

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Nuklearmedizin
der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. E. Richter

***In vitro* Effekte auf das Proliferations- und
Migrationsverhalten multizellulärer
Glioblastomsphäroide durch
Strahlensensibilisierung**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von
Martina Münch
aus Hannover

Lübeck 2004

Betreuer in Lübeck: Dr. med. Fabian Fehlauer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Eckhart Richter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans Arnold

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2005

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 09.08.2005

gez. Prof. Dr. med. Wolfgang Jelkmann

- Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
1.1 Das Glioblastom	3
1.2 Therapie maligner Gliome	5
1.3 Radiochemotherapie	8
1.4 Chemotherapie: Zelluläre Effekte	9
1.4.1 Temodal.....	9
1.4.2 Gemzitabin.....	10
1.5 Bestrahlung: Zelluläre Effekte	11
1.6 Multizelluläre Sphäroide als <i>in vivo</i> Modell.....	13
1.7. Fragestellung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Humane Glioblastomzelllinien	17
2.2 Sphäroide als Tumormodell	18
2.3 Voruntersuchungen	18
2.4 Behandlungsgruppen	19
2.5 Inkubation und Bestrahlung.....	21
2.5.1 Inkubation mit Gemzitabin	21
2.5.2 Inkubation mit Temodal	22
2.5.3 Bestrahlung.....	22
2.6 Proliferationsexperimente.....	23
2.7 Migrationsexperimente	24
3 Ergebnisse	26
3.1 Proliferationsverhalten.....	26
3.1.1 Proliferation nach Inkubation mit Gemzitabin	26
3.1.2 Proliferation nach Inkubation mit Gemzitabin und Bestrahlung	28
3.1.3 Proliferation nach Inkubation mit Temodal.....	32
3.1.4 Proliferation nach Inkubation mit Temodal und Bestrahlung.....	34

3.2 Migrationsverhalten	39
3.2.1 Migration nach Inkubation mit Gemzitabin	39
3.2.2 Migration nach Inkubation mit Gemzitabin und Bestrahlung	41
3.2.3 Migration nach Inkubation mit Temodal	46
3.2.4 Migration nach Inkubation mit Temodal und Bestrahlung	48
4 Diskussion	53
4.1 Das Tumormodell	53
4.2 Temodal	57
4.3 Gemzitabin	59
4.3 Radiochemotherapie	61
4.4 Perspektiven in der Therapie des Glioblastoms	65
5 Zusammenfassung	70
6 Literaturverzeichnis	72
7 Danksagung	97
8 Lebenslauf.....	98

1 Einleitung

1.1 Das Glioblastom

Die jährliche Inzidenz von primären Hirntumoren liegt in den Industrienationen bei durchschnittlich 10,2 Neuerkrankungen auf 100.000 Einwohner (Steiner et al., 1998). Gemessen an der Gesamtzahl aller an Malignomen verstorbenen Patienten beträgt die Mortalität an hirneigenen Tumoren drei bis fünf Prozent (Kallio et al., 1991; Fine, 1994). Bei 60% aller Hirntumoren handelt es sich um Tumore neuroepithelialen Ursprungs, die Gliome (Radhakrishnan et al., 1995). Da Gliome verschiedene Differenzierungsgrade aufweisen, werden diese Tumoren nach der Empfehlung der WHO in vier Malignitätsgrade eingeteilt: das benigne pilozytische Astrozytom (Grad 1), das Astrozytom (Grad 2), das anaplastische Astrozytom (Grad 3) und das Glioblastom (Grad 4) (Kleihues et al., 2002).

Das Glioblastom ist der häufigste gliale Tumortyp und gehört zu den bösartigsten Geschwülsten (Davis et al., 1998). 15-20 % aller malignen Hirntumoren bei Erwachsenen sind Glioblastome. Seine außerordentliche klinische Bedeutung ergibt sich aus der relativen Häufigkeit und der extrem schlechten Prognose. Der klinische Verlauf ist aufgrund des raschen und infiltrativen Wachstums sehr frustrierend. Trotz maximaler Therapie versterben die meisten Patienten innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung (Glioma Meta-Analysis Trialists Group, 2002). Die 1-Jahres Überlebensrate liegt beim Glioblastom bei 30-40%. Überlebenszeiten von mehr als fünf Jahren werden bei gesicherter Diagnose in der Literatur beschrieben und insbesondere bei jungen Patienten mit diskreten neurologischen Erstsymptomen beobachtet. Mit einem Altersgipfel um das fünfte Lebensjahrzehnt ist bevorzugt das männliche Geschlecht betroffen. Das Auftreten in Kindheit und Jugend ist eher selten, jedoch kann auch das Glioblastom in jedem Lebensalter

auftreten. In verschiedenen epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass die Inzidenz von Hirntumoren in der Altersgruppe über 65 Jahre zunimmt (Davis et al, 1998). Die Inzidenz von Hirntumoren nimmt demnach mit steigendem Alter zu. Dies ist deshalb relevant, da mit einem weiteren Ansteigen der Lebenserwartung in den nächsten Jahren zu rechnen ist.

Es werden heute verschiedene Wege der Tumorentstehung für das Glioblastom postuliert. Das Tumorprogressionsmodell (sekundäres Glioblastom) beschreibt eine Progression vom Astrozytom WHO Grad II über Astrozytom WHO Grad III zum Glioblastom. Diese betrifft vor allem jüngere Patienten mit einem niedrigmalignen Astrozytom in der Vorgeschichte. Dabei ist die Transformation auf histologischer Ebene durch eine vermehrte Neovaskularisation, fokale Nekrosen und eine Zunahme der Zellproliferation gekennzeichnet. Die Glioblastomentstehung *de novo* (primäres Glioblastom) betrifft insbesondere ältere Patienten. Molekulargenetisch sind es in erster Linie Deletionen auf dem Chromosom 10. Der daraus resultierende Verlust von Tumorsuppressorgenen (MMAC1/PTEN, DMBT1 und H-neu) sowie die Aktivierung von Onkogenen führen zu einer verstärkten Zellproliferation (von Deimling et al., 1995; van de Kelft et al., 1997; Fueyo et al., 1998; Hill et al., 1999).

Das Glioblastom wächst fast ausschließlich im Großhirn, das Auftreten im Kleinhirn oder im Rückenmark ist ausgesprochen selten. Der Tumor ist zumeist im Frontal- oder Temporalhirn lokalisiert, oft mit Infiltration des Balkens und der Stammganglien

Typischerweise geht der Tumor vom Marklager aus, hat aber einen sehr variablen Abstand vom Kortex, ohne dabei Lappen- oder Hemisphäregrenzen zu respektieren.

Das Glioblastom metastasiert selten in die Liquorräume, wobei die Inzidenz hierfür nach einer Tumorresektion ansteigt (Maiuri et al., 1980). Es finden sich in extrem seltenen Fällen Metastasen außerhalb des ZNS, die Anlage eines ventrikuloatrialen Shunts zur Entlastung des Hirndruckes gilt als Risikofaktor hierfür (Smith et al., 1969; Pasquier et al., 1980).

Histologisch imponiert das Glioblastom durch die große Variabilität des Zellbildes, daher auch seine ursprüngliche Namensgebung „Glioblastoma

multiforme“. Die Struktur des Tumors ist sehr heterogen (Shapiro und Shapiro, 1985). An einigen Stellen ist der Tumor fibrös und hart, an anderen erscheint das Gewebe eher weich und durchschimmernd. Der Tumor ist von Nekrosen durchsetzt, welche zum Teil von strahlenförmig abgehenden Tumorzellen umgeben sind. Am Rande der Nekrosezonen werden Gefäßveränderungen gefunden. Es finden sich reichlich neu gebildete arterielle und venöse Gefäße mit Shunts.

Die Nekrosehöhlen erscheinen wie mit eitriger Flüssigkeit gefüllt, die Wände der Höhlen sind zottig. Außerhalb dieser Areale ist der Tumor von vielen erweiterten und oft missgebildeten Gefäßen umgeben. Während seines Wachstums kann der Tumor Anschluss an die Hirnoberfläche und die Duraräume erreichen und hier Verbindungen zum Gefäßsystem der Arteria carotis externa herstellen. Oft entsteht durch die ausgeprägte Reaktion des den Tumor umgebenden Hirngewebes ein Ödem mit nachfolgenden Dekompensationszuständen.

1.2 Therapie maligner Gliome

Die Gliome hohen Malignitätsgrades und hier insbesondere das Glioblastom gehören zu den bösartigsten und therapieresistentesten Tumoren des Menschen überhaupt (Sauer, 1987). Die Prognose ist nach wie vor sehr schlecht und unbehandelt führt das Glioblastom durch sein schnelles und ungehindertes Wachstum oft innerhalb weniger Monate nach Diagnosestellung zum Tod. Trotz der enormen Fortschritte in der Diagnostik, die durch neue hochsensible Methoden wie Kernspintomografie (MRT), Computertomografie (CT), Angiografie, Single Positronen Emissionstomografie (SPECT) und Positronenemissionstomografie (PET) erweitert wurde, und auch aller therapeutischen Bemühungen, ist eine signifikante Verbesserung der Überlebenszeit oder gar eine Heilung bisher nicht möglich. Die derzeitige Therapieform besteht aus einer Kombination aus operativer Resektion, postoperativer Radiotherapie und in einigen

Fällen Chemotherapie (Gutin und Levin, 1983; Fine et al., 1993; DeAngelis et al., 1998; Stupp et al., 2002).

Initial wird der Versuch einer „Resektion im Gesunden“ unternommen, wozu bei entsprechender Tumorage- und Größe oft ein großer Teil eines Hirnlappens entfernt werden muss. Liegen die Tumoren ungünstig, muss man sich zur Vermeidung neuro-kognitiver Defizite, einschließlich Persönlichkeitsveränderungen, mit einer Teilresektion begnügen.

In den Fällen, in denen der Tumor in den „sprechenden“ Arealen der dominanten Hemisphäre, im Hirnstamm oder im Mittelhirn liegt, beziehungsweise im Bereich des Balkens wächst oder sich in die Basalganglien ausbreitet, ist eine chirurgische Therapie nur begrenzt oder nicht möglich, in diesen Fällen bleibt oft nur die Diagnosesicherung mittels einer stereotaktischen Biopsie. Zwar kann die mediane Überlebenszeit durch eine Operation verlängert werden, jedoch beträgt die Rezidivrate auch nach maximaler Resektion immer noch fast 100%.

Durch eine postoperative Radiotherapie kann die mediane Überlebenszeit auf 8-10 Monate verlängert werden, was den Nutzen dieses Therapieansatzes unterstreicht (Salazar et al., 1976, 1979; Bloom, 1982; Wara, 1985; Leibel, 1987; Sauer, 1998). Die externe fraktionierte Strahlentherapie der Tumorregion einschließlich eines Sicherheitssaums bis 60 Gy ist ein fester, leitlinienkonformer Therapiebestandteil.

Dennoch gilt das Glioblastom, verglichen mit anderen soliden Tumoren, als extrem strahlenresistent, wobei die intrinsischen Faktoren nicht endgültig geklärt sind. Es wird vermutet, dass die Strahlentherapie eine Hemmung der Epithelproliferation in den Kapillaren und in den kleinen Gefäßen in der Tumorperipherie und in der unmittelbaren Tumorumgebung bewirkt.

Dies könnte das Wachstum vorübergehend hemmen und zu einer Volumenreduktion des Glioblastoms führen (EORTC, 1976; 1978)

Die alleinige Strahlenbehandlung ohne vorangegangene Teilentfernung oder makroskopische Totalentfernung ist vom Ergebnis her schlechter und sollte nur dann empfohlen werden, wenn ein hohes Operationsrisiko besteht. Jedoch ist schon seit vielen Jahrzehnten bekannt, dass die

mediane Überlebenszeit um sieben Monate durch alleinige Bestrahlung gesteigert werden kann (Tönnis et al., 1959)

In den siebziger Jahren galt die Empfehlung, bei Vorliegen eines Glioblastoms grundsätzlich das ganze Hirn zu bestrahlen. Begründet wurde dieses Vorgehen mit dem gelegentlich multizentrischen und infiltrativen Wachstum dieser Tumoren, der häufigen Beteiligung der kontralateralen Hemisphäre und dem gelegentlichen Auftreten von Metastasen im Ventrikelsystem und Liquor cerebrospinalis (Salazar et al., 1976a, 1979). Salazar et al., empfahlen eine Ganzhirnbestrahlung von zumindest 50 Gy, die Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) forderte ebenfalls 50 Gy (Salazar et al., 1979).

Die Kommission „Qualitätssicherung in der Radioonkologie“ hat in ihren im Oktober 1999 veröffentlichten Leitlinien zur Radiotherapie von primären Tumoren des ZNS im Erwachsenenalter eine Gesamtdosis von 60 Gy bei Glioblastomen gefordert. Jedoch wird nach diesen Empfehlungen nicht mehr das gesamte Gehirn bestrahlt, sondern die Tumorregion mit einem Sicherheitssaum, um weniger Toxizität bei einer verhältnismäßig hohen Gesamtdosis zu verursachen (Haase et al., 1999).

Das Planungszielvolumen umfasst dabei den präoperativen Befund, sowie eine Sicherheitszone von 2cm. Grundvoraussetzung ist hierbei jedoch die CT- oder MRT-gestützte Bestrahlungsplanung sowie der Einsatz eines Therapie-Simulators oder der virtuellen Simulation.

Wenn das gesamte Gehirn bestrahlt wird, sollten 60 Gy Gesamtdosis in Dosen von 2 Gy fünfmal pro Woche nicht überschritten werden. Patienten mit Hirndrucksymptomatik bzw. neurologischen Ausfällen werden zuvor und während der Therapie mit Kortikoiden behandelt.

Es wurde versucht, mit alternativen Fraktionierungsschemata die Ergebnisse der Strahlentherapie zu verbessern.

Unter hyperfraktionierter Bestrahlung versteht man in diesem Zusammenhang die Erhöhung der Anzahl der Einzelbestrahlungen pro Zeiteinheit im Vergleich zum bisher üblichen. In einer Untersuchung mit 20 hyperfraktioniert bestrahlten Patienten mit Grad III und IV Hirntumoren betrug die Gesamtreferenzdosis 70 Gy. Diese Dosis wurde über einen

Zeitraum von sieben Wochen in siebenzig Fraktionen von 1 Gy aufgeteilt und zweimal täglich mit einem sechsstündigen freien Intervall appliziert. In der Kontrollgruppe wurden zehn Patienten konventionell fraktioniert bestrahlt. Hinsichtlich der Wirkung auf den Tumor ergaben sich in dieser Studie keine wesentlichen Unterschiede. Jedoch wurde die hyperfraktionierte Strahlentherapie besser vertragen, so dass eine größere therapeutische Breite vermutet werden kann, welche eine Dosiserhöhung gestatten könnte (Sauer, 1998; Nieder et al., 1999).

Andere Ansätze zur Behandlung des Glioblastoms, wie Chemotherapie, Immunotherapie, Hyperthermie oder die photodynamische Therapie wurden in die experimentellen Behandlungskonzepte aufgenommen; der Nutzen bleibt allerdings umstritten, da auch hier keine Verbesserung der Überlebenszeiten erreicht werden konnte (Fine et al., 1995; Muller und Wilson, 1996).

1.3 Radiochemotherapie

Die bisher bekannt gewordenen klinischen Daten einer Kombinationstherapie aus Radiotherapie und systemischer Chemotherapie legen den Schluss nahe, dass der Effekt der Strahlentherapie nicht wesentlich gesteigert werden kann. Seit Anfang der 60er Jahre wurde begonnen die Voraussetzungen zu schaffen, um Chemotherapeutika zur Therapie zu verwenden. Die Schwierigkeit besteht darin, geeignete Chemotherapeutika zu finden. Einerseits sollen die sich teilenden Tumorzellen in der empfindlichsten Zellzyklusphase geschädigt werden, um ein weiteres Wachstum zu verhindern. Andererseits muss eine Dosis gefunden werden die das umgebende gesunde Gewebe nicht schädigt. Computertomographie und Magnetresonanztomographie ermöglichen es, eine genauere Vorstellung von der Morphologie und der Veränderung der Tumoren unter einer zugeführten Therapie zu bekommen. Es mussten

liquorgängige Zytostatika entwickelt werden, damit eine Chemotherapie an ihren Wirkort gelangen kann.

Bei den Chemotherapeutika haben vor allem die Nitrosoharnstoffe BCNU (1,3-bis(2-chlorethyl)-1-nitrosourea) in der adjuvanten Therapie einen positiven Effekt beim Glioblastom gezeigt (Fine et al., 1994). In weiteren Studien wurden Carboplatin und Cisplatin, die eine Quervernetzung der DNS Einzelstränge bewirken, das Mitosegift Vincristin und Derivate von Camptothecin, die wie Topoisomeraseinhibitoren wirken, untersucht (Matsumoto et al., 1995; Weingart et al., 1995; Lamond et al., 1996; Nakatsu et al., 1997; Balmaceda et al., 1997). Meist wird Chemotherapie in Kombination mit einer Strahlentherapie gegeben, um durch die Bestrahlung die Blut- Hirn- Schranke permeabel zu machen (Rubin et al., 1994; Glioma Meta-Analysis Trialists Group, 2002).

1.4 Chemotherapie: Zelluläre Effekte

Die verwendeten Chemotherapeutika Temodal und Gemcitabin sind in ihren Wirkweisen darauf ausgelegt die Desoxyribonukleinsäure (DNS) der Tumorzellen zu schädigen und somit ihr Wachstum zu stoppen oder durch Zelltod den Tumor zu verkleinern.

1.4.1 Temodal

Temodal ist ein Imidazolderivat, welches als Alternative zu Dacarbazine synthetisiert wurde.

Nach oraler Gabe zerfällt Temodal unter physiologischen Bedingungen spontan in seinen aktiven Metaboliten Monomethyl 5- Triazino- Imidazol- Carboxamid (MTIC). Zusätzlich benötigt Temodal keine Aktivität der Leberenzyme und seine Bioverfügbarkeit ist unabhängig von Cytochrom

P450 (Stevens et al., 1987; Tsang et al., 1991). Die Umwandlung von Temodal in seinen aktiven Metaboliten MTIC erfolgt spontan unter alkalischen Bedingungen (Newlands et al., 1997). Dieses macht es für den Einsatz bei Hirntumoren besonders interessant, da diese Gewebe normalerweise ein alkalischeres Milieu aufweisen als die sie umgebenden gesunden Gewebe (Tsang et al., 1991; Newlands et al., 1997). Das MTIC methyliert die DNS an der O6- Position des Guanins, dies stört die Funktion der Tumor- DNS und erklärt seine zytotoxischen Eigenschaften. Kann dieser Defekt durch die Alkylguanin- DNS- Alkyltransferase nicht repariert werden, wird der Tumor am Weiterwachsen gehindert oder verkleinert sich bestenfalls (Friedman et al., 1998; Britten et al., 1999; Newlands et al., 1997). Temodal passiert die Blut- Hirn- Schranke unabhängig von seiner Darreichungsform. Die Verbindung zeigte in verschiedensten Studien seine zytotoxische Aktivität gegen zahlreiche solide Tumoren und war Gegenstand in diversen Phase II Studien als Basistherapeutikum bei Hirntumoren (Newlands et al., 1996; Bower et al., 1997; Wedge et al., 1997a; 1997b).

1.4.2 Gemzitabin

Das Nukleosidanalogen Gemzitabin (2',2'-Difluordesoxycytidin) ist ein Analogon des Cytosins Arabinosid mit einer nachgewiesenen Wirksamkeit gegen verschiedenste solide Tumoren, insbesondere gegen Pankreastumoren (Rothenberg et al., 1996), und gegen das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC)(Sandler et al., 1995; Carmichael et al., 1995). Des Weiteren wurde wegen der vielversprechenden Ergebnisse Gemzitabin auch an anderen soliden Tumoren untersucht, hier insbesondere an Mammatumoren, an Ovarialtumoren und an verschiedenen Kopf- Hals- Tumoren (Kaye, 1994; Carmichael et al., 1995; Kaufmann et al., 1997). Gemzitabin ist eine so genannte pro-drug und muss zunächst durch die Desoxycytidinkinase phosphoryliert werden, um

seine zytotoxische Aktivität zu entfalten (Heinemann et al., 1988). Die entstehenden Schlüsselmetaboliten sind einerseits Difluorodeoxycytidin-Diphosphat (dFdCDP), welches die Ribonukleotidreduktase hemmt, was die Störung des Deoxyribonucleosid 5'-Triphosphat-Pools und insbesondere des Adenosintriphosphat Pools zur Folge hat (Baker et al., 1991; Shewach et al., 1994). Andererseits entsteht Difluorodeoxycytidin- Triphosphat (dFdCTP), welches die DNS-Polymerase hemmt, die notwendig ist für die Replikation der DNS, indem sie mit dCTP in Konkurrenz tritt (Huang et al., 1991; Ruiz van Haaperen, 1993). Diese und andere Untersuchungen legen nahe, dass das dFdCTP der eigentliche zytotoxische Metabolit ist, da es in Form von Difluorodeoxycytidin- Monophosphat (dFdCMP) in die DNS eingebaut werden kann. Ein anderer Mechanismus des Gemzitabins ist seine strahlensensibilisierende Wirkung. Durch die Inkubation von EMT-6 Tumorzellen mit Gemzitabin vor der Bestrahlung wurde ein additiver Effekt erzielt (Rockwell et al., 1992). Dies bedeutet, dass die Kombination zweier Therapieformen die Wirkung einer einzelnen Therapieform mehr als verdoppelt. Andere Untersuchungen an HT-29 Kolonkarzinomzellen ergaben eine Steigerung des durch Bestrahlung induzierten Zelltodes, wenn die Zellen vier Stunden vor der Bestrahlung der Behandlung mit Gemzitabin ausgesetzt waren (Shewach et al., 1994).

1.5 Bestrahlung: Zelluläre Effekte

Der Angriffspunkt der Bestrahlung einer Tumorzelle ist die Desoxyribonukleinsäure (DNS) des Zellkernes. Des Weiteren erfolgen Schädigungen der Kernmembran sowie Veränderungen an den Zellorganellen und der Zellmembran, wodurch der Eiweiß- und Kohlenhydratstoffwechsel werden.

An der DNS entstehen vor allem Einzel- und Doppelstrangbrüche, fehlerhafte Verbindungen innerhalb der DNS oder mit anderen Molekülen sowie Schäden an den Basen. Da auf der DNS einer Zelle ihre gesamte

Erbinformation gespeichert ist, bedient sich die Zelle vielfältiger enzymgesteuerter Prozesse, z.B. Ligasen und Nukleasen, um molekulare Schäden an der DNS zu reparieren (Gutin et al., 1977).

Aus radiobiologischer Sicht ist der entscheidende Mechanismus, um Tumorzellen am Weiterwachsen zu hindern, der klonogene Zelltod. Klonogen sind die Zellen, die das Potenzial besitzen, mehrere Zellteilungen zu durchlaufen und dabei Kolonien von mindestens 50 Tochterzellen zu bilden. Tumorzellen sind Zellen, die unbegrenzt teilungsfähig sind und somit erst dann nicht mehr gefährlich sind, wenn sie die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilungsfähigkeit verloren haben. Durch die Bestrahlung oder Chemotherapie können Zellen die Fähigkeit Kolonien zu bilden verlieren. Das wird als reproduktiver Zelltod bezeichnet.

Es ist bekannt, dass mehrere Ursachen dafür verantwortlich sein können, dass Zellen diese Fähigkeit verlieren. Die wichtigste Ursache in diesem Zusammenhang ist der Mitosetod. Nach Bestrahlung sterben die Zellen nicht sofort, sondern können noch eine oder mehrere Mitosen durchlaufen, bevor die zugefügten Chromosomenschäden dazu führen, dass die Zelle sich nicht mehr teilen kann. Dies gilt für fast alle Normalgewebe und die meisten Tumorzellen.

Der Interphasetod bezeichnet den Vorgang, dass die Zellen, ohne noch eine Mitosephase zu durchlaufen, durch ein früh einsetzendes Apoptoseprogramm sterben. Diese Form des Zelltodes betrifft zum Beispiel Lymphozyten, Speicheldrüsen- und andere Säugerzellen nach höheren Strahlendosen (> 10 Gy).

Eine weitere Möglichkeit ist die beschleunigte oder induzierte Differenzierung. Es entstehen aus den klonogenen Zellen solche Zellen, die die Fähigkeit zur Zellteilung verloren haben oder nach wenigen Teilungen die Fähigkeit dazu verlieren (Herrmann et al., 1996).

1.6 Multizelluläre Sphäroide als *in vivo* Modell

Das Glioblastoma multiforme zeichnet sich durch sein infiltratives Wachstum und seine unkontrollierte Zellproliferation aus (Allam et al., 1993). Um die Mechanismen zu verstehen, die diesen charakteristischen Eigenschaften zugrunde liegen, wurden zunehmend Gewebekulturen als Modell verwendet. Viele Jahre wurden Untersuchungen in der Krebsforschung an Tumorzelllinien gemacht, die als Monolayer gezüchtet wurden. Auch wenn diese *in vitro* Zellmodelle viele wertvolle Informationen, zum Beispiel über das Wachstum von Tumorzellen lieferten, sind sie ungeeignet Tumoren in ihrem *in vivo* Verhalten darzustellen (Dertinger und Hülser, 1984).

Wichtig ist es, sich klarzumachen, dass solide Tumoren dreidimensional wachsen und dass in diesen Tumoren die Verteilung von Sauerstoff und Nährstoffen nicht überall gleich ist. Aus der unterschiedlichen Beschaffenheit verschiedener Regionen eines Tumors wird seine Heterogenität deutlich. Zum Beispiel wird in den Tumorarealen, in denen das Sauerstoff- und Nährstoffangebot schlecht ist, sich eher eine Nekrosezone entwickeln. In allen zweidimensionalen Tumormodellen sind jedoch alle Zellen dem gleichen Sauerstoffangebot und Nährstoffangebot ausgesetzt, so dass nicht alle Aspekte der Tumorbiologie erfasst werden können. Die großen Unterschiede bei der Reaktion auf Bestrahlung oder Chemotherapie von Monolayer- Zellkulturen einerseits oder Tumoren *in vivo* andererseits, begründen sich darauf, dass die räumliche Verteilung und die Zell-zu-Zell- Kontakte unterschiedlich sind. Um geeignetere Modelle herzustellen, die die dreidimensionale Anordnung von Tumorzellen repräsentieren können, wurden Tumor- Sphäroide entwickelt. Tatsächlich können Sphäroide das dreidimensionale Wachstum sowie die Organisationsstrukturen innerhalb eines Tumors sehr realistisch darstellen. Sie geben ein besseres Bild davon, wie die Zell-Zell- Kontakte aussehen und wie sich das Mikromilieu von Tumoren gestaltet. Außerdem können viele verschiedene Zellarten in der Gewebekultur zu Sphäroiden herangezüchtet werden (Santini und Rainaldi, 1999).

Durch die Ausprägung von Zelladhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche und der Ausbildung von tight- junctions zwischen den Zellen eines Sphäroids besteht ein sehr enger Zell-zu-Zell-Kontakt. Tight junctions sind schmale Bänder aus Membranproteinen, die einen sehr engen Kontakt zwischen zwei benachbarten Zellen herstellen, so eine Diffusionsbarriere bilden und den parazellulären Transport von Proteinen kontrollieren. Die als Sphäroide wachsenden Tumorzellen sind bezüglich des Proliferationsverhaltens, des Vorkommens ruhender Zellen sowie der Ausbildung nekrotischer Areale den entsprechenden Tumoren *in vivo* sehr ähnlich (Carlsson et al., 1983a).

