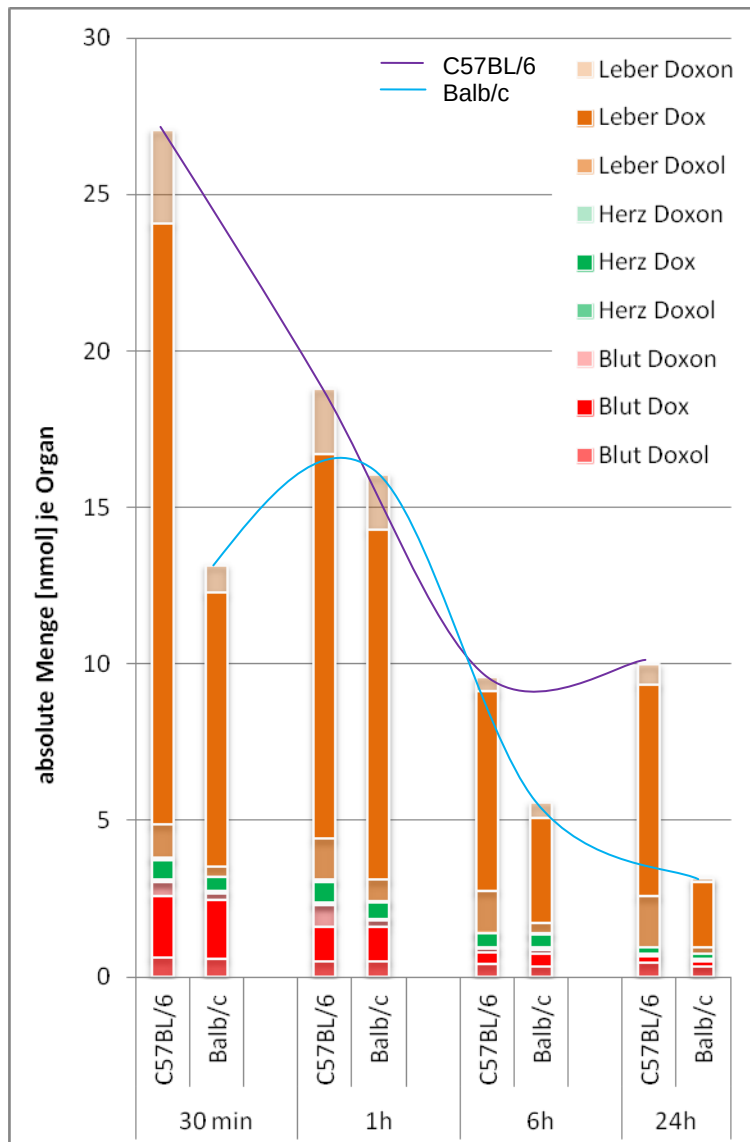
Verteilung von Doxon:

Generell ist festzuhalten, dass die Verteilung von Doxon innerhalb der drei untersuchten Organe der beiden Mäusestämmen sehr ähnlich war. In beiden Mäusestämmen wurde der Hauptanteil des Doxons in der Leber nachgewiesen. Bereits 30 min nach der Injektion war Doxon nachweisbar. Anschließend sank der Anteil in der Leber kontinuierlich. Mit Ausnahme des 6 h Wertes bei den Balb/c-Mäusen wurde bei den C57BL/6-Mäusen ein geringfügig höherer Anteil nachgewiesen. Im Gegensatz zur Leber konnte in den Herzen beider Mäusestämme ein Anstieg des Doxonanteils ab dem Messwert von 1 h nachgewiesen werden. Einziger Unterschied zwischen beiden Stämmen war, dass Doxon in den Herzen der C57BL/6-Mäuse früher nachgewiesen wurde als in den Balb/c-Mäusen. Nach 24 h konnte in beiden Herzen kein Doxon mehr nachgewiesen werden. Im Blut konnte in den Balb/c-Mäusen nach 30 min ein doppelt so hoher Doxonanteil wie in den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Damit lässt sich für Doxon zusammenfassen, dass dessen Hauptverteilungsraum innerhalb der drei untersuchten Organe die Leber ist (gefolgt vom Herz und dem Blut). Lediglich die absoluten Werte unterschieden sich in den beiden Mäusestämmen. Betrachtet man abschließend noch je nach untersuchtem Organ den vorliegenden Hauptmetaboliten von Dox, so konnte gezeigt

werden, dass im Blut und Herzgewebe bei beiden Mäusestämmen ein höherer Doxolanteil gegenüber dem Doxonanteil vorlag, während in den Lebern beider Mäusestämmen ein größerer Anteil an Doxon im Vergleich zum Doxol vorlag.

Schlussendlich ließen sich für die absoluten Mengen an Dox, Doxol und Doxon je gesamtes untersuchtes Organ (siehe Abb. 17) ähnliche Beobachtungen machen, wie bei den Untersuchungen in nmol je g Gewebe. Dabei wurden als Berechnungsgrundlage die Mittelwerte der Herz-/ Lebergewichte je Mäusestamm verwendet. Das Blutvolumen wurde bei beiden Mäusestämmen mit 1,6 ml je Maus definiert.

Abb. 17: Mengen an Dox, Doxol und Doxon je gesamtes untersuchtes Organ



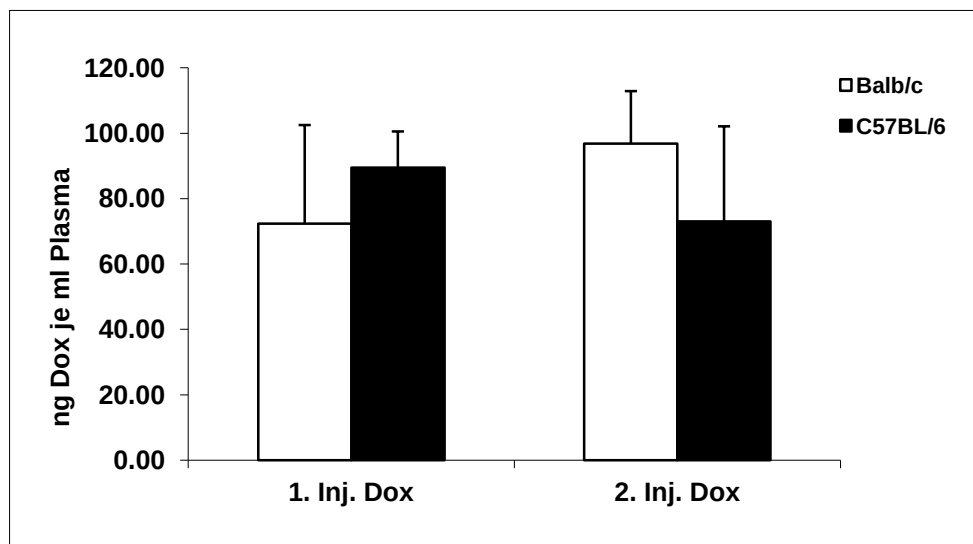
Addition der gefundenen Mengen an Dox+Doxol+Doxon (nmol) je untersuchtes Organ. Eine dargestellt Säule entspricht der Gesamtmenge an Dox+Doxol+Doxon in Blut+Herz+Leber.

7.1.2 Behandlung verschiedener Mäusestämmen mit 3 mg Dox je kg Körpergewicht

In dieser Versuchsserie sollte die chronische Dox-Toxizität untersucht werden. Hierfür wurden beide Mäusestämmen zeitversetzt mit 3 mg Dox je kg KG behandelt. Diese Dosis ist äquivalent zu der beim Menschen eingesetzten Chemotherapie-dosis. Ein Teil der Mäuse erhielt

nur 1 Injektion, der andere erhielt im Abstand von 1 Woche eine weitere Injektion mit Dox. Nach jeweils exakt 1 h wurden die Mäuse mittels Cervixdislokation getötet. Direkt danach erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des Herzens, sowie die Entnahme des Herzens und der Leber. Der Zeitpunkt von 1 h wurde ausgewählt, da aus den Untersuchungen mit 12 mg Dox bekannt war, dass zu diesem Zeitpunkt die höchste Dox-Konzentration im Herzen erwartet werden konnte. Somit bestand keine Gefahr, dass die Dox-Konzentration so niedrig ist, dass sie nicht mehr quantifiziert werden kann (kleiner als Bestimmungsgrenze). Im Blut beider Mäusestämme ließ sich ausschließlich Dox nachweisen. Bei den anderen beiden Metaboliten- Doxol und Doxon waren vermutlich die Konzentrationen zu gering, als dass sie quantifizierbar wären. Die beiden Mäusestämme wiesen ähnliche Dox-Gehalte im Blut auf (siehe Abb. 18). Dennoch wurde nach der 1. Injektion im Blut der C57BL/6-Mäuse ein geringfügig höherer Dox-Gehalt gemessen als in den Balb/c-Mäusen. Bei den Mäusen, die 2 Dox-Injektionen erhielten, zeigten die Balb/c-Mäuse einen etwas höheren Dox-Gehalt im Blut als die C57BL/6-Mäuse.

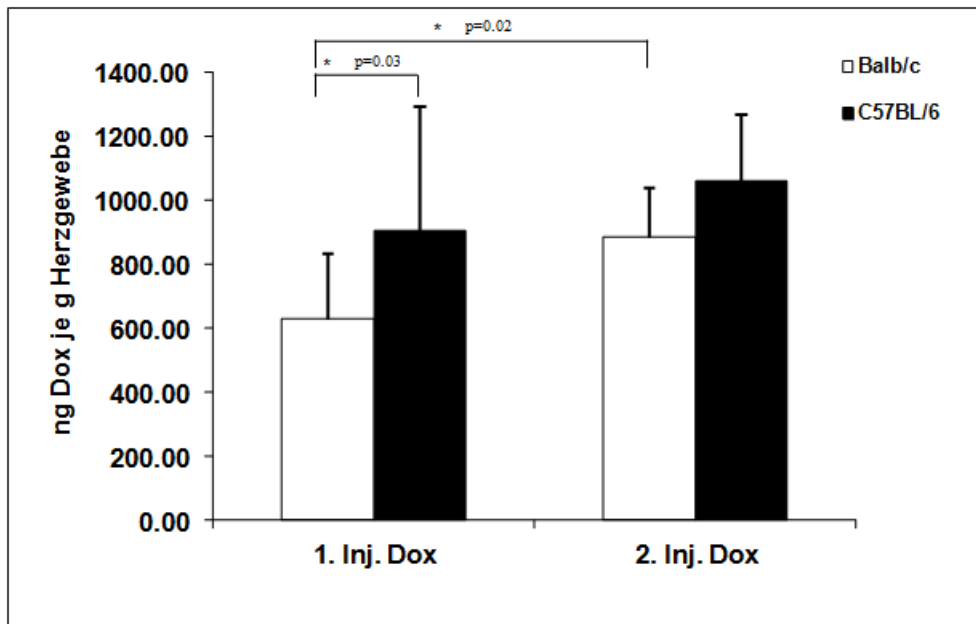
Abb. 18: HPLC-Untersuchung des Blutes nach der Gabe von 3 mg Dox je kg KG



6 Balb/c-Mäuse und 7 C57BL/6-Mäuse erhielten nur 1 Injektion mit 3 mg Dox je kg KG. Weitere 6 Mäuse je Stamm erhielten nach 1 Woche die zweite Dox-Injektion. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Bei der Analyse der Herzen konnte, ähnlich wie im Blut, nur Dox nachgewiesen werden. Es wurden jedoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen festgestellt (siehe Abb. 19). Die C57BL/6-Mäuse wiesen nach der 1. Dox-Injektion einen höheren Dox-Gehalt auf als die Balb/c-Mäuse.

Abb. 19: HPLC-Untersuchung des Herzens nach der Gabe von 3 mg Dox je kg KG

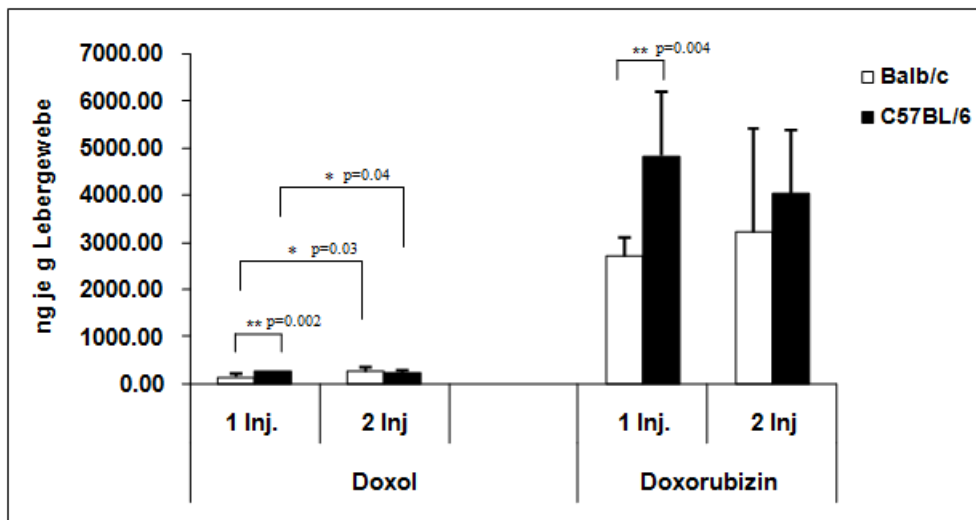


12 Balb/c-Mäuse und 10 C57BL/6-Mäuse erhielten nur 1 Injektion mit 3 mg Dox je kg KG. Von diesen erhielten 6 Mäuse je Stamm nach 1 Woche die zweite Dox-Injektion. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung. (*: $p < 0,05$)

Auch nach der 2. Injektion waren in den C57BL/6-Mäusen die Dox-Gehalte tendenziell höher als in den Balb/c-Mäusen. Bei beiden Mäusestämmen stieg im Vergleich zur 1. Injektion die Dox-Konzentration nach der 2. Injektion an. Bei den Balb/c-Mäusen ist dieser Anstieg signifikant. Dieser Befund ist umso bemerkenswerter, da beim Menschen in der Regel keine einmaligen Dox-Dosen verabreicht werden, sondern bei den meisten Therapieprotokollen eine wöchentliche Dox-Applikation erfolgt.

Bei der Vermessung der Lebergewebe konnte neben Dox auch der Metabolit Doxol nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen, wiesen die Lebern der C57BL/6-Mäuse nach der 1. Dox-Injektion signifikant höhere Gehalte an Dox und Doxol auf (siehe Abb. 20).

Abb. 20: HPLC-Untersuchung der Leber nach der Gabe von 3 mg Dox je kg KG



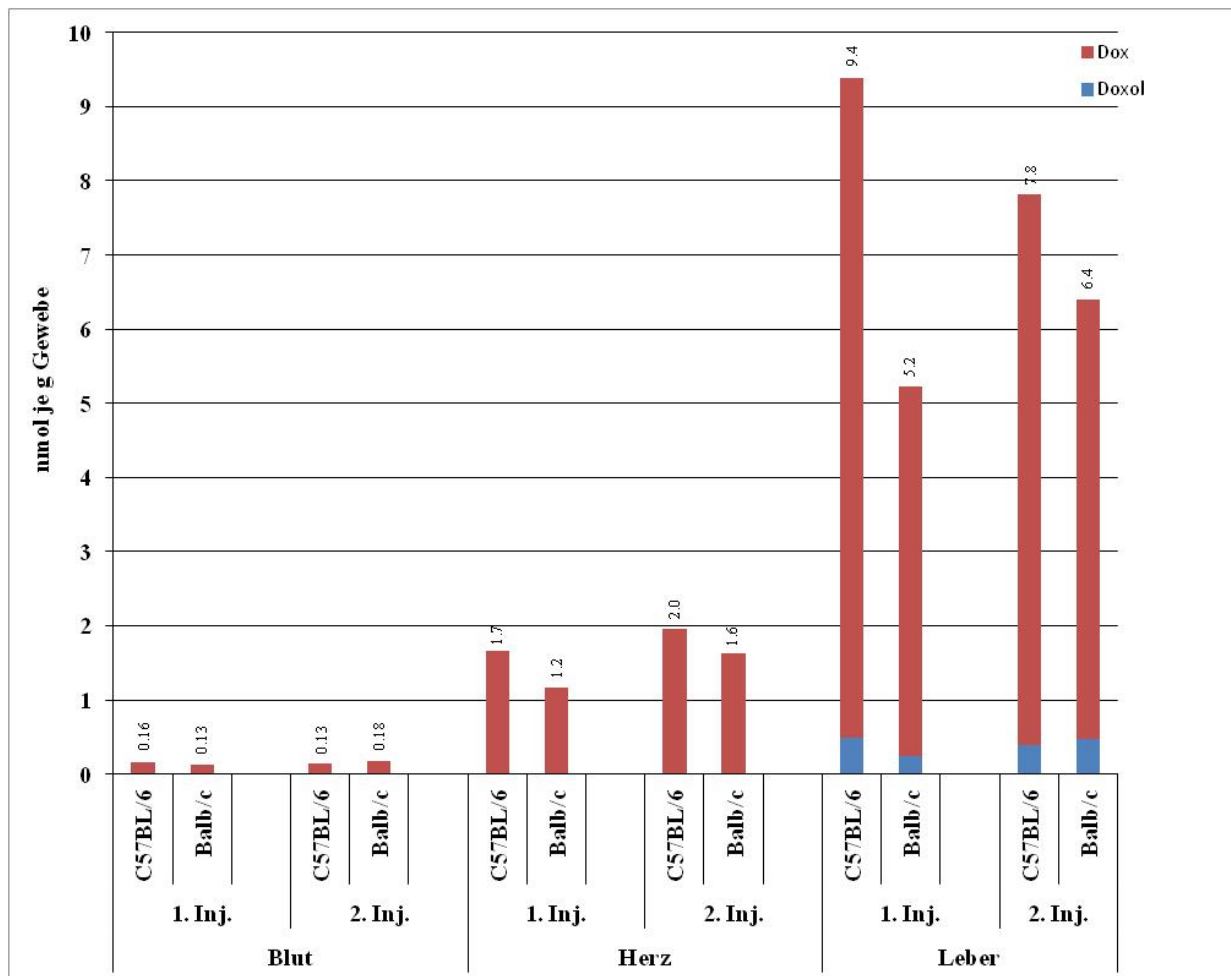
12 Mäuse pro Stamm erhielten 1 Injektion mit 3 mg Dox je kg KG. Von diesen erhielten 6 Mäuse je Stamm nach 1 Woche die zweite Dox-Injektion. (**: $p < 0,01$) Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Zusätzlich wurde bei den Balb/c-Mäusen ein signifikanter Anstieg der Doxolkonzentration zwischen der 1. und der 2. Injektion beobachtet, wohingegen die Doxolkonzentration bei den C57BL/6-Mäusen signifikant abfiel. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Dox-Gehalte zwischen der 1. und 2. Injektion nicht signifikant voneinander.

Organübergreifende Betrachtungen

Addiert man je Zeitpunkt und untersuchtes Organ die nachgewiesenen Konzentrationen von Doxol+Dox und Doxon (bezogen auf nmol/g Gewebe) konnte gezeigt werden, dass im Blut beider Mäusestämme nahezu identische Gesamtkonzentrationen vorlagen (siehe Abb. 21).

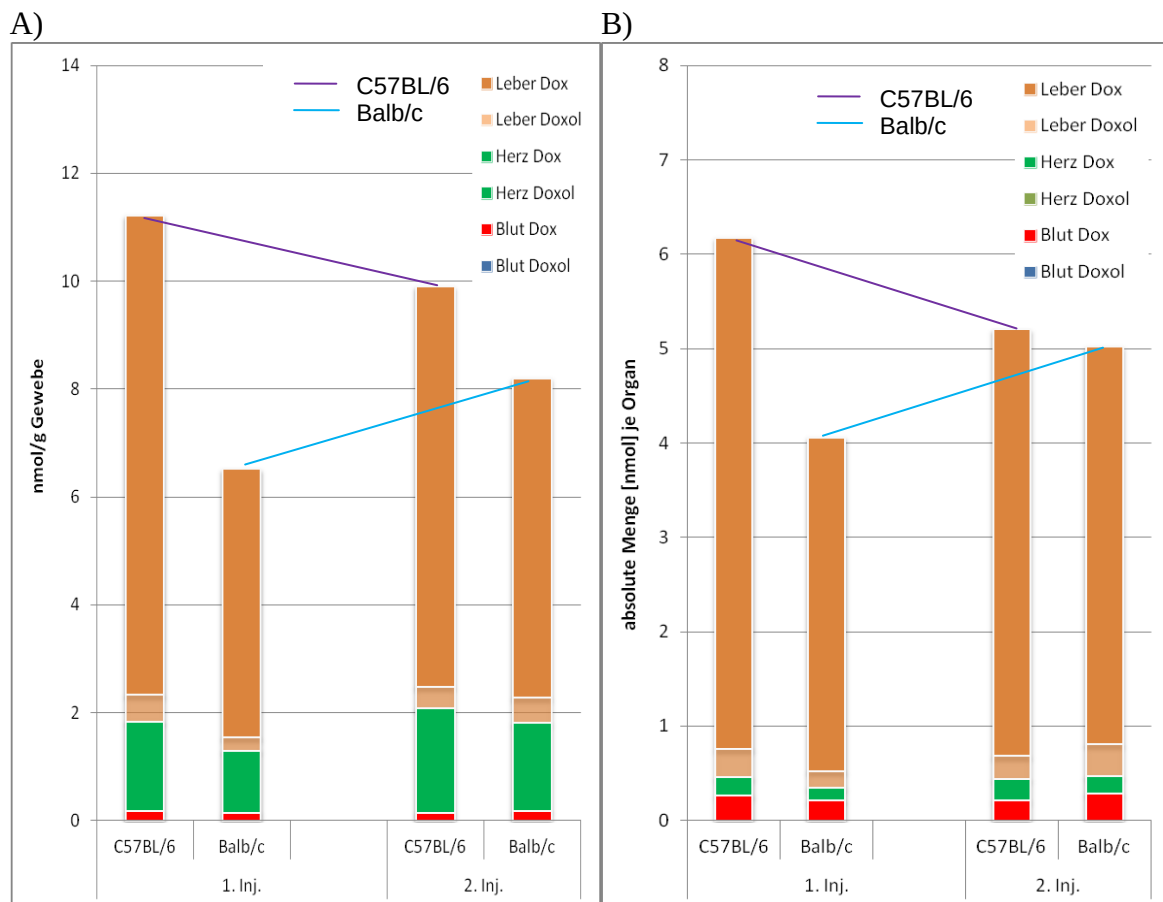
Abb. 21: Überblick über das Gesamtvorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Organ nach der Injektion von 3 mg Dox je kg KG



Hingegen ließen sich in den Herzen und den Lebern der C57BL/6-Mäuse stets höhere Gesamtkonzentrationen an Dox und Doxol nachweisen im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen (siehe Abb. 22). Damit stimmen die Ergebnisse aus der Versuchsserie mit 3 mg Dox je kg KG mit den Ergebnissen von 12 mg Dox je kg KG überein. In den von uns untersuchten Organen konnte in den C57BL/6-Mäusen im Herz und in der Leber eine höhere Gesamtkonzentration an Dox und seinen Metaboliten nachgewiesen werden, während sich das Blut beider Mäusestämme kaum voneinander unterscheidet. Bemerkenswert an der Versuchsserie mit 3 mg je kg KG ist, dass zwischen der 1. und der 2. Injektion die Gesamtmengen an Dox und seinen Metaboliten in den untersuchten Organen der C57BL/6 Mäuse absinkt, während sie bei den Balb/c-Mäusen leicht ansteigt.

Um die Verteilung von Dox innerhalb der drei untersuchten Organen zu beurteilen, wurde die gefundene Menge an Dox (ng/g Gewebe bzw. ng / gesamtes untersuchtes Organ) je Organ summiert und als 100% definiert (siehe Anhang Tab. 27). Die nachgewiesene Menge im Herz, im Blut und in der Leber waren x% von der Gesamtmenge. Ähnlich wie bei der Applikation von 12 mg Dox wurde auch bei der Gabe von 3 mg Dox je kg KG in den Balb/c-Mäusen ein etwas höherer Dox-Anteil im Blut und im Herzen nachgewiesen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen. Nach der 2. Injektion glich sich dieser Unterschied im Herzen jedoch nahezu wieder aus. Dagegen wurde im Blut der C57BL/6-Mäuse ein geringerer Abfall des Dox-Anteils beobachtet, wohingegen bei den Balb/c-Mäusen der Anteil steigt.

Abb. 22: Überblick über das Gesamtvorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Zeitpunkt und untersuchtem Organ in A) ng/g Gewebe und B) absolute Menge in nmol je gesamtes Organ



Addition der gefundenen Mengen an Dox+Doxol+Doxon (nmol) je g Gewebe bzw. je untersuchtes Organ. (Berechnungsgrundlage für die Organgewichte: Mittelwerte der Herz-/ Lebergewichte je Mäusestamm). Das Blutvolumen wurde bei beiden Mäusestämmen mit 1,6 ml je Maus definiert). Eine dargestellt Säule entspricht der Gesamtmenge an Dox+Doxol+Doxon in Blut+Herz+Leber.

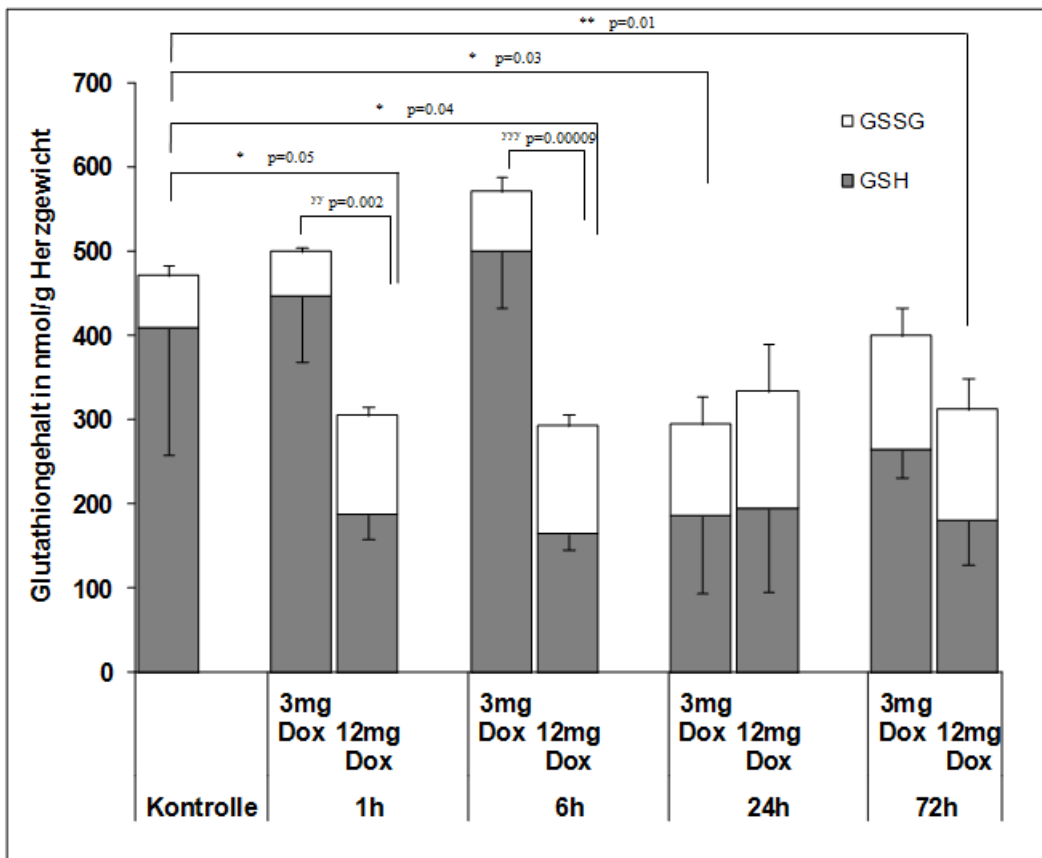
7.1.3 Bestimmung des oxidativen Stresses in den Mäuseherzen durch die Messung des GSH / GSSG-Gehaltes unter Verwendung von DTNB

Neben der Konzentrationsbestimmung von Dox und seiner Metabolite in den verschiedenen Mäusestämmen, sollte der Dox-induzierte oxidative Stress im Herzen ermittelt werden. Hierfür wurden die GSH / GSSG-Konzentrationen im Herzen bestimmt. Der oxidative Stress ist dabei umso größer, je größer die GSSG-Konzentration ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Injektion von 3 mg Dox pro kg KG nach 24 h eine signifikante Reduktion des Gesamt-Glutathionwertes gegenüber den Kontrollmäusen verursacht (siehe Abb. 23). Wurde die Dosis von Dox von 3 auf 12 mg erhöht, konnte bereits 1 h nach der Injektion eine deutliche Absenkung der Glutathionkonzentration gegenüber den Kontrollmäusen beobachtet werden. Damit konnte ähnlich wie in den HTETOP-Zellen (siehe 4.2.4) das Absinken der Glutathionkonzentration nach der Gabe von Dox im Herzen nachgewiesen werden.

Besonders interessierten uns jedoch GSSG-Konzentrationen, da mit diesen der oxidative Stress im Herzen nachgewiesen werden konnte. Die Gabe von 3 mg/kg KG Dox führte 24 h

und 72 h nach der Injektion zu einer signifikanten Erhöhung der GSSG-Konzentration ($p<0,006$) im Vergleich zu den Kontrollmäusen.

Abb. 23: Bestimmung des GSH / GSSG-Gehaltes in C57BL/6-Mäusen



Je Behandlungsgruppe (Kontrolle, 3 mg/kg KG Dox, 12 mg/kg KG Dox) und Zeitpunkt (1, 6, 24, 72 h) wurden 5-10 C57BL/6-Mäuse behandelt. Die Fehlerindikatoren wurden bei dem GSH-Anteil nach unten und bei dem GSSG-Anteil nach oben dargestellt und repräsentieren die Standardabweichung. Eine Säule entspricht dem gesamten Glutathiongehalt (GSH+GSSG) je g Herzgewicht. (*: $p<0,05$ Gesamt-Glutathion im Vergleich zur Kontrolle; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$ und ****: $p<0,001$ Gesamt-Glutathion 3 mg versus 12 mg Dox je Zeitpunkt).

Bei der Injektion von 12 mg/kg KG Dox wurde bereits nach 1 h und jedem folgenden Zeitpunkt (6 h, 24 h und 72 h) eine signifikante Erhöhung der GSSG-Konzentration gegenüber den Kontrollmäusen festgestellt ($p<0,006$). Bei dem Vergleich von 3 mg versus 12 mg Dox konnte nach 1 h und 6 h ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden ($p<0,002$). Bis 24 h nach der Injektion von 3 mg Dox je kg KG stiegen die prozentualen GSSG-Gehalte am Gesamt-Glutathiongehalt kontinuierlich an (siehe Tab. 10).

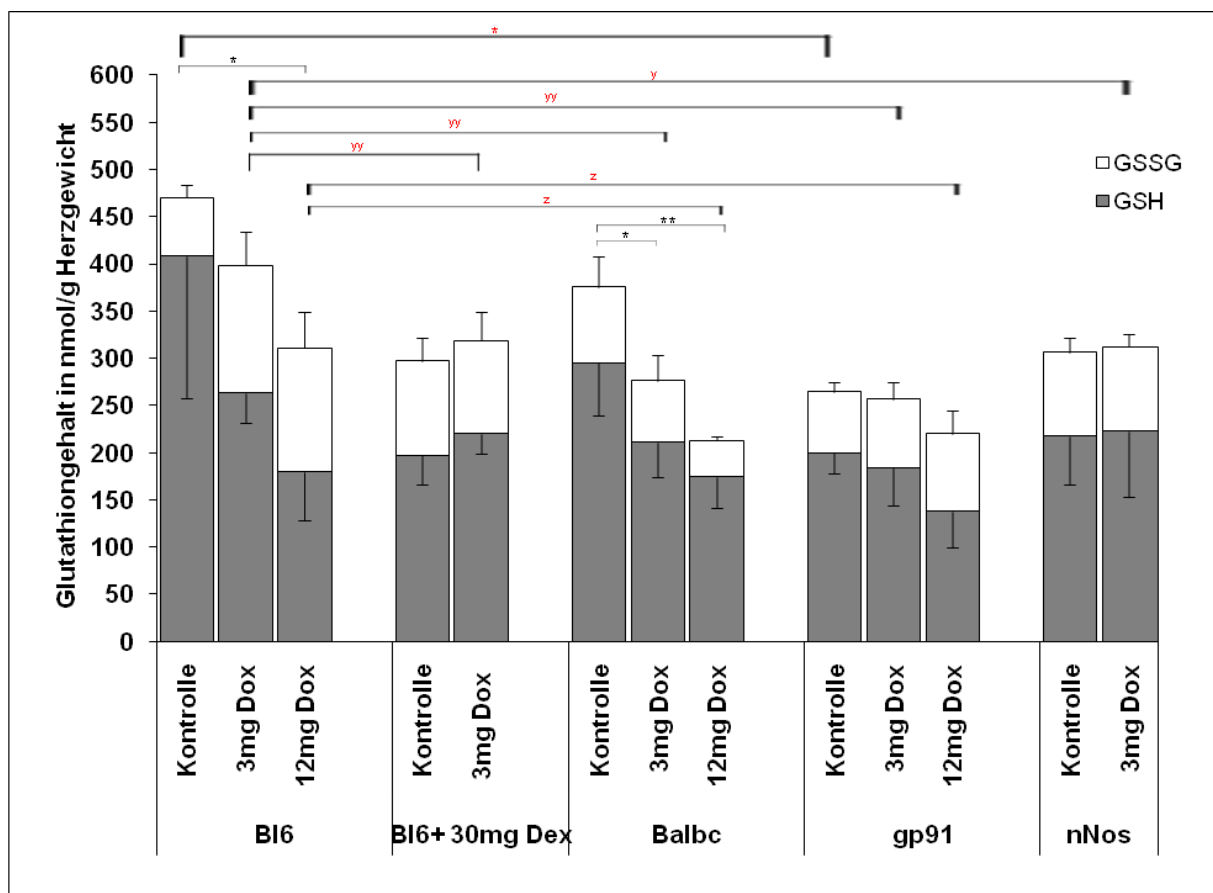
Tab. 10: Prozentualer GSSG-Anteil am Gesamt-Glutathiongehalt im Herzen der C57BL/6-Mäuse

	3 mg Dox	12 mg Dox
Kontrolle	13,2%	
1 h	10,9%	38,6%
6 h	12,5%	44,0%
24 h	37,4%	41,6%
72 h	34,0%	42,4%

Bei 12 mg Dox je kg KG ließ sich im Gegensatz zu den 3 mg Dox der GSSG-Anteil im Verlauf der Messung nur noch minimal steigern.

Als nächstes sollten die GSH / GSSG-Konzentrationen in den beiden Wildtypmäusestämmen C57BL/6 und Balb/c verglichen werden, um den Einfluss von ROS auf die unterschiedliche Sensitivität der beiden Mäusestämmen auf Dox zu untersuchen. In unseren Versuchen wurde in den C57BL/6-Mäusen (wie in dem Zeitverlauf siehe Abb. 23) ein kontinuierliches Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration mit steigenden Dox-Konzentrationen beobachtet (siehe Abb. 24).

Abb. 24: Bestimmung der GSH / GSSG-Gehalte in verschiedenen Mäusestämmen



Je Mäusestamm (C57BL/6, Balb/c, gp91, nNos) und Behandlungsgruppe (Kontrolle, 3 mg und 12 mg Dox je kg KG i.p.) wurden 3-10 Tiere behandelt. 6 C57BL/6-Mäuse erhielt eine Präinkubation mit Dex. Die Tötung erfolgte 72 h nach der Dox-Injektion. Die Fehlerindikatoren wurden bei dem GSH-Anteil nach unten und bei dem GSSG-Anteil nach oben dargestellt

und repräsentieren die Standardabweichung. Eine Säule entspricht dem gesamten Glutathiongehalt (GSH+GSSG) je g Herzgewicht

*: $p < 0,05$ beim Vergleich innerhalb eines Stammes mit deren Kontrollmäusen

^{x,y,z}: $p < 0,05$; ^{xy}: $p < 0,01$ beim Vergleich einer Behandlungsart mit den Werten der C57BL/6-Mäuse, dabei war **x** der Vergleich mit der Kontrolle, **y** der Vergleich mit der 3 mg Dox je kg KG Behandlung und **z** der Vergleich mit der 12 mg Dox je kg KG

Zeitgleich wurde ein signifikant höherer GSSG-Gehalt ($p < 0,0005$) nach der Behandlung mit 3 bzw. 12 mg Dox je kg KG im Vergleich zur Kontrolle (=unbehandelte C57BL/6-Maus) beobachtet, was auf eine Erhöhung des oxidativen Stresses hindeutet.

Überraschenderweise wurde in den C57BL/6-Mäusen durch die alleinige i.p. Injektion von Dex ein signifikant höherer GSSG-Gehalt ($p < 0,05$) im Vergleich zu Kontrollmäusen induziert. Jedoch führte die Kombinationstherapie von Dox+Dex zu einem geringeren GSSG-Gehalt (27%) im Vergleich zur alleinigen Gabe von Dox. Zusätzlich konnte bei der Gabe von Dex eine drastische Reduktion der Gesamt-Glutathionmenge gegenüber der C57BL/6-Kontrolle und der alleinigen Behandlung mit Dox festgestellt werden. Hierbei war der Unterschied zwischen der alleinigen Gabe von 3 mg/kg KG Dox und der Gabe von 3 mg/kg KG Dox+Dex hochsignifikant ($p = 0,004$). Betrachtet man daraufhin den prozentualen GSSG-Anteil am Gesamt-Glutathiongehalt, wurde durch die Gabe von Dex der GSSG-Anteil im Vergleich zu Kontrollmäusen erhöht. Die prozentualen GSSG-Anteile der Gruppen Dox versus Dox+Dex unterschieden sich hingegen nur geringfügig (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Prozentualer Anteil von GSSG am Gesamt-Glutathiongehalt

	C57BL/6	C57BL/6+ 30 mg Dex	Balb/c	gp91	nNos
Kontrolle	13,2%	33,6%	21,4%	24,5%	29,0%
3 mg Dox	34,0%	31,0%	23,7%	28,2%	28,7%
12 mg Dox	42,4%	-	18,2%	37,4%	-

In den Balb/c-Mäusen wurde ähnlich wie in den C57BL/6-Mäusen ein signifikantes Absinken der Glutathionkonzentration mit steigenden Dox-Konzentrationen beobachtet. Aber sowohl der absolute Glutathiongehalt war in den Balb/c-Mäusen signifikant niedriger als in den C57BL/6-Mäusen (C57BL/6 versus Balb/c nach 3 mg Dox: $p = 0,0006$; C57BL/6 versus Balb/c nach 12 mg Dox: $p = 0,01$), als auch der absolute GSSG-Gehalt (3 mg / 12 mg Dox: $p < 0,05$). Ebenso betrug der prozentuale GSSG-Anteil nach der Gabe von 3 mg bzw. 12 mg/kg KG Dox beachtenswerter Weise nur 70% (bei 3 mg Dox) und 43% (bei 12 mg Dox) des gemessenen Anteils bei den C57BL/6-Mäusen. Damit konnte ein niedrigerer oxidativer Stress in den Herzen der Balb/c-Mäuse nachgewiesen werden.

Auch von der Untersuchung der gp91-Mäuse haben wir uns wichtige Erkenntnisse über die Entstehung des oxidativen Stresses erhofft, da bei diesen Mäusen die Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase ausgeschaltet wurde. In den gp91-Mäusen wurde ein signifikant niedriger Glutathiongehalt als in den C57BL/6-Mäusen der jeweiligen Behandlungsgruppe nachgewiesen. Bemerkenswert an diesem Mäusestamm war, dass die Injektion von 3 mg Dox je kg KG nicht wie üblich zu einer Erhöhung der GSSG-Konzentration führte, sondern dass die GSSG-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle nahezu konstant blieb. Außerdem war die gemessene GSSG-Konzentration bei dieser Dox-Konzentration signifikant niedriger, als bei den C57BL/6-Mäusen. Hinzu kam, dass es in diesem Mäusestamm zu keinem Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration nach der Gabe von Dox kam. Erst durch die Gabe von 12 mg Dox je kg KG wurde auch in den gp91-Mäusen ein Anstieg der GSSG-Konzentration beobachtet, wodurch eine Zunahme des oxidativen Stresses nachgewiesen werden konnte. Diese

GSSG-Konzentration war aber immer noch niedriger als bei den C57BL/6-Mäusen, die mit 12 mg Dox behandelt wurden ($p=0,067$).

In den nNOS- Knockoutmäusen wurde bereits in den Kontrollmäusen ein signifikant höherer GSSG-Gehalt als in den C57BL/6-Kontrollen nachgewiesen. Durch die Gabe von 3 mg Dox je kg KG ließ sich jedoch dieser GSSG-Gehalt nicht weiter erhöhen und war insgesamt niedriger als bei den C57BL/6-Mäusen. Der Gesamt-Glutathiongehalt war in diesen Mäusen ebenfalls niedriger als in den C57BL/6-Mäusen (bei der Gabe von 3 mg Dox war der Unterschied sogar signifikant kleiner).

Bei der stammübergreifenden Betrachtung, wiesen alle untersuchten Kontrollmäuse der verschiedenen Behandlungsgruppen (C57BL/6+Dex, Balb/c, gp91 und nNos) einen höheren prozentualen GSSG-Anteil (am gesamten Glutathiongehalt) im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen auf. Wurde den Mäusen jedoch Dox (3 bzw. 12 mg je kg KG) verabreicht, konnte in allen anderen untersuchten Mäusestämmen ein niedrigerer GSSG-Anteil als in den C57BL/6-Mäusen gemessen werden.

7.2 Einfluss des oxidativen Stresses auf die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Toxizität in den HTETOP-Zellen

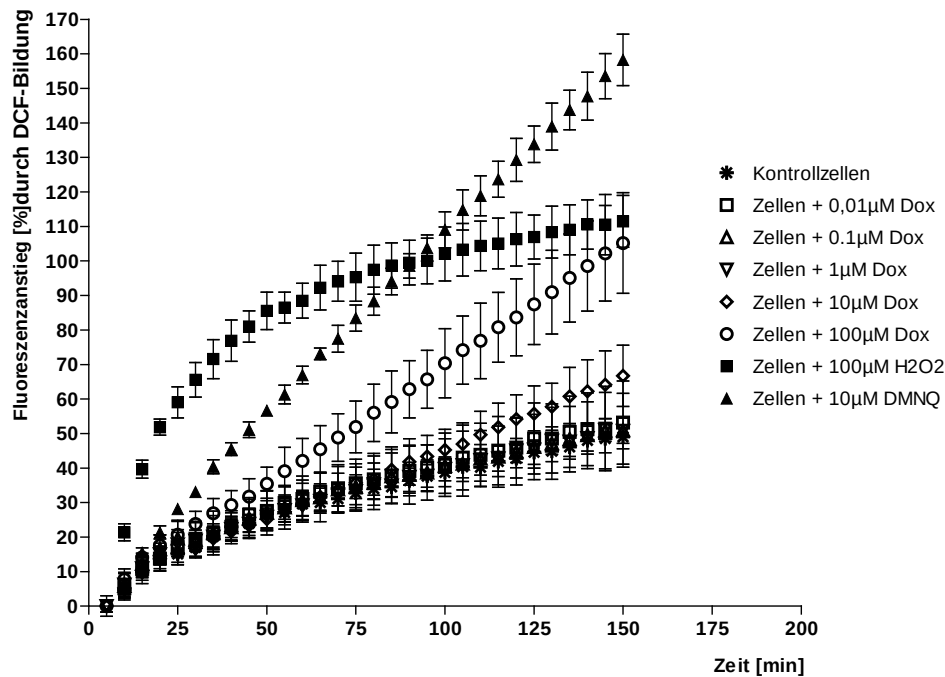
In dieser Arbeit sollte der Einfluss von ROS auf die Dox-induzierte Toxizität untersucht werden. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf klinisch relevante Dox-Dosen gerichtet werden. Außerdem sollte herausgefunden werden, welche Rolle die Topo II α bei der Entstehung von ROS spielt.

7.2.1 Messungen mit dem Fluoreszenzmarker H₂DCFDA

Zur Bestimmung des oxidativen Stresses wurde zunächst der Fluoreszenzmarker H₂DCFDA verwendet. Um sicher zu gehen, dass H₂DCFDA nur durch oxidativen Stress in DCF umgewandelt wird und nicht durch Dox selbst oxidiert werden kann, wurde Dox in Abwesenheit von Zellen mit H₂DCF versetzt. Die Herstellung von H₂DCF erfolgte nach der Methode von Cathcart [76]. Es konnte gezeigt werden, dass es trotz steigender Dox-Konzentrationen (in Abwesenheit von Zellen) zu keinem Anstieg der Fluoreszenz und damit zu keiner Reaktion zwischen Dox und H₂DCF kam.

Als Positivkontrolle wurde 100 μ M H₂O₂-Lösung bzw. 10 μ M DMNQ-Lösung verwendet. Sowohl H₂O₂ als auch DMNQ (bekannte Induktoren des oxidativen Stresses) führten zu einem steilen Anstieg der Fluoreszenz (siehe Abb. 25). Somit war H₂DCFDA in unserem Versuchsaufbau geeignet, oxidativen Stress nachzuweisen. In unseren Experimenten wurden HTETOP-Zellen für insgesamt 2 h mit steigenden Konzentrationen an Dox behandelt. Lediglich bei unphysiologisch hohen Konzentrationen an Dox (100 μ M) konnte in dieser Zeit ein deutlicher oxidativer Stress nachgewiesen werden. Bei 10 μ M Dox konnte zeitverzögert (1½ h nach Inkubationsstart) ein leichter Anstieg der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dagegen wurde bei den niedrigeren Dox-Konzentrationen (0,01 μ M und 0,1 μ M) kein Unterschied zu den unbehandelten Zellen nachgewiesen.

Abb. 25: Bestimmung des oxidativen Stresses unter Verwendung von H_2DCFDA nach der Gabe von verschiedenen Konzentrationen an Dox



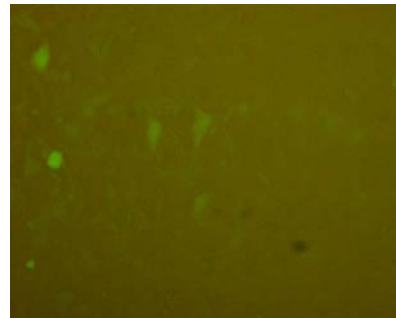
Nach Starten der Reaktion wird durch oxidativen Stress nicht fluoreszierendes H_2DCF in fluoreszierendes DCF umgewandelt. Daraus ergibt sich ein Fluoreszenzunterschied zwischen dem jeweiligen Messpunkt und dem Ausgangsmesswert. In der Darstellung wurde der prozentuale Anteil der errechneten Messdifferenz (Messzeitpunkt minus Ausgangsmesswert der jeweiligen Behandlungsgruppe) am Ausgangsmesswert dargestellt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus 3 separaten Versuchen dar. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Der durch die Applikation von 100 µM Dox induzierte oxidative Stress konnte ebenfalls durch Messungen mit dem Fluoreszenzmikroskop verifiziert werden (siehe Abb. 26). Die Zellen waren deutlich grüner gefärbt als die Kontrollzellen, wobei die grüne Färbung das gebildete DCF anzeigt. In der Positivkontrolle (100 µM H_2O_2) konnte bereits 5 min nach Inkubationsbeginn eine deutliche DCF-Bildung nachgewiesen werden. Nach 30 min intensivierte sich die Grünfärbung der Zellen. Zusätzlich wurde nach 30 min eine deutliche Zerstörung der Zellmembranen durch die 100 µM H_2O_2 -Lösung beobachtet. Die Zellen wurden mit einer 200 fachen Vergrößerung des Fluoreszenzmikroskopes beurteilt.

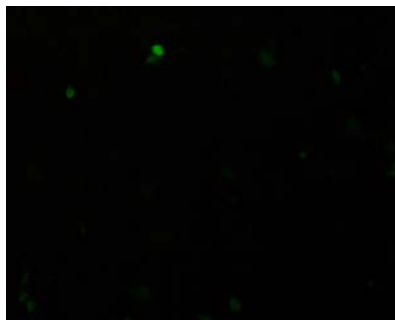
Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HTETOP-Zellen



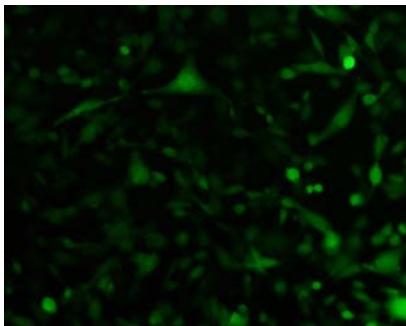
Zellen+ 100μM Doxorubicin
(ohne H₂DCFDA)



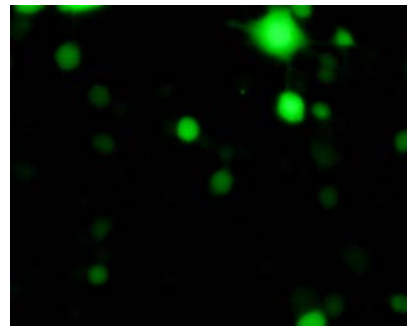
Zellen+ 100μM Doxorubicin
mit H₂DCFDA



Kontrollzellen in HBSS
mit H₂DCFDA



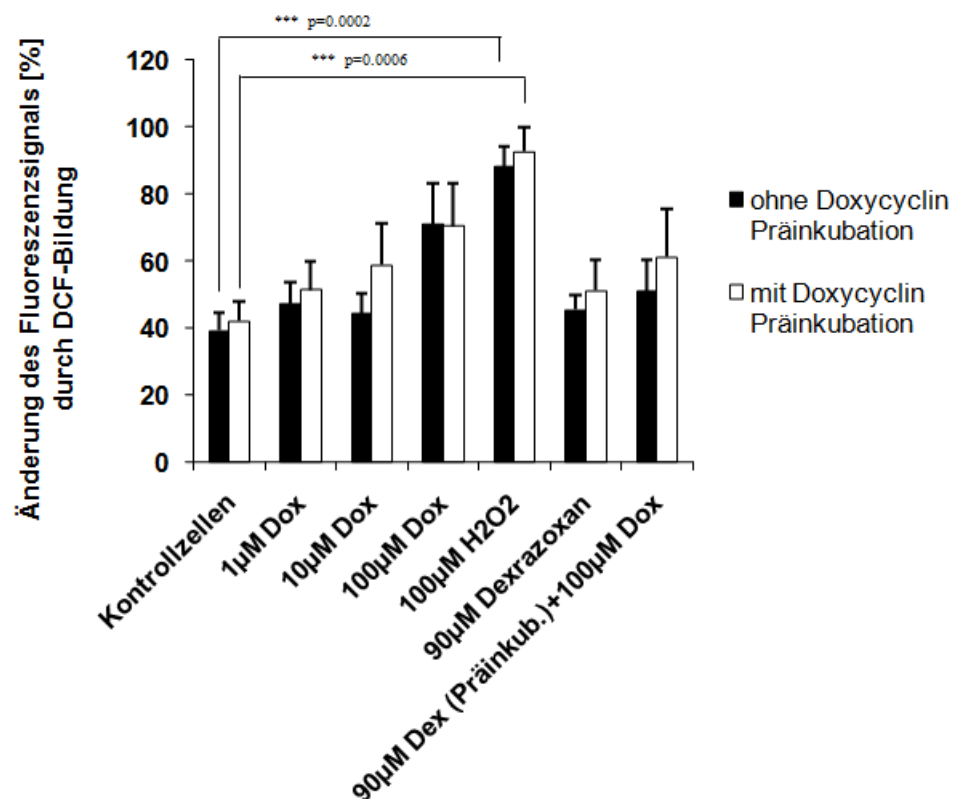
Zellen+ 100μM H₂O₂ mit H₂DCFDA



Zellen+ 100μM H₂O₂ mit H₂DCFDA
30 min. nach Inkubation mit H₂O₂

Um den Einfluss der Topo II α , die ein wichtiges Target von Dox und Dex darstellt, auf die Bildung von oxidativem Stress zu untersuchen, erhielten die Zellen eine 24 stündige Präinkubation mit DOXY (Endkonzentration je Well: 1 μ g/ml). Die Applikation von DOXY bewirkte in den HTETOP-Zellen eine Hemmung der Topo II α -Proteinexpression. Das Ausschalten der Topo II α führte jedoch während der 2 stündigen Messdauer, in denen die Zellen entweder mit Dox oder mit Dex behandelt wurden, zu keiner statistisch signifikanten Veränderung des oxidativen Stresses im Vergleich zu den Zellen ohne Präinkubation mit DOXY (siehe Abb. 27).

Abb. 27: Einfluss der Topo II α an der Entstehung des oxidativen Stresses, gemessen unter Verwendung von H₂DCFDA



Nach der 30 minütigen H₂DCFDA-Inkubation erfolgte die Behandlung mit Dox, HBSS, H₂O₂ oder Dex. Mit Beginn der 2. Inkubationszeit erfolgt die Fluoreszenzmessung. In der Darstellung wurde der prozentuale Anteil der errechneten Messdifferenz (Messwert des jeweiligen Messzeitpunktes minus Ausgangsmesswert der jeweiligen Behandlungsgruppe) am Ausgangsmesswert dargestellt. Die Ergebnisse stellen die Mittelwerte aus mind. 5 isolierten Versuchen dar. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

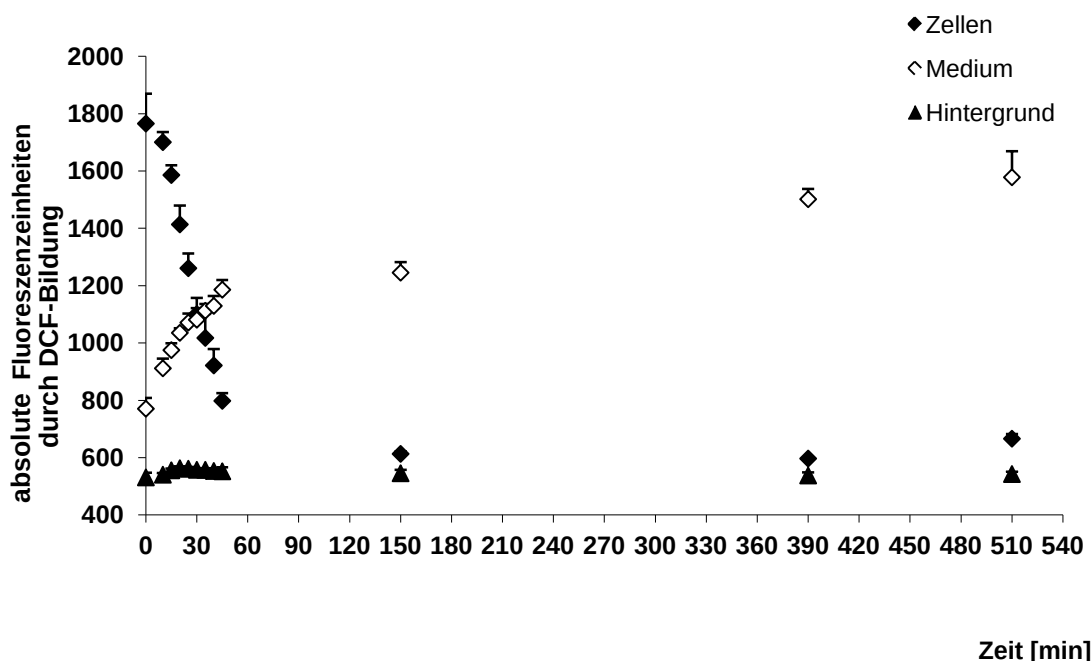
In beiden Behandlungsgruppen (Zellen mit und ohne Präinkubation von DOXY) wurde mit steigender Dox-Konzentration eine Zunahme des oxidativen Stresses im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet. Allerdings bewirkte nur die Gabe von 100 µM H₂O₂ –Lösung einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen. Die Behandlung mit 100 µM Dox (ohne Präinkubation mit DOXY) zeigte eine Borderline-Signifikanz (p=0,055). Durch die Präinkubation mit Dex wurde zwar ein deutlich geringerer oxidativer Stress nachgewiesen als bei der alleinigen Dox-Gabe (Änderung des Fluoreszenzsignals bei der Behandlung mit 100 µM Dox betrug 71% versus 100 µM Dox+Dex: 51%), jedoch war der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht signifikant.

Bei den vorgängig beschriebenen Experimenten betrug die maximale Inkubationszeit mit Dox 2 h. Dies entspricht der Messzeit im Fluorimeter. In den folgenden Untersuchungen sollte erforscht werden, ob Dox möglicherweise erst später als diese 2 h oxidativen Stress in den HTETOP-Zellen auslöst. Hierfür wurde zunächst untersucht, ob H₂DCF lange genug in den Zellen bleibt, um die eventuell stattfindende verzögerte Bildung von ROS nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden HTETOP-Zellen für 30 min mit H₂DCFDA inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit HBSS-Lösung gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Nach genau definierten Zeiten (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 und 45 min sowie nach

2,5; 6,5 und 8,5 h) wurde das überstehende Medium abpipettiert. Sowohl in das Medium, als auch auf die Zellen wurde sofort H_2O_2 (Endkonzentration: 500 μM) gegeben. Nach 105 min wurden die absoluten Fluoreszenzeinheiten von jeder Behandlungsgruppe aufgezeichnet (Hintergrund= reines HBSS). Es konnte gezeigt werden, dass in den Zellen der DCF-Gehalt kontinuierlich absank, während er zeitgleich im Medium kontinuierlich anstieg. Bereits nach 45 min war ein grosser Teil des Fluoreszenzfarbstoffes aus den Zellen hinaus penetriert (siehe Abb. 28). Nach 150 min konnte kein Fluoreszenzfarbstoff mehr in den Zellen nachgewiesen werden.

