

**Untersuchung der *in vitro*-Stimulierbarkeit der Akkumulation
von Zytostatika in gesundem Nierengewebe von Mensch und
Ratte und in menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe -
ein neuer Ansatz zur Überwindung der multidrug resistance?**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Steffen Jurkutat
geboren am 26. September 1972 in Jena
und
von Andreas Schimske
geboren am 22. November 1972 in Naumburg

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Fleck, Jena**
- 2. Prof. Dr. Schubert, Jena**
- 3. Prof. Dr. Honscha, Leipzig**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.03.2003

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	2
1.1. Chemotherapie von Tumoren	2
1.2. Resistenzmechanismen	5
1.3. Ansätze der Therapie des Nierenzellkarzinoms	8
1.4. Arbeitshypothese der vorliegenden Untersuchungen	11
1.5. Ziel der Arbeit	13
1.6. Wahl der Zytostatika	14
2. Material und Methoden	16
2.1. Untersuchungsmaterial	16
2.1.1. Rattengewebe	16
2.1.2. Menschliches Gewebe	16
2.2. Versuchsdurchführung	18
2.2.1. Präparation des Rattengewebes	18
2.2.2. Präparation des menschlichen Gewebes	19
2.2.3. Gewebeinkubation	20
2.2.3.1. Akutversuche	20
2.2.3.2. Langzeitversuche	21
2.2.3.3. Zusatzversuche	22
2.3. Probenaufarbeitung	23
2.3.1. Homogenat	23
2.3.2. Medium	23
2.4. Bestimmungsmethoden	24
2.4.1. p-Aminohippurat (PAH)	24
2.4.2. Methotrexat (MTX)	26
2.4.3. Cisplatin (CP)	27
2.4.4. Tomudex [®] (TDX, Raltitrexed)	27
2.4.5. Topotecan (TPT, Hycamtin [®])	28
2.5. Statistik	29
3. Ergebnisse	30
3.1. <i>In vitro</i> -Akkumulation verschiedener Modellsubstanzen in Nierengewebe	30
3.1.1. p-Aminohippurat	30

3.1.2. Methotrexat	30
3.1.3. Cisplatin	34
3.1.4. Tomudex®	37
3.1.5. Topotecan	38
3.1.6. Vergleich Akutversuche	38
3.2. Versuche zur Stimulierbarkeit der Fremdstoffaufnahme in Nierengewebe von Ratte und Mensch	43
3.2.1. Methotrexat	44
3.2.2. Cisplatin	44
3.2.3. Tomudex®	47
3.2.4. Topotecan	47
3.3. Kombination von Dexamethason und EGF zur Beeinflussung der PAH-Akkumulation in Nierengewebe der Ratte	47
3.4. Vergleich der Stimulierbarkeit der Fremdstoffaufnahme in Nierengewebe von Ratte und Mensch und in Nierenzellkarzinomgewebe	50
3.4.1. Ratte	51
3.4.2. Intaktes menschliches Gewebe	53
3.4.3. Nierenzellkarzinom	53
4. Diskussion	57
4.1. Methode/Versuchsbedingungen	58
4.2. Transportkapazität der Gewebe für die untersuchten Zytostatika	61
4.2.1. Methotrexat	61
4.2.2. Cisplatin	63
4.2.3. Tomudex®	65
4.2.4. Topotecan	67
4.3. Stimulierbarkeit der Fremdstoffaufnahme in intaktes Nierengewebe von Ratte und Mensch und in Nierenzellkarzinomgewebe	69
5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	78
Ehrenwörtliche Erklärung	94
Danksagung	95
Lebensläufe	96

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
BCRP	breast cancer resistance protein
cMOAT	canalicular multispecific organic anion transporter
CP	Cisplatin
Dexa	Dexamethason
DHFR	Dihydrofolsäurereduktase
EGF	epidermal growth factor
FPGS	Folylpolyglutamatsynthetase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxydiertes Glutathion
HC	Topotecan – Hydroxycarbonsäure
HPLC	high performance liquid chromathography
IFN	Interferon
MDR	multidrug resistance
MRP	multidrug resistance related protein
MTX	Methotrexat
NRS	Nierenrindenschnitt
NZK	Nierenzellkarzinom
oat	organic anion transporter
oct	organic cation transporter
PAH	p-Aminohippurat
Q _{S/M}	Schnitt-Medium-Quotient
RCC	renal cell carcinoma
RFC	reduced folate carrier
RL-MTX	rat liver MTX carrier
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
TDX	Tomudex [®] , Raltitrexed
TPT	Topotecan, Hycamtin [®]

1. Einleitung

Die Niere ist das wichtigste Exkretionsorgan für Stoffwechselendprodukte und Fremdstoffe. Die renale Ausscheidung erfolgt durch glomeruläre Filtration und tubuläre Sekretion; durch aktive tubuläre Reabsorption können Substanzen aus dem Primärharn zurückgewonnen werden. Für die renale Ausscheidung von Arzneimitteln hat die tubuläre Sekretion die größte Bedeutung. *In vitro* läßt sich dieser Transportvorgang am Nierenrindenschnitt (NRS) untersuchen. Hierbei stellt die Anreicherung von Fremdstoffen (= aktive Akkumulation) ein Maß für die Sekretionsleistung *in vivo* dar (STOPP und BRÄUNLICH 1975). Mit Hilfe dieser Methode läßt sich auch die Aufnahme von Arzneimitteln in die Tubuluszelle quantitativ erfassen. Eine Akkumulation von Zytostatika ist unabdingbar für die Chemotherapie von Nierentumoren. Deren schlechtes Ansprechen auf eine zytostatische Therapie (HARTMANN und BOKEMEYER 1999) ist offensichtlich durch eine mangelnde Anreicherung im Nierentumorgewebe begründet (MICKISCH et al. 1990d).

1.1. Chemotherapie von Tumoren

Maligne Tumoren stellen in den Industrienationen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (HOFFMEISTER et al. 1987). Seit Einführung der Chemotherapie als mögliche Behandlungsstrategie der Tumorbekämpfung wurde eine Vielzahl zytostatischer Substanzen getestet und eingesetzt. Die Kombination verschiedener, aber auch die Entwicklung immer wieder neuer, modifizierter Zytostatika trägt zu einer steten Steigerung der Therapieerfolge bei. Erfolg bedeutet allerdings nur bei einigen wenigen Tumoren die vollständige Remission, z.B. bei den akuten Leukämien (LATHAN et al. 1991). In den meisten Fällen hingegen kann von Erfolg lediglich in palliativer Hinsicht gesprochen werden. Das heißt, die Überlebenszeit kann verlängert und die Lebensqualität verbessert werden. Ein Fortschreiten der Erkrankung wird jedoch nur verlangsamt und kaum verhindert. Oft genug muß die zytostatische Therapie trotz Tumorremission aufgrund starker Nebenwirkungen (Blutbildveränderungen, Neuropathien, Stomatitis, Ösophagitis, Übelkeit, Abgeschlagenheit) bei systemischer Applikation abgebrochen werden. Die gezielte lokale Applikation, wie beispielsweise bei einigen gynäkologischen Tumoren, ist in den meisten Fällen nicht möglich, auch wenn die Nebenwirkungen geringer und der Therapieerfolg wahrscheinlich höher wären.

Das Nierenzellkarzinom (NZK; renal cell carcinoma, RCC) ist mit 1-2% aller soliden Tumoren (11000 Erkrankungsfälle pro Jahr in Deutschland) ein insgesamt seltenes Malignom. Neben dem sporadischen Auftreten sind als Risikofaktoren chronische Niereninsuffizienz oder die tuberöse Sklerose beschrieben (FISCHER et al. 2000). Nach neueren Untersuchungen stellen auch Übergewicht und arterielle Hypertension Risikofaktoren dar (CHOW et al. 2000). Eine weitere Ursache liegt in der Funktion des Organs begründet. Durch die Ausscheidung verschiedenster Substanzen unterliegt das Nierengewebe auch deren schädigendem Einfluß, da es oft zu einer Anreicherung mit nephrotoxischer bzw. kanzerogener Wirkung kommt.

Beim NZK handelt sich um einen epithelialen, von tubulären Strukturen ausgehenden Tumor (RIEDE et al. 1989). Aus histologischer Sicht ist das klarzellige Karzinom mit über 80% der häufigste Nierentumor. Die Differenzierung des Nierenzellkarzinoms erfolgt nach der TNM-Klassifikation (**Tab. 1**) der Vereinigten Internationalen Krebsorganisation (UICC).

Das NZK gehört zu den Tumoren, die sich der zytostatischen Therapie weitestgehend entziehen. Ein hoher Grad an Resistenz gegenüber einer Vielzahl Zytostatika ist charakteristisch für das NZK (MICKISCH 1994, HARTMANN und BOKEMEYER 1999). Bislang werden kurative Erfolge ausnahmslos durch operatives Vorgehen erreicht. Die Tumornephrektomie birgt jedoch große therapeutische Schwierigkeiten, wenn der Tumor bereits in der Lage war, Metastasen zu bilden. Ca. 40% der Patienten weisen Metastasen des NZK auf, die je zur Hälfte in lokalen Lymphknoten oder als Fernmetastasen bestehen (HERMANEK und SCHROTT 1990).

Tabelle 1

TNM-Klassifikation der Vereinigten Internationalen Krebsorganisation (UICC)

T	Primärtumor
Tis	Präinvasives Karzinom
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
T1	Tumorgröße < 7 cm; auf eine Niere beschränkt
T2	Tumorgröße > 7 cm; auf eine Niere beschränkt
T3a	Tumorinvasion in benachbartes Fettgewebe
T3b	Tumorinvasion in benachbarte Vene
T4	Tumorinvasion in benachbarte Gewebe

Tx	Die Minimalerfordernisse zur Bestimmung des Sitzes oder Ausbreitungsgrades des Primärtumors liegen nicht vor
N	Regionäre Lymphknoten
N0	Kein Anhalt für Befall der regionären Lymphknoten
N1	Ipsilateraler Lymphknotenbefall; mobil
N2	Bilateraler Lymphknotenbefall; mobil
N3	Fixierter Lymphknotenbefall
N4	Befall juxta-regionärer Lymphknoten
Nx	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionären Lymphknoten liegen nicht vor (Beurteilung von mindestens 8 Lymphknoten erforderlich)
M	Fernmetastasen
M0	Kein Anhalt für Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden
Mx	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen liegen nicht vor
R	Residualtumor
R0	Kein Anhalt für Residualtumor
R1	Mikroskopischer Residualtumor
R2	Makroskopischer Residualtumor
G	Grading: beschreibt den histologischen Differenzierungs- und Malignitätsgrad von malignen Tumoren und stellt einen prognoserelevanten Faktor für die Überlebensrate dar
G1	Hochdifferenziertes Gewebe geringer Malignität
G2	Mitteldifferenziertes Gewebe mäßiger Malignität
G3	Niedrigdifferenziertes Gewebe hoher Malignität
p	postoperative histopathologische Klassifikation (pTNM) unter Ergänzung oder Abänderung der prätherapeutischen TNM-Klassifikation durch die bei einem definitiven chirurgischen Eingriff und bei der histopathologischen Untersuchung des Resektionspräparates gewonnenen Erkenntnisse
L	Einbruch in Lymphgefäße
L0	Lymphgefäße nicht alteriert
L1	Einbruch in Lymphgefäße
V	Einbruch in Venen
V0	Venen nicht alteriert
V1	Tumorthromben in Venen

1.2. Resistenzmechanismen

Als Ursache für die geringe Ansprechbarkeit des NZK auf eine medikamentöse Therapie wird die multidrug resistance (MDR) angesehen, wie man sie auch bei anderen Tumoren beobachtet. Das Wesen der MDR ist eine breite Kreuzresistenz der Tumorzelle gegenüber Zytostatika unterschiedlicher Struktur und Wirkweise (EFFERTH et al. 1992). Mit Hilfe verschiedener Mechanismen sind Tumoren in der Lage, ihr Wachstum unabhängig vom ursprünglichen Gewebe und scheinbar unbeeinträchtigt von therapeutisch eingesetzten Zellgiften zu steuern. Zu diesen Resistenzmechanismen zählen u.a.:

1. das MDR1-Gen, welches für die Expression des Polyglykoproteins-170 verantwortlich ist,
2. mit der multidrug resistance assoziierte Proteine (multidrug resistance related proteins, MRP),
3. eine gesteigerte Biotransformation, z.B. durch Glutathion-S-Transferase,
4. eine erhöhte Aktivität der Topoisomerasen-I und II, wogegen
5. eine ursächliche Funktion der alkalischen Phosphatase für die Chemoresistenz inzwischen wohl widerlegt ist (EFFERTH et al. 1993).

ad 1. Diese Resistenzform wird auch als klassische MDR bezeichnet. Das ihr zugrunde liegende MDR1-Gen führt in der Tumorzelle zur Expression eines transmembranalen Polyglykoproteins-170, welches einen unidirektionalen Transportmechanismus mit breiter Substratspezifität darstellt, der Zytostatika und andere lipophile Stoffe aus der Tumorzelle aktiv herauspumpt. Das Protein ist 170kDa groß und benötigt ATP für seine Transportfunktion (ATP binding cassette) (LANNING et al. 1996). Es stellt eine eigene Carrierfamilie dar.

Ein als MDR2-Gen bekanntes Gen kodiert eine Phosphatidylcholin-Transferase, welche keinen Einfluß auf Resistenzentwicklungen haben soll (ERNEST und BELLOREUSS 1998).

Die beiden menschlichen MDR-Gene (MDR1 und MDR2) sind zu 80% homolog und auf dem Locus q21.1 des Chromosoms 7 gelegen. Bei Nagetieren existieren drei Varianten des MDR-Gens (FARDEL et al. 1996).

Für das MDR1-Gen und Polyglykoprotein-170 liegen die umfangreichsten Resistenzuntersuchungen vor. So konnte gezeigt werden, daß die höchsten

Konzentrationen von Polyglykoprotein-170 beim NZK und Kolonkarzinom auftreten (ALVAREZ et al. 1995). Polyglykoprotein-170 wird in mehr als 60% der hochresistenten Fälle des Nierenzellkarzinoms exprimiert, hingegen bei keinem der niedrigresistenten (MICKISCH et al. 1990a). Das unterstreicht die zentrale Bedeutung dieses Resistenzmechanismus. Im Umkehrschluß bedeutet dies allerdings, daß bei ca. 40% ein Nichtansprechen auf eine Chemotherapie durch andere Ursachen bedingt ist (NAITO et al. 1993).

Überraschenderweise gibt es undifferenzierte Karzinome, bei denen das für die Polyglykoprotein-Synthese verantwortliche MDR1-Gen in geringerem Ausmaß exprimiert wird als in gesundem Gewebe. Für eine Chemoresistenz ist die Produktion offensichtlich ausreichend hoch. Eventuell handelt es sich hierbei um nichtinvasive Tumoren, denn bei invasiven Formen läßt sich im allgemeinen eine hohe MDR1-Expression nachweisen, so daß eine Beziehung zwischen MDR1-Aktivität und Tumorinvasivität diskutiert wird (TOBE et al. 1995). Unterschiede bezüglich der MDR1-Expression bestehen infolge veränderter Differenzierung zwischen Zellen eines Primärtumors und seiner Metastasen. Die Chemoresistenz von ursprünglichem und sekundärem Tumor kann also durchaus verschieden sein (GAMELIN et al. 1999).

ad 2. Bei der non Polyglykoprotein-multidrug resistance kommt es zur Überexpression von MDR-assozierten membrangebundenen Glykoproteinen (MRP), welche wohl für die direkte Medikamentenausschleusung und/oder eine Sequestration der Arzneimittel in zellulären Kompartimenten verantwortlich sind. Beides hat eine gesenkte intrazelluläre Wirkstoffkonzentration zur Folge (NOOTER und STOTER 1996). Derzeit sind sechs MRP-Subtypen bekannt, ohne daß deren Wirkungsweise bereits vollständig charakterisiert worden ist. Die Höhe der nachweisbaren MRP1-Spiegel in Tumorgewebe differiert sehr stark. Deutlich erhöhte Spiegel finden sich bei der chronisch lymphatischen Leukämie. Unregelmäßig erfolgt die Expression bei der akuten myeloischen Leukämie oder dem Ösophaguskarzinom. Gesundem Gewebe vergleichbar niedrige MRP1-Spiegel weisen das NZK und Kolonkarzinom auf (NOOTER et al. 1995).

Außer dem MRP1 wird auch der Einfluß von MRP2 auf Medikamentenresistenz diskutiert. Eine Expressionsrate von 95% (!) beim klarzelligen NZK und eine ähnliche Substratspezifität verglichen mit MRP1 legen einen Zusammenhang nahe (SCHAUB et al. 1999).

- ad 3. Eine gesteigerte Aktivität der Glutathion-S-Transferase bedingt intrazelluläre Glutathionspiegelerhöhungen, deren Folge eine beschleunigte Zytostatikainaktivierung ist (MICKISCH 1996 und MICKISCH et al. 1991a). Das Glutathionsystem (GSH/GSSG) stellt das stärkste Redoxpotential der Zelle dar. Einer oxidativen DNA-Schädigung wird somit entgegen gewirkt. Dieser Mechanismus ist bspw. für die Cisplatinresistenz des NZK mitverantwortlich (AHN et al. 1994).
- ad 4. Topoisomerasen (bislang bekannt Typ I und II) sind als im Zellkern lokalisierte Enzyme für die Bildung der DNA-Superhelix zuständig. Dies geschieht durch Spaltung und Neuverknüpfung von DNA-Strängen. Wird diese Funktion blockiert, kommt es zum Zelltod. Die Aktivität der Topoisomerase-I ist im Unterschied zur Topoisomerase-II nicht zellzyklusspezifisch und auch nicht ATP-abhängig, sie verursacht lediglich Einzelstrangbrüche. Eine Resistenzentwicklung gegenüber Zytostatika ähnlich dem MDR-Mechanismus, während der Therapie mit einem Topoisomerasehemmstoff wie z.B. Topotecan, ist bislang nicht bekannt (HSIANG et al. 1985).

Trotz einer Vielzahl von Untersuchungen, welche die o.g. Zellbestandteile für ein Tumorüberleben (mit) verantwortlich machen, bleiben Fragen zu deren physiologischer Bedeutung noch offen.

So ist das Polyglykoprotein-170 außer in Tumorgewebe auch in gesunden Zellen von Darm, Niere, Leber, Gehirn oder Hoden nachweisbar (CHIN et al. 1994). Wahrscheinlich hat es hier die Funktion, in unpolarierten Zellen Peptide, Steroide und Phospholipide zu transportieren (ERNEST und BELLO-REUSS 1998). Im gesunden Nierengewebe kommt das Polyglykoprotein in Zellen des proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife, der Sammelrohre oder auch des Mesangium vor. Vermutlich spielt es eine Rolle beim Transport endogener Substanzen und der Regulation potentialgesteuerter Cl⁻-Kanäle (ERNEST et al. 1997). Neuere Untersuchungen zeigten, daß durch Polyglykoprotein-170 einerseits die Medikamentenaufnahme aus dem Gastrointestinaltrakt vermindert wird, sich andererseits deren Elimination über Urin und Galle erhöht. Polyglykoprotein-170 in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke soll den Medikamentenübertritt in das Gehirn verhindern (FROMM 2000).

Auch MRP scheinen in geringem Maße ubiquitär produziert zu werden. Bisher sind MRP in den Zellen des Urogenitaltrakts und des Endokrinium, im Darmtrakt, in lymphoretikulären

Zellen, in der Lunge und in der Muskulatur nachgewiesen worden. Im Gegensatz zum niedrigen Grad der physiologischen MRP-Expression liegt bei Tumoren die Produktion meist im mittleren bis hohen Bereich (NOOTER et al. 1995). Die physiologische Funktion ist bisher allerdings nur unzureichend erklärbar (BORST et al. 1997). SCHAUB et al. (1999) konnten zeigen, daß MRP2 in der kanalikulären Hepatozytenmembran und in der apikalen Bürstensaummembran des proximalen Tubulus für den Austransport anionischer Verbindungen, eventuell auch Zytostatika, zuständig ist.

1.3. Ansätze der Therapie des Nierenzellkarzinoms

Die Prognose (Tab. 2) des Nierenzellkarzinoms (NZK) ist eng mit der Größe des Tumors bzw. seinem TNM-Stadium verbunden (FISCHER et al. 2000).

Tabelle 2

Prognose des NZK in Abhängigkeit der Tumor-Größe

Tumor-Stadium	Prognose
Primum < 3cm	Metastasierung < 5%
Primum auf Niere begrenzt	Metastasierung < 20%
Positive regionäre Lymphknoten	Metastasierung bei 90%
Metastasierung	Mittl. Überlebenszeit 12 Monate

Die derzeit einzige erfolversprechende Therapie des nichtmetastasierten NZK ist die radikale Tumornephrektomie mit Entfernung des Nierentumorpakets, der Fettkapsel, der Fascia Gerota und die regionale Lymphadenektomie (FISCHER et al. 2000).

Die Schwierigkeiten der zytostatischen Therapie des Nierenzellkarzinoms beziehungsweise seiner Metastasen (v.a. Lunge und Knochen) wurden bereits weiter oben angesprochen. Bestehende Kreuzresistenzen zwischen Anthrazyklinen (z.B. Doxorubicin), Alkaloiden (z.B. Vinblastin) oder halbsynthetischen Epipodophyllotoxinen (z.B. Etoposid) seien als Beispiel aufgeführt (CHAPMAN und GOLDSTEIN 1995, NOOTER et al. 1996). Diese Substanzen sind Substrate des Polyglykoprotein-170 (EFFERTH et al. 1995). Als am wirksamsten erwies sich noch Vinblastin. Bei Therapiestudien wurde von einer Ansprechrate zwischen 6-9% berichtet. Ein optimales chronologisches Applikationsregime konnte bislang jedoch nicht

erstellt werden. Schemata, bei denen 5-Fluorouracil oder Floxuridin verwendet wurde, weisen 5-8% Ansprechrate auf (HARTMANN et al. 1999). Versuche mit dem Einsatz der Topoisomerase-I-Inhibitoren Irinotecan und Topotecan sind inzwischen angelaufen. Beim metastasierten NZK konnte durch Topotecan-Einsatz allerdings keine partielle bzw. komplette Response erzielt werden (LAW et al. 1994). Die alleinige Chemotherapie beim metastasierten NZK wurde als wirkungslos aufgegeben (FISCHER et al. 2000).

Gestützt durch das Auftreten von Spontanremissionen bei Lungenmetastasen (allerdings in weniger als 1% der Fälle, YOUNG 1998) wird versucht, die Immunkompetenz des NZK zu nutzen.

Klinisch wird die kombinierte Immunchemotherapie bis heute als einzige erfolgversprechende Option beim metastasierten NZK angewandt. Hierbei werden Interleukin-2 (IL-2) s.c. bzw. per inhalationem bei Lungenmetastasen und Interferon- α -2a (IFN- α -2a) s.c. mit 5-Fluorouracil (5-FU) i.v. kombiniert. Begründet ist diese Kombination durch einen experimentell beobachteten Synergismus bei der Verstärkung des antiproliferativen Effekts. Ein klinischer Beweis dieser Hypothese konnte bislang nicht erbracht werden. Ebenso fehlt der Beweis einer tatsächlichen Lebensverlängerung (PORTA et al. 2001). Allerdings wird über Ansprechraten von mehr als 25% berichtet (HÄNNINEN et al. 1996). Neuerdings ist wieder eine verstärkte Hinwendung zur alleinigen Chemotherapie zu beobachten, da die Wirksamkeit der Immunchemotherapie oft in keinem Verhältnis zu den beträchtlichen Nebenwirkungen steht (RINI et al. 2000, SHAMASH et al. 2001).

Auf der Suche nach Möglichkeiten, die multidrug resistance zu umgehen oder wenigstens in ihrer Ausprägung abzuschwächen, sind einige Substanzen als MDR-Modulatoren erkannt worden. So nimmt die Vinblastin- bzw. Doxorubicinresistenz ab, wenn zusätzlich der Kalzium-Antagonist Verapamil eingesetzt wird. Erreicht wird dies durch Blockade des Polyglykoprotein-170, wodurch der Zytostatika-Austransport reduziert wird. Allerdings bleibt zum Beispiel die Carboplatin-Resistenz unverändert (MICKISCH et al. 1990c). Ebenfalls in die Gruppe der MDR-Modulatoren gehören Calmodulin-Inhibitoren, Immunsuppressiva, Steroidhormone oder Antiöstrogene. Die durch die MDR-Modulatoren hervorgerufene verstärkte Wirkung des Zytostatikums ist über eine Blockade des Medikamentenaustransportes erklärbar. Erreicht wird dies durch eine Änderung des Phosphorylierungszustandes des Polyglykoprotein-170. Der Austransport der Zytostatika aus der Tumorzelle wird damit inaktiviert (EFFERTH et al. 1995). Beim Nierenzellkarzinom

bewirkt eine Vinblastin-Therapie unter Zugabe von Dexverapamil und Dexamethason ein Ansprechen sowohl von Primärtumor als auch dessen Metastasen (MICKISCH 1994). Einen additiven Effekt bezüglich der Zytotoxizität von Vinblastin und Adriamycin gegenüber NZK-Zellen kann man ebenfalls bei Zugabe von Tamoxifen oder Oligomycin beobachten. Hinsichtlich der Optimierung von Applikationsfrequenzen oder Dosierungen sind allerdings noch eine Reihe weiterführender Untersuchungen notwendig (YU et al. 1999).