Man nimmt an, dass einer der Gründe für die Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika ist, dass die im Zentrum von *in vivo* Tumoren liegenden Zellen sich in einem sauerstoff- und nährstoffarmen Milieu befinden und von Chemotherapeutika und Bestrahlung schlechter erreicht werden. Somit war es von großer Bedeutung ein geeignetes Modell zu finden, das diese Situation repräsentiert. Die Mechanismen, die für die Resistenzen verantwortlich zu sein scheinen, sind in zweidimensionalen Modellen nicht zu finden (Kaaijk et al. 1997). Durand und Sutherland zeigten, dass der relative Sauerstoffmangel und die besseren Zell-zu-Zell-Kontakte verantwortlich für die größere Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie von Sphäroiden im Vergleich zu Zelllinien, die als Monolayer wachsen, sind (Durand und Sutherland, 1984a). Eine der wichtigsten Eigenschaften, in denen die Sphäroide *in vivo* Tumoren gleichen, sind die uneinheitliche Verteilung der Zellen in der dreidimensionalen Form und der Aufbau, der dem eines Tumors ähnelt. In den äußeren Lagen sind die Zellen noch voneinander getrennt und in der Lage sich zu teilen. Tiefer liegende Zellen sind nicht mehr teilungsfähig, und im Zentrum eines Sphäroids entsteht eine Nekrosezone, die ebenfalls in ihrer Dicke variabel ist (Kerbel et al., 1994b; Carlsson 1977b; Carlsson et al., 1984; Haji- Karim et al., 1978; Kwok et al., 1985). Auch unterscheidet sich die Genexpression der in Sphäroiden gezüchteten Tumorzellen von der in Monolayer- Kultur gezüchteter. Am Beispiel von Kolontumoren wurde herausgefunden, dass Zellen, die zu Sphäroiden kultiviert wurden, einige

Gene, die für Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren kodiert werden, von Zellen, die zu Monolayern herangezüchtet werden, gar nicht exprimiert werden (Miller et al, 1989). Das Vorhandensein einer Nekrosezone ist anscheinend abhängig von ihrer Größe und von dem Ursprungsgewebe aus dem die Sphäroide gezüchtet werden. Sphäroide aus Mäusezellen haben häufiger eine Nekrosezone als Sphäroide von menschlichen Zellen, und Sphäroide, die aus strahlenresistenten Ursprungszellen angezüchtet werden haben häufiger eine Nekrosezone als Sphäroide, die aus strahlensensiblen Ursprungszellen gezüchtet werden. Möglicherweise liegt die Ursache in dem Nährstoffangebot und Sauerstoffangebot über das die Zellen in der Peripherie verfügen können. Aus diesem Grund wachsen die Sphäroide von der Peripherie aus. Vielleicht erklärt die uneinheitliche Struktur der Sphäroide auch das verschiedenartige Ansprechen auf die verschiedenen Therapieformen, was man auch von Tumoren kennt, die in ihrer Struktur eben auch nicht homogen sind (Olive et al, 1997; Chignola et al, 1995; Sutherland, 1988). Die heterogene Verteilung der Zellen entspricht der Verteilung verschiedenster Nährstoffe, Sauerstoff, Hormone, Wachstumsfaktoren und Protonen und damit auch dem pH- Wert (Sutherland 1986a, 1986b; Casciari et al., 1992). Man weiß inzwischen, dass die periphere Zellschicht umso dünner ist, je saurer der pH- Wert des Kerns ist, oder je mehr Glukose sich in dem umgebenden Medium befindet (Tannock et al., 1986a, 1986b). Ein weiterer Erklärungsansatz für die Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie ist die mangelnde Sauerstoffversorgung des Sphäroidzentrums (Wilson et al., 1989; Durand, 1983).

1.7. Fragestellung

Die Kombination von Bestrahlung und Chemotherapie ist bei verschiedenen soliden Tumoren ein verbreitetes Therapiekonzept. Für das Glioblastom wird der Einsatz von Chemotherapie zusätzlich zur Strahlentherapie kontrovers diskutiert.

Seit einigen Jahren werden für die Untersuchungen der Wirkungen von Chemotherapie oder Bestrahlung vermehrt Sphäroide eingesetzt, da Sphäroide bezüglich der Zellproliferation und der Ausbildung nekrotischer Areale ähnlich heterogen wie die entsprechenden Tumoren *in vivo* wachsen.

Es gibt nur wenige Arbeiten, die die Wirkung von Radiochemotherapie an Sphäroiden untersuchen. Ziel dieser Arbeit war es, die *in vitro* Effekte auf das Proliferations- und Migrationsverhalten maligner Glioblastomsphäroide nach Strahlensensibilisierung zu untersuchen.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss hat eine Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten von Glioblastomsphäroiden, welche mit Temodal behandelt wurden?
2. Welchen Einfluss hat eine Bestrahlung auf das Proliferationsverhalten von Glioblastomsphäroiden, welche mit Gemzitabin behandelt wurden?
3. Wie verändert sich die Migration von Glioblastomsphäroiden, welche mit Temodal behandelt wurden, nach einer Bestrahlung?
4. Wie verändert sich die Migration von Glioblastomsphäroiden, welche mit Gemzitabin behandelt wurden, nach einer Bestrahlung?

2 Material und Methoden

2.1 Humane Glioblastomzelllinien

Zur Untersuchung des Einflusses von Chemotherapie und Bestrahlung wurden zwei unterschiedliche humane Glioblastomzelllinien verwendet. Die Zelllinie GaMg (Passage 79) wurde uns freundlicherweise vom Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Bergen, von Herrn Professor Bjerkvig zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie stammt von einem menschlichen Glioblastoma multiforme ab (Akslen, 1988). Die andere Zelllinie U87 (Passage 84) ist uns freundlicherweise von Professor Carlson der Universität Uppsala, Schweden, überlassen worden. Auch diese Zelllinie stammt von einem humanen Glioblastoma multiforme ab. Die beiden Zelllinien wurden in 80cm² Zellkulturflaschen der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) und mit einem modifizierten Standard-Kulturmedium kultiviert. Als Basismedium wurde das Minimalmedium nach Dulbecco (Dulbecco's modification of Eagle's medium, DMEM, GIBCO, Life Technologies, England) verwendet. Diesem wurde 10% hitzeinaktiviertes Kälberserum, 2% L-Glutamin, Penicillin (100U/ml), Streptomycin (100µg/ml) (alle Reagenzien erhalten von Whittaker Bioproducts, Wakersville, USA) sowie die vierfache Menge nicht essentieller Aminosäuren (Flow Laboratories, Irvine, Schottland) hinzugegeben.

Die Zellkulturen wurden in einem Standard-Inkubator (100% Luftfeuchtigkeit, 95% Luft und 5% CO₂) bei 37°Celsius als Monolayer gezüchtet. Das Wachstum wurde mittels eines Phasenkontrastmikroskops kontrolliert und je nach Bedarf das Kulturmedium gewechselt. Sobald der Boden der Kulturflaschen gleichmäßig mit Zellen bedeckt war, konnte die Zelllinie trypsinisiert werden. Dazu wurde dem Medium 0,025% Trypsin (Wittaker Bioproducts, Wakersville, USA) zugefügt, und die trypsinisierten Zellen wurden auf mehrere neue Flaschen ausgesetzt.

2.2 Sphäroide als Tumormodell

Multizelluläre Tumor- Sphäroide sind ein dreidimensionales Zellmodell, an dem Eigenschaften wie das Wachstumsverhalten und zelluläre Organisationsstrukturen besser verdeutlicht werden können als an jedem anderen Zell- Modell *in vitro* (Sutherland et al., 1971a; Mueller-Klieser 1987).

Wir verwendeten die Liquid- Overlay- Technik nach Carlsson und Yuhas (Carlsson und Yuhas, 1984). Hierzu wurden 80cm²-Zellkulturflaschen der Firma Nunc (Roskilde, Dänemark) mit Agar (Dicfo Agar Noble, Detroit, Michigan, USA) beschichtet. Auf den Agar wurden 20ml von dem angereicherten Kulturmedium gegeben und 5×10^6 Zellen hinzugegeben. Da die Zellen aufgrund der Beschichtung nicht am Boden der Kulturflaschen festwachsen können, bilden sie kleine Zellkolonien aus. Wenn die Zellmassen zu gleichmäßigen, runden, regelmäßigen Sphäroiden gewachsen waren, wurden sie in saubere, ebenfalls mit Agar und Kulturmedium befüllte Kulturflaschen umgesetzt. Für die Experimente wurden Sphäroide mit einem Durchmesser von ca. 250-300µm ausgewählt. Diese Größe wurde nach acht bis zwölf Tagen erreicht.

2.3 Voruntersuchungen

Es wurden zunächst Dosisfindungsexperimente mit Temodal und Gemcitabin durchgeführt. Dazu wurden die herangezüchteten Sphäroide mit sechs verschiedenen Konzentrationen Gemcitabin und sechs verschiedenen Konzentrationen Temodal über 24 Stunden inkubiert. Im weiteren Verlauf wurde über 18 Tage das Wachstum gemessen. Die drei Konzentrationen des jeweiligen Chemotherapeutikums, die nach 18 Tagen eine Verringerung des Wachstums um ungefähr 50% erreichen konnten, wurden im weiteren Verlauf für die Experimente herangezogen. Sphäroide der Zelllinie U87 reagieren generell empfindlicher auf eine Behandlung mit

Chemotherapeutika als Sphäroide der Zelllinie GaMg (Guenther et al., 2003). Um dies zu berücksichtigen und um dennoch vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurden schließlich Dosen gewählt, die einerseits hoch genug waren um einen Effekt auf die GaMg Sphäroide zu erreichen und andererseits die U87 Sphäroide nicht schon durch eine alleinige Gabe eines Chemotherapeutikums am Weiterwachsen zu hindern.

Auch für die Bestrahlungsdosen wurden Dosisfindungsexperimente durchgeführt. Die herangezüchteten Sphäroide beider Zelllinien wurden mit Dosen von 2, 5 und 10 Gy bestrahlt, und im Verlauf wurde über 18 Tage das Wachstum gemessen. Es zeigte sich hierbei ein dosisabhängiger Verlauf des Wachstums.

Die GaMg Sphäroide tolerierten eine Dosis von 10 Gy. Durch die alleinige Bestrahlung mit 10 Gy ergab sich eine deutliche Verzögerung des Wachstums im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrolle, die auch noch eine Kombinationsbehandlung zuließ. Hingegen tolerierten die U87 Sphäroide eine Dosis von 10 Gy nicht, das Wachstum wurde eingestellt.

5 Gy bewirkten eine Wachstumshemmung, die auch noch eine Kombinationsbehandlung zuließ.

2.4 Behandlungsgruppen

Für die einzelnen Experimente wurden verschiedene Behandlungsgruppen gebildet. Zunächst wurden sowohl die GaMg Sphäroide als auch die U87 Sphäroide wie unter 2.2 beschrieben herangezüchtet.

Nachdem die GaMg Sphäroide ihre Ausgangsgröße erreicht hatten, wurden sie auf vier verschiedene Kulturflaschen aufgeteilt. Drei der Kulturflaschen enthielten die jeweilige Konzentration von 0,05mmol Gemzitabin, 0,01mmol Gemzitabin oder 0,5µmol Gemzitabin, die Kontrolle wurde in unverändertes Kulturmedium umgesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide aus jeweils einer Kulturflasche auf zwei 24-Loch-Platten ausgesetzt, von denen dann eine der Bestrahlung zugeführt wurde.

Auf diese Weise entstanden acht 24-Loch-Platten die für den Beobachtungszeitraum im Brutschrank aufbewahrt wurden. Die GaMg Sphäroide wurden mit 10 Gy bestrahlt.

Zur Untersuchung des Einflusses von Temodal auf das Migrations- und Proliferationsverhalten wurden die GaMg Sphäroide ebenfalls auf vier Kulturflaschen aufgeteilt, von denen drei mit 5µmol, 0,025mmol oder 0,05mmol Temodal inkubiert wurden. Die Kontrollgruppe erhielt unverändertes Kulturmedium. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide auf die acht 24-Loch-Platten ausgesetzt. Die 24-Loch-Platten wurden entsprechend markiert und die vier Gruppen, die eine Kombinationsbehandlung erhalten sollten, wurden dem Linearbeschleuniger zugeführt.

Auch die Sphäroide der Zelllinie U87 wurden zunächst alle unter den gleichen Bedingungen angezüchtet. Nachdem sie die entsprechende Größe erreicht hatten, wurden sie in vier kleinere Kulturgefäße mit entsprechend weniger Kulturmedium umgesetzt. Für die Dauer der Inkubation wurde den einzelnen Gruppen jeweils 0,05mmol Gemcitabin, 0,01mmol Gemcitabin oder 0,5µmol Gemcitabin hinzugegeben, die Kontrolle erhielt unverändertes Kulturmedium. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide auf die entsprechend markierten 24-Loch-Platten ausgesetzt und die vier Gruppen, die eine Kombinationsbehandlung erhielten, wurden mit 5 Gy bestrahlt.

Für die Untersuchung des Einflusses von Temodal wurden die U87 Sphäroide ebenfalls in vier kleinere Kulturflaschen umgesetzt und mit 5µmol, 0,025mmol oder 0,05mmol Temodal inkubiert. Auch hier erhielt die Kontrollgruppe unverändertes Kulturmedium. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide auf entsprechend markierten 24-Loch-Platten umgesetzt und die vier Gruppen, die eine Kombinationsbehandlung erhielten, mit 5 Gy bestrahlt.

Alle Experimente wurden dreimal wiederholt.

2.5 Inkubation und Bestrahlung

Nachdem die Zelllinien wie unter 2.2 beschrieben, zu Sphäroiden kultiviert worden waren, wurden die Sphäroide unter Zuhilfenahme eines Stereomikroskops ausgewählt und einzeln mit einer Pasteur- Pipette auf 24-Loch-Platten (Nunc, Roskilde, Dänemark) ausgesetzt. Die im Durchmesser 16mm betragenden Vertiefungen wurden für die Proliferationsexperimente mit 0,5ml Agar (Difco Agar Noble Detroit, Michigan USA) befüllt. Den Sphäroiden wurde 1ml Kulturmedium hinzugegeben und dieses regelmäßig gewechselt. Für die Untersuchung der Migration wurden die 24-Loch-Platten nicht mit Agar befüllt, damit die Sphäroide am Boden der Platte vom Zentrum des Sphäroids wegmigrieren konnten. Diesen Sphäroiden wurde ebenfalls jeweils 1ml Kulturmedium hinzugegeben und die 24-Loch-Platten wurden im Brutschrank aufbewahrt.

2.5.1 Inkubation mit Gemzitabin

Das Gemzitabin wurde uns freundlicherweise von der deutschen Niederlassung der Firma Lilly (Bad Homburg) zur Verfügung gestellt. Es wurden mit dem Kulturmedium die drei verschiedenen Konzentrationen von Gemzitabin hergestellt. Die entsprechende Verdünnung des Gemzitabin wurde jeweils in 40cm² große Kulturflaschen abgefüllt. Danach wurden die Sphäroide mit Hilfe einer Pasteur- Pipette auf die Kulturflaschen verteilt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide mittels einer Pasteur- Pipette unter einem Stereomikroskop ausgewählt und einzeln auf die 24-Loch-Platten übertragen.

2.5.2 Inkubation mit Temodal

Das Temodal wurde von der Firma Essex Pharma (München) erworben. Temodal wurde in Kulturmedium aufgelöst und zu den drei verschiedenen Konzentrationen verdünnt. Anschließend wurde das Temodal auf drei verschiedene 40cm² große Kulturflaschen verteilt. Nachdem die Sphäroide ihre Ausgangsgröße erreicht hatten, wurden sie zusammen mit Hilfe einer Pasteur- Pipette auf die entsprechenden Kulturflaschen verteilt und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für die Kontrollexperimente wurde den Sphäroiden lediglich Kulturmedium hinzugegeben. Nach 24- stündiger Inkubation wurden die Sphäroide mittels einer Pasteur- Pipette unter einem Stereomikroskop ausgewählt und einzeln auf die 24-Loch-Platten übertragen.

2.5.3 Bestrahlung

Nach der Inkubation für 24 Stunden mit den verschiedenen Konzentrationen von Temodal bzw. Gemcitabin wurden die Sphäroide bestrahlt. Dazu wurden jeweils eine Kontrollgruppe, die nicht mit einem der beiden Chemotherapeutika inkubiert worden war, sowie die drei Gruppen mit den entsprechenden Dosen des jeweiligen Chemotherapeutikums der Bestrahlung zugeführt.

Die Sphäroide wurden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Pasteur- Pipette auf entsprechend markierte 24-Loch-Platten ausgesetzt. Die Bestrahlungsgruppen wurden dann dem Linearbeschleuniger zugeführt und mit den verschiedenen Dosen bestrahlt. Die Sphäroide, die keine Bestrahlung erhielten, wurden auf die 24-Loch-Platten ausgesetzt und in den Brutschrank gestellt. Auf diese Weise entstanden pro Chemotherapeutikum und pro Zelllinie acht 24-Loch-Platten.

Für die Bestrahlung wurden die 24-Loch-Platten aus dem Inkubator genommen und auf den Bestrahlungstisch des Linearbeschleunigers

gelegt. Das Bestrahlungsfeld hat einen Durchmesser von 35x35cm, so dass vier Platten auf dem Bestrahlungstisch Platz haben.

Der Linearbeschleuniger arbeitet mit einer Energieleistung von 10 Megaelektronenvolt. Die 24-Loch-Platten wurden mit verschiedenen hohen Energiedosen bestrahlt. Dazu wurden die Sphäroide in verschiedene Gruppen eingeteilt. Es wurde immer eine Vergleichsgruppe, die keine Chemotherapie erhalten hatte, mitbestrahlt. Die Bestrahlungsdosen betragen 5 Gy für die U87 Sphäroide und 10 Gy für die GaMg Sphäroide. Die Bestrahlung erfolgte immer nach abgeschlossener Inkubation, also nach 24 Stunden und wurde als Einmaldosis appliziert. Anschließend wurden die orthogonalen Durchmesser der einzelnen Sphäroide unter einem Phasenkontrastmikroskop mit Hilfe einer mm-Skala gemessen, um einen Ausgangswert für das weitere Wachstum zu erhalten. Im Folgenden wurde die Größenzunahme der Sphäroide täglich gemessen.

2.6 Proliferationsexperimente

Für die Proliferationsexperimente wurden die Sphäroide nach der Liquid-Overlay- Technik angezüchtet und in die verschiedenen Gruppen, wie unter 2.5 beschrieben, eingeteilt. Jeweils eine Behandlungsgruppe wurde mit einer bestimmten Menge Gemzitabin oder Temodal inkubiert und jeweils eine der beiden Gruppen wurde bestrahlt. Somit entstanden pro Zelllinie und pro Chemotherapeutikum vier Gruppen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Sphäroide mit Hilfe der Pasteur- Pipette auf 24-Loch-Platten, welche mit Agar ausgegossen worden waren, ausgesetzt. Den einzelnen Sphäroiden wurde jeweils 1 ml Kulturmedium hinzugegeben. Im weiteren Verlauf wurde über 18 Tage, mittels des Phasenkontrastmikroskops, ihre Volumenzunahme gemessen.

Für die Auswertung wurden die maximalen Diameter gemessen und mittels folgender Formel die Volumina berechnet:

$$\frac{4}{3}\pi \left(\frac{D1+D2}{4}\right)^3$$

Dabei sind D1 und D2 die maximalen Diameter des jeweiligen Sphäroids im Querdurchmesser.

Anhand dieser errechneten Daten konnten Tabellen erstellt und die errechneten Daten in Diagramme umgewandelt werden.

Um die Ergebnisse besser beschreiben zu können, wurde die Wachstumsverzögerung gemessen. Die Wachstumsverzögerung beschreibt die Zeit der Volumenzunahme eines Sphäroids um ein Fünffaches, bezogen auf die Zeit der Kontrollgruppe. Konnte eine Behandlungsgruppe innerhalb der Nachbeobachtungszeit (18 Tage) dieses Volumen nicht erreichen, wurde die Wachstumsverzögerung mit > 18 Tagen angegeben.

2.7 Migrationsexperimente

Für die Migrationsexperimente wurden die Sphäroide, nachdem sie die geeignete Größe erreicht hatten, wieder in die entsprechenden Behandlungsgruppen, wie unter 2.5 beschrieben, aufgeteilt. Die Sphäroide wurden mit Hilfe einer Pasteur- Pipette in die jeweiligen Kulturflaschen, die die entsprechende Menge des jeweiligen Chemotherapeutikums enthielten, gegeben. Die Kontrollgruppe wurde in eine Kulturflasche mit frischem Nährmedium gegeben. Alle Kulturflaschen kamen für 24 Stunden in den Brutschrank. Nach 24 Stunden wurden die Sphäroide unter einem Phasenkontrastmikroskop ausgesucht und mit Hilfe einer Pasteur- Pipette auf die 24-Loch-Platten ausgesetzt. Auch hier wurde jedem Sphäroid 1ml Kulturmedium hinzugegeben. Die Sphäroide hafteten jetzt an der Unterfläche der 24-Loch-Platte, und die Zellen begannen kreisförmig von ihrer initialen Position wegzuwandern. Es wurde im Verlauf von vier Tagen die Fläche gemessen, die durch von dem Sphäroid wegwandernde

Tumorzellen bedeckt wurde. Die Fläche, die die Zellen maximal bedeckten, wurde als Indikator für die Fähigkeit zur Migration verwendet (Terzis et al., 1997). Die orthogonalen Durchmesser dieser Zone wurden im Verlauf von vier Tagen gemessen und die Fläche mit Hilfe einer mathematischen Formel berechnet.

Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde die Reduktion der Fläche im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle errechnet. Dabei wurde der Wert, den die Kontrolle nach vier Tagen erreichte, als 100% gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsverhalten

3.1.1 Proliferation nach Inkubation mit Gemcitabin

In der Abbildung 1A ist das Volumen der GaMg Sphäroide im Verlauf über 18 Tage nach Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen Gemcitabin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Die Sphäroide zeigten ein exponentielles Wachstum. Dieser Abbildung ist der Effekt einer alleinigen Behandlung der Sphäroide mit Gemcitabin ohne Bestrahlung zu entnehmen. Bei den unbehandelten Sphäroiden zeigte sich erwartungsgemäß eine deutlich schnellere Größenzunahme als bei den Sphäroiden, die mit Gemcitabin inkubiert worden waren. Diese Größenzunahme war abhängig von der Konzentration des applizierten Chemotherapeutikums.

Bei den U87 Sphäroiden zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die Sphäroide der Zelllinie U87 zeigten im Vergleich zu den GaMg Sphäroiden ein geringeres Volumen. Dies galt sowohl für die Behandlungsgruppen als auch für die unbehandelte Kontrolle. In der Abbildung 1B ist das Wachstum der U87 Sphäroide als unbehandelte Kontrolle im Vergleich zu den Behandlungsgruppen mit den verschiedenen Gemcitabinkonzentrationen dargestellt. Es fand sich auch hier eine konzentrationsabhängige Verzögerung des Wachstums in Abhängigkeit von der Menge der Gemcitabinapplikation.

Die Wachstumsverzögerung betrug bei den GaMg Sphäroiden für 0,5µmol Gemcitabin zwei Tage, für 0,01mmol Gemcitabin sechs Tage und für 0,05mmol Gemcitabin 11 Tage. Bei den U87 Sphäroiden wurde eine längere Verzögerung des Wachstums mit Gemcitabin erreicht. Hier wurde für 0,5µmol Gemcitabin eine Wachstumsverzögerung von sechs Tagen, für

0,01mmol Gemzitabin von 11 Tagen und für 0,05mmol Gemzitabin von mehr als 18 Tagen gefunden.

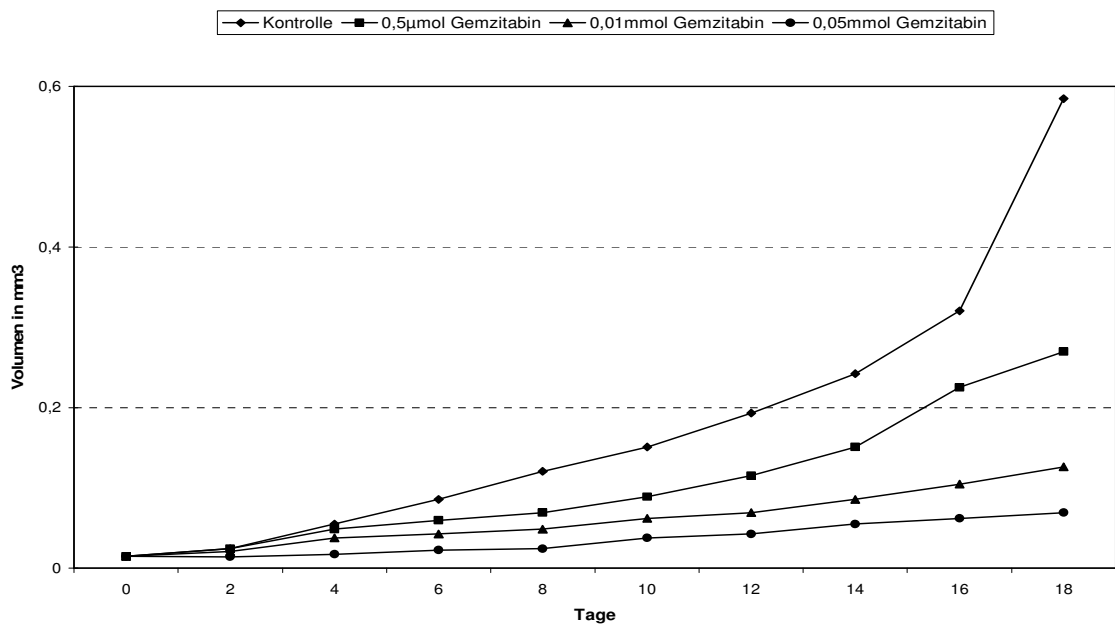


Abb. 1A: Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Sphäroide in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen Gemzitabin

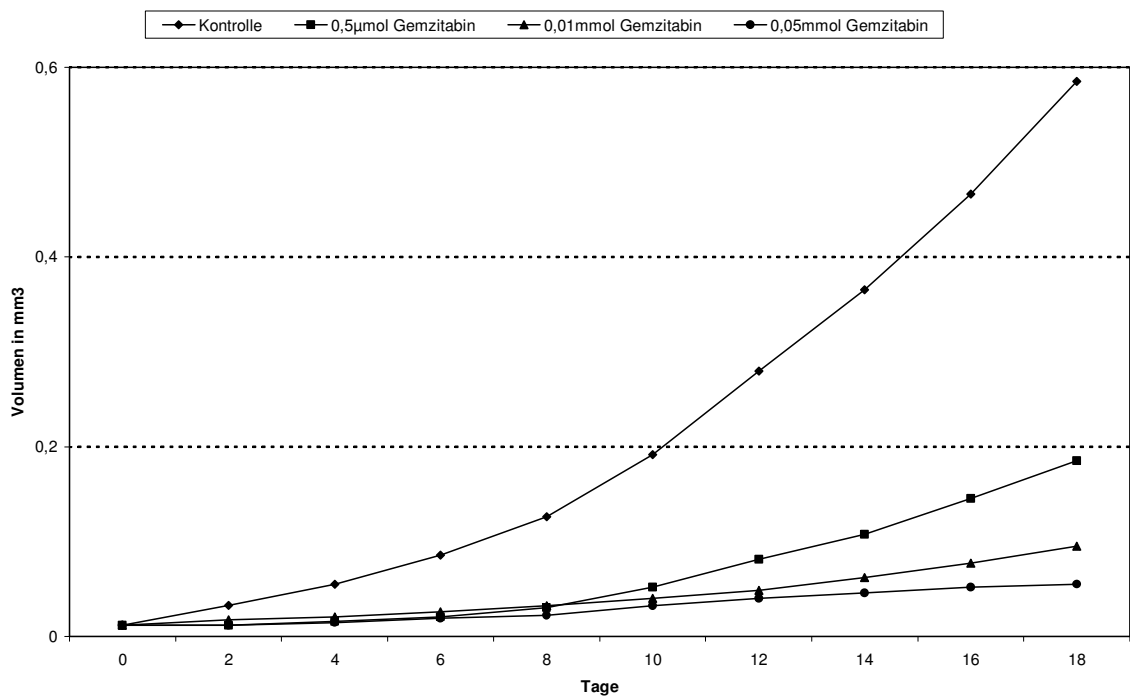


Abb. 1B: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen Gemzitabin

3.1.2 Proliferation nach Inkubation mit Gemzitabin und Bestrahlung

In den Abbildungen 2A - 2C ist der Effekt verschiedener Konzentrationen Gemzitabin, Gemzitabin und Bestrahlung sowie Bestrahlung ohne Gemzitabin auf die Proliferation der GaMg Sphäroide im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Der größte Effekt auf die Verzögerung des Wachstums ergab sich bei einer Konzentration von 0,05mmol Gemzitabin, in der Kombination war der Effekt als additiv zu werten. Es zeigte sich eine Wachstumsverzögerung von drei Tagen durch alleinige Bestrahlung, eine Wachstumsverzögerung von mehr als 18 Tagen bei den mit Gemzitabin inkubierten Sphäroiden und ebenfalls eine Wachstumsverzögerung von mehr als 18 Tagen bei den Sphäroiden mit der Kombinationsbehandlung. Bei einer Konzentration von 0,01mmol Gemzitabin (Abb. 2B) fand sich eine Wachstumsverzögerung von zwei Tagen für die alleinige Bestrahlung, sechs Tagen für eine Gemzitabinkonzentration von 0,01mmol und 12 Tagen für die Kombination aus Gemzitabin und Bestrahlung. In der Behandlungsgruppe mit 0,5 μ mol Gemzitabin ließ sich eine Wachstumsverzögerung von zwei Tagen für die alleinige Bestrahlung, drei Tagen für die Gemzitabinkonzentration von 0,5 μ mol und sechs Tagen für die Kombinationsbehandlung feststellen.