Dadurch wurde gezeigt, dass der Marker H_2DCFDA ungeeignet ist, um die eventuell verzögert entstehenden ROS in der Dox-Behandlung nachzuweisen.

Abb. 28: Auswaschversuch von H_2DCFDA aus den HTETOP-Zellen



105 min nach der Behandlung mit H_2O_2 (Endkonzentration: 500 μM) wurden die absoluten Fluoreszenzeinheiten von jeder Behandlungsgruppe gemessen (Hintergrund= reines HBSS). Die Fluoreszenzbildung resultiert aus der entstandenen Menge an DCF. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus 2 separaten Versuchsansätzen mit je 4 Wells pro Zeitpunkt und Gruppe. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

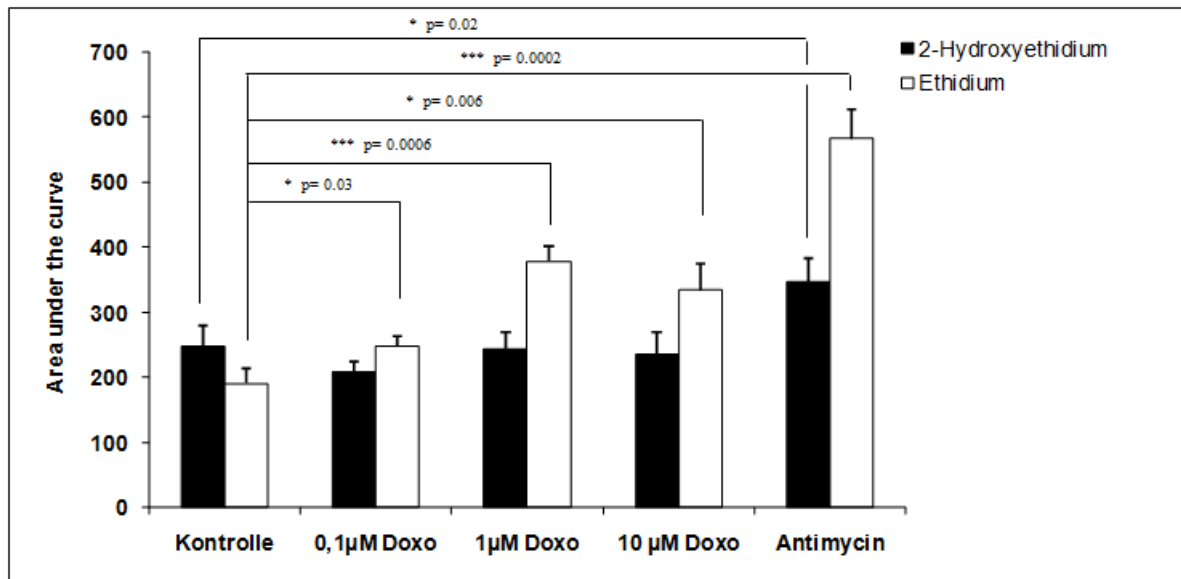
7.2.2 HPLC-Bestimmung des Superoxidgehaltes in den HTETOP-Zellen unter Verwendung von DHE

Unter Verwendung von DHE sollte untersucht werden, ob klinisch relevante Dox-Konzentrationen in den HTETOP-Zellen oxidativen Stress auslösen können. Außerdem sollte der Anteil von Superoxid am oxidativen Stress ermittelt werden.

Nach der 30 minütigen Behandlung der Zellen mit DHE und Dox bzw. Antimycin wurde jedoch lediglich durch Antimycin (=Positivkontrolle) ein signifikant höherer 2-Hydroxyethidium (2-HE)-Gehalt gegenüber den Kontrollzellen nachgewiesen (siehe Abb. 29).

Mit 2-HE wird hauptsächlich Superoxid aus der Vielzahl der möglichen ROS in den Zellen identifiziert, während Ethidium (E) einen unselektiven Marker auf ROS darstellt.

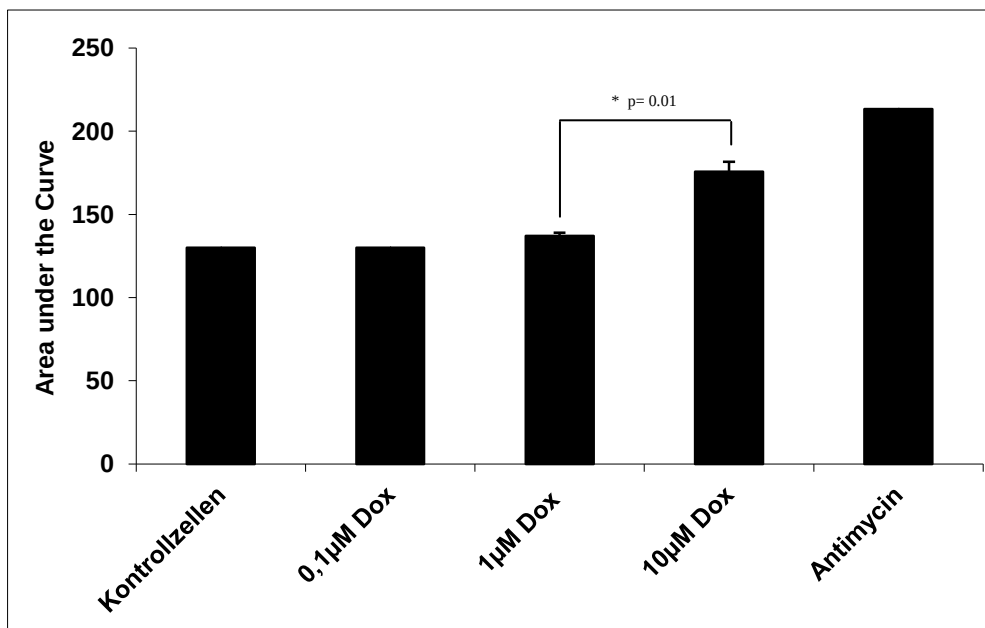
Abb. 29: Bestimmung des 2-HE- und des E-Gehaltes der HTETOP-Zellen mittels HPLC nach einer 30 minütigen Behandlung mit DHE



Die jeweilige Konzentration an 2-HE und E wurde durch Vermessung der Fläche unterhalb des HPLC-Peaks ermittelt. Die Ergebnisse stammen aus 6 isolierten Ansätzen. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Bei allen untersuchten Dox-Konzentrationen wurde lediglich ein signifikanter Anstieg der E-Konzentration beobachtet. Bei der 2 stündigen Behandlung der HTETOP-Zellen mit DHE, wurde bereits bei 10 µM Dox ein Anstieg der 2-HE- Konzentration beobachtet (siehe Abb. 30).

Abb. 30: Quantifizierung des 2-HE-Gehaltes nach einer 2 stündigen Behandlung der HTETOP-Zellen mit DHE



Die 2-HE-Konzentration wurde durch Vermessung der Fläche unterhalb des HPLC-Peaks ermittelt. Lediglich bei den mit 1 und 10 µM Dox behandelten Zellen existieren 2 isolierte

Versuchsansätze. Die restlichen Proben stammen aus 1 Versuchsansatz. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

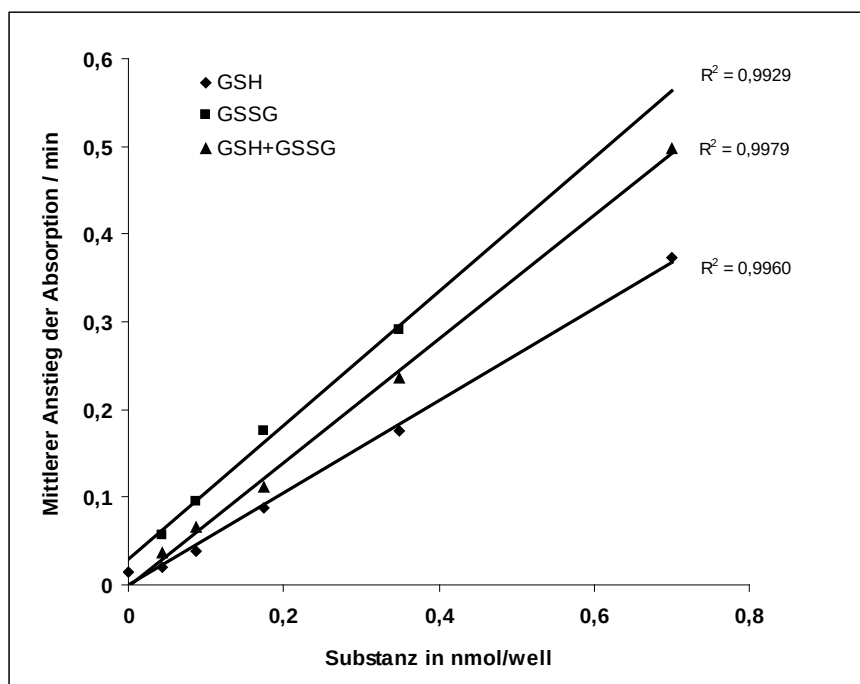
7.2.3 Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehaltes unter Verwendung von DTNB

Da Glutathion ein wichtiges Molekül zur Beseitigung des oxidativen Stresses in den Zellen darstellt, sollte die intrazelluläre Glutathion-Konzentration nach der Gabe von Dox bestimmt werden. Hierbei sollte zwischen der oxidierten Form (dem GSSG) und der reduzierten Form (dem GSH) unterschieden werden. Wird in den Zellen oxidativer Stress ausgelöst, äußert sich dies in einem Anstieg der oxidierten Glutathionform (GSSG).

In unseren Versuchen wurde intrazellulär vorhandenes GSH mit DTNB umgesetzt. Im Laufe der Reaktion entsteht kontinuierlich TNB, welches durch Absorptionsmessung bei 412 nm quantifiziert werden kann. Der Anstieg der Absorption je Minute ist umso steiler, je mehr Glutathion (GSH und GSSG) intrazellulär vorhanden ist.

Um sicherzustellen, dass zwischen dem gemessenen mittleren Anstieg der Absorption (meanslope/min) und der tatsächlich vorhandenen GSH / GSSG-Konzentration ein linearer Zusammenhang besteht, wurde der Versuch in Abwesenheit von Zellen für den Konzentrationsbereich (GSH: 0,04 - 0,7 und GSSG 0,04 - 0,35 nmol je Well) durchgeführt (siehe Abb. 31).

Abb. 31: Kalibriergeraden von GSH und GSSG



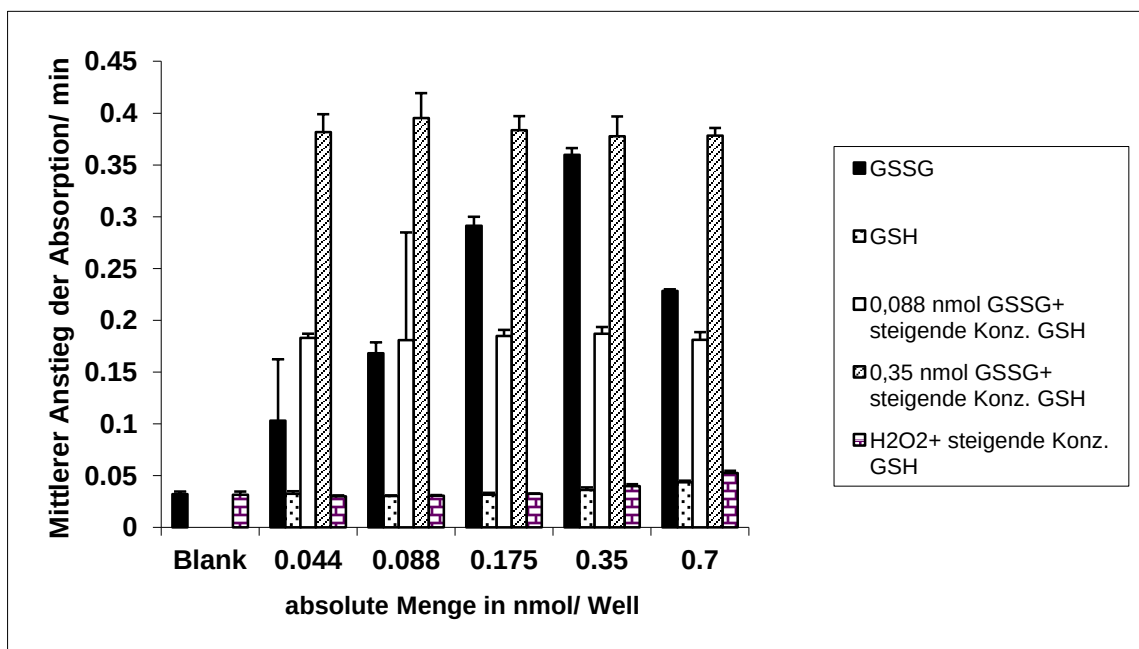
Von jeder GSH- und GSSG-Kalibrierprobe (0,044; 0,088; 0,175; 0,35; 0,7 nmol je Well) wurde alle 2 min die Absorption gemessen. Der Absorptionsanstieg im Messverlauf resultiert aus der Bildung von TNB. Der errechnete Anstieg der Absorption pro Minute wurde im obigen Diagramm dargestellt. Aus den Anstiegen der einzelnen Kalibrierproben wurde abschließend die eigentliche Kalibriergerade erstellt. Diese Versuche erfolgten ohne den Zusatz von 2-Vinylpyridin.

In dem gewählten Konzentrationsbereich konnte ein linearer Zusammenhang zwischen dem meanslope/min und der GSH / GSSG-Konzentration nachgewiesen werden. Pro Molekül

GSSG entstehen 2 Moleküle GSH, weshalb der Anstieg der GSSG-Kalibriergerade wie erwartet doppelt so steil war, wie der, der GSH-Kalibriergerade. Somit war die Methode geeignet, um eine Konzentrationsbestimmung von GSH / GSSG durchzuführen.

Um das intrazellulär vorhandene GSSG selektiv neben GSH nachweisen zu können, wurde GSH mit 2-Vinylpyridin maskiert und damit aus dem Reaktionszyklus entfernt. Um sicher zu gehen, dass die eingesetzte Menge an 2-Vinylpyridin ausreicht, um 0,7 nmol GSH (welches die maximal nachgewiesene Konzentration in den Zellen war) zu binden, wurden Derivatisierungsexperimente ohne Zellen durchgeführt. Hierfür wurden steigende Konzentrationen an GSH bzw. GSSG mit Vinylpyridin versetzt und der Anstieg der Absorption pro Minute gemessen. Wie erwartet, kam es lediglich bei den GSSG-Kalibrierproben zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Absorption, wohingegen bei allen untersuchten GSH-Konzentrationen der gemessene meanslope/min konstant blieb (siehe Abb. 32).

Abb. 32: Detektierbarkeit von GSSG und GSH in den HTETOP-Zellen mit der Maskierung von GSH durch 2-Vinylpyridin

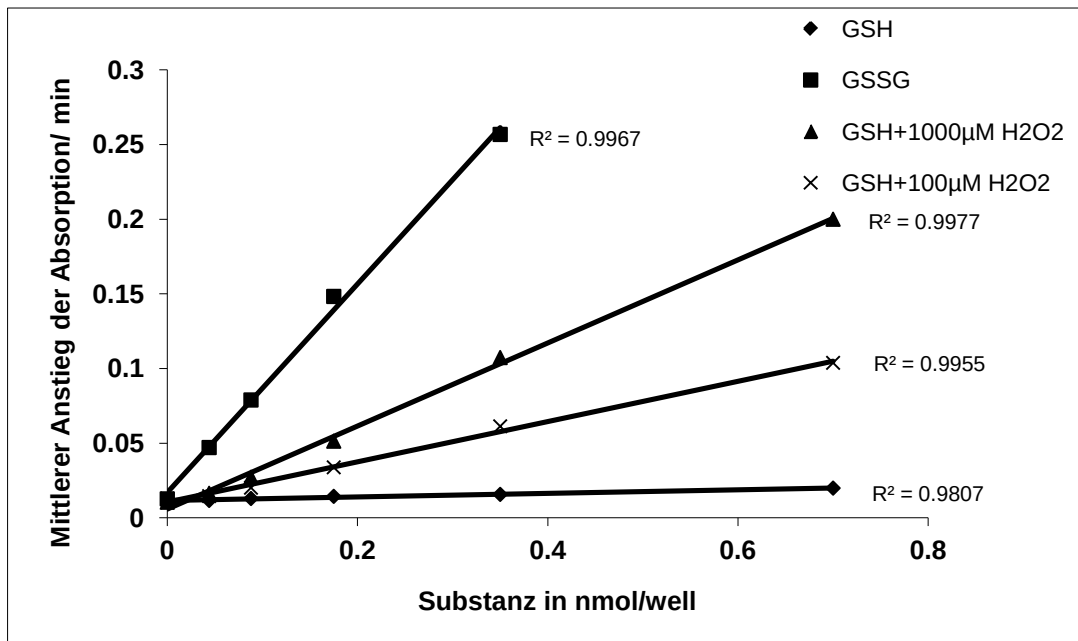


Jede GSH- und GSSG-Kalibrierprobe wurde mit 2-Vinylpyridin versetzt. Anschließend wurde mittels DTNB der Glutathiongehalt der Probe ermittelt. Der Absorptionsanstieg im Messverlauf resultiert aus der Bildung von TNB. Der errechnete Anstieg der Absorption pro Minute wurde im obigen Diagramm dargestellt. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Auch der Zusatz von steigenden Mengen an GSH zu einer konstanten Menge an GSSG (0,088 und 0,35 nmol) führte zu keiner Zunahme der Absorption. Somit konnte nachgewiesen werden, dass lediglich die vorhandene GSSG-Konzentration in der Probe erfasst wurde.

Außerdem wurde untersucht, ob oxidativer Stress mit diesem Versuchsaufbau nachgewiesen werden kann. Hierfür wurde GSH (in Abwesenheit von Zellen) mit unterschiedlichen Mengen H_2O_2 versetzt, wodurch die Bildung von GSSG provoziert wurde. Bei der Zugabe von 2-Vinylpyridin zu diesen Proben sollte jetzt das neu gebildete GSSG zu einem Anstieg der Absorption führen. Wie zu erwarten war, konnte durch die Zugabe von H_2O_2 ein Anstieg der Absorption im Vergleich zur alleinigen GSH-Gabe induziert werden (siehe Abb. 33).

Abb. 33 : Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin und Simulation von oxidativem Stress in Abwesenheit von Zellen



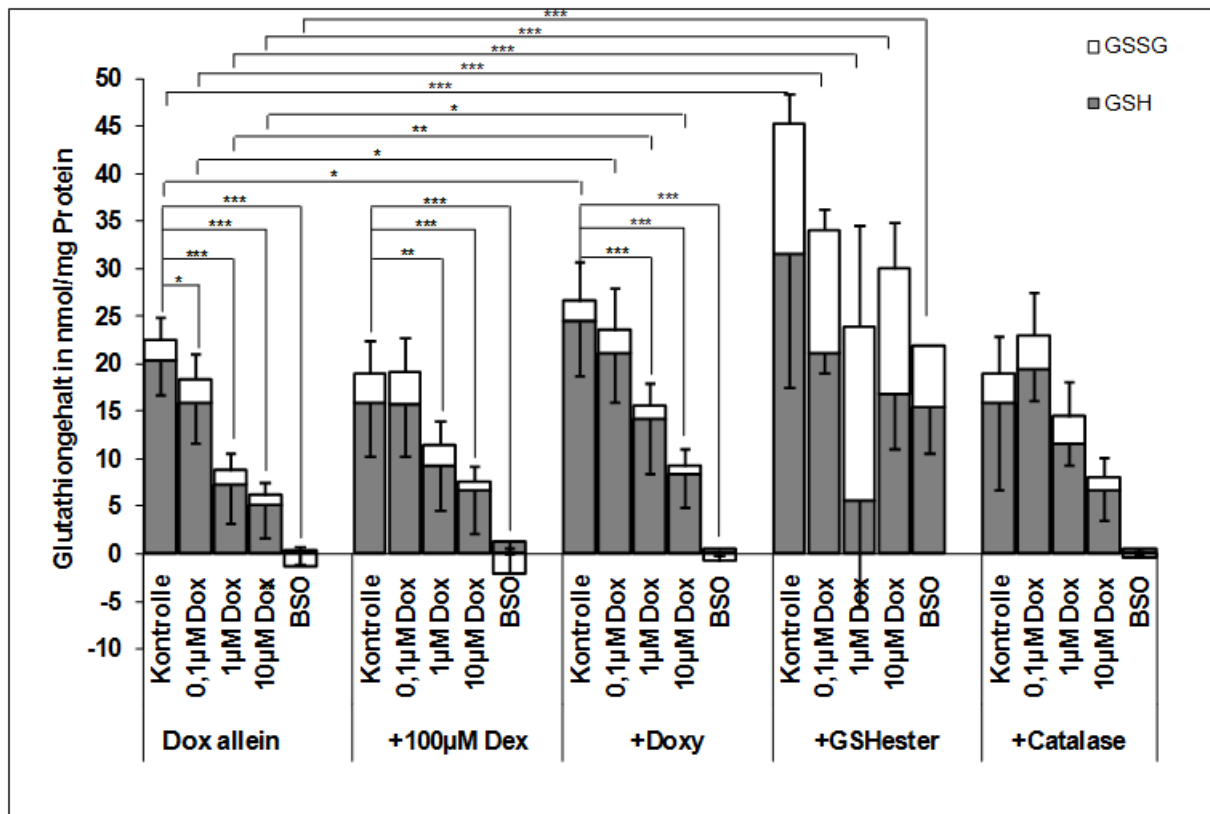
Jede GSH- und GSSG-Kalibrierprobe wurde mit 2-Vinylpyridin versetzt. Anschließend wurde mittels DTNB der Glutathiongehalt der Probe ermittelt. Der Absorptionsanstieg im Messverlauf resultiert aus der Bildung von TNB. Der errechnete Anstieg der Absorption pro Minute wurde im obigen Diagramm dargestellt. Aus den Anstiegen der einzelnen Kalibrierproben wurde abschließend die eigentliche Kalibriergerade erstellt.

Der Anstieg war dabei umso steiler, je höher die H₂O₂ Konzentration war. Damit konnte gezeigt werden, dass oxidativer Stress mit dieser Methode nachgewiesen werden kann und dass der oxidative Stress umso größer ist, je mehr GSSG nachgewiesen wird.

In unseren Versuchen sollte der Einfluss von Dox auf den intrazellulären Glutathiongehalt und die mögliche Modulation durch die Topo II α untersucht werden. Hierfür wurden HTETOP-Zellen für 24 h mit Dox behandelt. Ein Teil der Zellen erhielt zusätzlich eine Präinkubation mit Dex (für 30 min), mit DOXY (für 24 h), mit GSH-Ester (für 1 h) beziehungsweise mit Katalase (für 24 h). Als Positivkontrolle wurde BSO eingesetzt. Dieses blockiert die Neubildung von Glutathion, wodurch eine starke Reduktion der intrazellulären Glutathion-Konzentration nachweisbar sein sollte.

Durch die Behandlung mit Dox wurden zwei Effekte beobachtet. Zum Einen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Gesamt-Glutathions im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abb. 34). Diese Verringerung der Gesamt-Glutathionkonzentration wurde dabei umso größer, je höher die eingesetzte Dox-Konzentration war. Aber bereits bei 0,1 μ M Doxorubizin war diese Reduktion signifikant ($p < 0,05$).

Abb. 34: Glutathiongehalte in den HTETOP-Zellen nach Behandlung mit diversen Substanzen



Je Behandlungsgruppe (Dox allein, +100 µM Dex, +DOXY, +10 mM GSH-Ester, +Katalase) wurden die Zellen entweder nur mit Nährmedium (=Kontrolle), mit steigenden Konzentrationen an Dox, oder mit BSO versetzt. Die Ergebnisse resultieren in der Katalasegruppe aus 2, in allen anderen Gruppen aus 3 bis 14 isolierten Versuchsansätzen. Die Fehlerindikatoren wurden bei dem GSH-Anteil nach unten und bei dem GSSG-Anteil nach oben dargestellt und repräsentieren die Standardabweichung. Eine Säule entspricht dem gesamten Glutathiongehalt (GSH+GSSG) der Zellen je mg Protein.

* $p < 0,05$
 ** $p < 0,01$
 *** $p < 0,001$

Außerdem konnte wie erwartet durch BSO die Gesamt-Glutathionkonzentration gegenüber den Kontrollzellen hochsignifikant gesenkt werden ($p < 0,001$).

Der zweite beobachtete Effekt war, dass es im Vergleich zu den Kontrollzellen durch die 24 stündige Behandlung mit Dox (0,1 µM und 1 µM) zu einem Anstieg des oxidierten Glutathion-Anteils (GSSG) am Gesamt-Glutathiongehalt kam (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Prozentualer Anteil von GSSG am totalen Glutathiongehalt in den HTETOP-Zellen

	Dox allein	+100 µM Dex	+DOXY	+10 mM GSH-Ester	+Katalase
Kontrolle	9,5%	15,8%	8,3%	30,4%	15,9%
0,1 µM Dox	14,0%	17,6%	10,0%	38,0%	15,7%
1 µM Dox	17,8%	18,4%	8,7%	76,8%	20,3%
10 µM Dox	15,3%	11,6%	10,2%	43,8%	17,2%

Die zusätzliche Inkubation mit Dexrazoxan (Dex), Doxycyclin (DOXY), GSH-Ester, oder Katalase (CAT) führte zusätzlich zu Veränderungen der intrazellulären Glutathionkonzentration im Vergleich zur alleinigen Gabe von Dox.

Dex

Durch die Präinkubation mit Dex konnte das Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration verhindert werden, welches sonst durch die Gabe von 0,1 μM Dox im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet wurde (siehe Abb. 34). Allerdings wurde durch die alleinige Gabe von Dex ein deutlich niedrigerer Gehalt an Gesamtglutathion im Vergleich zu den völlig unbehandelten Zellen (Kontrollzellen aus der Behandlungsgruppe „Dox allein“) beobachtet. Die Gabe von 1 μM Dox führte dann aber wieder zu der gewohnten Erniedrigung des Gesamt-Glutathiongehaltes im Vergleich zu den Kontrollzellen dieser Behandlungsgruppe. In einem weiteren Experiment, in dem die HTETOP-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Dex (0,1; 1; 10; 100 μM) behandelt wurden, konnte ähnlich wie bei Dox, mit steigenden Dex-Konzentrationen ein Abfall des Gesamtglutathions beobachtet werden. Dabei zeigte 100 μM Dex eine ähnliche Reduktion (ca. 20% gegenüber den Kontrollzellen) wie sie bei 0,1 μM Dox beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt).

Bemerkenswert an der Behandlung mit Dex war außerdem, dass die alleinige Gabe von Dex zu einem deutlich höheren GSSG-Anteil am Gesamt-Glutathiongehalt im Vergleich zu den völlig unbehandelten HTETOP-Zellen führte (unbehandelt: 9,48% versus +Dex: 15,83%) (siehe Tab. 12). Möglicherweise lässt sich dieser Befund mit der gleichen Zielstruktur von Dox und Dex – der Topo II α - begründen (siehe Diskussion Absatz: 8.2). Durch die zusätzliche Gabe von 0,1 μM und 1 μM Dox ließ sich dieser GSSG-Anteil jedoch kaum weiter erhöhen. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sobald beide Substanzen gleichzeitig in der Zelle vorliegen, Dex den Dox-induzierten oxidativen Stress verhindern kann.

DOXY

Durch die Gabe von DOXY konnte in allen untersuchten Untergruppen (Kontrolle, 0,1; 1; 10 μM Dox und BSO) ein signifikant höherer Gesamt-Glutathiongehalt nachgewiesen werden im Vergleich zur Behandlungsgruppe „Dox allein“. Zusätzlich war der GSSG-Anteil am Gesamtglutathion um bis zu 50% niedriger (bei 1 μM Dox) als bei der alleinigen Behandlung mit Dox (siehe Tab. 12).

GSH-Ester

Um sicher zu gehen, dass der beobachtete Abwärtstrend der GSH-Konzentration kein Messartefakt darstellte, sollte versucht werden, den intrazellulären GSH-Gehalt zu erhöhen. Hierzu wurde zunächst 5 mM N-Acetylcystein (NAC) eingesetzt. Nach dem Eintritt in die Zellen sollte dieses Cysteinderivat mit Glutamat in Anwesenheit der γ -Glutamylcystein-Synthetase zu Glutathion umgewandelt werden, wodurch ein Anstieg der intrazellulären Gesamt-Glutathionkonzentration nachweisbar sein sollte. In unseren Versuchen konnte jedoch kein Anstieg gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). In der Veröffentlichung von Lars-Oliver Klotz et al. [100] wurde als mögliche Erklärung für diesen Effekt eine Rückkopplungshemmung der GSH-Biosynthese aufgeführt. Auch die Gabe von L-2-Oxothiazolidine-4-Carbonsäure (OTZ), welches ebenfalls die Glutathionsynthese durch Freisetzung von Cystein (mit Hilfe der 5-Oxo-L-Prolinase) ankurbeln sollte [101], führte nur zu einem minimalen Anstieg der intrazellulären Glutathionkonzentration (Daten nicht gezeigt). Da sowohl für NAC, als auch für OTZ die intrazelluläre Glutathionsynthese erst induziert werden musste, sollte in einem nächsten Schritt bereits fertig synthetisiertes Glutathion den Zellen verabreicht werden, um einen Anstieg der intrazellulären Gesamt-Glutathionkonzentration zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde eine Präinkubation mit dem GSH-Ester durchgeführt, aus dem die zahlreich in der Zel-

le vorhandenen Esterasen Glutathion freisetzen können. Die intrazelluläre Anreicherung des GSH-Esters sowie die deutliche Erhöhung der intrazellulären Gesamt-Glutathionkonzentration konnte durch eine Zeitverlaufsmessung nachgewiesen werden. Die optimale Behandlungsdauer mit 10 mM GSH-Ester konnte hierbei auf 24 h festgelegt werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe des GSH-Esters konnte zusätzlich die Richtigkeit unserer GSH-Messung überprüft werden. Durch den GSH-Ester sollte sich auch der BSO-induzierte Abfall der Gesamt-Glutathionkonzentration verhindern lassen. Tatsächlich entsprach der gemessene Glutathiongehalt nach der Gabe von GSH-Ester+BSO dem gemessenen Glutathiongehalt der Kontrollzellen aus der Behandlungsgruppe „Dox allein“ (siehe Abb. 34).

Die Präinkubation mit dem GSH-Ester führte zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Gesamt-Glutathionkonzentration im Vergleich zur Behandlungsgruppe „Dox allein“. Jedoch führte die Gabe des GSH-Esters als einzige Präinkubation sowohl zu einem signifikant höheren Gehalt ($p < 0,002$) an GSSG, als auch zu einem signifikant höheren GSSG-Anteil am Gesamtglutathion im Vergleich zur Behandlungsgruppe „Dox allein“ (siehe Tab. 12). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wird in der Diskussion (siehe 8.2.3) erörtert.

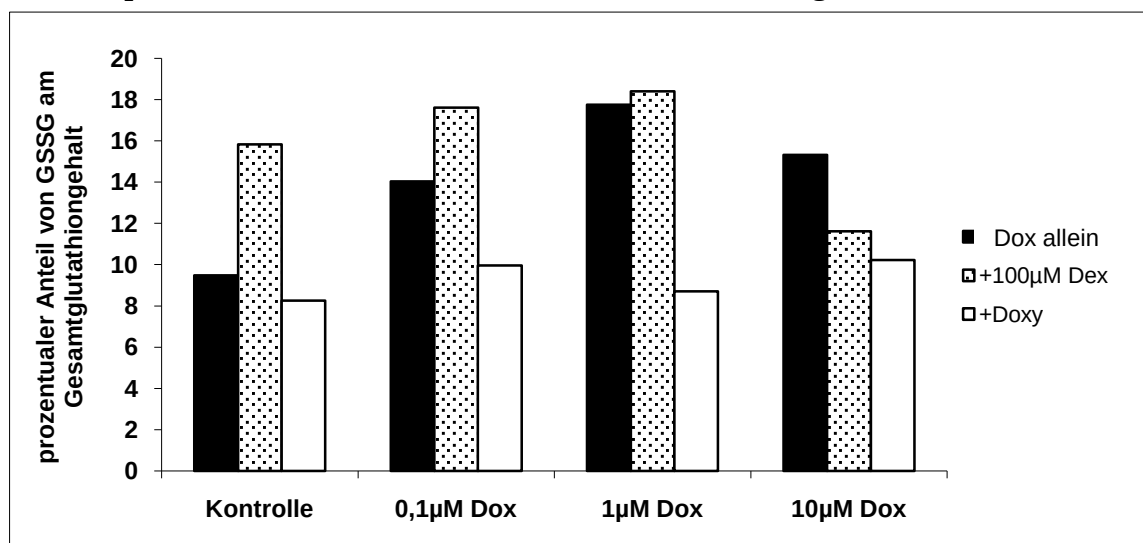
CAT

Durch die Verabreichung von pegylierter CAT sollte ähnlich wie durch Dex versucht werden, den Dox-induzierten oxidativen Stress zu minimieren. In unseren Versuchen lag jedoch der GSSG-Anteil in der gleichen Größenordnung wie der, bei der Behandlungsgruppe „Dox allein“. Die einzige Besonderheit in der Behandlungsgruppe „+CAT“ bestand darin, dass hier die 0,1 μM Gabe von Dox einen Anstieg der Gesamt-Glutathionkonzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen dieser Behandlungsgruppe verursachte.

GSSG im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander

In den Behandlungsgruppen „Dox allein“, „+Dex“, „+GSH-Ester“, „+CAT“ bewirkte die Gabe von 0,1 μM und 1 μM Dox stets einen Anstieg des GSSG-Anteils am Gesamt-Glutathiongehalt der Zelle im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen, während 10 μM Dox zu einem Absinken führte. Im Vergleich zur Behandlungsgruppe „Dox allein“ bewirkte die Präinkubation mit Dex sowohl bei den Kontrollzellen, als auch bei den Dox behandelten Zellen (Konzentrationen bis 1 μM Dox) stets einen höheren Anteil an GSSG. Im Gegensatz hierzu konnte durch die Gabe von DOXY stets ein niedrigerer GSSG-Anteil nachgewiesen werden (siehe Abb. 35).

Abb. 35: prozentualer GSSG-Anteil am Gesamt-Glutathiongehalt



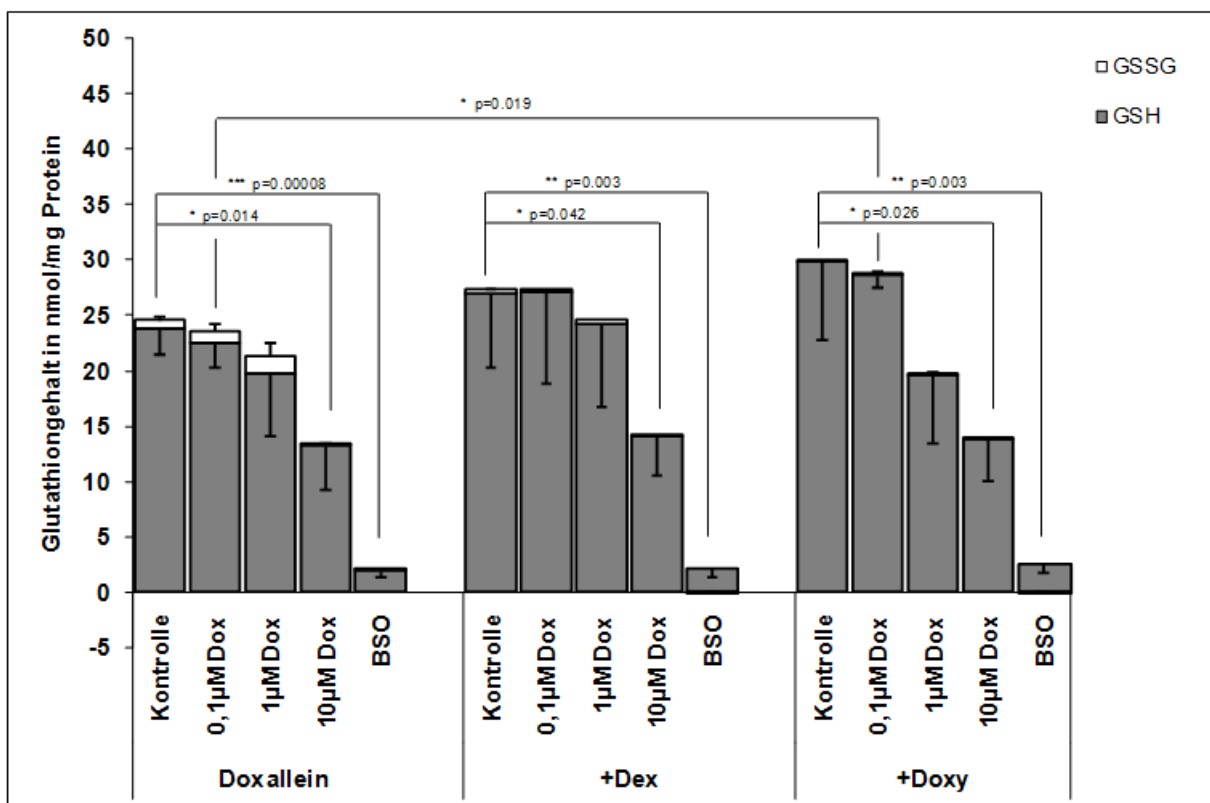
Gesamtglutathion im Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander
Vergleicht man die Gesamt-Glutathiongehalte der Behandlungsgruppen „+Dex“, „+DOXY“, „+GSH-Ester“ und „+Katalase“ mit der Gruppe „Dox allein“ ist auffällig, dass die Gabe von Dox in diesen Gruppen stets zu einem höheren Glutathiongehalt geführt hat, als in der Gruppe „Dox allein“ (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Prozentualer Anteil des gesamten Glutathions der jeweiligen Behandlungsgruppe im Vergleich zur Gruppe „Dox allein“ (Gruppe „Dox allein“ wurde auf 100% festgesetzt)

	+100 μ M Dex	+DOXY	+10 mM GSH-Ester	+Katalase
Kontrolle	84.4%	118.7%	202.2%	84.4%
0,1 μM Dox	103.4%	127.7%	184.9%	124.8%
1 μM Dox	130.5%	178.0%	274.3%	165.8%
10 μM Dox	124.5%	150.6%	491.6%	132.0%

Anschließend sollten die Glutathiongehalte in der ursprünglichen Zelllinie der HTETOP-Zellen- in den HT1080-Zellen untersucht werden. In der Behandlungsgruppe „Dox allein“ und „+Dex“ wurden in diesen Zellen ähnliche Ergebnisse wie in den HTETOP-Zellen beobachtet (siehe Abb. 36).

Abb. 36: Bestimmung der GSH / GSSG-Konzentration in den HT1080-Zellen



Je Behandlungsgruppe (Dox allein, +100 μ M Dex, +DOXY) wurden die HT1080-Zellen entweder nur mit Nährmedium (=Kontrolle) oder mit steigenden Konzentrationen an Dox oder mit BSO versetzt. Die Ergebnisse resultieren aus 3 isolierten Versuchsansätzen. Die Fehlerindikatoren wurden bei dem GSH-Anteil nach unten und bei dem GSSG-Anteil nach oben

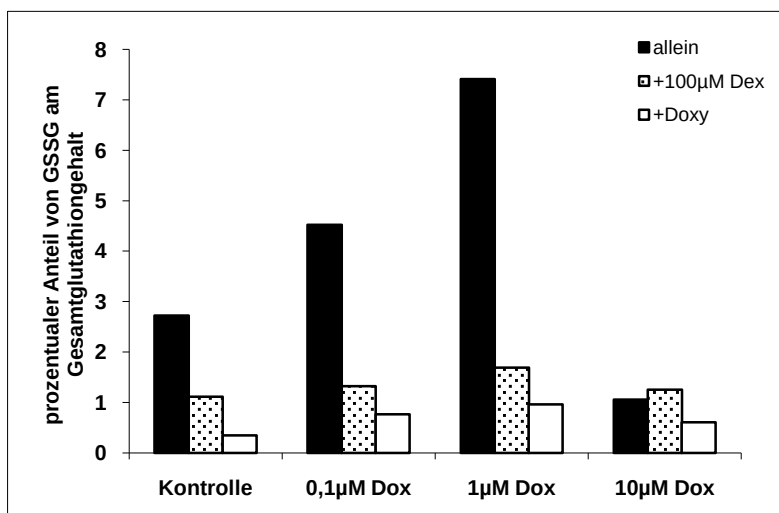
dargestellt und repräsentieren die Standardabweichung. Eine Säule entspricht dem gesamten Glutathiongehalt (GSH+GSSG) der Zellen je mg Protein.

* $p < 0,05$
 ** $p < 0,01$
 *** $p < 0,001$

Einzigste Besonderheiten waren, dass es 1. Durch die Gabe von Dex zu keinem Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration in den Kontrollzellen im Vergleich zu den Kontrollzellen aus der Behandlungsgruppe „Dox allein“ kam, sondern im Gegensatz zu den HTETOP-Zellen bei den HT1080 Zellen ein leichter Anstieg der Gesamt-Glutathionkonzentration beobachtet wurde. 2. Verließ der Abfall der Gesamt-Glutathionkonzentration nach der Gabe von steigenden Dox-Konzentrationen in den HT1080 –Zellen nicht so drastisch, wie in den HTETOP-Zellen und 3. Waren die gemessenen GSSG-Gehalte zumeist um 1 Zehnerpotenz niedriger als in den HTETOP-Zellen. Außerdem wurde durch die Behandlung mit Dex+10 μ M Dox als auch die Behandlung Dex+BSO ein signifikant niedrigerer Gehalt an GSSG im Vergleich zur Behandlungsgruppe „Dox allein“ beobachtet.

Besonderes Augenmerk haben wir jedoch auf die Gabe von DOXY gelegt. Da die Gabe von DOXY in den HTETOP-Zellen hauptsächlich mit der Hemmung der Topo II α -Protein-expression in Verbindung gebracht wurde, sollte die Gabe von DOXY in den HT1080 keine signifikante Änderung in den HT1080-Zellen bewirken. Bei den HT1080-Zellen konnte zwar in den Kontrollzellen dieser Behandlungsgruppe ebenfalls die Gesamt-Glutathionkonzentration durch DOXY leicht erhöht werden im Vergleich zu den Kontrollzellen der Behandlungsgruppe „Dox allein“, jedoch war der Unterschied zwischen beiden Gruppen **nicht** signifikant, während er sich in den HTETOP-Zellen signifikant unterschied. Lediglich die Behandlung mit 0,1 μ M Dox versus 0,1 μ M Dox+ DOXY wies eine signifikant unterschiedliche Gesamt-Glutathionkonzentration auf. Außerdem waren die beobachteten GSSG-Gehalte dieser Behandlungsgruppe tendenziell niedriger als in der Behandlungsgruppe „Dox allein“, sie unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Betrachtet man die prozentualen Anteile von GSSG an den Gesamt-Glutathiongehalten, bewirkte wie in den HTETOP-Zellen die alleinige Gabe von 0,1 μ M und 1 μ M Dox einen Anstieg gegenüber den jeweiligen Kontrollzellen (siehe Abb. 37). Allerdings konnte der GSSG-Anteil durch die Gabe von Dex um bis zu 80% gegenüber der Behandlungsgruppe „Dox allein“ reduziert werden.

Abb. 37: Prozentualer Anteil von GSSG am Totalen GSH-Gehalt in den HT1080-Zellen



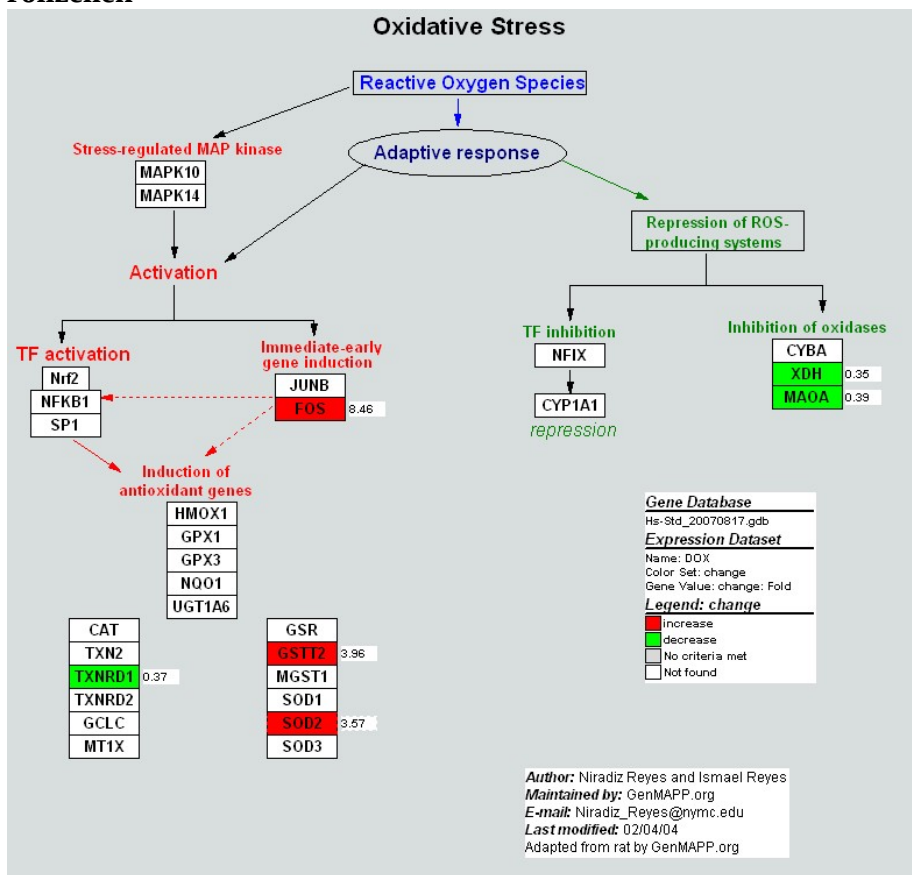
7.3 Untersuchungen zur Genexpression mittels Microarray

In diesen Experimenten wurden ausschließlich die HTETOP-Zellen untersucht. Die Zellen erhielten unterschiedliche Behandlungen (keine Behandlung, +Dox, +Dox und Dex, +Dox und DOXY). Anschließend wurde die Veränderung der Genexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ermittelt. Jedoch wurden in unseren Untersuchungen ausschließlich die Gene, die an der Entstehung und Beseitigung des oxidativen Stresses beteiligt sind, näher charakterisiert. Sowohl die alleinige Gabe von Dox, als auch die Kombination mit Dex oder DOXY führte zu einer verstärkten Genexpression von FOS, GSTT2 und SOD und zu einer verminderten Genexpression von XDH (siehe Abb. 38, Abb. 39 und Abb. 40).

Das cFOS-Gen codiert ein zelluläres Protoonkogen (FOS), welches zu der Gruppe der „immediate early gene family“ der Transkriptionsfaktoren gehört. Fos induziert unter anderem die Bildung von AP-1, NF- κ B und SP1, wodurch sich die Zelle gegen Zellschäden (z.B. oxidativen Stress) bzw. das Eindringen von Pathogenen verteidigen kann.

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) sind an der Bildung von Glutathionkonjugaten, der Reduktion von Peroxiden und an nichtkatalytischen Bindungs- und Transportfunktionen beteiligt. In unseren Versuchen war die Überexpression der GST-T2 bei der alleinigen Gabe von Dox am höchsten (3,96 fold) gefolgt von Dox+ DOXY (3,32 fold) und Dox+Dex (3,14 fold). Die Superoxiddismutasen (SOD) katalysieren den Abbau von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und tragen somit zu einer effektiven Beseitigung von ROS bei. In unseren Untersuchungen war die Überexpression der SOD2 bei der Gabe von Dox+ DOXY (3,64 fold) am höchsten, dicht gefolgt von der alleinigen Gabe von Dox (3,57 fold) und der Gabe von Dox+Dex (3,14 fold).

Abb. 38: Vergleich der Genexpressionen von den Dox-behandelten Zellen mit den Kontrollzellen



Die Xanthindehydrogenase (XDH) katalysiert die Oxidation der Purine zu Harnstoffen unter Verbrauch von NAD. In allen 3 Behandlungsgruppen konnte eine Reduktion der Genexpression auf 1/3 gegenüber den Kontrollzellen nachgewiesen werden.

Zwei weitere Gene, die in die Entstehung des oxidativen Stresses involviert sind, wurden durch die Gabe von Dox+Dex / Dox+DOXY differentiell reguliert.

1. TXNRD1, welches die Thioredoxinreduktase 1 codiert, war im Vergleich zu den Kontrollzellen nur bei der alleinigen Therapie mit Dox erniedrigt. Sowohl die Behandlung mit Dex, als auch die Therapie mit DOXY konnten die Verminderung der Genexpression durch Dox verhindern. Die Hemmung der Thioredoxinreduktase führt zur Apoptose und damit zum Sterben der Zellen.

2. Die MAOA ist hauptsächlich für die oxidative Deaminierung der Monoamine verantwortlich, in dessen Folge Ammoniak und Wasserstoffperoxid entstehen. Lediglich die kombinierte Gabe von Dox und Dex bewirkte keine Änderung der MAOA-Genexpression, während alle anderen Behandlungen zu einer deutlichen Reduktion führten.

Abb. 39: Vergleich der Genexpressionen von den Dox+Dex-behandelten Zellen mit den Kontrollzellen

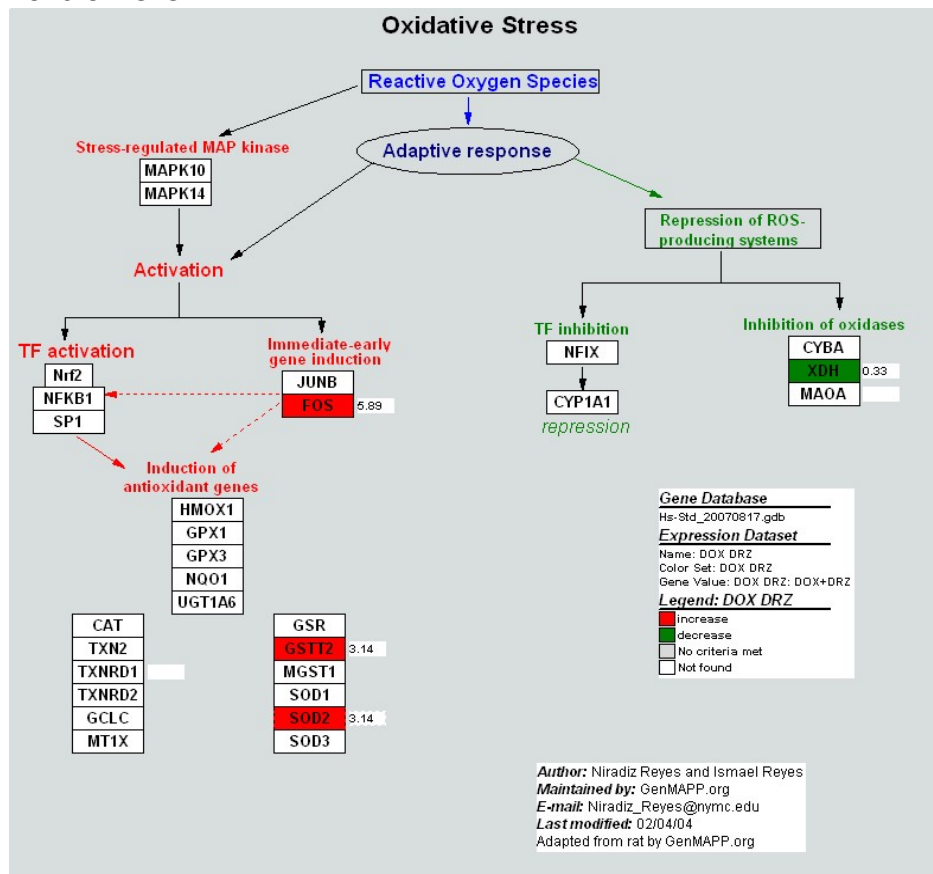
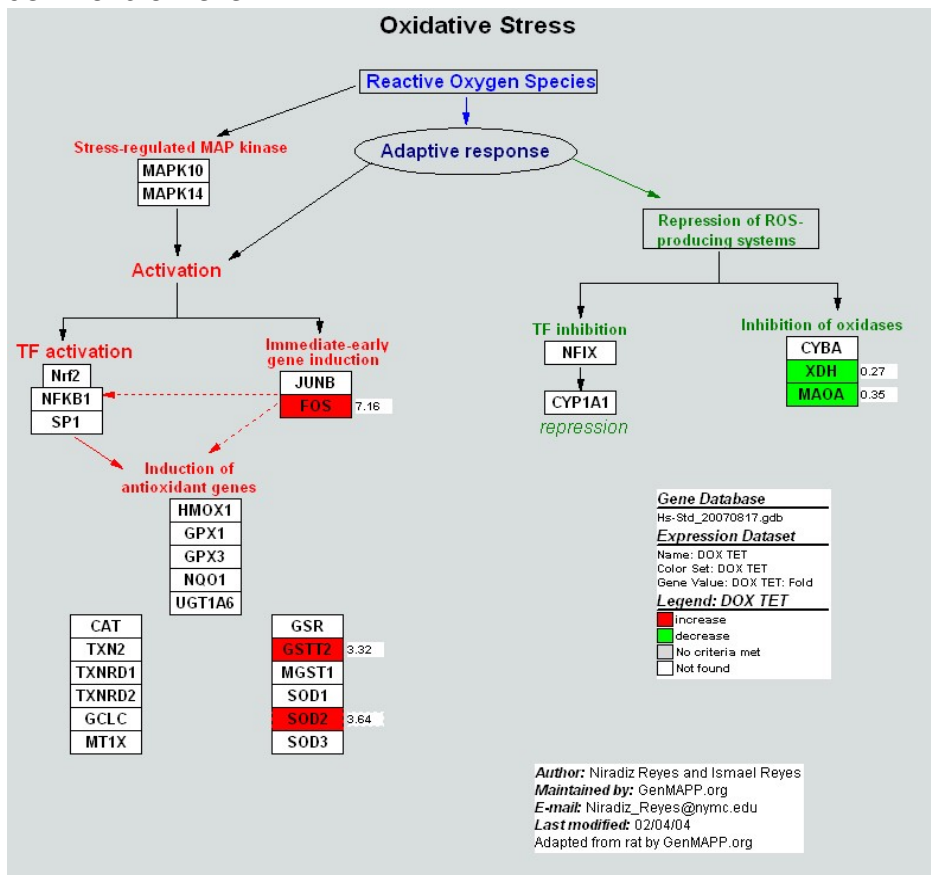


Abb. 40: Vergleich der Genexpressionen von den Dox+DOXY-behandelten Zellen mit den Kontrollzellen



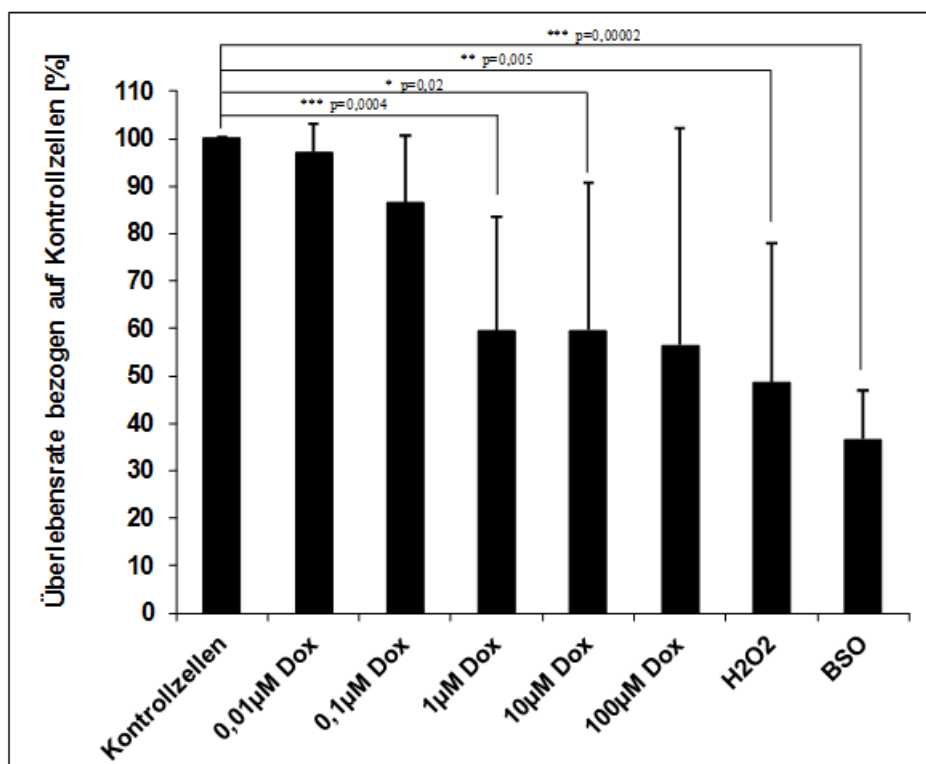
7.4 Bestimmung der Überlebensrate der HTETOP-Zellen mit Hilfe des MTT-Assays

In den HTETOP-Zellen wurde die Dox-induzierte Toxizität mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Dox-Konzentrationen, die den zu erwartenden Konzentrationen während einer Chemotherapie beim Menschen entsprechen (0,01 bzw. 0,1 μM Dox), führten zu einer maximalen Sterblichkeit der Zellen von 14% (siehe Abb. 41). Ab 1 μM Dox war die Überlebensrate der Zellen deutlich eingeschränkt (bis zu 40% Sterblichkeit).