Das neuentwickelte Immunsuppressivum Cyclosporin PSC 833 soll die Mutationsrate in Tumorzellen für eine erworbene Doxorubicin-Resistenz senken, wobei die Aktivierung des MDR1-Gens herabgesetzt sein soll. Als Ergebnis der Cyclosporin-Kombination mit einem Zytostatikum (Etoposid, Doxorubicin), dessen Dosierung nur ein Drittel im Vergleich zur Therapie ohne Modulator erfordert, treten in vereinzelten Fällen Remissionen ein (SIKIC et al. 1997).

Auch die Kombination der Zytostatika mit MDR-Modulatoren brachte alles in allem nur enttäuschende Ergebnisse und die Erkenntnis, daß es beim NZK noch andere für Resistenz verantwortliche Mechanismen geben muß (HARTMANN et al. 1999). Die bislang eingesetzten Modulatoren weisen eine relativ geringe Wirkung auf oder aber ihr Einsatz ist durch schwerwiegende Nebenwirkungen limitiert. Bedingt sind diese hauptsächlich durch eine veränderte Pharmakokinetik der Zytostatika: deren Halbwertszeit und die AUC sind erhöht (SIKIC et al. 1997). Zum einen nimmt die Metabolisierung am Cytochrom P450 ab, zum anderen sinkt die renale und biliäre Eliminationsrate. *In vitro* Studien lassen eine erhöhte Knochenmarktoxizität vermuten, so daß eine Dosisminderung der Zytostatika von ungefähr 50% erforderlich würde (LUM et al. 1995).

Die kombinierte Chemotherapie mit Tamoxifen konnte beim fortgeschrittenen NZK teilweise sogar vollständiges Ansprechen bewirken (WADA et al. 1993), jedoch auch dieser Versuch brachte insgesamt nicht die erhofften Erfolge, da der Effekt auf Einzelfälle beschränkt war.

Die Chemotherapie des Nierenzellkarzinoms ist trotz jahrelanger intensiver Bemühungen noch immer keine schonende Alternative zur operativen Therapie. Auch wenn es Hinweise auf eine Lebensverlängerung bei Patienten, deren NZK auf Zytostatika anspricht, gibt, so resultiert doch keine Verbesserung der Lebensqualität für den Tumorpatienten (HARTMANN et al. 1999). Aber gerade diese sollte heute das oberste Ziel jeglicher Tumorthherapie darstellen.

Weitere Überlegungen bei der Tumorbekämpfung waren, Zytostatika als Prodrug zu konzipieren, welche erst im Zielorgan mittels spezifischer Enzyme aktiviert werden

(MAGNAN et al. 1982) oder die Kopplung des Zytostatikums an Aminosäuren, bei dem spezifische Aminosäuretransportsysteme zur Anreicherung der Substanz genutzt werden könnten (HJELLE et al. 1984). Diese Strategien waren bezogen auf das NZK nicht erfolgreich.

1.4. Arbeitshypothese der vorliegenden Untersuchungen

Als hydrophile Modellsubstanz für den renalen Transport schwacher organischer Säuren wird seit vielen Jahren p-Aminohippurat (PAH) genutzt. PAH wird frei filtriert, nicht reabsorbiert und die ausgeschiedene Menge korreliert gut mit der Sekretionsleistung der proximalen Tubuluszellen (BALINT et al. 1965). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Vorversuche zur Optimierung des Versuchsansatzes mit dieser Substanz durchgeführt. Allerdings muß beachtet werden, daß die Transportvorgänge vom schwach sauren PAH und den lipophilen Zytostatika in der Niere erwartungsgemäß verschieden und die Ergebnisse somit nicht ohne weiteres vergleichbar sind.

Die Untersuchungen wurden als Inkubationsversuche an Nierenrindenschnitten durchgeführt, da sich so tubuläre Transporte *in vitro* nachweisen lassen. Durch den aktiven Eintransport von Fremdstoffen in die Tubuluszelle kommt es, verglichen mit dem umgebenden Inkubationsmedium, zu deren Anreicherung im Nierenrindenschnitt. Da die Tubuluslumina kollabiert sind und somit ein Austransport der Substanzen nicht möglich ist, kann die ermittelte Akkumulationsrate als Ausdruck des aktiven tubulären Transportes angesehen werden (BRÄUNLICH et al. 1986).

Es ist bekannt, daß sich die renale Aufnahme von PAH mit Hilfe des Glukokortikoids Dexamethason steigern läßt (BRÄUNLICH et al. 1992, FLECK 1997). Nach *in vivo*-Vorbehandlung mit Dexamethason erhöht sich einerseits die renale PAH-Ausscheidung und andererseits die PAH-Akkumulation *in vitro*. Auch bei *in vitro*-Versuchen, in denen die Nierenrindenschnitte über 24 Stunden mit z.B. Dexa inkubiert werden, kommt es zur gesteigerten PAH-Akkumulation. Die Übertragbarkeit dieses für die Ratte beschriebenen Effektes auf menschliches Nierengewebe war unter anderem Gegenstand unserer Untersuchungen. Dexamethason (9 α -Fluor-16 α -methyl-prednisolon) stellt ein synthetisches Steroidhormon dar, welches infolge seiner höheren Affinität durch den Einbau eines zusätzlichen Fluor-Atoms eine etwa 30fach stärkere Glukokortikoidwirkung als Kortisol aufweist und fast keine mineralokortikoide Wirkung besitzt. Auch ist die biologische

Halbwertszeit mit ungefähr 45 Stunden ca. 5 mal länger als die des Kortisols (NEUMANN et al. 1992). Die lange biologische Halbwertszeit der Steroidhormone erklärt sich mit deren Wirkmechanismus und ist von der Plasmahalbwertszeit zu unterscheiden. Nach Bildung eines intrazellulären Steroid-Rezeptor-Komplexes kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, welche ein Eindringen in den Zellkern ermöglicht. Über Interaktionen mit spezifischen Akzeptorstellen am Chromatin kann jetzt die Genexpression und entsprechend die Proteintranslation moduliert werden (YAMAMOTO 1985). Erst nach Abbau der auf diesem Weg neu synthetisierten Proteine ist die Steroidhormonwirkung beendet. Neben dem allgemein bekannten Einfluß auf Entzündungsgeschehen (durch antiproliferative, antiexsudative, immunsuppressive Komponenten) oder die Stoffwechselsituation (Stimulation der Glukoneogenese, Senkung der Glukoseverwertung in peripheren Geweben) sind auch speziell renale Effekte bezüglich der Neusynthese von Transportcarriern seit längerem beschrieben (JENNINGS und FERGUSON 1984). Dieser Mechanismus könnte zu einer gesteigerten Zytostatikum-Anreicherung in der NZK-Zelle führen und damit zur Verminderung der Medikamentenresistenz genutzt werden.

Neben dem Glukokortikoid Dexamethason wurde das Schilddrüsenhormon Trijodthyronin (T_3) zur Stimulation der Fremdstoffakkumulation im Nierenrindenschnitt verwendet (FLECK et al. 2000). Gemeinsam mit Thyroxin (T_4) bewirkt es Veränderungen im Energiestoffwechsel des Organismus. Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidbildung sind erhöht, die Energieträger Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette werden beschleunigt abgebaut und die Menge des gespeicherten Leberglykogens nimmt ab. Es besteht eine Proportionalität zwischen der Menge zirkulierender Schilddrüsenhormone und Grundumsatz (EDELMAN 1974). Beim Menschen werden 5% der physiologisch benötigten Tagesmenge von $100\mu\text{g}$ an Schilddrüsenhormon primär als T_3 bereitgestellt. Der weitaus größere Anteil gelangt als Thyroxin in die Blutbahn und wird erst im peripheren Gewebe in das etwa vierfach wirksamere Trijodthyronin umgewandelt. Die biologische Halbwertszeit der beiden Hormone ist verschieden ($T_3 \leq 2$ Tage, $T_4 \sim 7$ Tage). Intrazellulär bindet das T_3 mit 10fach höherer Affinität als T_4 an Non-Histon-Proteine des Zellkerns und führt zu einer gesteigerten mRNA-Synthese. In der Niere kommt es infolgedessen u.a. zu einer vermehrten $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Expression (KLEIN et al. 1984). Beim Nierenversagen pädiatrischer Patienten führt der Einsatz von L-Thyroxin zur Beschleunigung der Nierenreifung mit Steigerung der glomerulären Filtration und somit zur Anregung der Diurese (STRAUB 1976).

Außer den beiden genannten hormonellen Wirkstoffen Dexamethason und T_3 wurde auch der Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) in unsere Untersuchungen einbezogen, da in

vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, daß EGF die Nierenfunktion (Aminosäure-Reabsorption, PAH- und Elektrolytausscheidung) stimulieren kann. Im Gegensatz zu den *in vivo*-Versuchen von FLECK und PERTSCH (1999), bei denen nicht sicher nachgewiesen werden konnte, in welcher Menge EGF überhaupt seinen Wirkort in der Niere erreicht, war eine direkte Einwirkung von EGF auf die Nierenzellen bei den *in vitro*-Versuchen gewährleistet. Weiterhin moduliert EGF den renalen Metabolismus (HARRIS et al. 1991), stimuliert den Glukosetransport der Zellen des proximalen Tubulus (RACUSEN 1997), erhöht die Aminosäureaufnahme in Nierenzellen der Ratte (BOERNER et al. 1985) und induziert die Diurese beziehungsweise die Natriurese (WARDEN und STOKES 1993). Bekannt sind des weiteren Interaktionen zwischen Dexamethason und EGF in der Niere. So soll einerseits unter Dexamethason-Einwirkung die EGF-Konzentration im Nierengewebe zunehmen (TUOMELA et al. 1990), zum anderen wird berichtet, Dexamethason reduziert die EGF-Rezeptor-Synthese (OBERG und CARPENTER 1991). PERTSCH und FLECK (1999) schlußfolgern, daß der stimulierende Effekt des Dexamethason auf die renalen Transportfunktionen über EGF hervorgerufen sein könnte.

1.5. Ziele der Arbeit

Die favorisierte Erklärung des MDR-Phänomens ist ein gesteigerter Austransport der Zytostatika aus den Zellen des NZK (NISHIYAMA et al. 1993, LEIER et al. 1996). Neben dieser Vermutung konnten FLECK et al. (1997) zeigen, daß die Akkumulationsfähigkeit des NZK-Gewebes für PAH deutlich reduziert ist. Eventuell heben sich also Ein- und Austransport der Zytostatika gegenseitig auf?

Nachdem die prinzipielle Möglichkeit der *in vitro*-Stimulation der Akkumulation der Modellsubstanz PAH in vorangegangenen Versuchen eingehend untersucht wurde (FLECK et al. 2000), sollte in der vorliegenden Arbeit die Akkumulation von Zytostatika näher charakterisiert werden. Aufbauend auf die Validierung der PAH-Versuche bestand das Ziel unserer Arbeit darin, die Aufnahme von Zytostatika in intaktes Nierengewebe und NZK-Gewebe des Menschen durch eine *in vitro*-Stimulation zu verbessern. Zu diesem Zweck verglichen wir Akkumulationsraten unterschiedlicher zytostatischer Substanzen unter verschiedenen Bedingungen im Nierengewebe gesunder Ratten sowie in intaktem und tumorösem menschlichen Nierengewebe. Dieser Versuch, die MDR zu überwinden, stellt somit ein völlig anderes Herangehen an die bestehende Problematik dar als bisher

beschrieben: es soll nicht primär der Austransport der Zytostatika gehemmt werden, sondern über eine Stimulation der Zytostatikaaufnahme soll versucht werden, in der NZK-Zelle hinreichend hohe Zytostatikakonzentrationen zu erreichen, die einen Therapieerfolg ermöglichen und den gesteigerten Austransport antagonisieren. Allerdings muß kritisch angemerkt werden, daß eine gleichzeitige Stimulation des Austransportes der Zytostatika unter unseren Versuchsbedingungen nicht zu differenzieren ist. Für den „Netto-Effekt“ hat diese methodische Limitierung jedoch keine Konsequenz.

1.6. Wahl der Zytostatika

Als Zytostatika verwendeten wir Methotrexat, Cisplatin, Raltitrexed (Tomudex[®]) und Topotecan (Hycamtin[®]), wobei Methotrexat und Cisplatin zur Therapie des NZK verwendet wurden. Für Tomudex[®] und Topotecan stehen umfangreiche Untersuchungen noch aus. Grund für diese Auswahl war die Erfassung verschiedener Wirkmechanismen bzw. unterschiedlicher Transportprozesse, die für die Aufnahme der genannten Zytostatika verantwortlich sind.

Der Antimetabolit Methotrexat erreicht seine zytostatische Wirkung durch die Verhinderung der Synthese der DNA-Bausteine Purin und Thymidin. Für deren Bildung aus Folsäure ist die Umwandlung in Tetrahydrofolsäure über Dihydrofolsäure notwendig. Das hierfür verantwortliche Enzym Dihydrofolsäure-Reduktase wird durch das falsche Substrat Methotrexat blockiert (TOUROUTOGLOU und PAZDUR 1996).

Ähnlich dem Methotrexat greift auch Tomudex[®] in den intrazellulären Folsäurestoffwechsel ein. Die Reduktion der Thymidinproduktion erfolgt aber im Gegensatz zum MTX durch spezifische Hemmung der Thymidinsynthase. Tomudex[®] gelangt mittels des Folat-Carriers in das Zellinnere und wird dort in eine 100fach wirksamere Form umgewandelt. Die Ausscheidung erfolgt renal und biliär ohne weitere Metabolisierung (COCCONI 1997).

Cisplatin ist ein zweiwertiges Platin enthaltendes Molekül, welches innerhalb von DNA-Molekülen oder zwischen verschiedenen DNA-Strängen Brücken ausbildet, in deren Folge eine DNA-Fehllablesung resultiert, die für den zytostatischen Effekt verantwortlich ist (ROBERTS 1983).

Der neue Topoisomerase-I-Inhibitor Topotecan ist ein Derivat des seit mehr als 30 Jahren chemotherapeutisch genutzten Camptothecins (BURRIS und FIELDS 1994). Es verhindert die Korrektur der bei Transkription und Replikation aufgetretenen Fehlzusammensetzungen der DNA (HSIANG et al. 1985) und führt somit zum Absterben der Tumorzelle. Topotecan wird zu 60-70% renal eliminiert (ZAMBONI et al. 1998), was einen Einfluß der Substanz auf das Nierengewebe erwarten läßt.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsmaterial

2.1.1. Rattengewebe

Die Voruntersuchungen zur Standardisierung und Validierung des Versuchsablaufes an menschlichen Nierenrindenschnitten (NRS) wurden an Nierengewebe von weiblichen Wistar-Ratten (Han: WIST) aus dem Auszuchtstamm der Koloniezucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Das Alter der Tiere betrug 60 ± 5 Tage. Die Ratten, welche in Gruppen zu sechs Tieren pro Käfig (35 x 55 x 18cm) mit Einstreu (Weichholzgranulat 8/15, Fa. Altromin, Lage, BRD) untergebracht waren, wurden unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von 50% und einem Hell-Dunkel-Rhythmus (12/12 Stunden) im institutseigenen Tierhaus gehalten. Die Tiere wurden mit Standardfutter (Altromin 1316, Fa. Altromin, Lage, BRD) und Wasser ad libitum versorgt.

Die Organentnahmen wurden dem Thüringer Landesverwaltungsamt, Referat Tierschutz, ordnungsgemäß angezeigt und die gültige Gesetzgebung für den Umgang mit Versuchstieren beachtet.

2.1.2. Menschliches Gewebe

Das Nierengewebe stammte von Patienten, die sich in der Klinik für Urologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Direktor: Prof. Dr. med. J. Schubert) einer totalen Tumornephrektomie unterziehen mußten. Im Zeitraum von Februar 1998 bis Mai 2001 wurde Nierengewebe von 27 Patienten (18 männlich, 9 weiblich) in die Experimente einbezogen. Das durchschnittliche Patientenalter betrug 57,7 Jahre (35-75 Jahre). Es wurde sowohl tumoröses als auch makroskopisch intaktes Gewebe genutzt. Histologisch handelte es sich bei den Tumoren ausschließlich um Nierenzellkarzinome vom Klarzelltyp. Nachfolgende Übersicht (**Tab. 3**) dient der Charakterisierung der Patienten, deren Gewebeproben zur Untersuchung gelangten.

Tabelle 3

Charakterisierung der Patienten, deren Gewebeproben zur Untersuchung gelangten, nach Alter, Geschlecht, Operationszeitpunkt, Tumorart und Histologie

Pat.-Nr.	Geb.datum	Geschlecht	OP-Datum	Lokalisation	Histologie
1	30.04.51	M	23.02.98	rechts	pT1NxM0,G2,R0
2	28.03.63	M	09.03.98	rechts	pT3b
3	28.04.35	W	11.03.98	links	pT1N0M0,G1,R0
4	04.08.41	M	08.04.98	rechts	pT1pN1Mx,G2,R0
5	03.04.35	W	14.05.98	links	pT3bpN0M0,G3,R1
6	08.10.23	W	19.05.98	links	PT3apN0Mx,G3,R0
7	24.11.31	M	25.05.98	rechts	pT3apN0M0,G1,R0
8	26.08.43	M	03.06.98	links	pT3aN0M0,G2,R0
9	08.01.50	W	08.06.98	rechts	pT1NxpM0,G1,R0
10	07.06.41	M	10.06.98	links	pT1N0M0,G1,R0
11	06.02.29	M	30.06.98	rechts	pT2NxMx,G2,R0
12	19.04.42	M	25.08.98	rechts	pT3bpN0M1,G3,R2
13	29.05.49	M	10.09.98	rechts	pT1NxMx,G1,R0
14	25.06.53	M	11.11.98	links	pT1pN0Mx,G3,R0
15	04.06.41	M	17.11.98	rechts	pT2NxMx,G1,R0
16	23.11.40	W	14.12.98	links	pT1pN0pMx,G3,R0
17	19.04.41	M	02.03.99	rechts	pT1NxMx,G1,R0
18	22.07.28	W	10.03.99	rechts	pT1pNxpMx,G2,R0
19	06.01.33	M	26.08.99	rechts	pT2pN1Mx,G2,R1
20	03.05.25	M	26.08.99	rechts	pT1pN0pMx,G2,R0
21	15.07.31	W	08.09.99	links	pT1pN0pMx,G2,R0
22	07.05.43	W	30.11.00	links	pT1pN0pM0,R0
23	30.05.44	W	04.12.00	links	pT1pN1pM0,L0V0,G2,R0
24	22.01.59	M	15.01.01	rechts	pT1pN0pM0,R0
25	17.08.40	M	28.03.01	links	pT1pN0pM0,L0V0,R0
26	19.09.40	M	10.05.01	links	pT1pN0pM0,L0V0,G2,R0
27	03.08.44	M	22.05.01	rechts	pT2pN0pM1,G3,R0

Unmittelbar nach der Tumornephrektomie wurden die Gewebeproben in 4°C kalter University of Wisconsin (UW)-Lösung (Du Pont Pharma, Bad Homburg, BRD) aufbewahrt. Innerhalb von ca. 20-60 Minuten wurden die Präparate durch uns von der Urologischen Klinik in das Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena transportiert, wo die weitere Gewebevorbereitung für die *in vitro*-Experimente erfolgte. Die unterschiedlich langen Transportzeiten ließen sich logistisch nicht weiter optimieren, so daß die gemessenen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten zum Teil durch die verschieden langen kalten Ischämiezeiten erklärlich sind.

2.2. Versuchsdurchführung

Die im folgenden beschriebenen Versuchsansätze dienten zur Klärung folgender Fragestellungen:

- Bestimmung geeigneter Zytostatikakonzentrationen für die Inkubationsversuche,
- Akkumulationsfähigkeit für verschiedene Zytostatika in Nierenrindenschnitten von Ratte und Mensch,
- Einfluß der Energiebereitstellung (verschiedene Begasungen mit O₂ bzw. N₂) auf die Akkumulation von Zytostatika,
- Einfluß von Dexamethason, Trijodthyronin bzw. EGF (epidermal growth factor) auf die Akkumulationsfähigkeit.

2.2.1. Präparation des Rattengewebes

Zu Versuchsbeginn wurden die Ratten einer flachen Ethernarkose unterzogen. Nach anschließender Dekapitierung und sorgfältiger Entblutung, um eine Blutleere der Nieren zu erlangen, wurden nach einem medianen Abdominalschnitt die Nieren entnommen, dekapsuliert und in 4°C kalter 0,15M NaCl-Lösung bis zur Anfertigung der Schnitte aufbewahrt.

Danach erfolgte die Herstellung der Nierenrindenschnitte in einem Schneideblock. Dieser besteht aus einem Kunststoffkörper in Form eines Quaders (12,5 x 8 x 4cm). Ein daran befestigter Deckel aus durchsichtigem PVC dient der stabilen Fixierung des Nierengewebes für die weitere Präparation. Mit einer Rasierklinge wurden freihand ca. 0,3-0,5mm dicke

Schnitte von der anterioren und posterioren Nierenoberfläche hergestellt. Sie enthalten ca. 70% proximale Tubuluszellen der superfiziellen Nephronen (STOPP 1982). Bei dieser Schnittdicke ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung auch der tiefer gelegenen Tubuluszellen gewährleistet (WEDEEN und WERNER 1973, BERNDT 1976, STOPP 1982). Bis zur Einwaage wurden die Schnitte mit der Schnittfläche nach oben auf eisgekühlten Plastikschälchen bei 4°C gelagert. Bei längerer Verweildauer der Schnitte bis zu deren Weiterverarbeitung wurden diese in einer Krebs-Henseleit-Pufferlösung aufbewahrt, um die Funktionstüchtigkeit des Gewebes aufrechtzuerhalten. Der Puffer wurde aus folgenden Lösungen hergestellt:

40ml 2,7M NaCl, 30ml 0,15M KCl, 5ml 0,22M KH₂PO₄, 10ml 0,11M MgSO₄ x 7 H₂O, 10ml 0,12M CaCl₂ x 6 H₂O, 200ml NaHCO₃ (gesättigt) wurden ad 924ml mit Aqua bidest. verdünnt (alle genannten Substanzen wurden von der Fa. Sigma, Deisenhofen, BRD bezogen). Zu dieser Gebrauchslösung wurden pro 100ml 300mg HEPES-Puffer (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-Ethansulfonsäure, Fa. Serva Feinbiochemika, Heidelberg BRD) und 10ml Phenolrot-Stammlösung (10mg Phenolrot/100ml Aqua bidest.) gegeben. Anschließend wurde die Lösung 30min mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂, Fa. Linde, Höllriegelsgreuth, BRD) begast und der pH-Wert mittels 1N HCl bzw. 1N NaOH auf 7,4 eingestellt (Digitalmeßgerät MV 870, Fa. Präcitronic, Dresden, BRD).

2.2.2. Präparation des menschlichen Gewebes

Unmittelbar nach Ankunft des Untersuchungsmaterials aus der Klinik für Urologie erfolgte die Präparation des tumorösen und intakten Nierengewebes analog zu der des Rattengewebes. Trotz extrem unterschiedlicher morphologischer Eigenschaften der Präparate (Konsistenz, Gewebzusammensetzung, Wassergehalt etc.) ließen sich hinreichend standardisierte Nierenschnitte mit einer Dicke von 0,3-0,5mm anfertigen. Bei gesundem menschlichen Nierengewebe, bei dem es sich um makroskopisch unauffälliges Material der tumorbefallenen Niere handelte, wurden weitestgehend die Schnitte aus der Nierenrinde angefertigt. Die Einbeziehung von Markanteilen wurde nach Möglichkeit vermieden. Die Schnitte wurden bis zur Einwaage auf eisgekühlten Plastikschälchen gelagert.

Die zur Untersuchung zur Verfügung gestellten Gewebestücke differierten teilweise erheblich bezüglich ihres Gewichtes. Daraus ist die zum Teil geringe Anzahl an Versuchsansätzen pro Patient zu erklären.