In den Abbildungen 2D - 2F ist der Effekt verschiedener Konzentrationen Gemzitabin, Gemzitabin und Bestrahlung, sowie Bestrahlung ohne Gemzitabin auf die Proliferation der U87 Sphäroide im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Auch bei den U87 Sphäroiden zeigte sich eine konzentrationsabhängige Wachstumsverzögerung, die von der Größe der Gemzitabinkonzentration abhing. Es zeigte sich die größte Verzögerung des Wachstums auch hier für die größte Konzentration Gemzitabin (mehr als 18 Tage, auch schon für 0,05mmol Gemzitabin alleine). Auffallend war, dass die U87 Sphäroide insgesamt wesentlich empfindlicher auf eine Behandlung reagierten. In der Abbildung 2E fand sich eine Wachstumsverzögerung durch 0,01mmol Gemzitabin von 12 Tagen, für die Kombinationsbehandlung waren es mehr als 18 Tage. Insgesamt fiel auf, dass die U87 Sphäroide auch mit einer größeren

Wachstumsverzögerung auf die alleinige Bestrahlung reagierten. Bei den GaMg Sphäroiden fand sich eine Wachstumsverzögerung durch eine alleinige Bestrahlung von zwei bis drei Tagen, hingegen bei den U87 Sphäroiden von lediglich fünf Tagen.

Auch wenn jede Therapieform für sich schon einen Effekt zeigte, fand man in der Kombinationstherapie einen Effekt, der als additiv zu werten war.

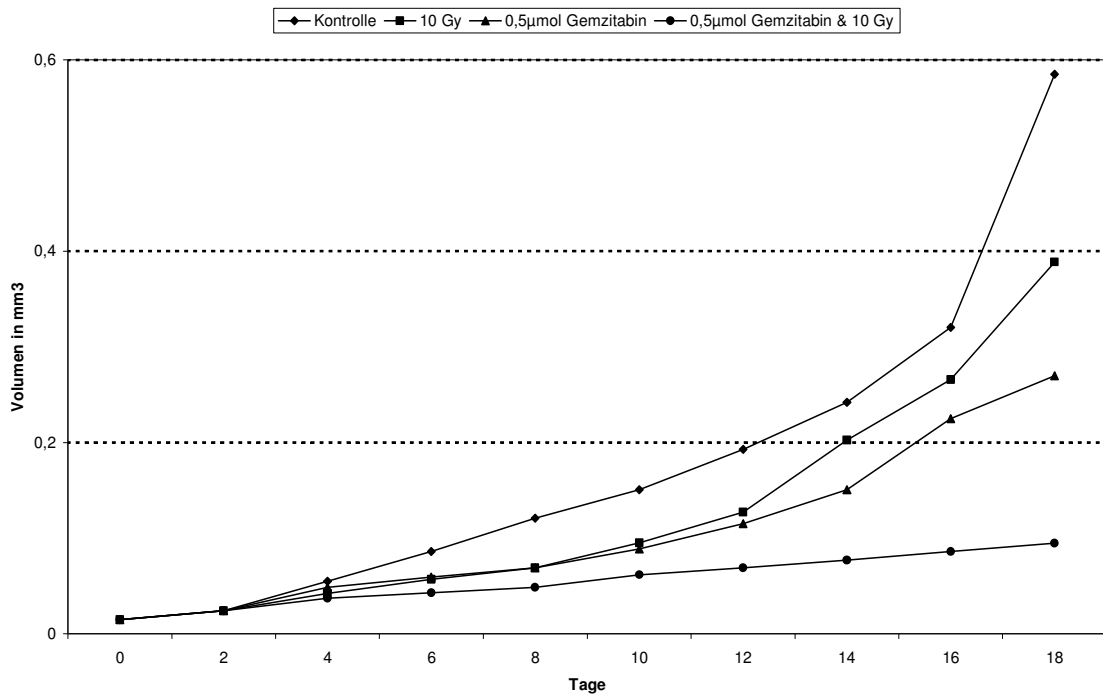


Abb. 2A: Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,5µmol Gemzitabin und nachfolgender Bestrahlung

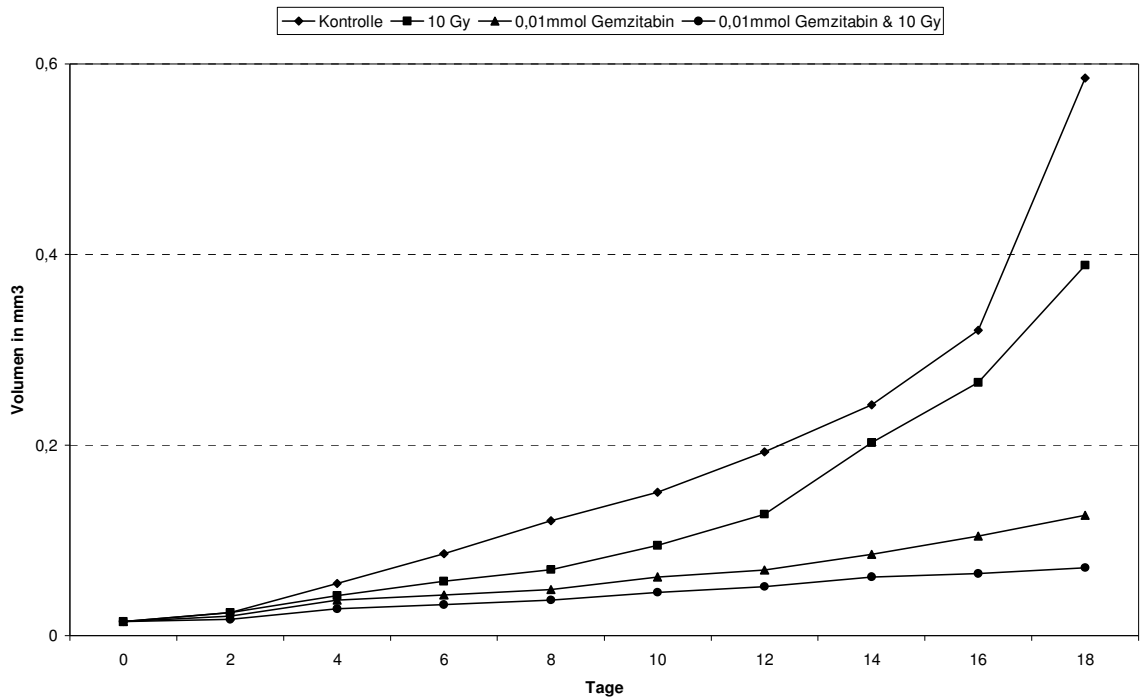


Abb. 2B: Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Spheroide nach Inkubation mit 0,01mmol Gemzitabin und nachfolgender Bestrahlung

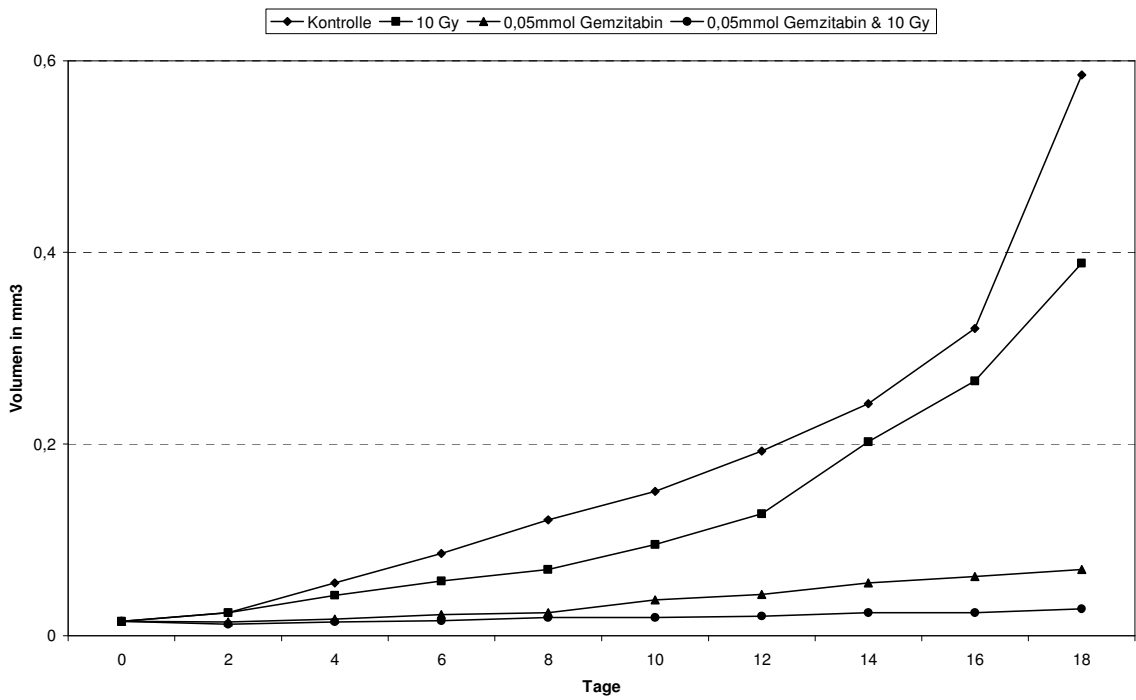


Abb.2C Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Spheroide nach Inkubation mit 0,05mmol Gemzitabin und nachfolgender Bestrahlung

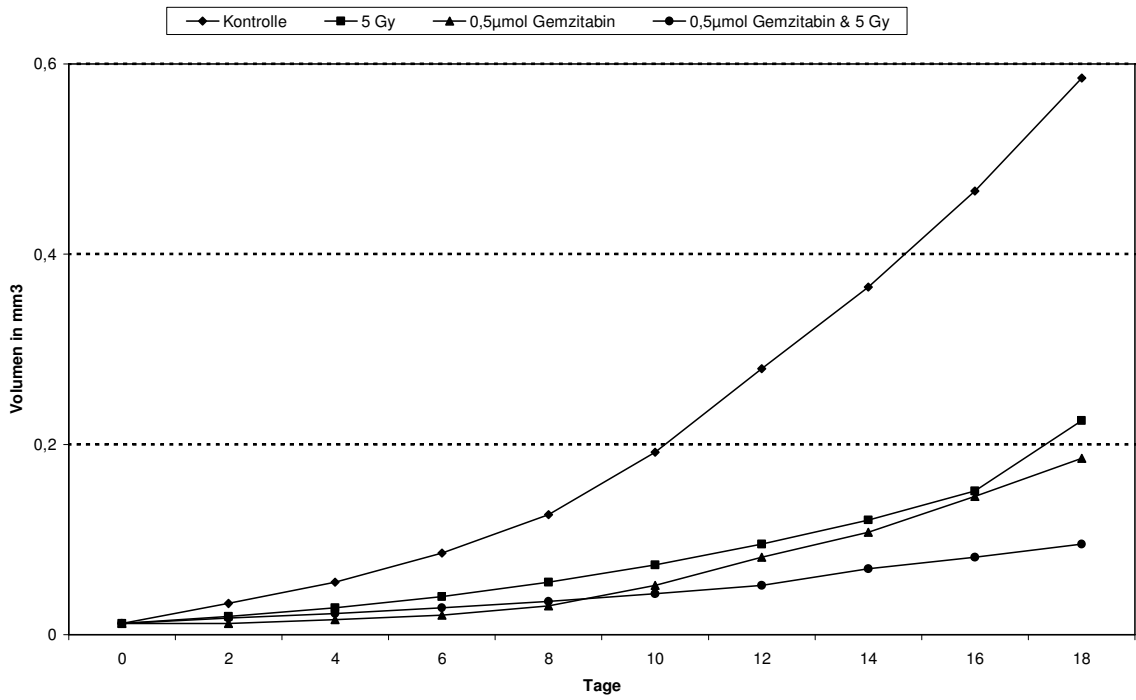


Abb. 2D: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,5μmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

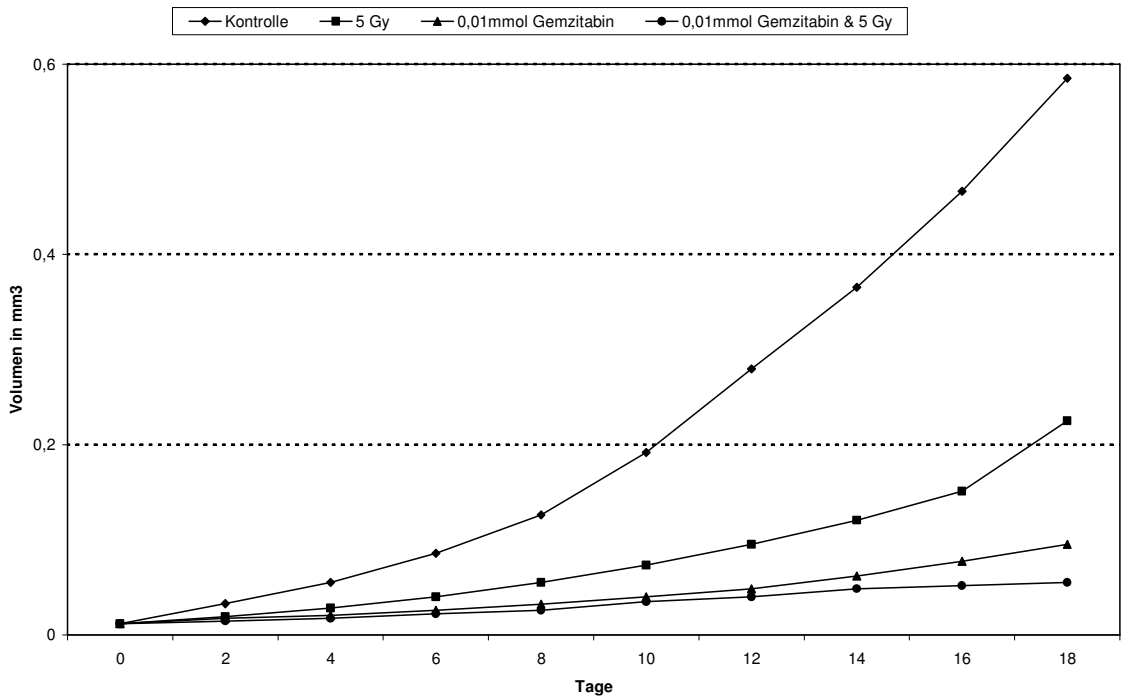


Abb. 2E: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,01mmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

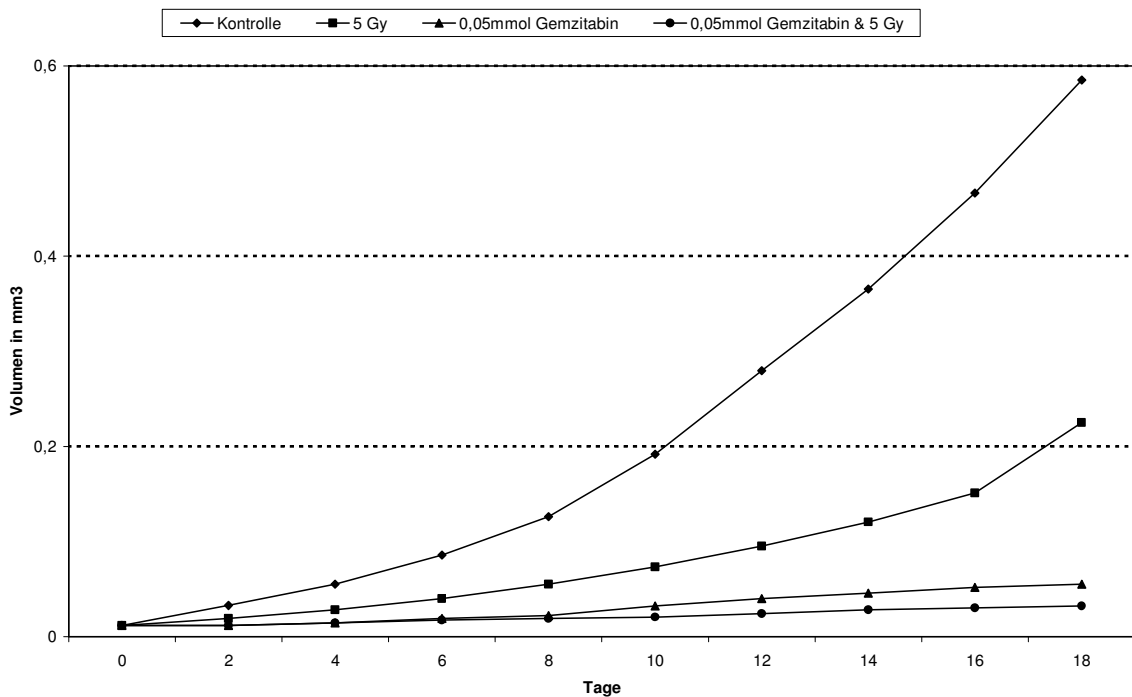


Abb.2F: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,05mmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

3.1.3 Proliferation nach Inkubation mit Temodal

In der Abbildung 3A ist das Sphäroidvolumen der GaMg Sphäroide im Verlauf über 18 Tage nach der Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen Temodal im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Das Wachstum erfolgte exponentiell, es ließ sich eine deutliche Abnahme des Wachstums abhängig von den einzelnen Temodalkonzentrationen feststellen. Die Wachstumsverzögerung betrug sieben Tage für die niedrigste Temodalkonzentration (5 μ mol). 0,025mmol Temodal verzögerten das Wachstum um 12 Tage, 0,05mmol Temodal verzögerten das Wachstum um 14 Tage.

Bei den U87 Sphäroiden zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In der Abbildung 3B ist das Sphäroidvolumen der U87 Sphäroide im Verlauf über 18 Tage nach der Inkubation mit den verschiedenen Temodalkonzentrationen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Auch hier zeigte sich erwartungsgemäß eine

konzentrationsabhängige Verzögerung des Wachstums in Abhängigkeit von den Temodalkonzentrationen. Die Wachstumsverzögerung betrug für die 5µmol Temodal drei Tage, bei 0,025mmol Temodal verzögerte sich das Wachstum um zehn Tage, 0,05mmol Temodal verzögerten das Wachstum um 13 Tage.

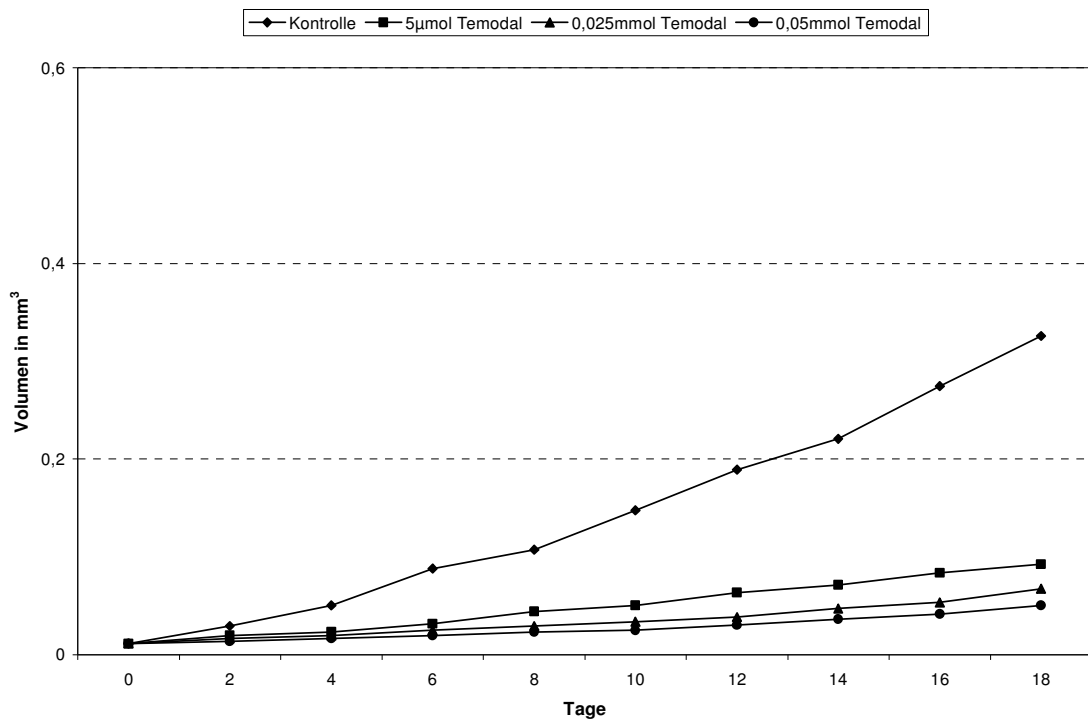


Abb.3A: Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Sphäroide in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen Temodal

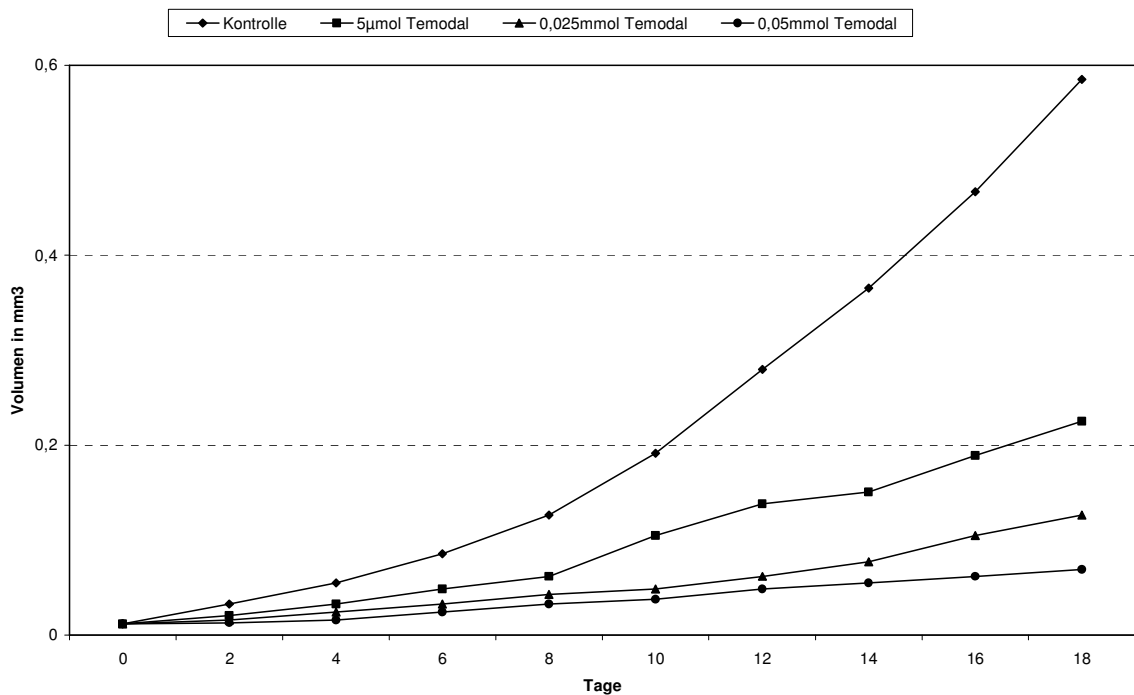


Abb. 3B: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen Temodal

3.1.4 Proliferation nach Inkubation mit Temodal und Bestrahlung

In den Abbildungen 4A - 4C ist der Effekt von verschiedenen Konzentrationen Temodal, Temodal und Bestrahlung, sowie Bestrahlung ohne Temodal auf die Proliferation der GaMg Sphäroide im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Der größte Effekt auf die Verzögerung des Wachstums ergab sich bei einer Konzentration von 0,05mmol Temodal. Die Wachstumsverzögerung betrug hier 14 Tage. In der Kombination war der Effekt als additiv zu werten. Es zeigte sich eine Wachstumsverzögerung von einem Tag durch alleinige Bestrahlung, eine Wachstumsverzögerung von 14 Tagen bei den mit 0,05mmol Temodal inkubierten Sphäroiden und ebenfalls eine Wachstumsverzögerung von mehr als 18 Tagen bei den Sphäroiden mit der Kombinationsbehandlung (Abb. 4C).

Bei einer Konzentration von 0,025mmol Temodal (Abb. 4B) fand sich eine Wachstumsverzögerung von einem Tag für die alleinige Bestrahlung, 12

Tagen für eine Temodalkonzentration von 0,025mmol und 16 Tagen für die Kombinationsbehandlung aus Temodal und Bestrahlung. In der Behandlungsgruppe mit 5µmol Temodal ließ sich eine Wachstumsverzögerung von einem Tag für die alleinige Bestrahlung, sieben Tagen für die Temodalkonzentration von 5µmol und 11 Tagen für die Kombinationsbehandlung feststellen.

In den Abbildungen 4D - 4F ist der Effekt verschiedener Konzentrationen von Temodal, Temodal und Bestrahlung, sowie Bestrahlung ohne Temodal auf die Proliferation der U87 Sphäroide im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Es zeigte sich auch bei den U87 Sphäroiden eine konzentrationsabhängige Wachstumsverzögerung, welche abhängig von der Höhe der Temodalkonzentration war. Es zeigte sich die größte Verzögerung des Wachstums auch hier für die größte Konzentration Temodal (mehr als 18 Tage, auch schon für 0,05mmol Temodal alleine).

In der Abbildung 4D ist die Proliferation der U87 Sphäroide nach einer Inkubation mit 5µmol Temodal dargestellt. Die alleinige Bestrahlung verzögerte bei den U87 Sphäroiden das Wachstum um drei Tage, 5µmol Temodal verzögerten das Wachstum um vier Tage, die Kombination von 5µmol Temodal und Bestrahlung zeigte eine Wachstumsverzögerung von sieben Tagen.

In der Abbildung 4E sind die Sphäroide nach der Inkubation mit 0,025mmol Temodal dargestellt. Es zeigte sich eine Wachstumsverzögerung von drei Tagen durch die alleinige Bestrahlung, 0,025mmol Temodal verzögerten das Wachstum um neun Tage, die Kombination aus Bestrahlung und 0,025mmol Temodal zeigte eine Wachstumsverzögerung von mehr als 18 Tagen.

Insgesamt fiel auch bei diesen Experimenten auf, dass die U87 Sphäroide wesentlich empfindlicher auf eine Behandlung, sei es nun Temodalinkubation oder Bestrahlung, reagierten. Auch wenn jede Therapieform für sich schon einen Effekt zeigte, sah man in der Kombinationstherapie einen Effekt, der als additiv zu werten war.