H_2O_2 und BSO führten zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit der HTETOP-Zellen. Um die Toxizität von Dox auf die HTETOP-Zellen zu minimieren, wurden verschiedene Präinkubationen durchgeführt. Die alleinige Gabe von Dex führte zu einer starken Beeinträchtigung des Überlebens im Vergleich zu den Kontrollzellen (siehe Abb. 42). Wurden jedoch Dox bis zu einer Konzentration von 1 μM und Dex zusammen verabreicht, konnte kein Überlebensunterschied im Vergleich zur alleinigen Dox-Therapie festgestellt werden. Bei der Gabe von 10 μM Dox addierten sich die Toxizitäten von Dox mit der, gegenüber den Kontrollzellen ausgelösten Toxizität von Dex.

Die Gabe von DOXY führte bis zu einer Konzentration von 1 μM Dox zu keiner signifikanten Veränderung in der Sterblichkeit. Wurde bei der Applikation von 10 μM Dox oder BSO gleichzeitig die Topoisomerase-Expression gesenkt (durch die Präinkubation mit DOXY), führte das zu einer erhöhten Sterblichkeit der Zellen im Vergleich zur alleinigen Gabe von Dox / BSO.

Abb. 41: Einfluss von steigenden Dox-Konzentrationen auf das Überleben der HTETOP-Zellen

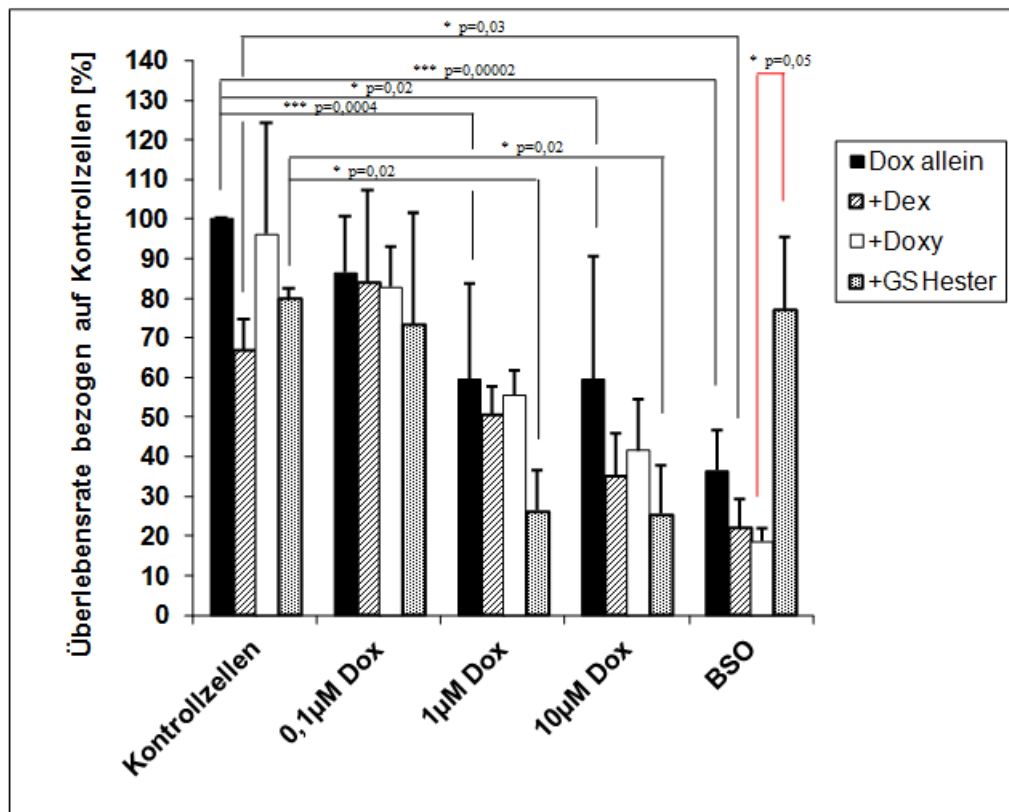


Die dargestellten Ergebnisse stammen aus 4-5 isolierten Versuchsansätzen mit je 3 Wells pro Behandlungsgruppe. Die Absorption der Kontrollzellen wurde als 100% festgesetzt. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Da mit steigenden Dox-Konzentrationen ein deutliches Absinken der GSH-Gesamtmenge in der Zelle beobachtet wurde (siehe 4.2.4), sollte durch die Substitution von GSH eine Verringerung der Sterblichkeit induziert werden. Diese Erwartung konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden. Sowohl bei den Kontrollzellen, als auch bei den Dox behandelten Zellen wurde durch die Gabe von GSH-Ester (aus dem intrazellulär GSH freigesetzt wird) eine erhöhte Sterblichkeit der Zellen induziert (mögliche Erklärung siehe Abschnitt 8.2.3).

Bildet man die Differenz aus der Überlebensrate von Dox und der Überlebensrate vom GSH-Ester und errechnet anschließend den prozentualen Anteil der Differenz an der Überlebensrate von Dox, so zeigte sich, dass die GSH-Ester induzierte Sterblichkeit mit zunehmender Dox-Konzentration stieg. Lediglich bei BSO, welches die Neubildung von GSH blockiert (durch die Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthetase), konnte durch die Gabe von GSH-Ester die Sterblichkeit der Zellen um mehr als das Doppelte reduziert werden.

Abb. 42: Einfluss der verschiedenen Präinkubationen auf die Dox-Toxizität gegenüber den HTETOP-Zellen

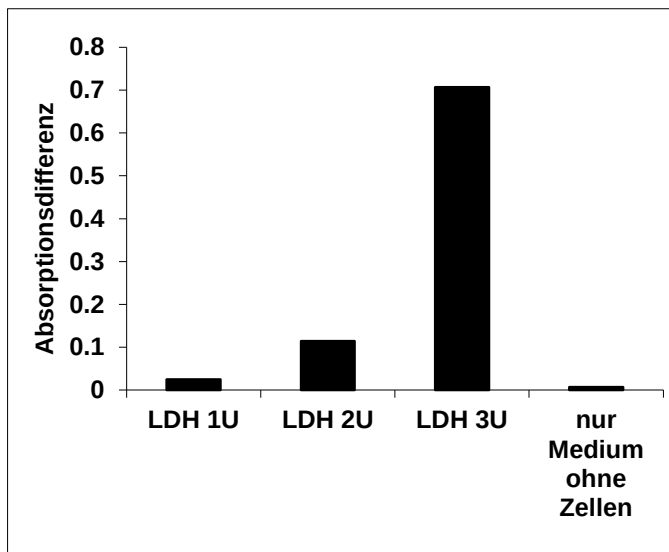


Präinkubationen: Dex 30 min, GSH-Ester 1 h und DOXY 24 h, anschließend wurden die Zellen für 24 h mit Dox bzw. BSO behandelt. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus mind. 3 isolierten Versuchsansätzen mit je 3 Wells pro Behandlungsgruppe. Die Absorption der Kontrollzellen (ohne Präinkubation) wurde als 100% festgesetzt. Der Fehlerindikator ist als Standardabweichung dargestellt.

7.5 Bestimmung der Zellmembranintegrität durch die Messung von LDH

Um zu überprüfen, ob Dox die Integrität der Zellmembranen beeinträchtigt, wurde die LDH-Konzentration im Medium bestimmt. Bei intakten Zellmembranen sollte kaum LDH im Medium nachweisbar sein. Wird jedoch die Zellmembran beschädigt, diffundiert LDH in den extrazellulären Raum, wo es durch enzymatische Umsetzung von Pyruvat mit NADH nachgewiesen werden kann. Je mehr LDH in der untersuchten Probe vorhanden ist, umso größer ist der NADH-Verbrauch und umso größer ist die Differenz zwischen Anfangswert und dem Messwert nach 3 min (siehe Abb. 43).

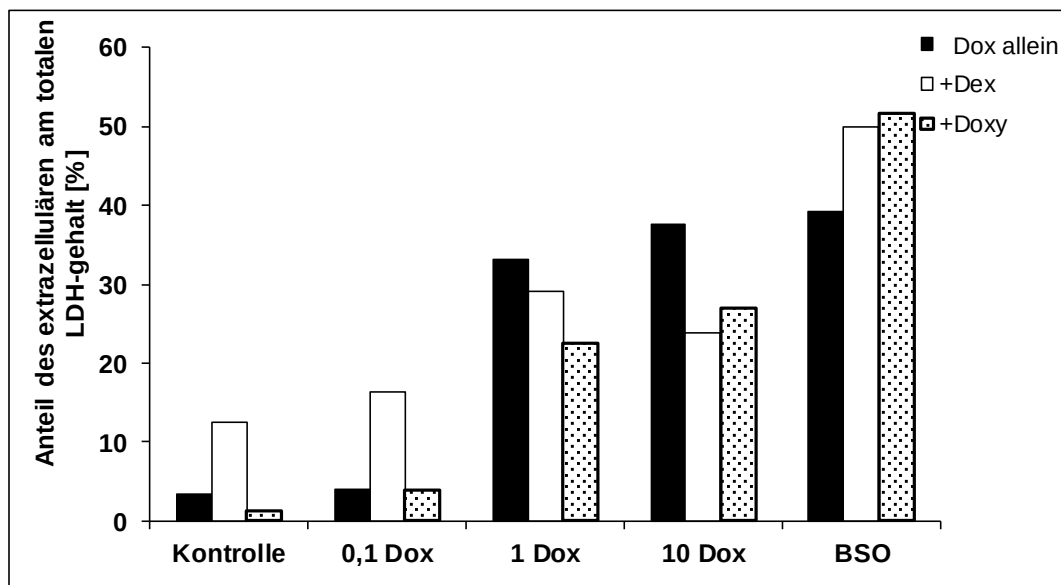
Abb. 43: Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz (Anfangsmesswert minus Messwert nach 3 min.) von der LDH-Menge in der Probe



In unseren Versuchen wurde der LDH-Gehalt im extrazellulären Medium nach der Gabe von Dox, Dox mit DOXY-Präinkubation (für 24 h) bzw. Dox mit Dex-Präinkubation (für 30 min) bestimmt. Ab 1 μM Dox stieg der Anteil des extrazellulär nachgewiesenen LDH am Gesamt-LDH-Gehalt erheblich an (siehe Abb. 44).

Hingegen führte 0,1 μM Dox, welches äquivalent zu der beim Menschen eingesetzten Dosis ist, zu keiner Erhöhung des extrazellulären LDH-Gehaltes im Vergleich zu den Kontrollzellen. Durch die Präinkubationen mit DOXY bzw. Dex konnte ebenfalls ein Anstieg der extrazellulären LDH-Konzentration beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 1 μM Dox war jedoch der extrazelluläre Anteil am Gesamt-LDH durch die Präinkubationen niedriger, als bei der alleinigen Dox-Gabe.

Abb. 44: Beeinflussung des LDH-Gehaltes durch die Kombinationstherapie mit Dex / DOXY

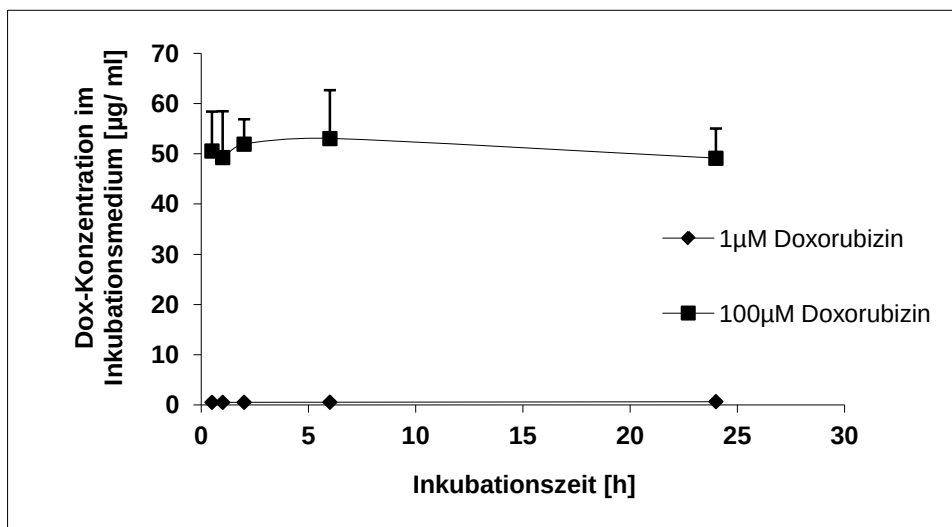


Darstellung des prozentualen Anteil des extrazellulären LDH-Gehaltes am Gesamt-LDH-Gehalt. Der LDH-Gehalt der Probe wurde anhand der Absorptionsdifferenz zwischen der 1. und der 2. Messung im Abstand von 3 min. ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse stammen aus 2 isolierten Versuchsansätzen.

7.6 Bestimmung der Dox-Konzentration in den HTETOP-Zellen durch HPLC-Messungen

Um herauszufinden, wie schnell Dox in den HTETOP-Zellen anflutet und wie schnell es anschließend wieder aus den Zellen heraus transportiert wird, wurden HPLC-Messungen durchgeführt (siehe Absatz 6.8.5). Nach der Dox-Behandlung (Endkonzentration: 1 μM und 100 μM) wurde nach 30 min, 1 h, 2 h, 6 h und nach 24 h aus dem Medium der HTETOP-Zellen der extrazelluläre Dox-Gehalt bestimmt (siehe Abb. 45).

Abb. 45: Nachweis der Dox-Konzentration im Medium mittels HPLC

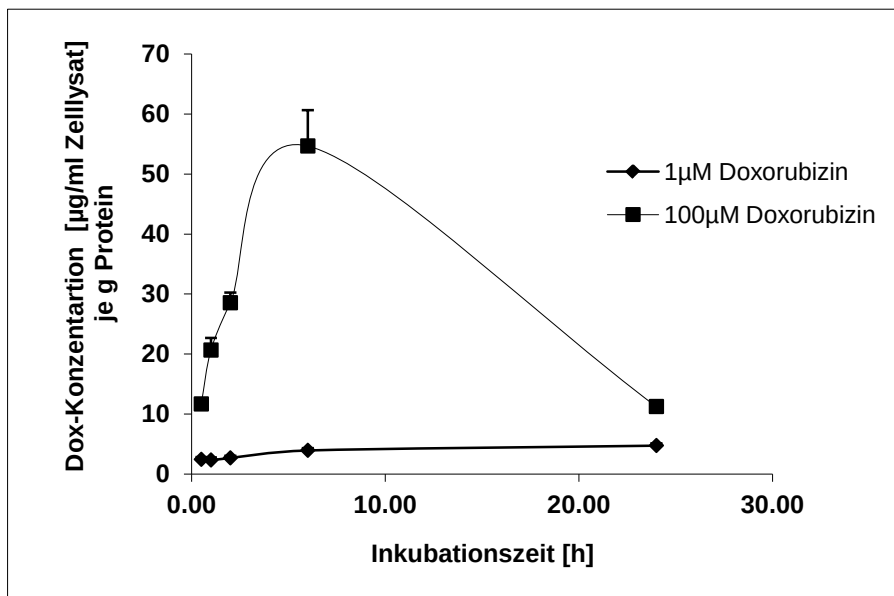


Die Ergebnisse resultieren aus 2 isolierten Versuchsansätzen mit je 2 Wells pro Behandlungsgruppe. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Hierbei ist bemerkenswert, dass bei der Behandlung mit 1 μM Dox die extrazelluläre Dox-Konzentration nach 24 h um ca. 30% gegenüber der gemessenen Anfangskonzentration anstieg. Hingegen blieb die extrazelluläre Dox-Konzentration nach der Gabe von 100 μM Dox nahezu konstant.

Nach Abnahme des überstehenden Mediums für die Messung der extrazellulären Dox-Konzentration wurden die Zellen gewaschen und anschließend lysiert um den intrazellulären Dox-Gehalt bestimmen zu können. Bei der Inkubation mit 100 μM Dox wurde im Verlauf der Messung zunächst ein deutlicher Anstieg der intrazellulären Dox-Konzentration beobachtet (bis zu dem 6 h Messwert). Nach 24 h sank dieser jedoch rapide ab (siehe Abb. 46).

Abb. 46: Nachweis der Dox-Konzentration im intrazellulären Raum mittels HPLC



Die Ergebnisse resultieren aus 2 isolierten Versuchsansätzen mit je 2 Wells pro Behandlungsgruppe. Der Fehlerindikator entspricht der Standardabweichung.

Bei der Inkubation mit 1 µM Dox wurde bis zu dem 6 h Messwert ein Anstieg der intrazellulären Dox-Konzentration beobachtet. Im Anschluss daran stieg die intrazelluläre Dox-Konzentration nur noch gering an (asymptotischer Kurvenverlauf). Dies deutet auf eine Sättigung der Zellen hin, bei der sich der einwärtsgerichtete Transport mit der Dox-Metabolisierung und dem auswärtsgerichteten Transport die Waage halten.

7.7 Bestätigung der in der NHLB-Studie identifizierten Assoziationen zwischen Dox-induzierter Kardiotoxizität und genetischen Varianten von MRP1 und MRP2 sowie der NAD(P)H-Oxidase

7.7.1 Erfassung und Beurteilung der Anthrazyklin-induzierten Herzinsuffizienz

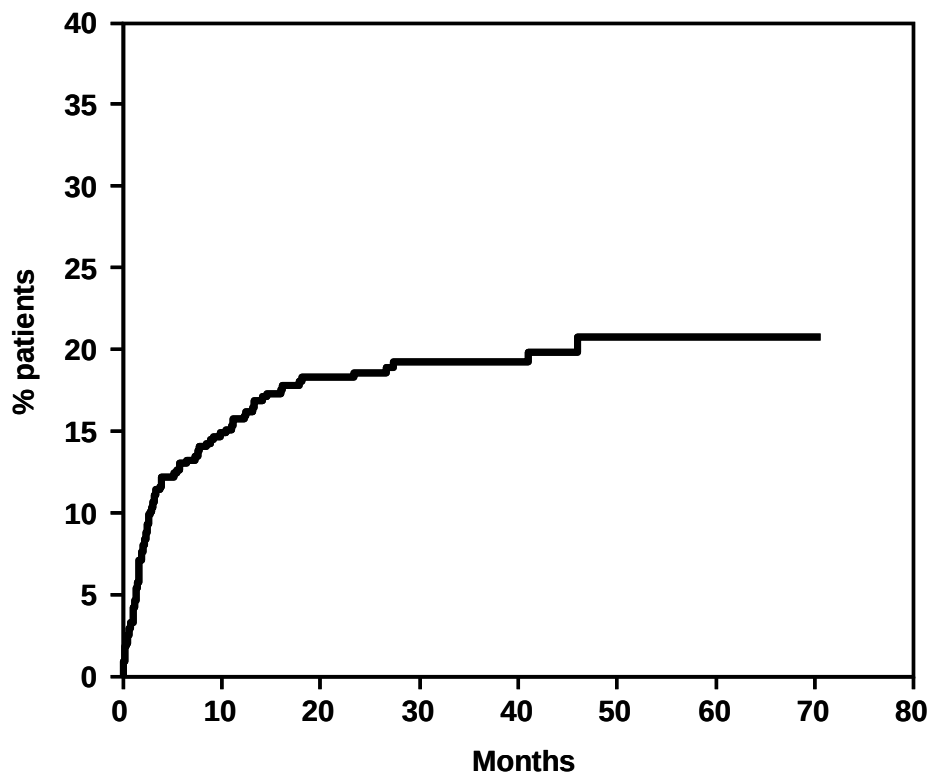
In die Auswertung der verifizierenden Ricover60-Studie sind insgesamt 1309 Patienten eingegangen. Nach Abschluss der Datenbankauswertung konnten alle Patienten anhand der dokumentierten Symptome eingestuft werden als 1.) Patienten mit sicheren Herzschäden, 2.) mit unsicheren aber sehr wahrscheinlichen Herzschäden und 3.) Patienten ohne Herzschäden.

Während der Chemotherapiezyklen 1-6 blieb die Inzidenz der sicheren Herzschäden relativ stabil. Hingegen nahm die Zahl der unsicheren Herzschäden bis zum Zyklus 4 stetig zu und war insgesamt rund dreimal so hoch, wie die der sicheren Herzschäden.

In der Nachbeobachtungszeit (Studienphase III) wurden zu jedem Zeitpunkt der Studie ähnlich viele sichere und unsichere Herzschäden festgestellt. Außerdem wiesen in der Chemotherapiezeit (Studienphase II) von den sicheren Fällen rund ein Viertel der Patienten wiederholte Anzeichen einer Herzschädigung auf.

In der Studienphase III (Folgebögen) hatten alle Patienten, die als sicher herzeschädigt charakterisiert wurden (n=25) mindestens auf zwei Folgebögen Hinweise auf Herzschäden. Die Zeit bis zum Auftreten von sicheren Herzschädigungen wurde in der Abb. 47 dargestellt.

Abb. 47: Zeit bis zum Auftreten von sicheren Herzscheiden



Zur besseren Übersicht wurde in den Abb. 49, Abb. 50, Abb. 51 das gesamte Studienkollektiv dargestellt. Dabei wurden in der Abb. 49 alle nachweisbaren Herzscheiden (also auch die, die nur durch unsichere Hinweise identifiziert werden konnten), während die Abb. 50 und Abb. 51 nur die gesicherten Herzscheiden beinhalten. Da von uns nur die Patienten mit gesicherten Herzscheiden näher erforscht werden sollten, die ausschließlich durch die Chemotherapie-induzierte Herzscheiden aufwiesen, konnten 573 Patienten in die Auswertung eingeschlossen werden. Die Patienten, die vor Beginn der Chemotherapie bereits Herzscheiden jeder Art aufwiesen, wurden daher in unserer Studie nicht mit eingeschlossen.

Von diesen wurden bei 66 Patienten gesicherte Symptome auf eine Herzscheiden während der Chemotherapie nachgewiesen. Bei 11 der 66 Patienten blieben diese Hinweise auch während der Nachbeobachtungszeit bestehen. 37 Patienten wiesen ausschließlich in der Studienphase III (auf den Folgebögen) Herzscheiden auf. Daher kamen für unsere Auswertung 48 chronische Fälle von Herztotoxizität (11+37) und 55 akute Fälle von Herztotoxizität in Frage. Als Kontrollen standen uns 311 Patienten zur Verfügung, die weder vor oder während der Chemotherapie, noch in der Nachbeobachtungszeit Herzscheiden egal welcher Art (unsichere oder gesicherte) aufwiesen.

Von diesen insgesamt 414 Patienten sollte eine Blutprobe beschafft werden. Dabei konnten wir zu Beginn unserer Analysen bereits auf die DNA von 398 Patienten zurückgreifen, welche 2003 gesammelt wurden. Jedoch waren unter diesen 398 Patienten nicht alle benötigten Kontrollen und Fälle enthalten, wodurch insgesamt 2 weitere Blutprobensammlungen erforderlich wurden. Neben der reinen Beschaffung der Blutproben wurden hierbei 2 weitere Ziele verfolgt: Zum Einen sollte von einem Teil, der bereits 2003 gesammelten chronischen / akuten Fällen erneut Blutproben beschafft werden, um eine Verifizierung der Herzscheiden durch die Messung der NT-proBNP-Werte zu erreichen und zum Zweiten sollte nachgewiesen werden, dass es zu keinen Ungereimtheiten / Probenverwechslungen zwischen den 3 Sammlungsaktionen gekommen ist.

7.7.2 Bestimmung des NT-proBNP-Wertes zur Verifizierung der Herzinsuffizienz

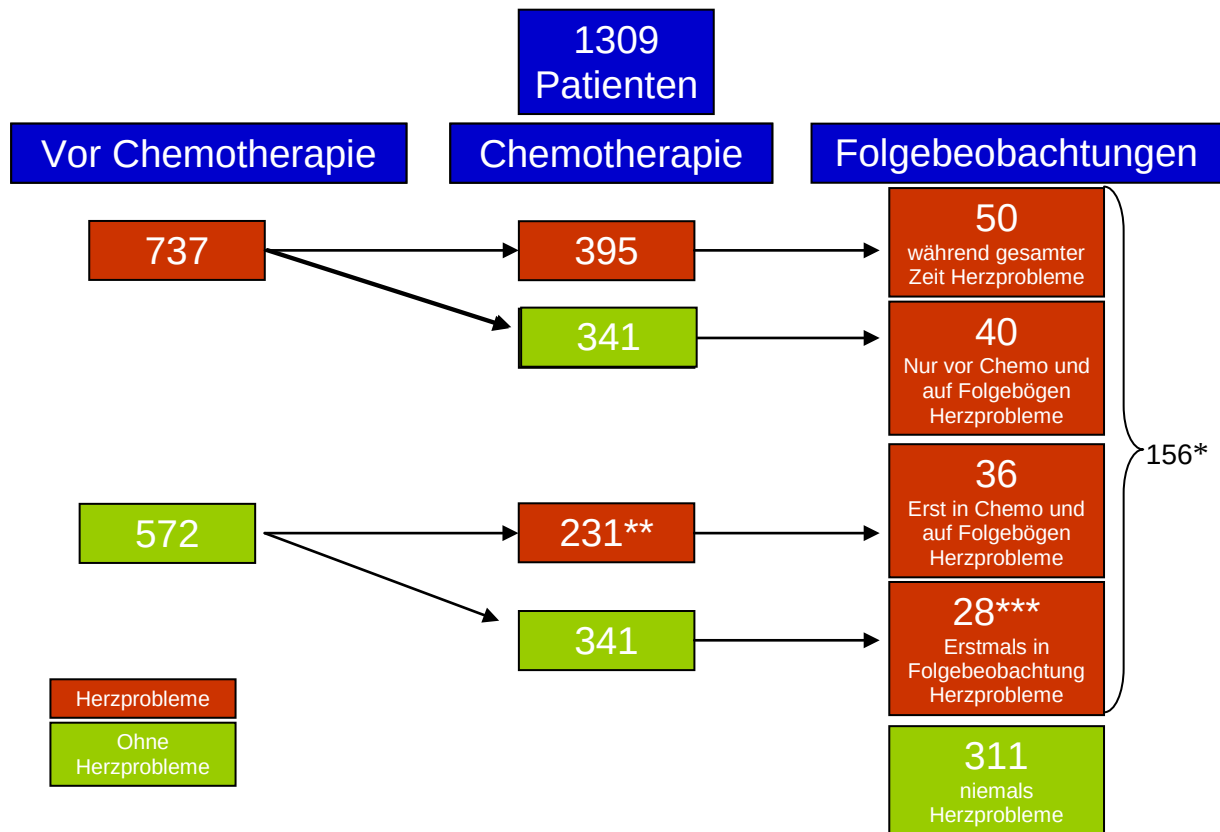
Da die Einteilung der Patienten in Fälle und Kontrollen ausschließlich anhand der Eintragungen in der Datenbank definiert wurde, sollte die Herzinsuffizienz nachträglich verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde der NT-proBNP-Wert von allen Blutproben bestimmt, die 2007 und 2008 gesammelt wurden. Insgesamt stand uns von 131 Patienten das Vollblut zur Verfügung. Hierunter befanden sich jedoch auch 16 Kontrollpatienten, die nicht im Matching enthaltenen waren.

Aus dem Serum konnten die NT-proBNP-Werte bestimmt werden (siehe Tab. 17). Werte unterhalb von 125 pg/ml Plasma (<75 Jahre) bzw. 450 pg/ml Plasma (>75Jahre) wurden als Ausschlusskriterium einer Herzinsuffizienz gewertet [89]. Von den 37 Fällen (14 akute / 23 chronische) wiesen 33 (89,2%) (13 akute / 20 chronische) erhöhte Werte auf. Dadurch konnte bei diesen Patienten die Eingruppierung als Fall und damit das Vorhandensein von Herzscheiden klinisch bestätigt werden. Diese Werte liegen sogar leicht über den Werten der Koc-Studie [95]. Durch die Messung der NT-proBNP-Werte konnte jedoch bei den Kontrollen eine bestehende Herzscheiden nicht ausgeschlossen werden. Von 94 Patienten, die eigentlich als Kontrollen definiert waren, wiesen 51 (54,3%) Patienten erhöhte Werte auf und müssten daher eigentlich der Gruppe der Fälle zugeordnet werden (siehe Abb. 48).

Abb. 48: Verteilung der NT-proBNP-Werte in den untersuchten Proben

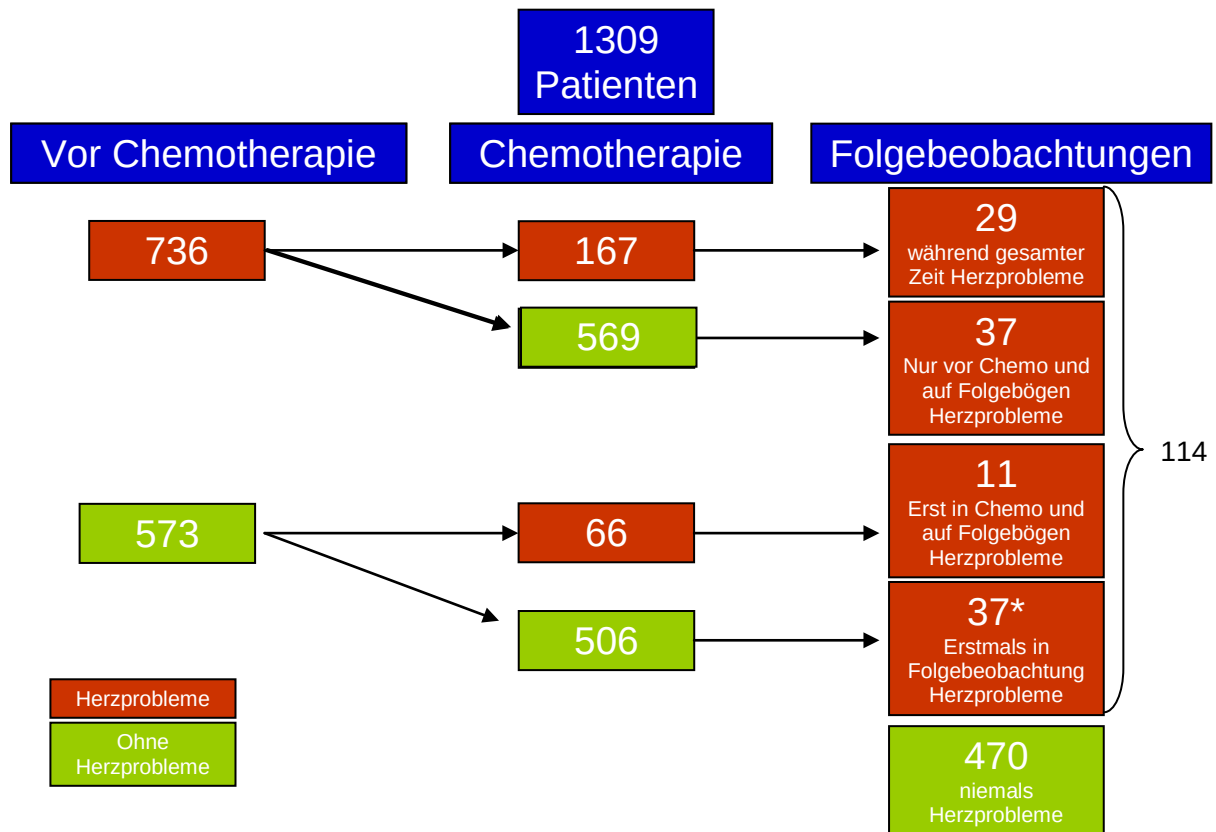
NT-proBNP hoch	Fälle Akute und Chronische	Kontrollen	Gesamt
Nein	4 (10,8%)	44 (45,7%)	47
Ja	33 (89,2%)	51 (54,3%)	84
Total	37 (28,2%)	94 (71,8%)	131

Abb. 49: Graphische Darstellung aller herzgeschädigter Patienten unter Berücksichtigung der übergeordneten Textfelder



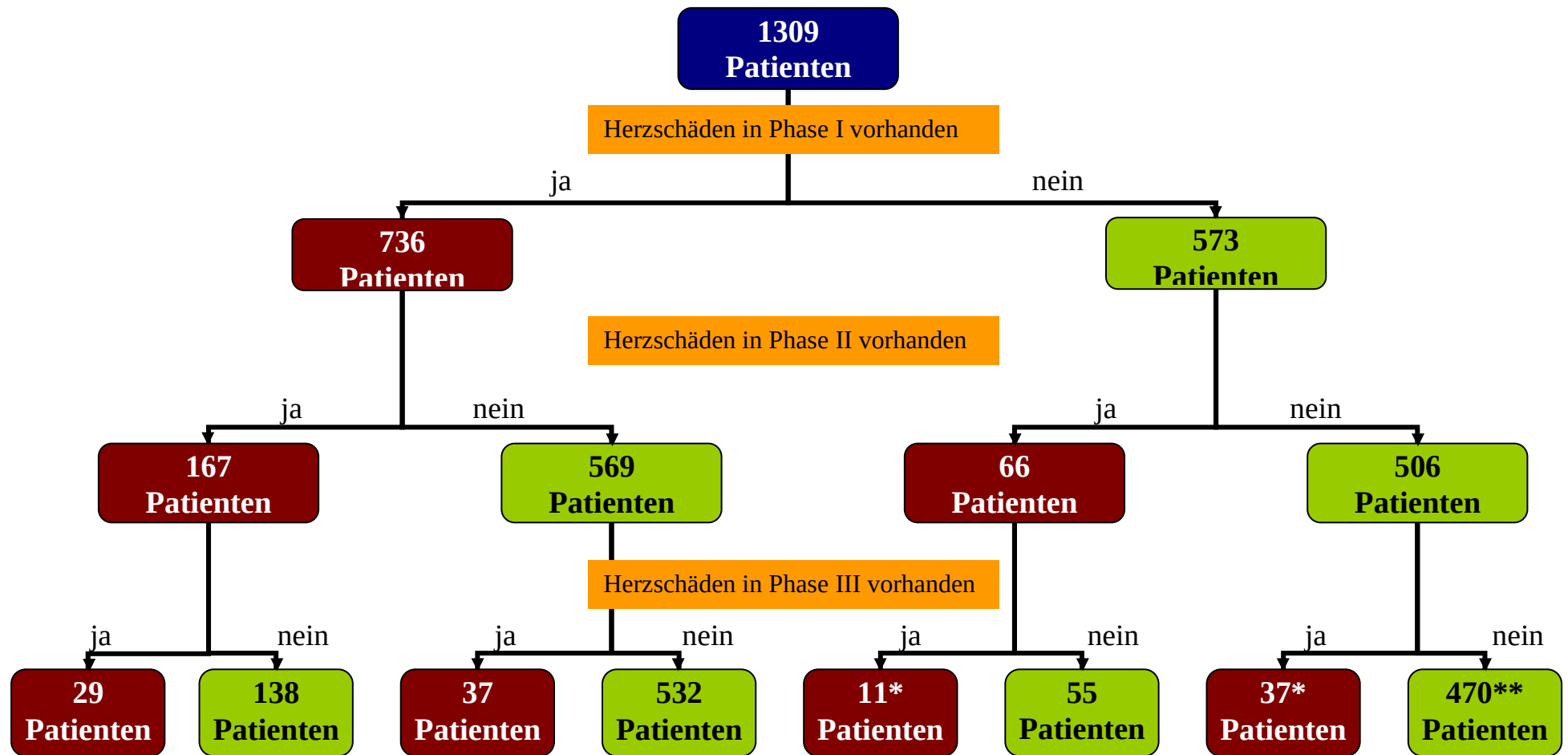
- * inklusive 1 Patient mit Herzproblemen ausschließlich auf einem der SUE-Bögen und 1 Patient mit Herzproblemen ausschließlich im Bemerkungsfeld des Arztes ohne Datum
- ** Diese 231 Patienten unterteilen sich in a) 220 Patienten, deren Herzprobleme in den Dokumentationsbögen der Phasen II vermerkt waren und b) 11 Patienten, deren Herzprobleme nur in den Extraspalten von dem Arzt oder der Eingabe oder auf den SUE bzw. Todesbögen vermerkt waren (Einsortierung anhand des Datums der SUE-/Todesbögen in die Phase II)
- *** Diese 28 Patienten unterteilen sich in a) 21 Patienten deren Herzprobleme in den Dokumentationsbögen der Phasen III vermerkt waren und b) 7 Patienten, deren Herzprobleme nur in den Extraspalten von dem Arzt oder auf den SUE bzw. Todesbögen vermerkt waren (Einsortierung anhand des Datums der SUE-/Todesbögen in die Phase III)

Abb. 50: Graphische Darstellung der Patienten mit sicheren Herzschäden unter Berücksichtigung der übergeordneten Textfelder



* Diese 37 Patienten unterteilen sich in a) 34 Patienten deren Herzprobleme in den Dokumentationsbögen der Phasen III vermerkt waren und b) 3 Patienten, deren Herzprobleme nur in den Extraspalten von dem Arzt oder auf den SUE bzw. Todesbögen vermerkt waren (Einsortierung anhand des Datums der SUE-/Todesbögen in die Phase III)

Abb. 51: Flussdiagramm der sicher herzgeschädigten Patienten



* Fälle, mit denen die Genotypisierungsstudie durchgeführt werden soll

** von diesen 470 Kontrollen sollen nur 311 Kontrollen für die Genotypisierungsstudie verwendet werden (welche weder sichere noch unsichere Herzschäden aufwiesen)

Nach Abschluss aller Sammelaktionen lagen von insgesamt 263 Patienten Blutproben vor, mit denen anschließend das Matching durchgeführt wurde. Unsere Studienpopulation, mit der schlussendlich die Genotypisierungsstudie durchgeführt wurde, bestand aus 150 B-Zell-Lymphom-Patienten, die sich aus 56 Fällen und 94 Kontrollen zusammensetzte. Klinisch lassen sich die eingeschlossenen B-Zell-Patienten, wie in Abb. 52 gezeigt, beschreiben.

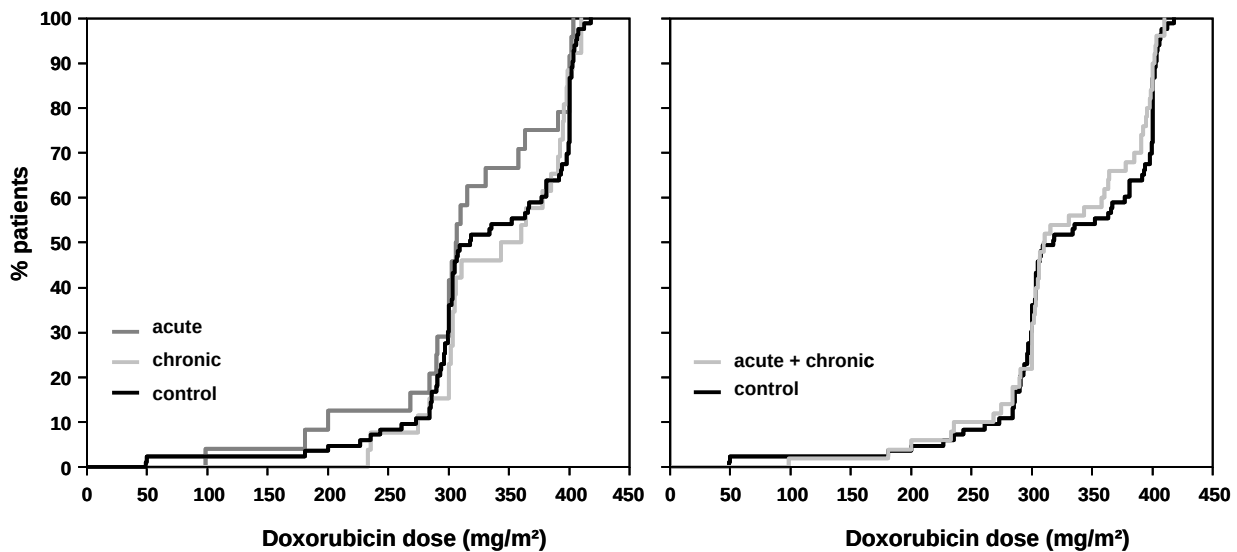
Abb. 52: Klinische Parameter der gematchten Patienten

	acute	chronic	acute + chronic	control
Number of patients	28	28	56	94
Median age, years (range)	71 (61-80)	66 (62-77)	68 (61-80)	67 (62-79)
Male sex, (%)	12 (42.9)	13 (46.4)	25 (44.6)	46 (48.9)
Female sex, (%)	16 (57.1)	15 (53.6)	31 (55.4)	48 (51.1)
IPI factors				
Age > 60 years, (%)	28 (100.0)	28 (100.0)	56 (100.0)	94 (100.0)
LDH > UNV, (%)	12 (42.9)	12 (42.9)	24 (42.9)	31 (33.0)
ECOG > 1, (%)	1 (3.6)	2 (7.1)	3 (5.4)	7 (7.4)
Stage III / IV, (%)	17 (60.7)	14 (50.0)	31 (55.4)	45 (47.9)
Extranodal disease >1, (%)	11 (39.3)	2 (7.1)	13 (23.2)	17 (18.1)
IPI score, (%)				
1	8 (28.6)	9 (32.1)	17 (30.4)	35 (37.2)
2	5 (17.9)	10 (35.7)	15 (26.8)	29 (30.9)
3	9 (32.1)	7 (25.0)	16 (28.6)	23 (24.5)
4,5	6 (21.4)	2 (7.1)	8 (14.3)	7 (7.4)
Reference histology				
DLBC, (%)	21 (75.0)	20 (71.4)	41 (73.2)	79 (85.9)*
Other, (%)	7 (25.0)	8 (28.6)	15 (26.8)	13 (14.1)*
Treatment				
6 x CHOP-14	4 (14.3)	5 (17.9)	9 (16.1)	16 (17.0)
8 x CHOP-14	11 (39.3)	8 (28.6)	19 (33.9)	26 (27.7)
6 x CHOP-14 + 8 x R	5 (17.9)	5 (17.9)	10 (17.9)	20 (21.3)
8 x CHOP-14 + 8 x R	8 (28.6)	10 (35.7)	18 (32.1)	32 (34.0)

* 2 missing values

Die kumulativen Dosiskurven für das tatsächlich verabreichte Dox sind nahezu deckungsgleich zwischen der Fall und Kontrollgruppe (siehe Abb. 53). Ebenso besteht zwischen den Gruppen kein Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben.

Abb. 53: Kumulative Dosiskurven Dox/m² KOF für B-Zellpatienten



7.7.3 Identifizierung von genetischen Polymorphismen

Alle im Matching ausgewählten Fälle und Kontrollen sollten genotypisiert werden. Es stellte sich jedoch heraus, dass einige der Proben (Pat.-ID: 238, 249, 476, 676, 704, 729, 733, 942), die bereits 2003 gesammelt worden sein sollten, sich nicht in dem Studienmaterial befanden (siehe gelb markierte Zeilen in Tab. 24). Die verbleibenden Proben wurden von Herrn Dr. M. Toliat, Cologne Center for Genomics (CCG) der Universität Köln genotypisiert. Zusätzlich wurden alle Kontrollen mit einem normalen NT-proBNP-Wert genotypisiert, unabhängig davon ob sie im Matching enthalten waren oder nicht.

Um die Richtigkeit der Probenbeschriftung mit dem genetischen Material überprüfen zu können und um sicherzustellen, dass alle 3 verschiedenen Sammlungsaktionen in sich kohärente Ergebnisse liefern, wurden von einigen Fall-Patienten (211; 225; 242; 268; 437; 498; 515; 690) jeweils 2 Blutproben (aus der Sammlungsaktion von 2003 und von 2008) genotypisiert. Da das genetische Material über die Zeit konstant bleibt, sollte mit diesem Schritt Verwechslungen bei der Probenaufarbeitung ausgeschlossen werden. In der Auswertung der Genotypisierungsdaten fiel jedoch auf, dass bei 4 der 8 doppelt genotypisierten Proben (242; 437; 515 und 690) Diskrepanzen zwischen den Proben von 2003 und 2008 vorlagen. Die Gruppe um Dr. Mladen Tzvetkov, aus der kooperierenden Abteilung für klinische Pharmakologie in Göttingen, bemerkte in ihrem Probensatz ebenfalls diese Diskrepanzen. Sie konnten mittels einer Geschlechtsbestimmung ihrer Proben und dem Vergleich des tatsächlichen Geschlechtes laut Studiendokumentation zeigen, dass es zu einer Verschiebung der DNA-Beschriftung ab den Probestammmnummern > 4000 gekommen sein musste. Da bei uns ebenfalls Probestammmnummern > 4000 im Matching enthalten waren (unter anderem auch die 4 doppelt vorhandenen Proben der Pat. ID: 242, 437, 515 und 690), wurden sowohl von den 2003 gesammelten Proben, als auch von den neuen Proben das Geschlecht bestimmt. In unseren Proben kam es ebenfalls, wie bei der Göttinger Gruppe, zu dieser Verschiebung der Probestammmnummern ab > 4000. Daraufhin wurden alle für unsere Analysen verwendeten Probestammmnummern, die größer als 4000 waren, um exakt eine Nummer verschoben. Um sicher zu gehen, dass nach der Verschiebung der Probestammmnummern die Patienten-ID jetzt tatsächlich mit der vorliegenden DNA-Probe übereinstimmt, wurden alle im Matching enthaltenen Probestammmnummern > 4000 und die doppelt vorliegenden Proben erneut genotypisiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach der Verschiebung sowohl das Geschlecht mit dem tatsächlichen Geschlecht (laut Studiendokumentation) übereinstimmte, als auch dass alle untersuchten Polymorphismen in den Proben 2003 mit denen von 2007 / 2008 übereinstimmten. Daher wurde

von allen Probestammmnummern > 4000 die Genotypisierungsdaten nach der Korrektur der Probenverschiebung verwendet.

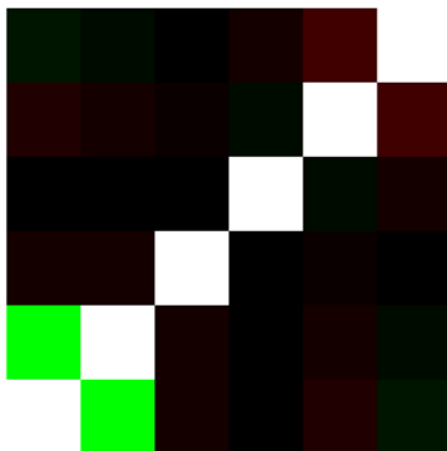
In unseren Untersuchungen sollten die genetischen Varianten von Dox Transportern (MRP1, MRP2) sowie der NAD(P)H-Oxidase (RAC2, CYBA und NCF4) verifiziert werden, die bereits in der NHLB-Publikation [20] mit einer erhöhten Inzidenz für Herzschäden assoziiert waren.

7.7.4 Kardiotoxizitätsanalyse

Univariate Analyse:

Nach Abschluss der Genotypisierung des vorhandenen genetischen Materials, wurden die statistischen Auswertungen von Herrn Dipl. Inf. Markus Kreuz vom Institut für Medizinische Informatik (IMISE) aus Leipzig durchgeführt. Um sicher zu gehen, dass die Genotypisierung korrekt verlaufen ist, wurden zahlreiche Qualitätstests durchgeführt. Abweichungen vom Hardy Weinberg Gleichgewicht (HWE) wurden durch den Pearson χ^2 –Anpassungstest und den HWE-exact Test ermittelt. Das HWE sollte hierbei mindestens 0,1 sein. Dabei sind Probleme mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht für 2 SNP aufgetreten: Für MRP2_rs8187694 ergaben sich sehr deutliche Abweichungen (fehlen eines Genotyps) und für NCF4_rs1883112 bestand eine leichte Abweichung. Da von MRP2 ein weiterer SNP genotypisiert wurde (MRP2_rs8187710), welcher deutlich mit diesem SNP gelinkt (siehe Abb. 54) und von dem das HWE erfüllt war, wurde MRP2_rs8187694 aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Abb. 54: HeatMap der untersuchten Polymorphismen



In dem oben dargestellten HeatMap sind die SNPs in der Reihenfolge MRP2_rs8187710, MRP2_rs8187694, MRP1_rs45511401, CYBA_rs4673, NCF4_rs1883112, RAC2_rs13058338 von links nach rechts, bzw. von unten nach oben aufgetragen. Die Farbgebung markiert den Korrelationskoeffizienten zwischen den SNP. Dieser wird von -1 (rot) bis +1 (hellgrün) dargestellt. Hierbei bedeutet eine grüne Farbgebung eine deutliche räumliche Nähe zwischen den beiden SNPs zueinander.

Außerdem wurde die minor allele frequency (MAF) bestimmt. Die MAF sollte größer als 5% sein, um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können. Von 2 SNP, MRP2_rs8187710, MRP1_rs45511401, war die MAF kleiner als 5% wodurch die Power bei diesen beiden SNP sehr gering ist.

Für die Assoziationsstudien wurden die für solche Analysen üblichen Trend-Tests (exact logistic regression und der Cochran-Armitage trend test), aber auch die Wildtypdominant-

Modelle (exact logistic regression /Fisher Test) und die Wildtyprezessive-Modelle (exact logistic regression /Fisher Test) errechnet.

Dabei wurden folgende Gruppen miteinander verglichen:

1. Akute Fälle versus Kontrollen
2. Chronische Fälle versus Kontrollen
3. Akute und chronische Fälle versus Kontrollen

In keiner dieser Gruppen konnte eine statistisch signifikante Assoziation eines der untersuchten Polymorphismen mit dem Auftreten von Herzscheiden festgestellt werden (siehe Tab. 14, Tab. 15 und Tab. 16). Einzig in der Gruppe 2 wurde eine Borderlinesignifikanz für CYBA im WT-rezessiven-Modell beobachtet. Generell fiel jedoch ein Trend für CYBA, RAC2 und NCF4 auf, bei dem jeweils im WT-rezessiven-Modell eine Anreicherung bestimmter Genotypen in den Fällen / Kontrollen nachgewiesen wurden (siehe Tab. 14, Tab. 15 und Tab. 16).

Der von uns untersuchte Polymorphismus rs4673 befindet sich im CYBA-Gen, welches die p22^{phox} Untereinheit (22 kDa) der NAD(P)H-Oxidase kodiert. In unserer Studie wurden folgende Verteilung der Genotypen beobachtet:

In der Patientengruppe 1 (akut vs. Kontrolle) waren 16.39% der Patienten Träger des Genotyps T/T, 35.25% von C/T und 48.36% von C/C. Für diesen Polymorphismus betrug die MAF 34.02% und das HWE 0.02. In der Patientengruppe 2 (chronisch vs. Kontrolle) war die Verteilung der Genotypen bei T/T=15.57%; C/T=39.34% und C/C=45.08%. Die MAF betrug 35.25% und das HWE lag bei 0.13. In der Patientengruppe 3 (akut und chronisch vs. Kontrolle) war die Verteilung der Genotypen bei T/T=14.67%; C/T=40.67% und C/C=44.67%. Die MAF betrug 35.0 % und das HWE lag bei 0.19.

In allen 3 Patientengruppen (akut, chronisch, akut+chronisch) konnte in dem Wildtyprezessiven Modell bei den Fällen eine Anreicherung von T/T und C/T beobachtet werden, während bei den Kontrollen C/C leicht überwog (siehe Abb. 55). In der Patientengruppe 2 konnte eine Borderlinesignifikanz ($p=0.053$) (siehe Tab. 14, Tab. 15) festgestellt werden. Die Odds Ratios für diesen Effekt lagen in der Patientengruppe 1 bei 1.33 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.52-3.47, in der Patientengruppe 2 bei 2.51 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.93-8.41 und in der Patientengruppe 3 bei 1.79 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.87-4.02. Damit wiesen die Patienten, die die Genotypen T/T bzw. C/T trugen, eine größere Wahrscheinlichkeit auf, an Herzscheiden zu erkranken, als Patienten mit dem Genotyp C/C.

Tab. 14: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Gruppe der akuten Fälle versus den Kontrollen

	Trend Test			Wildtyp dominant		Wildtyp rezessive	
SNP_Names	Trend_exact regression.Test	logistic	Trend_ ge.Test	Armita- Fisher.Test	WT_dominant_exact logis- tic regression	WT_recessive_ Fisher.Test	WT_recessive_exact logistic regression
MRP2_rs8187710	NA		NA	NA	NA	0.715	0.716
MRP2_rs8187694	NA		NA	NA	NA	1.000	1.000
MRP1_rs45511401	NA		NA	NA	NA	0.451	0.450
CYBA_rs4673	1.000		0.989	0.561	0.564	0.527	0.528
NCF4_rs1883112	0.777		0.675	0.804	0.805	0.822	0.821
RAC2_rs13058338	0.133		0.122	0.695	0.697	0.116	0.116

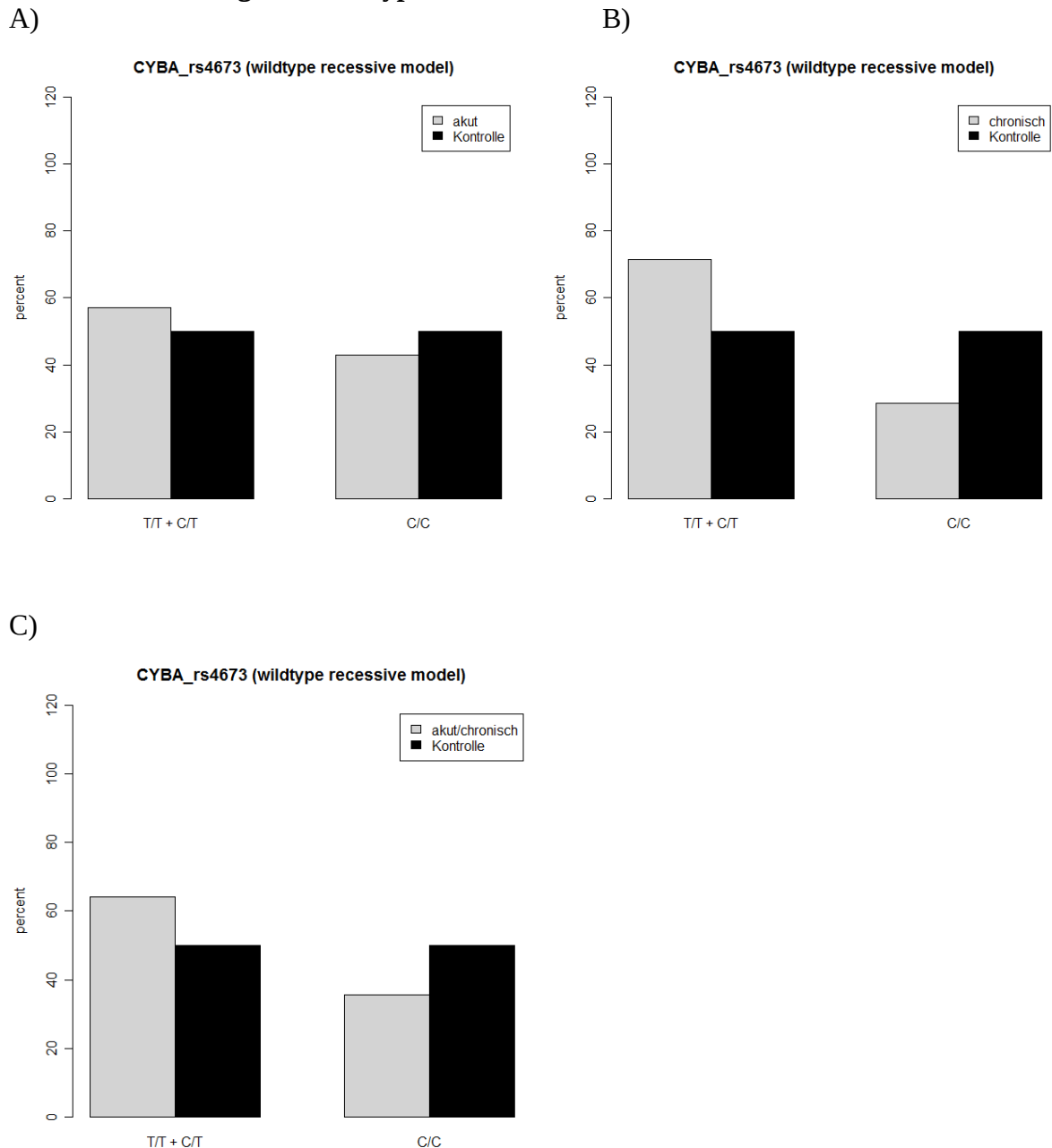
Tab. 15: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Gruppe der chronischen Fälle versus den Kontrollen

	Trend Test			Wildtyp dominant		Wildtyp rezessive	
SNP_Names	Trend_exact regression.Test	logistic	Trend Armitage.Test	WT_dominant_ Fisher.Test	WT_dominant_exact logis- tic regression	WT_recessive_ Fisher.Test	WT_recessive_exact logistic regression
MRP2_rs8187710	NA		NA	NA	NA	0.715	0.717
MRP2_rs8187694	NA		NA	NA	NA	1.000	1.000
MRP1_rs45511401	NA		NA	NA	NA	0.729	0.726
CYBA_rs4673	0.554		0.499	0.237	0.238	0.053	0.053
NCF4_rs1883112	0.315		0.276	0.307	0.304	0.651	0.654
RAC2_rs13058338	0.859		0.785	0.350	0.348	0.365	0.364

Tab. 16: Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Gruppe der akuten und chronischen Fälle versus den Kontrollen

	Trend Test			Wildtyp dominant			Wildtyp rezessive	
SNP_Names	Trend_exact regression.Test	logistic	Trend_ ge.Test	Armita-	WT_dominant_ Fisher.Test	WT_dominant_exact lo- gistic regression	WT_recessive_ Fisher.Test	WT_recessive_exact logistic regression
MRP2_rs8187710	NA		NA		NA	NA	0.774	0.774
MRP2_rs8187694	NA		NA		NA	NA	1.000	1.000
MRP1_rs45511401	NA		NA		NA	NA	0.768	0.766
CYBA_rs4673	0.721		0.668		0.156	0.157	0.094	0.095
NCF4_rs1883112	0.367		0.334		0.318	0.320	0.598	0.595
RAC2_rs13058338	0.280		0.232		0.744	0.745	0.084	0.084

Abb. 55: Verteilung der Genotypen von CYBA in den Kontrollen und Fällen



In den Abb.A-C wurden die Patientenzahlen je Genotyp bezogen auf das Gesamtkollektiv der Subgruppe (akut, chronisch, akut+chronisch versus Kontrolle) dargestellt.