2.2.3. Gewebeinkubation

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze zur Bestimmung der Zytostatikaakkumulation gewählt:

a) In den sogenannten **Akutversuchen** erfolgte eine zweistündige Inkubation der Nierenrindenschnitte in einem Medium, welchem die Testsubstanzen in verschiedenen Konzentrationen beigegeben waren. Eine Inkubationszeit von 2 Stunden hatte sich in früheren Versuchen (STOPP und BRÄUNLICH 1974) als optimal erwiesen, um steady state-Bedingungen zu erreichen. Die Akutversuche dienten der allgemeinen Charakterisierung des Akkumulationsvermögens des Nierengewebes für Zytostatika und der Ermittlung geeigneter Mediumkonzentrationen der Zytostatika für die Langzeitversuche. Die Mediumkonzentrationen orientierten sich dabei jeweils nach klinisch relevanten Dosierungen und differieren daher je nach Substanz.

b) In vorangegangenen Untersuchungen an Nierengewebe der Ratte, an intaktem menschlichen Nierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe ließ sich eine Stimulation der Akkumulationsfähigkeit für p-Aminohippurat (PAH) nach 24 Stunden *in vitro* nachweisen (FLECK 1997, Fleck et al. 2000). Darauf basierend sollte geklärt werden, ob eine *in vitro*-Stimulation der Zytostatika-Akkumulation durch eine 24-stündige Inkubation möglich ist (**Langzeitversuche**).

2.2.3.1. Akutversuche

Es wurden Gewebeschnitte von ca. 100mg Gewicht auf einer Präzisionswaage (Sartorius LC 220 S, Sartorius AG, Göttingen, BRD) eingewogen. Als Inkubationsmedium diente Cross-Taggart-Phosphatpuffer (pH = 7,4), welcher sich aus folgenden Substanzen zusammensetzte: 0,3M NaCl, 0,3M KCl, 0,02M CaCl₂ x 6 H₂O, 0,1M Na-Phosphatpuffer (17,8g Na₂HPO₄ x 4 H₂O/l + 3,956g NaH₂PO₄ x 2 H₂O/l) (Fa. Sigma, Deisenhofen, BRD), gelöst in Aqua bidest. Die Lösung hatte eine Osmolarität von 218mosmol/l.

Die Aufteilung der Inkubationslösung in 25ml-Erlenmeyerkölbchen erfolgte mittels Multipipette und Combitip (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, BRD). In den Kölbchen wurden 3ml des Inkubationsmediums für 20min einem Sauerstoffdurchfluß (Fa. Linde, Höllriegelsgreuth, BRD) von ca. 2l/h je Gefäß ausgesetzt, um einen optimalen Sauerstoffgehalt im Medium für die Funktionsfähigkeit der zu untersuchenden Gewebeproben

zu gewährleisten. Danach wurden die gewogenen Gewebeschnitte in die Kölbchen eingebracht, wobei auf ein freies Schwimmen der einzelnen Schnitte zu achten war, um die Akkumulationsfähigkeit nicht zu beeinträchtigen. Für jede verwendete Konzentration wurden Leerwerte ohne Gewebszusatz mitgeführt.

Während einer Zeit von 120min wurden die Nierenrindenschnitte in einem Schüttelinkubator vom Typ Julabo SW-21-C (Labortechnik, Seelbach, BRD) bei einer Sauerstoffbegasung von ca. 2l/h je Kölbchen, einer Schüttelfrequenz von 90-100 Oszillationen pro Minute und einer Temperatur von 25°C inkubiert. Die genannten Parameter hatten sich in früheren Untersuchungen für die Durchführung von Kurzzeitversuchen an Nierengewebe der Ratte als optimal erwiesen (STOPP und BRÄUNLICH 1973, STOPP 1982).

2.2.3.2. Langzeitversuche

Für die Langzeitversuche diente Williams-E-Medium (Biochrom, Berlin, BRD) als Inkubationsmedium. Zu Versuchsbeginn wurden 200ml Williams-E-Medium mit 58,4mg L-Glutamin (Sigma Chemical, St. Louis, USA), 640µl Normalinsulin (Berlin-Chemie, Berlin, BRD) und 250µl Gentamicin 80 (Ratiopharm, Ulm, BRD) versetzt. Die Zusätze im Medium dienen der Aufrechterhaltung der Funktionstüchtigkeit der Schnitte während der Inkubation und der Vermeidung einer bakteriellen Kontamination. Die Einwaage des Glutamin erfolgte mittels Präzisionswaage (Sartorius LC 220 S, Sartorius AG, Göttingen, BRD). Die Zugabe von Insulin und Antibiotikum wurde durch Pipettierung (Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, BRD) vorgenommen. Nach Herstellung dieser Gebrauchslösung erfolgte jeweils die Zugabe der verschiedenen Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen, durch die eine Stimulation des Akkumulationsvermögens der NRS erreicht werden sollte. Es kamen zur Anwendung Dexamethason (Fortecortin[®] Mono 4, Fa. Merck, Darmstadt, BRD), Trijodthyronin (Thyrotardin[®]-inject.N, Henning, Berlin, BRD) und Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF, Bachem Biochemica, Heidelberg, BRD). Alle chemischen Substanzen sind von analytischer Qualität und kommerziell erhältlich.

Die vorbereitete Inkubationslösung wurde 15-20min mit Carbogen begast, um die Zellfunktionen des Gewebes zu gewährleisten. Anschließend wurde der pH-Wert, wie bereits oben beschrieben, auf 7,4 eingestellt. Mittels Multipipette und Combipip (s.o.) wurden 10ml der Inkubationslösung in 50ml-Erlenmeyerkölbchen portioniert und nochmals für 20s einer

Carbogenbegasung unterzogen, bevor etwa 200mg Nierengewebe je Kölbchen eingebracht wurden.

Bei ca. 100 Schüttelbewegungen pro Minute, einer Temperatur von 30°C und einem Carbogendurchfluß von ca. 1l/h je Kölbchen verblieben die Proben 24h im Inkubator.

Nach dieser Zeit wurden die Schnitte vorsichtig mittels Papierfilter (Fa. Filtrak, Niederschlag/Erzgebirge, BRD) getrocknet und deren Gewicht bestimmt. Ungefähr 100mg Schnittgewebe je Probe wurden für den nun folgenden entsprechenden Akutversuch (s.o.) in 25ml-Erlenmeyerkölbchen eingebracht.

Eine Verlängerung der Inkubationsdauer in den Langzeitversuchen führte in vorangegangenen Untersuchungen sowohl in Nierenrindenschnitten der Ratte als auch in denen intakten menschlichen Gewebes zu keinem weiteren Anstieg der nachfolgenden PAH-Akkumulation (FLECK 1997, FLECK et al. 1998). Deshalb wurde in den Langzeitversuchen dieser Arbeit ebenfalls eine Inkubationszeit von 24h gewählt.

2.2.3.3. Zusatzversuche

Zur Beurteilbarkeit der aktiven bzw. passiven Anteile am Transport der Testsubstanzen erfolgten einige Akutversuche statt mit der üblichen Sauerstoffbegasung unter Stickstoffbegasung (Fa. Linde, Höllriegelsgreuth, BRD), um anaerobe Bedingungen zu erreichen. Sonst bestanden keine Abweichungen im Versuchsablauf.

Um die Zeitabhängigkeit der Akkumulation beurteilen zu können, wurden NRS in zeitlichen Abständen (10, 20, ...120min) dem Inkubationsgefäß entnommen und der Schnitt-Medium-Quotient ($Q_{S/M}$) bestimmt.

Versuche, bei denen der Medikamenten-Efflux aus dem NRS bestimmt werden sollte, untergliederten sich in zwei Teile. Nach dem o.g. Akutversuch (Beladung der Schnitte) erfolgte die Umlagerung der Schnitte in ein Zytostatikum-freies Cross-Taggart-Medium. Auch hier wurden die Schnitte zu unterschiedlichen Zeiten dem Medium entnommen. So konnte bestimmt werden, wieviel Zytostatikum aus den Nierenrindenschnitten pro Zeiteinheit wieder in das Medium abgegeben wurde.

2.3. Probenaufarbeitung

Nach 2-stündiger Inkubation der Nierenrindenschnitte in Zytostatikum- bzw. PAH-haltiger Cross-Taggart-Lösung erfolgte die Trennung von Medium und Gewebe mittels Filtration. Hierzu wurden Rundfilter der Größe 6 (Fa. Filtrak, Niederschlag/Erzgebirge, BRD) verwendet. Die Schnitte wurden im Anschluß vom Filter genommen, sorgfältig abgetupft und gewogen. Diese Bestimmung des Feuchtgewichtes diente der späteren Konzentrationsberechnung.

2.3.1. Homogenat

Zur Herstellung des Homogenates wurden die Schnitte in einem Glasröhrchen mit 0,5ml Aqua bidest. versetzt und homogenisiert (Homogenisator des Prüfgerätewerkes Medingen/Dresden, BRD). Um möglichst alle Gewebepartikel zu erfassen, wurde dreimal mit je 0,5ml Aqua bidest. gespült und jeweils erneut homogenisiert.

Homogenat und Inkubationsmedium wurden nachfolgend mit 0,5ml 20%iger Trichloressigsäure (Fa. Merck, Darmstadt, BRD) denaturiert. Nach einer Einwirkzeit von 10min erfolgte durch Zentrifugation (Megafuge 1.0, Hereus Instruments, Osterode, BRD) bei 4000U/min und einer Zeit von 10min die Trennung in zelluläre Bestandteile und Überstand. Vom Überstand wurden 2,0ml dekantiert und zu 1,0ml Aqua bidest. dazugegeben.

2.3.2. Medium

Das nach der Trennung von Medium und Gewebe gewonnene und enteweißte (siehe 2.3.1.) Filtrat wurde 10min bei 4500U/min zentrifugiert, um ein Absetzen der losgelösten Zellpartikel und denaturierten Proteine zu erreichen. Vom Überstand wurden 2,0ml dekantiert und zu 1,0ml Aqua bidest. dazugegeben.

2.4. Bestimmungsmethoden

2.4.1. p-Aminohippurat (PAH)

Dem Nachweis des PAH liegt die von BRATTON et al. (1939) entwickelte Methode zugrunde. Das Prinzip dieser Methode besteht in der Bildung von Diazoniumchlorid und der Kopplung der freien NH₂-Gruppe an N-Naphtyläthylendiamin unter Bildung eines kolorimetrisch nachweisbaren Farbkomplexes. Durch Diazotierung erfolgte der Nachweis der freien Aminogruppe am aromatischen Ring des p-Aminohippurat.

Dazu sind die Proben mit 0,1ml Natriumnitrit (NaNO₂, Laborchemie Apolda, BRD) versetzt worden, wodurch sich das Diazoniumsalz bildete. Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten wurde das überschüssige Nitrit durch 0,1ml 5%ige Amidosulfonsäure (Sojuzchimexport, Kiew, Ukraine) gebunden. Das Diazoniumsalz wurde nach weiteren fünf Minuten mit 0,1ml 0,1%iger N-[Naphtyl-(1)]-äthylen-diammoniumchlorid-Lösung (BRATTON-MARSHALL-Reagenz, Fa. Merck, Darmstadt, BRD) zu einem stabilen Azofarbstoff gekoppelt.

Die Herstellung der Natriumnitritlösung erfolgte am Versuchstag. Es wurden 200mg Natriumnitrit auf einer Präzisionswaage (Sartorius LC 220 S, Sartorius AG, Göttingen, BRD) abgewogen und mit 20ml Aqua bidest. zu einer 1%igen Lösung angesetzt. 2,5g Amidosulfonsäure wurden in 50ml Aqua bidest. gelöst und eine 5%ige Lösung hergestellt. Diese war bei 4-7°C für ungefähr zwei Wochen haltbar. Das Farbreagenz nach BRATTON-MARSHALL, hergestellt aus 100mg N-[Naphtyl-(1)]-äthylen-diammoniumchlorid-Lösung auf 100ml Aqua bidest., war in einer dunklen Flasche für ca. vier Wochen bei 4-7°C haltbar. Die Intensität des Farbstoffkomplexes erreicht nach 50 Minuten ihr Maximum und ist länger als eine Stunde stabil. Die Extinktionsmessung erfolgte mit dem Spektralfotometer Spekol 1100 (Carl Zeiss, Jena, BRD) bei einer Wellenlänge des Lichtes von 545nm gegen einen PAH-freien Leerwert.

Die Akkumulationsfähigkeit des Nierengewebes für PAH wurde als Schnitt-Medium-Quotient ($Q_{S/M}$) wie folgt berechnet:

$$Q_{S/M} = \frac{\mu\text{g PAH/g Schnitt}}{\mu\text{g PAH/ml Medium}} \quad (1)$$

Zur Kontrolle ließ sich der $Q_{S/M}$ -Wert auch indirekt ermitteln, indem der Quotient aus der berechneten Konzentration im Schnitt und PAH-Konzentration in 1ml Medium gebildet wurde. Dieses Berechnungsverfahren erlaubte es, bei $Q_{S/M}$ -Werten, die als Ausreißer identifiziert worden sind (siehe 2.5), herauszufinden wodurch die Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert der übrigen Proben zu erklären war (zu hohe Medium- bzw. zu niedrige Schnittkonzentration)

$$Q_{S/M, \text{ berechnet}} = \frac{c_{\text{Schnitt, berechnet}}}{c_{\text{PAH/1ml Medium}}} \quad (2)$$

$$c_{\text{Schnitt, berechnet}} = \frac{\text{PAH-Menge in 3ml MBW} - (3 \times c_{\text{PAH/1ml Medium}})}{\text{Schnittgewicht}} \quad (3)$$

MBW: Mediumbezugswert (PAH-Konzentration im Medium ohne Gewebezusatz)

$c_{\text{Schnitt, berechnet}}$: berechnete PAH-Konzentration im Schnitt nach Inkubation

$c_{\text{PAH/1ml Medium}}$: PAH-Konzentration in 1ml Medium nach Inkubation

Die Wiederfindungsrate (WFR) gibt die Summe der PAH-Mengen in Medium und Schnitt nach Beendigung der Inkubation bezogen auf 3ml Lösung an. Sie wird errechnet aus:

$$\text{WFR [\%]} = \frac{\text{PAH-Menge in 3ml MBW}}{3 \times c_{\text{PAH/1ml Medium}} + c_{\text{PAH/1g Schnitt}} \times m_{\text{Schnitt nach Inkubation}}} \times 100 \quad (4)$$

$c_{\text{PAH/1 ml Medium}}$: PAH-Konzentration in 1ml Medium nach Inkubation

$c_{\text{PAH/1 g Schnitt}}$: PAH-Konzentration in 1g Schnittgewebe

$m_{\text{Schnitt nach Inkubation}}$: Schnittgewicht nach Inkubation [mg]

Die Ermittlung der WFR war ein wichtiger Kontrollparameter, um die exakte Inkubation und korrekte Messung der PAH-Konzentrationen im Schnitt und im Medium einschätzen zu können.

2.4.2. Methotrexat (MTX)

Es wurde die Substanz Methotrexat „Lederle“ Lösung 50 (Lederle, Wolfratshausen, BRD) verwendet.

Nachdem Homogenat und Medium vorbereitet waren (s.o.), wurde jeweils 1ml dekantiert. Aus versuchstechnischen Gründen wurden die Proben bei -20°C bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren. Den nächsten Arbeitsschritt stellte die Vorbereitung der Proben zur späteren Konzentrationsbestimmung mittels HPLC dar. Es wurde die Methode nach ALBERTIONI (1995) genutzt, welche für die MTX-Bestimmung in Gewebehomogenat erweitert werden mußte. An dieser Stelle sei Herrn Dr. rer. nat. M. Rost, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena, herzlich für seine Unterstützung gedankt.

Festphasenextraktionssäulen LC-8 PK/54 (Supelco, Bellefonte, USA) wurden mit 3ml reinem Methanol (Roth, Karlsruhe, BRD) und 3ml 0,1M Phosphorsäure konditioniert. Im Anschluß wurde die Säule mit einem Gemisch aus 0,5ml Probe und 2ml 0,1M Phosphorsäure beladen. Nach dessen Durchlauf wurde die Säule mit 2ml Methanol (5%ig in Aqua bidest.) gewaschen. Im Anschluß an ein zweiminütiges Trocknen der Säule im Luftstrom erfolgte die Elution der Probe mit 2ml Trifluoressigsäure (TFA, Fa. Aldrich, Deisenhofen, BRD; 2%ig in Methanol).

Da das in einem TFA-Methanol-Gemisch gelöste MTX nicht auf die HPLC-Säule aufgetragen werden kann, mußte die Lösung eingetrocknet werden. Hierzu wurde das Trockentemperiersystem TCS (Labortechnik Barkey, Bielefeld, BRD) genutzt. Hierin verblieben die Proben zwei Stunden bei 45°C unter konstanter Stickstoffbegasung. Danach wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt, bis die quantitative Bestimmung des MTX-Gehaltes mittels HPLC als Serienmessung erfolgen konnte.

Zum Einsatz kam ein System der Fa. Knauer (Berlin, BRD) mit Shimadzu 551 Fluoreszenzdetektor (Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) und einer C18-Trennsäule (80x4,6mm I.D., $3\mu\text{m}$, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA). Die Probenaufgabe erfolgte mit einem Autosampler CMA-240 (Carnegie Medicine Schweden). Die mobile Phase, bestehend aus 0,01M Phosphatpuffer (pH 6,5), 6% Acetonitril und 0,06% Wasserstoffperoxid (Fa. Sigma Deisenhofen, BRD) durchströmte mit einem Fluß von 1ml/min bei einem Druck von 135bar und einer Temperatur von 37°C die Säule. Die Retentionszeit für MTX betrug unter den genannten Bedingungen 9min.

Die Akkumulationsfähigkeit (Q_{SM}) für MTX berechnete sich wie unter (1) für PAH angegeben.

2.4.3. Cisplatin (CP)

Die Versuche wurden mit Cis-Diammindichlorplatin (Bristol, München, BRD) durchgeführt. Nachdem die Trennung in Nierengewebe und Medium mittels Filtration (s.o.) erfolgt war, wurde das Feuchtgewicht der NRS bestimmt und das Medium zentrifugiert (2.3.2.). Nierenschnitte und Medium gelangten anschließend eisgekühlt in das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena (Direktor: Prof. Dr. T. Deufel) und wurden dort unter Leitung von Prof. Dr. K. Winnefeld zur quantitativen Cisplatin-Bestimmung vorbereitet. An dieser Stelle danken wir den an der CP-Bestimmung beteiligten Mitarbeitern für die freundliche Unterstützung.

Die CP-Bestimmungen erfolgten mittels flammenloser Atom-Absorptions-Spektroskopie im Graphitrohr (AAS 4 EA, Carl Zeiss Jena, BRD).

Zur Vorbereitung wurden die Gewebeproben vier Stunden im Trockenschrank bei 110°C aufbewahrt und anschließend das Trockengewicht ermittelt. Vor der Platin-Messung muß das Gewebe mineralisiert werden. Daher wurde es nach Trocknung mit einer 3:2 Mischung von Salpetersäure (HNO₃) und Perchlorsäure (HClO₄) versetzt und bis zur Entstehung eines weißen Pulvers eingedampft. Die veraschten Proben wurden vor dem Meßprozeß in 0,1N HNO₃ aufgenommen (alle verwendeten Laborsubstanzen Fa. Sigma Deisenhofen, BRD). Die Berechnung der Platin-Konzentration erfolgte im Vergleich zu einer wäßrigen Eichkurve (WINNEFELD et al. 1992).

Die Akkumulationsfähigkeit der Gewebeschnitte ($Q_{S/M}$) für CP wurde, wie unter (1) für PAH angegeben, bestimmt.

2.4.4. Tomudex[®] (TDX, Raltitrexed)

Bei den Versuchen kam die Substanz ZD 1694 der Fa. Zeneca (Cheshire, U.K.) zur Verwendung.

Die Proben wurden nach Trennung in Gewebe und Medium, Feuchtgewichtsbestimmung und Mediumzentrifugation (s.o.) trockenisgekühlt zur quantitativen Bestimmung in das Westdeutsche Tumorzentrum nach Essen verschickt.

Dort erfolgte eine Ultrafiltration der Medien über Centriscart I-Röhrchen (Sartorius, Göttingen, BRD) mit einem cut-off von 10000 bei Raumtemperatur für 30min.

Die Gewebeschnitte wurden mit 900µl eines Calcium- und Magnesium-freien Phosphatpuffers sowie 100µl Proteinase K versetzt und 4h bei 56°C in Eppendorfcaps aufgeschlossen. Das gewonnene Homogenat wurde zentrifugiert und analog dem Medium weiter aufgearbeitet. Weitere Angaben sind HILGER et al. (1999) zu entnehmen.

Es erfolgte die Bestimmung des Tomudex[®]-Gehaltes im Ultrafiltrat der Proben nach einer für Gewebehomogenat und Inkubationsmedium modifizierten RP-HPLC-Methode für den Tomudex[®]-Nachweis in Oxalatplasma (HILGER et al. 1999). Wir danken an dieser Stelle Herrn Dr. Hilger und seinen Mitarbeitern für die Messung der Tomudex[®]-Konzentrationen.

Für die finanzielle Unterstützung bei der Messung der Tomudex[®]-Proben danken wir der Fa. Zeneca (Niederlassung Plankstadt, BRD).

Die Berechnung der Akkumulationsfähigkeit ($Q_{S/M}$) für TDX geschah wie unter (1) für PAH beschrieben.

2.4.5. Topotecan (TPT, Hycamtin[®])

Es wurde die Substanz Topotecan der Firma SmithKline Beecham Pharma (München, BRD) verwendet. Nach Inkubation und anschließender Trennung in Gewebe und Medium (s.o.) erfolgte die Aufarbeitung des Mediums. Hiervon wurden nach Zentrifugation (4°C; 10min; 4000U/min) 1,5ml mit 4,5ml eiskaltem Methanol vermischt und auf diese Weise enteivweißt.

Das Gewebe wurde wie in 2.3.1. beschrieben homogenisiert. Statt Aqua bidest. wurden jedoch 2ml eiskalter Phosphatpuffer (PBS, phosphate buffered saline, Sigma Chemical, St. Louis, USA) verwendet. Zentrifugation und Methanol-Zusatz erfolgten analog zur Medium-aufarbeitung.

Der Überstand wurde dekantiert und bis zur quantitativen Bestimmung im Institut für Klinische Pharmakologie der Friedrich-Schiller-Universität (Direktorin: Frau Prof. Dr. med. A. Hoffmann) bei -80°C tiefgefroren.

Die Topotecanbestimmung erfolgte auf Grundlage der von LOOS et al. (1996) beschriebenen HPLC-Methode, welche durch Fr. Dr. U. Merkel, der wir an dieser Stelle für ihre Hilfe herzlich danken, für die Bestimmung von Topotecan in Gewebehomogenat modifiziert wurde (MERKEL et al. 2001). Vor der Analyse wurden 250µl Probe mit 750µl PBS versetzt, 10s

mittels Vortex-Mixer (Reax 2000, Fa. Heidolph, BRD) gemischt und 5min bei 4000U/min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Hereus Instruments, Osterode, BRD). 200µl wurden auf eine HPLC-Säule aufgetragen. Zur Bestimmung wurde das System HPLC LC10 (Fa. Shimadzu, Kyoto, Japan) genutzt.

Topotecan liegt bei physiologischem pH-Wert im Gleichgewicht zwischen der offenen Hydroxycarbonsäure (HC) und der geschlossenen Lactonform vor. Ein saures Milieu führt zur Verschiebung in Richtung des Lactons, welches die Topoisomerase-I-inhibierende Form darstellt.

Die Akkumulation ($Q_{S/M}$) beider Formen sowie die gesamte TPT-Akkumulation wurde analog zur Formel (1) berechnet.

2.5. Statistik

Bei den Versuchen an Nierenrindenschnitten der Ratte wurden pro Versuchsansatz $n = 4-6$ Proben untersucht. Vom menschlichen Gewebe wurden in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Menge ebenfalls bis zu 6 Proben je Versuchsreihe inkubiert. Um die Auswirkung der Hormonstimulation mit verschiedenen Konzentrationen beim gleichen Patienten zu vergleichen, mußte die Anzahl der Proben bei einigen Versuchsreihen reduziert werden. Die Ergebnisse einer Versuchsgruppe sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Es wurde der ungepaarte STUDENT's t-Test zum Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Meßreihen verwendet. Dabei wurde das übliche Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ angenommen.