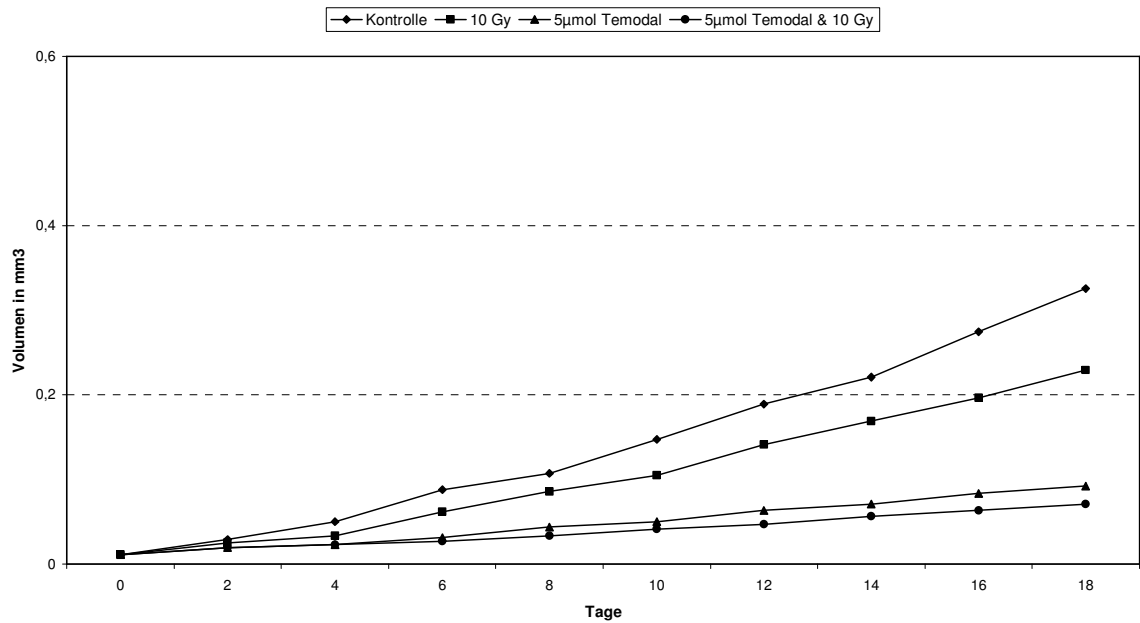


Abb.4A: Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 5µmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

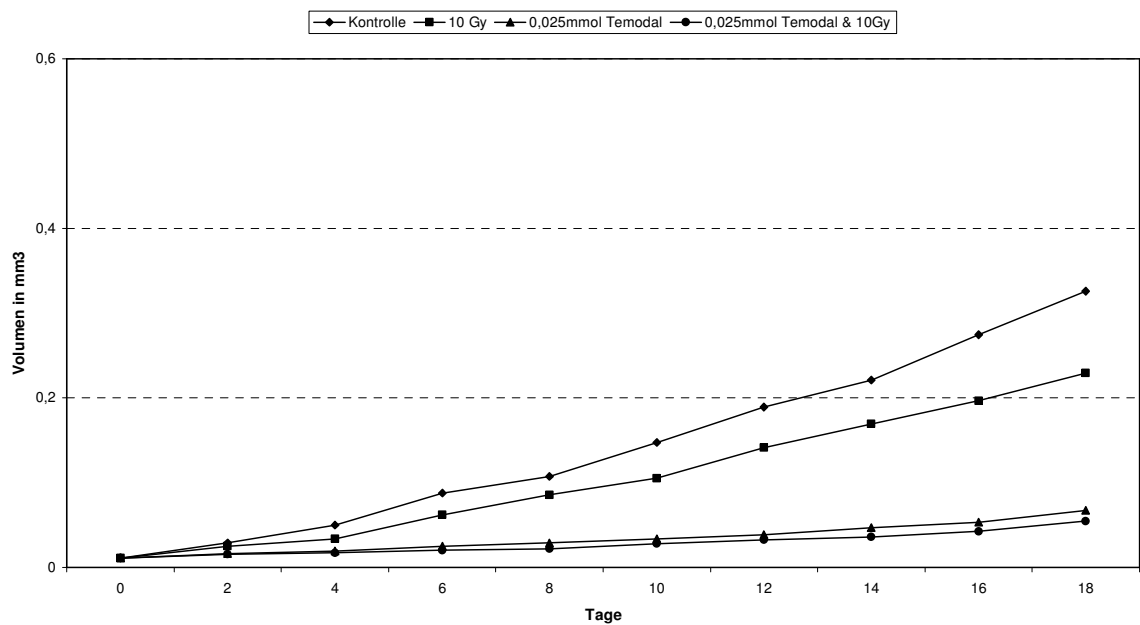


Abb.4B: Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,025mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

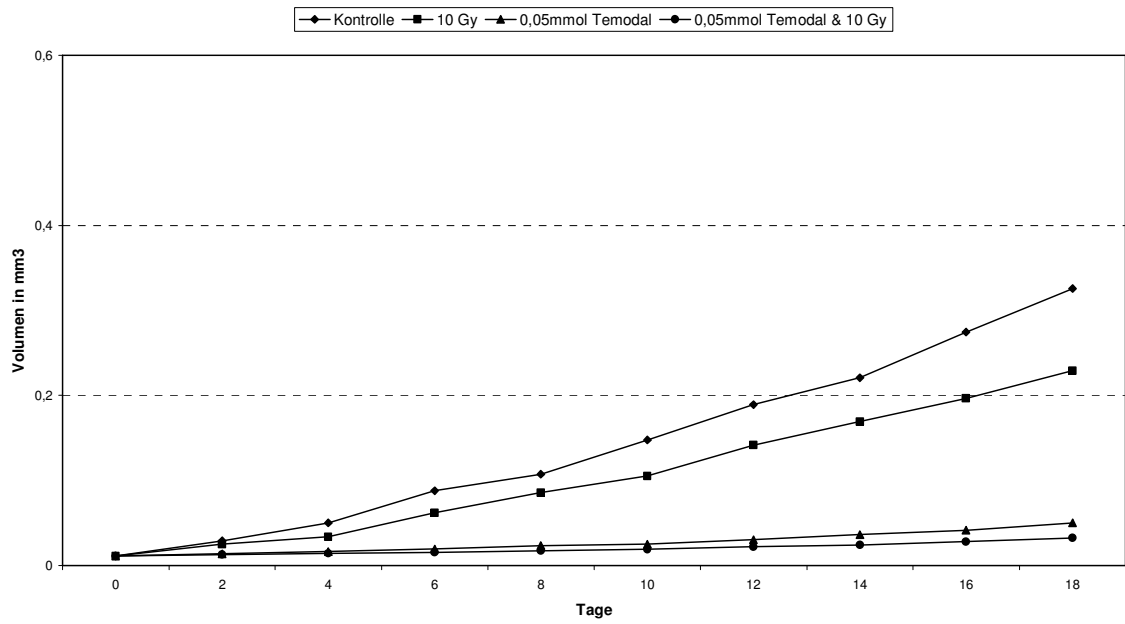


Abb. 4C: Volumenzunahme (Proliferation) der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,05mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

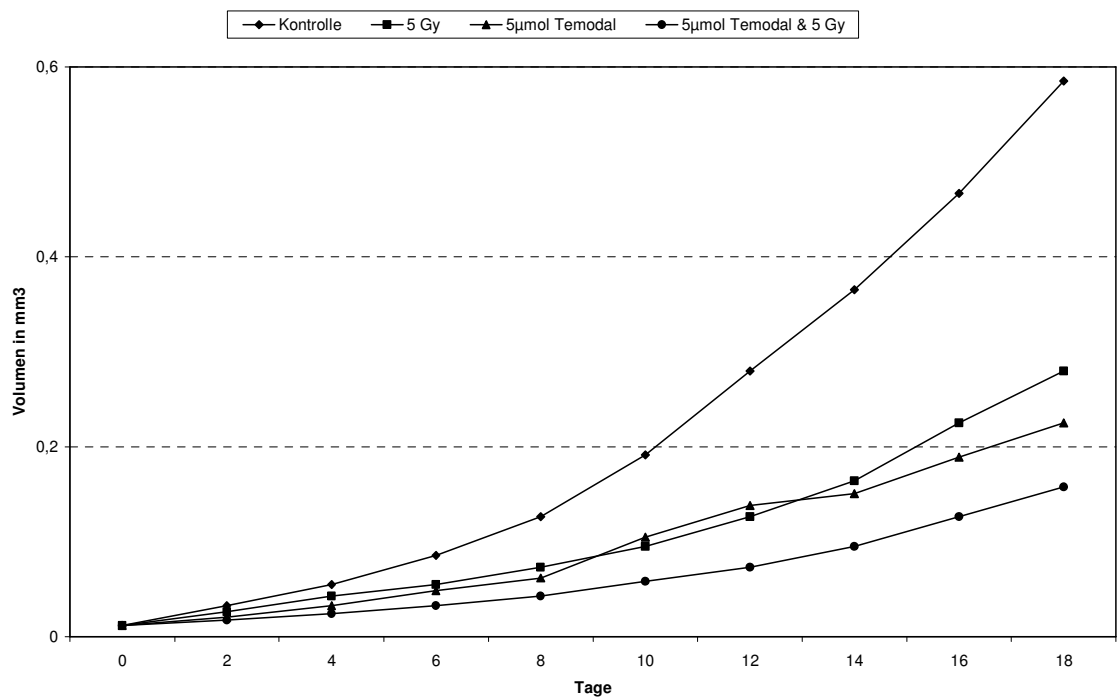


Abb. 4D: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 5µmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

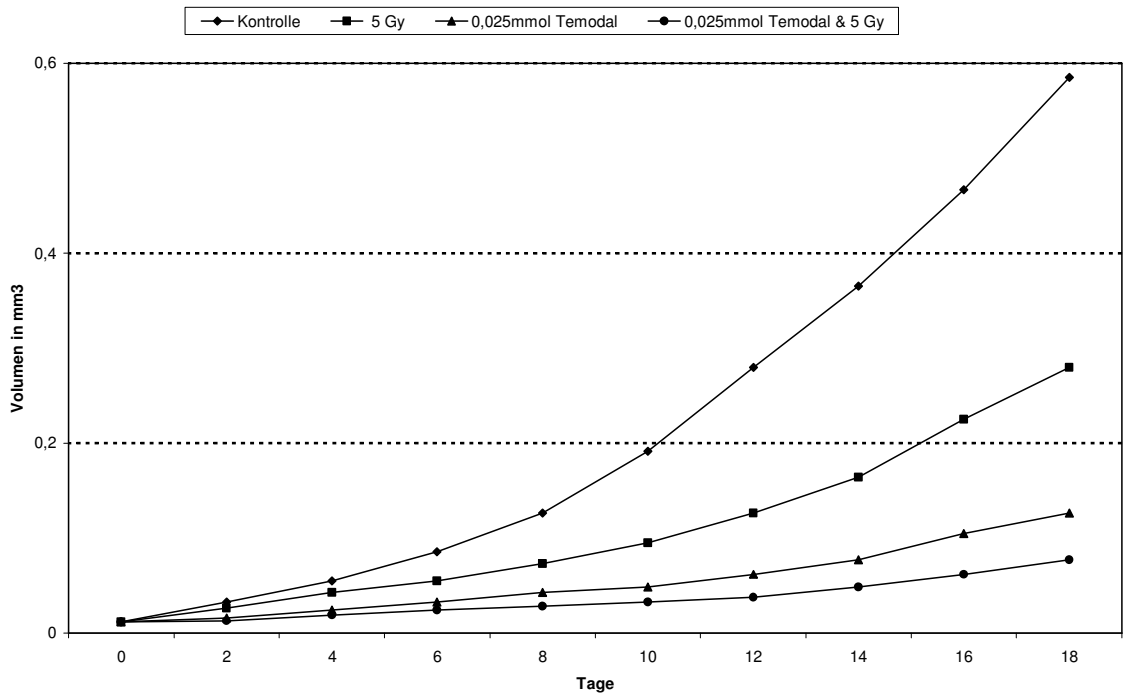


Abb. 4E: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,025mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

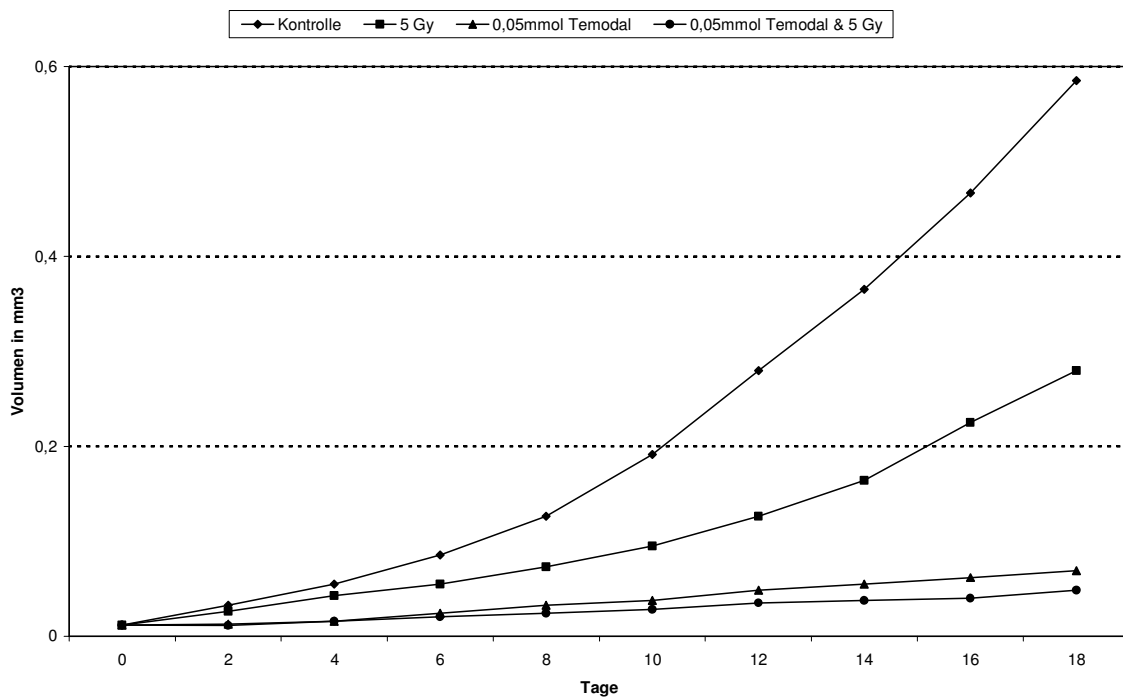


Abb. 4F: Volumenzunahme (Proliferation) der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,05mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

3.2 Migrationsverhalten

3.2.1 Migration nach Inkubation mit Gemzitabin

In der Abbildung 5A sind die Migrationsflächen der GaMg Sphäroide im Verlauf über vier Tage nach der Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen Gemzitabin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Die Zellen der Sphäroide der Zelllinie GaMg zeigten in den Migrationsexperimenten nach der Inkubation mit Gemzitabin eine dosisabhängige Verringerung der Migrationsfähigkeit. Die Migrationsfähigkeit der Zellen der GaMg Sphäroide nahm bei einer Konzentration von $0,5\mu\text{mol}$ Gemzitabin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 45% ab. Die Gemzitabinkonzentration von $0,01\text{mmol}$ Gemzitabin verringerte die Migrationsflächen um fast 50%, die größte Gemzitabinkonzentration ($0,05\text{mmol}$) verringerten die Migrationsflächen um 85%.

In der Abbildung 5B sind die Migrationsflächen der U87 Sphäroide im Verlauf über vier Tage nach der Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen Gemzitabin dargestellt. Es zeigte sich für alle beobachteten Gruppen eine annähernd lineare Ausdehnung der Migrationsflächen, wohingegen die inkubierten Gruppen einen konzentrationsabhängigen Verlust der Migrationsfähigkeit zeigten. Der Verlust der Migrationsfähigkeit betrug für die geringste Gemzitabinkonzentration ($0,5\mu\text{mol}$) 56%. Bei der nächst größeren Konzentration ($0,01\text{mmol}$) verringerten sich die Migrationsflächen um 74%, bei der größten Konzentration ($0,05\text{mmol}$) verringerten sich die Migrationsflächen um 85%. Mit steigenden Konzentrationen Gemzitabin nahmen also die Migrationsflächen sowohl der GaMg Sphäroide als auch der U87 Sphäroide ab.

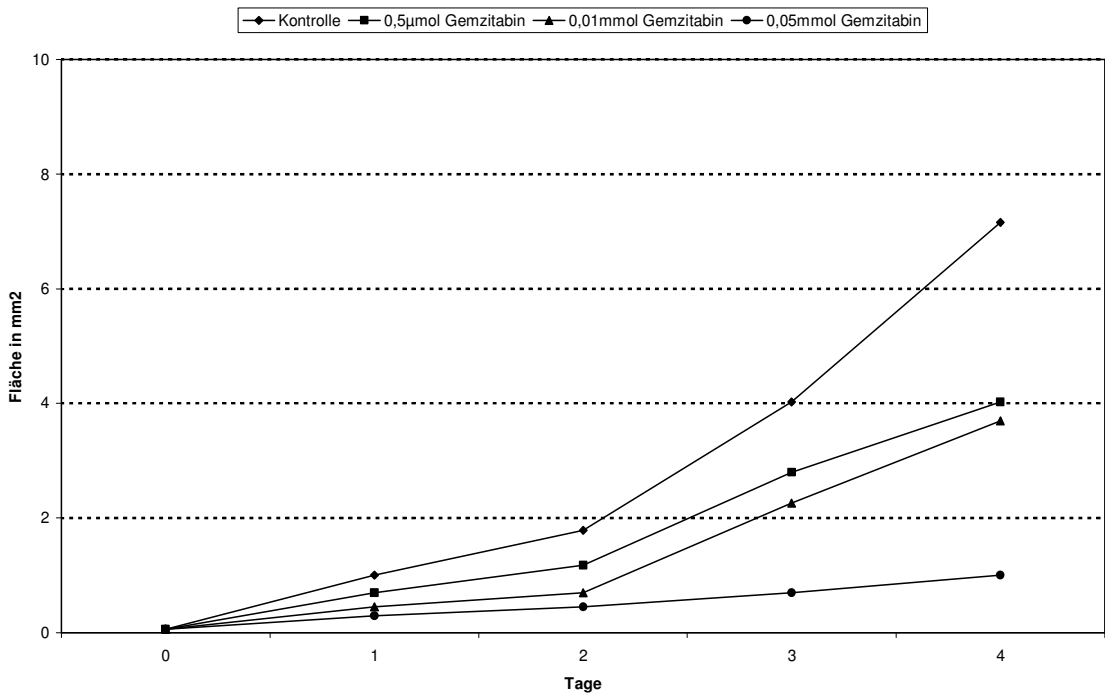


Abb. 5A: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide in Abhängigkeit von den verschiedenen Konzentrationen Gemcitabin

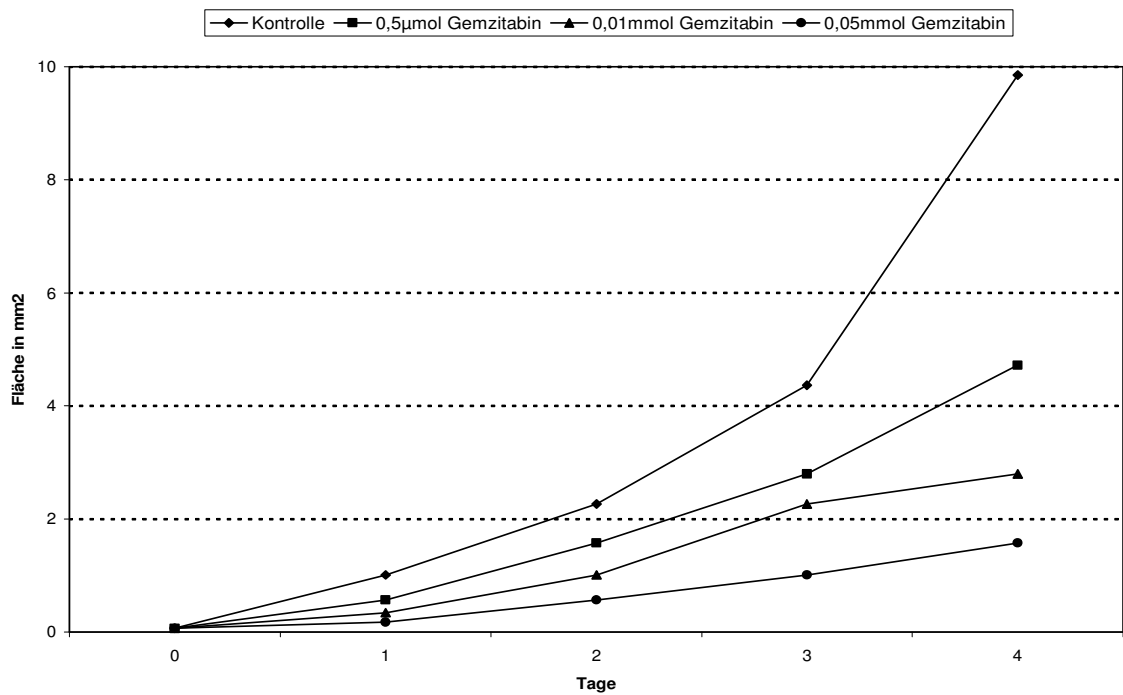


Abb. 5B: Migrationsflächen der U87 Sphäroide in Abhängigkeit von den verschiedenen Konzentrationen Gemcitabin

3.2.2 Migration nach Inkubation mit Gemzitabin und Bestrahlung

In den Abbildungen 6A - 6C ist der Effekt verschiedenener Konzentrationen Gemzitabin, Gemzitabin und Bestrahlung, sowie Bestrahlung alleine auf die Migrationsflächen der GaMg Sphäroide im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt.

Die Abbildung 6A zeigt die Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach einer Gemzitabininkubation von 0,5µmol und in der unteren Linie die Migration der Zellen der kombiniert behandelten Sphäroide. Alleine die Bestrahlung mit 10 Gy verringerte die Migrationsflächen um 25%. Die Migrationsflächen verringerten sich im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle bei alleiniger Inkubation mit 0,5µmol Gemzitabin um 45%. Kombinierte man Bestrahlung und 0,5µmol Gemzitabin, verringerten sich die Migrationsflächen um 58%.

Bei einer Gemzitabinapplikation von 0,01mmol verringerte die alleinige Gabe von Gemzitabin die Migrationsflächen um 48%, die Kombination mit Bestrahlung verringerte die Migrationsflächen um 80% (Abb. 6B).

Betrachtet man die Migrationsflächen in der Abbildung 6C, so fand sich bei einer Inkubation mit 0,05mmol Gemzitabin eine Verringerung der Migrationsfläche um 86%, bei der Kombination von 0,05mmol Gemzitabin und Bestrahlung wurde eine Verringerung der Migrationsfläche um 92% gefunden.

Die Abbildungen 6D - 6F zeigen die Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Gemzitabin, nach alleiniger Bestrahlung, und die Migrationsflächen nach der Kombination dieser beiden Therapieformen im Verlauf über vier Tage.

Wie aus Abbildung 6D zu entnehmen ist, verringerte die alleinige Bestrahlung mit 5 Gy die Migrationsflächen der U87 Sphäroide um 48%. Die Inkubation mit 0,5µmol Gemzitabin verringerte die Migrationsflächen um 56%. In der Kombination von Bestrahlung und Gemzitabin wurden die Migrationsflächen um 75% reduziert.

Abbildung 6E zeigt die Migrationsflächen nach Inkubation mit 0,01mmol Gemzitabin und Bestrahlung. Die Inkubation mit 0,01mmol Gemzitabin

verringerte die Migrationsflächen um 75%, in der Kombinationsbehandlung wurden die Flächen um 83% verringert.

In Abbildung 6F werden die Migrationsflächen nach einer Inkubation mit 0,05mmol Gemzitabin dargestellt. Die Kombinationstherapie erreichte hier eine Verringerung der Migrationsflächen um 92%, die alleinige Gemzitabininkubation verringerte die Flächen um 85%.

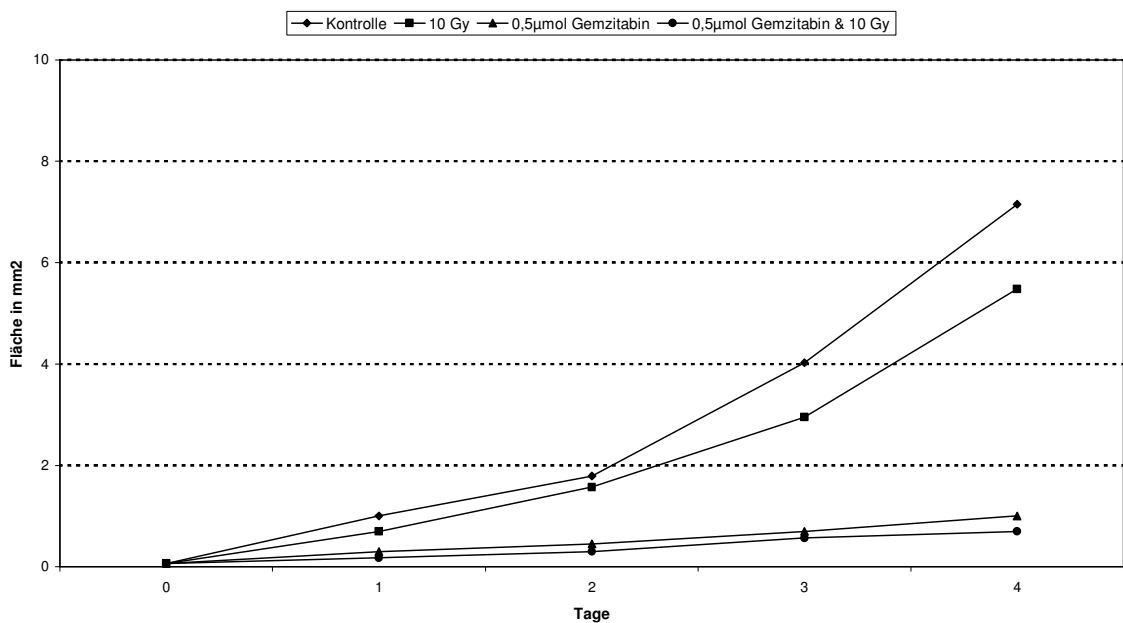


Abb.6A: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,5µmol Gemzitabin und nachfolgender Bestrahlung

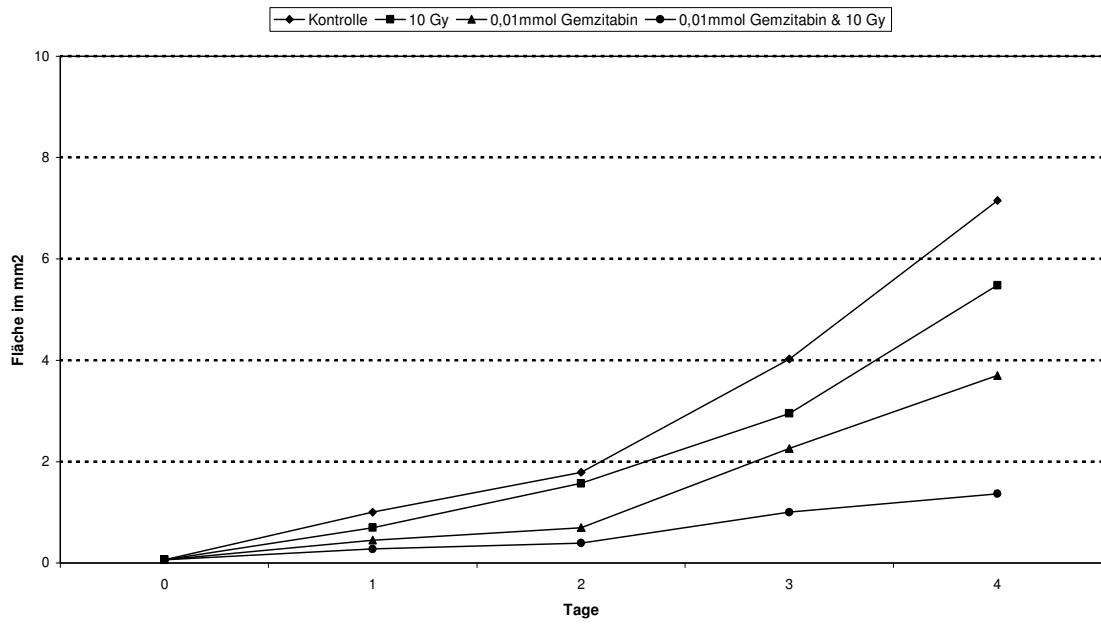


Abb. 6B: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,01mmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

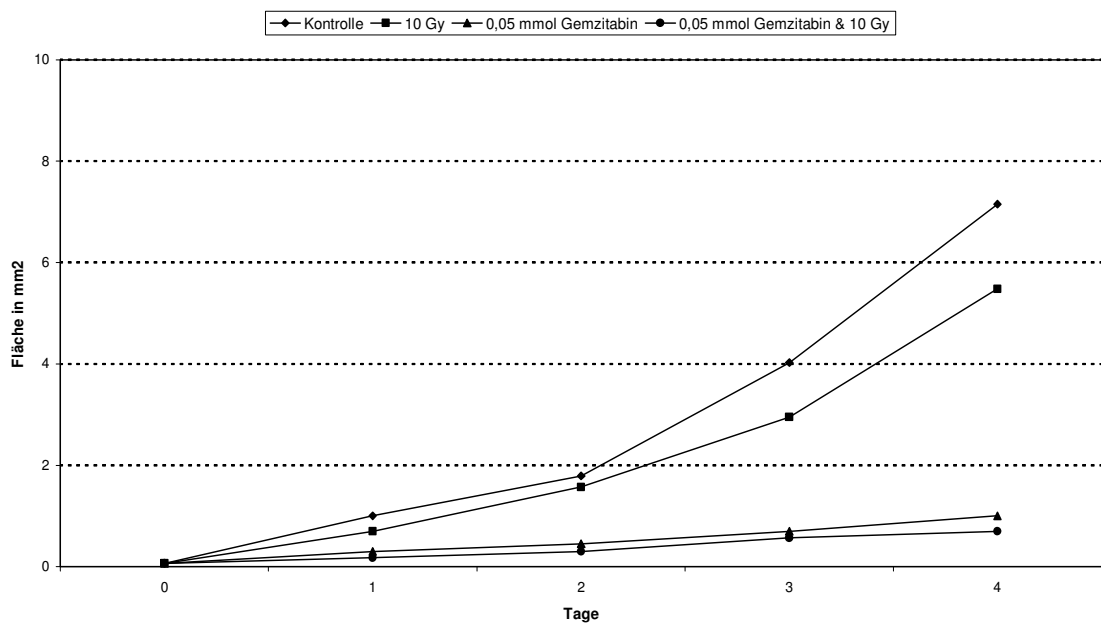


Abb. 6C: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,05mmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