Der NCF4-Polymorphismus rs1883112

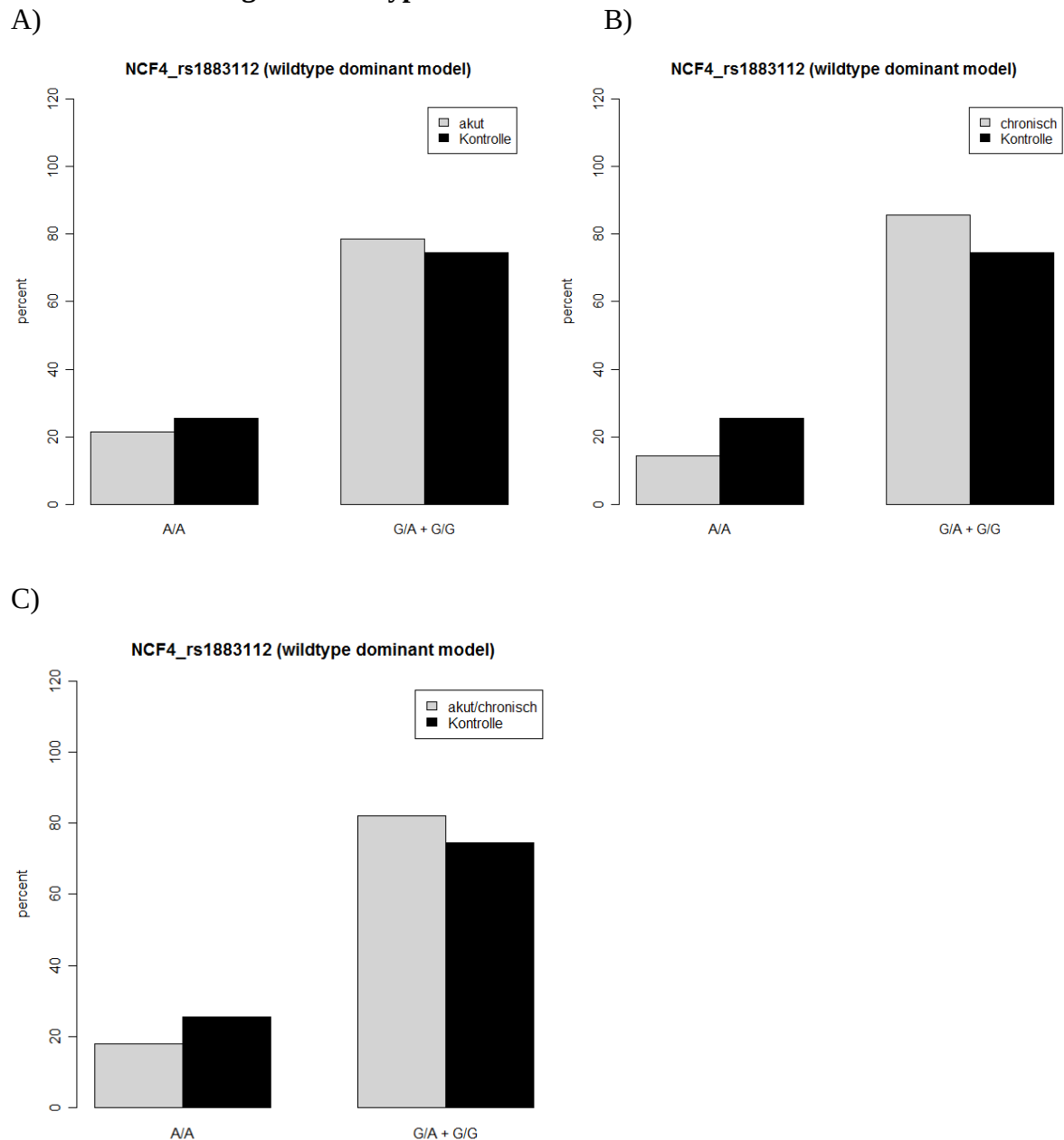
Der zweite Polymorphismus, der in unseren Untersuchungen eine Korrelation zur Herzschildigung aufwies, war der SNP NCF4 rs1883112. NCF4 codiert für die p40^{phox} Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase. In unserer Studie konnte folgende Verteilung der Genotypen beobachtet werden (siehe Abb. 56).

In der Patientengruppe 1 (akut vs. Kontrolle) waren 24.59% der Patienten Träger des Genotyps A/A; 41.8% von G/A und 33.61% von G/G. Für diesen Polymorphismus betrug die MAF 45.49% und das HWE 0.08. In der Patientengruppe 2 (chronisch vs. Kontrolle) war die Verteilung der Genotypen bei A/A=22.95%; G/A=42.62% und G/G=34.43%. Die MAF betrug 44.26% und das HWE lag bei 0.13. In der Patientengruppe 3 (akut und chronisch vs. Kontrol-

le) war die Verteilung der Genotypen A/A=22.67%; G/A=42.67% und G/G=34.67%. Die MAF betrug 44.0% und das HWE lag bei 0.10.

In allen 3 Patientengruppen (akut, chronisch, akut+chronisch) konnte im Wildtyp-dominanten Modell bei den Kontrollen eine leichte Anreicherung von A/A und G/A beobachtet werden, während bei den Fällen G/G leicht überwiegt (siehe Abb. 56). Die Odds Ratio für diesen Effekt lag in der Patientengruppe 1 bei 0.8 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.24-2.36, in der Patientengruppe 2 bei 0.49 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.12-1.63 und in der Patientengruppe 3 bei 0.64 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.24-1.54.

Abb. 56: Verteilung der Genotypen von NCF4 in den Kontrollen und Fällen



In den Abb.A-C wurden die Patientenzahlen je Genotyp bezogen auf das Gesamtkollektiv der Subgruppe (akut, chronisch, akut+chronisch versus Kontrolle) dargestellt.

Der RAC2 Polymorphismus rs13058338

Der letzte von uns untersuchte Polymorphismus, der mit dem vermehrten Auftreten einer Herzschrädigung verbunden war, war der SNP RAC2 rs13058338.

In unserer Studie konnte folgende Verteilung der Genotypen beobachtet werden:

In der Patientengruppe 1 (akut vs. Kontrolle) waren 8.2% der Patienten Träcker des Genotyps A/A; 27.87% von T/A und 63.93% von T/T. Für diesen Polymorphismus betrug die MAF: 22.13% und das HWE 0.03. In der Patientengruppe 2 (chronisch vs. Kontrolle) war die Verteilung der Genotypen bei A/A=5.74%; T/A=28.69% und T/T=65.57%. Die MAF betrug 20.08% und das HWE lag bei 0.24.

In der Patientengruppe 3 (akut und chronisch vs. Kontrolle) war die Verteilung der Genotypen A/A=6.67%; T/A=30.67% und T/T=62.67%. Die MAF betrug 22.0% und das HWE lag bei 0.19.

In allen 3 Patientengruppen (akut, chronisch, akut+chronisch) konnte im Wildtyp-rezessiven Modell bei den Fällen eine leichte Anreicherung von A/A und T/A beobachtet werden, während bei den Kontrollen T/T leicht überwiegt (siehe Abb. 57). Die Odds Ratio für diesen Effekt lag in der Patientengruppe 1 bei 2.16 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.83-6.32, in der Patientengruppe 2 bei 1.6 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.61-4.2 und in der Patientengruppe 3 bei 1.84 mit einem 95% Konfidenzintervall von 0.88-4.05.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Patienten, die die Genotypen A/A bzw. T/A tragen, eine größere Wahrscheinlichkeit aufweisen an Herzschräden zu erkranken, als Patienten mit dem Genotyp T/T.

Die Polymorphismen MRP2_rs8187710 und MRP1_rs45511401

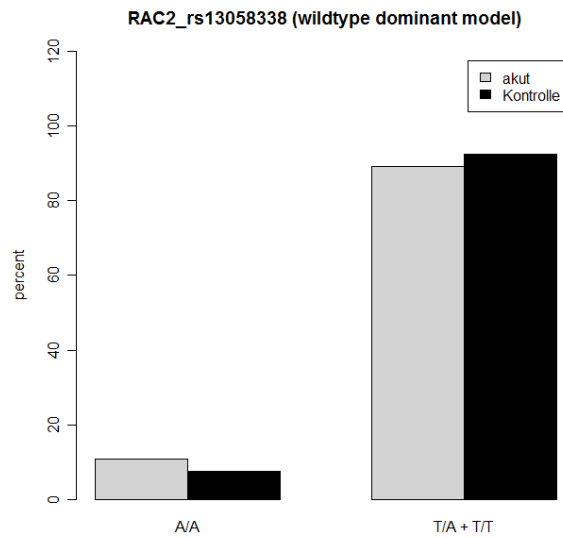
MRP1 und MRP2 (Multidrug Resistance Proteine) gehören zur Klasse C der ABC-Transporter.

In unseren Untersuchungen war die MAF für MRP2_rs8187710 und für MRP1_rs45511401 kleiner als 5 (MRP2 akut: 4.55; chronisch: 4.55; akut+chronisch: 4.7; MRP1 akut: 4.1; chronisch: 4.96; akut+chronisch: 4.36), da jeweils nur 2 Genotypen beobachtet wurden (fehlendes Genotyp bei MRP2: A/A und MRP1: T/T). Für keinen der beiden SNP konnte eine Korrelation eines Genotyps mit dem verstärkten Auftreten von Herzschrädigungen nachgewiesen werden (siehe Abb. 58).

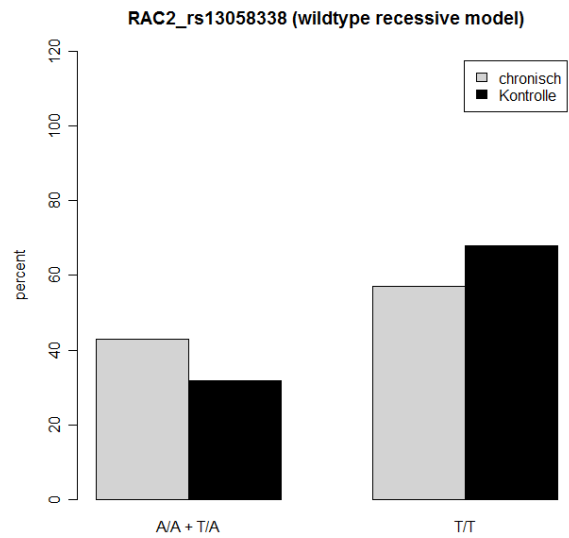
Da für uns hauptsächlich die Patientengruppe 3 (akut und chronisch vs. Kontrolle) von Bedeutung war, wurden alle Ergebnisse dieser Gruppe in Abb. 59 zusammenfassend dargestellt. Hierbei ist zu beachten, dass für diese Auswertung, ähnlich wie bei der Publikation von Wojnowski et al. [20] die logistische Regressionsanalyse unter der Annahme von asymmetrischen Konfidenzintervallen durchgeführt wurde.

Abb. 57: Verteilung der Genotypen von RAC2 in den Kontrollen und Fällen

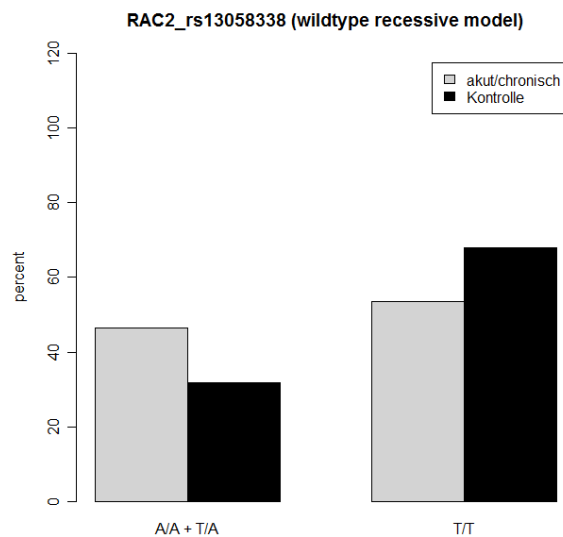
A)



B)



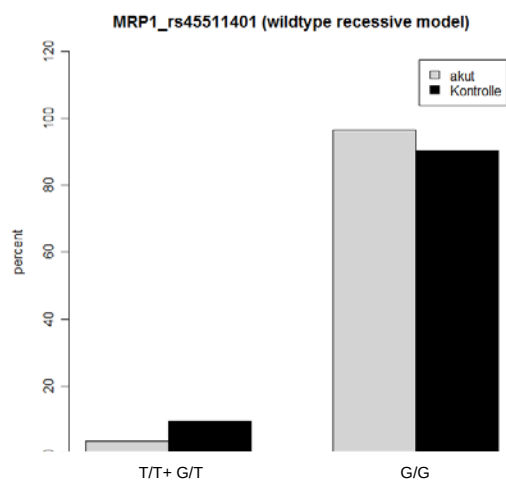
C)



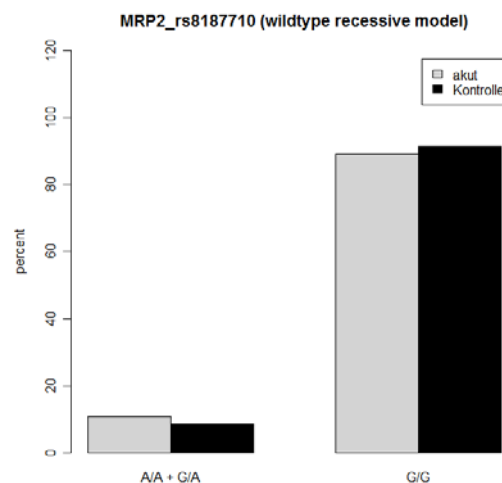
In den Abb.A-C wurden die Patientenzahlen je Genotyp bezogen auf das Gesamtkollektiv der Subgruppe (akut, chronisch, akut+chronisch versus Kontrolle) dargestellt.

Abb. 58: Verteilung der Genotypen von MRP1 und MRP2 in den Kontrollen und Fällen

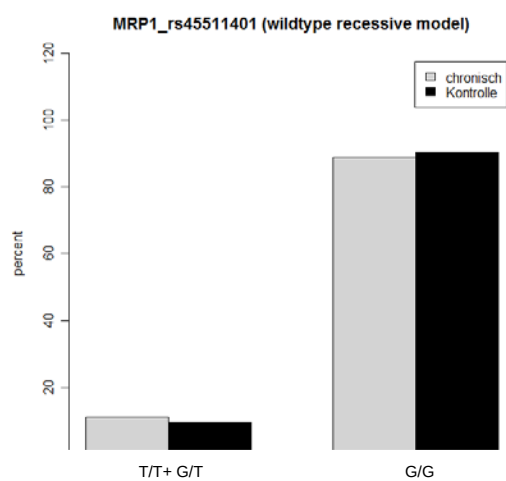
A1)



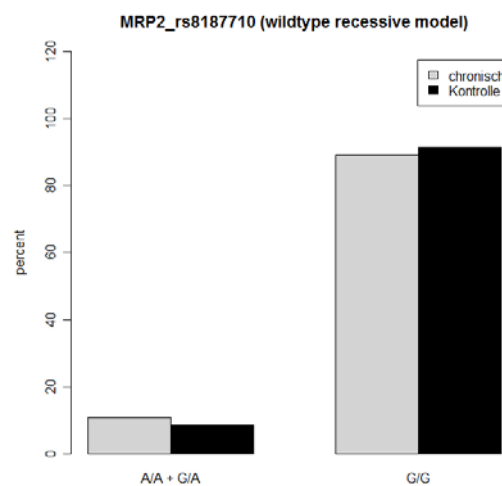
B1)



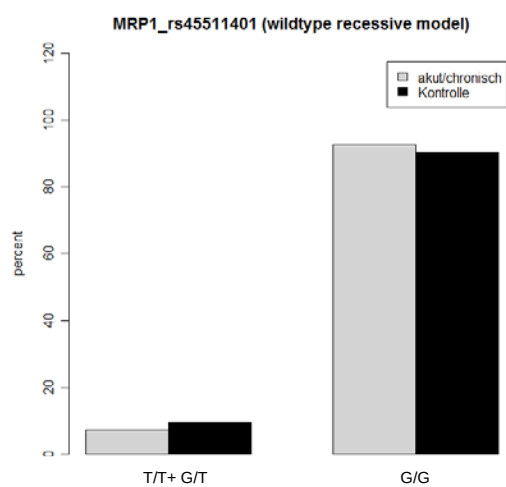
A2)



B2)



A3)



B3)

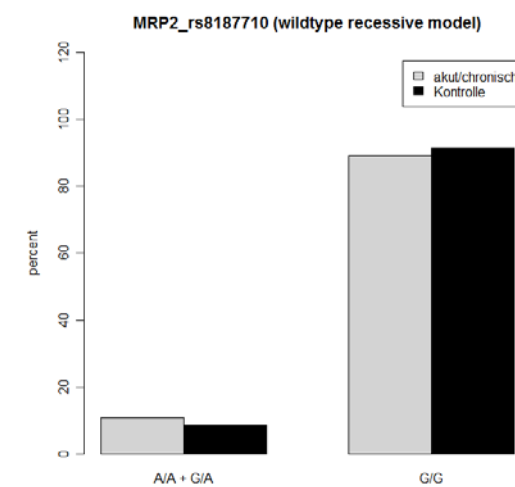


Abb. 59: Univariate logistic regressions Analyse

Gene variant		Genotype distribution		Effect size	
Gene	SNP rs_number	Genotypes*	n acute/chronic n control	Odds ratio logistic regression (95% CI)	p-value logistic regression
MRP2	rs8187710	<u>GG/GA/AA</u>	50 / 6 / 0 85 / 8 / 0	1.3 (0.4;3.9)	0.669
MRP2	rs8187694	<u>TT/TA/AA</u>	50 / 6 / 0 85 / 9 / 0	1.1 (0.4;3.4)	0.822
MRP1	rs45511401	<u>CC/CA/AA**</u>	51 / 4 / 0 85 / 9 / 0	0.7 (0.2;2.5)	0.632
CYBA	rs4673	<u>CC/CT/TT</u>	20 / 31 / 5 47 / 30 / 17	1.8 (0.9;3.6)	0.090
NCF4	rs1883112	<u>GG/GA/AA</u>	21 / 25 / 10 31 / 39 / 24	0.6 (0.3;1.4)	0.280
RAC2	rs13058338	<u>TT/TA/AA</u>	30 / 23 / 3 64 / 23 / 7	1.8 (0.9;3.7)	0.077

* underlined genotype(s) predisposing to ACT according to Wojnowski et al.

** In Wojnowski et al. GG/GT/TT

7.7.5 Multivariate Kardiotoxizitätsanalyse

Für die 2 Polymorphismen (CYBA und RAC2), für die bereits in der univariaten Analyse ein ähnlicher Trend wie in der Publikation von Wojnowski et al. [20] gezeigt werden konnte, wurde eine Adjustierung der Daten nach Geschlecht und Alter der Patienten, sowie nach der verabreichten Dox-Dosis vorgenommen und eine multivariate Analyse durchgeführt (siehe Abb. 60).

Abb. 60: Multivariate logistic regressions Analyse

Acute/chronic vs. control			
	OR	95% CI	p-value
CYBA_rs4673 (CT/TT vs. CC)	1.9	(0.9; 4.1)	0.089
female gender	0.9	(0.5; 2.0)	0.887
age > 68 years (median)	1.1	(0.5; 2.3)	0.784
doxorubicin > 311 mg/m ² (median)	1.0	(0.5; 2.0)	0.926
RAC2_rs13058338 (TA/AA vs. TT)	2.3	(1.1; 4.7)	0.028
female gender	1.1	(0.6; 2.3)	0.738
age > 68 years (median)	1.1	(0.5; 2.4)	0.715
doxorubicin > 311 mg/m ² (median)	0.8	(0.4; 1.8)	0.648

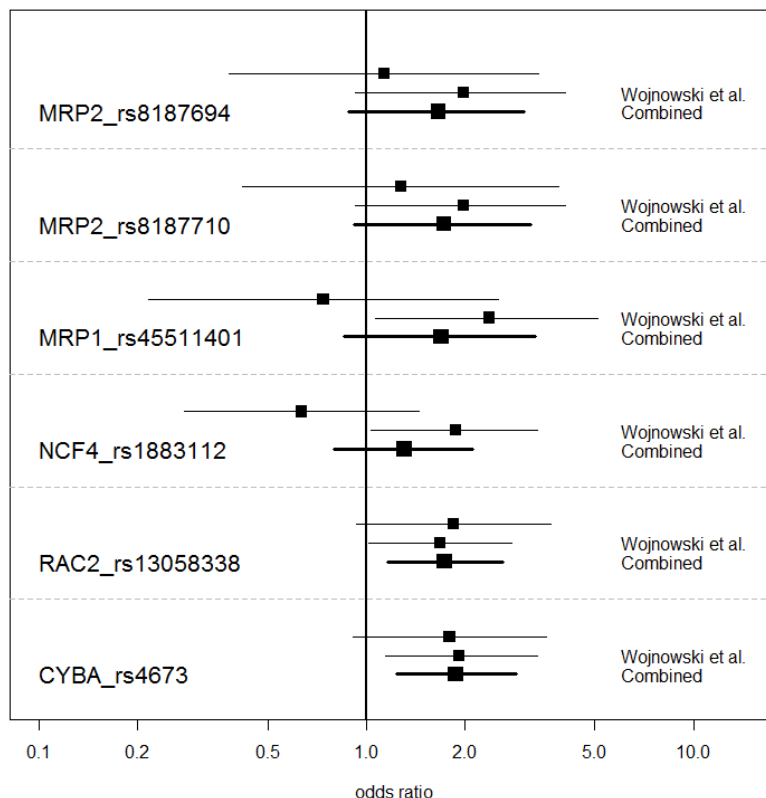
Die 3 Parameter (weibliches Geschlecht, hohes Alter und Dox-Dosen > 300 mg/m²) wurden ausgewählt, da diese besonders für die Entstehung einer Dox-induzierten Herzschränkung prädestinieren. Für den RAC2-Polymorphismus konnte hierbei ein signifikanter Zusammenhang mit dem Auftreten der Herztoxizität gezeigt werden.

7.7.6 Metaanalyse zwischen unserer Studie und der von Wojnowski et al. aus dem Jahr 2005 [20]

Um unsere Studie in einen Zusammenhang zu der Studie von der Gruppe um Wojnowski et al. [20] bringen zu können, wurde eine Metaanalyse durchgeführt. Hierzu wurden für jeden untersuchten Polymorphismus beide Studien separat dargestellt und anschließend mit Hilfe eines „Fixed effect modell“ direkt miteinander verglichen (siehe Abb. 61). In der Abbildung wurden die Log Odds Ratios (log OR) als schwarze Quadrate und die Konfidenzintervalle als waagerechte Striche dargestellt. Je dicker die schwarzen Quadrate sind, umso stärker ist die Power der Aussage (abhängig vom Standardfehler). In dem Fixed effect model wird der Tatsache Rechnung getragen, dass in der Studie von 2005 asymmetrische Konfidenzintervalle verwendet wurden.

In allen 3 Gruppen ist auffällig, dass sowohl für CYBA, als auch für RAC2 beide Studien fast identische Ergebnisse liefern. Bei den Polymorphismen von NCF4 und MRP1 wurden in der aktuellen Studie gegensätzliche Werte im Vergleich zu der Studie von 2005 gefunden. Für den Polymorphismus von MRP2 wurden in der jetzigen Studie log OR mit der gleichen Richtung des Effektes beobachtet, jedoch mit einem größeren Konfidenzintervall im Vergleich zur Studie von 2005.

Abb. 61: Metaanalyse aller untersuchter Genotypen bei den akuten und chronischen Fällen vs. den Kontrollen



8 Diskussion

8.1 Ursachen der unterschiedlichen Empfindlichkeit der C57BL/6- und Balb/c-Mäuse auf die Gabe von Dox

8.1.1 HPLC-Untersuchungen nach der Injektion von 12mg Dox je kg Körpergewicht (akute Toxizität)

Aus der Literatur [102-104] ist bekannt, dass nach der i.v. Injektion von Dox sowohl Dox, als auch seine Metabolite in der Leber, dem Herz, im Plasma und anderen Organen wie Lunge, Niere und Dünndarm nachgewiesen werden können. Die Gruppe um Formelli et al. [102] konnte in der Leber die Metabolite 13-Dihydrodoxorubizin, Doxorubizinon und 7-Desoxy-Doxorubizinon nachweisen, wobei Doxorubizinon und 7-Desoxy-Doxorubizinon nur 5 min - 2 h nach der i.v. Injektion detektierbar waren. Die Dox-Spiegel im Herz, in der Leber und im Plasma waren in der gleichen Größenordnung wie in unseren Versuchen. Jedoch vermuteten die Autoren, dass die 13-Dihydrodoxorubizin-Konzentration aus einer Verunreinigung der injizierten Substanz herkommen könnte, da nach Bolanowska et al. [105] in den Mäusen Dox nur zu den Aglykonen metabolisiert wird. In unseren Untersuchungen konnte jedoch bei der Injektion der reinen Dox-Lösung in die HPLC-Anlage keine solche Verunreinigung nachgewiesen werden. Auch die Gruppe um Cumming et al. [103] konnte Doxol in ihren Dox behandelten Mäusen nachweisen, wodurch die Theorie von Formelli, Doxol wäre nur eine Verunreinigung der Dox-Lösung widerlegt zu sein scheint. Allerdings unterscheiden sich die Ergebnisse von Cumming et al. von unseren. Sie konnten Doxol nur für 20 min im Serum nachweisen, während es bei uns bis zu 24 h nach der i.p. Injektion noch nachweisbar war. Dieser Unterschied lässt sich jedoch durch die unterschiedliche Verabreichungsart erklären. Durch die i.p. Verabreichung lässt sich eine gewisse Zeitverzögerung sowohl bei der Anflutungs- als auch Ausscheidungsgeschwindigkeit erwarten. Außerdem war bei Cumming et al. Doxol nur in der Leber, der Niere und im Serum nachweisbar, und nicht wie bei uns auch im Herzen. Die gemessenen Dox-Konzentrationen liegen jedoch in der gleichen Größenordnung wie in unseren Untersuchungen.

8.1.1.1 Unterschiede bei der Dox-Resorption /-Ausscheidung

Aus den Untersuchungen von Silvia Seifert [66] war bekannt, dass die C57BL/6-Mäuse wesentlich stärkere Herzschäden als die Balb/c-Mäuse nach der i.p. Gabe von Dox entwickeln. In unseren Untersuchungen sollten die Ursachen für dieses Phänomen näher untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass in den C57BL/6-Mäusen nach der i.p. Gabe von 12 mg Dox je kg KG in den drei untersuchten Organen tatsächlich insgesamt viel höhere Gesamtmengen an Dox, Doxol und Doxon nachweisbar waren, als in den Balb/c-Mäusen. Dies war besonders unerwartet, da beide Mäusestämme mit exakt den gleichen Mengen an Dox behandelt wurden. Für diesen Befund sind verschiedene Ursachen denkbar. Zum Einen könnten die Balb/c-Mäuse Dox im gesamten Organismus anders verteilen, wodurch die niedrigeren Gesamtmengen in Herz, Leber und Blut zustande gekommen sein könnten. Sie könnten Dox aber auch zu einem geringeren Ausmaß aus dem Peritonealraum resorbieren oder es insgesamt schneller wieder ausscheiden als die C57BL/6-Mäuse. Aus der Literatur [102, 106] war bekannt, dass nach der Injektion von Dox sich dieses in der Leber, dem Herz und dem Plasma nachweisen lässt (neben Milz, Lunge, Niere und Darm). Da uns besonders die unterschiedliche Herztoxizität der beiden Mäusestämme interessierte, haben wir unsere Untersuchungen auf die Organe (Herz, Leber und Blut) beschränkt, die hierbei eine Rolle spielen. Tatsächlich

konnten wir zeigen, dass das Dox in den drei untersuchten Organen der Balb/c-Mäuse a) langsamer (Balb/c $t_{\max}$ innerhalb der drei Organe: 1 h versus C57BL/6 $t_{\max}$ innerhalb der drei Organe: 30 min) und b) zu einem geringeren Ausmaß (65% der $c_{\max}$ unserer Versuche von C57BL/6) anflutet als in den C57BL/6-Mäusen. Dabei resultieren die Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen hauptsächlich aus unterschiedlichen Geschwindigkeiten und Gesamtmengen im Herz und in der Leber, während im Blut kaum Unterschiede zwischen den beiden Mäusestämmen nachweisbar waren. Zusätzlich zu den unterschiedlichen Anflutungszeiten und nachgewiesenen Gesamtmengen sank bei den Balb/c-Mäusen die Konzentration von Dox und seiner Metabolite in den 3 untersuchten Organen schneller als bei den C57BL/6-Mäusen (nach 24 h: Balb/c: 21% von $c_{\max}$ unserer Versuche versus C57BL/6: 34% von $c_{\max}$ unserer Versuche). Dabei stammt der Unterschied in der Abflutungsgeschwindigkeit hauptsächlich aus unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der Leber. Im Blut und im Herzen wurden ähnliche Geschwindigkeiten festgestellt.

Daraus, dass im Blut sowohl die absoluten Mengen an Dox+Doxol+Doxon, als auch die An- und Abflutungszeiten zwischen beiden Mäusestämmen nahezu gleich sind, lässt sich ableiten, dass beide Mäusestämme Dox und seine Metabolite ähnlich aus dem Peritonealraum resorbieren. Dies würde bedeuten, dass in beiden Mäusestämmen gleich viel Dox im Organismus anflutet. Die beobachteten Unterschiede in den Gesamtmengen an Dox+Doxol+Doxon und den An-/Abflutungsgeschwindigkeiten würden daher am ehesten aus einer unterschiedlichen Verteilung von Dox und seiner Metabolite innerhalb der Maus resultieren. Sowohl im Herz und in der Leber konnten wir bereits die unterschiedliche Verteilung zwischen den Mäusestämmen nachweisen. Die insgesamt höheren Konzentrationen an Dox und seiner Metabolite und die längere Verweilzeit in den drei untersuchten Organen, stellen möglicherweise eine Ursache für die höhere Empfindlichkeit der C57BL/6-Mäuse gegenüber Dox im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen dar. Bereits in den Studien von van Dalen et al. und anderen [26, 27, 44] konnte nachgewiesen werden, dass höhere Spitzenspiegel an Dox zu stärkeren kardialen Schäden führen können im Vergleich zu der langsameren Applikation. Bei der Behandlung von Kindern mit Anthrazyklinen wurde dieses Erkenntnis bereits dahingehend umgesetzt [44, 107-109], dass vermehrt Dox-Dauerinfusionen anstelle von Bolusinjektionen angewendet werden.

8.1.1.2 Unterschiede bei der Dox-, Doxol- und Doxonverteilung in den drei untersuchten Organen

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Verteilung von Dox mit einem zwei [110, 111] bzw. drei-Kompartimentmodell [112-114] beschrieben werden kann. Unsere Untersuchungen deuten ebenfalls auf einen großen Verteilungsraum von Dox und seiner Metabolite hin. Noch 3 Tage nach der Injektion von 12 mg Dox konnten sowohl Dox selbst, als auch seine Metabolite im Blut nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies spricht für ein Tiefenkompartiment, aus dem stets weiteres Dox in die Blutbahn abgegeben wird. Als mögliches Tiefenkompartiment kämen z.B. das Fettgewebe und das Herz der Mäuse in Frage. Für das Herz als ein mögliches Tiefenkompartiment sprächen ausserdem die folgenden 2 Befunde: zum Einen wurde in den Herzen der Mäuse erst 24 h nach der i.p. Injektion eine signifikant geringere Konzentration an Dox im Vergleich zur Ausgangskonzentration nachgewiesen (im Blut betrug die Zeitdifferenz nur 6 h). Dies deutet auf ein langsames Abfluten von Dox aus diesem Gewebe hin. Zum Zweiten wurde bei der wiederholten Gabe von 3 mg Dox je kg KG (siehe 8.1.2) ein deutlicher Anstieg der Dox-Konzentration im Herzen im Vergleich zur einmaligen Gabe beobachtet, was ebenfalls auf ein sehr langsames Abfluten aus dem Herzgewebe hindeutet. Würde nach 1 Woche alles Dox aus dem Herzen eliminiert worden sein, dann wären vergleichbare Dox-Konzentrationen wie bei der ersten Gabe zu erwarten. Dass auch nach 1 Woche noch nicht alles Dox aus den Mäusen ausgeschieden worden ist, ist umso bemerkenswerter, da beim Menschen in der Regel keine einmaligen Dox-Dosen verab-

reicht werden, sondern bei den meisten Therapieprotokollen eine wöchentliche Dox-Applikation erfolgt. Möglicherweise stellt diese Anreicherung von Dox im Herzen eine Ursache dafür dar, warum die Dox-Toxizität mit der Anzahl der Chemotherapiezyklen zunimmt. Bei der detaillierten Betrachtung der Verteilung von Dox und seiner Metabolite in den drei untersuchten Organen konnten deutliche Unterschiede zwischen beiden Mäusestämmen nachgewiesen werden.

Dox

Obwohl beiden Mäusestämmen gemeinsam war, dass der größte Anteil an Dox innerhalb der drei untersuchten Organe in den Lebern nachgewiesen wurde, zeigten sich dennoch ein unterschiedliches Verteilungsmuster bei den restlichen untersuchten Organen der C57BL/6- und Balb/c-Mäuse. Bei den Balb/c-Mäusen wurde, bezogen auf die Gesamtmenge an Dox, die je Zeitpunkt im Herz+Leber+Blut nachgewiesen worden ist, ein viel größerer Anteil an Dox im Blut und im Herzgewebe detektiert, als dies bei den C57BL/6-Mäusen der Fall war (siehe Tab. 26). Außerdem wurde in den Experimenten mit 3 mg Dox (siehe 7.1.2) gezeigt, dass die wiederholte Gabe von Dox in den Balb/c-Mäusen zu einem insgesamt höheren Dox-Gehalt im Blut und einem deutlicheren Anstieg der Dox-Konzentration im Herzen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen führte. Hingegen wurde in den C57BL/6-Mäusen Dox innerhalb der drei untersuchten Organe zu einem wesentlich größeren Ausmaß (bis zu einem Drittel mehr) in die Leber verteilt, als dies bei den Balb/c-Mäusen der Fall war. Hieraus ergeben sich drei Schlussfolgerungen:

1. Die C57BL/6-Mäuse scheinen zwar im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen Dox zu einem geringeren Ausmaß in das Herz zu verteilen, dennoch wurden in den Herzen der C57BL/6-Mäuse höhere Spitzenspiegel bis zu 1 h nach der i.p. Injektion festgestellt. Dadurch mussten die Herzen der C57BL/6-Mäuse eine insgesamt höhere „Entgiftungsleistung“, als die der Balb/c-Mäuse verrichten.
2. Damit scheint die stärkere Anreicherung von Dox im Herzen der Balb/c-Mäuse nur einen untergeordneten Einfluss auf die Sensibilität gegenüber Dox zu spielen. Vielmehr scheint es von enormer Bedeutung zu sein, wieviel Dox sich im Organismus befindet und für wie lange Zeit.
3. Aus der Literatur ist bekannt (siehe z.B. Fachinformation Adriblastin), dass Dox hauptsächlich biliär (über die Galle/den Darm) und nur zu circa 15% über die Nieren eliminiert wird. Die bei den C57BL/6-Mäusen beobachtete stärkere Umverteilung von Dox in die Leber scheint tatsächlich zu einer schnelleren Ausscheidung von Dox im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen zu führen, was sich an einem früheren signifikanten Absinken der absoluten Dox-Konzentration gegenüber der Ausgangskonzentration festmachen ließ (C57BL/6-Mäuse: 6 h; Balb/c-Mäuse 24 h). Jedoch scheint die Eliminationsgeschwindigkeit der C57BL/6-Mäuse nicht auszureichen, um nach 24 h die Gesamtmenge an Dox und seiner Metabolite in den drei untersuchten Organen auf das gleiche niedrige Niveau, wie bei den Balb/c-Mäusen zu bringen. Dies lässt sich an den signifikant höheren Dox-Konzentrationen in den Lebern der C57BL/6-Mäuse und an dem langsameren Absinken der Gesamtkonzentration von Dox+Doxol+Doxon in den drei untersuchten Organen festmachen.

Doxol

Ebenso wie die Verteilung von Dox unterschied sich auch die Verteilung von Doxol zwischen den beiden Mäusestämmen. In den Balb/c-Mäusen ließ sich im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen bereits zu Beginn der Messung, ein ca. doppelt so hoher Doxolanteil im Blut und Herzgewebe nachweisen (bezogen auf die insgesamt vorliegende Menge an Doxol in Herz+Blut+Leber je Zeitpunkt). Das bedeutet zum Einen, dass sich das vorhandene Doxol in den Balb/c-Mäusen ebenfalls viel stärker im Blut und im Herzen anreichert. Zum Zweiten erklären die zeitgleich erhöhten Dox- und Doxolanteile in den Balb/c-Mäusen, dass das Doxol vermutlich hauptsächlich aus der Metabolisierung von Dox und nicht aus einer vermehrten Anschwemmung aus anderen Organen stammen muss. Daher ist es auch nicht verwunderlich,

dass sich die Organe, in den Doxol hauptsächlich nachgewiesen werden konnte, zwischen den beiden Mäusestämmen unterschieden. Während bei den C57BL/6-Mäusen Doxol hauptsächlich in der Leber nachgewiesen werden konnte, wurde in den Balb/c-Mäusen der Hauptteil des Doxols im Herzen detektiert (siehe ebenfalls 8.1.1.3).

Doxon

Beiden Mäusestämmen war es gemeinsam, dass der größte Doxonanteil innerhalb der drei untersuchten Organe in der Leber nachgewiesen wurde. Im Blut und im Herzgewebe unterschieden sich jedoch die beiden Mäusestämme in der Art der Doxonverteilung. Während in den C57BL/6 bereits 30 min nach der Injektion Doxon im Herzen nachweisbar war, dauerte es in den Balb/c Mäusen 1 h, bevor das erste Doxon nachgewiesen wurde. Somit wurde bei den C57BL/6-Mäusen 30 min nach der Injektion ein größerer Doxonanteil im Herzgewebe nachgewiesen als bei den Balb/c-Mäusen. Im Gegensatz hierzu konnte in den Balb/c-Mäusen nach 30 min ein wesentlich höherer Anteil an Doxon im Blut nachgewiesen werden als bei den C57BL/6-Mäusen. Außerdem ist bemerkenswert, dass in den C57BL/6-Mäusen zu jedem untersuchten Zeitpunkt stets höhere Gesamtkonzentrationen an Doxon innerhalb der drei untersuchten Organe festgestellt wurden. Möglicherweise spielt Doxon somit eine größere Rolle bei der Herztoxizität, als bisher angenommen.

8.1.1.3 Unterschiede in der Art der Metabolisierung von Dox

Neben den Unterschieden in den Dox-Gesamtmenge, den An- und Abflutungsgeschwindigkeiten im Herz und der Verteilung von Dox sollte schlussendlich untersucht werden, ob sich der Art der Dox-Metabolisierung zwischen den beiden Mäusestämmen unterscheidet.

In beiden Mäusestämmen konnte im Blut und in den Herzen Doxol als Hauptmetabolit von Dox nachgewiesen werden (siehe Tab. 8). In der Literatur wird die Metabolisierung zum Doxol als eine der Ursachen für die Dox-induzierte Kardiotoxizität angesehen [2, 19]. Obwohl die beiden Mäusestämme eine unterschiedliche kardiale Schädigung aufwiesen, konnten jedoch kein signifikanter Unterschied in der absoluten Menge an Doxol im Herzen nachgewiesen werden. Daher scheint in unserem Mausmodell Doxol nicht für die unterschiedliche Kardiotoxizität verantwortlich sein. Sehr wohl aber konnte zwischen den Herzen der beiden Mäusestämme Unterschiede in der absoluten Menge an Dox und an Doxon nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die Dox-induzierte Kardiotoxizität eher von der absoluten Menge an Dox / Doxon und ihrer Anflutungsgeschwindigkeit abhängt, als von der vorliegenden Konzentration des Doxols.

Betrachtet man die Metabolisierungswege von Dox in der Leber, konnte bei beiden Mäusestämmen ein zeitabhängiger Verlauf der Dox-Metabolisierung gezeigt werden. Zu Beginn der Messung wurde Dox zunächst zu Doxon und erst im Laufe der Zeit zu Doxol umgewandelt. Jedoch konnte nachgewiesen werden, dass bei den C57BL/6-Mäusen der Wechsel wesentlich schneller abläuft. Bereits nach 6 h war bei den C57BL/6-Mäusen Doxol der Hauptmetabolit, während bei den Balb/c-Mäusen erst bei dem 24 h Messwert mehr Doxol als Doxon nachgewiesen werden konnte. Dies deutete zunächst auf eine unterschiedliche Metabolisierungsgeschwindigkeit innerhalb der beiden Mäusestämme hin. Betrachtet man dann jedoch die Doxolbildung in Abhängigkeit zur vorhandenen Menge an Dox fällt auf, dass der Zeitpunkt der ersten Doxolbildung mit dem Zeitpunkt übereinstimmt, an dem die Dox-Konzentration signifikant gegenüber der Anfangskonzentration absinkt (C57BL/6-Mäuse: nach 6 h; Balb/c-Mäuse: nach 24 h). Damit scheint die Art der Metabolisierung von Dox innerhalb der Leber der beiden Mäusestämme ähnlich zu sein.

Zusammenfassend kann man daher feststellen, dass sich die Art der Dox-Metabolisierung in den beiden Mäusestämmen kaum voneinander unterscheidet.

8.1.2 HPLC-Untersuchungen nach der Injektion von 3 mg Dox je kg Körpergewicht (chronische Toxizität)

Neben den Untersuchungen zur akuten Toxizität wurde auch eine Studie zur chronischen Toxizität von Dox durchgeführt. Hierfür wurden, über einen Zeitraum von 2 Wochen, beide Mäusestämme mit 3 mg Dox je kg KG behandelt. Die Dox-Injektion erfolgte einmal wöchentlich. Die Dosis wurde gewählt, da sie äquivalent zu der, beim Menschen eingesetzten Dosis während einer Chemotherapie ist. Bei der 1. Injektion von 3 mg Dox wurden, ebenso wie bei den Versuchen zur akuten Toxizität niedrigere Gesamtmengen an Dox bei den Balb/c-Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen. Zweitens ließen sich mit dieser Versuchsserie ebenfalls die Ergebnisse reproduzieren, dass es in den Balb/c-Mäuse zu einer Anreicherung von Dox im Blut und Herzgewebe kommt (anhand der leicht erhöhten Dox-Anteile in beiden Kompartimenten im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen). Damit scheint die Verteilung von Dox und seiner Metabolite innerhalb der drei untersuchten Organe unabhängig von der verabreichten Dosis zu sein.

Bei der 2. Injektion waren 3 Dinge von besonderer Bedeutung:

1.) Nach der 2. Injektion stieg bei beiden Mäusestämmen die Dox-Konzentration im Herzen im Vergleich zur 1. Injektion an (bei den Balb/c-Mäusen sogar signifikant). Dies deutet ganz generell auf eine Dox-Anreicherung im Herzen beider Mäusestämme hin. Jedoch scheint die Anreicherung bei den C57BL/6-Mäuse stärker zu sein, als bei den Balb/c-Mäusen. Dies deutet der etwas niedrigere Dox-Gehalt im Blut und der Leber und der in den Herzen der C57BL/6-Mäuse nachgewiesene stärkere Anstieg des Dox-Anteils zwischen 1. und 2. Injektion an. Möglicherweise wäre die stärkere Anreicherung von Dox im Herz der C57BL/6-Mäuse eine weitere Ursache, warum die C57BL/6-Mäuse empfindlicher als die Balb/c-Mäuse auf Dox reagieren. Außerdem könnten die Ergebnisse einen Hinweis darauf liefern, warum mit steigenden kumulativen Dox-Dosen / steigender Anzahl an Chemotherapiezyklen die in der Literatur beschriebene Kardiotoxizität zunimmt [1, 2, 7]. Schlussendlich könnte hierdurch auch unsere These erhärtet werden, dass das Ausmaß der Kardiotoxizität zu einem großen Anteil von der, ins Herz eingelagerten absoluten Menge an Dox abhängt und nur zu einem untergeordnetem Teil von der Art der Metabolisierung (z.B. zu Doxol).

2.) Nach der 2. Injektion konnte in der Leber neben Dox noch Doxol nachgewiesen werden. Bemerkenswert war, dass bei den Balb/c-Mäusen ein Anstieg der Doxolkonzentration zwischen 1. und 2. Injektion zu verzeichnen war, während bei den C57BL/6 ein signifikantes Absinken der Konzentration nachgewiesen wurde. Ebenfalls konnte in den Lebern der C57BL/6-Mäusen ein etwas niedrigerer Doxolanteil (bezogen auf die im Organ vorliegende Gesamtmenge an Dox+Doxol (nmol)) im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen nachgewiesen werden (C57BL/6: 5.1; Balb/c: 7.4).

Geht man davon aus, dass die C57BL/6-Mäuse nach der 2. Injektion tatsächlich mehr Dox als die Balb/c-Mäuse im Herz anreichern, müsste die Dox-Menge in anderen Organen stärker als bei den Balb/c-Mäusen absinken. In unseren Untersuchungen ließ sich genau dieses bestätigen. Im Blut und in der Leber der C57BL/6-Mäuse sank die gefundene Dox-/Doxol-Menge, während sie im Herzen anstieg. 3.) Nach der 2. Injektion wurde in den Balb/c-Mäusen ein Anstieg der Gesamtmengen an Dox+Doxol in Herz+Blut+Leber auf 126% gegenüber der 1. Injektion beobachtet, wohingegen bei den C57BL/6 ein Absinken der Gesamtmengen auf 88% der Ausgangsmenge nachgewiesen wurde. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass sich die Verteilungsräume von Dox und seiner Metaboliten bei der mehrmaligen Injektion einander angleichen. Somit würden auch die Balb/c-Mäuse mehr Dox in den von uns untersuchten Organen anreichern (vergleiche dazu 8.1.1.1). Bei diesen Ergebnissen darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass dennoch bei den Balb/c-Mäusen eine deutlich niedrigere Gesamtmenge (83%) an Dox+Doxol in den drei untersuchten Organen nachgewiesen wurde als bei den C57BL/6-Mäusen. Damit lässt sich zusammenfassen, dass die wiederholte Gabe von Dox

zu einer stärkeren Anreicherung von Dox im Herzen führte und dass die C57BL/6-Mäuse sowohl im Herzen, als auch in der Leber die höheren Konzentrationen an Dox aufwiesen.

8.1.3 Einfluss des oxidativen Stresses auf die unterschiedliche Empfindlichkeit beider Mäusestämme gegenüber Dox

Um herauszufinden, welche weiteren Faktoren für die erhöhte Empfindlichkeit der C57BL/6-Mäuse auf die Gabe von Dox verantwortlich sein könnten, sollte der Dox-induzierte oxidative Stress im Herzen ermittelt werden. Hierfür wurden die GSH / GSSG-Konzentrationen im Herzen bestimmt. Der oxidative Stress ist dabei umso größer, je größer die GSSG-Konzentration ist. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Dox ein signifikanter Anstieg der absoluten GSSG-Konzentration im Vergleich zu den Kontrollmäusen induziert wurde. Hierbei verursachte die Gabe von 12 mg Dox einen zeitlich gesehenen früheren Anstieg (1 h versus 24 h) von signifikant höheren GSSG-Konzentrationen im Vergleich zu der Gabe von 3 mg Dox. Auch der prozentuale GSSG-Gehalt am Gesamt-Glutathiongehalt stieg mit steigenden Konzentrationen an Dox an. Damit konnten die Hinweise aus der Literatur bestätigt werden, dass Dox generell oxidativen Stress auslösen kann. Auffällig ist jedoch die langanhaltende Wirkung des Dox-induzierten oxidativen Stresses. Obwohl das Maximum der Dox-Konzentration im Herzen bereits nach 1 h erreicht war und anschließend die Konzentration kontinuierlich sank, wurde dennoch ein kontinuierlicher Anstieg der GSSG-Konzentration bis zu 24 h nach der Injektion beobachtet.

Bei dem Vergleich der beiden Mäusestämme konnte in den Balb/c-Mäusen ein signifikant niedriger GSSG-Gehalt (3 mg / 12 mg Dox: $p < 0,05$) im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Auch der prozentuale GSSG-Anteil nach der Gabe von 3 mg bzw. 12 mg/kg KG Dox betrug beachtenswerter Weise nur 70% (bei 3 mg Dox) und 43% (bei 12 mg Dox) des gemessenen Anteils bei den C57BL/6-Mäusen. Dies deutet auf einen insgesamt niedrigeren oxidativen Stress in den Herzen der Balb/c-Mäuse hin. Da der Dox-induzierte oxidative Stress dosisabhängig zu sein scheint, würde dieser Befund zwei weitere Dinge erklären: zum Einen könnte er erklären, warum die Balb/c-Mäuse im Gegensatz zu den C57BL/6-Mäusen weniger empfindlich auf die Gabe von Dox reagierten und zum Zweiten, dass die Dox-induzierte Kardiotoxizität tatsächlich von der absoluten Konzentration an Dox im Herzen abhängt und nicht von der Verteilung von Dox bzw. seiner Metabolite im Organismus. Außerdem lässt sich hierdurch ableiten, dass das Ausmaß der Kardiotoxizität direkt von der Stärke des oxidativen Stresses im Herzen abhängt.

Wie aus der Literatur bekannt [115], führte auch in unseren Untersuchungen sowohl die Injektion von 3 mg als auch von 12 mg Dox pro kg KG zu einer Reduktion ($p < 0,05$) des Gesamt-Glutathionwertes gegenüber den Kontrollmäusen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gabe von 12 mg Dox zu einer deutlich früheren Reduktion des Gesamtglutathions (6 h) im Vergleich zur Gabe von 3 mg (24 h) führte. Als Ursache für das Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration im Herzen wird der auswärtsgerichtete Kotransport von Dox mit GSH via MRP1 vermutet [116, 117]. Die Gruppe um Jungsuwadee et al. [118] konnte zeigen, dass die MRP1-Expression nach 6 bzw. 24 h durch eine erhöhte Konzentration an Hydroxynoneal (HNE, welcher ebenfalls ein Marker für oxidativen Stress ist) anstieg. Jedoch ließ die Transportaktivität von MRP1 nach 72 h nach. Der Funktionsverlust von MRP1 wurde mit der massiven Anheftung von HNE begründet. Neuere Untersuchungen von Krause et al. [119] zeigten zudem, dass sich das Herz vor einer GSSG-Überladung zu schützen scheint, indem es die Expression der MRP1/GS-X-Pumpe an den jeweiligen Redoxstatus anpasst. Mit dem Funktionsverlust von MRP1 könnten 2 Phänomene aus unseren Untersuchungen erklärt werden: Sobald MRP1 nicht mehr richtig arbeitet, käme es zu einer Anreicherung von Dox im Herzgewebe, infolge dessen ein stärkerer oxidativer Stress, verbunden mit steigenden GSSG-Konzentrationen, nachweisbar sein müssten. Dieser Anstieg der GSSG-Konzentration nach

72 h konnte in unseren Untersuchungen nachgewiesen werden (siehe Abb. 23). Außerdem müsste durch den geringeren Auswärtstransport von Dox aus den Zellen ein Anstieg der Gesamt-Glutathionkonzentration resultieren. Auch dieser leichte Anstieg der Gesamt-Glutathionkonzentration nach 72 h im Vergleich zu dem 24 h-Wert konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden (siehe Abb. 23). Daher deuten auch unsere Untersuchungen darauf hin, dass ein Transportprotein wie zum Beispiel das MRP1 einen Einfluss auf die Höhe des Dox-induzierten oxidativen Stresses haben könnte.

In den Balb/c-Mäusen wurde ähnlich wie in den C57BL/6-Mäusen ein signifikantes Absinken der Glutathionkonzentration mit steigenden Dox-Konzentrationen beobachtet. Zusätzlich konnten bei den Balb/c-Mäusen generell niedrigere Gesamt-Glutathiongehalte (z.T. signifikant) im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung ist, dass Dox in Kombination mit Glutathion viel stärker aus den Kardiomyozyten der Balb/c-Mäusen heraustransportiert wird, als dies bei den C57BL/6-Mäusen der Fall ist. Dies würde auch die niedrigere absolute Dox-Konzentration in den Herzen der Balb/c-Mäuse (siehe Abb. 13) und die geringere Sensitivität der Balb/c-Mäuse auf Dox erklären.

Zusammengefasst kann man sagen, dass in den C57BL/6-Mäusen ein größerer oxidativer Stress im Vergleich zu den Balb/c-Mäusen nachgewiesen werden konnte, der höchstwahrscheinlich auf der größeren Dox-Konzentration im Herzen beruht.