Aufgrund der logistischen Probleme bei der Beschaffung menschlichen Nierengewebes, der unterschiedlich langen Ischämiezeiten und der stark variierenden Gewebemengen ließen sich in einigen Fällen die $Q_{S/M}$ -Werte nicht mit hinreichender Genauigkeit ermitteln (siehe auch 2.4.1). Deshalb war es notwendig, nicht repräsentative Werte als Ausreißer zu identifizieren, um eine Fehlerfortpflanzung zu vermeiden. Dazu wurde der „Test für den Erwartungswert einer Normalverteilung“ durchgeführt. Wenn ein Wert kein repräsentatives Element aus der Stichprobe der Grundgesamtheit war, wurde dieser in die Mittelwertberechnung nicht einbezogen (DEGEN und LORSCHIED 2001). Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgte mittels des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel 8.0 der Fa. Microsoft Inc., USA auf einem Computer vom Typ 486 der Firma IBM, USA.

3. Ergebnisse

3.1. *In vitro*-Akkumulation verschiedener Modellsubstanzen in Nierengewebe

3.1.1. p-Aminohippurat

Die Ergebnisse aus Versuchen mit der Modellsubstanz PAH (FLECK et al. 1996, 1997, 1998) bilden den Ausgangspunkt dieser Arbeit und sollen deshalb hier kurz zusammengefaßt werden:

Während einer zweistündigen Inkubation von Nierenrindenschnitten in PAH-haltigem Cross-Taggart-Puffer erfolgt die Aufnahme von PAH aus dem Medium in das Gewebe in Abhängigkeit von der Art des Gewebes (**Abb. 1a**). Auffällig ist die extrem geringe Anreicherung in Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen. Es werden Schnitt-Medium-Quotienten von lediglich ≤ 1 erreicht, was dafür spricht, daß eine aktive PAH-Anreicherung in Tumorgewebe nicht stattfindet. Dagegen akkumulieren Rattennierenschnitte und Rindenschnitte von intakten menschlichen Nieren PAH in beträchtlichem Ausmaß ($Q_{S/M} = 5,7$ bzw. 5,3).

Nach 24-stündiger Vorinkubation in T_3 -haltigem Williams-E-Medium reagieren alle drei Gewebe mit einer verminderten Akkumulationsleistung, bei den intakten Geweben verringert sich die Akkumulationsrate signifikant um 35% (Ratte) bzw. 45% (menschliche Niere). Beim Tumorgewebe ist der Effekt statistisch nicht zu sichern (**Abb. 1b**).

Unter Dexamethason-Vorbehandlung lassen sich in allen Fällen signifikante Steigerungen der Akkumulation nachweisen. Dabei reagiert das menschliche Gewebe besonders ausgeprägt mit Erhöhung des Schnitt-Mediumquotienten um 90% bei intaktem Nierengewebe und um 50% beim Nierenzellkarzinom. Rattengewebe zeigt eine Zunahme von 35%.

3.1.2. Methotrexat

Es wurde zunächst der renale Methotrexat-Transport bei der Ratte näher charakterisiert. Dies diente vor allem dazu, für die geplanten Stimulationsversuche optimale Inkubationsbedingungen zu ermitteln. Ausgehend von den Erfahrungen mit PAH erfolgte die Bestimmung der MTX-Akkumulation innerhalb von 2 Stunden zunächst in Abhängigkeit von der initialen MTX-Konzentration im Inkubationsmedium (**Abb. 2**). Es ist auffällig, daß die

MTX-Akkumulation mit einem Schnitt-Mediumquotienten von maximal 2,2 deutlich unter der von PAH (5,8) liegt. Offensichtlich werden beide Substanzen durch unterschiedliche Mechanismen transportiert.

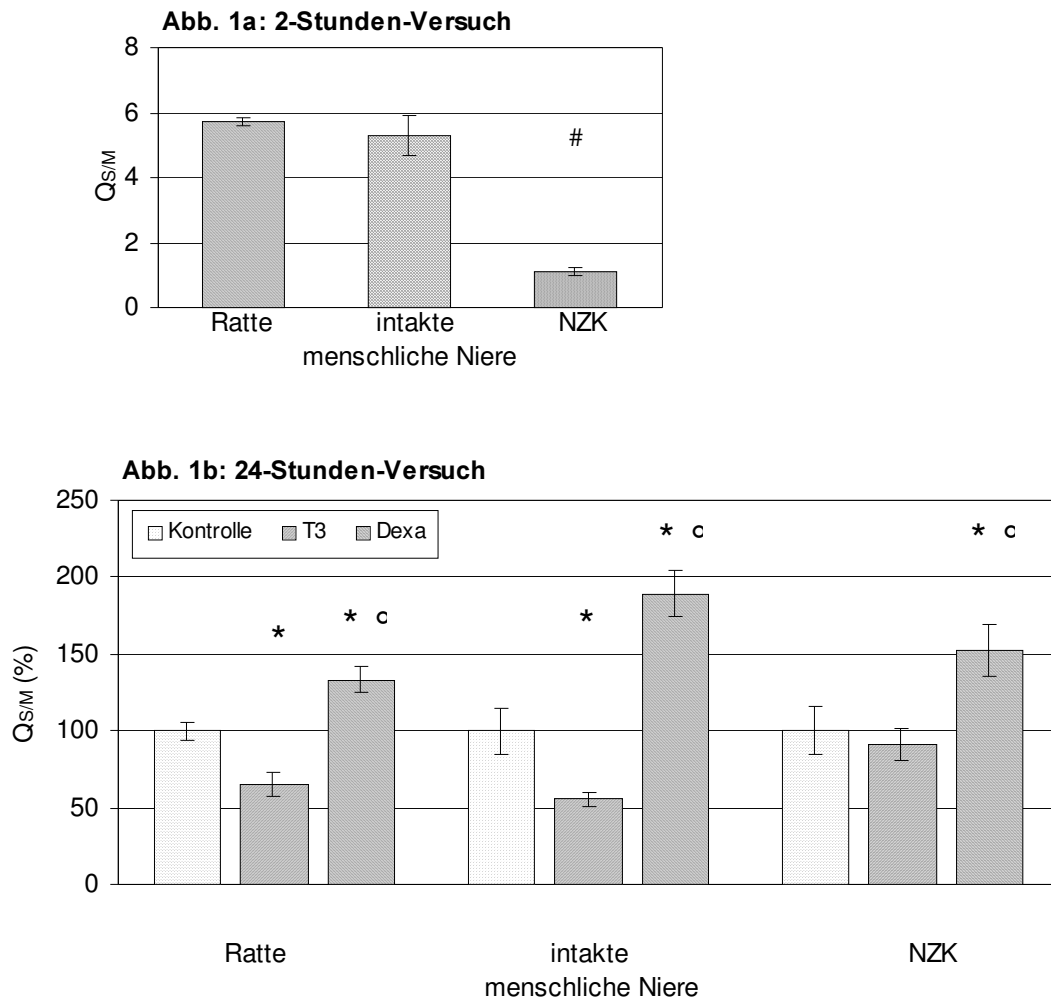


Abbildung 1

Akkumulation (Q_{SM}) von *p*-Aminohyppurat (PAH) während zweistündiger Inkubation in PAH-haltigem Cross-Taggart-Puffer in Nierenrindenschnitten der Ratte, in intaktem menschlichen Nierengewebe und im Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) ohne (1a) und nach (1b) 24h-Vorinkubation in T_3 - bzw. dexamethasonhaltigem (Dexa) Williams-E-Medium, im Vergleich zur Dexa- bzw. T_3 -freien Kontrolle (=100%); initiale PAH-Konzentration 24 μ g/ml; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., n=3-6; # - signifikanter Unterschied zu intaktem Nierengewebe von Ratte und Mensch, * - signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ohne Hormonvorinkubation, ° - signifikanter Unterschied zwischen T_3 - und Dexamethasonvorinkubation ($p \leq 0,05$).

Um Hinweise auf die Energieabhängigkeit der Transportprozesse zu erhalten, wurden die Versuche unter aeroben (Sauerstoffbegasung) und anaeroben (Stickstoffbegasung) Bedingungen durchgeführt (Abb. 2). Die erzielten Akkumulationsraten waren unter Stickstoffbegasung erwartungsgemäß signifikant niedriger (≤ 1) als unter Sauerstoffatmosphäre. Sowohl unter O_2 - als auch unter N_2 -Begasung nimmt die

Akkumulationsrate erwartungsgemäß mit steigender Ausgangskonzentration von MTX im Inkubationsmedium ab. Für die im folgenden durchgeführten Stimulationsversuche wurde als Kompromiß zwischen einer exakten Bestimmbarkeit oberhalb der Nachweisgrenze der Methode und einer möglichst hohen Akkumulationsrate eine initiale MTX-Konzentration im Medium von 30 µg/ml gewählt.

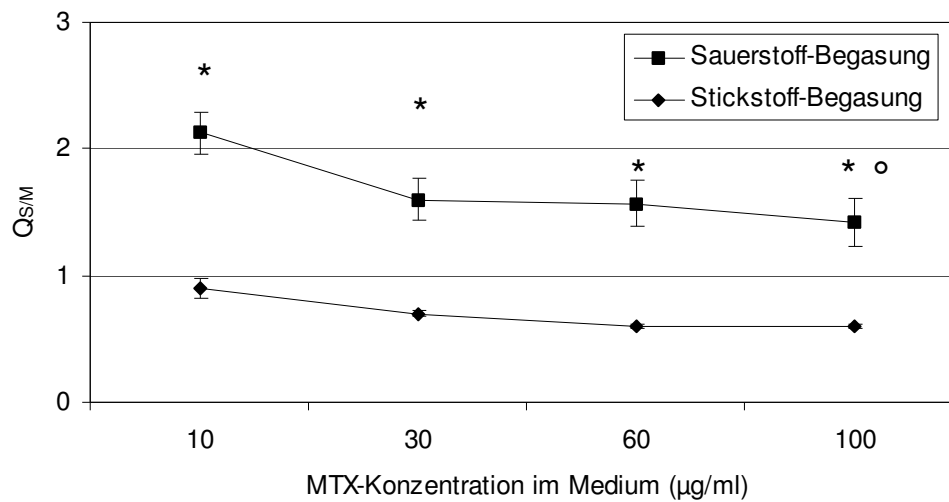


Abbildung 2

Abhängigkeit der Methotrexat (MTX)-Akkumulation ($Q_{S/M}$; 2h-Inkubation) in Nierenrindenschnitten der Ratte von der initialen MTX-Konzentration im Inkubationsmedium (Cross-Taggart-Puffer) und von der Energiebereitstellung (O_2 - bzw. N_2 -Begasung); arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., $n=4$, * - signifikanter Unterschied zwischen aeroben und anaeroben Inkubationsbedingungen, ° - signifikanter Unterschied zur niedrigsten Mediumkonzentration (10 µg/ml) unter O_2 -Begasung ($p \leq 0,05$).

Beim intakten menschlichen Nierengewebe ergab sich eine ähnliche Abhängigkeit von der initialen MTX-Konzentration im Medium (**Abb. 3**). Auch hier führt eine Zunahme der Mediumkonzentration zu einem Rückgang der Aufnahmekapazität. Überraschenderweise lag die maximal erreichbare Akkumulation ($Q_{S/M} = 3,3$) entgegen der bei der Ratte zu erwartenden höheren Transportleistung deutlich über der beim Rattengewebe ($Q_{S/M} = 2,2$).

Da beim Nierenzellkarzinomgewebe nur eine geringe MTX-Aufnahme erfolgt ($Q_{S/M} < 1$), läßt sich auch keine eindeutige Abhängigkeit der Akkumulationsfähigkeit von der initialen MTX-Konzentration im Medium nachweisen. Auffällig ist aber, daß die niedrigste Akkumulationsrate bei der geringsten untersuchten Mediumkonzentration (10 µg/ml) auftritt. Aufgrund der Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode (10^{-4} µg/ml), ist ein Transportoptimum oberhalb einer Mediumkonzentration von 10 µg/ml wahrscheinlich.

Da bei 25µg/ml Methotrexat im Versuchsansatz Inkubationsbedingungen gegeben waren, die mit denen der Ratte vergleichbar sind, wurden die weiteren Versuche mit Mediumkonzentrationen von 25 bzw. 30µg/ml durchgeführt.

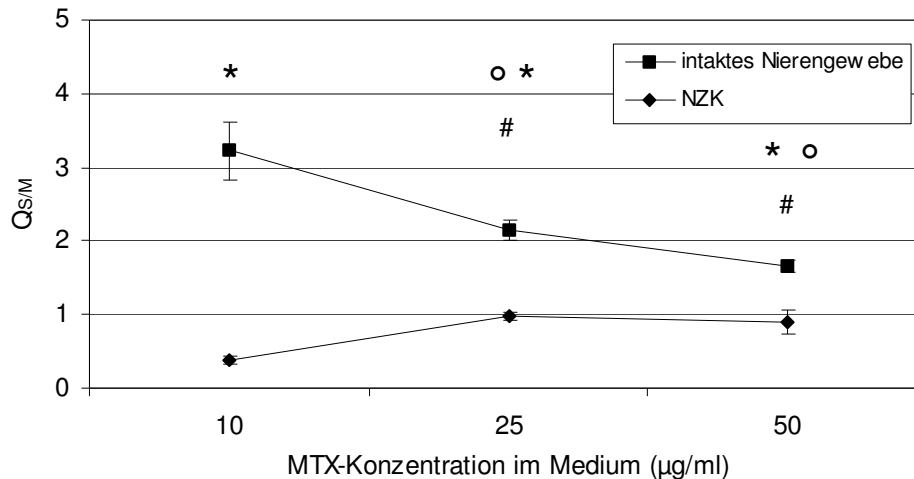


Abbildung 3

Abhängigkeit der Methotrexat (MTX)-Akumulation (Q_{SM} ; 2h-Inkubation) in intaktem menschlichen Nierenrindengewebe und in Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) von der initialen MTX-Konzentration im Inkubationsmedium (Cross-Taggart-Puffer, O_2 -Begasung); arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., $n=5$, * - signifikanter Unterschied zwischen intaktem Gewebe und NZK, ° - signifikanter Unterschied zur niedrigsten Mediumkonzentration (10 µg/ml) bei intaktem Gewebe, # -signifikanter Unterschied zur niedrigsten Mediumkonzentration (10 µg/ml) beim NZK ($p \leq 0,05$).

Zur Optimierung des zeitlichen Ablaufes von Uptake und Efflux des MTX erfolgten am Rattengewebe Untersuchungen zur Abhängigkeit der MTX-Anreicherung von der Inkubationsdauer (Abb. 4). Es ist ersichtlich, daß nach zweistündiger Inkubation ein steady-state erreicht wird (Abb. 4a). Aufgrund dessen wurde die Inkubationsdauer der anschließenden Versuche auf zwei Stunden festgesetzt.

Für die Untersuchung von Transporten an Zellmembranen ist neben der Messung der Aufnahme (Uptake) die Charakterisierung der Abgabe (Efflux) von Substanzen aus dem Zellinneren von Bedeutung. Es wurde daher Nierengewebe analog zu den o.g. Ergebnissen zwei Stunden mit Methotrexat inkubiert. Anschließend wurden die Nierenrindenschnitte in MTX-freies Medium umgelagert, und die MTX-Konzentration im Gewebe zu unterschiedlichen Zeiten ermittelt (Abb. 4b). Dieser Versuchsansatz läßt Rückschlüsse zur

Differenzierung zwischen aktivem und passivem Austransport zu, da die Experimente unter aeroben und anaeroben Bedingungen erfolgten. Der Verlauf der Efflux-Kurven ist bis auf streuungsbedingte Abweichungen der Ausgangswerte nahezu parallel. Die Konzentrationsabnahme ist unter aeroben und anaeroben Inkubationsbedingungen annähernd gleich, so daß offensichtlich trotz O₂-Begasung keine höheren Q_{S/M}-Werte aufrecht erhalten werden können.

3.1.3. Cisplatin

Die Vorversuche dienten der Ermittlung einer geeigneten Konzentration von Cisplatin im Inkubationsmedium, um möglichst optimale Inkubationsbedingungen zu gewährleisten. Zunächst wurden Rattennierenschnitte mit unterschiedlichen Cisplatinkonzentrationen unter aeroben und anaeroben Bedingungen über zwei Stunden inkubiert (**Abb. 5**). Überraschenderweise ist für CP keine klare Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation von der von uns verwendeten initialen Mediumkonzentration unter aeroben Inkubationsbedingungen nachweisbar. Auffällig ist der besonders niedrige Q_{S/M}-Wert (~1) bei der geringsten CP-Konzentration (3µg/ml). In einem breiten Konzentrationsbereich (30 – 300µg/ml) wird CP um ca. das 1,5fache im Nierengewebe angereichert. Unter Stickstoffbegasung ist die CP-Akkumulation deutlich kleiner als 1, wobei eine Parallelität der gemessenen Q_{S/M}-Werte unter O₂- und N₂-Begasung augenfällig ist. Anders als bei der Ratte wurden in menschlichem Nierengewebe (**Abb. 6**) erwartungsgemäß die höchsten Akkumulationsraten bei einer niedrigen initialen Cisplatinkonzentration (3µg/ml) erreicht, wobei einschränkend gesagt werden muß, daß auch unter optimalen Inkubationsbedingungen die CP-Akkumulation Q_{S/M}-Werte von 1,2 nicht überstieg. Die Untersuchung von höheren CP-Konzentrationen (>30µg/ml) war aus Kostengründen nicht möglich. Das Nierenzellkarzinomgewebe reichert Cisplatin praktisch überhaupt nicht an. Um dennoch möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurde für die Inkubation nach Vorbehandlung mit T₃ bzw. Dexa beim Rattengewebe 30µg/ml und bei menschlichem Gewebe 3µg CP/ml gewählt. In Anlehnung an die Versuche mit NRS der Ratte wurde bei menschlichem Nierengewebe auf die Bestimmung der Akkumulation von CP unter anaeroben Bedingungen aus ökonomischen Gründen verzichtet.

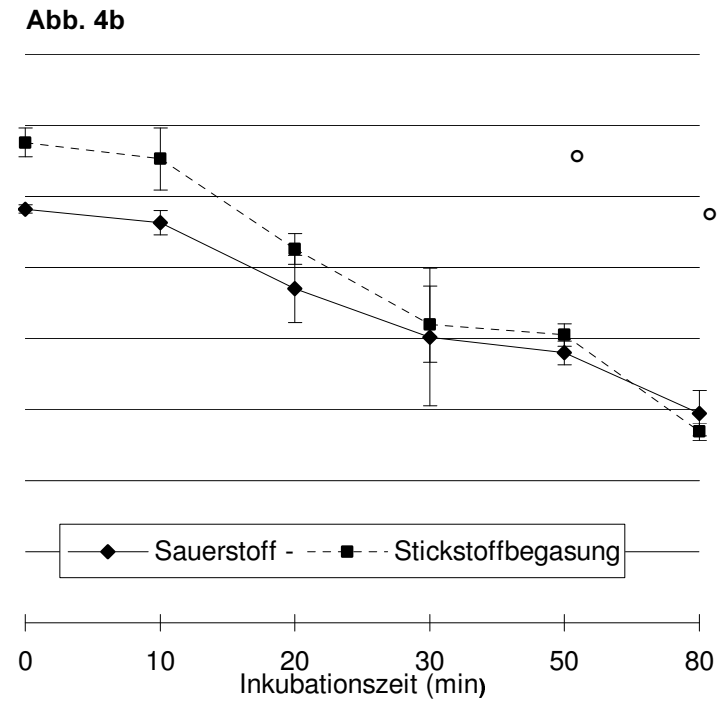
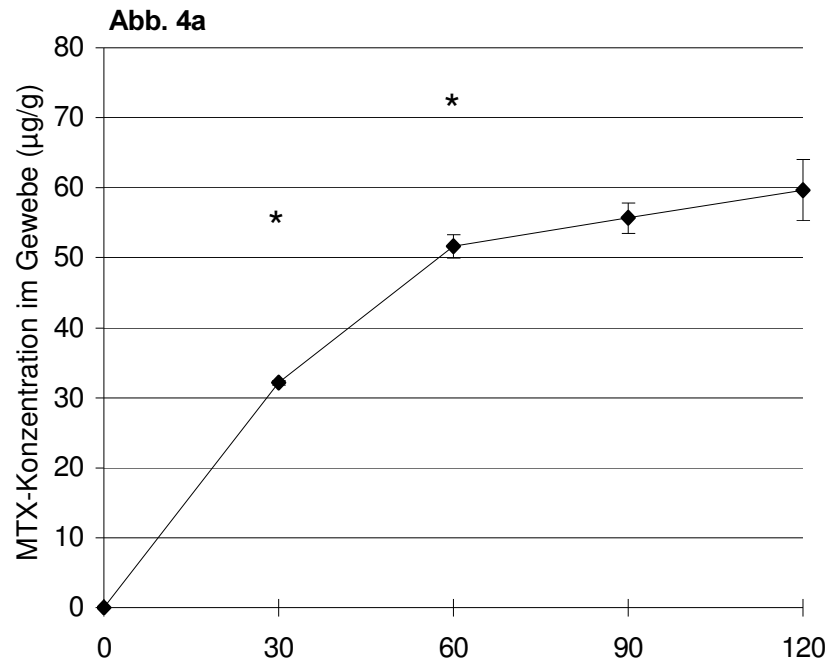


Abbildung 4

Abhängigkeit der Methotrexat (MTX)-Akkumulation in Nierenrindenschnitten der Ratte von der Inkubationsdauer (Abb. 4a, initiale MTX-Konzentration im Medium: 30µg/ml) und Verlauf der MTX-Konzentration im Nierengewebe nach zweistündiger MTX-Beladung und anschließender Inkubation in MTX-freiem Medium unter O₂- bzw. N₂-Begasung (Abb. 4b); arithmetische Mittelwerte ± S.E.M., n=4, * - signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Zeitpunkt; ° - signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt 0 unter O₂-Begasung in den Efflux-Versuchen (p ≤ 0,05).

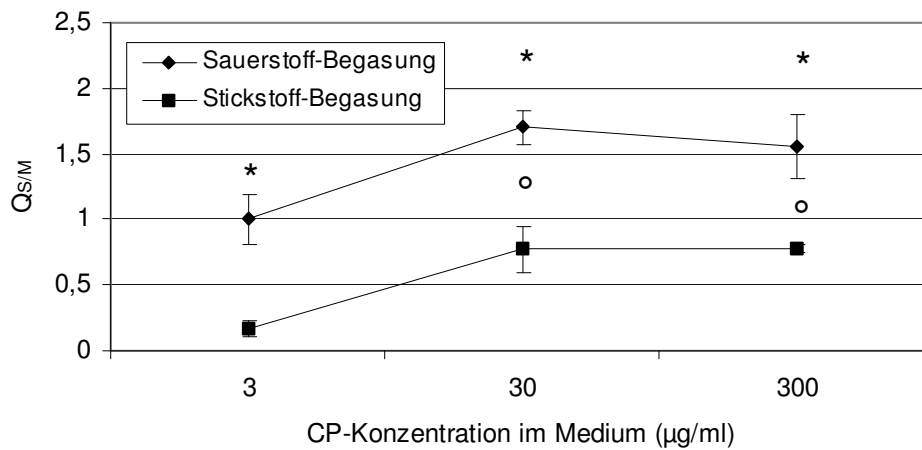


Abbildung 5

Abhängigkeit der Cisplatin (CP)-Akkumulation (2h-Inkubation) in Nierenrindenschnitten der Ratte von der initialen CP-Konzentration im Inkubationsmedium (Cross-Taggart-Puffer) und von der Energiebereitstellung (O₂- bzw. N₂-Begasung); arithmetische Mittelwerte ± S.E.M., n = 5
 * - signifikanter Unterschied zwischen aeroben und anaeroben Inkubationsbedingungen,
 ° - signifikanter Unterschied zur niedrigsten CP-Konzentration (3µg/ml) unter N₂-Begasung (p ≤ 0,05)

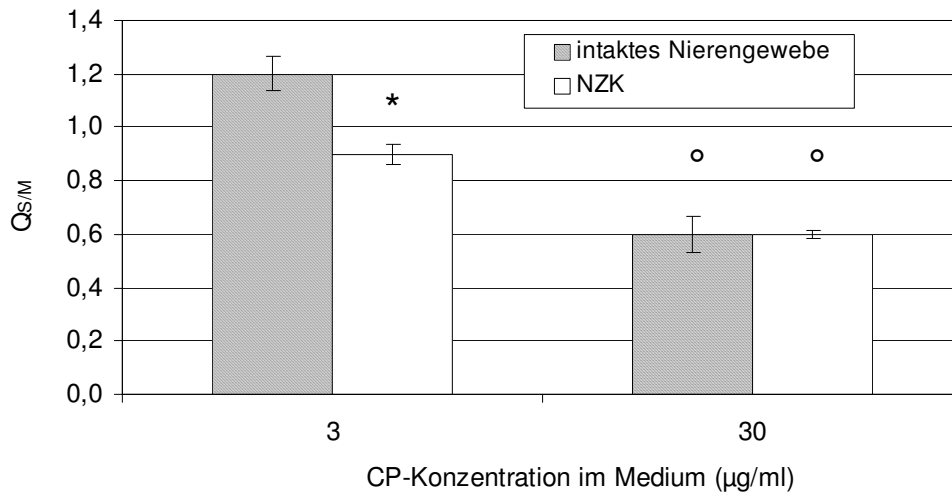


Abbildung 6

Abhängigkeit der Cisplatin (CP)-Akkumulation (2h-Inkubation) in intaktem menschlichen Nierengewebe und in Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) von der initialen CP-Konzentration im Inkubationsmedium (Cross-Taggart-Puffer, O₂-Begasung); arithmetische Mittelwerte ± S.E.M., n = 6
 * - signifikanter Unterschied zwischen intaktem Gewebe und NZK, ° - signifikanter Unterschied zwischen beiden CP-Konzentration im Medium (p ≤ 0,05)

3.1.4. Tomudex®

Beim Tomudex® wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation bei der Ratte über einen weiten Bereich von 10 bis 1000ng/ml untersucht. Überraschenderweise zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede der Akkumulationsraten. Der Schnitt-Medium-Quotient (**Abb. 7a**) liegt unabhängig von der initialen Tomudexkonzentration im Medium durchgehend um fünf und entspricht damit dem des PAH. Niedrigere TDX-Konzentrationen konnten nicht untersucht werden, da die Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode erreicht war, auf die Bestimmung der TDX-Akkumulation bei Mediumkonzentrationen $>1\mu\text{g/ml}$ mußte aus Kostengründen verzichtet werden. Allerdings ist beim Patienten nicht zu erwarten, daß im Tumorgewebe TDX-Konzentrationen $>1\mu\text{g/ml}$ erreicht werden. Gleichbleibende $Q_{S/M}$ -Werte bei unterschiedlichen initialen Mediumkonzentrationen haben zwangsläufig einen Anstieg der aufgenommenen Menge von Tomudex® im Gewebe zur Folge (**Abb. 7b**). Damit unterscheidet sich die Kinetik der Tomudex®-Aufnahme in Nierengewebe der Ratte deutlich von der der bisher genannten Testsubstanzen.