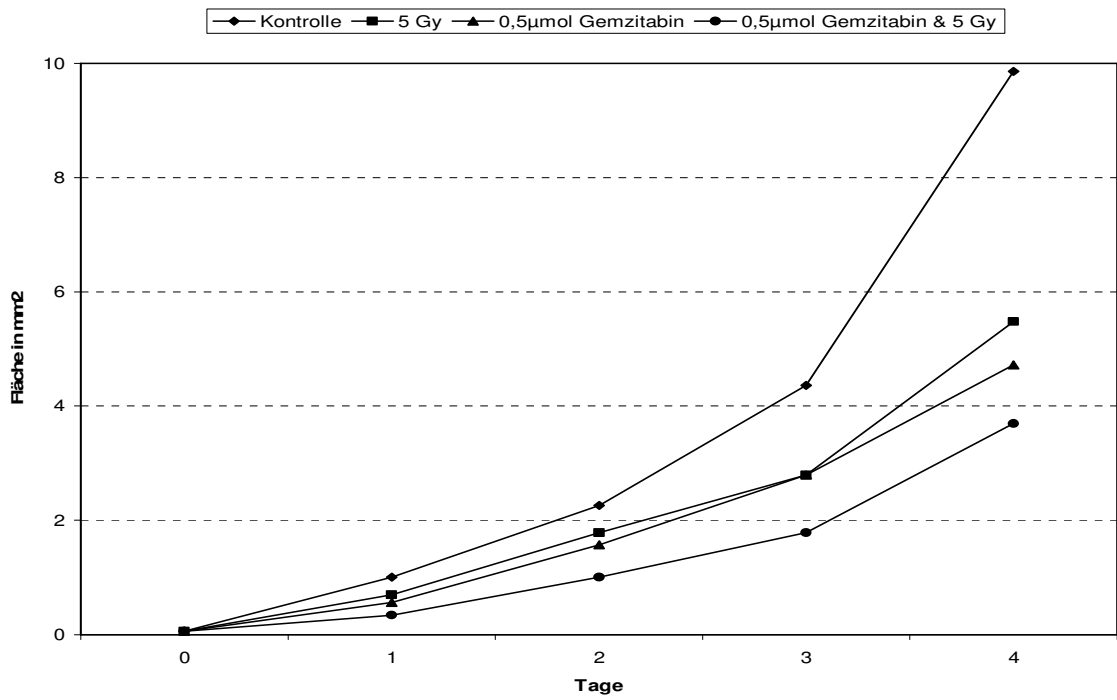


Abb. 6D: Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,5μmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

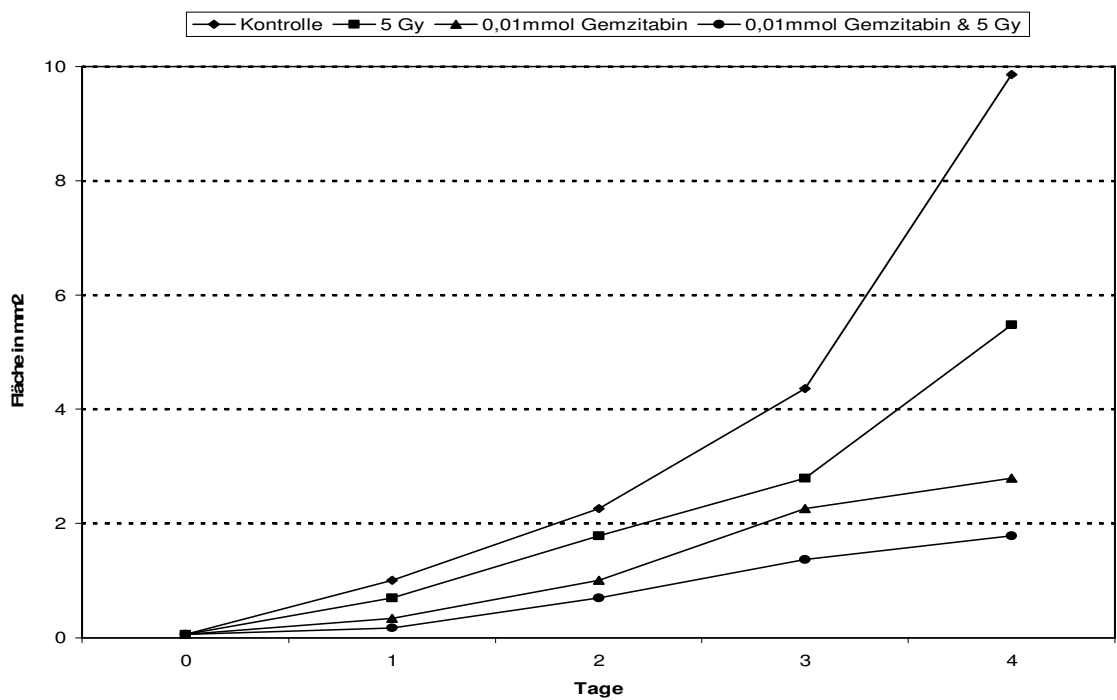


Abb. 6E: Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,01mmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

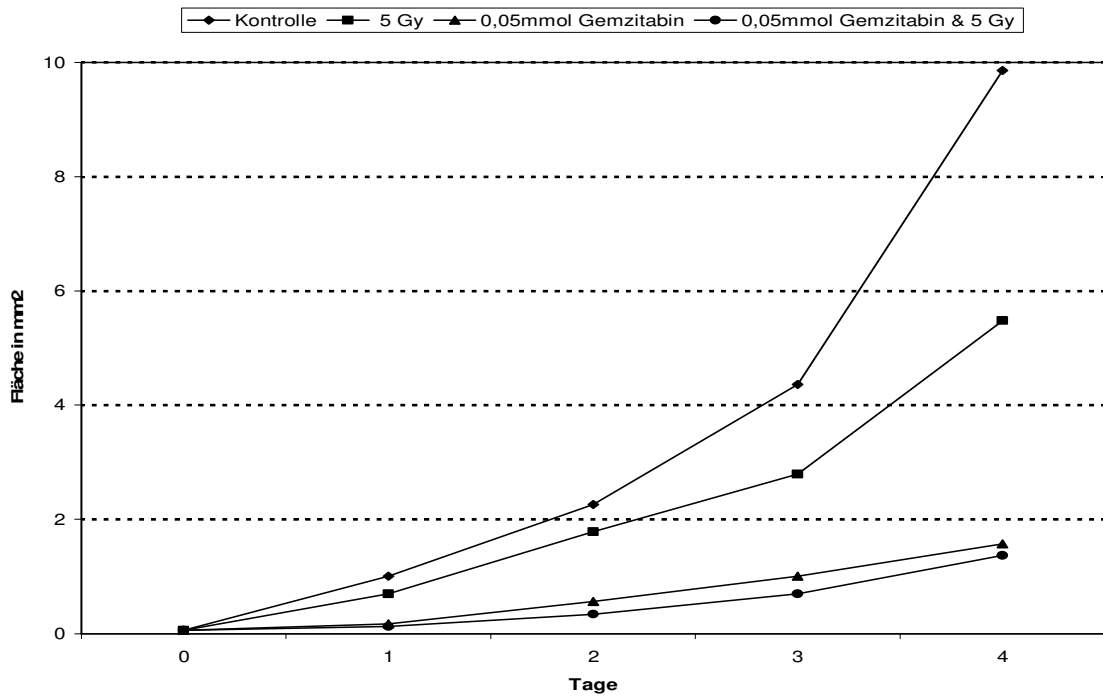


Abb. 6F: Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,05mmol Gemcitabin und nachfolgender Bestrahlung

3.2.3 Migration nach Inkubation mit Temodal

In der Abbildung 7A sind die Migrationsflächen der GaMg Sphäroide im Verlauf über vier Tage nach der Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen Temodal im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt. Die Zellen der Sphäroide der Zelllinie GaMg zeigten in den Migrationsexperimenten nach der Inkubation mit Temodal eine dosisabhängige Verringerung der Migrationsfähigkeit. Die Migrationsfähigkeit der Zellen der GaMg Sphäroide nahm bei einer Konzentration von 5µmol Temodal im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 27% ab. Eine Temodalkonzentration von 0,025mmol Temodal verringerte die Migrationsflächen um 63%, die größte Temodalkonzentration (0,05mmol) verringerte die Migrationsflächen um 78%.

In der Abbildung 7B sind die Migrationsflächen der U87 Sphäroide im Verlauf über vier Tage nach der Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen Temodal dargestellt. Es zeigte sich für alle beobachteten Gruppen ein annähernd lineares Wachstum, wohingegen die Wachstumskurven der Gruppen, die eine Chemotherapie erhielten einen konzentrationsabhängigen Verlust der Migrationsfähigkeit zeigten. Der Verlust der Migrationsfähigkeit betrug für die geringste Temodalkonzentration (5µmol) 48%. Bei der nächst größeren Konzentration (0,025mmol Temodal) verringerten sich die Migrationsflächen um 52%, bei der größten Konzentration (0,5mmol Temodal) verringerten sich die Migrationsflächen um 67%. Mit steigenden Konzentrationen Temodal nahmen also die Migrationsflächen, sowohl der GaMg Sphäroide als auch die der U87 Sphäroide in Abhängigkeit von der verabreichten Temodaldosis ab.

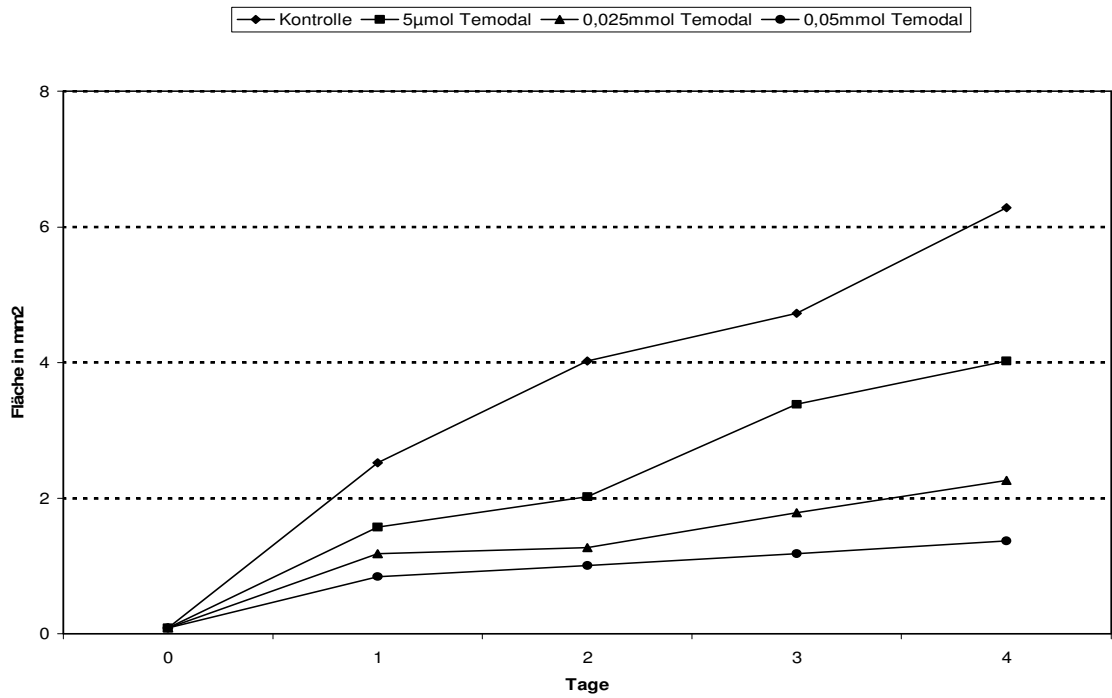


Abb. 7A: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Temodal

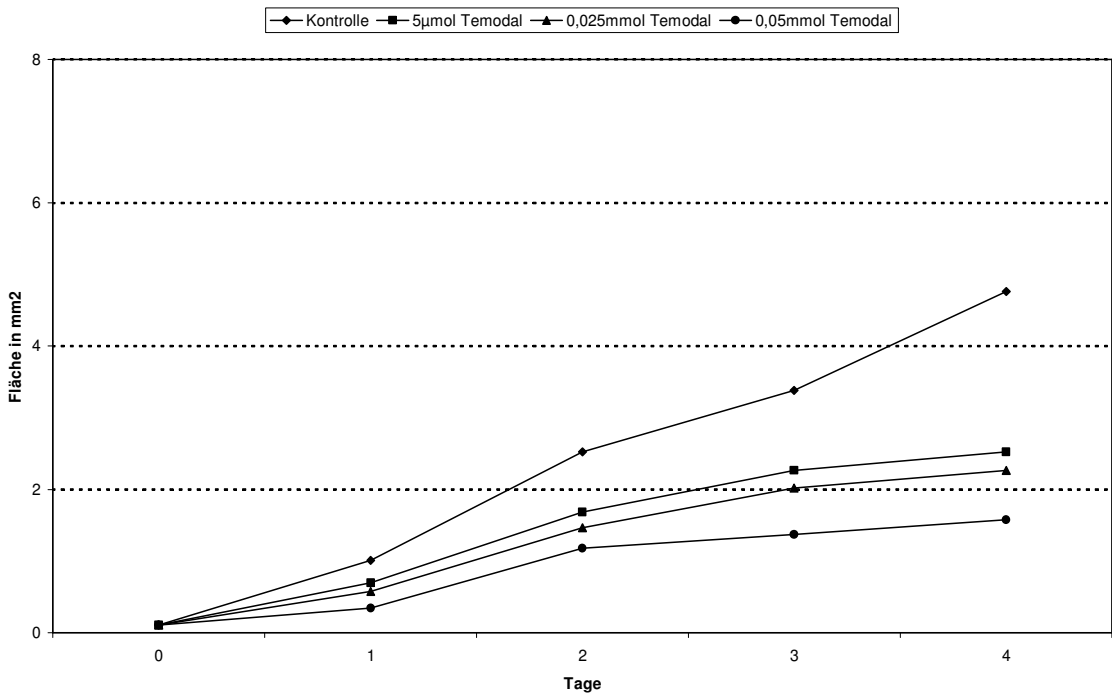


Abb. 7B: Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Temodal

3.2.4 Migration nach Inkubation mit Temodal und Bestrahlung

In den Abbildungen 8A - 8C ist der Effekt verschiedener Konzentrationen Temodal, Temodal und Bestrahlung, sowie Bestrahlung alleine auf die Migrationsflächen der GaMg Sphäroide im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe dargestellt.

Die Abbildung 8A zeigt die Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach einer Temodalinkubation von 5µmol und in der unteren Linie die Migrationsflächen der kombiniert behandelten Sphäroide. Alleine die Bestrahlung mit 10 Gy verringerte die Migrationsflächen um 30%. Die Migrationsflächen verringerten sich im Bezug auf die unbehandelte Kontrolle bei alleiniger Inkubation mit 5µmol Temodal um 37%. Kombinierte man Bestrahlung mit 5µmol Temodal, verringerten sich die Migrationsflächen um 65%.

Bei einer Temodalapplikation von 0,025mmol verringerte die alleinige Gabe von Temodal die Migrationsflächen um 63%. In der Kombination mit Bestrahlung verringerten sich die Migrationsflächen um 75% (Abb. 8B).

Betrachtet man die Migrationsflächen in der Abbildung 8C, fand sich bei einer Inkubation mit 0,05mmol Temodal eine Verringerung der Migrationsflächen um 78%, bei der Kombination von 0,05mmol Temodal mit Bestrahlung wurde eine Verringerung der Migrationsflächen um 84% gefunden.

Die Abbildungen 8D - 8F zeigen die Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen Temodal, alleiniger Bestrahlung und die Migrationsflächen nach der Kombination dieser beiden im Verlauf über vier Tage.

Die Inkubation mit 5µmol Temodal verringerte die Migrationsflächen um 48%. In der Kombination von Bestrahlung und Temodal wurden die Migrationsflächen um 62% reduziert.

Abbildung 8E zeigt die Migrationsflächen nach Inkubation mit 0,025mmol Temodal und Bestrahlung. Die Inkubation mit 0,025mmol Temodal verringerte die Migrationsflächen um 52%, in der Kombinationsgruppe wurden die Flächen um 67% verringert.

In Abbildung 8F werden die Migrationsflächen nach einer Inkubation mit 0,05mmol Temodal gezeigt. Die Kombinationstherapie erreichte hier eine Verringerung der Migrationsflächen um 73%, die alleinige Temodalapplikation verringerte die Flächen um 67%.

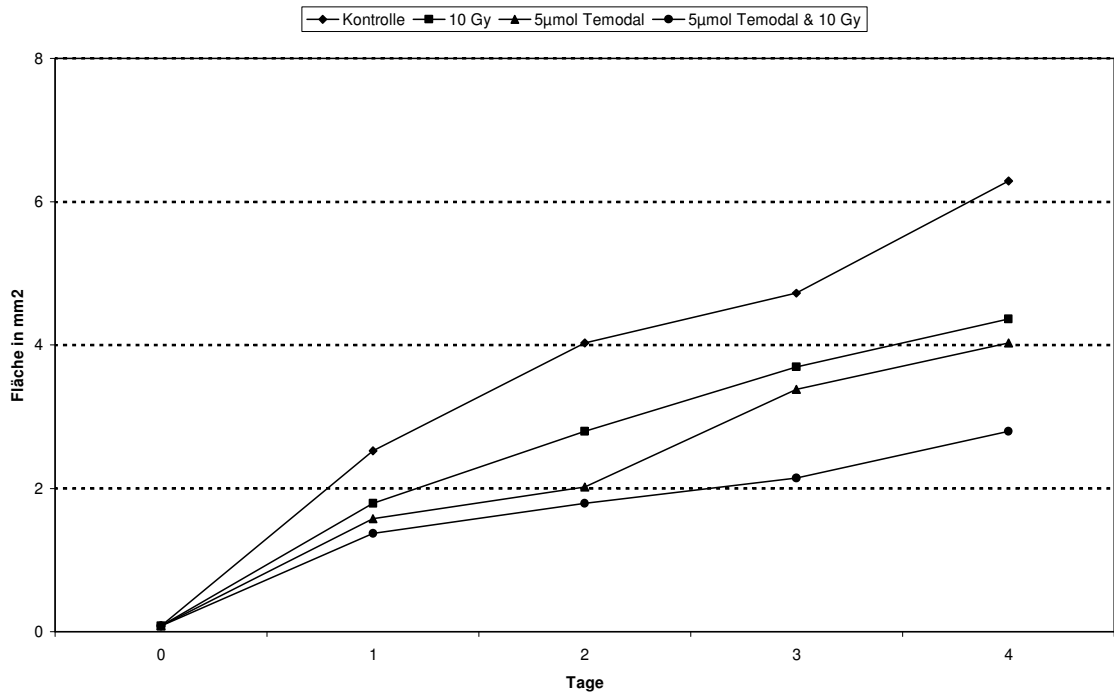


Abb. 8A: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 5µmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

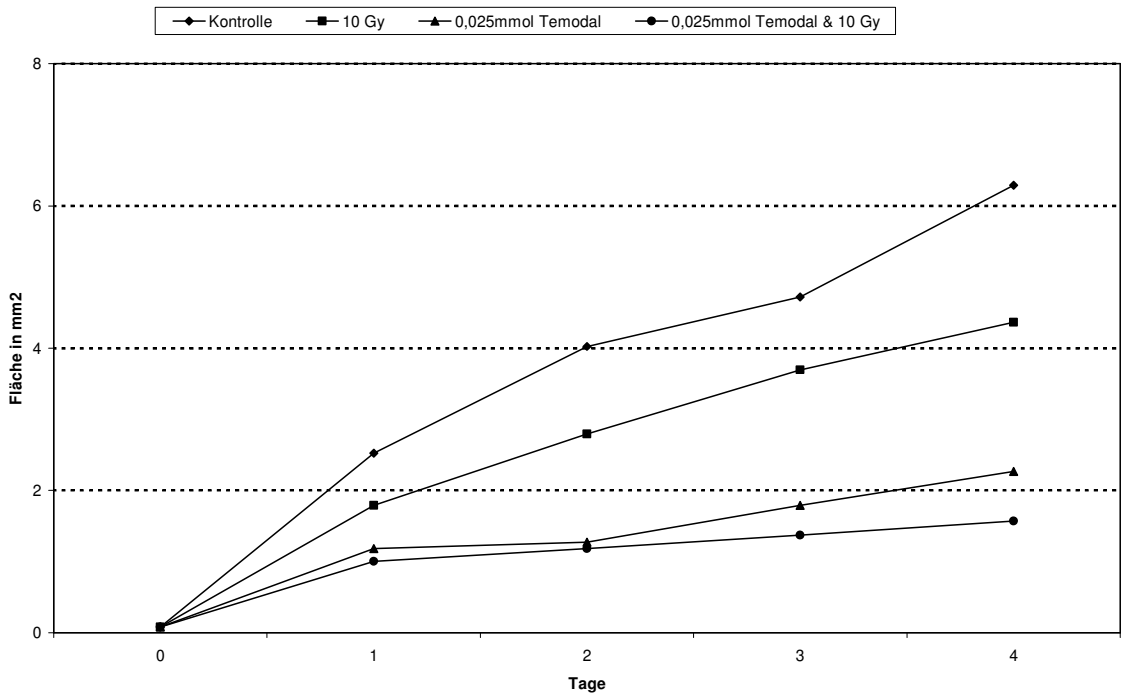


Abb. 8B: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,025mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

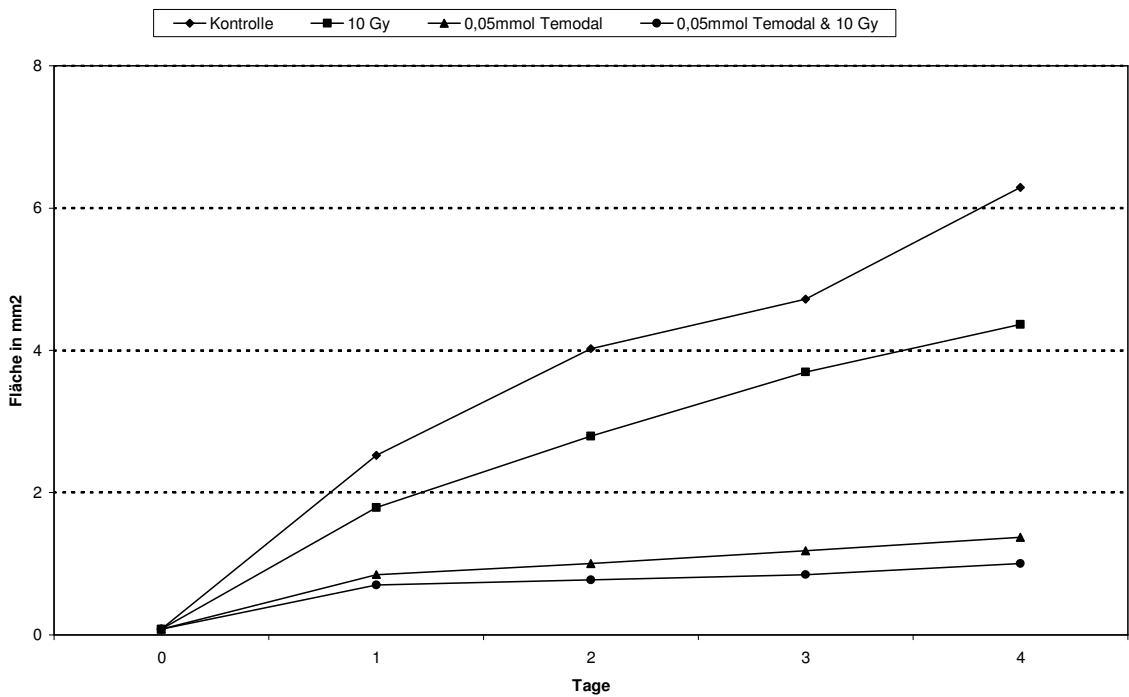


Abb. 8C: Migrationsflächen der GaMg Sphäroide nach Inkubation mit 0,05mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

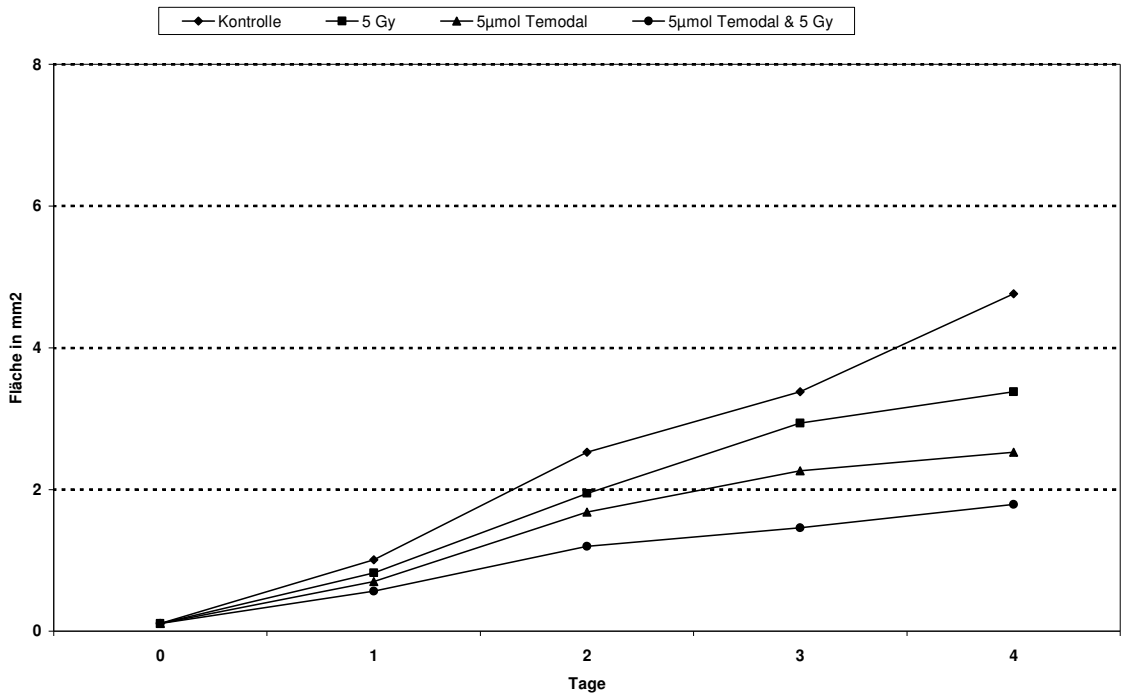


Abb.8D: Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 5µmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

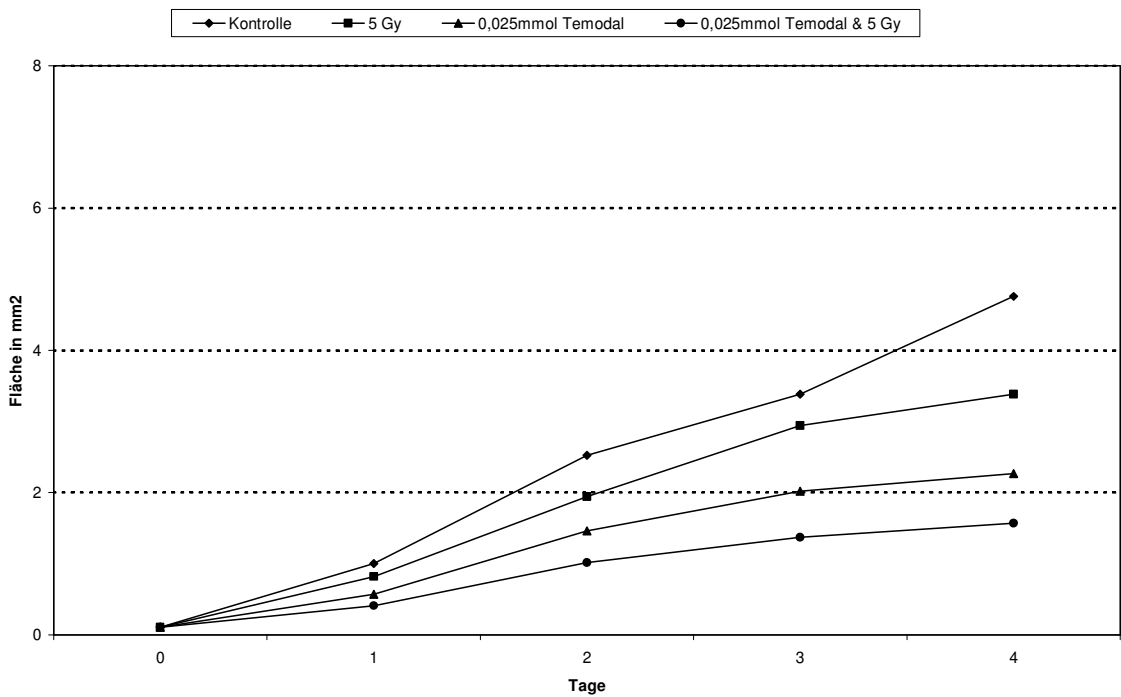


Abb. 8E: Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,025mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

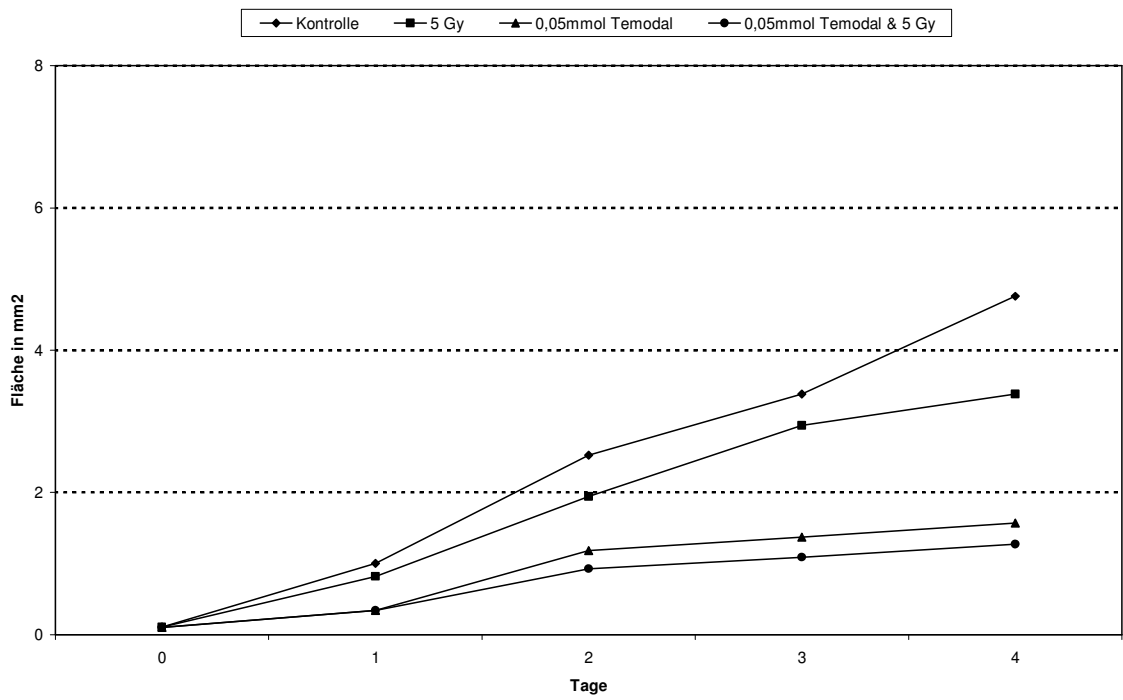


Abb. 8F: Migrationsflächen der U87 Sphäroide nach Inkubation mit 0,05mmol Temodal und nachfolgender Bestrahlung

4 Diskussion

4.1 Das Tumormodell

Die Idee, ein anderes Modell für Untersuchungen von Tumoren anstelle etablierter Zelllinien zu verwenden, ist nicht neu. Schon 1944 verwendete der Zoologe Holtfreter ein dreidimensionales *in vitro* Zellmodell für seine Untersuchungen an Amphibien, um die Zelladhäsion am Boden der Kulturflasche zu verhindern (Holtfreter, 1944). Später machte Moscona morphologische Untersuchungen an embryonalen und entarteten Zellen und verwendete hierfür kugelförmige Wiedervereinigungen aus Zellkulturen (Moscona, 1952, 1957a, 1957b, 1961).