8.1.4 Modulationsmöglichkeiten und Ursachen des Dox-induzierten oxidativen Stresses

Um nachweisen zu können, dass der beobachtete oxidative Stress tatsächlich durch die Gabe von Dox ausgelöst wurde, sollte versucht werden, den Dox-induzierten oxidativen Stress zu minimieren. Zu diesem Zweck wurde den C57BL/6-Mäusen eine i.p. Injektion mit Dex (einem bekannten Kardiopräventivum) verabreicht. Interessanterweise führte die i.p. Injektion von Dex in unseren Experimenten zu einem signifikant höheren GSSG-Gehalt ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Daher konnte ähnlich wie in den Zellkulturexperimenten (siehe 8.2) nachgewiesen werden, dass Dex selbst oxidativen Stress auslösen kann. Werden allerdings Dox und Dex zeitgleich verabreicht, konnte ein geringerer GSSG-Gehalt (27%) im Vergleich zur alleinigen Gabe von Dox nachgewiesen werden. Damit ließ sich durch die Gabe von Dex der Dox-induzierte oxidative Stress tatsächlich minimieren. Eine weitere Beobachtung in Zusammenhang mit der Applikation von Dex war sehr interessant. Wir konnten zeigen, dass Dex zu einer drastischen Reduktion der Gesamt-Glutathionmenge gegenüber den C57BL/6-Kontrollmäusen und der alleinigen Behandlung mit 3 mg Dox geführt hat. Für dieses Phänomen gibt es 3 mögliche Erklärungen: 1. Dex ist möglicherweise in der Lage, den Kcotransport von Dox und Glutathion via MRP1 zu stimulieren. Das würde dazu führen, dass intrazellulär niedrigere Dox-Konzentrationen nachzuweisen wären, die in niedrigeren GSSG-Konzentration (siehe Abb. 24) und damit zu einem niedrigeren oxidativen Stress führen würden. Möglicherweise trägt damit nicht nur die Reduktion des oxidativen Stresses, sondern auch die Absenkung der Glutathionkonzentration / der Einfluss auf MRP1 zum kardiopräventiven Effekt des Dex bei. Bisher ist bereits bekannt, dass Dex über die Komplexbildung von Eisen, die Reduktion des oxidativen Stresses und die Hemmung der Topoisomerase II kardioprotektiv wirksam ist [46, 57, 58, 120]. Dies führte dazu, dass zahlreiche andere Antioxidantien und Eisenchelatoren auf ihre kardioprotektiven Eigenschaften untersucht wurden - jedoch bislang ohne Erfolg. Möglicherweise ist der mangelnde Effekt dieser Substanzen auf MRP1 die Ursache für die fehlende Kardioprotektion. Jedoch würde die Beeinflussung von MRP1 durch Dex weitere Fragen aufwerfen. Würde es nämlich auch in den Tumorzellen zu einem verstärkten Auswärtstransport von Dox führen, hätte dies zur Folge, dass die Tumor-

zellen nicht mehr so effizient abgetötet werden würden, wodurch die Response erheblich beeinträchtigt sein könnte. Es existieren bereits heutzutage erste Hinweise darauf, dass Dex möglicherweise die Effizienz der Dox-Therapie beeinträchtigen könnte [46, 121]. 2. Eine weitere Erklärung für die drastische Reduktion der Gesamt-Glutathionmenge gegenüber den C57BL/6-Mäusen besteht darin, dass Dex selbst via Kotransport mit GSH aus der Zelle transportiert wird. 3. Schlussendlich könnte der intrazelluläre Verlust von Glutathion ebenso ein Zeichen für eine Dex-induzierte Apoptose sein. Dies lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass zum einen bekannt ist, dass die Apoptose von Zellen typischerweise mit einem intrazellulären Verlust an Glutathion einhergeht [122-124] und zum anderen, dass die Hemmung der Topoisomerase ebenfalls eine Apoptose auslösen kann [125]. Da sowohl Dox als auch Dex bekanntermaßen die Topo II α blockieren, wäre das Auftreten der Apoptose wahrscheinlich. Um zwischen diesen drei möglichen Ursachen für den drastischen Dex-induzierten Glutathionverlust zu unterscheiden, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Jedoch konnte nicht nur durch die Gabe von Dex, sondern auch durch das Ausschalten von intrazellulär vorhandenen Enzymen, der Dox-induzierte oxidative Stress moduliert werden. Dabei scheint die NAD(P)H-Oxidase ursächlich an der Entstehung des oxidativen Stresses beteiligt zu sein. Diese These begründet sich auf der Tatsache, dass durch das Ausschalten einer NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit in den gp91-Mäusen, ein geringerer Dox-induzierter oxidativer Stress nachgewiesen werden konnte. Dieser ließ sich durch den fehlenden Anstieg der GSSG-Konzentration nach der Gabe von 3 mg Dox gegenüber den Kontrollen und signifikant niedrigeren GSSG-Konzentrationen im Vergleich zu den gleichbehandelten C57BL/6-Mäusen quantifizieren. Für die gp91-Mäuse konnte in den Untersuchungen von Deng et al. [126] eine geringere Kardiotoxizität, als bei den C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Möglicherweise ist hierfür das geringere Ausmaß an Dox-induzierten oxidativen Stresses verantwortlich. Neben der NAD(P)H-Oxidase scheint auch die nNOS, einen Einfluss auf den oxidativen Stress zu haben. Ähnlich wie bei den gp91-Mäusen wurde bei den nNOS-Mäusen ein fehlender Anstieg der GSSG-Konzentration nach der Gabe von 3 mg Dox im Vergleich zu den Kontrollen und signifikant niedrigere GSSG-Konzentrationen im Vergleich zu den gleichbehandelten C57BL/6-Mäusen beobachtet.

8.2 Einfluss des oxidativen Stresses auf die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Toxizität in den HTETOP-Zellen

Da es sich bei dem oxidativen Stresses um ein sehr komplexes Phänomen handelt, wurde zunächst der Einfluss von Dox auf die HTETOP-Zellen analysiert. Erst im zweiten Schritt konnte mit den Versuchen zum oxidativen Stress begonnen werden. Der besseren Übersicht wegen soll diese Reihenfolge auch im Folgenden eingehalten werden.

8.2.1 Untersuchungen zum Zellüberleben nach der Gabe von Dox

Zunächst wurden Versuche zum Überleben der Zellen nach der Applikation von Dox durchgeführt. In den MTT-Versuchen konnte gezeigt werden, dass Dox-Dosen von 0,01 und 0,1 μ M von den HTETOP-Zellen gut toleriert wurden. Jedoch führte bereits die alleinige Gabe von 1 μ M bzw. 10 μ M Dox über 24 h zu einer starken Einschränkung der Überlebensrate. Die Ursachen hierfür konnten in den LDH- und den HPLC-Untersuchungen ermittelt werden. 24 h nach der Applikation von 1 μ M Dox konnte ein deutlicher Anstieg der Dox-Konzentration (ca. 30% gegenüber der gemessenen Anfangskonzentration) und der LDH-Konzentration im extrazellulären Medium nachgewiesen werden. Im Einklang zu unseren Ergebnissen konnten auch andere Gruppen wie zum Beispiel Konorev et al. [127] den Verlust von LDH nach der Gabe von 1 μ M Dox nachweisen. Somit konnte nachgewiesen werden, dass bereits zu diesem Zeitpunkt eine Beeinträchtigung der Membranintegrität vorlag (Penetration von LDH). Aus der Tatsache, dass die Transportrichtung von Dox entgegengesetzt zum vorliegenden Kon-

zentrationsgefälle stattfand, lässt sich ein aktiver Transport von Dox möglicherweise via MRP vermuten. Das MRP am auswärtsgerichteten Transport von Dox beteiligt ist, konnte bereits in zahlreichen Studien [118, 128, 129] nachgewiesen werden. Auch konnte die Gruppe um Pakunlu et al. [130, 131] zeigen, dass eine Blockade von MRP1 mittels antisense Oligonukleotiden zu einer verstärkten apoptotischen Wirkung von Dox führt. Bei der höchsten untersuchten Dox-Dosis (100 μ M) wurde eine massive Einschränkung des Überlebens (siehe Ergebnisse MTT Abb. 41) festgestellt. Die Zellmembranen wurden stark porös (siehe LDH-Versuche 7.5) und Dox diffundierte in den extrazellulären Raum. Die Folge war eine niedrige intrazelluläre Dox-Konzentration und eine nahezu konstante extrazelluläre Dox-Konzentration (siehe HPLC-Ergebnisse Abb. 45).

8.2.1.1 Komedikation mit Dex und DOXY

Die Komedikation mit Dex, welches sowohl Kardiopräventivum als auch Hemmer der Topoisomerase ist, oder DOXY (Hemmer der Topo II α - Proteinexpression in den HTETOP-Zellen) führte bei Dox-Dosen bis 1 μ M zu einer ähnlichen Sterblichkeit der Zellen wie bei der alleinigen Dox-Therapie. Erst bei der Konzentration von 10 μ M Dox wurde eine drastische Beeinträchtigung der Überlebensrate durch die Komedikation festgestellt. Aus diesen Beobachtungen lässt sich der Einfluss der Topo II α bei der Dox-induzierten Toxizität ableiten. Bei niedrigen Dox-Konzentrationen spielt vermutlich die Blockade nur eine untergeordnete Rolle für die Toxizität, da weder durch die Gabe von Dex noch durch die Gabe von DOXY deutliche Veränderungen in der Zellsterblichkeit ausgelöst wurden. Erst bei Dox-Konzentrationen größer als 1 μ M scheint die Blockade der Topo II α , zu einem größeren Teil für die Toxizität verantwortlich zu sein.

Erstaunlicherweise wurde jedoch durch Dex und DOXY eine niedrigere LDH-Konzentration im extrazellulären Medium nachgewiesen, was auf eine Stabilisierung der Membran im Vergleich zur alleinigen Dox-Gabe hindeutet. Außerdem lässt sich hieraus schliessen, dass die beobachtete drastisch erhöhte Toxizität von 10 μ M Dox+Dex gegenüber der alleinigen Gabe von Dox eine andere Ursache haben muss, als nur die alleinige Perforierung der Membran.

Mögliche Ursachen der Dex-induzierten Toxizität:

A)

Eine mögliche Ursache ist in dem gemeinsamen Wirkungsmechanismus von Dox, Dex und in der HTETOP-Zelllinie auch von DOXY zu sehen- die Beeinträchtigung der Topo II α . Niedrige Dox-Konzentrationen (0,01 - 1 μ M) scheinen zwar die Topo II α zu blockieren, für lebenswichtige Prozesse scheint aber immer noch genügend von dem Enzym vorhanden zu sein. Erhöht sich jedoch die Dox-Konzentration oder finden andere Prozesse statt, die die freie Konzentration der Topo II α in der Zelle zusätzlich herabsetzen (z.B. durch die Kombination mit Dex (blockiert die Topo II α) oder mit DOXY (senkt die Proteinexpression der Topo II α), erhöht sich die Toxizität. Diese Befunde stehen in Einklang mit zahlreichen anderen Untersuchungen. Zum Beispiel konnten Sordet et al. [132] zeigen, dass durch Hemmung der Topoisomerase eine Apoptose in den Zellen induziert werden kann. Auch konnte Martin et al. [133] zeigen, dass wenn man anstelle von Dex die ringoffene Form (ICRF 161) verwendet, welches die Topo II **nicht** blockiert, die zelltoxischen / myelotoxischen Eigenschaften nicht mehr nachweisbar waren. Dabei ist ICRF 161 und Dex gemeinsam, dass sie den Dox-induzierten LDH-Verlust der Zellen verhindern können. Jedoch scheint die Grenze, ab der die Beeinträchtigung der Topo II α überhand nimmt, die Konzentration von 10 μ M Dox zu sein (60% Überlebensrate bei 10 μ M Dox versus 35% bei 10 μ M Dox+Dex).

B)

Eine weitere mögliche Erklärung, warum die Therapie mit Dex zu einer erhöhten Sterblichkeit gegenüber den Kontrollzellen führte, liegt in dem Dex-induzierter Verlust an Glutathion

begründet. So konnten wir zeigen, dass eine Störung des Glutathionhaushaltes zu einer erhöhten Sterblichkeit der Zellen führen kann (vergleiche hierzu 8.2.1.1).

C)

Schlussendlich könnte auch die Beeinträchtigung von Effluxpumpen wie zum Beispiel dem MRP (siehe Absatz 8.2.2), für die erhöhte Sterblichkeit der HTETOP-Zellen gegenüber Dex verantwortlich sein.

8.2.1.1 Vergleich unserer Ergebnisse über Dex mit den Angaben in der Literatur

In der Literatur existieren je nach Dosis und Inkubationszeit von Dex / Dox unterschiedliche Angaben zum Überleben der Zellen. Die Gruppe um Hasinoff et al. [134] konnte im Einklang zu unseren Ergebnissen zeigen, dass bei K562 Zellen, die für 1-7 Tage kontinuierlich mit Dex (100 μ M) inkubiert wurden, die Überlebensrate im Vergleich zu den Kontrollzellen proportional zur Zeit sinkt. Gleichzeitig trat eine Wachstumshemmung in den Dex behandelten Zellen auf. Auch in späteren Publikationen von Hasinoff et al. [135] konnte ähnlich zu unseren Ergebnissen, das eingeschränkte Überleben der Zellen nach der alleinigen Dex-Therapie (100 μ M) verifiziert werden.

Entgegengesetzt zu unseren Ergebnissen konnten andere Gruppen eine erhöhte Überlebensrate der Zellen in der **kombinierten Gabe** von Dox und Dex nachweisen (z.B. Li et al. [136]), allerdings differiert häufig die verwendete Dox- bzw. Dex-Konzentration von unseren Messungen. Auch die verwendete Zelllinie unterscheidet sich von der unseren. So verwendete Li et al. H9C2-Zellen, die ähnliche Eigenschaften wie natürliche Kardiomyozyten aufweisen. Sie behandelten diese Zellen mit 5 μ M Dox und 50 μ M Dex, statt den bei uns eingesetzten Dosierungen von 0,1- 100 μ M Dox und 100 μ M Dex. Die Arbeit von Lyu et al. [137] liefert möglicherweise eine Erklärung, warum die kombinierte Gabe von Dox+Dex in den H9C2-Zellen zu einem besseren Überleben der Zellen führt. Sie konnte zeigen, dass Dex durch seine Interferenz mit der Topo II β die Dox-induzierte DNA-Schädigung verhindert. Sie fanden heraus, dass Dex die Bildung des „Topo II β - Cleavage- Komplexes“ antagonisiert und eine Topo II beta Degradation bewirkt. Allerdings nutzte diese Arbeitsgruppe 200 μ M Dex und eine Präinkubationszeit von 5 h statt wie bei uns 100 μ M und 30 min.

Die in der Literatur beschriebenen Diskrepanzen zum Überleben der Zellen nach der Gabe von Dox+Dex haben möglicherweise eine einfache Erklärung: die Art der untersuchten Zelllinie. Vermutlich ist diese entscheidend ob Dex zu einer Steigerung bzw. Senkung des Überlebens führt. Zunächst scheint es zwar kontrovers zu sein, warum die kombinierte Gabe von Dox+Dex die Kardiomyozyten vor Schädigungen schützen soll (Steigerung der Überlebensrate gegenüber der alleinigen Therapie mit Dox), während sie zum Beispiel in Tumorzellen die gleiche bzw. eine größere Toxizität gegenüber der alleinigen Therapie mit Dox gezeigt werden konnte. Diese Diskrepanz lässt sich jedoch auflösen, wenn man die Arbeiten der Gruppe um Sargent et al. [138] betrachtet. Sie konnten zeigen, dass die Gegenwart von Dex (20 nM) in der Dauertherapie mit Dox (15-30 nM) die Dox-Resistenz der K562-Zellen verhindern kann (signifikant niedrigere IC_{50} -Werte durch die Komedikation mit Dex im Vergleich zur alleinigen Dox-Gabe). Sie vermuteten, dass dies in der verzögerten Bildung von MRP1 begründet ist. Die viel größere Mitochondriendichte und der enorme Energieumsatz in den Kardiomyozyten könnten ebenfalls dazu beitragen, dass Dex in den Kardiomyozyten anders wirkt als in Tumorzellen.

8.2.1.1 Komedikation mit dem GSH-Ester

Durch die Verabreichung des GSH-Esters wird die intrazelluläre Glutathionkonzentration erhöht. Der GSH-Ester war die einzige Substanz, die bereits bei der Kombination mit 1 μ M Dox zu einer signifikanten Einschränkung des Überlebens gegenüber der alleinigen Dox-

Gabe führte. Hierbei war die Sterblichkeit umso größer, je höher die gleichzeitig verabreichte Dox-Dosis war. Zeitgleich wurde durch den GSH-Ester oxidativer Stress in den Zellen induziert. Dieser konnte durch eine stark erhöhte GSSG-Konzentration im Vergleich Kontrolle versus Kontrolle+GSH-Ester aber auch im Vergleich „+Dox“ versus „+Dox+GSH-Ester“ nachgewiesen werden. Lediglich bei den BSO-behandelten Zellen (BSO blockiert die Neubildung von Glutathion), konnte durch die Gabe des GSH-Esters die Sterblichkeit der HTETOP-Zellen um mehr als das Doppelte reduziert werden im Vergleich zur alleinigen Therapie mit BSO. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, wie entscheidend der „richtige“ Glutathiongehalt für das Überleben ist. Sowohl zu wenig (induziert durch die Verabreichung von BSO) als auch zu viel (induziert durch die Verabreichung von GSH-Ester) können das Überleben der Zellen einschränken.

8.2.2 Beschreibung des Dox-induzierten oxidativen Stresses in den HTETOP-Zellen

Um den Dox-induzierten oxidativen Stress näher erforschen zu können, wurden 3 verschiedene Versuchsserien durchgeführt: 1. Die Quantifizierung des oxidativen Stresses mittels DHE, 2. mittels H_2DCFDA und 3. mittels GSH / GSSG. Dox ist dafür bekannt, oxidativen Stress (ROS / RNS) in Zellen zu induzieren. Diese freien Radikale werden für die Membranschädigungen durch Lipidperoxidation, Beeinflussung der Genexpression, Veränderungen von Proteinaktivitäten und Schädigungen der DNA verantwortlich gemacht [4, 5, 19, 139]. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass der Dox-induzierte oxidative Stress in Zellkulturexperimenten vorwiegend nach der Gabe von supraklinischen Dosen an Dox (100 μM) nachweisbar ist (Gewirtz [19]).

8.2.2.1 Einfluss der Messmethode auf den Nachweis von oxidativem Stress

In allen 3 Versuchsserien zur Bestimmung des oxidativen Stresses konnte eine klare Abhängigkeit von der Dox-Dosis nachgewiesen werden. Je mehr Dox verabreicht wurde, umso höher war die nachgewiesene Menge an oxidativem Stress in den HTETOP-Zellen. Ab welcher Dox-Dosis oxidativer Stress nachgewiesen wurde, unterschied sich jedoch zwischen den einzelnen Methoden. So konnte in den H_2DCFDA -Experimenten bereits bei der kurzen Inkubationszeit von nur 2 h durch die Gabe von 10 μM Dox ein deutlicher Anstieg des oxidativen Stresses gegenüber den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Dox-Konzentrationen von 0,1-1 μM zeigten hingegen keinen Unterschied zu den Kontrollzellen. Wurden die HTETOP-Zellen deutlich länger als 2 h (so zum Beispiel für 24 h wie in unseren GSH-Experimenten) mit Dox behandelt, ließ sich auch bei deutlich niedrigeren Dox-Konzentrationen oxidativer Stress nachweisen. In den GSH-Experimenten konnten wir bereits bei 0,1 μM Dox ein Anstieg des GSSG-Anteils am Gesamt-Glutathiongehalt gegenüber den Kontrollzellen (siehe Abb. 35) nachweisen. Verwendet man schlussendlich die HPLC zur Untersuchung des oxidativen Stresses, konnte bereits nach 30 min ein signifikanter Anstieg des oxidativen Stresses durch die Gabe von 0,1 μM Dox nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch niedrige Konzentrationen an Dox oxidativen Stress in den HTETOP-Zellen auslösen können. Ob oxidativer Stress nachweisbar ist, hängt damit stark von der verwendeten Dox-Dosis, der Inkubationszeit sowie der verwendeten Messmethode ab.

8.2.2.2 Art der entstehenden ROS in Abhängigkeit zur Dox-Inkubationszeit

Betrachtet man die Superoxidmenge, die durch Dox gebildet wurde, lassen sich 2 Dinge feststellen: Zum einen scheint in den HTETOP-Zellen die Superoxidbildung von der Dosis an Dox abzuhängen (10 μM Dox führte bei der 2 stündigen Inkubation zu einem höheren Superoxidgehalt als die Gabe von 0,1 oder 1 μM Dox). Zum Anderen spielt auch die Zeit, in der das Dox auf die Zellen einwirkt eine Rolle. So konnte in den Experimenten mit DHE gezeigt werden, dass nach der 30 minütigen Inkubation mit 0,1, 1 und 10 μM Dox keine erhöhte Superoxidbildung im Vergleich zu den Kontrollzellen stattfindet, nach den 2 stündigen Inkuba-

tionen wurde aber bereits bei der Gabe von 10 μM Dox ein signifikant höherer Superoxidgehalt nachgewiesen.

Die Inkubationszeit mit Dox spielt ebenfalls eine Rolle, welche Art an ROS nachgewiesen wurde. So ließ sich nach der 30 minütigen Therapie nur ein signifikanter Anstieg der Ethidiumkonzentration (unselektiver Marker für ROS wie z.B. H_2O_2 und Peroxynitrit) (siehe Abb. 29) beobachten, während nach der 2 stündigen Inkubation bereits ein signifikanter Anstieg der Superoxidmenge nachgewiesen werden konnte. Somit scheint in den HTETOP-Zellen die Superoxidproduktion zeitverzögert einzutreten. Dies steht entgegengesetzt zu den Befunden in Kardiomyozyten, in denen die Superoxidproduktion bereits innerhalb weniger Minuten nach der Gabe von Dox erfolgte [140]. Allerdings ist in den Kardiomyozyten auch ein generell höherer Energieumsatz aufgrund der hohen Mitochondriendichte beschrieben [141]. Die Kardiomyozyten scheinen außerdem schlechter gegen oxidative Schäden gewappnet zu sein, aufgrund der niedrigen Konzentration an endogenen, antioxidativ wirksamen Enzymen (Dismutasen und Katalasen).

8.2.2.1 Einfluss der Genexpression auf die Entstehung von oxidativem Stress

Ebenso wie die Einwirkzeit und die verabreichte Dosis an Dox einen Einfluss auf die Art und Menge an oxidativem Stress spielt, können auch zelluläre Veränderungen den ROS-Gehalt beeinflussen. So konnten wir mit unseren Microarray- Untersuchungen eine stark erhöhte Genexpression von SOD (welche für die „Entsorgung“ von Superoxid verantwortlich ist), nach der 24 stündigen Therapie mit Dox nachweisen, was für eine gute Kompensationsfähigkeit der Zellen spricht (siehe auch 8.3).

8.2.3 Ursachen für die Dox-induzierte Veränderung des GSH / GSSG-Haushaltes in den HTETOP-Zellen

Ähnlich wie bei den Untersuchungen der Mäuseherzen konnte auch in den HTETOP-Zellen eine deutliche Dox-induzierte Absenkung der Gesamt-Glutathionkonzentration gegenüber den Kontrollzellen beobachtet werden, die bereits bei einer Dosierung von 0,1 μM Dox signifikant wurde. Der Dox-induzierte Verlust an Glutathion wurde ebenfalls in zahlreichen anderen Studien nachgewiesen (z.B. [142-145]).

Für den Dox-induzierten Glutathionverlust sind verschiedene Ursachen denkbar: 1. Die Dox-induzierte Hemmung der Glutathionneusynthese, 2. der verstärkte Glutathionverbrauch 3. der verstärkte Auswärtstransport von Glutathion bzw. die Zerstörung der Zellmembranintegrität durch Dox und schlussendlich die stattfindende Apoptose der Zellen.

Zu 1.: Würde der beobachtete Verlust des Gesamtglutathions aus der Hemmung der GSH-Neusynthese herrühren, müsste man durch Substitution von Glutathion den Dox-induzierten intrazellulären Abfall der Gesamt-Glutathionkonzentration verhindern können. Dies konnte in unseren Experimenten nicht bestätigt werden. Durch die Gabe des GSH-Esters (aus dem intrazellulär Glutathion freigesetzt wird) wurde zwar eine insgesamt höhere Glutathionkonzentration in den Zellen induziert, jedoch konnte das Absinken des Gesamtglutathions durch Dox nicht verhindert werden. Daher lässt sich die Synthesehemmung als Ursache für den Dox-induzierten Abfall der Gesamt-Glutathionkonzentration ausschließen.

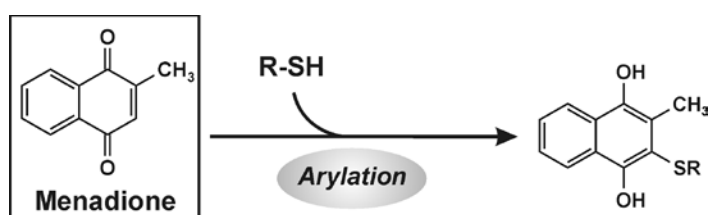
Zu 2.: Der verstärkte Glutathionverbrauch. Dieser kann zwei mögliche Ursachen haben.

Zum einen ist bekannt, dass Zellen für die Beseitigung von Peroxid zwingend GSH benötigen. Peroxide, wie z.B. H_2O_2 werden unter anderem durch die Glutathionperoxidase unter Verbrauch von GSH zu Wasser und GSSG umgewandelt. Bei solchen Prozessen kommt es zwar zu einer Veränderung des GSH / GSSG-Gleichgewichtes, die Gesamt-Glutathionkonzentration der Zelle sollte dadurch jedoch nur marginal beeinträchtigt werden. Hierdurch

ließe sich somit das beobachtete Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration in den HTETOP-Zellen nicht erklären.

Zum anderen ist ein erhöhter Glutathionverbrauch zu erwarten, bei der Konjugation von Glutathion an diverse Xenobiotika (wie z.B. Menadion). Die Glutaryltransferase (welche in unseren Microarraydaten (siehe 8.3) erhöht war) spielt dabei eine wichtige Rolle. Sie kann Glutathion auf verschiedene elektrophile Substanzen übertragen, wodurch Glutathion in unserem Versuchsaufbau nicht mehr nachweisbar wäre. Auch die nichtenzymatische Übertragung von Glutathion ist bereits beschrieben. So kann Glutathion an Menadion durch eine Arylierung gebunden werden (z. B. durch eine Michael-Addition [100]), wodurch Glutathion in unserem Versuchsaufbau ebenfalls nicht mehr nachweisbar wäre.

Abb. 62: Arylierung von Menadion aus [100]



Bei der Arylierung würde Glutathion an eine, im Dox vorhandene Doppelbindung addiert werden müssen. Hierdurch käme es jedoch zu einer Unterbrechung des konjugierten Ringsystems, was energetisch sehr ungünstig und damit eher unwahrscheinlich sein dürfte. Diese Überlegungen konnten durch die Gruppe um Jedlitschky et al. [146] bestätigt werden, die keine stabilen kovalenten Konjugate von Anthrazyklinen mit Glutathion nachweisen konnten. Somit kann die Arylierung als Ursache für den Dox-induzierten Abfall der Gesamt-Glutathionkonzentration nahezu ausgeschlossen werden.

Zu 3.: Damit bliebe noch der verstärkte Auswärtstransport von Glutathion aus der Zelle, der für die Absenkung der Gesamt-Glutathionkonzentration verantwortlich sein könnte. Glutathion besitzt nämlich neben der Beseitigung des oxidativen Stresses eine wichtige Entgiftungsfunktion in der Zelle. Es dient als Kosubstrat für einige Transporter (z.B. MRP1), über die zahlreiche Xenobiotika und toxische Substanzen wie das Dox aus der Zelle heraus transportieren werden können. Bei diesem Transport geht zeitgleich Glutathion verloren, was den Abfall der intrazellulären Glutathionspiegel erklären würde. Dass es durch den auswärts gerichteten Transport via MRP zu einem gleichzeitigen Absinken der intrazellulären GSH-Konzentration kommen kann, ist in zahlreichen Studien bestätigt worden (z.B. [147, 148]). Leider ließ sich in unseren Experimenten kein Anstieg der Glutathionkonzentration im extrazellulären Medium nachweisen, was vermutlich an der zu geringen Glutathionkonzentration lag (außerhalb der Bestimmungsgrenze). Allerdings konnte mittels unserer HPLC-Messung gezeigt werden, dass 1 μ M Dox zu einem Anstieg des extrazellulären Dox-Gehaltes um rund 30% gegenüber dem Anfangsgehalt führte (siehe Abb. 45). Dies deutet auf einen aktiven Transport von Dox aus der Zelle in das Medium hin, da die Transportrichtung entgegengesetzt zu dem Konzentrationsgefälle war. Auch das durch Dox verstärkt gebildete GSSG kann via MRP1 (worüber auch Dox transportiert wird) aus den Zellen heraus transportiert werden [149, 150], woraus ebenfalls ein Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration resultieren würde.

4. Schlussendlich ist bereits bekannt, dass die Apoptose von Zellen typischerweise mit einem intrazellulären Verlust an Glutathion einhergeht [123, 124, 151], obgleich die Ursachen hierfür immer noch kontrovers diskutiert werden [122].

Interessanterweise konnte das Absinken der Glutathionkonzentration durch die Blockade des Auswärtstransportes unterbunden werden [124]. Somit lässt sich das beobachtete Absinken

der Gesamt-Glutathion-Konzentration nach der Gabe von Dox am ehesten durch den verstärkten Auswärtstransport erklären.

In der Literatur ist ferner beschrieben, dass der Glutathionspiegel auch einen Einfluss auf die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Dox eine große Rolle zu spielen scheint. So konnte gezeigt werden, dass Dox-resistente Tumorzellen durch den Entzug von Glutathion wieder sensibel auf Dox reagierten [19, 152-155]. Hierfür ist es aber wichtig zu wissen, dass die Resistenz der Tumorzellen gegenüber Dox häufig mit einer verstärkten Expression von MRP oder p-Glykoprotein einher geht [156-158]. Wird der Zelle durch die Reduktion von Glutathion ein wichtiges Kosubstrat von MRP entzogen, kann Dox nicht mehr so effizient in den Extrazellulärraum transportiert werden. Die Folge wäre eine steigende intrazelluläre Dox-Konzentration und dadurch eine verbesserte Wirksamkeit von Dox gegen die Tumorzelle. Im klinischen Alltag dürfte es jedoch schwierig sein, die Tumoresistenz gegenüber Dox durch den Entzug von Glutathion aufzuheben, da Glutathion für alle Zellen eine lebenswichtige Substanz darstellt. Einen weiteren spannenden Ansatz lieferte die Gruppe um Sargent et al. [138], die zeigen konnten, dass Dex möglicherweise die Dox-Resistenz dadurch verhindern kann, in dem es die Bildung von MRP1 verzögert.

8.2.3.1 Folge des Kotransportes von Dox mit Glutathion

Je höher die verabreichte Dox-Dosis ist, umso mehr Glutathion geht der Zelle verloren. Zeitgleich verbleibt aber auch immer mehr Dox intrazellulär (begrenzte Kapazität des Transporters und zunehmende Inaktivierung von MRP durch ROS-Produkte wie HNE (siehe Absatz 8.1.3) und kann dort seine zytotoxischen Wirkungen entfalten. Die Folge hiervon ist die erhöhte Sterblichkeit der Zellen (siehe Abb. 41 und Abb. 42). Damit wäre die Dox-induzierte Absenkung der Gesamt-Glutathionkonzentration in den Zellen nicht der Grund für die steigende Sterblichkeit der Zellen, sondern lediglich die Folge des Auswärtstransportes von Dox. Diese These konnte auch durch die Experimente mit dem GSH-Ester untermauert werden. Wäre der Glutathionverlust die Ursache für die erhöhte Dox-induzierte Sterblichkeit, dann müsste man durch eine Glutathionsubstitution (z.B. durch die Verabreichung des GSH-Esters) eine deutliche Reduktion der Toxizität beobachten können. Wir konnten jedoch zeigen, dass durch den GSH-Ester zwar der intrazelluläre Glutathiongehalt wie erwartet erhöht werden konnte, aber dennoch wurde durch den GSH-Ester eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zur alleinigen Dox-Therapie beobachtet.

8.2.4 *Modulation des oxidativen Stresses in den HTETOP-Zellen*

Neben der reinen Quantifizierung des oxidativen Stresses sollte nach Möglichkeiten der Modulation gesucht werden. Zu diesem Zweck erhielten die Zellen unter anderem eine Dex-/CAT- oder DOXY- Komedikation.

8.2.4.1 Komedikation mit dem antioxidativ wirksamen Enzym Katalase (CAT)

Gelingt es, die CAT (welche H_2O_2 in H_2O und O_2 umwandelt) in die Zellen einzuschleusen, sollte ein geringerer oxidativer Stress nachweisbar sein, der sich durch einen geringeren Fluoreszenzanstieg (in den H_2DCFDA -Experimenten) oder einen geringeren GSSG-Anteil (in den DTNB-Experimenten) feststellen lässt. In unseren Versuchen konnte jedoch keine Reduktion des oxidativen Stresses nachgewiesen werden. Möglicherweise war jedoch die gewählte Katalasedosis zu niedrig, oder die Katalase kam trotz Pegylierung nicht in die Zelle hinein.

8.2.4.2 Komedikation mit Dexrazoxan

Dex ist ein bekanntes Kardiopräventivum, das neben anderen Effekten den Dox-induzierten oxidativen Stress verhindern soll. In unseren Untersuchungen konnte Dex jedoch ausschließlich bei unphysiologisch hohen Dox-Dosen (100 μM) die ROS-Produktion verringern (siehe Absatz 7.2.1). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit dem Review von Gewirtz [13], der zeigte, dass massiver oxidativer Stress vorwiegend nach der Gabe von supraklinischen Dosen an Dox (100 μM) auftritt.

Stattdessen konnten wir zeigen, dass Dex selbst sowohl zu einer deutlich erhöhten Sterblichkeit (siehe Abb. 42), als auch zu einem deutlich höheren GSSG-Anteil am Gesamt-Glutathiongehalt im Vergleich zu den völlig unbehandelten Kontrollzellen (der Gruppe „Dox allein“) führte. Das würde bedeuten, dass Dex selbst oxidativen Stress auslösen kann und ähnlich wie Dox toxische Eigenschaften besitzt. Ferner konnte mit steigenden Dex-Konzentrationen ähnlich wie bei Dox ein Abfall des Gesamtglutathions beobachtet werden. Dabei zeigte 100 μM Dex eine ähnliche Reduktion des Gesamtglutathions (ca. 20% gegenüber den Kontrollzellen) wie sie durch die 0,1 μM Dox-Therapie ausgelöst wird.

Überraschenderweise konnte jedoch in unseren Experimenten ein deutlicher Unterschied zwischen der alleinigen Therapie mit Dex und der kombinierten Gabe von 0,1 μM / 1 μM Dox mit Dex gezeigt werden. Hierbei waren 3 Befunde auffällig:

1. Durch die kombinierte Gabe konnte kein Anstieg des GSSG- Anteils am Gesamtglutathion im Vergleich zu den Kontrollzellen+Dex nachgewiesen werden.
2. Die Sterblichkeit der Zellen war bei der kombinierten Behandlung mit Dex+ 0,1 μM Dox leicht reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen+Dex.
3. Durch die Kombination von 100 μM Dex+0,1 μM Dox wurde das Absinken der Gesamt-Glutathionkonzentration im Vergleich zu den Kontrollzellen+Dex verhindert.

Diese 3 Befunde deuten darauf hin, dass Dox den Dex-induzierten oxidativen Stress nicht weiter erhöhen kann.

Mögliche Ursachen für diese Befunde:

A: Möglicherweise ist dieser Effekt dadurch zu erklären, dass Dex die Aufnahme von Dox in die Zelle verringert. Die Folge wäre, dass hierdurch weniger Dox aus der Zelle heraus transportiert werden müsste, wodurch den Zellen weniger Glutathion verloren ginge. Die Folge wären die 3 von uns beobachteten Befunde. Eine ähnliche Beobachtung machte die Gruppe um Vaidyanathan et al. [159], die herausfanden, dass die Interaktion von Dex mit roten Blutzellen und Hämoglobin die Pharmakokinetik von Dox verändern kann. Sie konnten zeigen dass Dex, abhängig von seiner Konzentration, die Bindung von Dox an rote Blutzellen verhindern kann. Die Folge waren eine niedrigere AUC in der Konzentrations- / Zeit- Kurve sowie eine Reduktion der mittleren Verweilzeit und der Plasmaclearance.

B: Möglicherweise beeinträchtigt aber Dex auch Effluxpumpen wie das MRP in ihrer Aktivität (z.B. durch Anlagerung von HNE [118]), wodurch Dox schneller wieder aus den Zellen heraus transportiert wird. Gegen diese mögliche Ursache sprechen die Befunde der Gruppe um Sargent et al. [138], die gezeigt haben, dass Dex die Dox-Resistenz möglicherweise dadurch verzögert, indem es die Bildung von MRP1 verzögert. Allerdings untersuchten sie den Einfluss von Dex in einem Zustand der Dauertherapie mit Dox (15-30 nM) in Gegenwart von nur 20 nM Dex.

C: Schlussendlich könnte die Hemmung der Topo II α , die sowohl für Dox, als auch für Dex ein Zieltarget darstellt, eine Rolle bei den beobachteten Effekten spielen. So konnte die Gruppe um Slater et al. [125] zeigen, dass eine Hemmung der Topoisomerase zu einem Anstieg des oxidativen Stresses durch Auslösung der Apoptose führt. Ist die Topoisomerase erst einmal gehemmt (und dabei ist es möglicherweise egal ob dies durch Dox oder durch Dex erfolgt) kann kein zusätzlicher oxidativer Stress mehr gebildet werden.

Obgleich die mögliche Ursache C am wahrscheinlichsten erscheint, sind weitere Untersuchungen nötig, um zwischen den 3 möglichen Ursachen zu unterscheiden.

8.2.5 Einfluss der Topo II α auf den Dox-induzierten oxidativen Stress

Mit den HTETOP-Zellen hatten wir die Möglichkeit, die Topo II α auf 2 verschiedenen Wegen auszuschalten: zum Einen durch die Gabe von Dex (blockiert die Aktivität der Topo II α) und zum anderen durch die Gabe von DOXY (senkt die Proteinexpression der Topo II α in den HTETOP-Zellen). Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Gabe von Dex die Gabe von DOXY in allen untersuchten Untergruppen (Kontrolle, 0,1; 1; 10 μ M Dox und BSO) einen signifikant höheren Gesamt-Glutathiongehalt im Vergleich zur Behandlungsgruppe „Dox allein“ bewirkte.

8.2.5.1 Wirkung von DOXY in den HT1080-Zellen

Um herauszufinden, ob die beobachteten DOXY-Effekte tatsächlich von der Topo II α - Hemmung resultieren, wurden die Ursprungszellen der HTETOP - die HT1080-Zellen- mit DOXY behandelt. Diesen fehlt die DOXY-Bindungsstelle zur „Ausschaltung“ der Topo II α . Folglich sollte durch die Behandlung mit DOXY keine Veränderung der Gesamt-Glutathiongehalte / keine Reduktion des GSSG-Anteils am Gesamtglutathion im Vergleich zur Behandlungsgruppe „Dox allein“ nachweisbar sein, wenn die beobachteten Effekte tatsächlich Topoisomerase induziert sind. Tatsächlich führte jedoch sowohl die alleinige Gabe von DOXY, als auch die Kombination mit 0,1 μ M Dox wie in den HTETOP-Zellen zu einer höheren Gesamt-Glutathionkonzentration im Vergleich zu der Behandlungsgruppe „Dox allein“. Zwar war der Anstieg der Gesamt-Glutathionkonzentration insgesamt niedriger als bei den HTETOP-Zellen, so war er aber dennoch nachweisbar. Auch der GSSG-Anteil am Gesamtglutathion konnte ähnlich wie in den HTETOP-Zellen, durch die Gabe von DOXY reduziert werden. Lediglich das Ausmass unterschied sich zwischen den beiden Zelllinien. In den HT1080-Zellen wurde durch die Behandlung mit DOXY noch rund 1/6 des prozentualen GSSG-Anteils nachgewiesen, während es bei den HTETOP-Zellen immerhin noch rund 2/3 waren. Damit zeigte DOXY selbst eine modulierende Wirkung, sowohl auf den Gesamt-Glutathiongehalt, als auch auf den GSSG-Gehalt.

8.2.5.2 Auswirkungen der Ergebnisse in den HT1080-Zellen auf die Untersuchungen in den HTETOP-Zellen

Aus diesem Grund scheint der in den HTETOP-Zellen beobachtete Anstieg der Gesamt-Glutathionkonzentration und die Reduktion des GSSG-Anteils am Gesamt-Glutathiongehalt nur zum Teil von der Topo II α abhängig zu sein. Zum anderen Teil beruhen die beobachteten Effekte auf substanzspezifischen Eigenschaften von DOXY selbst. Subtrahiert man jetzt die Effekte von DOXY in den HT1080 Zellen (=substanzspezifische Effekte von DOXY) von den Effekten in den HTETOP-Zellen (zusammengesetzter Effekt aus Substanzeigenschaften von DOXY und Topo II α -Hemmung) kann man den Einfluss der Topo II α auf den oxidativen Stress abschätzen. Somit wäre durch die DOXY-induzierte Hemmung der Topo II α -Expression, ähnlich wie durch die Gabe von Dex, insgesamt ein Anstieg des GSSG-Anteils am Gesamtglutathion und eine Reduktion des Gesamtglutathions zu erwarten. Damit scheint die Topo II α an der Beseitigung des oxidativen Stresses beteiligt zu sein. Möglicherweise senkt die Topo II α den oxidativen Stress in den Zellen dadurch, indem sie Folgen des oxidativen Stresses, wie zum Beispiel die Schädigungen der DNA beseitigt. Bei der Blockade der Topo II α können die oxidativen Schädigungen nicht behoben werden, wodurch ein größerer oxidativer Stress nachweisbar wäre. Eine mögliche Folge wäre die Einleitung der Apoptose.

8.2.5.3 Zusammenhang zwischen der Topo II α und dem oxidativen Stress

Normalerweise ist die Topo II α während der DNA-Replikation, Chromosomenkondensation und -segregation sowohl für das Religieren der DNA-Enden, als auch für den DNA-Abbau

verantwortlich [48, 160]. Der Topo II α - induzierten DNA-Abbau kann sowohl durch einige Zytostatika und Peptidtoxine wie Microcin B17 [48, 160], als auch durch zahlreiche andere Prozesse wie DNA-Modifikationen, Enzymmodifikationen und Veränderungen des Zell-pH-Wertes von 5 auf 6 induziert werden [161-164]. Damit spielt die Topo II α sowohl bei Zellteilungsprozessen als auch beim Tod (Apoptose) von Zellen eine Rolle [165].

Betrachtet man den Einfluss der Topo II α auf den oxidativen Stress lassen sich zwei Behauptungen aufstellen:

1.: Oxidativer Stress führt zum Einen zur Apoptose unter Beteiligung der Topo II α

So konnte zum Beispiel die Gruppe um Li et al. [166] zeigen, dass die Behandlung mit H₂O₂ (als Induktor für oxidativen Stress) zur Apoptose führt. Hierbei wurde zunächst die Entstehung von hochmolekularen DNA-Fragmenten (50-100kb) beobachtet. Deren Bildung war reversibel und wurde durch die Topo II α vermittelt. Im Verlauf der Apoptose wurde die Bildung der hochmolekularen DNA Fragmente irreversibel und die nukleosomale Leiterstruktur, die den DNA-Abbau anzeigt, wurde sichtbar. Somit konnte nachgewiesen werden, dass einerseits oxidativer Stress Apoptose auslösen kann. Die Gruppe um Shinagawa et al. [167] konnte zudem zeigen, wie sich die Topoisomeraseaktivität /-expression verändert, nachdem in den MOLT-4-Zellen oxidativer Stress durch H₂O₂ ausgelöst wurde. Sie fanden heraus, dass die katalytische Aktivität der Topo II α unter diesen Bedingungen reduziert war.

2.: Zum Anderen kann durch die Apoptose selbst oxidativer Stress ausgelöst werden, an dem die Topo II α beteiligt zu sein scheint.

Es ist bereits bekannt, dass die Hemmung der Topoisomerase zur Apoptose führen kann. Interessanterweise konnte die Gruppe um Slater et al. [125] zusätzlich zeigen, dass die Einleitung der Apoptose durch **nicht oxidative** Stimulie (wie Glukokortikoide oder Topo II-Inhibitoren) zu oxidativem Stress und damit zu oxidativen Veränderungen von Proteinen und Lipiden führen kann. Sie zeigten auch, dass Apoptose typischerweise mit dem Verlust von reduzierten Glutathion (GSH) einherzugehen scheint. Daher vermuteten die Autoren, dass durch den GSH-Verlust eine geringere Pufferkapazität für endogene Oxidantien resultiert. Dies sei möglicherweise die Ursache, für die beobachtete Entstehung von oxidativem Stress im Zuge der Apoptose. Diese Befunde stehen in Einklang mit unseren Experimenten. Wir konnten ebenfalls mit der Hemmung der Topo II α einen Anstieg des oxidativen Stresses (höherer GSSG-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle) beobachten. Zusätzlich konnte in unseren Untersuchungen ein Absinken der Gesamtglutathion-/ der reduzierten Glutathionkonzentration gezeigt werden, wodurch ebenfalls in der Zelle eine geringere Pufferkapazität für endogene Oxidantien vorliegen dürfte. Dabei spielte es scheinbar keine Rolle, ob die Topo II α - Enzymfunktion gehemmt wurde (durch die Applikation von Dex), oder ob die Proteinexpression durch die Applikation von DOXY (siehe 8.2.5.2) gesenkt wurde. Daher scheint die Beziehung zwischen der Topo II α und dem oxidativem Stress bestätigt worden zu sein.

Die Gruppe um Li et al. ([166] gehen sogar noch einen Schritt weiter, in dem sie behaupten, die Topo II α sei nicht nur am apoptotischen Zelltod beteiligt, sondern sie spiele auch eine Rolle bei der oxidativen Schädigung der DNA.

8.2.5.4 Zusammenfassung oxidativer Stress in den HTETOP-Zellen

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Dox unter physiologischen Bedingungen oxidativen Stress auslösen kann, dabei scheint die Art und die Konzentration der entstehenden ROS, abhängig von der Dox-Konzentration, der Einwirkzeit und der Kompensationsfähigkeit der Zelle gegenüber den gebildeten oxidativen Spezies zu sein. Durch die Gabe von Dex lässt sich das Ausmaß des oxidativen Stresses lediglich in den Mäuseversuchen reduzieren. In un-

seren Zellkulturversuchen zeigte Dex in Verbindung mit physiologischen Dox-Konzentrationen selbst stressauslösende Eigenschaften. Außerdem scheint die Topo II α an der Beseitigung des oxidativen Stresses beteiligt zu sein. Schlussendlich greifen sowohl Dox als auch Dex in den intrazellulären Glutathionhaushalt ein und führen zu einem Verlust an Glutathion. Dieser scheint jedoch nur indirekt an der Dox-induzierten Toxizität beteiligt zu sein.

8.3 Beeinflussung des oxidativen Stresses durch die Veränderung der Genexpression in den HTETOP-Zellen

In unseren Microarrayversuchen wurden verschiedene Gene, die den oxidativen Stress in der Zelle beeinflussen, differentiell reguliert. Im Folgenden soll zunächst auf die Proteine der überexprimierten Gene näher eingegangen werden.

8.3.1 Glutathion-S-Transferasen (GST)

8.3.1.1 Beschreibung der GST

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) gehören zu einer großen Enzymfamilie, die in vielen Spezies verbreitet sind und beim Menschen in nahezu allen Zellen vorkommen. Die GSTs können in 7 Klassen unterteilt werden [168], wobei eine von ihnen membrangebunden vorliegt und als microsomale GST (Kappa) bezeichnet wird [169]. Die restlichen 6 (Alpha, Mu, Pi und Theta, Zeta, Sigma) sind zytosolische Proteine [170]. Es sind dimere Proteine. Jede Untereinheit besitzt ein komplettes, unabhängiges aktives Zentrum, welches aus einer Bindungsstelle für Glutathion (G-Site), einer benachbarten hydrophoben Bindungsstelle für das elektrophile Substrat (H-Site) und einer Liganden-Bindungsstelle (L-Site) besteht.

GSTs haben verschiedene Funktionen: 1. die Bildung von Glutathionkonjugaten, 2. die Reduktion von Peroxiden und 3. die nichtkatalytische Bindungs- und Transportfunktion.

1. GSTs katalysieren die Konjugation von Glutathion mit einem breiten Spektrum an elektrophilen Substanzen [171]. Durch die Konjugation können die elektrophilen Substanzen schlechter mit Makromolekülen reagieren und diese in ihrer Funktion beeinträchtigen. Gleichzeitig werden die elektrophilen Substanzen durch die Konjugation mit Glutathion leichter über Glutathion-S-Konjugat-Effluxpumpen ausgeschieden. Im Menschen können die Glutathionkonjugate durch enzymatische Spaltungs- und Acetylierungsreaktionen zur Mercaptursäure umgewandelt werden, welche leicht über die Nieren ausgeschieden wird. Die GSTs besitzen daher wichtige Entgiftungsfunktionen. Aus den entstandenen Glutathionkonjugaten können aber auch toxische Zwischenprodukte entstehen (z. B.: das Episulfonium-Ionen, welches durch halogenierte Alkane (z. B. Dibromethan) gebildet werden kann [172], die anschließend an die DNA binden und diese dadurch schädigen.

2. Viele GST-Isoenzyme besitzen eine Peroxidase-Aktivität. Durch Übertragung der Elektronen vom Thiolat-Anion des Glutathions werden die Peroxide zu den entsprechenden Alkoholen reduziert. Es sind z. B. Reaktionen mit DNA- und Phospholipid-Hydroperoxiden und 4-Hydroxyalkenalen beschrieben worden [173, 174]. Durch die Beseitigung der 4-Hydroxyalkenale, welche als hochtoxische Endprodukte der Lipidperoxidation angesehen werden [175], wirken die GSTs dem oxidativen Stress entgegen.

3. GSTs können an ihrer nicht katalytisch wirksamen Liganden-Bindungsstelle (L-Site) eine Vielzahl hydrophober Substanzen (wie Bilirubin und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen) binden. Durch die Bindung kann die Toxizität dieser Substanzen verringert werden [176-179]. GSTs spielen auch bei der Entstehung von Zytostatika-Resistenzen eine Rolle. Folgende Mechanismen werden hierbei diskutiert [180, 181]: die Inaktivierung elektrophiler Zytostatika (z.B. Melphalan) durch direkte Konjugation mit Glutathion, die Beseitigung von DNA-Konjugaten (z. B. bei Cisplatin), die Reduktion von Peroxiden (z. B. Lipidperoxiden [174],

und Hydroxyalkenalen [182, 183], die zum Beispiel bei der Behandlung mit Dox gebildet werden), die aktive Eliminierung von GSH-Konjugaten und die GSH-abhängige Denitrosierung von Nitrosoharnstoffen. Es konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass in Cisplatin-resistenten Zellen die membranständige ATP-abhängige Efflux-Pumpe (GS-X-Pumpe) überexprimiert war [181]. Zusätzlich konnten in verschiedenen Tumorzellen eine isoenzymspezifische Überexpression der GSTs nachgewiesen werden (z.B. bei der Resistenz gegenüber Cisplatin war die Klasse Alpha der GSTs überexprimiert, während für die verstärkte Elimination von Dox die Überexpression der Pi- GST verantwortlich gemacht wurde [180, 184, 185]).

8.3.1.2 GST-T2 Überexpression in den HTETOP-Zellen

In unseren Versuchen mit den HTETOP-Zellen konnte eine Überexpression der GST-T2 durch die Gabe von Dox, Dox+Dex sowie Dox+DOXY nachgewiesen werden, welche bei der alleinigen Gabe von Dox am höchsten war. Die Isoenzyme der Klasse Theta unterscheiden sich charakteristisch von denen der anderen GST-Klassen. Das aktive Zentrum der GST Theta liegt tiefer als bei anderen GSTs [186] in einer V-förmigen Tasche des Proteins. Sie besitzen eine Affinität zu halogenierten Kohlenwasserstoffen und Epoxiden, die als Substrate für andere GST-Klassen kaum relevant sind. Außerdem sind die Theta-GSTs für die Entgiftung reaktiver Sulfatester verantwortlich. In vivo werden diese reaktiven Sulfatester zum Beispiel aus Hydroxymethylarenen bzw. 7,12 Dihydroxymethylbenz[a]anthracenen (mit Hilfe von Sulfotransferasen) gebildet [187]. Dox-Sulfate sind ebenfalls beschrieben und werden zum Beispiel bei der Herstellung von liposomal verpacktem Dox eingesetzt. Reaktive Sulfatester stellen potente Karzinogene dar, die schnell mit den Purinbasen der DNA reagieren können.

8.3.1.3 Folgen der Überexpression von GST-T2

Durch die Überexpression der GST-T2 sind 3 Effekte auf die Zellen denkbar.

A) Es könnte mehr Dox aus den Zellen abtransportiert werden. Hierdurch ließe sich die von uns beobachtete Reduktion der intrazellulären Glutathionkonzentration erklären. Die niedrigere GSTT2-Überexpression durch die Gabe von DOXY oder Dex im Vergleich zu Dox allein hätte eine erhöhte intrazelluläre Dox-Konzentration zur Folge. Hierdurch wäre die von uns beobachtete höhere Sterblichkeit der Zellen im Vergleich zur alleinigen Gabe von Dox erklärbar. Auch das fehlende Absinken der Glutathionkonzentration nach der Gabe von 0,1 μM Dox in Kombination mit DOXY bzw. Dex könnte mit der geringeren GSTT2-Überexpression im Vergleich zur alleinigen Dox-Gabe zusammenhängen.

B) Die erhöhte Expression der GSTT2 nach der Gabe von 0,1 μM Dox könnte die Gegenregulation der Zelle auf die gestiegene ROS-Konzentration sein. Durch die damit effizientere Beseitigung der Peroxide wäre erklärbar, warum in unseren Experimenten kaum oxidativer Stress nach der Gabe von 0,1 μM Dox nachweisbar war.

C) Der letzte Effekt der gesteigerten GSTT2-expression könnte in der verstärkten Bindung von Dox in der L-Site zu sehen sein. Dadurch könnten die toxischen Wirkungen von Dox unterbunden werden und somit eine verbesserte Entgiftung der Zelle stattfinden. Über die Substrate der GST2 ist bislang nur wenig bekannt. Ein bekanntes Zytostatikum (BCNU) ist ein Substrat von GSTT1, während Dox vorwiegend im Zusammenhang mit GSTP erwähnt wird [188].

8.3.2 SOD

8.3.2.1 Beschreibung der SOD

Die Gene, die die Superoxiddismutasen (SOD) kodieren, gehören ebenfalls zu einer Multifamilie [189]. Sie kommen ubiquitär vor. Alle SOD katalysieren den Abbau von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid und tragen somit zu einer effektiven Beseitigung von ROS bei [190-192]. Während physiologische Konzentrationen an ROS wichtige Signalfunktion in der Zelle besitzen, oder zur Beseitigung von eingedrungenen Pathogenen beitragen, kann eine übermäßige Menge an ROS zu zahlreichen Schädigungen bis hin zum Tod der Zelle führen [189]. Es existieren 3 verschiedene SOD, die sich sowohl in der biochemischen Struktur, als auch in ihrem Wirkort unterscheiden.

Die SOD1 ist ein Kupfer- und Zink- haltiges Homodimer, welches hauptsächlich im Zytoplasma vorkommt [193]. Die SOD2 ist ein Mangan-haltiges Tetramer, welche nur nach Bedarf synthetisiert wird. So können zum Beispiel Lipopolysaccharide, Interleukine, TNF α und Substanzen, die die Proteinkinase C aktivieren, die Transkription der SOD2 induzieren. Durch Methylierung von Teilbereichen des SOD-Gens, sowie durch erhöhte Level des AP2-Transskriptionsfaktors lassen sich die SOD2-level in der Zelle reduzieren [189]. Eine spezielle Peptidstruktur der SOD2 sorgt dafür, dass sie ausschließlich in den Mitochondrien von aeroben Zellen vorkommt. Die SOD2 spielt eine wesentliche Rolle bei der Zelldifferenzierung und Tumorgenese sowie beim Schutz vor einer Hypoxie-induzierten pulmonalen Toxizität. In der genomischen Sequenz der SOD2 konnte in der Promotorregion keine TATA oder CAAT-Box, sondern nur GC-reiche Regionen identifiziert werden [194]. Im Gen der humanen SOD2 ließen sich außerdem Bindungsstellen für den NF- κ B-Transskriptionsfaktor und in der Promotorregion für die Sp1 und AP2-Transskriptionsfaktoren finden. Die SOD3 ist ein Kupfer- und Zink- haltiges Tetramer [195]. Durch ein spezielles Signalpeptid kommt diese SOD nur im extrazellulären Raum vor. Die Expression der SOD3 ist stark an bestimmte Zelltypen / Gewebe gebunden. Die Aktivität kann jedoch die der SOD1 und SOD2 übersteigen. Alle SOD spielen sowohl im Normalzustand der Zelle als auch während bestimmter Krankheiten eine Rolle. So konnte einige Mutationen der SOD1 mit dem Auftreten der Amyotrophischen Lateralsklerose assoziiert werden [196], das Ausschalten des SOD2-Gens führte in Mäusen zu einer tödlichen Kardiomyopathie [197], während eine einzelne Aminosäuremutation der SOD3 einen bis zu 15 fachen Anstieg der SOD3-Serumspiegels bewirkte [198, 199].

8.3.2.2 Auswirkungen der SOD2 Überexpression

In unseren Versuchen konnte in allen 3 Behandlungsgruppen (Dox, Dox+Dex, Dox+DOXY) eine Überexpression der SOD2 im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Dies deutet auf einen erhöhten oxidativen Stress in den Mitochondrien hin. Bei Prozessen der Atmungskette entstehen auf physiologische Weise ROS, welche im Normalfall durch die mitochondrialen Enzyme unschädlich gemacht werden können. Kommt es jedoch zu einer starken Erhöhung der ROS-Produktion, können ROS aus den Mitochondrien in das Zytoplasma entweichen und dort starke Schäden verursachen. Die Überexpression der SOD2 stellt somit eine regulatorische Anpassung an das erhöhte ROS-Aufkommen in den Mitochondrien dar. Dadurch könnten die Superoxidanionen effizient beseitigt werden. Durch erhöhte SOD2-expression (ebenso wie durch die Überexpression der GSTT2) wäre erklärbar, warum in unseren Experimenten kaum oxidativer Stress nach der Gabe von 0,1 μ M Dox nachgewiesen werden konnte. Bemerkenswert ist, dass die Gabe von DOXY die stärkste Überexpression der SOD2 ausgelöst hat. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum in den Dox+DOXY behan-

delten Zellen der niedrigste oxidative Stress im Vergleich zur alleinigen Dox-Therapie bzw. Dox+ Dex gezeigt werden konnte.

8.3.3 *cFOS*

Das letzte überexprimierte Gen der HTETOP-Zellen war das cFOS-Gen. FOS ist ein zelluläres Protoonkogen, welches zu der Gruppe der „immediate early gene family“ der Transkriptionsfaktoren gehört. Die Transkription von c-Fos kann durch viele extrazelluläre Signale wie zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren angeregt werden. Eine Phosphorylierung durch die MAPkinase, die Proteinkinase A (PKA) und C (PKC) oder cdc2 kann die Aktivität und Stabilität von cFOS verändern [200]. Die Mitglieder der FOS-Familie können mit C-Jun dimerisieren und so den Transkriptionsfaktor AP-1 bilden [201]. AP-1 erhöht die Transkriptionsrate von vielen Genen, die in die Proliferation und Differenzierung involviert sind, um die Zelle gegen Zellschäden bzw. das Eindringen von Pathogenen zu verteidigen [200, 202].