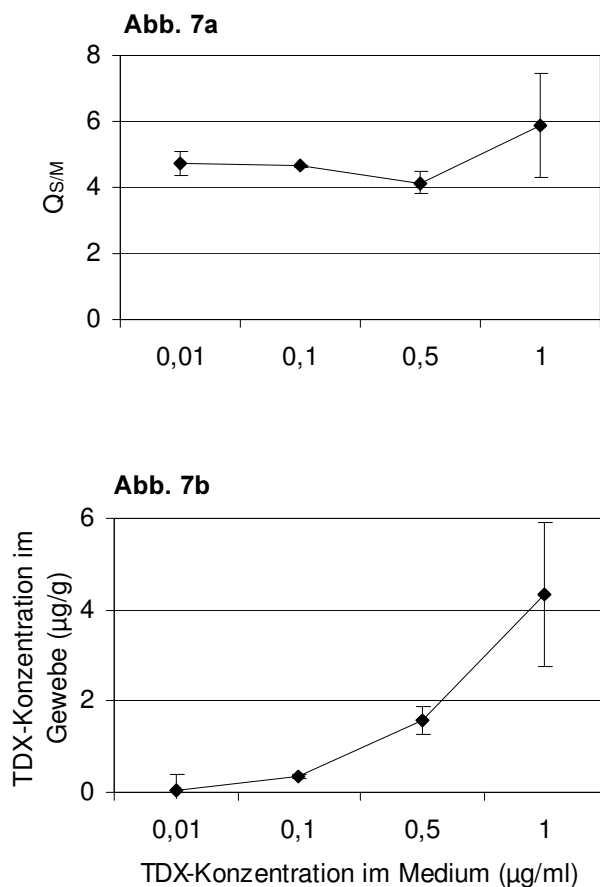


Abbildung 7

Abhängigkeit der Tomudex® (TDX)-Akkumulationrate ($Q_{S/M}$, **7a**) und der TDX-Konzentration im Nierengewebe (**7b**) nach 2h-Inkubation in Nierenrindenschnitten der Ratte von der initialen TDX-Konzentration im Inkubationsmedium (Cross-Taggart-Puffer, O_2 -Begasung), arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n=3$

3.1.5. Topotecan

Da Topotecan bei den gewählten Inkubationsbedingungen nicht stabil ist, machte es sich erforderlich, die im Gleichgewicht stehenden Formen TPT-Lacton und TPT-Hydroxycarbonsäure einzeln zu erfassen. Es wurden die Schnitt-Medium-Quotienten der Hydroxycarbonsäure und der Lactonform getrennt ermittelt.

Die untersuchten Gewebetypen von Ratte und Mensch reagierten weitgehend gleichartig. Es ließen sich im untersuchten Konzentrationsbereich nur geringe Abweichungen von einer mittleren Akkumulationsrate bestimmen (**Abb. 8**), wobei das TPT-Lacton generell besser in der Zelle angereichert wird. Die TPT-Konzentrationen im Gewebe (**Abb. 9**) sind proportional zur eingesetzten TPT-Konzentration im Medium, was sich entsprechend im Schnitt-Medium-Quotienten niederschlägt. Dieses Verhalten entspricht den beim Tomudex® erhobenen Befunden. Im Nachhinein muß kritisch angemerkt werden, daß der von uns gewählte Konzentrationsbereich offensichtlich nicht optimal war. Da die TPT-Bestimmungen nicht im eigenen Labor erfolgten, wären weiterführende Versuche nur mit einem unverhältnismäßig hohen personellen und finanziellen Aufwand möglich gewesen, so daß wir darauf verzichten mußten.

Auffällig ist, ähnlich wie beim MTX, eine stärkere Anreicherung im intakten menschlichen Nierengewebe ($Q_{S/M} = 6,0$) als im Rattengewebe ($Q_{S/M} = 5,0$). Außerdem ist TPT die einzige der untersuchten Substanzen, bei der eine nennenswerte Akkumulation im Tumorgewebe stattfindet ($Q_{S/M} = 2,9$). Trotzdem wird auch für TPT deutlich, daß analog zu PAH, MTX, CP und Tomudex das Akkumulationsvermögen des Tumorgewebes deutlich geringer ist, als es für intaktes Gewebe gefunden wurde.

3.1.6. Vergleich Akutversuche

Wegen einer höheren Probenzahl und damit höheren statistischen Sicherheit wurden für den Vergleich der Testsubstanzen im Folgenden die Ergebnisse der Akutversuche dargestellt, welche im Anschluß an eine 24-stündige Vorinkubation (siehe 3.2.) in Williams-E-Medium ohne Zusätze durchgeführt wurden. Dies ist insofern legitim, als die Vorinkubation zwar eine Verringerung der Akkumulationsrate bewirkt (FLECK et al. 1998, 2000), die Relation zwischen den Substanzen jedoch erhalten bleibt.

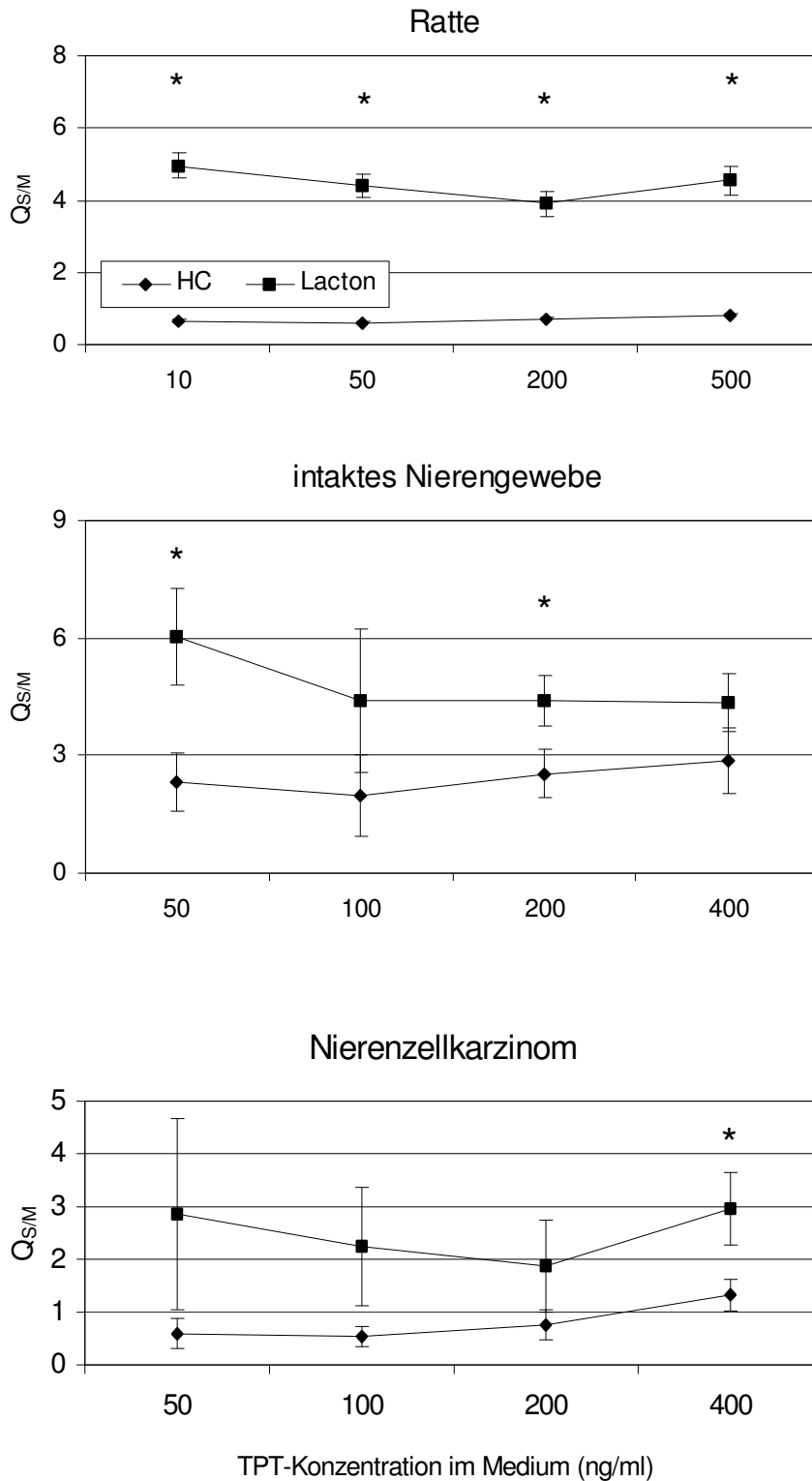


Abbildung 8

Abhängigkeit der Topotecan (TPT)-Akkumulation ($Q_{S/M}$) in Nierenrindenschnitten der Ratte, in intaktem menschlichen Nierengewebe und in Nierenzellkarzinomgewebe von der initialen TPT-Konzentration im Inkubationsmedium (Cross-Taggart-Puffer, O_2 -Begasung) nach zweistündiger Inkubation; Darstellung der Werte von TPT-Lacton und TPT-Hydroxycarbonsäure (HC); arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M.; $n = 4$ (Ratte), $n = 3$ (menschliches Gewebe), * - signifikanter Unterschied zwischen Lacton und Hydroxycarbonsäure ($p \leq 0,05$)

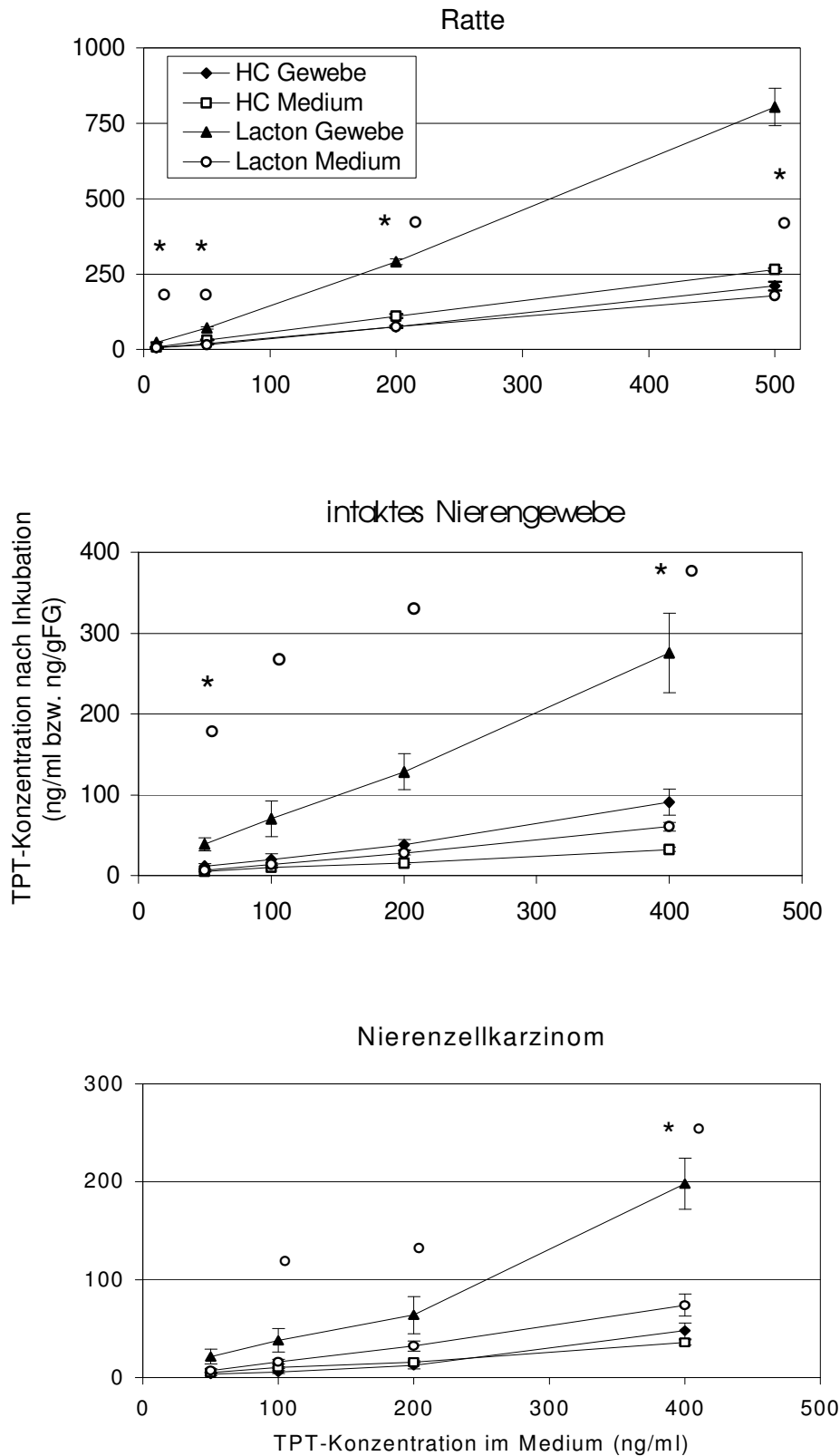


Abbildung 9

Abhängigkeit der Topotecan (TPT)-Konzentration in Nierenrindenschnitten der Ratte, in intaktem menschlichen Nierengewebe und in Nierenzellkarzinomgewebe von der initialen TPT-Konzentration im Inkubationsmedium (Cross-Taggart-Puffer, O₂-Begasung) nach zweistündiger Inkubation; Vergleich der Konzentrationen von TPT-Lacton und TPT-Hydroxycarbonsäure (HC) jeweils im Gewebe und im Medium; arithmetische Mittelwerte ± S.E.M.; n = 4 (Ratte), n = 3 (menschliches Gewebe), FG = Feuchtgewicht; * - signifikanter Unterschied zwischen Lacton im Gewebe und Lacton im Medium, ° - signifikanter Unterschied zwischen Lacton im Gewebe und Hydroxycarbonsäure im Gewebe (p ≤ 0,05)

Der Vergleich der maximalen Akkumulationsraten für die untersuchten Modellsubstanzen nach zweistündiger Inkubation ergab für die Ratte, daß PAH mit Abstand am besten akkumuliert wird (**Abb. 10**). Lediglich die Tomudex®-Aufnahme kommt der des PAH nahe. Allerdings muß beim Vergleichen der Transporte der verschiedenen Substanzen berücksichtigt werden, daß die verwendeten Konzentrationen im Medium um den Faktor 1:600 differierten.

Intaktes menschliches Nierengewebe akkumuliert die Testsubstanzen ähnlich wie das Nierengewebe der Ratte (**Abb. 11**). Die maximal erzielbaren Schnitt-Medium-Quotienten sind jedoch bei PAH und TDX niedriger. Methotrexat und Topotecan werden überraschenderweise stärker als bei der Ratte akkumuliert. Die Anreicherung von Tomudex® und Topotecan liegt beim intakten menschlichen Nierengewebe geringfügig über der der Referenzsubstanz PAH.

Bei Versuchen an NZK-Gewebe (**Abb. 12**) ist die Akkumulationsrate bei allen verwendeten Substanzen im Vergleich zum intakten Nierengewebe reduziert, Schnitt-Medium-Quotienten um eins belegen, daß im Tumorgewebe praktisch keine Anreicherung erfolgt. Dies ist insofern erstaunlich, als die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften der untersuchten Substanzen Unterschiede bezüglich der passiven Diffusion in die Zelle erwarten ließen.

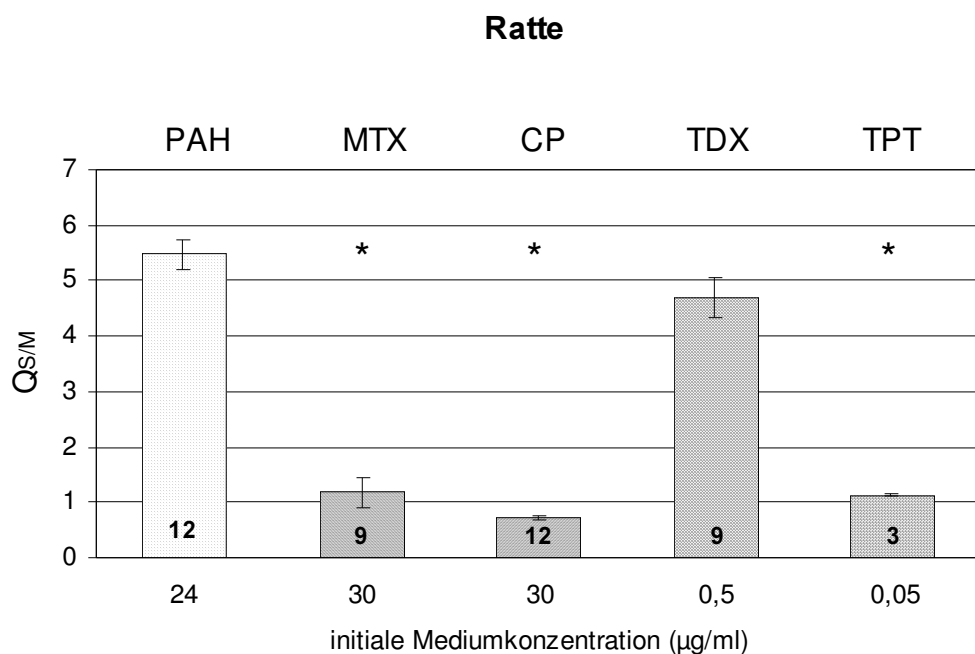


Abbildung 10

Maximale Anreicherung ($Q_{S/M}$) von p-Aminohippurat (PAH), Methotrexat (MTX), Cisplatin (CP), Tomudex (TDX) und Topotecan (TPT-Lacton + TPT-Hydroxycarbonsäure) in Nierenrindenschnitten der Ratte während zweistündiger Inkubation unter aeroben Bedingungen nach 24-stündiger Vorinkubation in Williams-E-Medium ohne Zusätze; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., n = Zahlen in den Säulen; * -signifikanter Unterschied zur Referenzsubstanz PAH ($p \leq 0,05$).

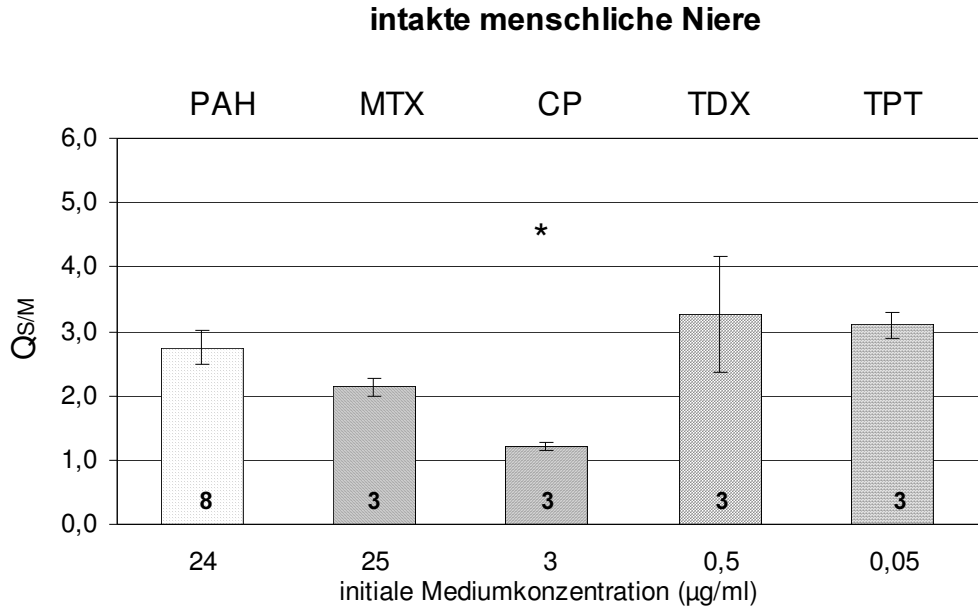


Abbildung 11

maximale Anreicherung ($Q_{S/M}$) von *p*-Aminohippurat (PAH), Methotrexat (MTX), Cisplatin (CP), Tomudex® (TDX) und Topotecan (TPT-Lacton + TPT-Hydroxycarbonsäure) in menschlichen Nierenrindenschnitten während zweistündiger Inkubation in Cross-Taggart-Puffer unter aeroben Bedingungen nach 24-stündiger Vorinkubation in Williams-E-Medium ohne Zusätze; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., n = Zahlen in den Säulen; * -signifikanter Unterschied zur Referenzsubstanz PAH ($p \leq 0,05$).

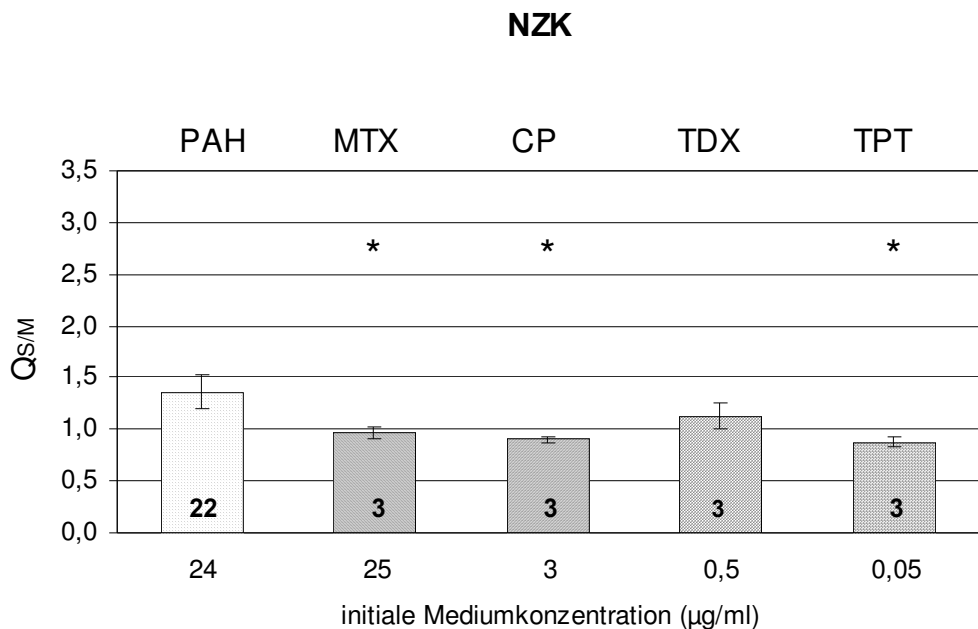


Abbildung 12

maximale Anreicherung ($Q_{S/M}$) von *p*-Aminohippurat (PAH), Methotrexat (MTX), Cisplatin (CP), Tomudex® (TDX) und Topotecan (TPT-Lacton + TPT-Hydroxycarbonsäure) in Nierenzellkarzinomgewebe während zweistündiger Inkubation in Cross-Taggart-Puffer unter aeroben Bedingungen, nach 24-stündiger Vorinkubation in Williams-E-Medium ohne Zusätze; arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., n = Zahlen in den Säulen; * -signifikanter Unterschied zur Referenzsubstanz PAH ($p \leq 0,05$).