Eine Vielzahl der sich daran anschließenden Untersuchungen verwendeten diese Techniken, weil sich daraus die Möglichkeit ergab, den Aufbau und die Funktionsweise der Entstehung von entarteten Zellen zu verstehen. Einen Durchbruch brachten die Arbeiten von Sutherland et al., die den Einsatz des dreidimensionalen Zellmodells der Sphäroide für Untersuchungen zur Effektivität und zur Überprüfung verschiedenener Tumorthérapien etablierten (Sutherland et al., 1971a; 1971b; 1973; 1981). Viele therapeutisch orientierte Studien wurden danach eine Domäne der Experimente mit Sphäroiden. Es konnte so die biologische Beschaffenheit von Tumorsphäroiden näher untersucht werden. Weiterhin konnten verschiedene biologische Mechanismen, wie die Steuerung des Wachstums, der programmierte Zelltod (Apoptose), die Invasion von Tumorzellen, ihre Angiogenese und ihr Immunverhalten untersucht werden (Mueller- Klieser, 1987; Sutherland, 1984, 1988; Knuechel et al., 1990; Bjerkvig, 1992). Auch wurden bereits einige Untersuchungen mit Sphäroiden verschiedenen Ursprungsgewebes hinsichtlich des Ansprechens auf Bestrahlung gemacht.

Stuschke et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad von menschlichen Tumorzellen, die zu Sphäroiden

kultiviert worden waren, in Bezug auf ihre Strahlenempfindlichkeit. Sphäroide spiegeln die Situation *in vivo* demnach wesentlich besser wieder als konventionelle Untersuchungen an Zellkulturen (Stuschke et al, 1995). Fritz et al. konnten bei Experimenten mit verschiedenen Fraktionierungsschemata einer Strahlentherapie und deren Auswirkungen auf den Zellzyklus an V79 Zellen die deutliche Überlegenheit von Sphäroiden im Gegensatz zu Monolayern hinsichtlich der Strahlenresistenz nachweisen (Fritz et al., 1996). Auch die Arbeitsgruppe von Durand kam bei Untersuchungen über das Wachstumsverhalten an V79 Sphäroiden des Hamsters zu ähnlichen Resultaten (Durand und Sutherland, 1994b).

Die Arbeitsgruppen um Kerbel und Teicher konnte den folgenden Sachverhalt beobachten: Resistenzen gegen alkylierende Substanzen (Cisplatin, Carboplatin, Cyclophosphamid, Thiopental), die EMT 6 Tumoren von Mäusen im Sphäroid Modell aufwiesen, verschwanden, wenn derselbe Tumor als Monolayer kultiviert wurde, treten aber wieder auf, wenn man aus den Monolayer- Kulturen wieder Sphäroide züchtete (Kerbel et al., 1994a; 1994b; Francia et al., 2004). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Zellen, die als Monolayer gezüchtet werden, viele der Eigenschaften verlieren, die für Untersuchungen von Chemotherapeutika wichtig sind, sollen deren Ergebnisse *in vivo* wieder reproduzierbar sein.

Eine ähnliche Beobachtung bezüglich Resistenzen gegenüber Chemotherapie oder Bestrahlung hatten Durand und Sutherland bereits 1972 gemacht. Damals wurde der Begriff des „Kontakt- Effektes“ geprägt. Der Kontakt- Effekt bezeichnet eine Zunahme der Resistenz gegenüber einem zytotoxischen Agens, zum Beispiel Bestrahlung oder zytotoxischen Medikamenten, wenn Zellen nicht als Monolayer sondern in einem dreidimensionalen Zellverband wachsen.

Auch hier wurde nachgewiesen, dass Sphäroide ein ähnliches Resistenzmuster wie *in vivo* Tumoren aufwiesen, wohingegen sich diese Resistenzen bei Monolayer-Zellkulturen nicht beobachten ließen (Durand und Sutherland, 1972a; 1972b). Diese Ergebnisse zeigen, dass es sinnvoll ist, präklinische Untersuchungen von zytostatischen Substanzen,

Bestrahlung oder einer Kombinationstherapie auch an einem *in vitro* Modell zu testen, welches die *in vivo* Situation möglichst genau wiedergeben kann. Olive und Durand konnten mit Tumorsphäroiden erarbeitete Ergebnisse zur Klärung der Ursache von Resistenzen gegenüber Medikamenten und Bestrahlung bestätigen. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass in Sphäroiden durch den engen Zellkontakt die DNS enger gepackt ist. Den Sphäroiden wird so im Gegensatz zu Zelllinien die Möglichkeit zur Aufrechterhaltung von Reparaturmechanismen gegeben (Olive und Durand, 1994a; 1994b).

Der Kontakt- Effekt beschreibt eine Zunahme der Resistenz von Zellen gegenüber einem zytotoxischen Agens, beispielsweise einer Radiotherapie. Dreidimensional wachsende Zellen zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung, d.h. eine zunehmende Reparaturkapazität gegenüber einem subletalen Strahlenschaden. Dertinger et al. schlussfolgern, dass der Kontakt- Effekt und damit auch die erhöhte Radioresistenz von Sphäroiden darin begründet ist, dass die bessere Kommunikation in den enger gepackten Sphäroiden die Zellen befähigt, Reparaturenzyme auszutauschen. Dieses wurde unter Zuhilfenahme von Mikroelektroden, die die elektrische Kopplung via gap-junctions messen, untersucht. Gap- junctions sind porenbildende Proteinkomplexe, die die Plasmamembran zweier Zellen eng miteinander verbinden. Eine enge elektrische Kopplung ist für die Ausprägung des Zell-Kontaktes und damit auch der Resistenzen notwendig. Auch in Monolayer Zellen ist eine elektrische Kopplung mittels gap- junctions ausgebildet, jedoch wird der Kontakt- Effekt erst im dreidimensionalem *in vitro* Wachstum erworben (Dertinger und Hülser 1981, Dertinger et al, 1983). Die Durchlässigkeit der gap- junctions wird über den cyclo Adenosinmonophosphat (cAMP)- Gehalt der Zelle geregelt. Der cAMP- Gehalt einer Zelle spielt eine entscheidende Rolle für die Zelldifferenzierung und die Zellentwicklung. Bei Sphäroiden, die gap- junctions ausbilden und somit zu verbesserter interzellulärer Kommunikation fähig sind, nimmt der cAMP- Gehalt und die Adenylatzyklaseaktivität ab, da die verbesserte interzelluläre

Kommunikation mittels gap-junctions funktioniert und der Informationsaustausch mittels Signaltransduktoren wie cAMP und Adenylatzyklase weniger benötigt wird. Monolayer können zwar auch gap-junctions ausbilden, jedoch erfolgt die interzelluläre Kommunikation weiterhin überwiegend mittels cAMP und Adenylatzyklase. Auf diesem von Dertinger et al. untersuchten Mechanismus beruht die Hypothese, dass sinkende Spiegel von cAMP und Adenylatzyklase eine Rolle für den Informationsaustausch und bei der Ausbildung von Resistenzen spielt (Dertinger et al, 1982). Diese Hypothese wird durch Experimente von Knedlitschek et al. gestützt, die an drei verschiedenen Nager-Zelllinien einen Zusammenhang zwischen dem Grad der elektrischen Kopplung und der Ausprägung der Strahlenresistenz nachweisen konnten (Knedlitschek et al, 1990).

Eine weitere Erklärung für die erhöhte Resistenz gegenüber Bestrahlung von Sphäroiden liegt möglicherweise darin begründet, dass Sphäroide im direkten Vergleich zu Monolayern einen Strahlenschaden besser reparieren können, da die Sphäroide im Vergleich mit Monolayern eine veränderte Zellkernform sowie einen DNS- Aufbau aufweisen, der der *in vivo* Situation entspricht (Olive und Durand, 1994a; 1994b). In einer Studie von Rodriguez et al., wurde die Reparaturkapazität von 9L Gliomsphäroiden der Ratte im Vergleich zu Monolayern untersucht (Rodriguez et al., 1988). Auch hier zeigten die Sphäroide eine größere Strahlenresistenz. Es konnte gezeigt werden, dass die Kinetik der Reparatur nach einem potentiell letalen Strahlenschaden biphasisch mit einer langsamen und einer schnellen Komponente ablief. Reparaturkinetik und -Kapazität waren jedoch für Monolayer und Sphäroide gleich, so dass die erhöhte Strahlenresistenz der Sphäroide durch einen verzögerten Wiedereintritt von klonogenen, nicht am Zellzyklus teilnehmenden, ruhenden Zellen in die proliferative Phase des Zellzyklus erklärt wurde.

Für die Untersuchungen an Glioblastomen gibt es theoretisch drei Ansätze. Untersuchungen an Zelllinien, Zelllinien- Sphäroiden (Taghian et al, 1993) und so genannten organotypischen Sphäroiden, wie sie auch in den Arbeiten von Kaaijk verwendet wurden, da diese die *in vivo* Situation am

besten abbilden (Kaaijk et al. 1995). Gerade auf Grund dieser vielfältigen genetischen Prozesse werden auch nicht alle Zellen eines Tumors *in vitro* wachsen und genau aus diesem Grund repräsentieren Zellkulturen, die als Monolayer wachsen, eben auch nur einen kleinen Ausschnitt aus der Komplexität eines Tumors.

Jedoch beziehen sich die meisten Untersuchungen über beispielsweise die Strahlensensibilität von Glioblastomen auf Zelllinien- Experimente, welches aus den oben genannten Gründen wenig sinnvoll erscheint.

4.2 Temodal

Temodal ist ein Medikament in der systemischen Therapie von malignen Tumoren. In jüngerer Zeit ist es im Rahmen multimodaler Behandlungskonzepte auch bei Patienten mit einem Glioblastom eingesetzt worden, da seine pharmakologischen Eigenschaften, die Möglichkeit der oralen Applikation, die relativ gute Verträglichkeit, sowie eine Bioverfügbarkeit von fast 100%, die Anwendung sinnvoll erscheinen ließ. Neben der Anwendung beim Glioblastom wird Temodal bereits beim malignen Melanom und bei anaplastischen Astrozytomen im Rahmen klinischer Studien eingesetzt. In einer Studie an Glioblastomsphäroiden konnte die Ursache für die Wirksamkeit von Temodal dadurch erklärt werden, dass Temodal nachweislich die Apoptose in Tumorsphäroiden induziert (Günther et al, 2003). Das Wachstum eines Glioblastoms lässt sich eine gewisse Zeit lang mit Temodal kontrollieren (Paulsen et al, 1999; Janinis et al, 2000; Yung et al, 2000; Schwenka et al., 2000). In einer Phase II Studie der Arbeitsgruppe von Bower wurden 103 Patienten mit fortgeschrittenem, histologisch gesichertem Grad III oder Grad IV Gliom mit 150- 200mg/m² Körperoberfläche Temodal über fünf Tage behandelt. Dieser Zyklus wurde alle 28 Tage wiederholt. Von den 103 Patienten hatten 11% ein objektives Ansprechen auf die Therapie und 47% einen Wachstumsstillstand. Das mittlere Überleben betrug 5,8 Monate bei allen

eingeschlossenen Patienten. Nach sechs Monaten hatten 22% der in die Studie eingeschlossenen Patienten noch kein Rezidiv des Tumors (Bower et al, 1997). In Kombination mit Bestrahlung wurde Temodal von Stupp et al. sowohl während als auch nachfolgend zu einer Strahlentherapie verabreicht. Diese Kombinationstherapie wurde relativ gut toleriert und führte letztendlich zu einer Verlängerung des medianen Überlebens auf 16 Monate (Stupp et al, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden Sphäroide des Glioblastoms aus zwei verschiedenen Zelllinien GaMg und U87 mit Temodal inkubiert und bestrahlt. Wie schon bei anderen Arbeiten herausgefunden worden ist, wurde berücksichtigt, dass die Zelllinie U87 wesentlich empfindlicher sowohl auf die Chemotherapeutika als auch auf Bestrahlung reagiert, während GaMg weniger empfindlich ist. Dieses wurde bei den hier durchgeführten Experimenten bestätigt. Günther et al sahen die Ursache hierfür in einer möglicherweise generell höheren Toleranz der GaMg-Sphäroide gegenüber Umwelteinflüssen (Guenther et al., 2003). In den Kombinationsexperimenten –Temodal und Bestrahlung- wurde der Effekt, den das Chemotherapeutikum alleine bewirkte, verstärkt. Die Wachstumsverzögerung durch Temodal alleine betrug für die GaMg Sphäroide im Mittel 12 Tage. Bei den U87 Sphäroiden betrug die Wachstumsverzögerung im Mittel 14 Tage. Verglichen mit den Wachstumsverzögerungen nach Gemcitabininkubation (6 Tage GaMg, 12 Tage U87) zeigt sich für die GaMg Sphäroide ein deutlich besseres Ansprechen auf die Temodalinkubation. Hingegen sind die Auswirkungen auf die U87 Sphäroide für beide Pharmaka ungefähr gleich.

Das Migrationsverhalten wurde durch eine Temodalinkubation abhängig von der Höhe der applizierten Temodalosis eingeschränkt. Hier fand sich eine Reduktion der Migrationsflächen von 78% bei der größten Dosis Temodal. Die U87 Sphäroide wurden bei der größten Dosis Temodal in ihrer Migrationsfähigkeit nicht so stark beeinträchtigt (67% bei 0,05mmol).

4.3 Gemcitabin

Die meisten Studien, die sich mit der Wirkung von Gemcitabin beschäftigen, beruhen auf Untersuchungen an Monolayern. Smitskamp-Wilms et al. fanden heraus, dass Gemcitabin bei Untersuchungen an menschlichen Kolontumorzelllinien, die einerseits als Monolayer gezüchtet wurden und andererseits in mehreren Lagen wuchsen, in den mehrreihigen Tumorzelllinien nicht so gut wirkte wie an den Monolayern (Smitskamp-Wilms et al., 1998). Andere Arbeiten, in denen die Wirksamkeit von Gemcitabin einerseits an Monolayern und andererseits an Sphäroiden getestet wurde, kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Genc et al., 2004). Diese Arbeit sieht die Ursache für die größere Strahlenresistenz der Sphäroide darin, dass Sphäroide mehr Zellen in Zellzyklusphasen halten, die per se resistent gegen Chemotherapie oder Bestrahlung sind. Dieser Effekt wird durch eine Diffusionsgrenze im Sphäroid verursacht. Ab einer bestimmten Größe nimmt das Sphäroid kein Gemcitabin mehr auf; es kann infolgedessen auch nicht mehr in die DNS eingebaut werden. Diese Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen von Neshateh- Riz et al., die radioaktiv markiertes Deoxyuridin in Sphäroide gaben. Sie fanden heraus, dass das Sphäroid umso weniger markiertes Deoxyuridin einbaut, je mehr es an Größe zunimmt. Der maximale Einbau wurde an den äußeren Rändern der Sphäroide beobachtet, wo auch das Wachstum stattfindet (Neshateh- Riz et al., 1997). Gemcitabin ist ein Zytostatikum, welches seit einigen Jahren bei der Therapie verschiedenster solider Tumoren angewendet wird. Insbesondere bei der Therapie des inoperablen Pankreaskarzinoms hat Gemcitabin sich im Vergleich zu anderen Zytostatika als überlegen erwiesen. In einer Phase III Studie an Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom der Arbeitsgruppe von Burris et al., wurden 126 Patienten einer Therapie mit Gemcitabin oder 5FU zugeführt, wobei sich für die Patienten mit Gemcitabin ein medianes Überleben von 5,65 im Vergleich zu 4,41 Monaten bei der Therapie mit 5FU herausstellte. Weiterhin war das Überleben nach 12 Monaten bei der

Gruppe mit Gemzitabin 18% im Vergleich zu der Gruppe mit 5FU 2% (Burris HA, 1997).

In einer anderen Studie der Arbeitsgruppe von Heinemann wurden Patienten mit einem fortgeschrittenen Pankreaskarzinom einerseits einer Therapie mit Gemzitabin alleine im Vergleich zu Gemzitabin in Kombination mit Cisplatin zugeführt. Das Patientenkollektiv, das lediglich einer Gemzitabintherapie zugeführt worden war, hatte sowohl einen Vorteil hinsichtlich der rückfallfreien Zeit (5,4 Monate gegen 2,8 Monate) als auch im Gesamtüberleben (8,3 Monate gegen 6,0 Monate) (Heinemann et al, 2003). In einer Phase II Studie der Arbeitsgruppe um Perng wurden 53 Patienten mit einem inoperablen nicht kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) (Stadium III und Stadium IV) einer Therapie mit Gemzitabin im Vergleich zu einer Kombinationstherapie bestehend aus Etoposid und Cisplatin zugeführt. 27 Patienten erhielten Gemzitabin alleine, 26 Patienten die Kombinationstherapie bestehend aus Etoposid und Cisplatin. Ein Ansprechen auf die Therapie fand sich bei 19,2% der Patienten, die lediglich Gemzitabin erhielten. Im Vergleich dazu fand sich ein Ansprechen auf die Kombinationstherapie bei 20,8% der Patienten. Jedoch waren die toxischen Nebenwirkungen wie Knochenmarksdepression und Thrombozytopenie in dem Patientenkollektiv mit der alleinigen Gemzitabintherapie wesentlich weniger stark ausgeprägt (Perng et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die Wachstumsverzögerung nach alleiniger Gemzitabininkubation auf die Sphäroide der Zelllinie GaMg und U87 untersucht. Vergleicht man die Ergebnisse (GaMg: 6 Tage, U87: 12 Tage) wird auch hier die deutlich ausgeprägtere Empfindlichkeit der U87 Sphäroide sichtbar. Es fällt im Vergleich mit den Ergebnissen der Temodalexperimente auf, dass Temodal in seiner Wirkung zumindest auf die GaMg Sphäroide überlegen zu sein scheint. Bei den per se empfindlicheren U87 Sphäroiden ist die Wirkung der beiden verwendeten Chemotherapeutika auf das Proliferationsverhalten ähnlich.

Bezüglich des Migrationsverhaltens ähneln sich die Ansprechraten der Sphäroide. Bei den GaMg Sphäroiden wurde eine Verringerung der

Migrationsflächen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle nach Gemzitabininkubation mit 0,05mmol Gemzitabin um 86% erreicht. Die U87 Sphäroide verringerten die Migrationsflächen nach einer Gemzitabinapplikation von 0,05mmol Gemzitabin um 85%. Dies legt die Vermutung nahe, dass hinsichtlich der Migrationsfähigkeit die beiden verwendeten Chemotherapeutika eine ähnliche Wirksamkeit zeigen.

4.3 Radiochemotherapie

Konzepte mit einer kombinierten Radiochemotherapie werden bei zahlreichen soliden Tumoren seit vielen Jahren erfolgreich angewendet, um die Behandlungsergebnisse zu verbessern. Neben einer systemischen Wirkungsweise besitzen einige Chemotherapeutika das Potential strahlensensibilisierend zu wirken. Das klassische Beispiel einer Strahlensensibilisierung ist die Kombination von Cisplatin und Bestrahlung. Die verschiedensten Substanzen sind in Kombination mit einer Strahlentherapie in klinischen Studien angewendet worden, die bei präklinischen Untersuchungen bereits die Effektivität der Bestrahlung steigerten. Zu diesen zählen Platin- Analoga, Taxane, Topoisomerase-Inhibitoren sowie Gemzitabin (Levine, 1951; Skipper et al., 1951, Hertel et al., 1990).

Die Mechanismen der Strahlensensibilisierung oder Strahlentherapieverstärkung durch Gemzitabin sind von mehreren Autoren untersucht worden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten bei unterschiedlichen soliden Tumoren und hämatologischen Erkrankungen die radiotherapieverstärkenden Eigenschaften von Gemzitabin bestätigt werden (Grunewald et al., 1992; Carmichael, 1995). In einer Untersuchung von Gemzitabin und Bestrahlung auf vier verschiedene humane Zelllinien des Zervixkarzinoms konnte mit DNS Untersuchungen ein strahlensensibilisierender und ein zytotoxischer Effekt auf diese Zelllinien nachgewiesen werden (Hernandez et al., 2001). Des Weiteren konnte ein

strahlensensibilisierender Effekt des Gemzitabins auf verschiedene andere Tumorzellen nachgewiesen werden (Latz et al, 1998; Shewach et al, 1994, 1995; Shewach et al 1996a, 1996b). Biochemisch und molekularbiologisch ist der strahlensensibilisierende Effekt von Gemzitabin letztendlich noch nicht geklärt. Es wird angenommen, dass Gemzitabin eine Imbalance des Nukleotidpools erzeugt, welche zu einer Zellzyklusinstabilität führt, wodurch die Apoptoseschwelle der Tumorzelle herabgesetzt werden kann. Kombiniert man diesen Effekt mit ionisierender Bestrahlung, kann der DNS- Defekt nicht repariert werden, so dass der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet wird (Choy, 2000). Möglicherweise wird die intrinsische Apoptoseneigung durch einen Doppelstrangbruch in der S-Phase des Zellzyklus herabgesetzt (Lawrence et al., 1999; Milas et al., 1999). Mittlerweile ist unbestritten, dass durch die Gabe von Gemzitabin der zelluläre Adenosintriphosphat (ATP)- Pool reduziert wird. Dieser Effekt wird durch Bestrahlung verstärkt, wobei noch unklar, ist wie die ionisierenden Strahlen auf einen reduzierten ATP-Pool wirken. (Lawrence et al., 1997a; 1997b; Ostruszka et al., 2000; Robertson et al., 1996; Shewach et al., 1994).

Des Weiteren ist die Rolle von Gemzitabin und p53 auf die Zellzykluskontrolle und die zelluläre Strahlenempfindlichkeit nicht endgültig geklärt (Chang et al., 1995; Dahm-Daphi, 2000).

Im Gegensatz zu anderen strahlensensibilisierenden Medikamenten, wie Bromdesoxyuridin oder Ioddesoxyuridin, wirkt Gemzitabin an zwei verschiedenen Angriffspunkten. Einerseits wirkt Gemzitabin wachstumshemmend auf die DNS, da es direkt in den sich replizierenden Strang der DNS eingebaut wird, und andererseits wird direkt die spezifische Ribonukleotidreduktase gehemmt, so dass die Zelle nicht in der Lage ist die notwendigen Nukleotide zu synthetisieren.

Metaboliten des Gemzitabins, wie 2',2'-Difluordesoxycytidin- Triphosphat (dFdCTP), 2',2'-Difluordesoxycytin- Diphosphat (dFdCDP) und 2',2'-Difluordesoxycytidin- Monophosphat (dFdCMP), werden schnell in die DNS eingebaut und bewirken dadurch eine Strahlensensibilisierung (Lawrence et al., 1997; Shewach, 1996b). Der Einbau von Thymidin- Analoga führt

einerseits zu einer gesteigerten Anzahl von DNS- Schäden, andererseits wird der Zelle die Möglichkeit genommen, die entstandenen DNS Schäden zu reparieren (Iliakis et al., 1989; Kinsella et al., 1987; 1992; Ling et al., 1990). Aber auch Radiosensitizer wie Hydroxyurea, welches kein Nukleosidanalogon ist und demnach auch nicht in die DNS eingebaut wird, sind in der Lage die Ribonukleotidreduktase direkt anzuhalten, so dass der Nukleotidpool verkleinert wird (Sinclair, 1968; Fram et al., 1986; Fox, 1985). Außerdem ist Fluorodesoxyuridin in der Lage die Thymidin- Synthetase anzuhalten, welches auch ein möglicher strahlensensibilisierender Effekt ist.

Gemcitabin kann Tumorzellen in der G1/ S- Übergangsphase des Zellzyklus arretieren, wodurch eine Strahlensensibilisierung erzielt wird (Mose et al., 1999; 2000). In Zellzyklusexperimenten von Mose et al. ergab sich folgender Zusammenhang. Durch Gemcitabin kommt es zu einem Zellzyklusarrest und infolgedessen zu einer Anhäufung und Synchronisierung der Zellen im strahlenempfindlichen G1/S- Übergang. Es wird angenommen, dass in der G1/S- Phase bestimmte proapoptotische Proteine exprimiert werden, die zunächst noch nicht in der Lage sind die Zellen abzutöten, jedoch die Zelle in einen Alarmzustand versetzen. Ohne Bestrahlung kann der vorübergehende Zellzyklusarrest genutzt werden, um die durch Gemcitabin verursachte Schädigung zu reparieren. Wird jedoch die Zelle in das nächste Stadium überführt, häufen sich in der G1/S- Phase die proapoptotischen Proteine zu schnell an und die Zelle ist nicht mehr in der Lage, den entstandenen DNS- Schaden zu reparieren (Mose et al., 2002). Diese Hypothese wurde in verschiedenen Tierexperimenten unterstützt (Gregoire et al., 1997; Mason et al., 1999; Milas et al., 1999). Unklar bleibt, welcher Mechanismus genau zu dem strahlenempfindlichen G1/S-Phasen-Arrest führt (Kinsella, 1992; Shewach et al., 1994; Sinclair, 1981).