FOS hat ebenfalls einen Einfluss auf NF- κ B und SP1, wodurch wiederum antioxidative Gene induziert werden (siehe SOD2-Gen, welches eine Bindungsstelle für NF- κ B, SP1 und AP1 besitzt). Damit kann durch die verstärkte Expression von cFOS zumindest teilweise die Überexpression der Gene für die SOD2 und GSTT2 erklärt werden. Soriani et al. [203] konnten zeigen, dass eine Reduktion des intrazellulären Glutathionspiegels zu einem signifikanten Anstieg der cFOS-Expression führt. Interessanterweise konnte die Gruppe um Piret [204] nachweisen, dass die durch oxidativen Stress ausgelöste Schädigung der DNA die Aktivierung von NF- κ B triggern kann. Die Gruppe zeigte auch, dass Topoisomerasegifte wie Actinomycin, Daunomycin und Etoposid ebenfalls NF- κ B aktivieren kann. Da die Topoisomerasegifte zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen führen können, vermuten die Autoren, dass diese Schädigung möglicherweise für die gesteigerte Aktivierung von NF- κ B verantwortlich sein könnte. Umgekehrt führten DNA-schädigende Substanzen die durch die Bindung an die DNA (z.B. durch Transplatin) und / oder durch Crosslinkings wirken (wie z. B. durch Cisplatin), nicht oder nur schwach zu einer Aktivierung von NF- κ B in T-Zellen. Daher lassen sich die Ergebnisse dieser Gruppe zusammenfassen: 1. oxidativer Stress führt zu einer DNA-Schädigung, die ihrerseits eine Apoptose auslösen kann, wodurch NF- κ B aktiviert wird. 2. Die Hemmung der Topoisomerase kann ebenfalls in einer Apoptose münden, wodurch ebenfalls NF- κ B aktiviert wird. 3. Wird die DNA durch andere Substanzen wie Cisplatin geschädigt, erfolgt keine Aktivierung der NF- κ B. Aus diesen Befunden könnte man schließen, immer dann, wenn die Topoisomerase ursächlich an der Schädigung beteiligt ist, erfolgt die Aktivierung von NF- κ B. In unseren Microarrayuntersuchungen konnte zwar eine Überexpression von cFOS nachgewiesen werden, diese führte jedoch in keiner Behandlungsgruppe (Dox, Dox+Dex, Dox+DOXY) zu einer Überexpression von NF- κ B1. Jedoch ist hierdurch noch nicht abschließend geklärt, ob nicht durch cFOS mehr NF- κ B gebildet werden kann. Dies müssten weitergehende Studien noch untersuchen.

In unseren Versuchen konnten jedoch nicht nur überexprimierte Gene nachgewiesen werden, die in den oxidativen Stress involviert sind, sondern auch Gene, die durch die Behandlung in ihrer Expression eingeschränkt wurden. Hierzu zählen die XDH, TXNRD1 und die MAOA, auf welche im Folgenden eingegangen werden soll.

8.3.4 *Xanthindehydrogenase (XDH)*

In allen 3 Behandlungsgruppen (Dox, Dox+Dex, Dox+DOXY) konnte eine Verringerung der XDH-expression im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet werden. Die Xanthindehydrogenase (XDH) gehört zu den molybdänhaltigen Hydroxylasen. Das Enzym ist ein Homodimer, welches a) durch posttranslationale Modifikation der XDH oder durch b) die reversible Oxidation seiner SH-gruppen oder durch c) eine irreversible proteolytische Abspaltung

eines Segmentes der XDH in die Xanthin-Oxidase (XO) umgewandelt werden kann [205]. Die XDH ist die konstitutiv in den Zellen exprimierte Form. Sowohl die XDH als auch die XO katalysieren die Oxidation der Purine zu Harnstoffen. Allerdings verwendet die XDH für diese Redoxreaktion NAD^+ , welches anschließend in NADH umgewandelt wird ($\text{Xanthin} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Urat} + \text{NADH} + \text{H}^+$), während die XO molekularen Sauerstoff reduziert und so das hochreaktive Superoxidradikal bildet ($\text{Hypoxanthin} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Xanthin} + \text{H}_2\text{O}_2$ bzw. $\text{Xanthine} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightleftharpoons \text{Harnsäure} + \text{H}_2\text{O}_2$) [206, 207]. Die schnelle posttranslationale Umwandlung von XDH in die ROS-produzierende XO könnte ein physiologisches Beispiel für eine schnelle posttranslationale Signalübertragung sein, die durch aktivierten Sauerstoff vermittelt wird. Die Verringerung der XDH-expression hätte damit möglicherweise zur Folge, dass lebenswichtige Signalübertragungsprozesse nicht mehr ordnungsgemäß stattfinden können.

8.3.5 Thioredoxinreduktase 1

TXNRD1, welches die Thioredoxinreduktase 1 codiert, war im Vergleich zu den Kontrollzellen nur bei der alleinigen Therapie mit Dox erniedrigt. Dieses Gen gehört zur Familie der Pyridinnukleotid-Oxidoreduktasen (welche die Elektronenübertragung für die Nucleosiddiphosphatreduktion ermöglichen). Es ist ein Homodimer, welches Selenocystein enthält und man vermutet, dass es FAD als Kofaktor verwendet. Durch alternatives Splicing existieren zahlreiche Transkriptionsvarianten, die entweder gleiche oder verschiedene Isoformen verschlüsseln. TXNRD1 kann Thioredoxin und andere Substrate reduzieren und spielt eine Rolle im Selenmetabolismus und bei dem Schutz der Zelle vor oxidativem Stress. Die Aktivität dieser Enzyme ist essentiell für das Zellwachstum und das –überleben. Schlussendlich führt die Hemmung der Thioredoxinreduktase zur Apoptose und damit zum Sterben der Zellen. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die zeitgleiche Behandlung mit Dox+Dex / DOX+DOXY zu keiner Einschränkung der Genexpression der TXNRD1 führt. Dies könnte einer der Gründe dafür sein, warum in den Dex / DOXY behandelten Zellen weniger oxidativer Stress durch 0,1 μM Dox ausgelöst werden konnte im Vergleich zur alleinigen Gabe von Dox. Jedoch scheint selbst durch die verringerte Genexpression der TXNRD1 noch genügend von dem Enzym für lebenswichtige Prozesse vorzuliegen, was möglicherweise die ähnlichen Sterblichkeiten zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen erklären könnte (siehe Abschnitt 7.4).

8.3.6 Monoaminoxidase A

Durch die Gabe von Dox und Dox+DOXY wurde das Gen, welches für die Monoaminoxidase A (MAOA) codiert, in seiner Expression eingeschränkt. MAOA ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert [208]. Außerhalb von Neuronen und Astrogliazellen kommt die MAOA in der Leber, dem Gastrointestinaltrakt und der Plazenta vor. Die MAOA ist hauptsächlich für die oxidative Deaminierung von Noradrenalin, Adrenalin und Serotonin verantwortlich. Gemeinsam mit der MAOB ist die MAOA auch an der Deaminierung von Dopamin beteiligt. Molekularer Sauerstoff wird hierbei zur Umwandlung des Amins in den dazugehörigen Aldehyd verwendet. FAD dient den Monoaminoxidasen als Kofaktor, welcher kovalent gebunden wird.



Bei dieser Katalyse stellen Ammoniak und Wasserstoffperoxid die Endprodukte dar, die somit ebenfalls für die Entstehung von oxidativem Stress verantwortlich sind. In unseren Versuchen führte lediglich Dex zu keiner Änderung der MAOA-Genexpression, während bei allen anderen Behandlungen eine deutliche Reduktion gezeigt werden konnte. Möglicherweise stellt die fehlende Reduktion der MAOA-Expression einen weiteren Grund dar, warum Dex in diesen Zellen den Dox-induzierten oxidativen Stress schlechter kompensieren kann, als erwartet.

8.4 Bedeutung genetischer Polymorphismen für die Entstehung von kardialen Schäden nach Dox

8.4.1 Kardiotoxizitätsanalyse am Studienkollektiv der Ricover60-Studie

Die aktuelle Datenlage weist eine hohe interindividuelle Variabilität der Dox-induzierten Herzschiiden auf [9]. Einige neuere Studien [209-211] deuten darauf hin, dass die genetische Ausstattung entscheidend an der Entstehung der Herzschiiden beteiligt sein k6nnte. Bereits in der Arbeit von Wojnowski et al. [20] wurden 6 Polymorphismen als m6gliche Risikofaktoren f6r die Entstehung von kardialen Schiiden identifiziert. Der Einfluss von diesen 6 Polymorphismen auf die Kardiotoxizitit sollte in unserem Studienkollektiv von 1309 Patienten verifiziert werden. Drei der untersuchten Polymorphismen kodieren f6r Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase, daher soll zunichst auf die Besonderheiten dieses Enzyms eingegangen werden. Die NAD(P)H-Oxidase ist daf6r verantwortlich, dass Elektronen von NAD(P)H via der Flavin- und H6m-Redoxcenter im gp91^{phox} auf Sauerstoff (O₂) 6bertragen werden, infolge dessen die hoch reaktive Superoxidanionen (O₂⁻) entstehen [212]. Dabei besteht das Enzym aus membrangebundenen und cytosolischen Bestandteilen. Die integralen Membranproteine bestehen aus gp91^{phox} (CYBB) und der p22^{phox} (CYBA), die gemeinsam das Flavocytochrom 558 bilden. In der gp91^{phox}-Untereinheit befindet sich die FAD und die H6m (Eisen)-Bindungsstelle. Die cytosolischen Komponenten der NAD(P)H-Oxidase bestehen aus dem Komplex aus p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox}.

Nach Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase wandert der Komplex aus p40^{phox}, p47^{phox} und p67^{phox} an die Membran und wird 6ber die Bindung von p47^{phox} stabil an p22^{phox} gebunden. Dadurch wird RAC2 aus seinem Komplex mit dem Rho- GDP Dissoziationsinhibitor freigesetzt, bindet jetzt GTP und wandert ebenfalls an den Membrankomplex, wo es p47^{phox}, p40^{phox} und p67^{phox} an verschiedenen Stellen phosphoryliert. Hierdurch wird wiederum das Flavocytochromsystem aktiviert, wodurch schlussendlich die Elektronen von NAD(P)H via der Flavin- und H6m-Redoxcenter im gp91^{phox} auf O₂ 6bertragen werden.

8.4.1.1 Der CYBA-Polymorphismus rs4673

CYBA ist ein Gen, welches die p22^{phox} Untereinheit (22kDa) der NAD(P)H-Oxidase kodiert. Parkos et al. [213] konnte erstmals nachweisen, dass p22^{phox} konstitutiv in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert wird. 6ber die transkriptionelle Regulation ist jedoch nur wenig bekannt. Sowohl LPS als auch verschiedene Zytokine (TNF- α und koloniestimulierender Faktor) k6nnten laut Untersuchungen von Newburger et al. [214] an der transkriptionellen Regulation von CYBA beteiligt sein. Neben der gp91 Untereinheit ist die p22^{phox} Untereinheit entscheidend an der Superoxidproduktion beteiligt (durch die Bindung der anderen Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase). So konnte die Gruppe um Ushio-Fukai M. et al. [215] zeigen, dass vaskul6re glatte Muskelzellen die F6higkeit zur Superoxidanionenproduktion verlieren, sobald die Zellen mit antisense Oligonukleotiden gegen diese Untereinheit transfiziert wurden. CYBA ist auf dem gro6en Arm von Chromosom 16 an Position 24 lokalisiert. Das Gen umspannt 8,5 kb und ist aus 6 Exons und 5 Introns zusammengesetzt. Exon 6 kodiert rund 35% der 195 Aminos6uren des Proteins, die restlichen 5 kodieren je 20-25% der Aminos6uren

[216]. Polymorphismen innerhalb der Promotersequenz dieses Gens führen zu einer interindividuellen Variation der Enzymaktivität. Der von uns untersuchte SNP (CYB rs4673) befindet sich in Exon 4 und ist ein „nonsynonymous SNP“, was bedeutet, dass es zu einer Veränderung der Polypeptidstruktur von CYBA führt [217]. Die Mutation bewirkt, dass Histidin (kodiert durch Codon 94) gegen Tyrosin an der Position 72 substituiert wird. In dem Cytochrom B Komplex befinden sich zahlreiche Histidinreste in gp91^{phox}, während in p22^{phox} nur ein Histidinrest vorhanden ist. Normalerweise sorgt Histidin dafür, dass Häm innerhalb der Membran des Cytochrom B Komplexes bleibt. Jedoch war man sich lange Zeit nicht einig, wo sich das Häm in diesem Komplex genau befindet. Ursprünglich ging man davon aus, dass ein Häm in gp91^{phox} lokalisiert ist und das zweite Häm von beiden Untereinheiten geteilt wird [218]. Neuerdings besteht jedoch die Auffassung, dass beide Häm-Gruppen in gp91^{phox} lokalisiert sind. Somit würde der Histidinrest in der p22^{phox} Untereinheit nicht an der Bindung von Häm und damit auch nicht an dem Elektronentransfer innerhalb der NAD(P)H-Oxidase beteiligt sein [219]. Jedoch scheint der C-terminale prolinreiche Teil der p22^{phox} und damit der Histidinrest für die Stabilität der eintretenden p47^{phox} Untereinheit (über die Interaktion mit deren SH3-Domäne) verantwortlich zu sein. Ein Austausch des Histidinrestes in der p22^{phox} Untereinheit an Position 72 gegen Tyrosin verändert jedoch die Proteinstabilität im Gegensatz zu einer Substitution mit Arginin nicht. Zu den klinischen Auswirkungen dieses SNP wurde eine Vielzahl an Untersuchungen mit zum Teil widersprüchlichen Ergebnissen durchgeführt. In unserer Studie konnte in dem Wildtyp-rezessiven Modell bei den Fällen eine Anreicherung von T/T und C/T beobachtet werden, während bei den Kontrollen C/C leicht überwiegt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Patienten, die die Genotypen T/T bzw. C/T tragen und eine Therapie mit Dox erhielten, eine größere Wahrscheinlichkeit aufweisen an Herzschäden zu erkranken, als Patienten mit dem Genotyp C/C. Mit diesen Ergebnissen konnten damit die Befunde aus der 1. großen Studie Wojnowski et al. [20] bestätigt werden.

Weshalb sich der CYBA-Polymorphismus rs4673 C242T auf das Risiko zur Entstehung einer Herzschädigung ausprägt, konnte bislang noch nicht geklärt werden. Verschiedene Arbeitsgruppen befassten sich daher mit den Auswirkungen auf proteinchemischer Ebene. So fand die Gruppe um Guzik et al. [220] heraus, dass verglichen mit dem C₂₄₂-Allel das T₂₄₂-Allel sowohl basal, als auch unter NADH-Stimulation eine geringere Superoxidproduktion auslöst (in vitro). Diese Ergebnisse konnte die Gruppe um Wyche neuerdings bestätigen. Sie zeigten, dass T/T trotz gleichbleibender Proteineexpression aller 3 Genotypen zu einer signifikant niedrigeren Superoxidproduktion in neutrophilen Zellen (30% weniger als im Wildtyp) führte [221]. Im starken Kontrast zu diesen Ergebnissen steht jedoch die Arbeit von Y. Shimo-Nakanishi et al. [222], der bei PMA stimulierten Neutrophilen eine gesteigerte Superoxidproduktion für das T-Allel nachwies. Unsere eigenen Versuche an Mäusen würden ebenfalls eher die Ergebnisse von Y. Shimo-Nakanishi unterstützen. Wir konnten zeigen, dass sowohl durch höhere Dox-Konzentrationen im Herzen, als auch durch höheren oxidativen Stress eine stärkere Kardiotoxizität induziert wird. Wurde durch einen Knockout einer NAD(P)H-Oxidase-Untereinheit (bei den gp91-Mäusen) die Ursache für oxidativen Stress ausgeschaltet, so konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in den Herzen dieser Mäuse ein niedrigerer oxidativer Stress (quantifiziert über den geringeren GSSG-Gehalt) nachweisbar war. Zum Anderen konnte in den Untersuchungen von Deng et al. [126] eine niedrigere Rate an Dox-induzierter Kardiotoxizität nachgewiesen werden. Dies würde bedeuten, dass die Substitution von C>T in CYBA zu einer Aktivierung der NAD(P)H-Oxidaseaktivität führen könnte, was eine stärkere Kardiotoxizität zur Folge hätte. Auch die kürzlich publizierte Studie von Rossi et al. [211], untermauern unsere eigenen Ergebnisse. Sie konnten zeigen, dass Patienten, die mit dem RCHOP-Schema behandelt worden sind, ein längeres Event freies Überleben aufwiesen, wenn sie Träger der Genotypen C/T / C/C waren im Vergleich zum Genotyp T/T. Rossi et al. führte das verringerte Überleben der „T/T-Patienten“ auf eine ineffiziente Bekämpfung der Tumorzellen (durch ROS) zurück.

Es wäre jedoch auch gut denkbar, dass der T/T-Genotyp eine stärkere NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung verursacht, wodurch früher kardiale Schäden auftreten, die ihrerseits in einem kürzeren eventfreien Intervall münden.

In vivo Untersuchungen zu den Auswirkungen des C242T Genotyps lieferten ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse. Es existierten Hinweise darauf, dass das T-Allel für eine verstärkte Endothel-abhängige Vasodilatation der epikardialen Koronararterien verantwortlich wäre [223]. Jedoch konnte diese Beobachtung in keiner weiteren Untersuchung bestätigt werden. Auch konnte keine Korrelation zwischen dem T Genotyp und einer veränderten Lipidperoxidation nachgewiesen werden [224]. Die Gruppe um Schirmer et al. [225] untersuchte ebenfalls den Einfluss des C242T Genotyps auf die NAD(P)H-Oxidaseaktivität. Zwischen den einzelnen Genotypen von CYBA242 (C/C, C/T, T/T) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Lediglich bei der Durchführung einer stark eingeschränkten (restricting analyses) Analyse konnte für den T/T Genotyp eine 30 prozentige Reduktion der NAD(P)H-Oxidaseaktivität wie bei Wyche et al. [221] nachgewiesen werden. Bislang konnte nicht abschließend geklärt werden, worin der ursächliche Zusammenhang zu der erhöhten Inzidenz von Herzschäden und dem CYBA-Genotyps begründet liegt.

Die bedeutende in vivo-Rolle der NAD(P)H-Oxidase scheint jedoch durch unsere Studie weiter untermauert worden zu sein.

8.4.1.2 Der NCF4-Polymorphismus rs1883112

Der zweite Polymorphismus, der in unseren Untersuchungen eine Korrelation zur Herzschädigung aufwies war der SNP NCF4 rs1883112. NCF4 codiert für die p40^{phox} Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase. p40^{phox} stellt das Adapterprotein zwischen den membrangebundenen Bestandteilen der Oxidase und dem Oxidaseaktivator p67^{phox} dar. Damit das Protein nicht als dauerhafter Aktivator der Oxidase wirkt, ist seine SH-Domäne durch eine intramolekulare Interaktion maskiert. Erst durch eine Stimulation der Zellen findet ein Konformationswechsel statt, wodurch die SH-Gruppe freigelegt wird und für die Interaktion mit der p22^{phox} Untereinheit zur Verfügung steht [226]. Das für die p40^{phox} Untereinheit codierende NCF4-Gen befindet sich auf dem Chromosom 22q13.1 [227] und ist hauptsächlich in Knochenmarkszellen (Neutrophile, Monozyten, Basophile, Eosinophilen, Mastzellen, Megakaryozyten sowie in B- und T-Zellen) exprimiert. Der von uns untersuchte SNP befindet sich in der Promoterregion von NCF4 (-368 G>A).

In unserer Studie konnte in allen 3 Patientengruppen (akut, chronisch, akut+chronisch) im Wildtyp-dominanten Modell eine leichte Anreicherung von A/A und G/A bei den Kontrollen beobachtet, während bei den Fällen G/G leicht überwiegt. Der hier beobachtete Effekt ist gegensätzlich zu den Ergebnissen der Gruppe um Wojnowski et al. [20] und Rossi et al. [211], die herausfanden, dass nach einer RCHOP Therapie die Träger der Genotypen A/G bzw. G/G besser vor kardialen Toxizitäten geschützt waren, als die Träger des Genotyps A/A. Möglicherweise ist der Effekt für diesen Genotyp zu schwach, als dass der Einfluss von NCF4 auf die kardiale Toxizität sicher beurteilt werden könnte. Daher wäre in weiteren Studien ein 1:3 Matching sicher von Vorteil, um die Ursache für die Diskrepanz zwischen den drei Studien herausfinden zu können.

8.4.1.3 Der RAC-Polymorphismus rs13058338

Der letzte von uns untersuchte Polymorphismus, der mit dem vermehrten Auftreten einer Herzschädigung verbunden war, stellt RAC2 rs13058338 dar. Das kleine regulatorische G-Protein gehört zu der Superfamilie der Ras-GTPasen [228]. RAC2 wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und ist für die Aktivierung der NOX2 in neutrophilen Zellen verantwortlich [229]. Komplexe aus aktiviertem RAC und p67^{phox} sorgen für einen geregelten Elektronentransport durch das Flavocytochrom b558 auf Sauerstoff und die Translokation der RAC-GTPase in die Plasmamembran. Neben der p47^{phox} und der p67^{phox} scheint RAC

auch für die korrekte Zusammenlagerung der NAD(P)H-Oxidase-Untereinheiten verantwortlich zu sein [230]. Die Gene von RAC2 und NCF4 sind beide auf dem Chromosom 22 lokalisiert mit einem Abstand von 350000bp. Jedoch besteht zwischen beiden Polymorphismen kein Koppelungsungleichgewicht. Der von uns untersuchte Polymorphismus befindet sich im Intron 2 von RAC2 (T7508A). Die funktionellen Veränderung die dieser Polymorphismus im RAC2 bewirkt, wurden von der Gruppe um Schirmer et al. [225] untersucht. Sie konnten zeigen, dass der Austausch von T>A an der Position 7508 mit einer gesteigerten mRNA-Expression des RAC2-Gens und des NCF4 Gens (1,5 fach) korreliert. Die Träger des Genotyps A/A wiesen ca. 1,5 mal mehr RAC2 Transskripte auf als die Träger von T/T. Ebenso fanden sie heraus, dass sowohl zwischen NCF4 und CYBA/ RAC2, als auch zwischen CYBA und RAC2 eine signifikante Koregulation vorhanden ist. Der Polymorphismus von RAC2 korrelierte signifikant mit den Transskriptionslevels von RAC2 und NCF4 (mit CYBA nur in die gleiche Richtung, jedoch nicht signifikant). Die Gruppe um Schirmer et al. [225] vermuteten daher, dass die Korrelation der RAC2-, NCF4- und CYBA-Transkriptionslevel auf einen gemeinsamen Regulator stromaufwärts (wie z.B. der Hämatopoese-assoziierte Faktor 1 oder der Nukleärer Faktor kappa B (NFκB)) hindeuten. In unserer Studie konnte im Wildtyp-rezessiven Modell bei den Fällen eine leichte Anreicherung von A/A- und T/A-Genotypen beobachtet werden, während bei den Kontrollen der T/T-Genotyp leicht überwog (siehe Abb. 57). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Patienten, die die Genotypen A/A bzw. T/A tragen und eine Therapie mit Dox erhielten, eine größere Wahrscheinlichkeit aufweisen, an Herzschäden zu erkranken, als Patienten mit dem T/T- Genotyp. Mit diesen Ergebnissen konnten ebenfalls die Befunde aus der Studie von Wojnowski et al. bestätigt werden. Ebenso wie die NAD(P)H-Oxidase sind verschiedene andere Systeme an der Regulation der zellulären Redoxgleichgewichte beteiligt. So auch die Effluxtransporter MRP1 und MRP2.

8.4.1.4 Die Polymorphismen MRP2 rs8187710 und MRP1 rs45511401

MRP1 und MRP2 gehören zur Gruppe der Multidrug Resistance Proteine (MRP) und darin zur Klasse C der ABC-Transporter. Sie kommen in der Plasmamembran aller Eukaryoten vor. Im menschlichen Organismus sind MRPs in vielen physiologischen Barrieren zu finden, wie zB. an der Blut-Hirn-Schranke, im Darm, in der Niere und der Leber. Unter Energieverbrauch (Hydrolyse von ATP) werden sowohl körpereigene, als auch toxische Stoffe bzw. Xenobiotica aus den Zellen heraustransportiert. Alle ABC-Transportproteine bestehen aus einer großen transmembranären Domäne und einer Nukleotid-Bindungsdomäne (NBD). Während die transmembranären Domänen die „drug binding site“ (internale Kammer) besitzen, sind die NBD für den ATP-abhängigen aktiven Transport der Substanzen verantwortlich. Die Struktur der NBD ist stark konserviert.

MRP1 ist in zahlreichen Geweben exprimiert, jedoch besonders in Herz, Lunge, Dünndarm, Gehirn und Haut [231]. MRP1 fungiert als eine zelluläre Effluxpumpe, die verschiedene Glucuronat- und Sulfonatkonjugate [150, 232-234] (darunter auch Konjugate mit diversen Zytostatika / Zytokinen) transportiert. Auch die Anthrazykline werden unter Beteiligung von Glutathion transportiert [116]. Ob Glutathion bei dem Transport nur als Kosubstrat (GS-Konjugat zu Dox) oder als Aktivator von MRP1 wirkt, konnte bislang noch nicht abschließend geklärt werden [116, 117]. Damit spielt MRP1 eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zellredoxpotentials (via Transport von Glutathion), bei dem Transport von diversen Ionen (via seiner Ionenkanalregulation), bei der inflammatorischen Immunantwort (via Transport von Prostaglandinen, Leukotrienen und Zytokinen), aber auch bei dem Transport von Endo- und Xenobiotica und der Verteilung der Phospholipide in den Zellmembranen [150, 233, 234]. Da MRP1 im Herzen exprimiert ist, geht man heute davon aus, dass eine erhöhte Expression von MRP1 vor einer Anreicherung der Anthrazykline bzw. deren Folgen (Anreicherung von ROS in der Zelle) schützen kann. So konnte die Gruppe um Wijnholds et al. [235] bereits im Jahr 2000 zeigen, dass eine gezielte Entfernung von MRP1 in Mäusen zu

einer Akkumulation von Etoposid im Herzen führte und die Gruppe um Joshi et al. [139] beobachtete eine veränderte MRP1 Expression unter oxidativem Stress. 72 h nach einer i.p. Injektion von Dox konnte parallel zum Anstieg der oxidierten Protein- und Lipidperoxid-Level eine verstärkte Expression von MRP1 im Gehirn beobachtet werden. Im Herzgewebe wurden 6 bzw. 24 h nach der Gabe von Dox ähnliche Anstiege der MRP1-Expression (1.6 - 3 fach) beobachtet, die mit einem signifikanten Anstieg von HNE einhergingen [118, 119]. Die Gruppe um Jungsuwadee et al. [118] vermuten daher, dass die MRP1-Expression eine frühe Antwort auf den Dox-induzierten oxidativen Stress darstellen könnte. Damit könnte MRP1 dazu beitragen, dass Herz vor dem Dox-induzierten oxidativem Stress zu schützen. Jedoch führte die starke Anreicherung der toxischen oxidativen Produkte wie Hydroxynoneal (HNE) dazu, dass die MRP1-Aktivität im Laufe der Zeit wieder sank. Die Autoren führten dieses Phänomen auf eine vermehrte HNE- Addition an MRP1 zurück.

Eine wichtige Rolle spielen die MRPs auch in Tumorzellen (z.B. bei Brust-, Ovarial oder Lungenkarzinomen). Sie sorgen dafür, dass die Zytostatika aktiv aus der Tumorzelle heraus transportiert werden, wodurch es zu einer geringeren Akkumulation und damit auch zu einer geringeren Wirksamkeit der Zytostatika kommt. Dieses Phänomen wird dafür verantwortlich gemacht, dass einige Tumore resistent gegenüber bestimmten Zytostatika geworden sind.

Der von uns untersuchte Polymorphismus befindet sich auf dem Chromosom 16 im Exon 16 (G2012T) und stellt ein „nonsynonymous SNP“ dar. In diesem Fall wird das in der humanen ABCC-Familie hochkonservierte Glycin in Position 671 gegen Valin ersetzt. Die Mutation befindet sich außerdem nur 6 Aminosäuren von dem „Walker A signature-Motifs“ der ersten NBD stromaufwärts entfernt. Damit wäre eine Veränderung der Transporteigenschaften wahrscheinlich. Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob die Mutation tatsächlich zu einer veränderten MRP1-aktivität für Dox führt. Die Gruppe um Conrad et al. [236] konnte lediglich für den Transport von Leukotrien C₄, 17-Estradiol 17-(d)-Glucuronide und Estronsulfat keine veränderten K_m oder V_{max} -Werte gegenüber dem Wildtyp feststellen. Allerdings konnten sie zeigen, dass die Mutation zu einer geringeren mRNA-Expression führte. Diese Ergebnisse könnten für die Interpretation unsere Ergebnisse von großer Bedeutung sein. Durch eine geringere MRP1-Expression würde man eine verstärkte Akkumulation von ROS, als auch von Dox im Herzen erwarten. Die Folge hiervon wäre eine erhöhte Inzidenz von Herzscheiden im Vergleich zum Wildtyp. Tatsächlich konnte in der Arbeit von Wojnowski et al. [20] eine Anreicherung der MRP1-Genotypen G/T und T/T bei den Fällen nachgewiesen werden. In unserem Studienkollektiv ließen sich jedoch diese Ergebnisse nicht bestätigen. Lediglich in der Subgruppe chronische Fälle versus Kontrolle konnte eine leichte Anreicherung von G/T und T/T in den Fällen beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit der kürzlich publizierten Studie von Visscher et al. [237]. Zwar bestand deren Studienkollektiv ausschliesslich aus Anthrazyklin behandelten Kindern und nicht wie bei uns aus Patienten, die in einem Alter zwischen 61-80 Jahren alt waren. Auch die Art der Tumoren unterschied sich in beiden Studien. So gab es in der Studie von Visscher et al. keine Begrenzung auf nur eine Tumorentität, während in unserer Studie ausschliesslich Patienten mit Non Hodgkin-Lymphomen eingeschlossen worden. Visscher et al. konnte, wie in der vorliegenden Arbeit keine Assoziation zwischen dem von uns untersuchten Polymorphismus von MRP1 rs45511401 mit einer erhöhten Inzidenz einer Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität nachweisen. Jedoch konnten sie eine Assoziation im selben Haplotyp-Block wie das von uns untersuchte MRP1 rs45511401 nachweisen (rs4148350). Hinzu kommt, dass beide Polymorphismen miteinander gelinkt sind. Diese Befunde deuten darauf hin, dass der Austausch von Glycin in Position 671 gegen Valin doch eine Rolle bei der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität zu spielen scheint. Welcher SNP hierbei den entscheidenden Einfluss spielt, bleibt in weiteren Studien abzuklären.

MRP2 gehört zur Subfamilie C2 der ABC-Transporter und besitzt ebenso wie MRP1 Exkretions- und Detoxifizierungseigenschaften. Genetische Polymorphismen können hier ebenfalls die Genexpression verändern.

Der von uns untersuchte Polymorphismus von MRP2 befindet sich auf dem Chromosom 10 im Exon 32 (73832G>A) und stellt ebenfalls ein „nonsynonymous SNP“ dar. In diesem Fall bewirkt die Mutation einen Austausch von Cystein gegen Tyrosin an der Position 1515. In der Studie von Meier et al. [238] konnte gezeigt werden, dass eine hohe MRP2-Expression signifikant mit diesem Polymorphismus korrelierte.

Jedoch konnte in unserer Studie keine Korrelation eines Genotyps mit dem verstärkten Auftreten von Herzschädigungen nachgewiesen werden. (siehe Abb. 58).

8.4.2 Bewertung der Metaanalyse

Vergleicht man die Studie von Wojnowski et al. [20] mit unserem Studienkollektiv, dann ist auffällig, dass sowohl für CYBA als auch für RAC2 in beiden Studien ähnliche Odds Ratios nachgewiesen wurden. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass beide SNP für eine Untereinheit von ein und demselben Protein- der NAD(P)H-Oxidase- codieren. Damit könnte nachgewiesen sein, dass zum Einen die NAD(P)H-Oxidase ursächlich an der Entstehung der Herzschädigung beteiligt ist und zum Zweiten, dass diese 2 SNP mit dem gehäuften Auftreten von Herztotoxizitäten nach Anthrazyklingabe verantwortlich zu sein scheinen.

Bei den Polymorphismen von NCF4 und MRP1 wurden in der aktuellen Studie gegensätzliche Werte im Vergleich zu der Studie von 2005 gefunden. Für diese beiden SNP kann daher keine Korrelation zum verstärkten Auftreten von Herzschädigungen hergestellt werden (mit der Einschränkung, die die Arbeit von Visscher et al impliziert siehe 8.4.1.4). Einzig für den Polymorphismus von MRP2 wurden in der jetzigen Studie ähnliche log OR zur Studie von 2005 nachgewiesen. Da in der aktuellen Studie jedoch viel größere Konfidenzintervalle beobachtet wurden, konnte auch für diesen SNP keine eindeutige Korrelation mit dem gehäuften Auftreten von Herzschäden getroffen werden.

Außerdem konnte für keine untersuchte Assoziation ein statistisch signifikanter Wert nachgewiesen werden. Möglicherweise sind hierfür verschiedene Faktoren verantwortlich. In unserer Studie konnte die Herzschädigung nur an Hand von Symptomen ermittelt werden, die in der Datenbank dokumentiert waren. Eine klinische Bestätigung einer Herzinsuffizienz (z.B. durch Echokardiographie) fehlte. Ebenso lagen uns nur sporadisch Diagnoseparameter (wie zum Beispiel: die Einschränkung der LVEDP oder der Ejektionsfraktion des Herzens) vor. Der einzige Hinweis auf die richtige Eingruppierung der Patienten als Fall / Kontrolle lieferten uns die NT-proBNP-Werte. In diesen Untersuchungen konnten die Fälle zu 89% bestätigt werden, jedoch war die Eingruppierung als Kontrolle wesentlich schwieriger (nur 44% waren wirkliche Kontrollen). Für die mangelnde Vorhersagbarkeit von Kontrollpatienten sind möglicherweise 4 Faktoren von Bedeutung. Zum Einen wurde ein Patient als Kontrolle definiert, sobald weder sichere, noch unsichere Hinweise auf eine Herzschädigung in der Datenbankabfrage zu finden waren. Die unsicheren Hinweise bestanden jedoch zum Teil nur aus der Angabe: Patient besitzt eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit und ist kurzatmig. Möglicherweise hat nicht jeder Patient diese schwachen Symptome gegenüber seinem behandelnden Arzt erwähnt bzw. der Arzt hat sie als ganz normale Alterserscheinungen angesehen und sie nicht in die Studiendokumentation eingetragen. Zum Zweiten ist bekannt, dass die Anthrazyklin-induzierte Kardiotoxizität zum Teil erst Jahre nach der eigentlichen Chemotherapie auftreten kann. Da die Blutprobensammlung und damit auch die Bestimmung des NT-proBNP-Wertes mit großem zeitlichen Abstand zur Chemotherapie erfolgten, ist es durchaus möglich, dass die Patienten zwar während der Nachbeobachtungszeit unauffällig waren, aber schließlich bis 2007 doch noch eine Herzschädigungen entwickelt haben. Eine weitere mögliche Ursache für die mangelnde Vorhersagbarkeit der Kontrollen könnte darin gesehen werden, dass die Patienten zum Zeitpunkt der Chemotherapie bereits mindestens 60 Jahre alt waren. Mit zuneh-

mendem Alter steigt jedoch die Inzidenz zur Entstehung von Herzscheiden, auch ohne dass eine Therapie mit Anthrazyklinen stattgefunden hat. Schlussendlich könnte die mangelnde Sensitivität / Spezifität des Markers NT-proBNP, eine Rolle für die ungenaue Vorhersagbarkeit der Kontrollpatienten spielen.

Eine weitere Limitierung der Aussagekraft dieser Studie bestand in der geringen Fall / Kontrollzahl. Wir konnten in unserer Studie nicht das sonst übliche Matching von 3 Kontrollen je Fall, sondern nur ein Verhältnis von 2:1 anwenden. Dadurch sinkt die Power der Aussage dramatisch. Ferner gestaltete es sich schwierig, aufgrund der geringen Probandenzahl und der Abwesenheit je eines MRP2 / MRP1-Genotyps den Effekt dieser beiden Polymorphismen auf die Entstehung von Anthrazyklin-induzierten Herzscheiden nachzuweisen.

9 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden Polymorphismen von CYBA und RAC2 das Auftreten von Herzscheidigungen nach der Gabe von Anthrazyklinen beeinflussen. In prospektiven Studien sollte anhand von größeren Probandenzahlen überprüft werden, ob sich die Ergebnisse dieser Studie bestätigen lassen. Ferner sollten von allen Patienten der kardiale Zustand an Hand von eindeutigen Diagnoseparametern (wie z.B. der Abfall der Ejektionsfraktion) verifiziert werden. Von besonderem Interesse sind jedoch Studien, die untersuchen sollen, ob die Aussagen an das klinische Outcome gekoppelt sind. So könnten möglicherweise Träger der T/T+C/T Genotypen von CYBA bzw. der A/A+T/A Genotypen von RAC2 von einer anthrazyklinfreien Therapie / einer deutlich dosisgesenkten Therapie profitieren. Weiterführende Projekte könnten zudem das Ziel haben, ob zwischen der „nützlichen“ NAD(P)H-Oxidasefunktion als Zerstörer von Tumorgewebe und der „schädlichen“ NAD(P)H-Oxidasefunktion als Verursacher von Kardiotoxizität unterschieden werden kann.

Auch die Erforschung von weiteren genetischen Polymorphismen, die mit dem Auftreten von kardialen Schäden assoziiert sind, könnten die Ursachen der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität näher beleuchten. Ebenso könnte die weitere Abklärung des kardiopräventiven Effektes von Dex dazu beitragen, die Therapie mit Anthrazyklinen nebenwirkungsärmer zu gestalten. Hierbei wäre besonders der Einfluss von Dex auf MRP1 von Interesse. Beeinträchtigt Dex den Dox-Transport via MRP1 oder die MRP1-Expression und was wären die Folgen für die Antitumorthherapie mit Dox stellen interessante Fragestellungen dar. Außerdem bliebe die Frage offen, ob die Hemmung der Topo II durch Dex sich nachteilig auf die Tumorresponse bzw. die Langzeit-Kardiotoxizität auswirkt.

Um herauszufinden, worin sich die beiden Wildtypmausestamme C57BL/6 und Balb/c unterscheiden, wäre sicher noch die Frage zu klären, ob die Balb/c-Mäuse in allen Organen niedrigere Mengen an Dox und seiner Metabolite aufweisen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäuse. Hierzu wäre entscheidend, die Doxorubizinverteilung in der gesamten Maus zu ermitteln und dabei auch die Ausscheidungssekrete der Mäuse zu untersuchen. Möglicherweise kann dies durch neuere Techniken wie die Positron-Elektronen-Tomographie (PET) bewerkstelligt werden.

Außerdem wäre sicherlich spannend zu prüfen, inwieweit sich die von uns beobachteten Änderungen in der Genexpression, der am oxidativen Stress beteiligten Gene auf Proteinebene auswirken. Lässt sich zum Beispiel durch die Überexpression von cFos tatsächlich mehr NF- κ B in den Zellen nachweisen und was sind die Folgen hiervon.

10 Zusammenfassung

Dox gehört zur Gruppe der Anthrazykline, welche seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich gegen ein breites Spektrum an Tumoren eingesetzt wird. Neben der guten Wirksamkeit besitzt Dox jedoch auch ein sehr hohes Nebenwirkungspotential. Die wohl folgenschwerste Nebenwirkung stellt die irreversible Schädigung des Herzens dar. Zahlreiche Faktoren, wie zum Beispiel die kumulative Dox-Dosis konnten bereits mit einer erhöhten Inzidenz an kardialen Schäden in Verbindung gebracht werden. Bislang ungeklärt war jedoch die Frage, warum Patienten unterschiedlich sensibel auf die Verabreichung von Dox reagierten.

An dem Patientenkollektiv der Ricover60-Studie wurde der Einfluss der individuellen genetischen Ausstattung auf die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Herzschiidigung untersucht. Alle Patienten mit Dox-induzierten Herzschiiden wurden identifiziert und auf das Vorhandensein von genetischen Polymorphismen der NAD(P)H-Oxidase (CYBA, RAC2 und NCF4) und der Anthrazyklin-Transporter (MRP1 und MRP2) untersucht. Sowohl fiiir CYBA als auch fiiir RAC2 konnte eine Anreicherung bestimmter Genotypen (CYBA: CT/TT; RAC2: TA/AA) in der Gruppe der herzgeschadigten Patienten nachgewiesen werden. In der Multivariaten Analyse von RAC2 erreichte diese Anreicherung ein signifikantes Niveau ($p=0.028$). Damit konnte fiiir diesen Polymorphismus die klinische Relevanz bestatigt werden.

Die Ursachen der Dox-induzierten Toxizitat wurden auBerdem an verschiedenen Mausstammen und Zelllinien untersucht. Balb/c- und C57BL/6-Mause, die bekanntermassen unterschiedlich sensibel auf Dox reagierten, wurden mit Dox behandelt. Anschliessend wurden die Organe Herz, Leber und Blut via HPLC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sich 1. die Hauptanreicherungsorte fiiir Dox und Doxol (Balb/c: Herz und Blut versus C57BL/6: Leber), 2. die nachgewiesenen Gesamtmengen an Dox+Doxol+Doxon in den drei Organen ($\text{Menge}_{\text{C57BL/6}} > \text{Menge}_{\text{Balb/c}}$) sowie 3. die An- und Abflutungsgeschwindigkeiten von Dox zwischen den beiden Mausstammen unterscheiden. Schlussendlich konnte im Vergleich zu den Balb/c-Mausen, bei den C57BL/6-Mausen eine starkere kardiale Anreicherung von Dox nach der mehrmaligen Dox-Injektion nachgewiesen werden. Somit scheinen der deutlich hohere Dox-Gehalt und die langere Verweilzeit in den Herzen fiiir die starkere kardiale Schadigung der C57BL/6-Mause verantwortlich zu sein. Hingegen verlief die Art der Dox-Metabolisierung in beiden Mausstammen ahnlich.

Bei der Betrachtung des oxidativen Stresses konnte gezeigt werden, dass in den Herzen der C57BL/6-Mausen ein groBerer oxidativer Stress vorlag, als bei den Balb/c-Mausen. Ahnlich wie bei der Ricover60-Studie lieB sich auch bei den Mausen eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase am Dox-induzierten oxidativen Stress nachweisen.

Mit der HTETOP-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass Dox unter physiologischen Bedingungen oxidativen Stress auslosen kann. Die Art und die Konzentration der gebildeten ROS waren abhanging von der Dox-Konzentration, der Einwirkzeit und der Kompensationsfahigkeit der Zellen. Durch die Gabe von Dex lieB sich das AusmaB des oxidativen Stresses lediglich in den Mauserzen reduzieren. In den HTETOP-Zellen zeigte Dex selbst stressauslosende Eigenschaften. Durch die Behandlung mit Dex / DOXY konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Topo II α selbst oxidativen Stress in den HTETOP-Zellen auslost. Jedoch scheint weder die Topo II α -Hemmung, noch der Dox-induzierte oxidative Stress bei physiologischen Dox-Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) eine entscheidende Rolle fiiir die Toxizitat zu spielen.

In der Mikroarray-Analyse der HTETOP-Zellen konnten verschiedene Gene identifiziert werden, die in den oxidativen Stress involviert sind und die durch die Gabe von Dox differentiell reguliert werden. Durch die Komedikation mit Dex / DOXY lieBen sich diese Veranderungen teilweise modulieren.

11 Anhang

11.1 Zusammensetzung des „Blutprobenkits“

- 1 Anschreiben für den Arzt
- 1 Begleitbogen
- 2 Patienteninformationen (eine für den Patienten und eine für das Studiensekretariat in Bad Homburg)
- 1 frankierte und an uns adressierte Transportbox mit:
 - 1 EDTA-haltiges Blutentnahmeröhrchen (schon mit der Patientennummer beschriftet)
 - 1 Schutzhülle für das Blutentnahmeröhrchen
- 1 frankierten und an das Studienzentrum adressierten Rückumschlag für die Einverständniserklärung des Patienten
- 1 frankierte und an uns adressierte Karte, die den Erhalt des Blutentnahmekits bestätigen soll
- 1 Süßigkeit für den Patienten

11.2 Arztansreiben für die akuten Fälle

Sehr geehrte Kollegin, sehr geehrter Kollege

Ihr Patient

hat während seiner Chemotherapie an der Ricover60-Studie teilgenommen, die von der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome durchgeführt wird. Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass eine zusätzliche Gabe des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen die Wirksamkeit der CHOP-14-Chemotherapie verbessert. Außerdem wurden bzw. werden die durch die Chemotherapie ausgelösten kurz- und langfristig aufgetretenen Toxizitäten erfasst.

Bei ihrem Patienten ist uns eine therapieassoziierte Kardiotoxizität gemeldet worden, deren Ursachen näher charakterisiert werden sollen. Da wir auch Symptome wie Herzrhythmusstörungen als Zeichen einer Herzschiidigung in die zu untersuchende Risikogruppe eingeschlossen haben, kann es sein, dass Ihr Patient trotz der gemeldeten Kardiotoxizität klinisch v611ig beschwerdefrei ist.

In Zusammenarbeit mit der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome hat Herr Prof. Dr. L. Wojnowski, Institut f611r Pharmakologie der Universit611t Mainz, die Untersuchungen zur Kardiotoxizit611t 611bernommen. Es sollen hierbei relevante Genpolymorphismen identifiziert und ihr m611glicher Einfluss auf die Entstehung einer Herzschiidigung nach Gabe von Anthrazyklinen erforscht werden. Fr611here Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wojnowski lieferten bereits erste Hinweise auf einige Gene, die mit dem Auftreten einer Anthrazyklin-induzierten Herzschiidigung bei erwachsenen NHL-Patienten korrelieren*. Diese bereits bekannten Gene sollen verifiziert und auf ihre klinische Relevanz in dem Patientenkollektiv der Ricover60-Studie gepr611ft werden. Zus611tzlich soll die Herzschiidigung durch die Messung des NT-proBNP, einem Marker f611r Herzschiidigung, verifiziert werden.

Wir bitten Sie, f611r diese Analysen 4 ml Vollblut ihres Patienten **in EDTA** an folgende Adresse zu schicken:

**Prof. Dr. L. Wojnowski,
Institut f611r Pharmakologie
RICOVER60-Studie
Johannes-Gutenberg-Universit611t Mainz,
Obere Zahlbacher Str. 67
55101 Mainz.**

Bitte verwenden Sie das beiliegende Entnahmer611hrchen, den Begleitbogen und den frankierten Umschlag. Falls Sie ein anderes Entnahmesystem benutzen – das Blut muss **unbedingt in EDTA** entnommen werden. Eine K611hlung des Blutes ist nicht notwendig.

* Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schl611ter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeb611ller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, N611rnberg P, Pfreundschuh M, Tr611mper L, Brockm611ller J, Hasenfuss G. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. Circulation (2005) 113:3754-62.

Bitte senden Sie außerdem die unterschriebene und vom Patienten datierte Einwilligungserklärung des Patienten an das Studiensekretariat der DSHNHL zurück (frankierte Rückumschläge liegen diesem Anschreiben bei).

Die Ihnen entstandenen Kosten übernehmen wir selbstverständlich. Schicken Sie hierfür bitte die Rechnung an den Herrn Prof. Dr. L. Wojnowski. (Tel.: 06131/3933460; E-Mail: wojnowski@uni-mainz.de)

Für Ihre Fragen bezüglich dieses Forschungsprojekts im Rahmen der Ricover60-Studie stehen wir selbstverständlich jederzeit zur Verfügung.

Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Mit freundlichen, kollegialen Grüßen,

Prof. Dr. M. Pfreundschuh
Studienleiter

11.3 Arztansreiben für die chronischen Fälle

Sehr geehrte Kollegin, sehr geehrter Kollege

Ihr Patient

hat während seiner Chemotherapie an der Ricover60-Studie teilgenommen, die von der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome durchgeführt wird. Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass eine zusätzliche Gabe des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab zur Verbesserung der Wirksamkeit der CHOP-14-Chemotherapie beitragen kann. Außerdem wurden bzw. werden, die durch die Chemotherapie ausgelösten kurz- und langfristig aufgetretenen Toxizitäten erfasst.

Bei ihrem Patienten ist uns eine Kardiotoxizität gemeldet worden, deren Ursachen näher charakterisiert werden soll. Da wir auch Symptome wie Herzrhythmusstörungen als Zeichen einer Herzschiidigung in die zu untersuchende Risikogruppe eingeschlossen haben, kann es sein, dass der Patient v611g beschwerdefrei ist.

In Zusammenarbeit mit der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome hat Herr Prof. Dr. L. Wojnowski, Institut f611r Pharmakologie der Universit611t Mainz, die Untersuchungen zur Kardiotoxizit611t 611bernommen. Es sollen hierbei relevante Genpolymorphismen identifiziert und ihr m611glicher Einfluss auf die Entstehung einer Herzschiidigung erforscht werden. Fr611here Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wojnowski lieferten bereits erste Hinweise auf einige Gene, die mit dem Auftreten einer Anthrazyklin-induzierten Herzschiidigung in Erwachsenen NHL-Patienten korrelieren*. Diese bereits bekannten Gene sollen verifiziert und auf ihre klinische Relevanz in dem Patientenkollektiv der Ricover60-Studie gepr611ft werden.

Wir bitten Sie f611r diese Analysen 4 ml Vollblut ihres Patienten **in EDTA** an folgende Adresse zu schicken:

**Prof. Dr. L. Wojnowski,
Institut f611r Pharmakologie
RICOVER60-Studie
Johannes-Gutenberg-Universit611t Mainz,
Obere Zahlbacher Str. 67
55101 Mainz.**

Bitte verwenden Sie das beiliegende Entnahmer611hrchen, den Begleitbogen und den frankierten Umschlag. Falls Sie ein anderes Entnahmesystem benutzen – das Blut muss **unbedingt auf EDTA** entnommen werden. Eine K611hlung des Blutes ist nicht notwendig.

Bitte senden Sie au611erdem die unterschriebene und vom Patienten datierte Einwilligungserkl611rung des Patienten an das Studiensekretariat der DSHNHL zur611ck (frankierte R611ckumschl611ge liegen diesem Anschreiben bei).

* Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schl611ter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeb611ller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, N611rnberg P, Pfreundschuh M, Tr611mper L, Brockm611ller J, Hasenfuss G. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. Circulation (2005) 113:3754-62.

Die Ihnen entstandenen Kosten übernehmen wir selbstverständlich. Schicken Sie hierfür bitte die Rechnung an den Herrn Prof. Dr. L. Wojnowski. (Tel.: 06131/3933460; E-Mail: wojnowski@uni-mainz.de)

Für Ihre Fragen bezüglich dieses Forschungsprojekts im Rahmen der Ricover60-Studie stehen wir selbstverständlich jederzeit zur Verfügung.

Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Mit freundlichen, kollegialen Grüßen,

Prof. Dr. M. Pfreundschuh
Studienleiter

11.4 Arztansreiben für die Kontrollen

Sehr geehrte Kollegin, sehr geehrter Kollege

Ihr Patient

hat während seiner Chemotherapie an der Ricover60-Studie teilgenommen, die von der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome durchgeführt wird. Mit dieser Studie wurde gezeigt, dass eine zusätzliche Gabe des monoklonalen CD20-Antikörpers Rituximab bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen die Wirksamkeit der CHOP-14-Chemotherapie verbessert. Außerdem wurden bzw. werden die durch die Chemotherapie ausgelösten kurz- und langfristig aufgetretenen Toxizitäten erfasst.

In Zusammenarbeit mit der Deutschen Studiengruppe Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome hat Herr Prof. Dr. L. Wojnowski, Institut für Pharmakologie der Universität Mainz, die Untersuchungen zur Kardiotoxizität übernommen. Es sollen hierbei relevante Genpolymorphismen identifiziert und ihr möglicher Einfluss auf die Entstehung einer Herzschiidigung nach Gabe von Anthrazyklinen erforscht werden. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wojnowski lieferten bereits erste Hinweise auf einige Gene, die mit dem Auftreten einer Anthrazyklin-induzierten Herzschiidigung bei erwachsenen NHL-Patienten korrelieren*. Diese bereits bekannten Gene sollen verifiziert und auf ihre klinische Relevanz in dem Patientenkollektiv der Ricover60-Studie geprüft werden. Zusätzlich soll eine Herzschiidigung durch die Messung des NT-proBNP, einem Marker für Herzschiidigung, ausgeschlossen bzw. verifiziert werden

Bei Ihrem Patienten ist uns keine therapieassoziierte Kardiotoxizität gemeldet worden. Er ist für die Kontrollgruppe vorgesehen.

Wir bitten Sie, für diese Analysen 4 ml Vollblut ihres Patienten **in EDTA** an folgende Adresse zu schicken:

**Prof. Dr. L. Wojnowski,
Institut für Pharmakologie
RICOVER60-Studie
Johannes-Gutenberg-Universität Mainz,
Obere Zahlbacher Str. 67
55101 Mainz.**

Bitte verwenden Sie das beiliegende Entnahmeröhrchen, den Begleitbogen und den frankierten Umschlag. Falls Sie ein anderes Entnahmesystem benutzen – das Blut muss **unbedingt in EDTA** entnommen werden. Eine Kühlung des Blutes ist nicht notwendig.

* Wojnowski L, Kulle B, Schirmer M, Schlüter G, Schmidt A, Rosenberger A, Vonhof S, Bickeböller H, Toliat MR, Suk EK, Tzvetkov M, Kruger A, Seifert S, Kloess M, Hahn H, Loeffler M, Nürnberg P, Pfreundschuh M, Trümper L, Brockmöller J, Hasenfuss G. NAD(P)H oxidase and multidrug resistance protein genetic polymorphisms are associated with doxorubicin-induced cardiotoxicity. Circulation (2005) 113:3754-62.

Bitte senden Sie außerdem die unterschriebene und vom Patienten datierte Einwilligungserklärung des Patienten an das Studiensekretariat der DSHNHL zurück (frankierte Rückumschläge liegen diesem Anschreiben bei).

Die Ihnen entstandenen Kosten übernehmen wir selbstverständlich. Schicken Sie hierfür bitte die Rechnung an den Herrn Prof. Dr. L. Wojnowski. (Tel.: 06131/3933460; E-Mail: wojnowski@uni-mainz.de)

Für Ihre Fragen bezüglich dieses Forschungsprojekts im Rahmen der Ricover60-Studie stehen wir selbstverständlich jederzeit zur Verfügung.

Vielen Dank für Ihre Unterstützung.

Mit freundlichen, kollegialen Grüßen,

Prof. Dr. M. Pfreundschuh
Studienleiter

11.5 Begleitbogen

RICOVER60- STUDIE

BEGLEITBOGEN

Bitte 4 ml Vollblut in **EDTA** an:

Institut für Pharmakologie, z. Hd. Prof. Dr. L. Wojnowski, RICOVER60- Studie, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, Obere Zahlbacher Str. 67, 55101 Mainz.

Keine Kühlung erforderlich. Bitte Probenröhrchen mit Patientenaufkleber versehen.

Patienten-ID

Geburtsdatum

Klinik/Praxis

Entnahmedatum

Entnahmeuhrzeit

Bei Fragen wenden Sie sich bitte an:

Herrn Prof. Dr. med. Leszek Wojnowski
Tel. +49 (0)6131 39 33460
Web-Fax: +49 (0)1803 5518 36727
Email: wojnowski@uni-mainz.de

Vielen Dank !

11.6 Patienteninformation

Sehr geehrte/r Patient/in,

Sie mussten während Ihrer Chemotherapie mit Medikamenten behandelt werden, die leider für eine Reihe von Nebenwirkungen verantwortlich gemacht werden. So treten bei einigen Patienten Schädigungen des Herzens auf. Die Ursachen dieser medikamentösen Herzschiidigung sind wissenschaftlich noch nicht vollstiindig geklärst. Allerdings weist die unterschiedliche Anfälligkeit verschiedener Personen für diese Nebenwirkung auf eine individuelle genetische Veranlagung hin.

Sie erklärten sich während Ihrer Chemotherapie bereit, an der klinischen Studie Ricover60 teilzunehmen. Im Rahmen dieser Studie möchten wir Sie um Ihre Zustimmung zur Entnahme von 4 ml Blut bitten. Mit Ihrem Blut sollen genetische Untersuchungen durchgeführt werden, die dazu beitragen könnten, die zu Grunde liegenden Mechanismen der Herzschiidigung aufzuklären. Dabei wird das Erbgut auf das Vorhandensein bestimmter NormalGenotypen der Erbinformation untersucht und deren Vorhandensein mit dem Auftreten einer Herzschiidigung verglichen. Zusätzlich soll überprüft werden, ob bei Ihnen der Herzmarker NT-proBNP erhöht ist.