3.2. Versuche zur Stimulierbarkeit der Fremdstoffaufnahme in Nierengewebe von Ratte und Mensch

Aufbauend auf vorangegangenen Versuchen, die im selben Labor an intaktem Nierengewebe von Mensch und Ratte und an Nierenzellkarzinomgewebe mit der Modellsubstanz PAH durchgeführt wurden (siehe auch eigene Vorversuche, **Abb. 1**) sollte geklärt werden, ob durch eine *ex vivo*-Stimulation mit T₃, Dexamethason bzw. EGF auch die Anreicherung von Zytostatika in Nierengewebe, speziell im Nierenzellkarzinom, gesteigert werden kann. Zur Stimulation der PAH-Akkumulation hatte sich Dexamethason als besonders geeignet erwiesen, dagegen rief eine 24-stündige Vorinkubation mit T₃ eine Abnahme der PAH-Akkumulationsfähigkeit hervor (FLECK et al. 2000, **Abb. 13**)

Die Auswirkungen von T₃ und Dexamethason auf die PAH-Akkumulation waren bei gesundem Nierengewebe von Mensch und Ratte sowie im Nierenzellkarzinomgewebe prinzipiell gleichartig ausgeprägt, wobei die signifikanten Unterschiede der Ausgangswerte zu berücksichtigen sind.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, daß bei den Stimulationsversuchen unterschiedliche Dexa- bzw. T₃-Konzentrationen (Dexa: 0,1-1,0-10µM, T₃: 0,1-0,5-1,0µM) untersucht wurden, für die folgenden Darstellungen jedoch nur die jeweils stärksten Effekte herangezogen wurden. Auf eine Darstellung der übrigen Ergebnisse wurde verzichtet, da sie keine weiterführenden Informationen ergaben.

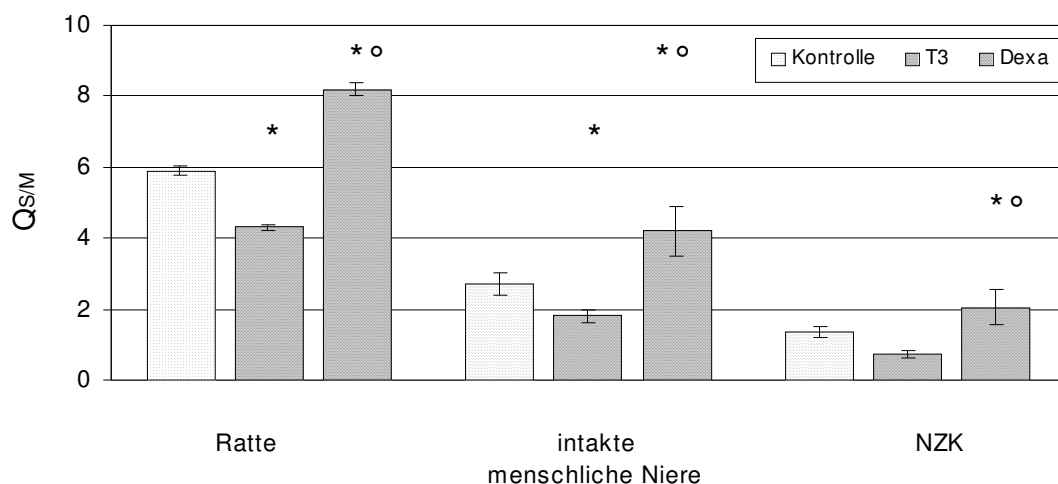


Abbildung 13

Akkumulation ($Q_{S/M}$) von *p*-Aminohippurat (PAH) während zweistündiger Inkubation in PAH-haltigem Cross-Taggart-Puffer in Nierenrindenschnitten der Ratte, in menschlichem intaktem Nierengewebe und im Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) nach 24h-Vorinkubation in T₃- bzw. dexamethasonhaltigem (Dexa) Williams-E-Medium, im Vergleich zur Dexa- bzw. T₃-freien Kontrolle; initiale PAH-Konzentration 24µg/ml; arithmetische Mittelwerte ± S.E.M., n=3-6; * - signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ohne Hormonvorinkubation, ° - signifikanter Unterschied zwischen T₃- und Dexamethasonvorinkubation ($p \leq 0,05$). (nach FLECK et al. 2000)

3.2.1. Methotrexat

In der **Abbildung 14** sind die maximal erreichten Akkumulationsraten für MTX unter Stimulationsbedingungen aufgetragen. Dabei wird auf eine Kontrollgruppe bezogen, die 24 Stunden ohne Hormonzusätze inkubiert worden ist. Als Kontrolle dienten jeweils Gewebeproben desselben Tieres bzw. desselben Patienten. In der Relativdarstellung (**Abb. 14-17**) wurden die Kontrollwerte für alle Gewebe aus Gründen der Übersichtlichkeit in einer Säule zusammengefaßt (= 100%), die Angabe eines Standardfehlers ist damit nicht möglich.

Die T₃-Vorbehandlung führt, im Gegensatz zu PAH beim intakten Nierengewebe von Ratte und Mensch zu einer geringen Steigerung der MTX-Akkumulation, die allerdings nicht signifikant ist. Das Nierenzellkarzinom reagiert dagegen mit einer verringerten MTX-Anreicherung nach T₃-Behandlung, was dem Verhalten der PAH-Akkumulation entspricht. Unter Dexamethason-Vorbehandlung kehren sich die Verhältnisse um: der vom PAH bekannte Effekt der Steigerung der Akkumulationsrate bleibt aus, intaktes Nierengewebe von Ratte und Mensch nimmt sogar signifikant weniger MTX auf. Beim Tumor dagegen ist die Akkumulation von MTX nicht vermindert sondern sogar geringfügig, wenn auch nicht signifikant erhöht.

3.2.2. Cisplatin

Die Cisplatinakkumulation läßt sich durch T₃-Vorbehandlung geringfügig steigern. (**Abb. 15**). Der Effekt ist lediglich bei der Ratte signifikant. Für menschliches intaktes Nierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe sind 1/10 der für die Ratte optimalen T₃-Dosis in der Lage, die CP-Akkumulation zu verbessern. Das Ausmaß liegt im gleichen Bereich wie bei der Ratte, der Unterschied läßt sich aber aufgrund der geringen Patientenzahl nicht statistisch sichern. Diese Befunde sind denen der Versuche mit PAH entgegengesetzt, da PAH von den untersuchten Geweben nach T₃-Vorbehandlung signifikant geringer akkumuliert wird.

Durch Dexamethasonvorinkubation kommt es, anders als beim PAH, nur im Tumorgewebe zu einer Steigerung der Akkumulationsrate um etwa 25%. Auch dieser Effekt ist infolge der geringen Patientenzahl nicht statistisch signifikant. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von menschlichem Gewebe war die Untersuchung eines größeren Stichprobenumfangs nicht möglich. Intaktes Nierengewebe von Ratte und Mensch zeigt bei keiner der eingesetzten

Konzentrationen (0,1-1,0-10 μ M) eine Veränderung der CP-Akkumulation nach Dexamethasonvorbehandlung.

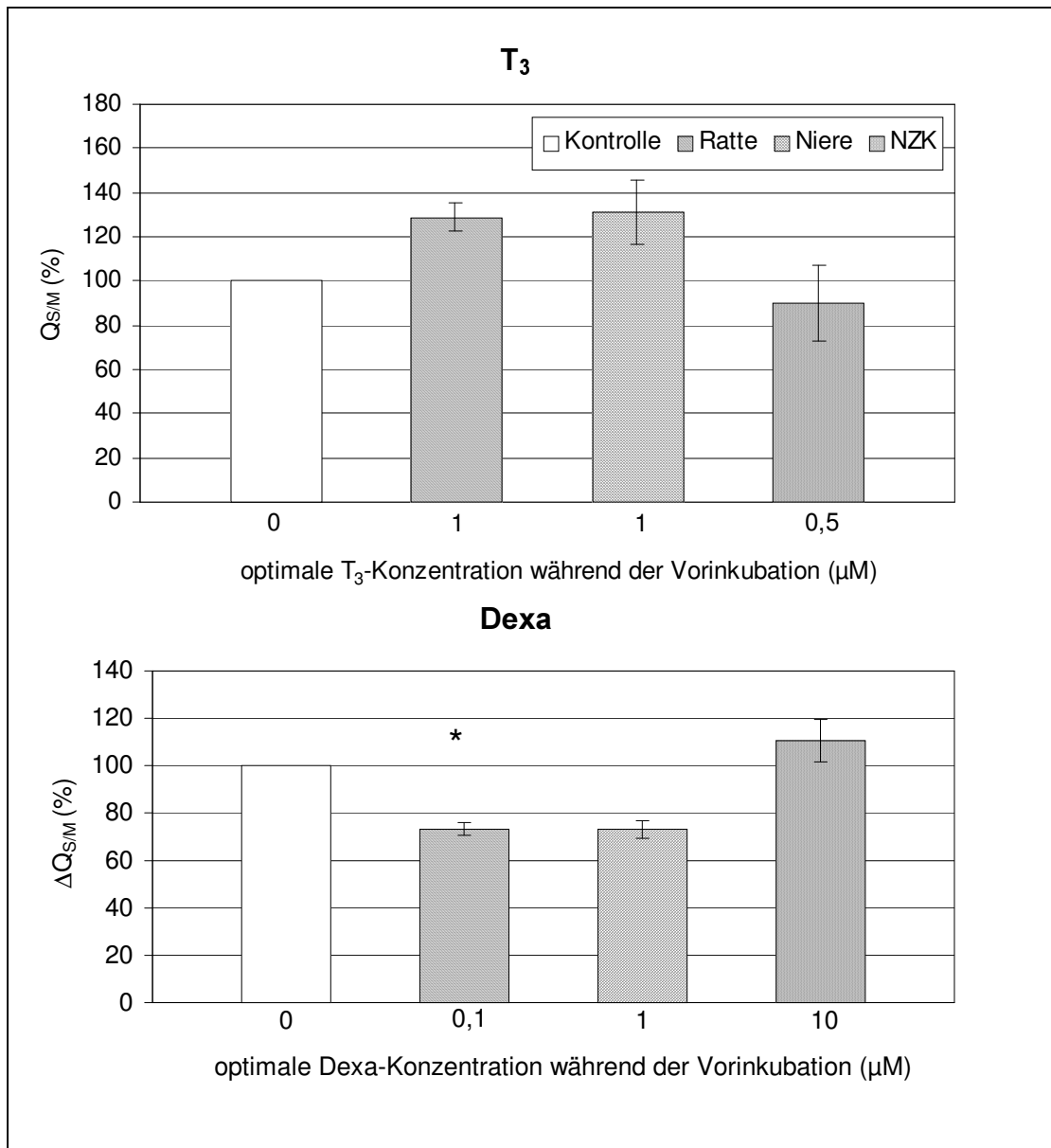


Abbildung 14

Veränderung der maximalen Akkumulation (ΔQ_{SM}) von Methotrexat (MTX) während zweistündiger Inkubation in MTX-haltigem Cross-Taggart-Puffer in Nierenrindenschnitten der Ratte, in intaktem menschlichen Nierengewebe (Niere) und Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) nach 24h-Vorinkubation in T₃- bzw. dexamethasonhaltigem (Dexa) Williams-E-Medium, im Vergleich zur Dexa- bzw. T₃-freien Kontrolle (= 100%); initiale MTX-Konzentrationen: Ratte – 30 μ g/ml, intaktes Nierengewebe und NZK – 25 μ g/ml, arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., n = 3-4; * - signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ohne Hormonvorinkubation ($p \leq 0,05$).

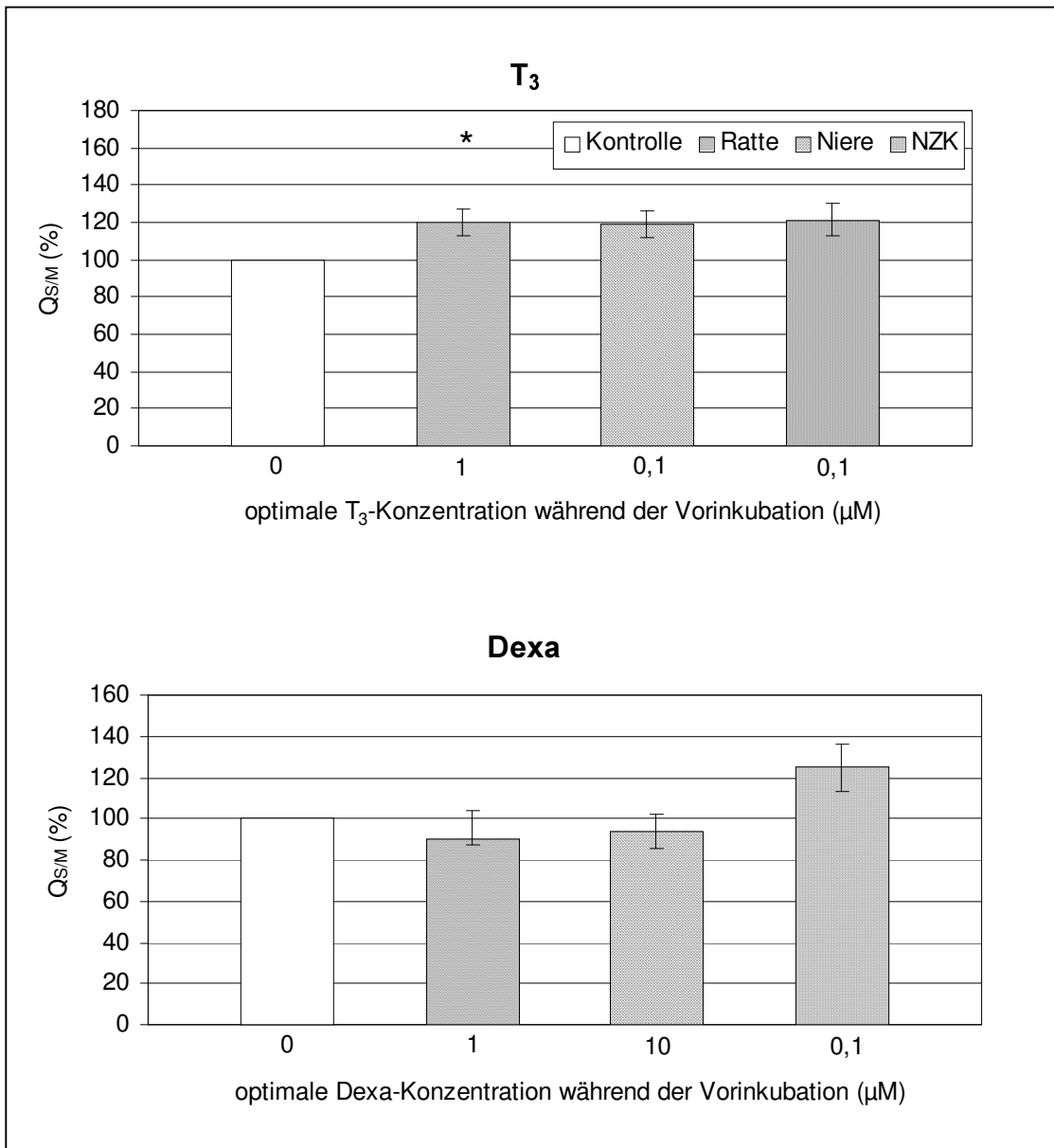


Abbildung 15

Veränderung der maximalen Akkumulation (ΔQ_{SM}) von Cisplatin (CP) während zweistündiger Inkubation in CP-haltigem Cross-Taggart-Puffer in Nierenrindenschnitten der Ratte, in intaktem menschlichen Nierengewebe (Niere) und Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) nach 24h-Vorinkubation in T₃- bzw. dexamethasonhaltigem (Dexa) Williams-E-Medium, im Vergleich zur Dexa- bzw. T₃-freien Kontrolle (= 100%); initiale CP-Konzentrationen: Ratte – 30 μg/ml, intaktes Nierengewebe und NZK – 3 μg/ml, arithmetische Mittelwerte ± S.E.M., n = 3-4; * - signifikanter Unterschied zur jeweiligen Kontrolle ohne Hormonvorinkubation ($p \leq 0,05$).

3.2.3. Tomudex®

Die Vorbehandlung von Rattengewebe mit T₃ oder Dexa (**Abb. 16**) bewirkt praktisch keine Änderung der maximalen Akkumulationsrate von Tomudex®. Es ist allenfalls eine tendenzielle Abnahme der TDX-Akkumulation nach T₃-Vorbehandlung in intaktem menschlichen Nierengewebe und in Tumorgewebe erkennbar. Damit verhält sich die Aufnahme von TDX ähnlich wie die vom PAH. Möglicherweise werden hier Transportmechanismen erfaßt, welche sowohl TDX als auch PAH in die Zelle transportieren. Unter Dexa-Einfluß ist ebenfalls keine Änderung der Tomudex®-Akkumulationsleistung zu verzeichnen.

3.2.4. Topotecan

Weder durch T₃- noch durch Dexavorbehandlung läßt sich die Topotecanaufnahme in Nierengewebe von Ratte und Mensch stimulieren. Es kommt eher zu einer, wenn auch nicht signifikanten Abnahme des Schnitt-Medium-Quotienten (**Abb. 17**).

Damit weist die Topotecan-Akkumulation deutliche Unterschiede im Vergleich zum PAH auf. Sowohl der beschriebene Rückgang der PAH-Aufnahme unter T₃-Einfluß als auch die Dexa-Stimulationswirkung bleiben bei Topotecan in den untersuchten Geweben aus. Anders als beim Tomudex® sind für Topotecan andere Transportmechanismen als für PAH zu diskutieren.

3.3. Kombination von Dexamethason und EGF zur Beeinflussung der PAH-Akkumulation in Nierengewebe der Ratte

Aus der Literatur sind verschiedene Effekte von EGF auf die Nieren bekannt. Unter anderem konnte nachgewiesen werden, daß die renale Ausscheidung von PAH nach EGF-Vorbehandlung *in vivo* bei der Ratte ansteigt (FLECK u. PERTSCH 1999). Wie in der Einleitung erwähnt, wird diskutiert, daß dieser Effekt von EGF über eine Beeinflussung der Glukocortikoid-Wirkung vermittelt werden soll. Um dieser Frage nachzugehen, sollte in einem weiteren Versuchsansatz diese Hypothese, analog zu den Versuchen bei alleiniger Vorbehandlung mit T₃ und Dexa, am Nierengewebe der Ratte überprüft werden (**Abb. 18**).

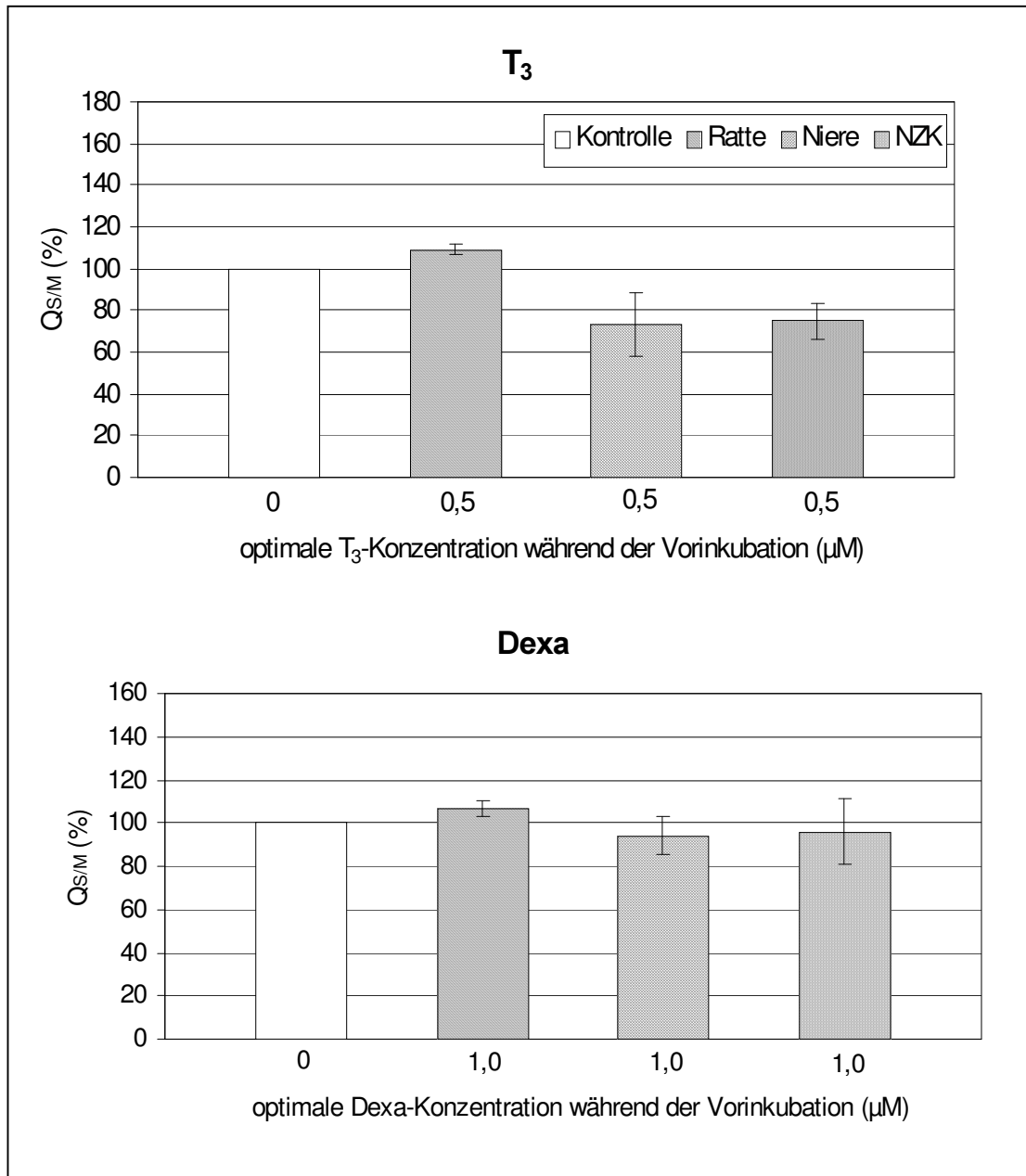


Abbildung 16

Veränderung der maximalen Akkumulation (ΔQ_{SM}) von Tomudex® (TDX) während zweistündiger Inkubation in TDX-haltigem Cross-Taggart-Puffer in Nierenrindenschnitten der Ratte, in intaktem menschlichen Nierengewebe (Niere) und Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) nach 24h-Vorinkubation in T₃- bzw. dexamethasonhaltigem (Dexa) Williams-E-Medium, im Vergleich zur Dexa- bzw. T₃-freien Kontrolle (= 100%); initiale TDX-Konzentration in allen Versuchsgruppen 0,5 μg/ml, arithmetische Mittelwerte ± S.E.M., n = 3-6;

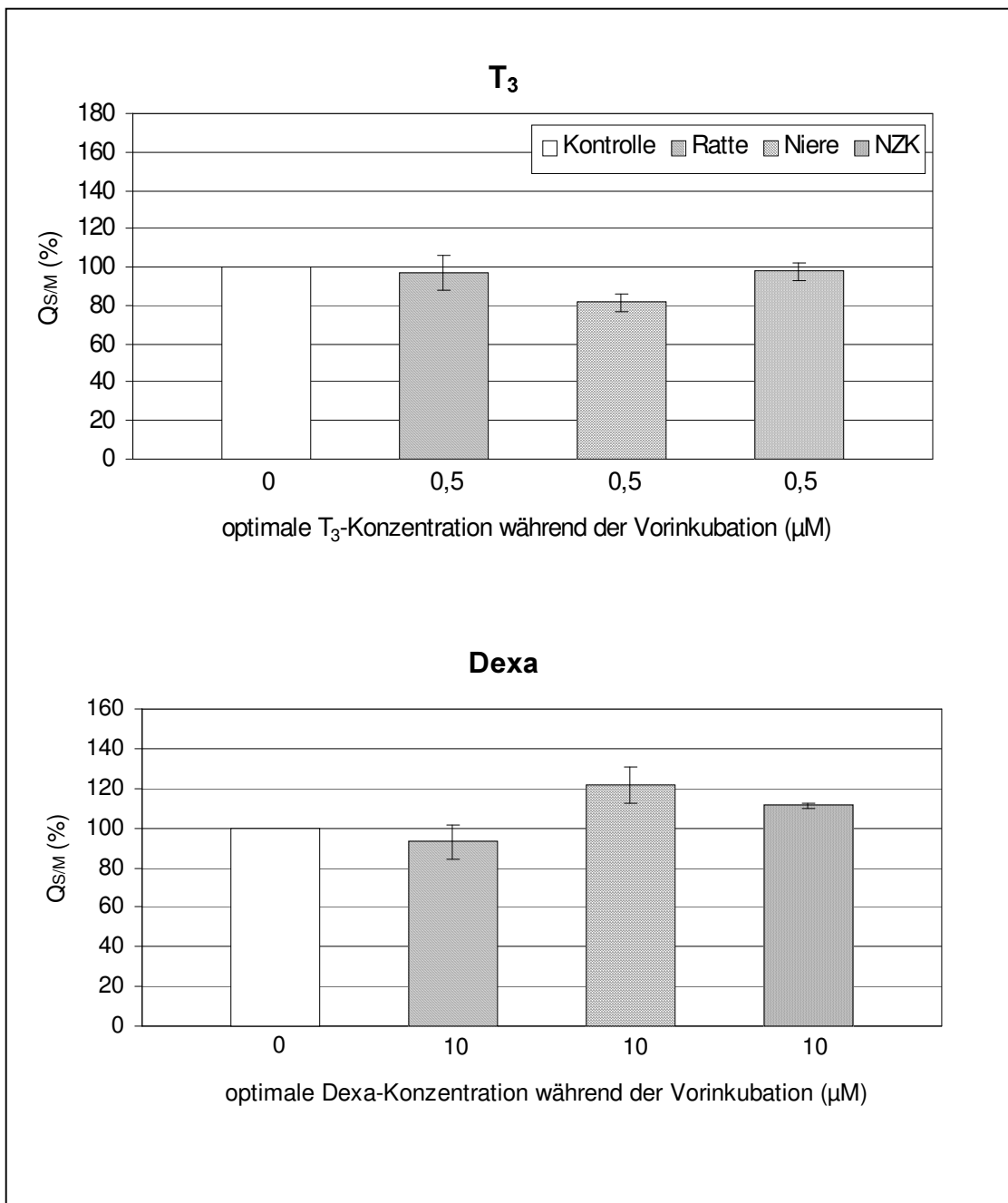


Abbildung 17

Veränderung der maximalen Akkumulation (ΔQ_{SM}) von Topotecan (TPT-Lacton + TPT-Hydroxycarbonsäure) während zweistündiger Inkubation in TPT-haltigem Cross-Taggart-Puffer in Nierenrindenschnitten der Ratte, in intaktem menschlichen Nierengewebe (Niere) und Nierenzellkarzinomgewebe (NZK) nach 24h-Vorinkubation in T₃- bzw. dexamethasonhaltigem (Dexa) Williams-E-Medium, im Vergleich zur Dexa- bzw. T₃-freien Kontrolle (= 100%); initiale TPT-Konzentration in allen Versuchsgruppen: 0,05 μg/ml, arithmetische Mittelwerte ± S.E.M., n = 3.