Insbesondere drei Mechanismen bei der Wirkweise von Gemcitabin sind für die Kombinationstherapie von besonderem Interesse. Erstens sollte Gemcitabin als DNS- Syntheseinhibitor in der Lage sein die durch eine Bestrahlung zugefügten DNS- Schäden zu verstärken und die

Reparaturmöglichkeiten einzuschränken. Zweitens, und dies ist besonders für die Experimente mit Sphäroiden von Interesse, ist Gemzitabin in der Lage den Tumor zu verkleinern und somit wird der Tumor besser mit Sauerstoff versorgt. Dies ist für eine Bestrahlungstherapie von großem Nutzen, da eine verbesserte Sauerstoffversorgung auch eine verbesserte Wirkung der Bestrahlung zur Folge hat (Gregoire et al., 1999). In verschiedenen Arbeiten über die Wirkweise von Gemzitabin wurde herausgefunden, dass der strahlensensibilisierende Effekt nur dann auftritt, wenn das Gemzitabin vor der Bestrahlung entfernt wird (Mose et al., 1999). Auch ist die Wirkung bei verschiedenen Zelllinien sehr unterschiedlich, in der vorliegenden Arbeit wurde vor allem ein konzentrationsabhängiger Unterschied bei den unterschiedlichen Glioblastomzelllinien herausgefunden. Die eigenen Ergebnisse bestätigen die konzentrationsabhängige Wirkungsweise von Gemzitabin vor Bestrahlung. In Tierexperimenten bestätigte die Arbeitsgruppe von Milas die Untersuchungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass der radiotherapieverstärkende Effekt kleiner wird, wenn Gemzitabin zu einem späteren Zeitpunkt gegeben wird oder wenn die Bestrahlung gleichzeitig mit der Gemzitabingabe erfolgt (Milas et al., 1999). Besonders interessant ist, dass Gemzitabin Sauerstoff-unabhängig zu wirken scheint. In anderen Tierexperimenten wurde *in vivo* bestätigt, dass der radiotherapieverstärkende Effekt auch unter hypoxischen Bedingungen eintritt (Mason et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden Glioblastomsphäroide der Zelllinien GaMg und U87 mit Gemzitabin inkubiert und nachfolgend bestrahlt. Die Wachstumsverzögerung durch alleinige Bestrahlung betrug für die GaMg Sphäroide 1-2 Tage, für die U87 Sphäroide hingegen im Mittel 4 Tage. In den Sphäroidexperimenten fand sich eine Wachstumsverzögerung durch Gemzitabin alleine von im Mittel 6 Tagen für die GaMg Sphäroide und von 12 Tagen für die U87 Sphäroide. Bei den Kombinationsexperimenten (Gemzitabin und Bestrahlung) betrug die Wachstumsverzögerung im Mittel 12 Tage bei den GaMg Sphäroiden und mehr als 18 Tage bei den U87 Sphäroiden. Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur gefundenen

Daten hinsichtlich der größeren Empfindlichkeit der U87 Sphäroide auf Chemotherapie und/ oder Bestrahlung.

Die Kombinationsuntersuchungen mit Temodal zeigten folgende Ergebnisse. Die Wachstumsverzögerung betrug für die GaMg Sphäroide nach Temodalapplikation im Mittel 12 Tage. Wurden die Sphäroide zusätzlich bestrahlt, verzögerte sich das Wachstum um 16 Tage. Bei den U87 Sphäroiden betrug die Wachstumsverzögerung im Mittel 14 Tage, die Kombination aus Temodal und Bestrahlung verzögerte das Wachstum um mehr als 18 Tage. Auch hier wird die größere Empfindlichkeit der U87 Sphäroide hinsichtlich einer Therapie deutlich.

Die Untersuchung der Migrationsfähigkeit zeigte für die Kombinationsuntersuchungen mit Gemzitabin an den GaMg Sphäroiden eine Reduktion der Migrationsflächen um maximal 90%, bei den U87 Sphäroiden fand sich eine maximale Reduktion der Migrationsflächen um 87%. Auch hier findet man hinsichtlich des Migrationsverhaltens nicht sehr ausgeprägte Unterschiede für die beiden Untersuchungsgruppen. Betrachtet man die Migrationsexperimente mit Temodal, findet sich bei den GaMg Sphäroiden eine Verringerung der Migrationsflächen um 85% für die Kombinationsbehandlung, im Vergleich dazu wurden bei den U87 Sphäroiden die Migrationsflächen lediglich um 73% reduziert. Dies lässt den Schluss zu, dass hinsichtlich der Migrationsfähigkeit Gemzitabin dem Temodal überlegen zu sein scheint.

4.4 Perspektiven in der Therapie des Glioblastoms

Trotz Fortschritten im Bereich der Neurochirurgie, der Strahlentherapie und der internistischen Onkologie konnten die Behandlungsergebnisse bei Patienten mit einem Glioblastom nur marginal verbessert werden (Nieder und Nestle, 2000). Letztendlich entscheiden so genannte Prognosefaktoren über das Behandlungsergebnis und damit über die Überlebenszeit. Eine

entscheidende Rolle für das Gesamtüberleben spielen demnach das Alter des Patienten sowie der performance status des Tumors (Lutterbach et al, 2003; Curan et al 1993). Des Weiteren konnten andere Prognosefaktoren herausgearbeitet werden: Die Lage des Tumors wird als ein entscheidender Faktor angesehen, je zentraler der Sitz des Tumors desto ungünstiger für das mediane Überleben (Liigant et al., 2001). Auch ein niedriges Hämoglobin korreliert negativ mit den Überlebensraten (Chow et al., 1999). Doch rücken neuere Therapieversuche mit Erythropoetin eine neue Therapieoption ins Blickfeld (Cerami et al., 2001; Brines et al, 2000). Ein weiterer Prognosefaktor ist die Laktatdehydrogenase (LDH), welche diesbezüglich schon für verschiedene Krebsarten herangezogen wird (Huijgen et al., 1997). Dass die Laktatdehydrogenase auch bei Hirntumoren als Prognosefaktor herangezogen werden kann, postulierte Buckell schon 1965 (Buckell et al., 1965), dieses wurde von Smrcka et al. 1983 bestätigt (Smrcka et al., 1983).

Der enorme Fortschritt in der Molekularbiologie machte es möglich, die biologischen und genetischen Grundlagen für das Entstehen von Krankheiten zu verstehen. Dies kommt auch der Therapie des Glioblastoms zugute (Brock et al, 1997; Kyritsis et al, 1996). Die neueren Therapieansätze können so viel besser auf die speziellen Eigenschaften des Glioblastoms zielen, wie zum Beispiel auf die Angiogenese, die DNS-Reparaturmechanismen, die Apoptose und die Zell- Zykluskontrolle (Wen et al, 1995).

Viel wichtiger ist allerdings die Einsicht, dass eine Heilung immer noch nicht in greifbare Nähe gerückt ist, da die uneinheitliche Beschaffenheit der Glioblastome und ihre Resistenz gegenüber den heutigen Therapiemöglichkeiten dies verhindert (Davis et al, 1998). Die heutigen Therapieoptionen versuchen also nicht hauptsächlich eine Heilung zu erreichen, sondern lediglich das Tumorwachstum zu kontrollieren (Fine, 1995). Des weiteren gehen die Bemühungen eher dahin, die Therapie schonender zu gestalten, indem man neuere synthetische Analoga der bekannten zytostatischen Wirkstoffe verwendet (Ingber et al., 1990; Levin et al.; 1992; Takamiya et al., 1994) oder abgewandelte Formen, von denen

einige in der Lage waren in umgewandelten Zellen Apoptose zu induzieren (Delia et al., 1993). haben

Um die Lebensqualität der Patienten möglichst wenig zu beeinträchtigen, ist man dazu übergegangen sich auf Therapieformen zu stützen, die zwar eine Wirkung gegen Glioblastome aufweisen, jedoch über eine geringere Zytotoxizität und eine geeignetere Applikationsform verfügen (Mount et al., 1994; Scott 1997; Weitzner et al., 1997).

Das Glioblastom entsteht als ein Endprodukt eines vielschichtigen Prozesses, der viele verschiedenen Angriffe auf die physiologischen Prozesse, wie das Zellwachstum, die Angiogenese, den programmierten Zelltod und die Migration umfasst (Mikkelsen et al., 1991; Biernat et al., 1997; Bjerkvig et al., 1997). Einerseits kann das Glioblastom als spontane Neumutation entstehen oder aber sich aus den verschiedenen niedriger malignen Vorstufen entwickeln. Es wurden verschiedene genetische Veränderungen identifiziert, die daran maßgeblichen Anteil haben (Kyritsis et al., 1996; Binger et al., 1990; Kyritsis et al., 1993). Die ältesten dieser Chromosomenaberrationen, die in niedrig malignen Gliomen entdeckt worden sind, sind der Verlust von 17p (dort ist das p53 Gen lokalisiert), der Verlust von 13q (dort ist das Retinoblastom- Gen lokalisiert), und der partielle oder vollständige Verlust von Chromosom 22. Der kritische Punkt für die Transformation zum Glioblastom ist jedoch der Verlust von 10q und die Erweiterung des EGFR Gens (Kyritsis et al., 1996; Binger et al., 1990; Kyritsis et al., 1993). In diesem Zusammenhang ist auch die neuste Entdeckung des MMAC1 Tumorsuppressorgens auf Chromosom 10 von großer Bedeutung für das Verständnis des molekularbiologischen Entstehungsprozesses des Glioblastoms (Steck et al., 1997).

In den neu diskutierten Behandlungsstrategien taucht immer wieder die Hemmung der Angiogenese auf. Die Angiogenese wird als ein bedeutender Faktor für das Wachstum von Glioblastomen und somit wieder als ein Ansatz für die Therapie betrachtet (Bjerkvig et al., 1997; Folkman, 1990; 1997). Der Grad der Vaskularisation korreliert eng mit dem Differenzierungsgrad von Tumoren, nicht zuletzt, weil Tumoren mit einer höheren Wachstumsrate auch eine bessere Gefäßversorgung benötigen

um eine optimale Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen zu gewährleisten (Plate et al., 1995). Thalidomid, welches als Sedativum aufgrund seiner Toxizität vom Markt genommen wurde, konnte in verschiedenen Tierexperimenten eine Anti-Angiogenese-Wirkung unter Beweis stellen (D'Amato et al., 1994). In der ersten Phase II Studie mit Thalidomid konnte zwar kein Durchbruch erzielt werden, nicht zuletzt wegen der vielen Nebenwirkungen, dennoch konnte das erste Mal der Anti-Angiogenese-Effekt gegen Glioblastome nachgewiesen werden (Fine et al., 2000). Die Angiogenese ist mitverantwortlich für das Wachstum von Tumoren. Insbesondere Glioblastome sind streckenweise sehr stark vaskularisiert und werden gerne als Modell für die Erforschung und Untersuchung von Faktoren, die für die Angiogenese verantwortlich sind, herangezogen; andererseits können sie gut als Modell für Therapiestudien mit Angiogeneseinhibitoren wie Angiostatin oder Endostatin dienen.

Ein anderer Angriffspunkt ist VEGF. VEGF ist ein Angiogenesefaktor, der die Proliferation von Endothelzellen stimuliert und eine wichtige Rolle für die Neovaskularisation bei malignen Glioblastomen spielt (Plate KH et al, 1994). Beim Glioblastom steigt die VEGF Produktion als Reaktion auf Hypoxie und hohe VEGF Konzentrationen werden vor allem in der Umgebung von Nekrosezonen gefunden (Plate et al., 1992; 1995). Dieses lässt den Schluss zu, dass die VEGF Produktion die Glioblastome in die Lage versetzt trotz der hypoxischen Bedingungen, die aus dem schnellen Wachstum resultieren, eine verbesserte Versorgungssituation herbeizuführen (Plate KH et al, 1993). Diese Beobachtungen legen nahe, die Hemmung von VEGF als einen vielversprechenden Ansatz in der Anti-Angiogenese Therapie zu erproben (Jensen, 1998; Plate et al., 1994; Stratmann et al., 1997).

Ein ganz neuer Ansatz in der Therapie des Glioblastoms ist die Anwendung von lokal applizierbaren Chemotherapeutika direkt in die Tumorkavität (Gliadel). Dabei wird das Chemotherapeutikum BCNU (Carmustin) auf ein biologisch abbaubares Polymer gegeben und nach der Entfernung des Tumors direkt in die Tumorkavität eingelegt.

In einer Phase III Studie der Arbeitsgruppe von Westphal wurde eine placebokontrollierte, verblindete Studie mit 140 Patienten durchgeführt. Beide Gruppen wurden zusätzlich einer konventionellen Bestrahlung zugeführt. Es fand sich ein medianer Überlebensvorteil der Gruppe mit dem Gliadel von 13,9 gegenüber 11,6 Monaten (Westphal et al, 2003).

Durch das bessere Verständnis der komplexen biologischen Beschaffenheit der Glioblastome zeichnet sich ein neuer Weg in den Therapiemöglichkeiten ab, weg von den heute vorherrschenden zytotoxischen Therapien hin zu einer Kombination von zytotoxischen Medikamenten mit Wirkstoffen, die gezielt an der Biologie der Glioblastome angreifen. Auch die weiteren Entwicklungen von Pharmaka, die die Strahlenresistenz der Glioblastome senken, werden zwar den Tumor in naher Zukunft nicht heilen, aber unter Umständen die immer noch schlechte Überlebenszeit verlängern oder zumindest die Lebensqualität der Patienten verbessern können. Es bleibt abzuwarten, ob Gemzitabin und Temodal in neuen Untersuchungen an Patienten das halten können, was sie zumindest im Experiment versprechen.

5 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme ist der häufigste maligne Hirntumor. Seine Tumorzellen zeichnen sich durch ein unkontrolliertes, infiltratives Wachstum in das sie umgebende Hirngewebe aus. Da die biologischen Mechanismen, die für diese Eigenschaften verantwortlich sind, noch nicht vollständig geklärt sind, sind somit auch die therapeutischen Möglichkeiten der Beeinflussung eingeschränkt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von kombinierter Radiochemotherapie, im Vergleich zu Chemotherapie und Radiotherapie alleine, auf das Proliferations- und Migrationsverhalten maligner Glioblastome *in vitro* untersucht. Es wurde ein dreidimensionales multizelluläres Sphäroidmodell aus den beiden permanenten Zelllinien GaMg und U87 verwendet. Für Untersuchungen über Bestrahlung und Strahlensensibilisierung durch Gemzitabin und Temodal an humanen Glioblastomzellen eignen sich Sphäroide sehr gut, da bei Sphäroiden der Tumoraufbau, das genetische Profil, die Zellzyklusverteilung, die Komponenten der extrazellulären Matrix und der Zellaufbau *in vivo* Verhältnissen nahe kommt.

Die verwendeten Chemotherapeutika waren Temodal und Gemzitabin, wobei Temodal bereits heute in der Hirntumorthherapie eingesetzt wird und die Eigenschaften des Gemzitabin hinsichtlich seiner strahlensensibilisierenden Wirkung viel versprechend sind. Die beiden Chemotherapeutika wurden in drei verschiedenen Dosen zu den herangezüchteten Sphäroiden hinzugegeben und nach 24- stündiger Inkubation der Bestrahlung zugeführt. Die Bestrahlung erfolgte mit einem Linearbeschleuniger, wobei wegen der größeren Strahlenempfindlichkeit der U87 Zellen eine Dosisreduktion erfolgte. Die in einer Einzelsitzung applizierte Gesamtdosis betrug 10 (GaMg) bzw. 5 (U87) Gy.

Es fand sich sowohl in den Proliferations- als auch in den Migrationsuntersuchungen eine dosisabhängige Reduktion des Wachstums. In den Kombinationsexperimenten (Radiochemotherapie) war dieser Effekt als additiv zu werten.

Zellproliferation und Zellmigration sind zwei verschiedene biologische Eigenschaften von malignen Glioblastomzellen. Es konnte gezeigt werden, dass mit Strahlentherapie und Chemotherapie in Kombination diese besonderen Eigenschaften beeinflusst werden können. Möglicherweise liegt die Ursache in der Wirkungsverstärkung bei den Kombinationsexperimenten darin, dass auch Zellen, die bei nur einer Therapieform ihre Fähigkeit zur Proliferation behalten und nach einer Ruhephase erneut in den Zellzyklus eintreten, erfasst werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Akslen LA, Andersen KJ, Bjerkvig R: Characteristics of human rat and glioma cells grown in a defined medium. **Anticancer Res** 1988; 8: 797-804.
2. Allam A, Taghian A, Gioioso D, Duffy M, Suit HD. Intratumoral heterogeneity of malignant gliomas measured *in vitro*. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1993, 30; 27:303-308.
3. Baker CH, Banzon J, Bollinger JM, Stubbe J, Samano V, Robins MJ, Lippert B, Jarvi E, Resvick R. 2'- deoxy- 2'- methylenecytidine and 2'- deoxy-2',2'-difluorocytine 5'-diphosphates: Potent mechanism- based inhibitors of ribonucleotide reductase. **J Med Chem** 1991; 34: 1879-1884.
4. Balmaceda C, Fetell MR, Hesdorffer C. Thiotepa and etoposide treatment of recurrent malignant gliomas: phase I study. **Cancer Chemother Pharmacol** 1997; 40:72-74.
5. Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. **Acta Neuropathol (Berl.)** 1997; 94: 303- 309.
6. Bigner SH, Vogelstein B. Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma. **Brain Pathol** 1990; 1: 12- 18.
7. Bjerkvig R. Spheroid culture in cancer research. **Boca Raton FL:CRC** 1992
8. Bjerkvig R, Lund- Johansen M, Edvardsen K. Tumor cell invasion and angiogenesis in the central nervous system. **Curr Opin Oncol** 1997; 9: 223-229.

9. Bloom HJC. Intracranial tumors: response and resistance to therapeutic endeavours, 1970-1980. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1982; 8: 1083-1113.

10. Bower M, Newlands ES, Bleehen NM, Brada M, Begent RJ, Calvert H, Colquhoun I, Lewis P, Brampton MH. Multicentre CRC phase II trial of temozolomide in recurrent or progressive high- grade glioma. **Cancer Chemother Pharmacol** 1997; 40: 484- 488.

11. Brines ML, Ghezzi P, Kheenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:10526-10531.

12. Britten CD, Rowinsky EK, Baker SD, Agarwala SS, Eckardt JR, Barrington R, Diab SG, Hammond LA, Johnson T, Villalona-Calero M, Fraass U, Statkevich P, Von Hoff DD, Eckhardt SG. A Phase I and pharmacokinetic study of temozolomide and cisplatin in patients with advanced solid malignancies. **Clin Cancer Res** 1999; 5: 1629- 1637.

13. Brock CS, Bower M. Current perspectives in gliomas. **Med Oncol** 1997; 14: 103- 120.

14. Buckell M, Robertson MC. Enzyme studies in cerebral tumors. Lactate dehydrogenase, glucose phosphatase isomerase, acid and alkaline phosphatase in plasma, ventricular cerebrospinal fluid and tumor cyst fluid from cases of glioma and cerebral secondary glioma. **Br J Cancer** 1965; 19:83-91.

15. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff PG, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. **J Clin Oncol 1997; 15: 2403- 2413.**
16. Carlsson J, Brunk U. The fine structure of three- dimensional colonies of human glioma cells in agarose culture. **Acta Pathol Microbiol Scand 1977a; 85A: 183- 192.**
17. Carlsson J. A proliferation gradient in three- dimensional colonies of cultured human glioma cells. **Int J Cancer 1977b; 20: 129- 136.**
18. Carlsson J, Nilsson K, Westermark B, Ponten J, Sundström C, Larsson E, Bergh J, Pohlmann S, Busch C, Collins VP. Formations and growth of multicellular spheroids of human origin. **Int J Cancer 1983a; 31:523-533.**
19. Carlsson J, Nederman T. A method to measure the radio and chemosensitivity of human spheroids. **Adv Exp Med Biol. 1983b;159:399- 417.**
20. Carlsson J, Yuhas JM: Liquid –overlay culture of cellular spheroids. In: Recent Results in Cancer Research. Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland RM (Editors), Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1984, pp1-23.
21. Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. **Recent Results Cancer Res. 1984; 95:1-23.**
22. Carmichael J, Possinger K, Phillip P, Beykirch M, Kerr H, Walling J, Harris AL. Advanced breast cancer: A phase II trial with gemcitabine. **J Clin Oncol 1995; 13: 2731-2736.**

23. Casciari JJ, Sotirchos SV, Sutherland RM. Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration and extracellular pH. **J Cell Physiol 1992; 151: 386- 394.**
24. Cerami A, Brines ML, Ghezzi P, Cerami CJ. Effects of epoetin alfa on the central nervous system. **Semin Oncol 2001; 28: 66-70.**
25. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology. **J Clin Oncol 1995; 13: 1009- 1022.**
26. Chen M, Hough AM, Lawrence TS. The role of p53 in gemcitabine-mediated cytotoxicity and radiosensitization. **Cancer Chemother Pharmacol 2000; 45: 369-74.**
27. Chignola R, Foroni R, Franceschi A, Pasti M, Candiani C, Anselmi C, Fracasso G, Tridente G, Colombatti M. Heterogeneous response of individual multicellular tumor spheroids to immunotoxins and ricin toxins. **Br J Cancer 1995; 72: 607- 614.**
28. Chow E, Danjoux CE, Pataki I, Franssen E, Jenkin RD. Effect on hemoglobin on radiotherapy response in children with medulloblastoma: should patients with a low hemoglobin be transfused? **Med Pediatr Oncol 1999; 32: 395-397.**
29. Choy H. Combination Chemoradiotherapy with Gemcitabine: Potential Applications. **Oncology 2000; 14 (7 suppl 4): 20-25.**
30. Curran WJ, Scott CB, Horton J, Nelson JS, Weinstein AS, Fischbach AJ, Chang CH, Rotman M, Asbell SO, Krisch RE, et al. Recursive partitioning analysis of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group malignant glioma trials. **J Natl Cancer Inst 1993; 85: 704-710.**

31. Dahm-Daphi J. p53: biology and role for cellular radiosensitivity. **Strahlenther Onkol** 2000; 176: 278- 285.
32. D´Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91: 4082- 4085.
33. Davis FG, Freels S, Grutsch J, Barlas S, Brem S. Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results, 1973- 1991. **J Neurosurg** 1998; 88: 1-10.
34. DeAngelis LM, Burger PC, Green SB, Cairncross JG. Malignant glioma: Who benefit's from adjuvant chemotherapy? **Ann Neurol** 1998; 44: 691- 695.
35. Delia D, Aiello A, Lombardi L, Pelicci PG, Grignani F, Formelli F, Menard S, Costa A, Veronesi U. N-(4- hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. **Cancer Res** 1993; 53: 6063- 6041.
36. Dertinger H, Hülser D. Increased radioresistance of cells in cultured multicell spheroids. I. Dependence on cellular interaction. **Radiat Environ Biophys** 1981; 19: 101- 107.
37. Dertinger H, Hinz G, Jakobs KH. Intercellular communication, three-dimensional cell contact and radiosensitivity. **Biophys Struct Mech** 1982; 9: 89-93.
38. Dertinger H, Guichard M, Malaise EP. Is there a relationship between hypoxia, contact resistance, and intercellular communication? **Radiat Environ Biophys** 1983; 22: 209- 214.

39. Dertinger H, Hülser DF. Intercellular communication in spheroids. In: Acker H, Carlsson J, Durand R, Sutherland RM: Spheroids in cancer research. Vol 95: 67- 83, Springer Verlag, Heidelberg, 1984.
40. Durand RE, Sutherland RM. Effects on intercellular contact on repair of radiation damage. **Exptl Cell Res 1972a; 71: 75- 80.**
41. Durand RE, Sutherland RM. Radiation-resistant tumor cells may be more sensitive *in vitro*. **Cancer Res 1972b; 32: 2587-2588.**
42. Durand RE. Radioprotection by WR- 2721 *in vitro* at low oxygen tensions: implications for its mechanisms of action. **Br J Cancer, 1983; 47: 387- 392.**
43. Durand RE, Sutherland RM. Radiation studies with spheroids. **Recent Results Cancer Res. 1984; 95:103-115.**
44. Durand RE. Contributions of flow cytometry to studies with multicell spheroids. **Methods Cell Biol 1994; 42B: 405-422.**
45. EORTC Brain Tumor Group. Effect of CCNU on survival, rate of objective remission and duration of free interval in patients with malignant brain glioma- First evaluation. **Eur J Cancer 1976 ;12: 41-45.**
46. EORTC Brain Tumor Group. Effect of CCNU on survival rate of objective remission and duration of free interval in patients with malignant brain glioma- Final evaluation. **Eur J Cancer 1978; 14: 851-856.**
47. Fine HA, Dear KB, Loeffler JS, Black PM, Canellos GP. Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults. **Cancer 1993; 71: 2585-2597.**

48. Fine HA. The basis for current treatment recommendations for malignant Gliomas. **J Neurooncol 1994; 20: 111.**
49. Fine HA. Novel biologic therapies for malignant gliomas. Antiangiogenesis, immunotherapy and gene therapy. **Neurol Clin 1995; 13: 827- 846.**
50. Fine HA, Figg WD, Jaeckle K, Wen PY, Kyritsis AP, Loeffler JS, Levin VA, Black PM, Kaplan R, Pluda JM, Yung WK Phase II trial of the antiangiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas. **J Clin Oncol 2000; 18: 708- 715.**
51. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent (Editorial) **J Natl Cancer Inst 1990; 82: 4- 6.**
52. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition: an overview. **EXS 1997; 79: 1- 8**
53. Fox RM. Changes in deoxynucleoside triphosphate pools induced by inhibitors and modulators of ribonucleotide reductase. **Pharmacol Ther 1985; 30: 31-42.**
54. Fram RJ, Kufe DW. Inhibition of DNA excision repair of x- ray induced DNA damage by cytosine arabinoside and hydroxyurea. **Pharmacol Ther 1985; 31: 165-176.**
55. Fram RJ, Sullivan J, Marinus MG. Mutagenesis and repair of DNA damage caused by nitrogen mustard, N,N'-bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea (BCNU), streptozotocin, and mitomycin C in E. coli. **Mutat Res 1986; 166: 299-42.**

56. Francia G, Man S, Teicher B, Grasso L, Kerbel RS. Gene expression analysis of tumor spheroids reveals a role for suppressed DNA mismatch repair in multicellular resistance to alkylating agents. **Mol Cell Biol** 2004 ; **24: 6837- 6849**.
57. Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, Ashley DM, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, Marchev F, Seman AJ, Cokgor I, Rich J, Stewart E, Colvin OM, Provenzale JM, Bigner DD, Haglund MM, Friedman AH, Modrich PL: DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. **J Clin Oncol**. 1998; **16:3851-7**.
58. Fritz P, Weber KJ, Frank C, Flentje M. Differential effects of dose rate and superfractionation on survival and cell cycle of V79 cells from spheroid and monolayer culture. **Radiother Oncol** 1996; **39: 73-79**.
59. Fueyo J, Gomez- Manzano C, Yung WKA, Kyritsis AP. The functional role of tumor suppressor genes in gliomas. **Neurology** 1998; **51:1250-1255**.
60. Genc M, Castro Kreder N, Barten-van Rijbroek A, Stalpers LJ, Haveman J. Enhancement of effects of irradiation by gemcitabine in a glioblastoma cell line and cell line spheroids. **J Cancer Res Clin Oncol** 2004; **130: 45-51**.
61. Glioma Meta-Analysis Trialists Group: Chemotherapy in adult high-grade glioma : A systematic review and meta- analysis of individual patient data from 12 randomised trials. **Lancet** 2002; **359: 1011-1018**.

62. Gregoire V, Beauduin M, Rosier JF, DeCoster B, Bruniaux M, Octave-Prignot M, Scalliet P. Kinetics of mouse jejunum radiosensitization by 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) and its relationship with pharmacodynamics of DNA synthesis inhibition and cell cycle redistribution in crypt cells. **Br J Cancer** 1997; **76**: 1315- 1321.
63. Grunewald R, Kantarjian H, Du M, Faucher K, Tarassoff P, Plunkett W. Gemcitabine in leukemia: a phase I clinical, plasma, and cellular pharmacology study. **J Clin Oncol** 1992; **10**: 406- 413.
64. Guenther W, Pawlak E, Damasceno R, Arnold H, Terzis AJ. Temozolomide induces apoptosis and senescence in glioma cells cultured as multicellular spheroids. **Br J Cancer** 2003; **88**: 463- 469.
65. Gutin PH, Hilton J, Fein VJ, Allen AE, Walker MD. S1 nuclease from *Aspergillus oryzae* for the detection of DNA damage and repair in the gamma- irradiated intracerebral rat gliosarcoma 9L. **Radiat Res** 1977; **72**: 100-106.
66. Gutin PH, Levin VA. Surgery, radiation and chemotherapy in the treatment of malignant brain tumors. In: **Thompson RA, Green JR: Controversies in Neurology, 67-86, Raven Press, New York, 1983.**
67. Haase W, Molls M, Hess CF, Richter J, Kamprad F, Seegenschmiedt H und Schnabel K. (Herausgeber). **Leitlinien in der Radioonkologie; Radiotherapie von primären Tumoren des Zentralnervensystems und ZNS- Metastasen im Erwachsenenalter, Stand Oktober 1999.**
68. Haji- Karim M, Carlsson J. Proliferation and viability in cellular spheroids of human origin. **Cancer Res** 1978; **38**: 1457- 1464.

69. Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-β-D-arabinofuranosylcytosine. **Cancer Res 1988; 48: 4024- 4038.**
70. Heinemann V, Quietzsch D, Gieseler F et al. A phase II trial comparing gemcitabine plus cisplatin vs. gemcitabine alone in advanced pancreatic carcinoma. **Proc Am Soc Clin Oncol 2003; 22:250.**
71. Herrmann T, Baumann M. Klinische Strahlenbiologie **Urban und Fischer Verlag München, 1997.**
72. Hernández P, Olivera P, Duenas.Gonzales A, Perez-Pastenes MA, Zarate A, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. Gemcitabine activity in cervical cancer cell lines **Cancer Chemother Pharmacol 2001, 48: 488-492.**
73. Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, PooreGA, Todd CG, Grindey GB. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine). **Cancer Res, 1990; 50: 4417- 4422.**
74. Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Israel MA. Molecular genetics of brain tumors. **Arch Neurol 1999; 56:439- 441.**
75. Holtfreter J. A study of the mechanisms of gastrulation. **Journal of Experimental Zoology 1944; 95, 171-212.**
76. Hong WK. Retinoids and human cancer. **In: Sporn MD, Roberts AB and Goodman DS eds.; The retinoid: biology, chemistry, and medicine, 2nd Edition New York: Raven Press 1994; 597-602.**
77. Huang P, Chubb S, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W. Action of 2',2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. **Cancer Res 1991; 51: 6110- 6117.**

78. Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Vreeken J, Bossuyt PM. The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. **Eur J Clin Chem Clin Biochem** 1997; **35**: 569- 579.
79. Iliakis G, Kurtzman S, Pantelias G, Okayasu R. Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: Effect of BrdU on radiation induction of DNA and chromosome damage and it's correlation with cell killing. **Radiat Res** 1989; **119**: 286-304.
80. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and supress tumor growths. **Nature** 1990; **348**: 555- 557.
81. Janinis J, Efstathiou E, Panopoulos C, Samantas E, Aravantinos G, Christodoulou C, Skarlos D. Phase II study of temozolomide in patients with relapsing high- grade glioma and poor performance status. **Med Oncol** 2000; **17**: 106- 110.
82. Jensen RL. Growth factor- mediated angiogenesis in the malignant progression of glial tumors: a review. **Surg Neurol** 1998; **49**: 189- 195.
83. Kaaijk P, Troost D, Das PK, Leenstra S, Bosch DA. Long- term culture of organotypic multicellular glioma spheroids: a good culture modell for studying gliomas. **Neuropathol Appl Neurobiol** 1995; **21**:386
84. Kaaijk P, Troost D, Sminia P, Hulshof MC, van der Kracht AH, Leenstra S, Bosch DA. Hypofractionated radiation induces a decrease in cell proliferation but no morphological damage to organotypic multicellular spheroids of human glioblastomas. **Eur J Cancer** 1997; **33**: 645-651
85. Kallio M, Sankila R, Jääskeläinen J, Karjlainen S, Hakulinen T. A population-based study on the incidence and survival rates of 3857 glioma patients diagnosed from 1953 to 1984. **Cancer** 1991; **68**: 1394-1400.

86. Kaufmann M, von Minckwitz G. Gemcitabine in ovarian cancer: an overview of safety and efficacy. **Eur J Cancer** 1997; **33 Suppl 1: 31- 33.**
87. Kaye SB. Gemcitabine: Current status of phase I and II trials. **J Clin Oncol** 1994; **12: 1527-1531.**
88. Kerbel RS, Kobayashi H, Graham CH. Intrinsic or acquired drug resistance and metastasis: are they linked phenotypes? **J Cell Biochem** 1994a; **56: 37- 47.**
89. Kerbel RS, Rak J, Kobayashi H, Man MS, St Croix B and Graham CH. Multicellular resistance: a new paradigm to explain aspects of acquired drug resistance of solid tumors. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 1994b; **59: 661- 672.**
90. Kinsella TJ, Dobson PA, Mitchell JB, Fornace AJ. Enhancement of x-ray induced DNA damage by pre-treatment with halogenated pyrimidine analogs. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1987; **13: 733-739.**
91. Kinsella TJ. Radiosensitization and cell kinetics: Clinical implications for 5-phase specific radiosensitizers. **Semin Oncol** 1992; **19: 41-47.**
92. Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G, Burger PC, Cavenee WK. The WHO classification of tumors of the nervous system. **Neuropathol Exp Neurol**, 2002, **61:226-229.**
93. Knedlitschek G, Anderer U, Weibezahn KF, Dertinger H. Radioresistance of rat glioma cell lines cultured as multicellular spheroids. Correlation with electrical cell- to- cell coupling. **Strahlenther Onkol** 1990; **166: 164- 167.**
94. Knuechel R, Sutherland RM. Recent developments in research with human tumor spheroids. **Cancer J** 1990; **3: 234-243.**

95. Kwok TT, Twentyman PR. The relationship between tumor geometry and the response of tumor cells to cytotoxic drugs- an *in vitro* study using EMT6 multicellular spheroids. **Int J Cancer 1985; 35: 675- 682.**
96. Kyritsis AP, Saya H. Epidemiology, cytogenetics and molecular biology of brain tumors. **Curr Opin Oncol 1993; 5: 474- 480.**
97. Kyritsis AP, Yung WK. Molecular genetics and tumor suppressor genes in gliomas. **Baillieres Clin Neurol 1996; 5: 295-305.**
98. Lamond JP, Mehta MP, Boothman DA. The potential of topoisomerase I inhibitors in the treatment of CNS malignancies: report of a synergistic effect between topotecan and radiation. **J Neurooncol 1996; 30: 1-6.**
99. Latz D, Fleckenstein K, Eble M, Blatter J, Wannemacher M, Weber KJ. Radiosensitizing potential of gemcitabine(2',2'- difluoro-2'-deoxycytidine) within the cell cycle *in vitro*. **Int J Radiat Oncol Biol Phys 1998; 41:875-882.**
100. Lawrence TS, Eisbruch A, Shewach DS. Gemcitabine-mediated radiosensitization. **Semin Oncol 1997a; 24(2 Suppl 7):S7-24-S7-28.**
101. Lawrence TS, Chang EY, Hahn TM, Shewach DS. Delayed radiosensitization of human colon carcinoma cells after brief exposure to 2', 2'- difluoro-2'-deoxycytidine (gemcitabine). **Clin Cancer Res 1997b; 3: 777-782.**
102. Lawrence TS, Eisbruch A, McGinn CJ, Fields MT. Radiosensitization by gemcitabine. **Oncology 1999; 13: Suppl 5: 55-60.**
103. Leibel SA. Radiation Therapy for neoplasms of the brain. **J Neurosurg 1987; 66: 1-22.**

104. Levin VA, Prados MD, Yung WK, Gleason MJ, Ictech S, Malec M. Treatment of recurrent gliomas with eflornithine. **J Natl Cancer Inst** 1992; **84: 1432- 1437.**
105. Levine M. The action of colchicine on cell division in human cancer animal and plant tissue. **Ann NY Acad Sci** 1951; **51: 1365-1408.**
106. Liigant A, Kulla A, Linnamagi U, Asser T, Kaasik AE . Survival of patients with primary CNS tumors in Estonia. **Eur J Cancer** 2001; **37: 1895-1903.**
107. Ling LL, Ward JF. Radiosensitization of Chinese hamster V79 cells by bromodeoxyuridine substitution of thymidine: Enhancement of radiation-induced toxicity and DNA strand break production by monofilar and bifilar substitution. **Radiat Res** 1990; **121: 76-83.**
108. Lutterbach J, Sauerbrei W, Guttenberger R. Multivariate Analysis of Prognostic Factors in Patients with Glioblastoma. **Strahlenther Onkol** 2003; **179: 8-15.**
109. Maiuri F, Benvenuti D, Gangemi M, Corriero G, Giamundo A, De Chiara A. Spinal subarachnoidal metastasis from primary intracranial gliomas. **Acta Neurologica** 1980; **35: 399-405.**
110. Mason KA, Milas L, Hunter NR, Elshaikh M, Buchmiller L, Hittelman KW, Kian Ang K. Maximizing therapeutic gain with gemcitabine and fractionated radiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1999; **44:1125- 1135.**
111. Matsumoto Y, Fujiwara T, Nagao S. Determinants of drug response in camptothecin-11-resistant glioma cell lines. **J Neurooncol.** 1995;**23(1):1-8.**
112. Mikkelsen T, Cairncross JG, Cavenee WK. Genetics of the malignant progression of astrocytoma. **J Cell Biochem** 1991; **46: 3- 8.**

113. Milas L, Fujii T, Hunter N, Elshaikh M, Mason KA, Plunkett W, Kian Ang K, Hittelman W. Enhancement of tumor response in vivo by gemcitabine. **Cancer Res 1999; 59: 107-114.**
114. Miller FR, Mc Eachern D, Miller BE. Growth regulation of mouse mammary tumor cells in collagen gel cultures by diffusible factors produced by normal mammary gland epithelium and stromal fibroblasts. **Cancer Res 1989; 49: 6091- 6097.**
115. Moscona A., Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. **Exp Cell Res 1952; 3: 535-539.**
116. Moscona A. Formation of lentoids by dissociated retinal cells of the chick embryo. **Science 1957a;125: 598-599.**
117. Moscona A. The development *in vitro* of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. **Proc Natl Acad Sci USA 1957b; 43: 184-194.**
118. Moscona A. Rotation- mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. **Exp Cell Res 1961; 22: 455-475.**
119. Mose S, Karapetian M, Jüling- Pohlitz L, Taborski B, Damrau M, Ramm U, Rahn AN, Böttcher HD. Verstärkung der radiotherapeutischen Wirkung auf HeLa- Zellen durch Gemcitabine. **Strahlenther Onkol 1999; 175: 78-83.**
120. Mose S, Karapetian M, Jüling- Pohlitz L, Taborski B, Damrau M, Ramm U, Rahn AN, Böttcher HD. Radiation enhancement of Gemcitabine in two human squamous cell carcinoma lines. **Anticancer Res 2000; 20: 401-406.**

121. Mose S, Class R, Weber HW, Oszvald A, Rahn A, Brady LW, Bottcher HD. Combined radiotherapy and gemcitabine. Evaluation of clinical data based on experimental knowledge. **Strahlenther Onkol** 2002; **178**: 59-70.
122. Mount BM, Hamilton P. When palliative care fails to control suffering. **J Palliat Care** 1994; **10**: 24- 30.
123. Mueller-Klieser W. Multicellular spheroids: a review on cellular aggregates in cancer research. **J Cancer Res Clin Oncol** 1987; **113**: 101-122.
124. Muller PJ, Wilson BC. Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas. **J Clin Laser Med Surg** 1996; **14**: 263-270.
125. Nakatsu S, Kondo S, Kondo Y, Yin D, Peterson JW, Kaakaji R, Morimura T, Kikuchi H, Takeuchi J, Barnett GH. Induction of apoptosis in multi-drug resistant (MDR) human glioblastoma cells by SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11. **Cancer Chemother Pharmacol** 1997; **39**: 417- 423.
126. Neshateh- Riz A, Angerson WJ, Reeves JR, Smith G, Rampling R, Mairs RJ. Incorporation of iododeoxyuridine in multicellular glioma spheroids: implications for DNA- targeted radiotherapy using Auger electron emitters. **Br J Cancer** 1997; **75**: 493- 499.
127. Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre- clinical development and clinical trials. **Cancer Treat Rev** 1997; **23**: 35-61.

128. Nieder C, Nestle U, Ketter R, Kolles H, Gentner SJ, Steudel WI, Schnabel K. Hyperfractionated and accelerated-hyperfractionated radiotherapy for glioblastoma multiforme. **Radiat Oncol Investig.** 1999;7: 36-41.
129. Nieder C, Nestle U. A review of current and future treatment strategies for malignant astrocytomas in adults. **Strahlenther Onkol** 2000; 176: 251-258.
130. Olive PL, Banath JP, MacPhail HS. Lack of a correlation between radiosensitivity and DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. **Cancer Res** 1994a; 54: 3939- 3946.
131. Olive PL, Durand RE. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. **Cancer Metastasis Rev** 1994b; 13: 121-138.
132. Olive PL, Banath JP, Durand RE. Detection of subpopulations resistant to DNA-damaging agents in spheroids and murine tumors. **Mutat Res** 1997; 375: 157- 165.
133. Ostruszka LJ, Shewach DS. The role of cell cycle progression in radiosensitization by 2',2'-difluoro-2'-deoxycytidine. **Cancer Res** 2000; 60: 6080-6088.
134. Pasquier B, Pasquier D, Golet A, Panh MH, Couderc P. Extraneural metastases of astrocytomas and glioblastomas. **Cancer** 1980; 45: 112-125
135. Paulsen F, Hoffmann W, Becker G, Belka C, Weinmann M, Classen J, Kortmann RD, Bamberg M. Chemotherapy in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme: ifosfamide versus temozolomide. **Cancer Res Clin Oncol** 1999; 125: 411- 418.

136. Perng R-P, Chen Y-M, Jing- Liu J, Tsai CM, Lin WC, Yang KY, Whang- Peng J. Gemcitabine vs the combination of cisplatin and etoposide in patients with inoperable non- small- cell lung cancer in a phase II randomized study. **J Clin Oncol 1997; 15: 2097-2102.**
137. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumor angiogenesis factor in human gliomas *in vivo*. **Nature 1992; 359: 845- 848.**
138. Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W. Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible *in vivo* regulatory mechanisms. **Int J Cancer 1994; 59:520- 529.**
139. Plate KH, Mennel HD. Vascular morphology and angiogenesis in glial tumors. **Exp Toxicol Pathol 1995; 47: 89- 94.**
140. Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT. The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. **Ann Neurol 1995; 37: 67-73.**
141. Robertson JM, Shewach DS, Lawrence TS. Preclinical studies of chemotherapy and and radiation therapy for pancreatic carcinoma. **Cancer 1996; 78: 674-679.**
142. Rockwell S, Grindey GB. Effect of 2',2'-difluorodeoxycytidine on the viability and radiosensitivity of EMT6 cells *in vitro*. **Oncol Res. 1992; 4: 151-155.**
143. Rodriguez A, Alpen EL, Mendonca M, DeGuzman RJ. Recovery from potentially lethal damage and recruitment time of noncycling clonogenic cells in 9L confluent monolayers and spheroids. **Radiat Res 1988; 114: 515- 527.**

144. Rothenberg ML, Moore MJ, Cripps MC, Andersen J, Portenoy RK, Burris HA 3rd, Green MR, Tarassoff PG, Brown TD, Casper ES, Storniolo AM, von Hoff DD. A phase II trial of gemcitabine in with 5- FU- refractory pancreas cancer. **Ann Oncol 1996; 7: 347- 353.**
145. Rubin P, Gash DM, Hansen JT, Nelson DF, Williams JP. Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation. **Radiother Oncol 1994; 31: 51- 60.**
146. Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Vermorken JB, Peters GJ. 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine) incorporation into RNA and DNA of tumor cell lines. **Biochem Pharmacol 1993; 46: 762- 766.**
147. Salazar OM, Rubin P, McDonald JV, Feldstein ML. High dose radiation Therapy in the treatment of glioblastoma multiforme: a preliminary report. **Int J Radiat Oncol Biol Phys 1976; 712-727.**
148. Salazar OM, Rubin P, Feldstein ML, Pizzutiello R. High dose radiation therapy in the treatment of malignant gliomas: final report. **Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1979 Oct; 5(10):1733-40.**
149. Sandler AB, Ansari R, McClean JA. Hoosier Oncology Group phase II trial of gemcitabine plus cisplatin in non- small-cell lung cancer (abstract 1089). **Proc Am Soc Clin Oncol 1995; 14: 357.**
150. Santini MT, Rainaldi G. Three dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. **Pathobiology 1999; 67:148- 157**
151. Sauer R. Radiation Therapy of brain tumors. In: **Jellinger K. Therapy of malignant brain tumors, 195-276, Springer, 1987.**

152. Sauer R. Gegenwärtiger Stand der Strahlenbehandlung der Gliome hohen Malignitätsgrades. **Aus: Therapie primärer Hirntumoren, W. Zuckerschwerdt Verlag München 1998; 75-83.**
153. Schwenka J, Ignoffo RJ. Temozolimide: A new option for High-Grade Astrozytomas. **Cancer Practice 2000; November/December: Vol.8, No.6.**
154. Scott CB. Quality adjusted survival analysis of malignant glioma patients (see comments). **Control Clin Trials 1997; 18: 277-285.**
155. Shapiro JR, Shapiro WR. The subpopulations and isolated cell types of freshly resected high grade human gliomas: their influence on the tumor's evolution *in vivo* and behavior and therapy *in vitro*. **Cancer Metastasis Rev 1985; 4: 107- 124.**
156. Shewach DS, Hahn TM, Chang E, Hertel L, Lawrence TS. Metabolism of 2',2'- difluoro-2'-deoxycytidine and radiation sensitization of human colon carcinoma cells. **Cancer Res 1994; 54: 3218- 3223.**
157. Shewach DS, Lawrence TS. Radiosensitization of human tumor cells by gemcitabine *in vitro*. **Semin Oncol 1995; 22(4 Suppl 11): 68-71.**
158. Shewach DS, Lawrence TS. Radiosensitization of human solid tumor cell lines with gemcitabine. **Semin Oncol. 1996a Oct; 23 (5 Suppl 10): 65-71.**
159. Shewach DS, Lawrence TS. Gemcitabine and radiosensitization in human tumor cells. **Invest New Drugs. 1996b; 14:257- 263.**
160. Sinclair WK. The combined effect of hydroxyurea and x-rays on Chinese hamster cells *in vitro*. **Cancer Res 1968; 28: 198- 206.**

161. Sinclair WK. Hydroxyurea revisited: A decade of clinical effects studies. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1981; 7: 631-637.
162. Skipper HG, Chapman JB, Bell M: The antileukemic action of combination of certain known antileukemic agents. **Cancer Res** 1951; 11:109- 111.
163. Smith DR, Hardman JM, Earle KM. Contiguous glioblastoma multiforme and fibrosarcoma with extracranial metastasis. **Cancer** 1969; 24: 270- 276.
164. Smitskamp- Wilms E, Pinedo HM, Veerman G, Ruiz van Haperen VWT, Peters GJ. Postconfluent multilayered cell line cultures for selective screening of gemcitabine. **Eur J Cancer** 1998; 34: 921- 926.
165. Smrcka V, Schroder R, Tovarek J, Vojtkova J. Levels of lactate dehydrogenase isoenzymes in the serum and cerebrospinal fluid and the degree of malignancy of brain tumors. **Cesk Neurol Neurochir.** 1983; 46: 89- 95.
166. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nat Genet** 1997; 15: 356- 362.
167. Steiner HH, Herold-Mende C, Bonsanto M, Geletneky K, Kunze S. Zur Prognose von Hirntumoren: Epidemiologie, Überlebenszeit und klinischer Verlauf. **Versicherungsmedizin** 1998; 50: 173-179

168. Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, et al. Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. **Cancer Res** 1987; 15: 5846-5852.
169. Stratmann A, Machein MR, Plate KH. Anti- angiogenic gene therapy of malignant glioma. **Acta Neurochir Suppl (Wien)** 1997; 68: 105- 110.
170. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, Meuli R, Janzer R, Pizzolato G, Miralbell R, Porchet F, Regli L, de Tribolet N, Mirimanoff RO, Leyvraz S. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. **J Clin Oncol** 2002; 20: 1375- 1382.
171. Stuschke M, Budach V, Stuben G, Streffer C, Sack H. Heterogeneity in the fractionation sensitivities of human tumor cell lines: studies in a three dimensional model system. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1995; 32: 395-408.
172. Sutherland RM, MacCredie JA, Inch WR. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. **J Natl Cancer Inst** 1971a; 46: 113- 120.
173. Sutherland RM, Inch WR, MacCredie JA. Phytohemagglutinin (PHA)-induced transformation of lymphocytes from patients with cancer. **Cancer** 1971b; 27:574– 578.
174. Sutherland RM, Durand RE. Hypoxic cells in an *in vitro* tumour model. **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med** 1973; 23: 235- 246.

175. Sutherland RM, Durand RE. Radiation response of multicell spheroids--an *in vitro* tumour model. **Curr Top Radiat Res Q 1976; 11: 87-139.**
176. Sutherland RM, Carlsson J, Durand RE, Yuhas J: Spheroids in cancer research. **Cancer Res 1981, 41: 2980-2994.**
177. Sutherland RM, Durand RE. Growth and cellular characteristics of multicell spheroids. **Recent Results Cancer Res 1984; 95:24- 49.**
178. Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, Gabbert H, Bourrat B, Mueller-Klieser W. Oxygenation and differentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. **Cancer Res 1986a; 46: 5320-5329.**
179. Sutherland RM. Importance of critical metabolites and cellular interactions in the biology of microregions of tumors. **Cancer 1986b; 58: 1668-1680.**
180. Sutherland RM. Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. **Science 1988: 240: 177- 184.**
181. Taghian A, Ramsay J, Allalunis-Turner J, Budach W, Gioioso D, Pardo F, Okunieff P, Bleehen N, Urtasun R, Suit H. Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme. **Int J Radiat Oncol Biol Phys 1993; 25: 243-249.**
182. Takamiya Y, Brem H, Ojeifo J, Mineta T, Martuza RL. AGM- 1470 inhibits the growth of human glioblastoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Neurosurgery 1994; 34: 869- 875.**
183. Tannock IF, Kopelyan I. Influence of glucose concentration on growth and formation of necrosis in spheroids derived from a human bladder cell line. **Cancer Res 1986a; 46: 3105- 3110.**

184. Tannock IF, Kopelyan I. Variation of pO₂ in the growth medium of spheroids: interaction with glucose to influence spheroid growth and necrosis. **Br J Cancer 1986b; 53: 823- 827.**
185. Terzis AJ, Thorsen F, Heese O, Visted T, Bjerkvig R, Dahl O, Arnold H, Gundersen G. Proliferation, migration and invasion of human glioma cells exposed to paclitaxel (Taxol) *in vitro*. **Br J Cancer 1997; 75: 1744- 1752.**
186. Thorsen F, Tysnes BB. Brain tumor cell invasion, anatomical and biological considerations. **Anticancer Res 1997; 17: 4121- 4126.**
187. Tönnis W, Walter W. Das Glioblastoma multiforme. Bericht über 2611 Fälle. In: **Loew F, Weber G. Das Glioblastoma multiforme. Acta Neurochir 1959; 1: 40-62.**
188. Tsang LLH, Quaterman CP, Gescher A, Slack JA. Comparison of the cytotoxicity *in vitro* of temozolomide and dacarbazine, prodrugs of 3- methyl-(triazene-1-yl)imidazole-4-carboxamide. **Cancer Chemother Pharmacol 1991; 27: 342- 346.**
189. Von Deimling AHR, Louis DN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. **Glia 1995; 15: 2328- 2338.**
190. Van de Kelft E. Molecular pathogenesis of astrocytoma and glioblastoma multiforme. **Acta Neurochir (Wien) 1997; 139: 589- 599.**
191. Wara WM. Radiation therapy for brain tumors. **Cancer 1985; 55(9 Suppl):2291-2295.**
192. Wedge SR, Porteus JK, Glaser MG, Marens K, Newlands ES. *In vitro* evaluation of temozolomide combined with x- radiation. **Anticancer Drugs 1997a; 8: 92- 97.**

193. Wedge SR, Porteous JK, Newlands ES. Effect of single and multiple administration of an O6-benzylguanine/temozolomide combination: an evaluation in a human melanoma xenograft model. **Cancer Chemother Pharmacol** 1997b; 40: 266- 272.
194. Weingart JD, Thompson RC, Tyler B, Colvin OM, Brem H. Local delivery of the topoisomerase I inhibitor camptothecin sodium prolongs survival in the rat intracranial 9L gliosarcoma model. **Int J Cancer** 1995; 62: 605- 609.
195. Weitzner MA, Meyers CA. Cognitive functioning and quality of live in malignant glioma patients: a review of the literature. **Psychooncology** 1997; 6: 169- 177.
196. Wen PY, Fine HA, Black MP, Shrieve DC, Alexander E 3rd, Loeffler JS. High grade astrocytomas. **Neurol Clin** 1995; 13: 875- 900.
197. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, Whittle IR, Jaaskelainen J, Ram Z. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. **Neuro Oncol** 2003; 5: 79- 88.
198. Wilson RE, Keng PC, Sutherland RM. Drug resistance in Chinese hamster ovary cells during recovery from severe hypoxia. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81: 1235- 1240.
199. Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedmann H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA. A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. **Br J Cancer** 2000; 83: 588- 593.

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Richter für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und Förderung dieser Arbeit, sowie für die Bereitstellung der erforderlichen technischen Ausstattung.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Arnold und der Klinik für Neurochirurgie, die freundlicherweise ihr Labor zur Verfügung gestellt haben und deren Einrichtung und Wissen mir jederzeit zur Verfügung stand.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. F. Fehlauer für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Dr. Fehlauer war mir als ständiger Ansprechpartner eine große Hilfe während der ganzen Zeit und hatte für alle Schwierigkeiten und Probleme, die auftraten immer ein offenes Ohr.

Ein weiterer großer Dank gilt Frau E. Pawlack, die mich geduldig in dem Labor der Neurochirurgischen Klinik eingearbeitet hat und von der ich viel über den sorgfältigen und umsichtigen Umgang mit Zellkulturen und Sphäroiden lernen konnte.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Nadrowitz, der sich immer die Zeit genommen hat mit mir die Sphäroide am Linearbeschleuniger zu bestrahlen.

Bedanken möchte ich mich bei der Kreitz- Stiftung, die diese Arbeit finanziell gefördert hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Christian für seine Geduld, sein Verständnis und die kleinen und großen Hilfestellungen.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich immer gefördert und unterstützt haben, wo sie konnten.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Martina Münch, geborene Reilmann
Geboren am 7.6.1973 in Hannover
Verheiratet mit Christian Münch

Schulbildung

1979 – 1983	Grundschule Isernhagen
1983 – 1990	Gymnasium Isernhagen
1990 - 1993	Jugenddorf Christophorusschule in Braunschweig, 1993 Abitur

Medizinstudium

10/1996 – 10/1999	Universität Greifswald
09/1999	Physikum
10/1999 – 11/2003	Medizinische Universität zu Lübeck
09/2000	1. Staatsexamen
08/2002	2. Staatsexamen
10/2002 – 09/2003	Praktisches Jahr
11/2003	3. Staatsexamen

Klinische Ausbildung

Seit 02/2004	Ärztin im Praktikum am Israelitischen Krankenhaus in Hamburg, Abteilung für Innere Medizin
--------------	--

Seit 10/2004	Assistenzärztin am Israelitischen Krankenhaus in Hamburg, Abteilung für Innere Medizin
--------------	---

Kongressbeiträge

1. Fehlaue F, Reilmann M, Stalpers LJA, Sminia P; van der Valk; Feyerabend T, Terzis A: Proliferation inhibition in glioblastoma spheroids by radiotherapy and gemcitabine. DEGRO 2000: 6. Deutscher Kongreß für Radioonkologie, Strahlenbiologie und Medizinische Physik. München, 6.-9.10.2000. **[Abstract]** Strahlenther Onkol **2000**; 176(S1): 36.
2. Reilmann M, Feyerabend T, Nadrowitz R, Richter E, Terzis A, Fehlaue F: Additiver Effekt auf das Wachstumsverhalten von multizellulären Sphäroiden des Glioblastoms durch Bestrahlung und Gemcitabin. **[Abstract]** DEGRO VII., Hamburg, 8.-11. September 2001, Strahlenther Onkologie **2001**;177 (S1): 106.
3. Fehlaue F, Stalpers L, Sminia P, Reilmann M, Vesely H, Feyerabend T, Valk P van der, González González D - Effect of radiotherapy and gemcitabine on proliferation in glioblastoma spheroids. **[Abstract]** Neuro-Oncol 2001;3:suppl 1:S96/22. Third International From Gene to Cure Congress. Glioma: from Gene to Cure. Amsterdam, 26-28.April **2001**.
4. Reilmann M, Weinhold D, Nadrowitz R, Richter E, Fehlaue F: Proliferations- und Migrationsverhalten von Sphäroiden des Glioblastoma nach Bestrahlung und Temodal. **[Abstract]** DEGRO IX., Essen, 28.6-01.07. 2003, Strahlenther Onkologie **2003**;179 (S1):75.

Hamburg, den 01.12.2004