Die Teilnahme an diesem Projekt der Studie ist freiwillig und dient rein wissenschaftlichen Zwecken. Sollten Sie der Teilnahme zustimmen, erfolgt lediglich eine zusätzliche Blutentnahme aus der Armvene, sofern dies nicht im Rahmen geplanter Routineuntersuchungen stattfinden kann. Wir möchten darauf hinweisen, dass in seltenen Fällen durch die venöse Blutentnahme Nebenwirkungen und Folgen auftreten können (z. B. Bluterguss, Nervenverletzung, versehentliche arterielle Punktion, Infektion). Das gewonnene Blut wird zur weiteren Untersuchung an das Labor des Pharmakologischen Institutes der Johannes-Gutenberg Universität Mainz geschickt. Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen Ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie zurücknehmen, eventuell bereits entnommenes Blut wird in diesem Fall vernichtet. Alle Ihre Angaben werden vertraulich behandelt und in keinem Fall an Dritte weitergegeben; aus Datenschutzgründen werden die experimentell ermittelten Daten anonymisiert. Mit Ihrem Einverständnis können Sie uns helfen, die Krebstherapie in Zukunft etwas nebenwirkungsärmer zu machen.

11.7 Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich von dem Arzt/der Ärztin

.....

über die oben genannte Untersuchung informiert worden bin. Ich bin damit einverstanden, dass an meiner Blutprobe die beschriebenen Untersuchungen durchgeführt werden. Diese Zustimmung erfolgt freiwillig. Ich kann jederzeit ohne Angaben von Gründen mein Einverständnis zurückziehen, die Blutprobe wird in diesem Fall vernichtet. Eine Kopie dieser Einverständniserklärung und der Patienteninformation habe ich erhalten.

.....
Unterschrift des/der Patienten/in

.....
Datum

.....
Unterschrift des/der aufklärenden Arztes/Ärztin

.....
Datum

11.8 Ergebnisse aus den NT-proBNP-Bestimmungen

Tab. 17: NT-proBNP-Messwerte

Pat.-Nr.	NT-proBNP [pg/ml]	Geb.-datum	Alter im Jahr 2007	erhöhte NT-proBNP Werte (x)	akuter chronischer Kontrolle=3 Fall=1 Fall=2
6	50,88	08.05.1939	68		1
269	334,9	03.04.1938	69	x	1
292	480,7	22.03.1939	68	x	1
361	862,2	02.06.1932	75	x	1
499	1293	31.12.1935	71	x	1
503	1220	29.08.1922	85	x	1
706	196,4	04.03.1933	74	x	1
756	144,5	23.03.1936	71	x	1
852	563,2	14.03.1929	78	x	1
871	669,4	19.03.1934	73	x	1
892	1211	20.09.1934	73	x	1
971	389,7	23.02.1939	68	x	1
1147	490,9	08.02.1940	67	x	1
1276	464,5	05.07.1932	75	x	1
211	2131	27.06.1938	69	x	2
225	160,5	07.09.1936	71	x	2
242	4818	05.07.1934	73	x	2
268	244,7	06.05.1938	69	x	2
437	91,84	29.08.1935	72		2
498	1066	04.12.1935	72	x	2
515	6256	11.02.1938	69	x	2
690	48	29.05.1938	69		2
390	8291	28.09.1934	73	x	2
453	8148	12.02.1934	73	x	2
239	4405	27.07.1926	81	x	2
333	2703	22.04.1928	79	x	2
1235	1981	10.11.1938	69	x	2
1281	1857	31.05.1927	80	x	2
413	1484	07.06.1938	69	x	2
1242	897,2	19.08.1933	74	x	2
820	794,5	09.07.1939	68	x	2
729	500,9	03.03.1941	66	x	2
809	446,3	18.09.1933	74	x	2
699	318,2	11.11.1940	67	x	2
837	220,1	20.11.1939	68	x	2
296	132	18.11.1937	70	x	2
543	167,3	31.05.1927	80		2
25	186	27.07.1933	74	x	3
27	93,76	12.07.1936	71		3
32	75,44	20.10.1935	72		3
33	1594	26.08.1930	77	x	3
34	475,9	11.07.1932	75	x	3

Pat.- Nr.	NT-pro BNP [pg/ml]	Geb.-datum	Alter im Jahr 2007	erhöhte NT- proBNP Werte (x)	akuter Fall=1 chronischer Fall=2 Kontrolle=3
69	174,7	06.02.1933	74	x	3
97	215	16.07.1933	74	x	3
122	8,79	19.07.1936	71		3
167	321,9	23.04.1939	68	x	3
171	275	12.04.1939	68	x	3
173	153,8	23.04.1935	72	x	3
191	63,67	24.12.1936	71		3
229	301,9	27.05.1939	68	x	3
254	33,13	28.01.1938	69		3
270	289,7	02.06.1940	67	x	3
285	9288	24.07.1927	80	x	3
286	650,9	24.06.1935	72	x	3
288	177,4	11.10.1939	68	x	3
338	65,51	14.09.1937	70		3
384	60,7	23.02.1936	71		3
389	252,3	01.08.1933	74	x	3
391	221,5	01.05.1940	67	x	3
402	68,77	04.06.1933	74		3
411	21,44	28.03.1929	78		3
448	633,4	13.12.1935	72	x	3
475	1074	27.11.1935	72	x	3
492	149,9	27.12.1939	68	x	3
545	668,5	11.05.1935	72	x	3
556	100,3	01.06.1931	76		3
587	295,3	27.07.1939	68	x	3
595	219,7	16.01.1934	73	x	3
597	91,66	02.07.1937	70		3
608	449,3	20.02.1941	66	x	3
616	71,62	24.12.1939	68		3
652	114,1	26.06.1940	67		3
685	70,31	30.11.1940	67		3
711	484,2	03.05.1937	70	x	3
724	1286	10.10.1923	84	x	3
725	350,8	04.06.1929	78		3
750	78,39	29.05.1938	69		3
753	37,25	04.10.1937	70		3
764	269,4	27.06.1927	80		3
765	1830	27.06.1939	68	x	3
777	208	09.08.1939	68	x	3
783	314,5	22.02.1935	72	x	3
800	89,94	27.09.1938	69		3
821	429,6	21.02.1926	81		3
841	96,61	09.06.1938	69		3
842	148,2	13.09.1939	68	x	3
853	176,2	28.10.1935	72	x	3

Pat.-Nr.	NT-pro BNP [pg/ml]	Geb.-datum	Alter im Jahr 2007	x=erhöhte NT-proBNP Werte	akuter chronischer Kontrolle=3 Fall=1 Fall=2
874	283,9	24.04.1933	74	x	3
876	107,8	13.02.1932	75		3
881	1991	28.10.1932	75	x	3
899	332,7	24.12.1932	75		3
909	332,7	17.07.1930	77		3
911	256,3	21.03.1936	71	x	3
925	49,69	23.11.1938	69		3
930	203,5	27.08.1937	70	x	3
941	19484	05.12.1928	79	x	3
954	919,9	15.07.1938	69	x	3
965	65,12	30.12.1932	74		3
967	275,3	10.04.1942	65	x	3
970	300,1	21.09.1941	66	x	3
986	56,92	19.02.1937	70		3
989	273,2	27.03.1927	80		3
993	11,91	10.01.1941	66		3
996	390,7	16.01.1942	65	x	3
998	357,5	04.01.1934	73	x	3
1007	279,1	05.10.1934	73	x	3
1021	100,3	23.11.1931	76		3
1029	156,8	22.03.1931	76		3
1040	105,2	19.04.1937	70		3
1055	45,91	05.06.1941	66		3
1058	415,7	19.10.1939	68	x	3
1059	263,5	19.08.1940	67	x	3
1065	86,08	26.01.1935	72		3
1094	152,7	04.04.1932	75		3
1095	380,4	09.09.1939	68	x	3
1099	268,6	16.01.1940	67	x	3
1119	139,3	21.08.1940	67	x	3
1129	81,2	13.04.1941	66		3
1178	67,44	11.09.1934	73		3
1194	118,9	13.08.1942	65		3
1207	65,12	02.06.1937	70		3
1231	70,26	01.05.1941	66		3
1236	99,43	22.08.1939	68		3
1237	1943	06.07.1935	72	x	3
1263	27,71	30.11.1942	65		3
1265	537,3	20.12.1930	77	x	3
1269	623,4	26.08.1930	77	x	3
1305	1289	08.09.1936	71	x	3
1308	153,6	05.02.1940	67	x	3
1311	72,3	09.05.1940	67		3
1316	462,6	18.11.1934	73	x	3

11.9 Kriterien aus der Datenbankabfrage

Tab. 18: Parameter die aus der Datenbank abgefragt wurden

1 Prätherapie	2 Während der Chemotherapie für jeden Chemotherapiezyklus	3 Nachbeobachtung im Anschluss an die Chemotherapie (Folgebeobachtungen)
Welche Erkrankungen lagen vor? (mit ICD-Code und Freitext)	Datum des Chemotherapiezyklusbeginns	Datum des Folgebogens
Begleitmedikation	Abbruch der protokollgerechten Therapie	Diagnostizierte Folgeerkrankungen anhand von Verschlüsselungscodes oder Freitexten
	Grund für den Abbruch der Therapie	1. Schweres Unerwünschtes Ereignis mit Datumsangabe, Therapiebedingte Todesfolge?, schwere Kardiomyopathie? Und Freitext
	Vorliegen des CTC-Codes 301 (Arrhythmie) oder 302 (Abfall der Ejektionsfraktion) mit Angabe der Schwere des Ereignisses?	2. Schweres Unerwünschtes Ereignis mit Datumsangabe, Therapiebedingte Todesfolge?, schwere Kardiomyopathie? Und Freitext
	sonstige Unerwünschte Ereignisse während der Chemotherapie mit Angabe des CTC-Codes und dem Grad des Ereignisses	Todesfolge mit Datumsangabe, Ursache: Therapie-/ Tumor-/ Primärtherapiebedingt, oder sonstige Ursachen im Freitext
	sonstige Unerwünschte Ereignisse während der Chemotherapie mit Angabe des Freitextes und dem Grad des Ereignisses	
	Interkurrente Erkrankungen	

11.10 Identifizierung von Herzschäden

Tab. 19: Kriterien, anhand derer eine Herzschädigung sicher identifiziert wurde

Herzprobleme vor Beginn der Chemotherapie	Herzprobleme während der Chemotherapie	Herzprobleme im Anschluss an die Chemotherapie (auf den Folgebögen)
Herzinsuffizienzmedikamente (Digitalis, ACE-Hemmer, AT1-Blocker, Diuretika, β -Blocker)	Eintragungen anhand des CTC Codes	Lungenfunktionseinschränkung
AV-Block	301 (Arrhythmie) (Grad des Ereignisses 1-4)	Schädigung des Herzens
Vorhofflimmern /-flattern	302 (Eingeschränkte Herzfunktion durch Abfall der Ejektionsfraktion) (Grad des Ereignisses 1-4)	KHK
Arrhythmien (auch Schrittmacherträger)	Angaben im Freitext	Herzmuskelschädigung
Synkopen	deutlich eingeschränkte Herzinsuffizienz zu erwarten	Angaben im Freitext
pAVK	Synkopen	Belastungsdyspnoe, Arrhythmie
Stent	Kardiomyopathie	Dysp.+progre. Beinödeme bei bek. chron. Herzinsuff. ; begl. Stauungs.
Herzklappeninsuffizienz	akutes Nierenversagen, Bronchopulm. Infekt; Tachyarrhythmie, schl. AZ	Rhythmogener Herztod, Therapieinfo
Thrombose /Stenosen	Vorderwandinfarkt	Tachycardia arrhythmia absolut
Ischämien	Abfall EF	erfolglose REA bei Kammerflimmern/ flattern
Belastungsdyspnoe	Herzrhythmusstörungen	schwere Kardiomyopathie
KHK	Rez. Re Infarkte	3-GHK, Bypass - OP
z.N. Schlaganfall/ Herzinfarkt	manif. kardiale Insuffiz. nach 4. Kurs	paroxusmales Vorhofflimmern
Hypertonie	zu erwartende Herzschädigung	Tachykardie, V.a. Sepsis, 4 Tage intensivmed. Behandlung
Angina	wegen kardialer Situation	kardial-embolischer Mediateilinfarkt re
	Arrhythmie	Infect and cardiac arrhyhtmia
	Apoplex	s.o. plötzlicher Herztod bei tadylarder Herzrhythmusstörung unter häuslichen Bedingungen

Herzprobleme vor Beginn der Chemotherapie	Herzprobleme während der Chemotherapie	Herzprobleme im Anschluss an die Chemotherapie (auf den Folgebögen)
	Herzstolpern	Coronarthrombose; akuter Myocardinfarkt
	Kardiale Dekompensation	toxische Kardiomyopathie
	Kardiale Unverträglichkeit	V.a. plötzlichen Herztod
		Herzinsuffizienz
		intermittierende Tachyarrhythmia absoluta
		Pat. akut verstorben, nach Kurzmitteilung des HA:v.a. akuter Herztod
		akuter Myokardinfarkt
		V.a. Lungenembolie oder maligne Herzrhythmusstörungen
		Septisches Herz-/Kreislaufversagen
		Cardiac insufficiency
		Mediatotalinfarkt
		KHK
		TAA bei VHF
		pAVK
		Aortenstenose
		Deg. cerot. Dekompensation
		Mediainsult
		Apoplex
		Kardial embol. Mediateilinfarkt

Tab. 20: Kriterien, anhand derer eine Herzschiidigung zu vermuten ist

Wiihrend der Chemotherapie	Folgebiiogen
Hinweise in den CTC-Codes:	Hinweise in den Freitexten:
10.04 Blutungen	Beinvenenthrombose
6.08 Schwindel	schwere Gangunsicherheit
6.04 Koordination	schlechter Allgemeinzustand
6.03 Bewusstsein	Fatigue
6.02 Motorik	unklare schwiiuche in beiden Beinen
4.09 Husten	diffuse Hypokinesie
4.02 Blutgase	Miiidigkeit
4.01 Dyspnoe	Schwindel
3.09 iiideme	fulminante Lungenembolie mit Exitus
3.08 Phlebitis / Thrombose / Embolie	zu.AZ-Verschle. Gewichtsverl.,
3.07 Hypotonie	Thrombopene Hirnblutung
3.06 Hypertonie	GOT 87,6 U/l , GPT 134 U/l , Gamma-GT 344 U/l
3.05 sonstiges Herz	PH Lebothrombose
3.03 Ischiiemie	Thrombose v. axilla
1.22 Hypokaliiiiemie	Tod vor Beginn der Therapie vermutlich durch Hirninfarkt; Obduktion veranlaiiet
1.21 Hyponatriiiiemie	TIA
1.13 Transaminasen	Tetraparese (toxisch) Endoxanindz.
1.04 Thrombozyten	Phlebothrombose, Thrombose
Hinweise in den Freitexten:	Acute Temperatur Paraparesis Recover after about 6 H.
Miiidigkeit	V. a. Hirnstamminsult
Abgeschlagenheit	intestinale Blutung unter Marcumar/femorocruraler Bypass 7/02; Quick 18%
Fatigue	reg. cerot. Dekompensation
Schwiiuche, Schlapp	generalisierte Gefiiuisklerose Kachexie
Asthenie	
Beinkrampfe	ausgedehnte rechtsfrontoparietale intracerebrale Blutung mit resultierender Hirnstammeinklemmung
Venenschmerzen im Bein, Schwellung im Bein, Unterschenkelschwellungen	noch unbekannt
Oberbauchschmerzen, Schmerzen obere BWS, Schmerzen linker Oberbauch	unklare Ursache
Thorakale Schmerzen	s. SUE u. gefaxter AB (PCP/Multiorganversagen)

Während der Chemotherapie	Folgebögen
Verschlechterung des Allgemeinzustandes	mittelgradig eingeschränkte Diffusionskapazität
Herzrasen, Unruhe	s. anliegender Brief / Bemerkung Arzt
Fatigue	Multiorganversagen
Schwindel, Übelkeit, polyneuropathische Beschwerden	Therapiebedingter Todesfall
AZ, Kraftlosigkeit	Unbekannte Ursache Tod
AZ-Verschlechterung	Gestorben ohne Angabe eines Grundes
ALAT-GGT	Kreislaufdysregulation
Leistungsfähigkeit, Leistungsknick / -abfall	Respiratorische Insuffizienz
schwäche linkes Bein	Krämpfe in der Beinmuskulatur
starke Wadenkrämpfe, Waden-/ Fußkrämpfe	Leistungsabfall
Kreislaufstörungen	Unterschenkelvenenthrombose
Orthostatische Beschwerden	Wadenkrämpfe
Kollaps	
Performancestatus	
Multiple Komplikationen	
Intracerebrale Blutungen	

Tab. 21: Hinweise auf Herzscheiden in dem Bemerkungsfeld Arzt unterteilt in A) sichere und B) unsichere, aber wahrscheinliche Herzscheiden

Sichere Hinweise	Unsichere Hinweise
Belastungsdyspnoe	CML lt. Kardiologe als Anthrazyklin verursacht bewertet.
instabile Pectangina bei Hb 8,7 n. Transfusion stabil	Blutungen
PAVK	Dyspnoe
Echokardiogr.: Pumpfunktion gut, EF leicht gemindert	Schwindel+Übelkeit kardial keine neue Erkrankung
Begleiterkrankg.: Aortenstenose, Ovarialcyste, C0 ab 29.5.01	zu CTC-Code 3.01. Arrhythmie: Zusammenhang fraglich, eher unwahrscheinlich
Echo: Cor hypertonicum ohne Anhalt auf tox. Medikamentenwirkung	Herzkatheteruntersuchung: O.B.
Meningeosis Lymphomatosa; Apoplex am 26.3.04	Müdigkeit, Gewichtsabnahme, innere Unruhe
keine Nachsorge mehr möglich, Pat. wird durch Hausarztbesuche versorgt, da sie einen Schlaganfall hatte	Krampfanfall
Echokardio: nicht streng behandlungsbedürftige Aorteninsuffizienz, 05.03.05 Impingement-OP im Bereich der rechten Schulter	Dyspnoe durch Anämie bedingt
Dyspnoe bei geringer Belastung	cerebr. Insultes m. li-seitiger Kraftminderung.
01/06 Apoplex ohne Residuen	Leistungsfähigkeit
Belastungsdyspnoe, LV-Funkt. o.B.	Unterschenkelödeme vorbestehend
Dyspnoe same as before treatment	(taubes Gefühl in der rechten Wade), (03.09 Unterschenkelödeme => Lasix p.o.)
Progreß, Tod dann durch Herz - Kreislauf - Versagen	Gewichtsverlust durch Rückgang der Ödeme von 80,9 kg auf 63,7 kg.
Tachykardie	Vincristin 1 mg absolut, da retrosternales Druckgefühl, z. B. KHK ?
Arrhythmie; Pat hat Vorhofflimmern schon vorbestehend	Kollapssymptomatik
Lungenembolie Zykl. II, T 5 (Z.n. Alter 1997 Embolie, vorbestehend VHFli)	zu Untersuchungen: Langzeit-EKG, Duplex Sono Beinvenen, Durchflusszytometrie; zunehmende Dyspnoe
kardiale Toxizität wurde im April festgestellt, nicht während des KH-Aufenthaltes zur Chemotherapie	nach klin. Untersuchung in der Kardiologie - CR, s. Brief
Plötzliche tachykarde Herzrhythmusstörung am 26.12.01 nachts / morgens; mit Todesfolge (zu Hause), lt. Bericht der Ehefrau	rez. thorakale Schmerzen => Vorstellung Kardioloige => noch keine Ergebnisse
art. Hypertonus	zu Leistungsabfall: problemlos zu bewältigende Gehstrecke: 500 m
ab C2 liposomales Adriblastin statt Dox wg Kardiotoxizität (->6 lix 20mg/qm; 500mg/qm; Cyclophosphamid 500mg/qm + Vincristin 2mg abs.-Umstellg. auf 21-täg. Schema!	zunehmende Besserung des AZ und der Leistungsfähigkeit

Sichere Hinweise	Unsichere Hinweise
während C1 Auftreten pectaninöser Beschwerden bei eindeutiger EKG-Kinetik =>koronare 3-Gefäßerkrankung	weiterhin Belastungsdyspnoe bei COPD
Rö. Thorax: kardiale Stauung	1200 = Leistungsminderung u. Müdigkeit
G-CSF abgesetzt wg. Herzinsuff.	Schwindel, Gangunsicherheit, Ataxie, Kreislaufkollaps, RR 80/50 mm Hg
im Mediastromgebiet li mit Aphasie u. bds. Armschwäche am 18.4.05; CT morphologisch kein Korrelat;Rückbildg. d. Symptom nach 2 h)	TIA=transistorische ischämische Attacken
Doxorubizin abgesetzt:deutl. Verschlechterung der linksventrikulären Funktion. Toxische Kardiomyopathie	Schwäche li. Bein u. Arm; neurolog. Konsil->kein Reapoplex (Zn. Apoplex 12/03); kein neurol. Defizit TIA möglich; ASS 300 gegeben.
Stopp antihypertensive Therapie ---> Besserung der Symptome	Herzklopfen bei stärkerer Belastung, verstärkt während Chemotherapie
kardiologische Symptomatik steht zuerst im Vordergrund - Restaging und dann Planung des weiteren therap. Vorgehens	Prednison Tag 1 100, Tag 2-3 50mg, Tag 4 12,5 mg; rez. leichte links thorakale Schmerzen, Echo, EKG, Labordiagnostik zeigten keinen Hinweis auf kardiale Erkrankung => am ehesten muskulär funktionell bedingt zu werten
Unter Therapie Schwierigkeiten d. art. Bluthochdruck einzustellen. Im Rahmen eines orthostatischen Kollapses gestürzt, Rippenfraktur!	Aufnahme zum Linksherzkatheter u. CT Untersuchungen sowie Abklärung eines Schlafapnoesyndroms
Unterbrechung d. Therapie nach 2. Zyklen wg. interventionspflichtiger 3-G-KHK. OP 07/03 und ausschließende Reha	
Stat. Aufnahme v. 8.10.-22.10.03 wg. Neutropenie Gr. 4, Verwirrtheit, Exsikkose, LSB + absolute Arrhythmie. Möglicherweise Neupogen im Heim nicht bekommen.	
Myokardinfarkt	
antihypertensive TX	
vom 6.10 bis 10.10.03 stationär wg. paroxysmalem Vorhofflimmern medikamentöse Kardroverson mit Tamlorcor - Werte mit ß-Blocker, s. SUE vom 3.11.03	
Abs. Arrhythmie bei Vorhofflimmern	
Nach jeder Neupogengabe retrosternales Druckgefühl,welches nitrosensibel sei u.bei Ruhe auf trete ohne Dyspnoe-Symptomatik. Er habe intermitt. tachykard. Herzrhythmusstörg. ->Beta-Blocker u orale Nitrat-Medikation ->LZ-EKG	

Sichere Hinweise	Unsichere Hinweise
Vincristin abgesetzt wg PNP; Herz-Echo: Hypertensive Herzerkrankung; Tachykardie unklarer Genese	
Befund LZ-EKG: wahrscheinlich nur einmalige Episode von VHF im 1. Zyklus => Beendigung der Antikoagulation	
Bei Pat. liegt paroxysmales VHF vor, Pat. soll bis Ende Feb. 04 antikoaguliert bleiben; Epiphora	
zu Dauer des Zyklus: verschlossene LAD u. RCX mit offenem sequentiell Venenbypass und UMA ad LAD => konservative Therapie mit Betablockade u. ACE-Hemmer => Besserung	
aufgetretenes Vorhofflimmern	
Non Compliance antihypertensive Medikation, dadurch Intervallverlängerung mitbedingt	
klinisch NYMA 2, Echokardiographisch idem zu Befund vor Therapiebeginn => unveränderte Fortsetzung der Therapie	
Pneumonie bds. mit kardiopulm. Dekompensation	
Kardiomyopathie	
Interkurrent aufgetretene TAA bei VHF mit notfallmäßiger Aufnahme	
Kardiale Dekompensation in der Phase	
ab C7 ohne Doxorubizin wegen der kardialen Voranamnese	
Nachdem das Zwischenstaging eine Verschlechterung der bekannten eingeschränkten Herzfunktion zeigte, führten wir nach Rücksprache mit der Studienzentrale die Therapie ohne Anthracycline fort.	
Tox 3.02: bei bisher nicht bekannter Herzinsuffizienz ist eine cardiotoxische Nebenwirkung der Doxorubizin-Therapie am wahrscheinlichsten	
Angina pectoris	
Synkope	
zwischenzeitl. ACB-OP, jetzt kardial o. B.	
während Vorphase hypertensive RR- Werte(Cordisol), medikam. Einstellung	
schwere Begl.erkrank. nach Arzangaben "nein", aber lt. Akte: art. Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterie, rheum. Arth., Mammared., Penicillinallergie	

Sichere Hinweise	Unsichere Hinweise
zu Begleiterkrankungen: 6. Trikuspidalklappeninsuffizienz III° I07.1, 7. Anämie D64.9, chron. obstruktive Lungenerkrankung J44.99	
Myokardinfarkt	
Bulk disease komplett reseziert N+NN Doxorubizin induzierte Kardiomyopathie, klinisch kompensiert	
kardiologische Symptomatik steht im Vordergrund, dann weitere Planung des therap. Vorgehens	
EF 20% !	
Blutbild vom 27.01.04 - Therapieänderung wg. Kardiotoxizität ab C5	
Herzinsuffizienz bei KHK	
VHF	
Herzbeschwerden, Verdacht auf Myokarditis, CRP-Anstieg auf 14mg/dl, infektiöse Ursache möglich.	
koronäre Bypass OP 07.08.02-09.08.02 komplikationslos	
Herzschrittmacher seit 25.05.2004 wg. Sick-Sinus	
Tod am 7.7.02, Herz - Kreislaufversagen	
Hypertonus fraglich therapiebedingt	
Stauung Pneumonie bds. linksführende kardiale Dekompensation; siehe AB primäre Hypertonie (arteriell)	
laut mündl. Arztangabe CRu; keine Untersuchungen zum Remissionsstatus durchgeführt; Pat. lehnt Unters. ab.; Dysp.+progre. Beinödeme bei bek. chron. Herzinsuff. ; begl. Stauungs.	
stationär wg. Bronchopneumonie bds., Vorhofflimmern mit intermitt. Tachyarrhythmie	
akut dekompensierte Herzinsuff. nach Absetzen v. Enalapril+Torasemid; wieder ok mit Medikam.	
zu Folgeerkrkg.:2): dilatative Kardiomyopathie sie beil. AB v. 16.9.03	
rechtsbetonte kardiale Dekompensation -> diuretische Medikation	
seit Jahren Cardiomyopathie, 7/04 Apoplex	
Kardiomyopathie mit eingeschränkter EFL: 40%	
seit 1.6.04 Phenprocoumon-Therapie wg. intermitt. Vorhofflimmern.Keine Anhaltspkte im peripheren Blut für Rezidiv	

Sichere Hinweise	Unsichere Hinweise
zwischenzeitl. Episode erstmaligen Vorhofflimmerns mit erfolgreicher Kardioversion	
Herzinsuffizienz, letzte CT-Untersuchung 11/05 mit CR	
leichter Husten m. weißl. Auswurf; Tachykardie/Bradykardie Syndrom (abs. Arrhythmie)	
Befund Mamma-PE v. 19.05.05 => ductale Hyperplasie, kein Anhalt f. Malignität, Inhomogene Leber 5x2 cm Verdichtung => Verfettung/Lymphominfiltration; Arrhythmien	
kardiale Dekomp., Stauungspneumonie, benigne Prostatahypertrophie	
abs. Arrhythmie (unverändert)- Tachy-/Bradykardie	
Januar 2004: neu diagnostiziertes Vorhofflimmern. Seitdem Marcumartherapie	
Z.n. Arrhythmie bei Vorhofflimmern, Pat. nimmt Marcumar.	
mittelschwere-schwere Kardiomyopathie am ehesten Anthrzyklininduziert, leichte-mittelschwere Mitralinsuffizienz (seit 05/04)	
07/2005: Episode mit kardialen Beschwerden im Sinne von links-thorakalen Schmerzen, Übelkeit und Erbrechen + wässriger Diarrhoe, Herzinfarkt wurde ausgeschlossen.	
Weiterhin kardiolog. Symptomatik im Vordergrund	
EF 38%	
07/04 Mediateilinfarkt re. mit brachiofacialbetonter Hemiparese li.	
Therapiefolgeerkrankung Herzschädigung	
zunehmende Herzgröße nach Anthrazyklintherapie -> kardiologische Untersuchung folgt	
KHK	
Aortenklappenstenose	
Herzinsuffizienz NYHA	
Linksherzdekompensation bei Überwässerung 09/2002; Peronäus Läsion 08/2002, Grad: k.A.	
Herzschrägung	
Tachykardie bei Vorhofflimmern	
Herzinsuffizienz	
kein Doxorubicin wegen kardialer Voranamnese	
Bypass-OP	

Tab. 22: Hinweise auf Herzscheiden in dem Bemerkungsfeld Eingabe unterteilt in A) sichere und B) unsichere, aber wahrscheinliche Herzscheiden

Sichere Hinweise	Unsichere Hinweise
Belastungsdyspnoe	Dyspnoe
Tachykardie	Kreislaufschwäche
14.5. Tachykardie (>200), Linksherzdilatation	Abgeschlagenheit
CTC-Code: 305: Angina pectoris	Thrombose
kein Doxorubizin wg. KHK	Herzstiche nachts
hypertensive Entgleisungen	passageres Herzrasen
Myocardinfarkts: kein Doxorubizin dafür Etoposid	Tox 302 durch Echokardiographie nicht quantifizierbar
Myocardinfarkt	EKG-untersuchung
Tricuspidalklappeninsuffizienz.Keine Einschränkung. der LV-Funktion!!!	Echo-untersuchung
therapiebed. Folgeerkrankungen: des Herzens	
koronare Herzkrankheit	
vor Einschluß OP koronare Dreifäßerkrankung (ACVB-OP) am 26.02.03	
Arrhythmie bei Vorhofflimmern I48	
Art. Hypertonie	
PAVK	
Begleiterkrankg: V.a. KHK I25.9	
zu Zigarettenkonsum: keine Angabe, bei Aufnahme kein Nikotinabusus; zu Vorphasetherapie: 18.09.-24.09.2003 vor ACB-OP,danach Fortführung Prednisolon bis 05.10.03 in wechselnder Dosierung (wurde nicht gezählt wg. kardialer Dekompensation9	
Begleiterkrankg.: 6) art. Hypertonie I10; 7) Z.n. linkshirn. TiA. G45.9; zu Medikamente: 6)MCP ratiopharm. 3x20 Trpf.. zu Hospital: komplett	
Begleiterkrankg.: 6) intermitt. TAA bei VHF I48.19; 7) chron Niereninsuff. N18.9	

11.11 Ergebnisse der Genotypisierung

Tab. 23: Genotypisierungsergebnisse aus der Ricover60-Studie

1	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A	T/T
2	C/A	T/A	G/A	G/A	T/A	C/T
3	C/C	T/T	G/G	G/G	T/T	C/C

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
6	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/T		1	1
22	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		1	1
152	C/C	T/A	G/A	G/G	A/A	T/C		1	1
230	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	C/C		1	1
252	C/C	T/A	G/A	G/A	A/A	T/C		1	1
269	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		1	1
292	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		1	1
361	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		1	1
385	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		1	2
412	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		1	2
416	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		1	2
449	C/C	T/T	G/G	G/A	T/T	C/C		1	2
477	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		1	2
499	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	C/C		1	1
503	C/C	T/T	G/G	A/A	T/T	T/C		1	1
531	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		1	2
570	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/T		1	2
626	A/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		1	2
706	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		1	1
712	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C		1	2

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
714	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		1	2
721	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		1	2
756	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C		1	1
852	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		1	1
871	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/T		1	1
892	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		1	1
971	C/C	T/T	G/G	G/G	T/T	T/C		1	1
1147	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		1	1
1276	C/C	T/A	G/A	G/A	A/A	C/C		1	1
126	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		2	1
159	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		2	1
239	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/C		2	1
244	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		2	1
266	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		2	1
296	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		2	1
329	C/C	T/A	G/A	G/G	A/A	T/C		2	1
333	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		2	1
390	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		2	1
413	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		2	1
453	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/T		2	1
456	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		2	2
543	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/T		2	1
699	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		2	1
729	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		2	1
809	A/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	1

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
820	NA	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		2	1
837	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C		2	1
1235	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		2	1
1242	C/C	T/A	G/A	G/A	A/A	C/C		2	1
1281	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		2	1
211a	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	1
211b	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	1
225a	C/C	T/A	G/A	G/A	A/T	T/C		2	1
225b	C/C	T/A	G/A	G/A	A/T	T/C		2	1
242a	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	1
242b	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	1
268a	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/C		2	1
268b	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/C		2	1
437a	A/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		2	1
437b	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/C		2	1
498a	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		2	1
498b	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		2	1
515a	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	1
515b	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/C		2	1
690a	A/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		2	1
690b	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	1
437b	A/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		2	2
498b	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		2	2
515b	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		2	2
690b	A/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		2	2

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
27	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/T	1	3	1
32	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	C/C	1	3	1
597	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C	1	3	1
750	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C	1	3	1
800	C/C	T/A	G/G	G/A	A/A	C/C	1	3	1
925	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C	1	3	1
986	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C	1	3	1
989	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/C	1	3	1
1040	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C	1	3	1
1055	C/C	T/A	G/A	G/G	A/T	T/C	1	3	1
1065	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C	1	3	1
1178	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C	1	3	1
1194	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C	1	3	1
1231	C/C	A/A	A/A	G/G	A/T	C/C	1	3	1
1263	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C	1	3	1
1311	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C	1	3	1
4	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/T		3	1
5	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/T		3	1
30	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
33	A/C	T/T	G/G	A/A	T/T	T/C		3	1
61	C/C	T/A	G/A	G/G	A/A	C/C		3	1
69	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C		3	1
79	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/T		3	1
91	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
99	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		3	1

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
115	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
122	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/T		3	1
123	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
139	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	C/C		3	1
153	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
167	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	C/C		3	1
171	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		3	1
182	C/C	T/A	G/A	G/G	A/A	T/C		3	1
191	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
195	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
214	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		3	1
216	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/T		3	1
229	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
250	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		3	1
254	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		3	1
255	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/T		3	1
274	C/C	T/A	G/A	G/G	A/A	T/C		3	1
279	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		3	1
285	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		3	1
286	A/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		3	1
288	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	C/C		3	1
299	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
320	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
338	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
359	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		3	1
384	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/T		3	1
388	C/C	T/T	G/G	G/G	T/T	T/C		3	2
391	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
396	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	2
400	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		3	2
402	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
404	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/T		3	2
411	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C		3	1
422	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/T		3	2
423	C/C	T/T	G/G	A/A	T/T	T/C		3	2
424	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		3	2
448	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/T		3	1
462	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	2
491	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		3	2
492	C/C	T/T	G/G	G/A	T/T	C/C		3	1
522	A/C	T/T	G/G	G/A	A/T	T/C		3	2
525	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/T		3	2
545	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
556	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
558	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	2
576	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		3	2
595	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
613	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/T		3	2
616	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	C/C		3	1

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
639	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		3	2
652	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
675	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/T		3	2
684	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		3	2
685	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C		3	1
711	C/C	T/T	G/G	A/A	T/T	T/C		3	1
720	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	2
724	C/C	T/T	G/G	G/A	T/T	C/C		3	1
725	C/C	T/A	G/A	G/A	A/A	T/C		3	1
745	C/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		3	2
753	A/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		3	1
764	A/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/T		3	1
765	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	C/C		3	1
777	C/C	T/A	G/A	A/A	A/A	T/C		3	1
783	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	C/C		3	1
821	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
841	A/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
842	C/C	T/T	G/G	G/G	A/T	T/C		3	1
876	C/C	T/A	G/A	G/A	A/A	T/C		3	1
881	C/C	T/T	G/G	G/A	T/T	C/C		3	1
899	A/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/T		3	1
909	A/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/C		3	1
941	C/C	T/A	G/A	G/A	A/A	C/C		3	1
954	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	C/C		3	1
965	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1

Pat.-ID	MRP1_rs4 5511401	MRP2_rs8 187694	MRP2_rs8 187710	NCF4_rs 1883112	RAC2_rs1 3058338	CYBA_rs4 673	Kontrollen mit normalen NT- proBNP (zusätz- lich genotypisiert)	Akuter Fall=1 Chronischer Fall=2 Kontrolle=3	1= 1. Genotypisierung 2= Nachtypisierung
993	C/C	T/A	NA	A/A	T/T	C/C		3	1
1021	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
1029	C/C	T/A	G/A	G/G	A/T	T/C		3	1
1059	A/C	T/T	G/G	G/A	A/T	C/C		3	1
1094	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/T		3	1
1095	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	C/C		3	1
1099	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	C/C		3	1
1129	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
1207	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		3	1
1236	C/C	T/T	G/G	A/A	A/T	T/C		3	1
1237	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		3	1
1265	C/C	T/T	G/G	G/A	A/A	T/C		3	1
1305	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	C/C		3	1
1308	C/C	T/T	G/G	G/G	A/A	T/C		3	1
1316	C/C	T/T	G/G	A/A	A/A	T/T		3	1

Die ersten 3 Zeilen stellen die jeweils möglichen Genotypen je Polymorphismus dar. 1 ist dabei die homozygote Variante, 2 die heterozygote Variante und 3 der Wildtyp. Fett hervorgehoben wurden die Genotypen, die in der NHLB-Studie mit dem verstärkten Auftreten von Herzschäden assoziiert waren.

11.12 Detaillierte Darstellung der Zuordnung Fall /Kontrolle

Tab. 24: Matching der Fälle und Kontrollen

Pat.-ID	Zeitpunkt aller Herzprobleme	Zeitpunkt der gesicherten Herzprobleme	HERZVOR	HERZ_AK	HERZ_CHR	HERZ_UNK	erstes Auftreten von sicheren Herzprobleme	erstes Auftreten von unsicheren Herzprobleme bei 33	PATMATCH	NTproBNP	Auswahl	Auswahl BT
6	8	8	0	1	0		6		1	1	1	1
22	8	8	0	1	0		3		1	2	1	1
152	8	8	0	1	0		2		1	2	1	1
230	8	8	0	1	0		4		1	2	1	1
252	8	8	0	1	0		2		1	2	1	1
269	8	8	0	1	0		3		1	1	1	1
292	8	8	0	1	0		2		1	1	1	1
361	8	8	0	1	0		3		1	1	1	1
385	8	8	0	1	0		3		1	2	1	1
412	8	8	0	1	0		4		1	2		1
416	8	8	0	1	0		1		1	2	1	1
449	8	8	0	1	0		3		1	2	1	1
477	8	8	0	1	0		3		1	2	1	1
499	8	8	0	1	0		28		1	1	1	1
503	8	8	0	1	0		2		1	1	1	1
531	8	8	0	1	0		4		1	2	1	1
570	8	8	0	1	0		5		1	2	1	1
626	8	8	0	1	0		1		1	2	1	1
706	8	8	0	1	0		6		1	1	1	1
712	8	8	0	1	0		3		1	2	1	1
714	8	8	0	1	0		6		1	2	1	1
721	8	8	0	1	0		3		1	2	1	1
756	8	8	0	1	0		1		1	1	1	1
852	8	8	0	1	0		7		1	1	1	1

Pat.-ID	Zeitpunkt aller Herzprobleme	Zeitpunkt der gesicherten Herzprobleme	HERZVOR	HERZ_AK	HERZ_CHR	HERZ_UNK	erstes Auftreten von sicheren Herzprobleme	erstes Auftreten von unsicheren Herzprobleme bei 33	PATMATCH	NTproBNP	Auswahl	Auswahl BT
871	8	8	0	1	0		25		1	1	1	1
892	8	8	0	1	0		2		1	1	1	1
942	8	8	0	1	0		5		1	1	1	1
971	8	8	0	1	0		3		1	1	1	1
1147	8	8	0	1	0		1		1	1	1	1
1276	8	8	0	1	0		3		1	1	1	1
126	5	5	0	1	1	.	4		2	3	1	1
159	5	1	0	0	1	.	27	.	2	3	1	1
211	1	1	0	0	1		15		2	1	1	1
225	1	1	0	0	1		13		2	1	1	1
238	1	1	0	0	1		29	2	2	2	1	1
239	5	5	0	1	1		6		2	1	1	1
242	5	1	0	0	1		15		2	2	1	1
244	1	1	0	0	1		13		2	3	1	1
266	1	1	0	0	1		7		2	2	1	1
268	1	1	0	0	1		13		2	1	1	1
296	5	1	0	0	1		13		2	1	1	1
329	5	1	0	0	1		27		2	3	1	1
333	5	5	0	1	1		4		2	1	1	1
390	5	1	0	0	1		13		2	1	1	1
413	1	1	0	0	1		15		2	1	1	1
437	1	1	0	0	1		14		2	1	1	1
453	5	5	0	1	1		5		2	1	1	1
456	1	1	0	0	1		13		2	3	1	1
498	1	1	0	0	1		13		2	1	1	1
515	1	1	0	0	1		13		2	1	1	1
543	1	1	0	0	1		17		2	1	1	1
676	5	5	0	1	1		1		2	2	1	1

Pat.-ID	Zeitpunkt aller Herzprobleme	Zeitpunkt der gesicherten Herzprobleme	HERZVOR	HERZ_AK	HERZ_CHR	HERZ_UNK	erstes Auftreten von sicheren Herzprobleme	erstes Auftreten von unsicheren Herzprobleme bei 33	PATMATCH	NTproBNP	Auswahl	Auswahl BT
690	5	5	0	1	1		4		2	1	1	1
699	5	5	0	1	1		9		2	1	1	1
729	1	1	0	0	1		13		2	1	1	1
733	5	1	0	0	1		13		2	2		1
809	5	1	0	0	1		13		2	1	1	1
820	5	5	0	1	1	.	6	.	2	1	1	1
837	5	1	0	0	1		13		2	1	1	1
1235	5	1	0	0	1		14		2	1	1	1
1242	5	1	0	0	1		13		2	1	1	1
1281	1	1	0	0	1		13		2	1		1
4	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
5	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
30	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
33	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
61	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
69	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
79	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
91	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
99	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
115	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
122	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
123	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
139	6	6	0	0	0	0	34		3	2		1
153	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
167	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
171	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
182	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
191	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1

Pat.-ID	Zeitpunkt aller Herzprobleme	Zeitpunkt der gesicherten Herzprobleme	HERZVOR	HERZ_AK	HERZ_CHR	HERZ_UNK	erstes Auftreten von sicheren Herzprobleme	erstes Auftreten von unsicheren Herzprobleme bei 33	PATMATCH	NTproBNP	Auswahl	Auswahl BT
195	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
214	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
216	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
229	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
249	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
250	6	6	0	0	0	0	34		3	2		1
254	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
255	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
274	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
279	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
285	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
286	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
288	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
299	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
320	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
338	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
359	6	6	0	0	0	0	34		3	2		1
384	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
388	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
391	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
396	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
400	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
402	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
404	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
411	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
422	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
423	6	6	0	0	0	0	34		3	2		1
424	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1

Pat.-ID	Zeitpunkt aller Herzprobleme	Zeitpunkt der gesicherten Herzprobleme	HERZVOR	HERZ_AK	HERZ_CHR	HERZ_UNK	erstes Auftreten von sicheren Herzprobleme	erstes Auftreten von unsicheren Herzprobleme bei 33	PATMATCH	NTproBNP	Auswahl	Auswahl BT
448	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
462	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
476	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1s
491	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
492	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
522	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
525	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
545	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
556	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
558	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
576	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
595	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
613	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
616	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
639	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
652	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
675	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
684	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
685	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
704	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
711	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
720	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
724	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
725	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
745	6	6	0	0	0	0	34		3	2	1	1
753	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
764	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
765	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1

Pat.-ID	Zeitpunkt aller Herzprobleme	Zeitpunkt der gesicherten Herzprobleme	HERZVOR	HERZ_AK	HERZ_CHR	HERZ_UNK	erstes Auftreten von sicheren Herzprobleme	erstes Auftreten von unsicheren Herzprobleme bei 33	PATMATCH	NTproBNP	Auswahl	Auswahl BT
777	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
783	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
821	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
841	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
842	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
876	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
881	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
899	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
909	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
941	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
954	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
965	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
993	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1021	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1029	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1059	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1094	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1095	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1099	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1129	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1207	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1236	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1237	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1265	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1305	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1308	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1
1316	6	6	0	0	0	0	34		3	1	1	1

Legende:

Gelb markiert	DNA sollte eigentlich 2003 vorhanden sein, fehlte aber in der Realität
Zeitpunkt aller Herzprobleme	1=Herzprobleme erstmals auf den Folgebögen 2= Herzprobleme in Prätherapie und! Chemo und! Folgebögen vorhanden 3= Herzprobleme nur in Prätherapie und auf Chemobögen vorhanden 4= Herzprobleme nur in Prätherapie und auf Folgebögen vorhanden 5= Herzprobleme nur auf Chemobögen und auf Folgebögen 6= Herzprobleme weder in Prätherapie noch während der Chemotherapie noch auf Folgebögen vorhanden 7= Herzprobleme nur in Prätherapie (inklusive Pat. mit Herzproblemen auf SUE/Todesbögen die anhand des Datums in diese Studienphase einsortiert wurden) 8= Herzprobleme nur während der Chemotherapie 9= nur in Extraspalten (inklusive Pat. mit Herzproblemen auf SUE/Todesbögen die anhand des Datums in diese Studienphase einsortiert wurden)
Zeitpunkt der gesicherten Herzprobleme	1=gesicherte Herzprobleme erstmals auf den Folgebögen 2= gesicherte Herzprobleme in Prätherapie und! Chemo und! Folgebögen vorhanden 3= gesicherte Herzprobleme nur in Prätherapie und auf Chemobögen vorhanden 4= gesicherte Herzprobleme nur in Prätherapie und auf Folgebögen vorhanden 5= gesicherte Herzprobleme nur auf Chemobögen und auf Folgebögen 6= gesicherte Herzprobleme weder in Prätherapie noch während der Chemotherapie noch auf Folgebögen vorhanden 7= gesicherte Herzprobleme nur in Prätherapie 8= gesicherte Herzprobleme nur während der Chemotherapie
HERZVOR	1= Herzprobleme in Prätherapie 0= keine Herzprobleme in Prätherapie
HERZ_AK	1= Herzprobleme in Chemotherapie 0= keine Herzprobleme in Chemotherapie
HERZ_CHR	1= Herzprobleme auf Folgebögen 0= keine Herzprobleme auf Folgebögen
HERZ_UNK	1= keine sicheren Herzprobleme nachweisbar, aber dennoch unsichere Hinweise vorhanden 0= weder sichere noch unsichere Herzprobleme nachweisbar

PATMATCH	1=akut 2=chronisch 3=Kontrolle
erstes Auftreten von sicheren Herzprobleme	0= Prätherapie 1= Chemobogen Nr.1 2= Chemobogen Nr.2 3= Chemobogen Nr.3 4= Chemobogen Nr.4 5= Chemobogen Nr.5 6= Chemobogen Nr.6 7= Chemobogen Nr.7 8= Chemobogen Nr.8 9= Bestrahlungsbogen Nr.1 10= Bestrahlungsbogen Nr.2 11= Restagingbogen Nr.1 12= Restagingbogen Nr.2 13= Folgebogen Nr.1 14= Folgebogen Nr.2 15= Folgebogen Nr.3 16= Folgebogen Nr.4 17= Folgebogen Nr.5 18= Folgebogen Nr.6 19= Folgebogen Nr.7 20= Folgebogen Nr.8 21= Folgebogen Nr.9 22= Folgebogen Nr.10 23= Folgebogen Nr.11 24= Folgebogen Nr.12 25= SUE-Bogen Nr.1 26= SUE-Bogen Nr.2 27= Todesbogen 28= Bemerkungsfeld Arzt während der Chemotherapie 29= Bemerkungsfeld Arzt auf den Folgebögen 30= Bemerkungsfeld Eingabe in der Prätherapie 33=unklare Patienten 34=niemals Herzprobleme

erstes Auftreten von unsicheren Herzprobleme bei 33	0= Prätherapie 1= Chemobogen Nr.1 2= Chemobogen Nr.2 3= Chemobogen Nr.3 4= Chemobogen Nr.4 5= Chemobogen Nr.5 6= Chemobogen Nr.6 7= Chemobogen Nr.7 8= Chemobogen Nr.8 9= Bestrahlungsbogen Nr.1 10= Bestrahlungsbogen Nr.2 11= Restagingbogen Nr.1 12= Restagingbogen Nr.2 13= Folgebogen Nr.1 14= Folgebogen Nr.2 15= Folgebogen Nr.3 16= Folgebogen Nr.4 17= Folgebogen Nr.5 18= Folgebogen Nr.6 19= Folgebogen Nr.7 20= Folgebogen Nr.8 21= Folgebogen Nr.9 22= Folgebogen Nr.10 23= Folgebogen Nr.11 24= Folgebogen Nr.12 25= SUE-Bogen Nr.1 26= SUE-Bogen Nr.2 27= Todesbogen 31=Todesbogen Bemerkungsfeld Arzt unklar 32=Prätherapie Bemerkungsfeld Arzt unklar 33=Chemotherapie Bemerkungsfeld Arzt unklar 34=Bemerkungsfeld Arzt (chemo)+Eingabe (FB) unklar
NT-proBNPO	1: Ergebnis da 2: Ergebnis fehlt da Probeneingang 2003 3: Ergebnisse verloren da Pat. tot
Auswahl	1 sind alle B-Zell
AuswahlBT	1 sind alle B und T-Zellpatienten.

11.13 Diverse HPLC-Chromatogramme

Abb. 63: Vermessung von Fließmittel

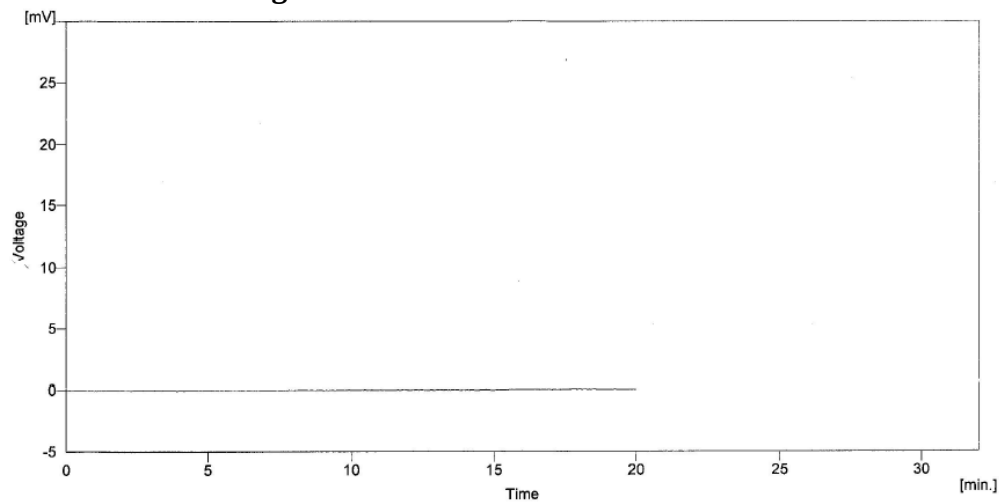


Abb. 64: Vermessung von unbehandeltem Mäuseherz

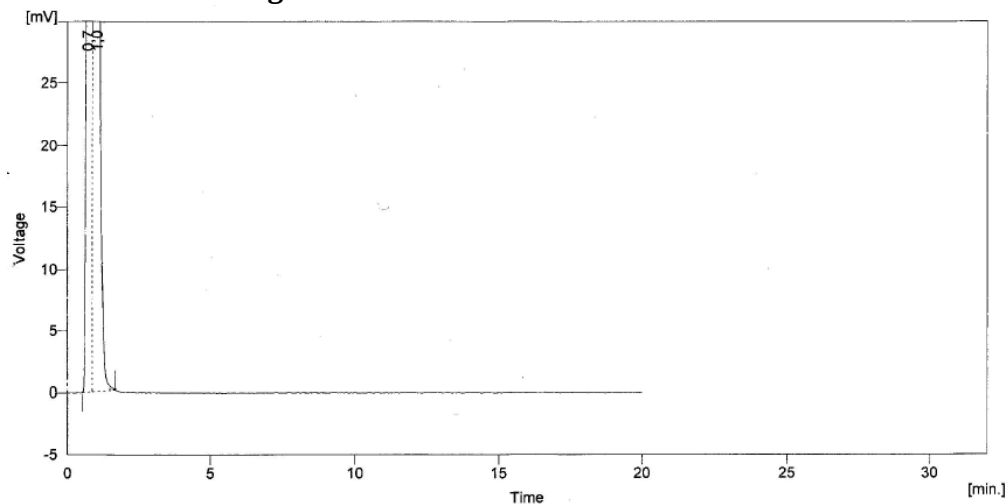
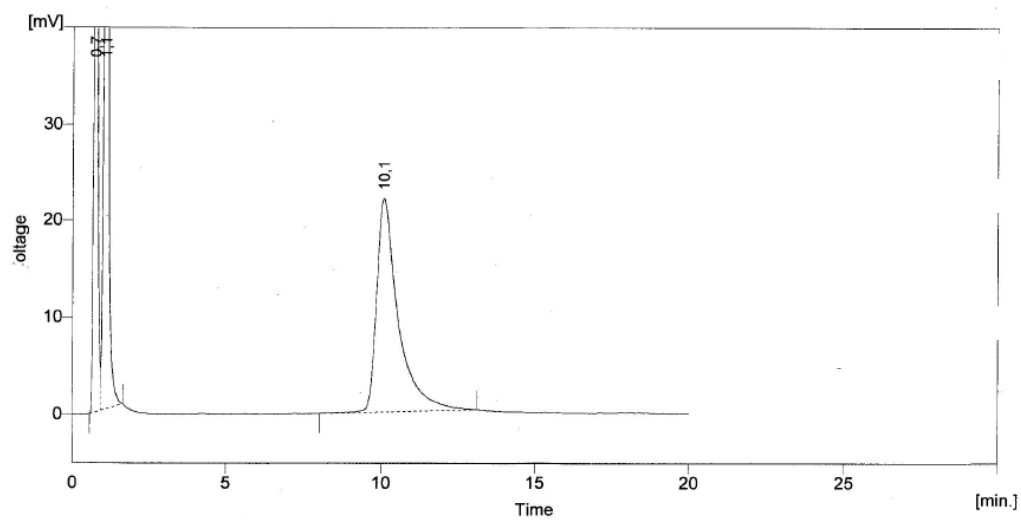


Abb. 65: Vermessung von unbehandeltem Mäuseherz versetzt mit internem Standard DNR



11.14 Übersichtsdarstellung zum oxidativen Stress in den HTETOP-Zellen

Tab. 25: absolute Mengen an Dox, Doxol und Doxon in den untersuchten Geweben (Blut, Herz und Leber) [ng/g Gewebe] nach der Injektion von 12 mg Dox je kg KG

		C57BL/6			Balb/c			Gesamt Mengen in Blut, Herz und Leber	
		Blut	Herz	Leber	Blut	Herz	Leber	C57BL/6	Balb/c
Doxol	30 min	207.18	473.45	943.54	198.88	449.67	263.12	1624.18	911.67
	1 h	169.20	261.99	1179.76	169.04	205.55	530.97	1610.95	905.57
	6 h	140.06	344.23	1205.06	117.39	347.17	243.00	1689.35	707.56
	24 h	148.33	340.98	1464.50	112.74	405.82	175.39	1953.82	693.94
Dox	30 min	666.55	2983.84	17138.35	633.81	2105.69	6679.43	20788.73	9418.93
	1 h	370.29	3216.57	10960.83	373.34	2375.18	8558.72	14547.69	11307.24
	6 h	127.37	1991.62	5677.56	127.24	2016.78	2587.54	7796.56	4731.56
	24 h	72.35	1011.47	6050.44	51.61	740.92	1589.66	7134.25	2382.20
Doxon	30 min	114.56	307.63	2032.48	53.23	n.d.	519.03	2454.66	572.26
	1 h	186.13	199.43	1429.22	58.22	144.89	1021.69	1814.79	1224.80
	6 h	27.10	75.86	320.33	39.29	75.36	276.98	423.29	391.62
	24 h	n.d.	n.d.	434.55	n.d.	n.d.	81.15	434.55	81.15

n.d.: nicht nachweisbar

Tab. 26: prozentuale Verteilung von Doxorubizin und seiner Metabolite in den untersuchten Organen (Blut+Herz+Leber=Gesamt=100%) nach der Injektion von 12 mg Dox je kg KG

		C57BL/6 [% von Gesamt]			Balb/c [% von Gesamt]			Gesamt Mengen in den untersuchten Geweben (Blut, Herz und Leber) [ng/g Gewebe]	
		Blut	Herz	Leber	Blut	Herz	Leber	C57BL/6	Balb/c
Doxol	30 min	12.76	29.15	58.09	21.82	49.32	28.86	1624.18	911.67
	1 h	10.50	16.26	73.23	18.67	22.70	58.63	1610.95	905.57
	6 h	8.29	20.38	71.33	16.59	49.07	34.34	1689.35	707.56
	24 h	7.59	17.45	74.96	16.25	58.48	25.27	1953.82	693.94
Dox	30 min	3.21	14.35	82.44	6.73	22.36	70.91	20788.73	9418.93
	1 h	2.55	22.11	75.34	3.30	21.01	75.69	14547.69	11307.24
	6 h	1.63	25.54	72.82	2.69	42.62	54.69	7796.56	4731.56
	24 h	1.01	14.18	84.81	2.17	31.10	66.73	7134.25	2382.20
Doxon	30 min	4.67	12.53	82.80	9.30	n.d.	90.70	2454.66	572.26
	1 h	10.26	10.99	78.75	4.75	11.83	83.42	1814.79	1224.80
	6 h	6.40	17.92	75.68	10.03	19.24	70.73	423.29	391.62
	24 h	n.d.	n.d.	100.00	n.d.	n.d.	100.00	434.55	81.15

n.d.: nicht nachweisbar

Substanzspezifische Addition der im Blut, der Leber und dem Herzen vorgefundenen Mengen an Dox/Doxol/Doxon. Diese Menge wurde als 100% definiert[ng/g Gewebe]. Anschließend wurde von jedem Gewebe der prozentuale Anteil der Substanz an der Gesamtkonzentration in den drei untersuchten Organen ermittelt [Darstellung in % von Gesamt].