Die Zugabe von EGF allein während der 24-stündigen Vorinkubation erwies sich bei Verwendung unterschiedlicher praktisch relevanter Konzentrationen von 0,01 bis 10 µg/ml als ungeeignet, die Akkumulationsrate von PAH zu erhöhen. In Kombination mit Dexa kommt es sogar zum Ausbleiben des Stimulationseffektes, der durch alleinige Vorinkubation mit Dexa hervorgerufen wird. Aufgrund dieses negativen Resultates wurden weitere Kombinationsversuche mit menschlichem Nierengewebe und mit verschiedenen Zytostatika nicht in das Versuchsprogramm aufgenommen.

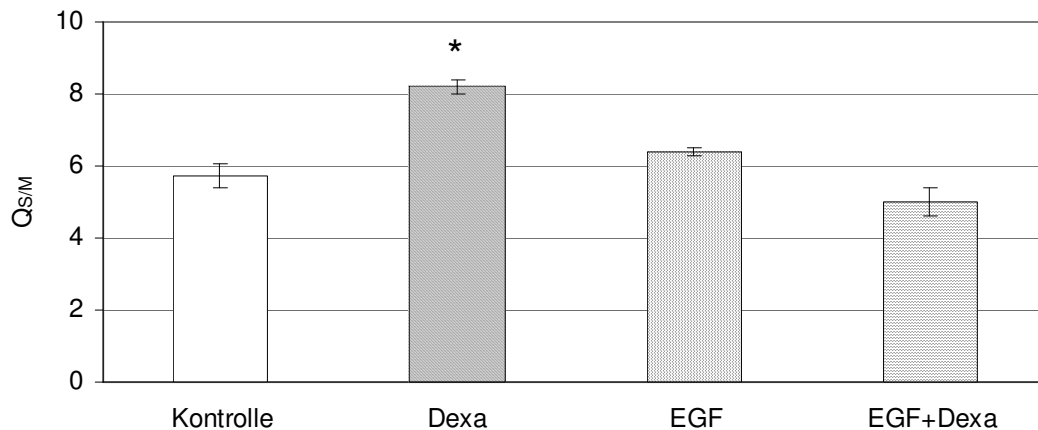


Abbildung 18

Anreicherung ($Q_{s/M}$) von *p*-Aminohippurat (PAH) in Nierenrindengewebe der Ratte während zweistündiger Inkubation in Cross-Taggart-Medium nach 24-stündiger Vorinkubation in Williams-E-Medium mit folgenden Zusätzen: Dexamethason (Dexa, 0,5 µmol/l), EGF (0,1 µg/ml) allein oder in Kombination mit Dexa (0,5 µmol/l), im Vergleich zur Kontrolle, die ohne Zusätze vorinkubiert wurde, arithmetische Mittelwerte \pm S.E.M., $n=4$; * - signifikanter Dexa-Effekt ($p \leq 0,05$).

3.4. Vergleich der Stimulierbarkeit der Fremdstoffaufnahme in intakte Nierengewebe von Ratte und Mensch und in Nierenzellkarzinomgewebe

Beim Vergleich der Auswirkungen einer Vorinkubation mit T₃ bzw. Dexa auf intaktes Nierengewebe von Ratte und Mensch sowie Nierenzellkarzinomgewebe seien nochmals folgende Besonderheiten bzw. Einschränkungen hervorgehoben, um die getroffenen Aussagen besser nachvollziehen zu können:

1. Als Referenzsubstanz diente in allen Versuchsansätzen PAH, von dem in vorangegangenen Versuchen bereits detaillierte Kenntnisse zur hormonellen Beeinflussbarkeit seines Transportes gewonnen werden konnten (FLECK 1997, FLECK et al. 1996, 1998, 1999, 2000; LU et al. 1999; LEIER et al. 2000).

2. Als Kontrolle (= 100%) dienten in allen Fällen Gewebeproben desselben Tieres bzw. desselben Patienten, die nicht hormonell vorinkubiert worden sind. Die Gewebeschnitte befanden sich lediglich 24 Stunden in Williams-E-Medium, da vorangegangene Untersuchungen gezeigt hatten, daß während einer eintägigen Inkubation die Akkumulationsfähigkeit des Nierengewebes abnimmt (FLECK et al. 1998).
3. Die Akkumulation aller Zytostatika und auch von PAH wurde nach Vorinkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dexamethason (Dexa) (0,1-1,0-10 μ M) und Triiodthyronin (T_3) (0,1-0,5-1,0 μ M) bestimmt. Zur Darstellung gelangten jeweils die Ergebnisse, bei denen die deutlichsten Effekte nachweisbar waren. Auf die Darstellung der weniger wirksamen Konzentrationen von T_3 bzw. Dexa wurde verzichtet.

3.4.1. Ratte

Die **Abbildung 19** zeigt für die Ratte die maximal erreichten Änderungen der Akkumulationsrate aller untersuchten Substanzen, bezogen auf die jeweils zugehörige unbehandelte Kontrolle. Berücksichtigt wurden die bei jeder Substanz am stärksten wirksamen Konzentrationen von T_3 bzw. Dexa sowie die optimale Mediumkonzentration der Substanzen. Als Referenzwert sind die Effekte auf den PAH-Transport vorangestellt. Im Gegensatz zum PAH kommt es außer beim Topotecan bei den übrigen Zytostatika nach T_3 -Vorinkubation zu einer, wenn auch nicht signifikanten (Ausnahme CP) Zunahme der Akkumulationsfähigkeit. Die MTX-Anreicherung nimmt fast um 1/3 zu. Die Aufnahme von TDX steigt dagegen nur geringfügig an (20%). T_3 hat keinen Einfluß auf den Transport von TPT. Im Gegensatz dazu bewirkt die Dexa-Vorinkubation beim PAH eine signifikante Steigerung der Q_{SM} -Werte um 1/3, die Akkumulation von MTX hingegen wird signifikant um 1/4 reduziert. Auf den Transport von CP, TDX und TPT hat eine Vorbehandlung mit Dexa keine praktisch relevanten Auswirkungen.

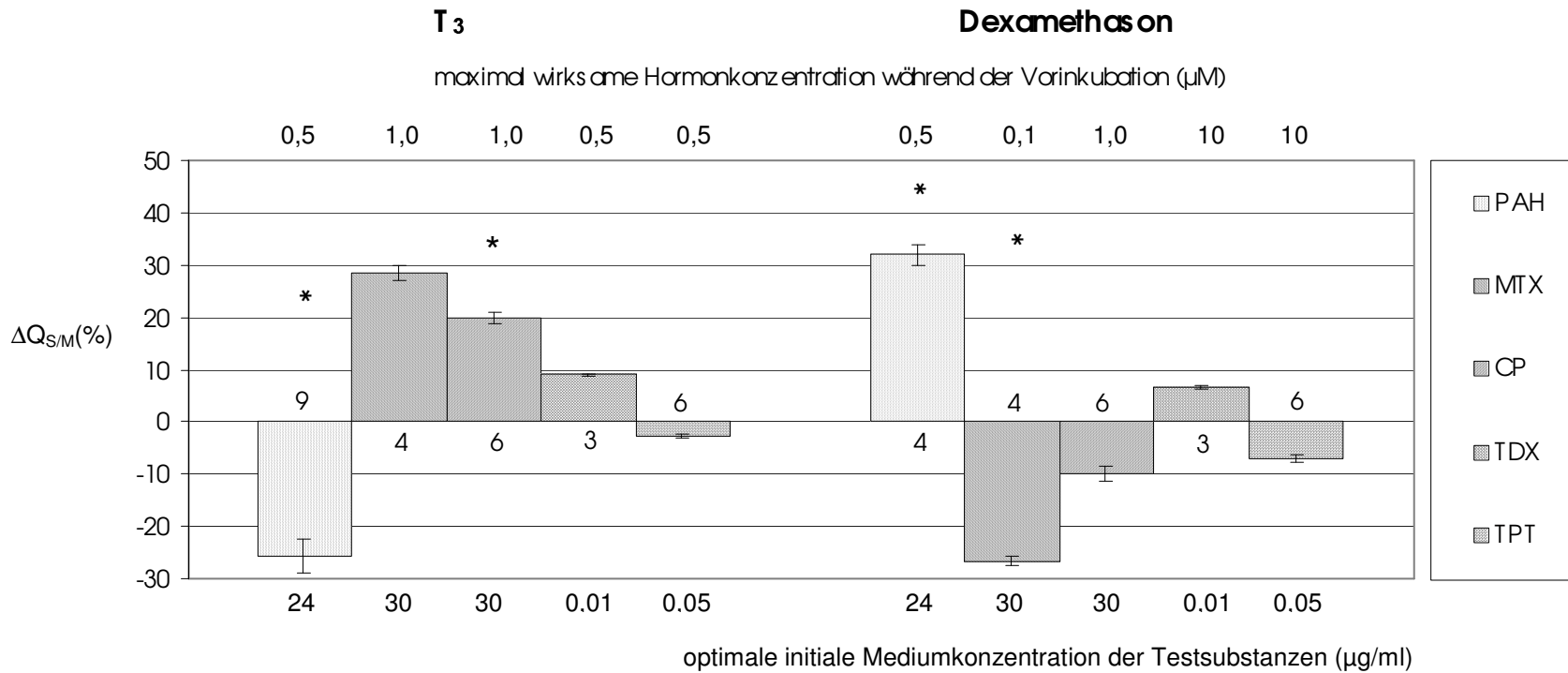


Abbildung 19

Relative Änderung der maximalen Akkumulationsfähigkeit (ΔQ_{SM}) während zweistündiger Inkubation von Nierenrindenschnitten der Ratte nach 24h-Vorinkubation in T₃ – bzw. dexamethasonhaltigem Williams-E-Medium; arithmetische Mittelwerte, n = Zahlen an den Säulen; * - signifikante Veränderung zur zugehörigen unbehandelten Kontrolle, die nicht mit Hormonen vorinkubiert wurde ($p \leq 0,05$).

3.4.2. Intakte menschliche Niere

Wie bei der Ratte läßt sich durch T_3 -Vorbehandlung von intaktem menschlichen Nierengewebe die PAH-Akkumulation nicht steigern (**Abb. 20**). Dexa bewirkt wie bei der Ratte ebenfalls eine signifikante Steigerung der PAH-Aufnahme. Die Akkumulation von MTX und CP verhält sich nach T_3 -Vorbehandlung im intakten menschlichen Nierengewebe analog zu den Versuchen an Nierengewebe der Ratte: Die Vorinkubation mit T_3 in vergleichbarer Konzentration wie bei den Versuchen an der Ratte führt zu einer Steigerung der Aufnahme von MTX bzw. CP um 1/3 bzw. 1/4. Auf die Akkumulation von TPT hat T_3 auch in intaktem menschlichen Nierengewebe keinen Einfluß. Die TDX-Akkumulation wird jedoch deutlich reduziert. Nach Dexa-Vorinkubation ergibt sich ein ähnliches Bild wie in den Versuchen an Nierengewebe der Ratte: die PAH Akkumulation läßt sich signifikant steigern, wogegen die Aufnahme von MTX um ca. 30% reduziert wird. Auf den Transport von CP und TDX hat eine Vorinkubation mit Dexa keine nennenswerten Auswirkungen. Lediglich die TPT-Aufnahme erhöht sich um 20%, wobei aufgrund der niedrigen Patientenzahlen dieser Effekt nicht statistisch zu sichern war.

3.4.3. Nierenzellkarzinom

Die relativen Änderungen der Akkumulationskapazität unterscheiden sich deutlich zwischen intaktem menschlichen Nierengewebe und Nierenzellkarzinomgewebe (**Abb. 21**). Durch T_3 -Vorbehandlung geht der Schnitt-Medium-Quotient für PAH nur um 10% zurück. Somit reagiert Nierenzellkarzinomgewebe ähnlich, aber deutlich geringer als gesundes Nierengewebe von Ratte und Mensch auf T_3 . Dexa hingegen bewirkt eine durchschnittliche Steigerung der PAH-Aufnahme um 50%. Es ist allerdings bekannt, daß es eine große interindividuelle Variabilität hinsichtlich des Dexa-Effektes gibt (FLECK et al. 2000). Prinzipiell reagiert NZK-Gewebe aber analog wie intaktes Gewebe von Mensch und Ratte auf eine Vorinkubation mit Dexa. Auffällig ist, daß in NZK-Gewebe lediglich die Akkumulation von CP sowohl durch T_3 als auch Dexa um ca. 25% gesteigert werden kann. Damit unterscheidet sich die Ansprechbarkeit des Tumorgewebes auf Dexamethason deutlich von intaktem Nierengewebe des Menschen und der Ratte. Zu einer signifikanten Steigerung der Anreicherung der übrigen Zytostatika (MTX, TPT, TDX) kommt es weder nach T_3 - noch nach Dexa-Inkubation. T_3 bewirkt lediglich eine geringfügig verringerte TDX-Aufnahme,

welche aber ohne klinische Relevanz ist. Aufgrund der vorliegenden Befunde kann allerdings nicht differenziert werden, inwieweit die annähernd unveränderten Q_{SM} -Werte Veränderungen der Aufnahme bzw. des Efflux widerspiegeln, da in jedem Fall von einer Überlagerung von aktiver Akkumulation und passiver Diffusion in die Zelle und aktivem Austransport ausgegangen werden muß. Um die Ursachen der genannten Effekte näher zu charakterisieren, wären umfangreiche weiterführende Versuche notwendig gewesen (Untersuchungen unter aeroben/anaeroben Bedingungen, Einsatz von Stoffwechselhemmern, Kombinationsversuche [T_3 + Dexa] etc.), deren Durchführung aufgrund der minimalen Veränderungen und des enormen logistischen Aufwandes (Beschaffung von menschlichem Nierengewebe) ökonomisch nicht vertretbar war.

4. Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchungen war die Beobachtung, daß das Nierenzellkarzinom (NZK) gegen eine Vielzahl von Chemotherapeutika, u. a. bedingt durch Veränderungen von Transportmechanismen im Rahmen der malignen Transformation unempfindlich ist. Wie einleitend beschrieben, sind dafür vor allem eine Vielzahl von Austransportsystemen verantwortlich, welche die intrazelluläre und damit therapeutisch bedeutsame Wirkstoffkonzentration effektiv senken. Im Gegensatz zu anderen Ansätzen, welche auf der Hemmung dieser Austransporte beruhen (MICKISCH et al. 1990c, VOLM et al. 1991, GENNE et al. 1995, PUNT et al. 1997), wurde hier versucht, die intrazelluläre Konzentration von Fremdstoffen im NZK durch eine Steigerung ihres Eintransportes zu erhöhen.

Die Möglichkeit, den renalen Transport körperfremder Substanzen zu stimulieren, ist seit langem bekannt. Hierzu existieren vielfältige Untersuchungen mit p-Aminohippurat (PAH), dem „Prototypen“ eines organischen Anions (WILLIAMS und HOTTENDORF 1985).

Bei den seit Jahren am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena mit PAH durchgeführten Untersuchungen zeigte sich, daß der renale PAH-Transport bei der Ratte durch Dexamethasongabe *in vivo* wie *in vitro* an Nierenrindenschnitten (NRS) zu steigern ist (FLECK 1997). Ferner liegen Ergebnisse über die Steigerung der PAH-Akkumulation bei intaktem menschlichen Nierengewebe und NZK-gewebe vor (FLECK et al. 1998, 2000). Vergleichbare Akkumulationskapazitäten konnten für Ratte und Mensch gefunden werden (FLECK et al. 1998), wobei auch Speziesunterschiede für den PAH-Transport beschrieben worden sind (BURCKHARDT et al. 2001).

Als nächster Schritt sollten mit der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse mit der Modellsubstanz PAH auf klinisch relevante Fremdstoffe (Zytostatika) übertragen werden, um erste Daten über die praktische Anwendbarkeit der Arbeitshypothese - die Steigerung der intrazellulären Zytostatikakonzentration durch vermehrte Expression von Eintransportsystemen - zu erhalten. Bei der Betrachtung der vorliegenden Arbeit als Bestandteil umfassender Untersuchungen zum NZK am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena spielt ebenfalls die Anwendbarkeit der Versuchsmethode für eine erweiterte Anzahl chemisch unterschiedlicher Substanzen eine bedeutende Rolle. Außerdem sollten geeignete Zytostatika und deren Akkumulationsverhalten als Grundlage für weiterführende Versuche ermittelt werden. Praktisch bedeutsam ist dies insbesondere im Rahmen der in letzter Zeit wieder zunehmenden Hinwendung zur Chemotherapie, da andere

Ansätze, wie die Immuntherapie, die hohen Erwartungen, die in sie gesetzt wurden, nicht erfüllt haben (RINI et al. 2000, SHAMASH et al. 2001).

Es zeigte sich, daß die für PAH vorliegenden Ergebnisse nicht ohne weiteres auf andere Substanzen übertragbar sind, obwohl z.B. beim Transport von PAH und MTX Parallelen vorliegen (LILLY und OMURA 1985). MILLER und PRITCHARD (1997) wiesen darauf hin, daß Unterschiede zwischen PAH und MTX bestehen, was durch die unterschiedliche chemische Struktur bzw. verschiedene Transportproteine, wie z.B. den selektiven MTX-Transportern RL-MTX1 und 2 (HONSCHA 2000) zu erwarten ist.

Die in dieser Arbeit am Nierenzellkarzinomgewebe des Menschen gewonnenen Erkenntnisse gelten in erster Linie für den Primärtumor. Es ist bekannt, daß Metastasen durch weitere Entdifferenzierung sowohl genetisch (JUNKER et al. 2000) als auch phänotypisch (GAMELIN et al. 1999) andere Eigenschaften als das Primum vorweisen können. Die Untersuchungen von Metastasen von Nierenzellkarzinomen war aus logistischen Gründen nicht möglich, so daß wir uns bei unseren Aussage ausschließlich auf das NZK selbst beziehen können.

4.1 Methode/Versuchsbedingungen

Die für PAH bereits seit langem an Nierenrindenschnitten der Ratte etablierte Methode der *in vitro*-Untersuchung der Akkumulation (STOPP und BRÄUNLICH 1974, FISCHER et al. 1994) ließ sich auch für die Untersuchung von verschiedenen Zytostatika anwenden. Es wurde die Transportleistung ermittelt, indem die Zytostatikakonzentrationen im Gewebe und im Medium nach Erreichen von steady-state Bedingungen bestimmt wurden. Dabei wurden Summationseffekte erfaßt, die weiter unten erörtert werden. Die zugrunde liegenden Transportmechanismen arbeiten z.T. bidirektional und werden von passiven Diffusionsvorgängen überlagert, die der Aufrechterhalten eines Konzentrationsgradienten entgegenwirken. Eine Differenzierung der verschiedenen Transportvorgänge ist mit der gewählten Methode nicht möglich, zur Klärung der hormonellen Beeinflussung des Substanztransportes jedoch auch nur von untergeordneter Bedeutung, da letztendlich der „Nettoeffekt“ von Interesse ist. Als Maß für die Transportleistung wurde die Substanzakkumulation herangezogen. Da die Tubuluslumina beim Anfertigen der Nierenrindenschnitte kollabiert sind, ist ein Austransport über die luminale Membran nicht zu erwarten (KINNE 1991). Deshalb kann die Messung der Akkumulation als Maß der

Substanzaufnahme über die basolaterale Membran betrachtet werden (BRÄUNLICH et al. 1986).

Bei der Bewertung der Ergebnisse sind die im folgenden genannten Einflußfaktoren zu berücksichtigen:

- Alter, Geschlecht

Bei der Versuchsdurchführung mit Rattengewebe ist die Standardisierung der Versuchsbedingungen weitestgehend gewährleistet. Faktoren wie Tierstamm und -alter, das Geschlecht oder die Ernährung, die die Ergebnisse stark beeinflussen können (DANTZLER und SILBERNAGL 1988), sind in den vorliegenden Versuchen standardisiert. Anders ist es bei Versuchen mit menschlichem Gewebe. Hier variierten das Patientenalter, das Geschlecht und das Tumorstadium stark. Allerdings konnte in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, daß das Alter bei humanem Gewebe ohne wesentlichen Einfluß auf den Stimulationseffekt ist, sofern es sich um ältere Patienten handelt, was bei den vorliegenden Untersuchungen der Fall war. Ebenso existieren keine geschlechtlichen Unterschiede bei älteren Erwachsenen (FLECK et al. 1998).

- Tumorart

Die Akkumulationsraten sind bei Verwendung zentraler bzw. peripherer Tumoranteile ebenfalls nicht signifikant verschieden (FLECK et al. 1996). Aus Untersuchungen des Institutes für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena geht hervor, daß es sich bei den Nierenzellkarzinomen vom Klarzelltyp um relativ homogene Tumoren handelt, deren Stroma-Anteil bei ca. 20% liegt (persönliche Information Prof. Dr. med. H. KOSMEHL). Eventuelle Abweichungen der Menge des bindegewebigen Anteils könnten Unterschiede im Akkumulationsverhalten erklären. Die Abhängigkeit des MDR-Verhaltens vom histologischen Subtyp ist bekannt (ROCHLITZ et al. 1992). Mit der Beschränkung ausschließlich auf klarzellige Nierenzellkarzinome konnte dieser Einfluß ausgeschlossen werden. Eine Aussage über die Korrelation zwischen Akkumulationsrate und Tumorgröße ist aufgrund der geringen Patientenzahlen nicht möglich.