Tab. 27: prozentuale Verteilung von Dox und Doxol innerhalb der drei untersuchten Organe (Blut, Herz, Leber=Gesamt=100%) nach der Injektion von 3 mg Dox je kg KG

		C57BL/6 [% von Gesamt]			Balb/c [% von Gesamt]			Gesamt Mengen in den untersuchten Gewebe (Blut, Herz und Leber) [ng/g Gewebe]	
		Blut	Herz	Leber	Blut	Herz	Leber	C57BL/6	Balb/c
Doxol	1. Inj.	n.d.	n.d.	100.00	n.d.	n.d.	100.00	269.34	135.61
	2. Inj.	n.d.	n.d.	100.00	n.d.	n.d.	100.00	215.30	257.91
Dox	1. Inj.	1.53	15.54	82.92	2.12	18.50	79.38	5'829.78	3'407.40
	2. Inj.	1.41	20.51	78.07	2.30	21.04	76.66	5'170.88	4'202.08

Substanzspezifische Addition der im Blut, der Leber und dem Herzen vorgefundenen Mengen an Dox/Doxol/Doxon. Diese Menge wurde als 100% definiert[ng/g Gewebe]. Anschließend wurde von jedem Gewebe der prozentuale Anteil der Substanz an der Gesamtkonzentration in den drei untersuchten Organen ermittelt [Darstellung in % von Gesamt].

12 Literatur

1. Kruger, A. and L. Wojnowski, *Kardiotoxizität von Anthrazyklinen – ein ungelöstes Problem*. Deutsches Ärzteblatt, 2006. **103**(37): p. 2393 -2399.
2. Minotti, G., et al., *Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity*. 2004. p. 185-229.
3. Cheng, K.C., et al., *8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions*. J Biol Chem, 1992. **267**(1): p. 166-72.
4. Cummings, J., et al., *The molecular pharmacology of doxorubicin in vivo*. Eur J Cancer, 1991. **27**(5): p. 532-5.
5. Kappus, H., *Oxidative stress in chemical toxicity*. Arch Toxicol, 1987. **60**(1-3): p. 144-9.
6. Gutierrez, P.L., *The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-Diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review*. Free Radic Biol Med, 2000. **29**(3-4): p. 263-75.
7. Tokarska-Schlattner, M., et al., *New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics*. J Mol Cell Cardiol, 2006. **41**(3): p. 389-405.
8. Gosalvez, M., et al., *Effects of anticancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumor cells*. Eur J Cancer, 1974. **10**(9): p. 567-74.
9. Von Hoff, D.D., et al., *Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure*. Ann Intern Med, 1979. **91**(5): p. 710-7.
10. Wouters, K.A., et al., *Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies*. British Journal of Haematology, 2005. **131**(5): p. 561-578.
11. Steinherz, L.J., et al., *Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy*. Jama, 1991. **266**(12): p. 1672-7.
12. Speyer, J.L., et al., *ICRF-187 permits longer treatment with doxorubicin in women with breast cancer*. J Clin Oncol, 1992. **10**(1): p. 117-27.
13. Tjeerdsma, G., et al., *Early detection of anthracycline induced cardiotoxicity in asymptomatic patients with normal left ventricular systolic function: autonomic versus echocardiographic variables*. Heart, 1999. **81**(4): p. 419-23.
14. Swain, S.M., F.S. Whaley, and M.S. Ewer, *Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials*. Cancer, 2003. **97**(11): p. 2869-79.
15. Aldrich, S.
16. Olson, R.D. and P.S. Mushlin, *Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses*. Faseb J, 1990. **4**(13): p. 3076-86.
17. Xu, C., J. Lebkowski, and J.D. Gold, *Growth and differentiation of human embryonic stem cells for cardiac cell replacement therapy*. Curr Stem Cell Res Ther, 2006. **1**(2): p. 173-87.
18. Anmann, T., et al., *Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and in HL-1 cardiac cells. Importance of cell structure/organization for respiration regulation*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1757**(12): p. 1597-606.
19. Gewirtz, D.A., *A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin*. Biochem Pharmacol, 1999. **57**(7): p. 727-41.
20. Wojnowski, L., et al., *NAD(P)H Oxidase and Multidrug Resistance Protein Genetic Polymorphisms Are Associated With Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity*. Circulation, 2005. **112**(24): p. 3754-3762.

21. Aplenc, R., et al., *Polymorphisms in candidate genes in patients with congestive heart failure (CHF) after childhood cancer: A Report from the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS)*. Journal of Clinical Oncology, 2006 **24**(18S): p. 9004.
22. Jahanzeb, M., *Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2008. **8**(4): p. 324-33.
23. Mendelsohn, J. and J. Baselga, *Epidermal growth factor receptor targeting in cancer*. Semin Oncol, 2006. **33**(4): p. 369-85.
24. Berger, D.P., R. Engelhardt, and R. Mertelsmann, *Das Rote Buch: Hämatologie und Internistische Onkologie*. ecomed Medizin, 2006.
25. Patil, R.R., S.A. Guhagarkar, and P.V. Devarajan, *Engineered nanocarriers of doxorubicin: a current update*. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2008. **25**(1): p. 1-61.
26. Zucchi, R. and R. Danesi, *Cardiac toxicity of antineoplastic anthracyclines*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003. **3**(2): p. 151-71.
27. Hortobagyi, G.N., *Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview*. Drugs, 1997. **54 Suppl 4**: p. 1-7.
28. Gabizon, A., H. Shmeeda, and Y. Barenholz, *Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**(5): p. 419-36.
29. Drummond, D.C., et al., *Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors*. Pharmacol Rev, 1999. **51**(4): p. 691-743.
30. Ryberg, M., et al., *Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 1998. **16**(11): p. 3502-8.
31. Tokudome, T., et al., *Prevention of doxorubicin (adriamycin)-induced cardiomyopathy by simultaneous administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor assessed by acoustic densitometry*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **36**(3): p. 361-8.
32. Sacco, G., et al., *Cardioprotective effects of zofenopril, a new angiotensin-converting enzyme inhibitor, on doxorubicin-induced cardiotoxicity in the rat*. Eur J Pharmacol, 2001. **414**(1): p. 71-8.
33. Santos, D.L., et al., *Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy*. Toxicol Appl Pharmacol, 2002. **185**(3): p. 218-27.
34. Okumura, K., et al., *Beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in adriamycin-induced cardiomyopathy in hamsters*. Jpn J Pharmacol, 2002. **88**(2): p. 183-8.
35. Boucek, R.J., Jr., et al., *Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor on delayed-onset doxorubicin-induced cardiotoxicity*. Cardiovasc Toxicol, 2003. **3**(4): p. 319-29.
36. Vaynblat, M., et al., *Simultaneous angiotensin converting enzyme inhibition moderates ventricular dysfunction caused by doxorubicin*. Eur J Heart Fail, 2002. **4**(5): p. 583-6.
37. Matsui, H., et al., *Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats*. Life Sci, 1999. **65**(12): p. 1265-74.
38. Thomas, L., et al., *Cardiovascular and survival effects of sympatho-inhibitors in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats*. Fundam Clin Pharmacol, 2004. **18**(6): p. 649-55.
39. Oliveira, P.J., et al., *Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity*. Toxicol Appl Pharmacol, 2004. **200**(2): p. 159-68.
40. Fujita, N., et al., *Chronic effects of metoprolol on myocardial beta-adrenergic receptors in doxorubicin-induced cardiac damage in rats*. J Cardiovasc Pharmacol, 1991. **17**(4): p. 656-61.
41. Singal, P., et al., *Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention*. FA-SEB J., 1997. **11**(12): p. 931-936.

42. Singal, P., et al., *Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2000. **207**(1): p. 77-86.
43. van Dalen, E.C., et al., *Different anthracycline derivatives for reducing cardiotoxicity in cancer patients*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(4): p. CD005006.
44. van Dalen, E.C., et al., *Different dosage schedules for reducing cardiotoxicity in cancer patients receiving anthracycline chemotherapy*. Cochrane Database Syst Rev, 2006(4): p. CD005008.
45. van Dalen, E.C., et al., *Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(2): p. CD003917.
46. Hasinoff, B.B., et al., *Chemical, biological and clinical aspects of dexrazoxane and other bisdioxopiperazines*. Curr Med Chem, 1998. **5**(1): p. 1-28.
47. Kaiserova, H., et al., *Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin*. Br J Pharmacol, 2006. **149**(7): p. 920-30.
48. Liu, L.F., *DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs*. Annu Rev Biochem, 1989. **58**: p. 351-75.
49. Tanabe, K., et al., *Inhibition of topoisomerase II by antitumor agents bis(2,6-dioxopiperazine) derivatives*. Cancer Res, 1991. **51**(18): p. 4903-8.
50. Hasinoff, B.B., et al., *A QSAR study comparing the cytotoxicity and DNA topoisomerase II inhibitory effects of bisdioxopiperazine analogs of ICRF-187 (dexrazoxane)*. Biochem Pharmacol, 1995. **50**(7): p. 953-8.
51. Zhang, J., et al., *Doxorubicin-induced apoptosis in spontaneously hypertensive rats: differential effects in heart, kidney and intestine, and inhibition by ICRF-187*. J Mol Cell Cardiol, 1996. **28**(9): p. 1931-43.
52. Sehested, M., et al., *Antagonistic effect of the cardioprotector (+)-1,2-bis(3,5-dioxopiperazinyl-1-yl)propane (ICRF-187) on DNA breaks and cytotoxicity induced by the topoisomerase II directed drugs daunorubicin and etoposide (VP-16)*. Biochem Pharmacol, 1993. **46**(3): p. 389-93.
53. Jensen, L.H., et al., *Characterisation of cytotoxicity and DNA damage induced by the topoisomerase II-directed bisdioxopiperazine anti-cancer agent ICRF-187 (dexrazoxane) in yeast and mammalian cells*. BMC Pharmacol, 2004. **4**(1): p. 31.
54. Swain, S.M., et al., *Cardioprotection with dexrazoxane for doxorubicin-containing therapy in advanced breast cancer*. J Clin Oncol, 1997. **15**(4): p. 1318-32.
55. Swain, S.M., et al., *Delayed administration of dexrazoxane provides cardioprotection for patients with advanced breast cancer treated with doxorubicin-containing therapy*. J Clin Oncol, 1997. **15**(4): p. 1333-40.
56. Jelic, S., et al., *Cardioprotection with ICRF-187 (Cardioxane) in patients with advanced breast cancer having cardiac risk factors for doxorubicin cardiotoxicity, treated with the FDC regimen*. Support Care Cancer, 1995. **3**(3): p. 176-82.
57. Cvetkovic, R.S. and L.J. Scott, *Dexrazoxane : a review of its use for cardioprotection during anthracycline chemotherapy*. Drugs, 2005. **65**(7): p. 1005-24.
58. Marty, M., et al., *Multicenter randomized phase III study of the cardioprotective effect of dexrazoxane (Cardioxane) in advanced/metastatic breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy*. Ann Oncol, 2006. **17**(4): p. 614-22.
59. Venturini, M., et al., *Multicenter randomized controlled clinical trial to evaluate cardioprotection of dexrazoxane versus no cardioprotection in women receiving epirubicin chemotherapy for advanced breast cancer*. J Clin Oncol, 1996. **14**(12): p. 3112-20.
60. van Dalen, E.C., et al., *Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(1): p. CD003917.
61. Lopez, M., et al., *Randomized prospective clinical trial of high-dose epirubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer and soft tissue sarcomas*. J Clin Oncol, 1998. **16**(1): p. 86-92.

62. Salzer, W.L., et al., *Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: a report from the children's oncology group*. Leukemia. **24**(2): p. 355-70.
63. Tebbi, C.K., et al., *Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease*. J Clin Oncol, 2007. **25**(5): p. 493-500.
64. Lipshultz, S.E., S.R. Lipsitz, and E.J. Orav, *Dexrazoxane-Associated Risk for Secondary Malignancies in Pediatric Hodgkin's Disease: A Claim Without Compelling Evidence*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(21): p. 3179.
65. Lipshultz, S.E., et al., *Assessment of dexrazoxane as a cardioprotectant in doxorubicin-treated children with high-risk acute lymphoblastic leukaemia: long-term follow-up of a prospective, randomised, multicentre trial*. The Lancet Oncology. **11**(10): p. 950-961.
66. Seifert, S., *Bestimmung von Unterschieden in der Toxizität von Doxorubicin bei zwei Mausstämmen*. Dipl. 111 Institut für Humangenetik Göttingen 2004.
67. Carpenter, A.J. and A.C. Porter, *Construction, characterization, and complementation of a conditional-lethal DNA topoisomerase IIalpha mutant human cell line*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5700-11.
68. OWENS, C.W. and R.V. BELCHER, *A COLORIMETRIC MICRO-METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUTATHIONE*. Biochem. J., 1965. **94**: p. 705-711.
69. Tietze, F., *Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues*. Analytical Biochemistry, 1969. **27**(3): p. 502-522.
70. Vandeputte, C., et al., *A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol*. Cell Biology and Toxicology, 1994. **10**(5): p. 415-421.
71. Hempel, S.L., et al., *Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(1-2): p. 146-159.
72. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(5-6): p. 612-616.
73. Halliwell, B. and M. Whiteman, *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* Br J Pharmacol, 2004. **142**(2): p. 231-255.
74. Sarvazyan, N., *Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2079-85.
75. LeBel, C.P., H. Ischiropoulos, and S.C. Bondy, *Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress*. 1992. p. 227-231.
76. Cathcart, R., E. Schwiers, and B.N. Ames, *Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay*. Anal Biochem, 1983. **134**(1): p. 111-6.
77. Zhao, H., et al., *Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(16): p. 5727-5732.
78. Slater, T.F., B. Sawyer, and U. Straeuli, *Biochem Biophys. Acta* 1963. **77**: p. 383.
79. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.

80. Gautier, L., et al., *affy--analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level*. Bioinformatics, 2004. **20**(3): p. 307-15.
81. Irizarry, R.A., et al., *Exploration, normalization, and summaries of high density oligo-nucleotide array probe level data*. Biostatistics, 2003. **4**(2): p. 249-64.
82. Tusher, V.G., R. Tibshirani, and G. Chu, *Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(9): p. 5116-21.
83. Dennis, G., Jr., et al., *DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery*. Genome Biol, 2003. **4**(5): p. P3.
84. Andersen, A., D.J. Warren, and L. Slørdal, *Quantition of cell-associated doxorubicin by high-performance liquid chromatography after enzymatic desequestration*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1994. **34**(3): p. 197-202.
85. Shah, V.P., et al., *Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies: Sponsored by the American Association of Pharmaceutical Chemists, U.S. Food and Drug Administration, Fédération Internationale Pharmaceutique, Health Protection Branch (Canada) and Association of Official Analytical Chemists*. International Journal of Pharmaceutics, 1992. **82**(1-2): p. 1-7.
86. Shah, V., et al., *Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress*. Pharmaceutical Research, 2000. **17**(12): p. 1551-1557.
87. Collinson, P.O., et al., *Analytical performance of the N terminal pro B type natriuretic peptide (NT-proBNP) assay on the Elecsys 1010 and 2010 analysers*. Eur J Heart Fail, 2004. **6**(3): p. 365-8.
88. Hunt, P.J., et al., *Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment*. Clin Endocrinol (Oxf), 1997. **47**(3): p. 287-96.
89. Rademaker, M.T. and A.M. Richards, *Cardiac natriuretic peptides for cardiac health*. Clin Sci (Lond), 2005. **108**(1): p. 23-36.
90. Bayes-Genis, A., et al., *Serial NT-proBNP monitoring and outcomes in outpatients with decompensation of heart failure*. Int J Cardiol, 2006.
91. Hess, G., et al., *Reference interval determination for N-terminal-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP): a study in blood donors*. Clin Chim Acta, 2005. **360**(1-2): p. 187-93.
92. Joung, B., et al., *Can pro-brain natriuretic peptide be used as a noninvasive predictor of elevated left ventricular diastolic pressures in patients with normal systolic function?* Am Heart J, 2005. **150**(6): p. 1213-9.
93. Alehagen, U. and M. Janzon, *A clinician's experience of using the Cardiac Reader NT-proBNP point-of-care assay in a clinical setting*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(3): p. 260-6.
94. Cowie, M.R. and G.F. Mendez, *BNP and congestive heart failure*. Prog Cardiovasc Dis, 2002. **44**(4): p. 293-321.
95. Koc, M., et al., *Cutoff values of NT-proBNP for the prediction of low functional capacity, decreased ejection fraction and cardiovascular events in patients with heart failure*. Cardiol J, 2009. **16**(1): p. 43-9.
96. Pfreundschuh, M., et al., *Six versus eight cycles of bi-weekly CHOP-14 with or without rituximab in elderly patients with aggressive CD20+ B-cell lymphomas: a randomised controlled trial (RICOVER-60)*. Lancet Oncol, 2008. **9**(2): p. 105-16.
97. Glanzmann, C., et al., *Cardiac lesions after mediastinal irradiation for Hodgkin's disease*. Radiother Oncol, 1994. **30**(1): p. 43-54.
98. Gagliardi, G., et al., *Radiation Dose-Volume Effects in the Heart*. International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics. **76**(3, Supplement 1): p. S77-S85.

99. Demirci, S., et al., *Radiation-Induced Cardiac Toxicity After Therapy for Breast Cancer: Interaction Between Treatment Era and Follow-Up Duration*. International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, 2009. **73**(4): p. 980-987.
100. Klotz, L., et al., *Modulation and determination of cellular glutathione concentrations*. Free Radicals in Ophthalmic Disorders, 2008: p. 45-54.
101. Williamson, J.M., B. Boettcher, and A. Meister, *Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(20): p. 6246-9.
102. Formelli, F., R. Carsana, and C. Pollini, *Comparative pharmacokinetics and metabolism of doxorubicin and 4-demethoxy-4'-O-methyldoxorubicin in tumor-bearing mice*. Cancer Chemother Pharmacol, 1986. **16**(1): p. 15-21.
103. Cummings, J., S. Merry, and N. Willmott, *Disposition kinetics of adriamycin, adriamycinol and their 7-deoxyglycosides in AKR mice bearing a sub-cutaneously growing rhabdomyosarcoma (ROS)*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1986. **22**(4): p. 451-60.
104. Peer, D. and R. Margalit, *Tumor-targeted hyaluronan nanoliposomes increase the antitumor activity of liposomal Doxorubicin in syngeneic and human xenograft mouse tumor models*. Neoplasia, 2004. **6**(4): p. 343-53.
105. Bolanowska, W. and T. Gessner, *Body residue and metabolism of adriamycin and daunorubicin in control and phenobarbital-pretreated mice*. Xenobiotica, 1982. **12**(2): p. 125-36.
106. Urva, S.R., et al., *Sensitive high performance liquid chromatographic assay for assessment of doxorubicin pharmacokinetics in mouse plasma and tissues*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2009. **877**(8-9): p. 837-41.
107. Lipshultz, S.E., et al., *Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood*. N Engl J Med, 1991. **324**(12): p. 808-815.
108. Lipshultz, S.E., et al., *Long-term enalapril therapy for left ventricular dysfunction in doxorubicin-treated survivors of childhood cancer*. J Clin Oncol, 2002. **20**(23): p. 4517-22.
109. Lipshultz, S.E., et al., *The effect of dexrazoxane on myocardial injury in doxorubicin-treated children with acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2004. **351**(2): p. 145-53.
110. Frenay, M., et al., *Pharmacokinetics of weekly low dose doxorubicin*. Eur J Cancer Clin Oncol, 1989. **25**(2): p. 191-5.
111. Speth, P.A., Q.G. van Hoesel, and C. Haanen, *Clinical pharmacokinetics of doxorubicin*. Clin Pharmacokinet, 1988. **15**(1): p. 15-31.
112. Twelves, C.J., et al., *Comparative pharmacokinetics of doxorubicin given by three different schedules with equal dose intensity in patients with breast cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 1991. **28**(4): p. 302-7.
113. Jacquet, J.M., et al., *Doxorubicin and doxorubicinol: intra- and inter-individual variations of pharmacokinetic parameters*. Cancer Chemother Pharmacol, 1990. **27**(3): p. 219-25.
114. Camaggi, C.M., et al., *Epirubicin and doxorubicin comparative metabolism and pharmacokinetics. A cross-over study*. Cancer Chemother Pharmacol, 1988. **21**(3): p. 221-8.
115. Abd El-Gawad, H.M. and M.M. El-Sawalhi, *Nitric oxide and oxidative stress in brain and heart of normal rats treated with doxorubicin: Role of aminoguanidine*. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2004. **18**(2): p. 69-77.
116. Hipfner, D.R., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1461**(2): p. 359-76.

117. Priebe, W., et al., *Doxorubicin- and daunorubicin-glutathione conjugates, but not unconjugated drugs, competitively inhibit leukotriene C4 transport mediated by MRP/GS-X pump*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(3): p. 859-63.
118. Jungsuwadee, P., et al., *Increase in Mrp1 expression and 4-hydroxy-2-nonenal adduction in heart tissue of Adriamycin-treated C57BL/6 mice*. 2006. p. 2851-2860.
119. Krause, M.S., et al., *MRP1/GS-X pump ATPase expression: is this the explanation for the cytoprotection of the heart against oxidative stress-induced redox imbalance in comparison to skeletal muscle cells?* Cell Biochem Funct, 2007. **25**(1): p. 23-32.
120. Wiseman, L.R. and C.M. Spencer, *Dexrazoxane. A review of its use as a cardioprotective agent in patients receiving anthracycline-based chemotherapy*. Drugs, 1998. **56**(3): p. 385-403.
121. Tebbi, C.K., et al., *Dexrazoxane-Associated Risk for Acute Myeloid Leukemia/Myelodysplastic Syndrome and Other Secondary Malignancies in Pediatric Hodgkin's Disease*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(5): p. 493-500.
122. LU, S.C., *Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies*. The FASEB Journal, 1999. **13**(10): p. 1169-1183.
123. Ghibelli, L., et al., *Non-oxidative Loss of Glutathione in Apoptosis via GSH Extrusion*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **216**(1): p. 313-320.
124. van den Dobbela, D.J., et al., *Rapid and Specific Efflux of Reduced Glutathione during Apoptosis Induced by Anti-Fas/APO-1 Antibody*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(26): p. 15420-15427.
125. Slater, A.F., et al., *Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis*. Toxicol Lett, 1995. **82-83**: p. 149-53.
126. Deng, S., et al., *Gp91phox-containing NAD(P)H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(4): p. 466-73.
127. Konorev, E.A., M.C. Kennedy, and B. Kalyanaraman, *Cell-permeable superoxide dismutase and glutathione peroxidase mimetics afford superior protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity: the role of reactive oxygen and nitrogen intermediates*. Arch Biochem Biophys, 1999. **368**(2): p. 421-8.
128. Abe, T., et al., *Possible involvement of multidrug-resistance-associated protein (MRP) gene expression in spontaneous drug resistance to vincristine, etoposide and adriamycin in human glioma cells*. Int J Cancer, 1994. **58**(6): p. 860-4.
129. Vezmar, M. and E. Georges, *Reversal of MRP-mediated doxorubicin resistance with quinoline-based drugs*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(10): p. 1245-52.
130. Pakunlu, R.I., T.J. Cook, and T. Minko, *Simultaneous modulation of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense by MDR1 and BCL-2 targeted antisense oligonucleotides enhances the anticancer efficacy of doxorubicin*. Pharm Res, 2003. **20**(3): p. 351-9.
131. Pakunlu, R.I., et al., *Enhancement of the efficacy of chemotherapy for lung cancer by simultaneous suppression of multidrug resistance and antiapoptotic cellular defense: novel multicomponent delivery system*. Cancer Res, 2004. **64**(17): p. 6214-24.
132. Sordet, O., et al., *Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2003. **3**(4): p. 271-90.
133. Martin, E., et al., *Evaluation of the topoisomerase II-inactive bisdioxopiperazine ICRF-161 as a protectant against doxorubicin-induced cardiomyopathy*. Toxicology, 2009. **255**(1-2): p. 72-9.
134. Hasinoff, B.B., et al., *The Catalytic DNA Topoisomerase II Inhibitor Dexrazoxane (ICRF-187) Induces Differentiation and Apoptosis in Human Leukemia K562 Cells*. Molecular Pharmacology, 2001. **59**(3): p. 453-461.

135. Hasinoff, B.B., et al., *The Catalytic DNA Topoisomerase II Inhibitor Dexrazoxane (ICRF-187) Induces Endopolyploidy in Chinese Hamster Ovary Cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **295**(2): p. 474-483.
136. Li, K., et al., *Thrombopoietin Protects Against In Vitro and In Vivo Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin*. Circulation, 2006. **113**(18): p. 2211-2220.
137. Lyu, Y.L., et al., *Topoisomerase II α -Mediated DNA Double-Strand Breaks: Implications in Doxorubicin Cardiotoxicity and Prevention by Dexrazoxane*. Cancer Research, 2007. **67**(18): p. 8839-8846.
138. Sargent, J.M., et al., *Dexrazoxane significantly impairs the induction of doxorubicin resistance in the human leukaemia line, K562*. Br J Cancer, 2001. **84**(7): p. 959-964.
139. Joshi, G., et al., *Free radical mediated oxidative stress and toxic side effects in brain induced by the anti cancer drug adriamycin: insight into chemobrain*. Free Radic Res, 2005. **39**(11): p. 1147-54.
140. Doroshow, J.H. and K.J. Davies, *Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical*. Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(7): p. 3068-3074.
141. Page, E. and L.P. McCallister, *Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxine-stimulated hearts*. Am J Cardiol, 1973. **31**(2): p. 172-81.
142. Doroshow, J.H., et al., *The effect of doxorubicin on hepatic and cardiac glutathione*. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1979. **26**(2): p. 285-95.
143. al-Kabban, M., et al., *The use of 1H spin echo NMR and HPLC to confirm doxorubicin induced depletion of glutathione in the intact HeLa cell*. Br J Cancer, 1988. **57**(6): p. 553-8.
144. Paranka, N.S. and R.T. Dorr, *Effect of doxorubicin on glutathione and glutathione-dependent enzymes in cultured rat heart cells*. Anticancer Res, 1994. **14**(5A): p. 2047-52.
145. Troyano, A., et al., *Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47107-15.
146. Jedlitschky, G., et al., *Transport of Glutathione, Glucuronate, and Sulfate Conjugates by the MRP Gene-encoded Conjugate Export Pump*. Cancer Research, 1996. **56**(5): p. 988-994.
147. Zaman, G.J., et al., *Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7690-4.
148. Rappa, G., et al., *Evidence That the Multidrug Resistance Protein (MRP) Functions as a Co-Transporter of Glutathione and Natural Product Toxins*. Cancer Research, 1997. **57**(23): p. 5232-5237.
149. Kuo, M.T., *Redox regulation of multidrug resistance in cancer chemotherapy: molecular mechanisms and therapeutic opportunities*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(1): p. 99-133.
150. Leier, I., et al., *The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates*. J Biol Chem, 1994. **269**(45): p. 27807-10.
151. Cotgreave, I.A. and R.G. Gerdes, *Recent Trends in Glutathione Biochemistry--Glutathione-Protein Interactions: A Molecular Link between Oxidative Stress and Cell Proliferation?* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **242**(1): p. 1-9.
152. Lee, F.Y., M.J. Allalunis-Turner, and D.W. Siemann, *Depletion of tumour versus normal tissue glutathione by buthionine sulfoximine*. Br J Cancer, 1987. **56**(1): p. 33-8.

153. Jordan, J., M. d'Arcy Doherty, and G.M. Cohen, *Effects of glutathione depletion on the cytotoxicity of agents toward a human colonic tumour cell line*. Br J Cancer, 1987. **55**(6): p. 627-31.
154. Russo, A., et al., *Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs*. Cancer Res, 1986. **46**(6): p. 2845-8.
155. Arrick, B.A., et al., *Glutathione depletion sensitizes tumor cells to oxidative cytolysis*. J Biol Chem, 1982. **257**(3): p. 1231-7.
156. Kuo, M.T., *Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance*. Adv Exp Med Biol, 2007. **608**: p. 23-30.
157. Pajic, M., et al., *The role of the multidrug resistance-associated protein 1 gene in neuroblastoma biology and clinical outcome*. Cancer Lett, 2005. **228**(1-2): p. 241-6.
158. Leslie, E.M., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **204**(3): p. 216-37.
159. Vaidyanathan, S. and M. Boroujerdi, *Interaction of dexrazoxane with red blood cells and hemoglobin alters pharmacokinetics of doxorubicin*. Cancer Chemother Pharmacol, 2000. **46**(2): p. 93-100.
160. Wang, J.C., *DNA Topoisomerases*. Annual Review of Biochemistry, 1996. **65**(1): p. 635-692.
161. Liu, L.F., et al., *Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II*. J Biol Chem, 1983. **258**(24): p. 15365-70.
162. Zechiedrich, E.L., et al., *Double-stranded DNA cleavage/religation reaction of eukaryotic topoisomerase II: evidence for a nicked DNA intermediate*. Biochemistry, 1989. **28**(15): p. 6229-36.
163. Frydman, B., et al., *Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones*. Cancer Res, 1997. **57**(4): p. 620-7.
164. Kingma, P.S. and N. Osheroff, *Spontaneous DNA damage stimulates topoisomerase II-mediated DNA cleavage*. J Biol Chem, 1997. **272**(11): p. 7488-93.
165. Shinagawa, H., Y. Miki, and K. Yoshida, *BRCA1-Mediated Ubiquitination Inhibits Topoisomerase II β Activity in Response to Oxidative Stress*. Antioxidants & Redox Signaling, 2008. **10**(5): p. 939-950.
166. Li, T.-K., et al., *Activation of topoisomerase II-mediated excision of chromosomal DNA loops during oxidative stress*. Genes & Development, 1999. **13**(12): p. 1553-1560.
167. Shinagawa, H., Y. Miki, and K. Yoshida, *BRCA1-Mediated Ubiquitination Inhibits Topoisomerase II β Activity in Response to Oxidative Stress*. Antioxidants & Redox Signaling, 2007. **10**(5): p. 939-950.
168. Mannervik, B., et al., *Nomenclature for human glutathione transferases*. Biochem J, 1992. **282** (Pt 1): p. 305-6.
169. Morgenstern, R., C. Guthenberg, and J.W. Depierre, *Microsomal glutathione S-transferase. Purification, initial characterization and demonstration that it is not identical to the cytosolic glutathione S-transferases A, B and C*. Eur J Biochem, 1982. **128**(1): p. 243-8.
170. Mannervik, B., *The isoenzymes of glutathione transferase*. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1985. **57**: p. 357-417.
171. Ketterer, B., D.J. Meyer, and K.H. Tan, *The role of glutathione transferase in the detoxication and repair of lipid and DNA hydroperoxides*. Basic Life Sci, 1988. **49**: p. 669-74.
172. van Bladeren, P.J., *Formation of toxic metabolites from drugs and other xenobiotics by glutathione conjugation*. Trends Pharmacol Sci, 1988. **9**(8): p. 295-9.

173. Ketterer, B. and D.J. Meyer, *Glutathione transferases: a possible role in the detoxication and repair of DNA and lipid hydroperoxides*. Mutat Res, 1989. **214**(1): p. 33-40.
174. Singhal, S.S., et al., *Glutathione S-transferases of human lung: characterization and evaluation of the protective role of the alpha-class isozymes against lipid peroxidation*. Arch Biochem Biophys, 1992. **299**(2): p. 232-41.
175. Jensson, H., et al., *Rat glutathione transferase 8-8, an enzyme efficiently detoxifying 4-hydroxyalk-2-enals*. FEBS Lett, 1986. **203**(2): p. 207-9.
176. Litwack, G., B. Ketterer, and I.M. Arias, *Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions*. Nature, 1971. **234**(5330): p. 466-7.
177. Arias, I.M., *Mechanism of bilirubin transfer into the liver*. Verh Dtsch Ges Inn Med, 1976. **82 Pt 2**: p. 2024-9.
178. Bhargava, M.M., et al., *Subunit composition, organic anion binding, catalytic and immunological properties of ligandin from rat testis*. J Biol Chem, 1980. **255**(2): p. 724-7.
179. Homma, H. and I. Listowsky, *Identification of Yb-glutathione-S-transferase as a major rat liver protein labeled with dexamethasone 21-methanesulfonate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(21): p. 7165-9.
180. Waxman, D.J., *Glutathione S-transferases: role in alkylating agent resistance and possible target for modulation chemotherapy--a review*. Cancer Res, 1990. **50**(20): p. 6449-54.
181. Ishikawa, T., et al., *Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14981-8.
182. Alin, P., U.H. Danielson, and B. Mannervik, *4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase*. FEBS Lett, 1985. **179**(2): p. 267-70.
183. Hubatsch, I., M. Ridderstrom, and B. Mannervik, *Human glutathione transferase A4-4: an alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation*. Biochem J, 1998. **330 (Pt 1)**: p. 175-9.
184. Mulders, T.M., et al., *In vivo characterization and modulation of the glutathione/glutathione S-transferase system in cancer patients*. Drug Metab Rev, 1995. **27**(1-2): p. 191-229.
185. Dirven, H.A., et al., *The role of human glutathione S-transferase isoenzymes in the formation of glutathione conjugates of the alkylating cytostatic drug thiotepa*. Cancer Res, 1995. **55**(8): p. 1701-6.
186. Wilce, J.A., L. Otvos, Jr., and D.J. Craik, *¹H NMR studies of the effects of glycosylation on the C-terminal pentapeptide of peptide T*. Biomed Pept Proteins Nucleic Acids, 1996. **2**(2): p. 59-66.
187. Okuda, H., et al., *Inactivation of the carcinogen, 5-hydroxymethylchrysene, by glutathione conjugation via a sulphate ester in hepatic cytosol*. Biochem Pharmacol, 1986. **35**(24): p. 4573-6.
188. Lo, H.W. and F. Ali-Osman, *Genetic polymorphism and function of glutathione S-transferases in tumor drug resistance*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(4): p. 367-74.
189. Zelko, I.N., T.J. Mariani, and R.J. Folz, *Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression*. Free Radical Biology and Medicine, 2002. **33**(3): p. 337-349.
190. Fridovich, I., *Superoxide Radical and Superoxide Dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**(1): p. 97-112.

191. Bannister, J.V., W.H. Bannister, and G. Rotilio, *Aspects of the Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase*. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1987. **22**(2): p. 111-180.
192. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988)*. Free Radical Biology and Medicine, 1988. **5**(5-6): p. 363-369.
193. Crapo, J.D., et al., *Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. **89**(21): p. 10405-10409.
194. Jones, N.C., P.W. Rigby, and E.B. Ziff, *Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses*. Genes & Development, 1988. **2**(3): p. 267-281.
195. Marklund, S.L., *Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1982. **79**(24): p. 7634-7638.
196. Banci, L., et al., *SOD1 and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Mutations and Oligomerization*. PLoS ONE, 2008. **3**(2): p. e1677.
197. Hiroi, S., et al., *Polymorphisms in the SOD2 and HLA-DRB1 Genes Are Associated with Nonfamilial Idiopathic Dilated Cardiomyopathy in Japanese*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999. **261**(2): p. 332-339.
198. Folz, R.J., L. Peno-Green, and J.D. Crapo, *Identification of a homozygous missense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatically increased serum enzyme levels*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(12): p. 2251-4.
199. Yamada, H., et al., *Molecular analysis of extracellular-superoxide dismutase gene associated with high level in serum*. Jpn J Hum Genet, 1995. **40**(2): p. 177-84.
200. Abate, C., et al., *Dimerization and DNA binding alter phosphorylation of Fos and Jun*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6766-70.
201. Kerppola, T.K. and T. Curran, *Fos-Jun heterodimers and jun homodimers bend DNA in opposite orientations: Implications for transcription factor cooperativity*. Cell, 1991. **66**(2): p. 317-326.
202. Silvers, A.L. and G.T. Bowden, *UVA Irradiation–induced Activation of Activator Protein-1 is Correlated with Induced Expression of AP-1 Family Members in the Human Keratinocyte Cell Line HaCaT*. Photochemistry and Photobiology, 2002. **75**(3): p. 302-310.
203. Soriani, M., V. Hejmadi, and R.M. Tyrrell, *Modulation of c-jun and c-fos transcription by UVB and UVA radiations in human dermal fibroblasts and KB cells*. Photochem Photobiol, 2000. **71**(5): p. 551-8.
204. Piret, B. and J. Piette, *Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-kappaB in ACH-2 and CEM cells*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(21): p. 4242-8.
205. Hoidal, J.R., et al., *Lung injury and oxidoreductases*. Environ Health Perspect, 1998. **106 Suppl 5**: p. 1235-9.
206. Saito, T. and T. Nishino, *Differences in redox and kinetic properties between NAD-dependent and O₂-dependent types of rat liver xanthine dehydrogenase*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(17): p. 10015-22.
207. Nishino, T., et al., *Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase*. FEBS Journal, 2008. **275**(13): p. 3278-3289.
208. Edmondson, D.E., et al., *Structure and mechanism of monoamine oxidase*. Curr Med Chem, 2004. **11**(15): p. 1983-93.
209. Blanco, J.G., et al., *Genetic polymorphisms in the carbonyl reductase 3 gene CBR3 and the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene NQO1 in patients who developed*

- anthracycline-related congestive heart failure after childhood cancer*. Cancer, 2008. **112**(12): p. 2789-2795.
210. Hoffmann, M., et al., *A Functional Polymorphism in the NAD(P)H Oxidase Subunit CYBA Is Related to Gene Expression, Enzyme Activity, and Outcome in Non-Hodgkin Lymphoma*. Cancer Research. **70**(6): p. 2328-2338.
 211. Rossi, D., et al., *Analysis of the host pharmacogenetic background for prediction of outcome and toxicity in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP21*. Leukemia, 2009. **23**(6): p. 1118-26.
 212. Babior, B.M., *NADPH oxidase*. Curr Opin Immunol, 2004. **16**(1): p. 42-7.
 213. Parkos, C.A., et al., *Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3319-23.
 214. Newburger, P.E., Q. Dai, and C. Whitney, *In vitro regulation of human phagocyte cytochrome b heavy and light chain gene expression by bacterial lipopolysaccharide and recombinant human cytokines*. J Biol Chem, 1991. **266**(24): p. 16171-7.
 215. Ushio-Fukai, M., et al., *p22phox is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system and regulates angiotensin II-induced hypertrophy in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23317-21.
 216. Dinauer, M.C., et al., *Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease*. J Clin Invest, 1990. **86**(5): p. 1729-37.
 217. Quinn, M.T. and K.A. Gauss, *Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases*. J Leukoc Biol, 2004. **76**(4): p. 760-81.
 218. Quinn, M.T., M.L. Mullen, and A.J. Jesaitis, *Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits*. J Biol Chem, 1992. **267**(11): p. 7303-9.
 219. Biberstine-Kinkade, K.J., et al., *Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558): identification of specific histidines in gp91(phox)*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 31105-12.
 220. Guzik, T.J., et al., *Functional effect of the C242T polymorphism in the NAD(P)H oxidase p22phox gene on vascular superoxide production in atherosclerosis*. Circulation, 2000. **102**(15): p. 1744-7.
 221. Wyche, K.E., et al., *C242T CYBA polymorphism of the NADPH oxidase is associated with reduced respiratory burst in human neutrophils*. Hypertension, 2004. **43**(6): p. 1246-51.
 222. Shimo-Nakanishi, Y., et al., *Functional effects of NAD(P)H oxidase p22(phox) C242T mutation in human leukocytes and association with thrombotic cerebral infarction*. Atherosclerosis, 2004. **175**(1): p. 109-15.
 223. Schachinger, V., et al., *NADH/NADPH oxidase p22 phox gene polymorphism is associated with improved coronary endothelial vasodilator function*. Eur Heart J, 2001. **22**(1): p. 96-101.
 224. Stanger, O., et al., *NADH/NADPH oxidase p22 phox C242T polymorphism and lipid peroxidation in coronary artery disease*. Clinical Physiology, 2001. **21**(6): p. 718-722.
 225. Schirmer, M., et al., *Genetic polymorphisms of NAD(P)H oxidase: variation in subunit expression and enzyme activity*. Pharmacogenomics J, 2007. **8**(4): p. 297-304.
 226. Sumimoto, H., et al., *Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5345-9.
 227. Zhan, S., et al., *Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex*. Blood, 1996. **88**(7): p. 2714-21.

228. Haeusler, L.C., et al., *Purification and biochemical properties of Rac1, 2, 3 and the splice variant Rac1b*. Methods Enzymol, 2006. **406**: p. 1-11.
229. Hordijk, P.L., *Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins*. Circ Res, 2006. **98**(4): p. 453-62.
230. Diekmann, D., et al., *Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity*. Science, 1994. **265**(5171): p. 531-3.
231. Flens, M.J., et al., *Tissue distribution of the multidrug resistance protein*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1237-47.
232. Loe, D.W., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP*. Eur J Cancer, 1996. **32A**(6): p. 945-57.
233. Borst, P., et al., *A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(16): p. 1295-302.
234. Leslie, E.M., R.G. Deeley, and S.P. Cole, *Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters*. Toxicology, 2001. **167**(1): p. 3-23.
235. Wijnholds, J., et al., *Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier*. J Clin Invest, 2000. **105**(3): p. 279-85.
236. Conrad, S., et al., *Identification of human multidrug resistance protein 1 (MRP1) mutations and characterization of a G671V substitution*. J Hum Genet, 2001. **46**(11): p. 656-663.
237. Visscher, H., et al., *Pharmacogenomic Prediction of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity in Children*. J Clin Oncol.
238. Meier, Y., et al., *Interindividual variability of canalicular ATP-binding-cassette (ABC)-transporter expression in human liver*. Hepatology, 2006. **44**(1): p. 62-74.

13 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturen von Doxorubizin (DOX), Daunorubizin (DNR), Epirubizin (EPI) und Idarubizin (IDA) aus Minotti et al. [2]	9
Abb. 2: Kumulative Wahrscheinlichkeit einer Dox-induzierten Herzschiädigung.....	11
Abb. 3: Übersicht zur Entstehung und Beseitigung von oxidativem Stress in der Zelle (aus [15]).....	12
Abb. 4: Mögliche Mechanismen für die Entstehung der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität aus Kruger et al. [1]	13
Abb. 5: Hydrolyseschema von Dex aus Hasinoff et al. [46]	17
Abb. 6: Ergebnisse der Chochrane-Metaanalyse aus [1].....	18
Abb. 7: Einfluss von Dex auf die Tumorresponse aus [56].....	19
Abb. 8: Mechanismus der Glutathionbestimmung.....	28
Abb. 9: Beispielchromatogramm aus dem Blut von unbehandelten C57BL/6-Mäusen	36
Abb. 10: Kalibriergerade am Beispiel der Blutbestimmung	37
Abb. 11: Altersabhängiger Anstieg der NT-proBNP Werte bei gesunden Menschen (ng/L) [87]	47
Abb. 12: HPLC-Untersuchungen des Blutes nach der Gabe von 12 mg Dox je kg KG	52
Abb. 13: HPLC-Untersuchung des Herzens nach der Gabe von 12 mg Dox je kg KG	53
Abb. 14: HPLC-Untersuchung der Leber nach der Gabe von 12 mg Dox /kg KG	55
Abb. 15: Überblick über das Gesamtorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Organ.....	57
Abb. 16: Überblick über das Gesamtorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Zeitpunkt	58
Abb. 17: Mengen an Dox, Doxol und Doxon je gesamtes untersuchtes Organ.....	60
Abb. 18: HPLC-Untersuchung des Blutes nach der Gabe von 3 mg Dox je kg KG.....	61
Abb. 19: HPLC-Untersuchung des Herzens nach der Gabe von 3 mg Dox je kg KG	62
Abb. 20: HPLC-Untersuchung der Leber nach der Gabe von 3 mg Dox je kg KG	63
Abb. 21: Überblick über das Gesamtorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Organ nach der Injektion von 3 mg Dox je kg KG	64
Abb. 22: Überblick über das Gesamtorkommen von Dox, Doxol und Doxon je untersuchtem Zeitpunkt und untersuchtem Organ in A) ng/g Gewebe und B) absolute Menge in nmol je gesamtes Organ	65
Abb. 23: Bestimmung des GSH / GSSG-Gehaltes in C57BL/6-Mäusen	66
Abb. 24: Bestimmung der GSH / GSSG-Gehalte in verschiedenen Mäusestämmen.....	67
Abb. 25: Bestimmung des oxidativen Stresses unter Verwendung von H ₂ DCFDA nach der Gabe von verschiedenen Konzentrationen an Dox.....	70
Abb. 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HTETOP-Zellen.....	71
Abb. 27: Einfluss der Topo II α an der Entstehung des oxidativen Stresses, gemessen unter Verwendung von H ₂ DCFDA	72
Abb. 28: Auswaschversuch von H ₂ DCFDA aus den HTETOP-Zellen.....	73
Abb. 29: Bestimmung des 2-HE- und des E-Gehaltes der HTETOP-Zellen mittels HPLC nach einer 30 minütigen Behandlung mit DHE.....	74
Abb. 30: Quantifizierung des 2-HE-Gehaltes nach einer 2 stündigen Behandlung der HTETOP-Zellen mit DHE	74
Abb. 31: Kalibriergeraden von GSH und GSSG	75
Abb. 32: Detektierbarkeit von GSSG und GSH in den HTETOP-Zellen mit der Maskierung von GSH durch 2-Vinylpyridin	76
Abb. 33: Derivatisierung mit 2-Vinylpyridin und Simulation von oxidativem Stress in Abwesenheit von Zellen.....	77
Abb. 34: Glutathiongehalte in den HTETOP-Zellen nach Behandlung mit diversen Substanzen.....	78
Abb. 35: prozentualer GSSG-Anteil am Gesamt-Glutathiongehalt	80
Abb. 36: Bestimmung der GSH / GSSG-Konzentration in den HT1080-Zellen	81
Abb. 37: Prozentualer Anteil von GSSG am Totalen GSH-Gehalt in den HT1080-Zellen.....	82
Abb. 38: Vergleich der Genexpressionen von den Dox-behandelten Zellen mit den Kontrollzellen	83
Abb. 39: Vergleich der Genexpressionen von den Dox+Dex-behandelten Zellen mit den Kontrollzellen	84
Abb. 40: Vergleich der Genexpressionen von den Dox+DOXY-behandelten Zellen mit den Kontrollzellen	85
Abb. 41: Einfluss von steigenden Dox-Konzentrationen auf das Überleben der HTETOP-Zellen.....	86
Abb. 42: Einfluss der verschiedenen Präinkubationen auf die Dox-Toxizität gegenüber den HTETOP-Zellen.....	87
Abb. 43: Abhängigkeit der Absorptionsdifferenz (Anfangsmesswert minus Messwert nach 3 min.) von der LDH-Menge in der Probe.....	88

Abb. 44: Beeinflussung des LDH-Gehaltes durch die Kombinationstherapie mit Dex/ DOXY.....	88
Abb. 45: Nachweis der Dox-Konzentration im Medium mittels HPLC.....	89
Abb. 46: Nachweis der Dox-Konzentration im intrazellulären Raum mittels HPLC.....	90
Abb. 47: Zeit bis zum Auftreten von sicheren Herzscheiden	91
Abb. 48: Verteilung der NT-proBNP-Werte in den untersuchten Proben.....	92
Abb. 49: Graphische Darstellung aller herzgeschädigter Patienten unter Berücksichtigung der übergeordneten Textfelder	93
Abb. 50: Graphische Darstellung der Patienten mit sicheren Herzscheiden unter Berücksichtigung der übergeordneten Textfelder.....	94
Abb. 51: Flussdiagramm der sicher herzgeschädigten Patienten	95
Abb. 52: Klinische Parameter der gematchten Patienten	96
Abb. 53: Kumulative Dosiskurven Dox/m ² KOF für B-Zellpatienten	97
Abb. 54: HeatMap der untersuchten Polymorphismen.....	98
Abb. 55: Verteilung der Genotypen von CYBA in den Kontrollen und Fällen.....	101
Abb. 56: Verteilung der Genotypen von NCF4 in den Kontrollen und Fällen.....	102
Abb. 57: Verteilung der Genotypen von RAC2 in den Kontrollen und Fällen.....	104
Abb. 58: Verteilung der Genotypen von MRP1 und MRP2 in den Kontrollen und Fällen	105
Abb. 59: Univariate logistic regressions Analyse.....	106
Abb. 60: Multivariate logistic regressions Analyse.....	106
Abb. 61: Metaanalyse aller untersuchter Genotypen bei den akuten und chronischen Fällen vs. den Kontrollen.....	107
Abb. 62: Arylierung von Menadion aus [100].....	120
Abb. 63: Vermessung von Fließmittel.....	180
Abb. 64: Vermessung von unbehandeltem Mäuseherz.....	180
Abb. 65: Vermessung von unbehandeltem Mäuseherz versetzt mit internem Standard DNR.....	180

14 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Mögliche Zielstrukturen zur Steigerung der Tumorselektivität (nach [24]).....	15
Tab. 2:	Pharmakogenetische Varianten die mit dem Auftreten einer Chemotherapie-Toxizität korrelieren (nach [24]).....	15
Tab. 3:	Nachweis der Validierungsparameter für Präzision und Richtigkeit	39
Tab. 4:	Wiederfindungsraten von Dox, Doxol, und Doxon nach der Aufarbeitung von Plasma	41
Tab. 5:	Stammlösungen für Dox, Doxol und Doxon sowie für den internen Standard (IS) DNR	42
Tab. 6:	Mix-Lösungen zur Herstellung der Kalibrierreihen	42
Tab. 7:	Primersequenzen und PCR-Bedingungen für den Pyrosequencing™ assay	51
Tab. 8:	Prozentualer Anteil der Metabolite am Gesamtgehalt Dox+Doxol+Doxon (je mol Substanz und Zeitpunkt) im Herzgewebe	54
Tab. 9:	Prozentualer Anteil der Metabolite am Gesamtgehalt Dox+Doxol+Doxon (je mol Substanz und Zeitpunkt) in der Leber der Mäuse	56
Tab. 10:	Prozentualer GSSG-Anteil am Gesamt-Glutathiongehalt im Herzen der C57BL/6-Mäuse	67
Tab. 11:	Prozentualer Anteil von GSSG am Gesamt-Glutathiongehalt	68
Tab. 12:	Prozentualer Anteil von GSSG am totalen Glutathiongehalt in den HTETOP-Zellen	78
Tab. 13:	Prozentualer Anteil des gesamten Glutathions der jeweiligen Behandlungsgruppe im Vergleich zur Gruppe „Dox allein“ (Gruppe „Dox allein“ wurde auf 100% festgesetzt).....	81
Tab. 14:	Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Gruppe der akuten Fälle versus den Kontrollen	100
Tab. 15:	Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Gruppe der chronischen Fälle versus den Kontrollen	100
Tab. 16:	Ergebnisse der Assoziationsanalyse in der Gruppe der akuten und chronischen Fälle versus den Kontrollen.....	100
Tab. 17:	NT-proBNP-Messwerte.....	149
Tab. 18:	Parameter die aus der Datenbank abgefragt wurden	152
Tab. 19:	Kriterien, anhand derer eine Herzschiidigung sicher identifiziert wurde	153
Tab. 20:	Kriterien, anhand derer eine Herzschiidigung zu vermuten ist	155
Tab. 21:	Hinweise auf Herzschiiden in dem Bemerkungsfeld Arzt unterteilt in A) sichere und B) unsichere, aber wahrscheinliche Herzschiiden.....	157
Tab. 22:	Hinweise auf Herzschiiden in dem Bemerkungsfeld Eingabe unterteilt in A) sichere und B) unsichere, aber wahrscheinliche Herzschiiden.....	162
Tab. 23:	Genotypisierungsergebnisse aus der Ricover60-Studie.....	163
Tab. 24:	Matching der Fälle und Kontrollen.....	171
Tab. 25:	absolute Mengen an Dox, Doxol und Doxon in den untersuchten Geweben (Blut, Herz und Leber) [ng/g Gewebe] nach der Injektion von 12 mg Dox je kg KG.....	181
Tab. 26:	prozentuale Verteilung von Doxorubizin und seiner Metabolite in den untersuchten Organen (Blut+Herz+Leber=Gesamt=100%) nach der Injektion von 12 mg Dox je kg KG.....	181
Tab. 27:	prozentuale Verteilung von Dox und Doxol innerhalb der drei untersuchten Organe (Blut, Herz, Leber=Gesamt=100%) nach der Injektion von 3 mg Dox je kg KG	182

15 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
°C	Grad Celcius
μ	Mikro
2-HE	2-Hydroxyethidium
5-FU	5-Fluorouracil
6-MP	6-Mercaptopurin
Abb.	Abbildung
AKdÄ	Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the Curve
Balb/c	Wildtypmäusestamm
BNP	Brain natriuretisches Protein; Marker für Herzinsuffizienz
BSA	Bovines Serumalbumin
BSO	L-Buthionine-Sulfoximine
C57BL/6	Wildtypmausestamm
CAT	Katalase
CDK	Cyclinabhängige Kinasen
cFOS	zelluläres Protoonkogen
Chemo	Chemotherapie
CHF	congestive heart failure
CHOP	Chemotherapieprotokoll mit Cyclophosphamid, Dox, Vincristin und Prednison
CI	Konfidenzintervall
CR	Komplette Remission
CYBA	Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DCF	Dichlorofluorescein
Dex	Dexrazoxan
DHE	Dihydroxyethidium
DMEM	Dulbecco's Minimalmedium
DMNQ	2,3-Dimethoxy-1-Naphthoquinone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNR	Daunorubizin
Dox	Doxorubizin
Doxol	Doxorubizinol
Doxon	Doxorubizinon
DOXY	Doxycyclin
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
E	Ethidium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EPI	Epirubizin

Abkürzung	Bezeichnung
FB	Folgebogen
FCS	Fetal bovin serum
FDR	Rate der falsch positiven Werte
g	gramm
GCOS	GeneChip Operating System
gp91	Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	reduzierte Form von Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid; oxidierte Form von Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferasen
H ₂ DCF	Dichlorodihydrofluorescein
H ₂ DCFDA	2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's buffered salt solution
HCL	Salzsäure
Her2	Rezeptor auf Tumorzellen
HIF	Hypoxia-inducible Factor
HNE	Hydroxynoneal
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie
HT1080	Zelllinie
HTETOP	Zelllinie
HWE	Hardy Weinberg-Gleichgewicht
i.p.	intraperitoneal
ICRF 161	ringoffene Form von Dexrazoxan
IDA	Idarubizin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IMISE	Institut für Medizinische Informatik
IS	interner Standard
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LDH	Lactatdehydrogenase
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantification
LVEF	linksventrikuläre Ejektionfraktion
M	Molarität
m	milli
M	molar
MAF	minor allele frequency
MAO	Monoaminoxidase
min	Minute
MRP	Multidrug Resistance Protein (Transportprotein der ABC-Transporter)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n.d.	nicht definiert

Abkürzung	Bezeichnung
n=	Anzahl
NAC	N-Acetylcystein
NAD(P)H	Nicotinamidadenindiphosphat
NBD	Nukleotid-Bindungsdomäne
NCF4	Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase
NFkB	Nuclear Factor kappa B
NHLB	Studie: Non Hodgkin Lymphom B
nm	nanometer
nNOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NT-proBNP	Spaltprodukt von BNP; Marker für Herzinsuffizienz
NYHA	Klassifizierungsskala für Herzinsuffizienz
O ₂	Sauerstoff
OR	Odds Ratio
OTZ	L-2-Oxothiazolidine-4-Carbonsäure
PegCAT	Pegylierte Katalase
PegSOD	Pegylierte Superoxiddismutase
PET	Positron-Emissions-Tomographie
pH	pH-Wert
PK	Proteinkinase
PRISM	Statistikprogramm
R	Rituximab
RAC	Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase
RMA	robust multiarray analysis
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR	relatives Risiko
Rt	Retentionszeit
s	Sekunde
SAM	significance analysis of microarrays
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
SOD	Superoxiddismutase
SPSS	Statistikprogramm
SUE	schwere unerwünschte Ereignisse
Tab.	Tabelle
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoessäure
Topo IIα	Topoisomerase II alpha
TPMT	Thiopurin-Methyltransferase
TTTF	Zeit bis zum Therapieversagen
TXNRD1	Thioredoxinreduktase 1
VEGF	vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthin-Oxidase