- Gewebebereitstellung

Da menschliches Untersuchungsmaterial durch häufig nicht planbare Tumornephrektomien gewonnen wurde, ließen sich die Untersuchungen nicht im Voraus vorbereiten, so daß gelegentlich Verzögerungen im Versuchsablauf entstanden. Eine konstant kurze Ischämiezeit des Untersuchungsmaterials konnte auch aus

logistischen Gründen nicht immer eingehalten werden. Aufgeführt werden müssen in diesem Zusammenhang intraoperativ auftretende Probleme mit entsprechend verlängerter Operationsdauer oder aber auch Zeitverzug bei der Bereitstellung des entnommenen Nierengewebes zum Transport. Eine verlängerte Ischämiezeit kann zu einer verminderten Akkumulation führen und muß zur Erklärung etwaiger Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen mit herangezogen werden (FLECK et al. 1998). Des weiteren sind Streuungen der Werte innerhalb einer Versuchsgruppe durch individuelle Besonderheiten beim Versuchsablauf, wie Schwierigkeiten beim Schneiden des NZK-Gewebes, das häufig fibrotisch verändert war, zu erklären. Durch Unterstützung einer in dieser Technik erfahrenen MTA und sorgfältiges eigenständiges Arbeiten konnten Abweichungen jedoch weitestgehend minimiert werden.

- Bestimmungsmethode

Bei der quantitativen Bestimmung der Substanzkonzentrationen sollte aufgrund der Eiweißausfällung die Gesamtmenge der Substanzen erfaßt werden, da auch der proteingebundene Anteil freigesetzt wurde. Dies geschieht jedoch meist nicht vollständig, weshalb die Wiederfindungsraten teilweise unter 100% lagen. Nicht ohne Einfluß sind hinsichtlich der Wiederfindungsrate auch Verluste beim Homogenisieren des Nierengewebes, wobei trotz mehrfacher Spülvorgänge davon ausgegangen werden muß, daß eine gewisse Substanzmenge z.B. am Reagenzglas haften bleibt. Da die Versuchsdurchführung jedoch stark standardisiert ist, handelt es sich hierbei weitgehend um systematische Abweichungen, welche die Vergleichbarkeit der Meßwerte einer Substanz nicht beeinträchtigen. Lediglich beim Vergleich zwischen den Substanzen ist dieser Aspekt zu berücksichtigen.

- Eiweißbindung

Da sich die Wiederfindungsraten von Methotrexat, Cisplatin und Tomudex[®] nur geringfügig unterscheiden (~80%), ist hier eine gute Vergleichbarkeit gegeben. Im Vergleich zum PAH (Wiederfindungsrate ~100%) muß von einem generell zu niedrig bestimmtem Schnitt-Medium-Quotienten ausgegangen werden, da sich die Proteinbindung im NRS aufgrund der geringeren absoluten Substanzmenge im Gewebe dort relativ stärker auswirkt. Noch deutlicher ist der Unterschied zum Topotecan (Lacton + HC: Wiederfindungsrate ~ 50%). Auch die verschieden hohe intrazelluläre Proteinbindung – die proportional zur Plasmaproteinbindungsrate von 6,6% (TPT) bis 93% (TDX) sein dürfte – und die unterschiedlichen absoluten Mediumkonzentrationen,

die zur Erzielung optimaler $Q_{S/M}$ -Werte eingesetzt wurden, erklären Unterschiede im Akkumulationsverhalten zwischen den Testsubstanzen.

Unter der Voraussetzung, daß die Proteinbindungsrate in allen untersuchten Geweben in der gleichen Größenordnung liegt, spielt diese Einschränkung jedoch für den Vergleich der relativen Stimulationseffekte keine Rolle, da immer auf die zugehörige Kontrolle bezogen wurde.

- **Metabolismus**

Der Einfluß eines möglichen Metabolismus der Zytostatika auf die Gewebekonzentration blieb mit Ausnahme des TPT, wegen der kurzen Inkubationsdauer unberücksichtigt. Dabei wirft v.a. die Interpretation der Ergebnisse der Topotecan-Versuche Fragen auf. Wegen der Instabilität der Substanz unter Versuchsbedingungen lassen sich mit dem gewählten Versuchsansatz die Einflüsse des Metabolismus auf die Transportprozesse nicht klar trennen. Um dennoch ein Maß für die Nettotrantransportleistung zu erhalten, wurden die beiden Formen des TPT - Lacton und Hydroxycarbonsäure - zusammengefaßt. Die absoluten Akkumulationsraten sind aber möglicherweise nicht völlig mit denen der anderen Testsubstanzen vergleichbar, bei denen der Metabolismus vernachlässigt werden kann. Hinsichtlich des relativen Effektes von Dexamethason und T_3 auf die Anreicherung von TPT sind aufgrund der standardisierten Bedingungen jedoch durchaus vergleichende Aussagen möglich.

4.2. Transportkapazität der Gewebe für die untersuchten Zytostatika

4.2.1. Methotrexat

Der zelluläre MTX-Transport in der Niere ist bereits intensiv untersucht worden. Unter anderem konnte für die Ratte (KATE et al. 1976), beim Kaninchen (CHEN et al. 1983) und für die menschliche Niere (LILLY und OMURA 1985) die Hemmung des MTX-Transportes durch Probenecid nachgewiesen werden. Damit war die Methotrexat-Aufnahme über ein Transportsystem für organische Anionen nachgewiesen. 1999 wurde dies durch Entdeckung und Klonierung des organic-anion-transporter (OAT-K1) in der apikalen Membran der Tubuluszellen näher charakterisiert (Masuda et al. 1999b). Für die Rattenleber war mit oatp ein ähnlicher Carrier bereits bekannt. Beide sind jedoch nicht identisch (HONSCHA und PETZINGER 1999). Doch nicht nur die Aufnahme, sondern auch der Methotrexat-Efflux

über die apikale Membran wird über OAT-K1 vermittelt (MASUDA et al. 1999b). Für die Interpretation unserer Ergebnisse dürfte dies von untergeordneter Bedeutung sein, da die Lumina der Tubuli beim NRS kollabiert sind und somit ein Austransport von MTX über die apikale Membran wenig wahrscheinlich ist. Inzwischen konnte mit OAT-K2 ein weiterer Carrier isoliert werden. Er besitzt 91% Ähnlichkeit mit OAT-K1 und vermittelt den bidirektionalen Transport hydrophober organischer Anionen (Methotrexat, Folat) an der apikalen Membran der Tubuluszelle (MASUDA et al. 1999a, 2000).

Von HONSCHA (2000) wurden die Sequenzen zweier scheinbar selektiver Methotrexat-Transporter (RL-MTX1, RL-MTX2) veröffentlicht. Die entsprechende mRNA konnte sowohl in der Leber als auch in beträchtlichem Ausmaß in der Niere nachgewiesen werden. Die physiologische Bedeutung dieses Proteins ist bislang noch nicht geklärt. In der Leber scheinen Beziehungen zum Gallensäure-Transport zu bestehen. Keine Ähnlichkeit besteht zu Vertretern der oben beschriebenen OAT-Gruppe.

Des Weiteren erfolgt die intrazelluläre Aufnahme des MTX über den bekannten reduzierten Folat-Carrier (RFC). Dessen Expression ist vom Folatgehalt der Zelle abhängig (KAMEN et al. 1986). Neben RFC existiert ein membranassoziiertes Folat-bindendes Protein (mFBP). Dies spielt jedoch trotz teilweise starker Expression eine untergeordnete Rolle für den MTX-Transport in der Niere (WESTERHOF et al. 1995).

MRP3 ist ein Transporter aus der Gruppe der multidrug-resistance-related-proteins, dessen Substrate organische Anionen und damit eine Vielzahl von Medikamenten sind. Zellen mit hoher MRP3-Expression zeigen einen erhöhten Glutathion-Austransport bzw. niedrige intrazelluläre Glutathionspiegel. MRP3 ist für eine ausgeprägte Methotrexat-Resistenz verantwortlich, die durch einen vermehrten Austransport von GSH-gekoppeltem MTX verursacht sein könnte (KOOL et al. 1999). Auch der MTX-Transport über dieses System ist durch verschiedene organische Anionen wie Sulfobromphthalein oder Probenecid im Sinne eines kompetitiven Antagonismus hemmbar (MASUDA et al. 1999a, MASUDA 2000).

Neben der beschriebenen Effluxsteigerung durch die genannten Transportsysteme existieren weitere Resistenzmechanismen für MTX. Sowohl die verminderte zelluläre Aufnahme, als auch ein erhöhter Glutathion-Gehalt mit einer vermehrten Bildung wasserlöslicher Konjugate und dem damit verbundenen beschleunigten Austransport tragen dazu bei (MICKISCH 1991, BANNWARTH et al. 1997). Außerdem werden Veränderungen des Metabolismus im Sinne eines Affinitätsrückganges zu Folat-abhängigen Enzymen und eine gesteigerte Expression der Dihydrofolsäure-Reduktase diskutiert (TAKIMOTO und ALLEGRA 1995).

HONSCHA und PETZINGER (1999) charakterisierten bereits den Methotrexat-Transport der Hepatozyten als natrium- und energieabhängig. Wir konnten zeigen, daß Methotrexat unter aeroben Bedingungen in Nierengewebe von Ratte und Mensch effektiv angereichert wird. Die fehlende Akkumulation unter Stickstoffbegasung spricht für einen energieabhängigen Vorgang. Rattenniere und intaktes menschliches Nierengewebe besitzen vergleichbare Transportkapazitäten, die aber deutlich niedriger als für PAH sind. Dies bestätigt die Ergebnisse von BESSEGHIR et al. (1989), nach denen MTX von isolierten Kaninchen-Tubuli ebenfalls nur relativ gering akkumuliert wird. Menschliches Tumorgewebe hingegen weist keinerlei Akkumulation von MTX auf. Dieser Befund entspricht der klinisch gefundenen Methotrexatresistenz des NZK (TAKIMOTO und ALLEGRA 1995). Als Ursache kommt dabei einerseits eine verminderte Aufnahme aufgrund fehlender Transportmechanismen im Rahmen der Entdifferenzierung in Frage. Andererseits muß die Existenz von zusätzlichen Austransportmechanismen diskutiert werden, welche einen Aspekt der multidrug resistance darstellen (GOTTESMAN et al. 1995). Da die Schnitt-Medium-Quotienten des Tumorgewebes um eins liegen, ist entweder von einem Gleichgewicht der Aus- und Eintransporte auszugehen, oder es liegt ein weitgehend passiver Konzentrationsausgleich bei völlig fehlender Transportaktivität vor. Zur Klärung dieses Problems wären weiterführende Kompetitionsversuche sinnvoll, in denen Hemmstoffe des Austransportes (Verapamil) untersucht werden sollten.

Die Konzentrationsabhängigkeit der MTX-Akkumulation zeigt beim NZK einen untypischen Verlauf mit dem geringsten Wert bei der niedrigsten Mediumkonzentration. Als Gründe sind das Erreichen der Nachweisgrenze oder aber die Existenz eines tatsächlichen Transportoptimums bei höheren Konzentrationen zur Erklärung heranzuziehen. Da die Nachweisgrenze der Bestimmungsmethode bei 10^{-4} µg/ml liegt (ALBERTIONI et al. 1994), die niedrigste MTX-Konzentration bei den Versuchen jedoch 2 µg/ml betrug, scheidet die Limitation durch die Empfindlichkeit der Nachweismethode als Erklärung aus, so daß eine Konzentrationsabhängigkeit des MTX-Transportes mit einem Transportoptimum bei höheren Konzentrationen wahrscheinlich ist.

4.2.2. Cisplatin

Limitierend für die Anwendung von CP ist neben seinen typischen allgemeinen Nebenwirkungen oftmals die Nierenschädigung im Bereich des proximalen Tubulus

(APPENROTH et al. 1984, 1988, 1991), wo eine beträchtliche Anreicherung erfolgt (SUSUMU et al. 1999). Unter anderem vermindert sich die Aminosäure-Reabsorptionskapazität nach Cisplatineinwirkung. Dieser Effekt ist bei der Ratte vor allem bei älteren Tieren ausgeprägt (FLECK et al. 2001), da Nieren von Jungtieren Cisplatin wesentlich geringer akkumulieren (APPENROTH et al. 1988). AGGARWAL (1993) beschreibt die Cisplatin-Wirkungen an der Niere als Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit verminderter ATP-Synthese und mitochondrialem Calcium-Efflux, sowie Verringerung des membrangebundenen Calciums. Insgesamt resultiert daraus eine Hemmung der renalen Transportprozesse. Dabei reagieren die Zellen der verschiedenen Nephron-Abschnitte mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. Der proximale Tubulus wird viel stärker beeinflusst als das distale Konvolut (KRONING et al. 1999). WILLIAMS (1985) zeigte, daß Cisplatin den renalen Kationentransport der Bürstensaummembran inhibiert. Ebenso konnten SAFIRSTEIN et al. (1984) die Verminderung der CP-Akkumulation in Rattennierenschnitten durch eine Reihe von organischen Basen wie Tolazolin und Mepiperphenidol nachweisen. PAH hatte jedoch keinerlei Einfluß. Zusammen mit den vorliegenden Befunden, nach denen CP von allen Geweben erheblich weniger akkumuliert wird als PAH, ist von überwiegend verschiedenen Aufnahmemechanismen für CP und PAH auszugehen. Obwohl CP die Expression von Polyglykoprotein-170 induziert (DEMEULE et al. 1999), scheint es selbst nicht diesem Resistenzmechanismus zu unterliegen. Inzwischen ist mit cMOAT (canalicular multispecific organic anion transporter, MRP2) (BORST et al. 1997) ein Transporter aus der Gruppe der multidrug resistance related proteins (MRP) identifiziert worden, welcher u.a. CP transportiert. Das Vorkommen in der apikalen Membran polarisierter Zellen wurde von CUI et al. (1999) bestätigt. Außerhalb der Niere findet man MRP2 in der Leber oder dem Dünndarm. VAN AUBEL et al. (1998) wiesen den Transport konjugierter organischer Anionen durch MRP2 über die apikale Membran von Epithelzellen nach. Aber auch an der basolateralen Membran des proximalen Tubulus vermittelt cMOAT den Cisplatin-Transport. Dieser ist dort sogar effektiver als apikal (OKUDA et al. 1999). Letzteres würde unter unseren Versuchsbedingungen die CP-Aufnahme in den NRS eher begünstigen.

Es besteht keine Cisplatin-Spezifität. So ist beispielsweise auch PAH ein Substrat des MRP2, welches ATP-abhängig über die apikale Membran in das Tubuluslumen transportiert wird (LEIER et al. 2000). Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen, nach denen Cisplatin unter Stickstoffbegasung von keinem der untersuchten Gewebe angereichert wird.

Neben verstärkten DNA-Reparaturmechanismen unter CP-Therapie (MUSUDA et al. 1988) resultiert eine cMOAT-vermittelte Cisplatin-Resistenz. CUI et al. (1999) beziffern sie auf das 10fache im Vergleich zu Zellen ohne cMOAT-Expression. Dies stimmt im Umkehrschluß mit Untersuchungen von DEMEULE et al. (1999) überein, die nach Vorbehandlung von Ratten mit Cisplatin eine 10fache cMOAT-Expression fanden.

Anders als in Versuchen von SUSUMU et al. (1999) an proximalen Tubulusabschnitten fand sich bei unseren Untersuchungen, die das gesamte Nierenrindengewebe umfaßten, nur eine vergleichsweise geringe Anreicherung von CP. KRONING et al. (1999) wiesen für distale und proximale Nephronzellen Unterschiede in der Transportcharakteristik für CP nach. Insgesamt muß man damit in unseren Versuchen von einem geringeren Anteil Zellen mit höherer Cisplatin-Transportkapazität ausgehen, zumal die Plasmaproteinbindungsrate von 90% (ROBERTS 1983) eine hohe Akkumulation aufgrund einer ebenfalls hohen intrazellulären Proteinbindung erwarten ließ. WALKER und OLIVER (1941) ermittelten den Anteil der proximalen Tubuluszellen im Nierenrindengewebe mit 70%.

Auffällig ist der deutliche Speziesunterschied. Cisplatin wird, anders als bei der Ratte, weder von intaktem menschlichen Nierengewebe noch von Karzinomgewebe in nennenswertem Umfang angereichert. Die Ursache für dieses Phänomen läßt sich aufgrund der vorhandenen Literatur nicht klären. Hinweisend sind jedoch Ergebnisse der Genanalysen von FARDEL et al. (1996), die beträchtliche Abweichungen der DNA-Sequenzen der MDR-Gene beim Mensch und Nager zeigten. Dies legt die Vermutung nahe, daß auch für andere Transportproteine wie MRP2 (cMOAT) genetische und funktionelle Variationen bestehen. Das im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen niedrige Akkumulationsniveau ist möglicherweise auch durch die relativ hohe Lipophilie des CP zu erklären, wodurch ein passiver Efflux aus der Tubuluszelle möglich wäre, der die aktive Aufnahme eventuell vollständig antagonisiert.

4.2.3. Tomudex®

Die Einbeziehung des Zytostatikums Tomudex® in unsere Versuche ist neben der uns zur Verfügung stehenden Möglichkeit der quantitativen Bestimmung auch wegen der Ähnlichkeit zu Methotrexat getroffen worden. So wie wir die energieabhängige Akkumulation von Methotrexat bestätigen konnten, wird auch für Tomudex® eine aktive intrazelluläre Aufnahme beschrieben (JACKMAN et al. 1995a). Wie Methotrexat gelangt Tomudex® über den

reduzierten Folat-Carrier (RFC) in die Zelle (COCCONI et al. 1997, TAKEMURA et al. 1997). Dort inhibiert es jedoch spezifisch die Thymidin-Synthase und nicht zusätzlich die RNA-Synthese wie MTX (CUNNINGHAM et al. 1996). Folge sind eine gestörte DNA-Synthese sowie eine verminderte DNA-Reparaturleistung (TOUROUTOGLOU und PAZDUR 1996). Die intrazelluläre Glutamatkopplung durch die Folylpolyglutamatsynthetase (FPGS) bewirkt eine gesteigerte Hemmung der Thymidinsynthase auf das 60fache und erhöht die intrazelluläre Verweildauer von Tomudex[®] (MORAN et al. 1985).

Eine Tomudex[®]-Resistenz wird mit einer erhöhten Aktivität der Thymidin-Synthase und einer Aktivitätsminderung der FPGS erklärt (JACKMAN et al. 1995b). Da Tomudex[®] und Methotrexat sich in transmembranösem Transport sowie intrazellulärem Angriffsort gleichen, besteht eine Kreuzresistenz beider Substanzen (TOFFOLI et al. 2000). Im Gegensatz hierzu sind keine überlappenden Resistenzmechanismen zwischen Tomudex[®] und Cisplatin bekannt (KELLAND et al. 1995).

Die vorliegenden Versuche an Nierengewebe der Ratte zeigen für TDX eine deutlich höhere Akkumulationsrate als bei den anderen untersuchten Zytostatika, welche der des PAH nahe kommt. Als Erklärung kann einerseits eine erhöhte Aktivität der FPGS bei der Ratte (JACKMAN et al. 1995a) mit Verzögerung des Ausstroms herangezogen werden. Andererseits sind eine effektive Aufnahme über den RFC zu diskutieren, welcher jedoch im Gegensatz zur FPGS bei der Ratte nach COCCONI et al. (1997) und TAKEMURA et al. (1997) nur vermindert vorkommt. Eine mögliche Erklärung ist auch in der hohen Plasmaproteinbindungsrate (93%, Prescribing Information ZENECA Ltd. 1997) zu suchen, welche eine ebenso hohe intrazelluläre Proteinbindung nahelegt. Aufgrund der hohen intrazellulären Bindung bliebe über lange Zeit ein Konzentrationsgradient des freien TDX erhalten, der eine weitere Anreicherung der Substanz begünstigen würde. Darüber hinaus ist die Existenz weiterer Transportmechanismen nicht unwahrscheinlich, welche teilweise auch von denen für MTX (Plasmaproteinbindungsrate 42-57%, BANNWARTH et al. 1997) abweichen. WHETSTINE et al. (2001) beschreiben eine frame-shift-Mutation des RFC beim Menschen, welche für TDX, nicht aber für MTX, im Vergleich zur bisher bekannten Form eine geänderte Transportkinetik zur Folge hat.

Auffällig ist ferner die fehlende Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulation bei der Ratte. Es ist anzunehmen, daß die Transportsysteme auch bei der höchsten Mediumkonzentration (1µg/ml) keine Sättigung erreichen. Prinzipiell hätte dies eine Erweiterung des untersuchten Konzentrationsbereiches erforderlich gemacht. Da aber mit 0,5µg/ml bereits die Peak-Plasma-

Konzentration (Prescribing Information ZENECA Ltd. 1997) bei der klinischen Anwendung erreicht ist, wurde wegen fehlender praktischer Relevanz darauf verzichtet.

4.2.4. Topotecan

Die Topotecan-Akkumulation verringert sich bei gleichzeitiger Überexpression des Polyglykoproteins-170, so daß dies als ein Resistenzfaktor im Sinne der MDR (multidrug resistance) angesehen werden kann (CHARCOSSET et al. 1993). Dieser Effekt ist jedoch geringer als bei dem Anthrazyklin Daunorubicin und dem Epipodophyllotoxin Etoposid (HENDRICKS et al. 1992). MA et al. (1998a) postulierten einen zusätzlichen Resistenzmechanismus, unabhängig von Polyglykoprotein-170 und MRP, welcher auf einer verminderten Akkumulation beruht. Mittlerweile ist mit dem breast cancer resistance protein (BCRP) u.a. beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (KAWABATA et al. 2001), bei kolorektalen und Mammakarzinomen (SCHELLENS et al. 2000) ein hocheffektiver Effluxmechanismus für Camptothecin-Derivate, wie z.B. Topotecan, charakterisiert worden. Zellen dieser genannten Tumoren weisen bei Expression des BCRP-Gens eine verminderte Akkumulation von Topotecan im Sinne der klassischen MDR auf. Ein Nachweis im Nierenzellkarzinom steht noch aus.

Im Akkumulationsverhalten zeigten sich im Vergleich zu den anderen Substanzen eindeutige Unterschiede in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe. Auch hier ist zwar die Anreicherung im Tumor deutlich niedriger als im intakten Nierengewebe, aber signifikant höher als die der übrigen untersuchten Substanzen. Dies spricht dafür, daß Resistenzfaktoren wie Polyglykoprotein-170 oder MRP beim TPT nur eine untergeordnete Rolle spielen. Andererseits liegt die Vermutung nahe, daß der bei anderen Tumoren gefundene Camptothecin-Effluxmechanismus BCRP von NZK-Zellen nicht exprimiert wird. Für die klinisch gefundene TPT-Resistenz scheint damit weniger das Ausmaß der Akkumulation verantwortlich zu sein. Eine größere Bedeutung ist wohl eher der intrazellulären Gegenregulation, wie ein verringerter Gehalt an Topoisomerase-I und eine kompensatorische Überexpression der Topoisomerase-II (CHANG et al. 1995), beizumessen. Die dennoch im Vergleich zum intakten menschlichen Nierengewebe gefundene Verringerung der Akkumulationsrate im Tumor stimmt gut mit den Angaben von MA et al. (1998b) überein.

Die Plasmaproteinbindungsrate vom TPT ist im Vergleich zu den anderen untersuchten Zytostatika relativ gering. Sie wird in der Literatur im Bereich von 6,6% (COLE et al. 1995)

bis 21,3% (MUNSHI et al. 1995) angegeben. Prinzipiell wäre mit niedriger intrazellulärer Proteinbindung auch eine geringe Anreicherung verbunden. Die Aufnahmesysteme scheinen jedoch effektiv genug zu sein, um einen vergleichbaren Konzentrationsgradienten herzustellen.

Bemerkenswerterweise sind auch im intakten Rattengewebe keine höheren Werte als in gesundem menschlichen Nierengewebe erzielt worden. Auch hier muß analog zum Cisplatin eine genetische und funktionelle Variabilität der beteiligten Transportmechanismen (FARDEL et al. 1996) in Betracht gezogen werden.

Die fehlende Konzentrationsabhängigkeit der Akkumulationsrate spricht für eine effektive Aufnahme, die im untersuchten Konzentrationsbereich keine Sättigungsbedingungen erreicht. Da bei der klinischen Anwendung Plasmaspiegel von höchstens 0,045µg/ml (KATH et al. 1998) auftraten, die maximale untersuchte Mediumkonzentration jedoch 0,5µg/ml betrug, wurde, ähnlich wie beim Tomudex[®], wegen mangelnder praktischer Relevanz auf eine Erweiterung des Konzentrationsbereiches verzichtet, zumal die klinisch erreichten Gewebekonzentrationen eher geringere als die genannten Plasmaspiegel sein dürften.

Wie unter 4.2. bereits angedeutet, liegt Topotecan unter den Versuchsbedingungen im Gleichgewicht zwischen der offenen und der Lactonform vor. Auch bei getrennter Bestimmung beider Formen kann keine Aussage bezüglich unterschiedlicher Transporte gemacht werden. Die ca. 3fach höhere Akkumulationsrate des Lactons kann einerseits durch verstärkten Eintransport, andererseits durch verringerten Austransport erklärt werden. Die Bedeutung der Umwandlung des Topotecan in Lacton und Hydroxycarbonsäure (HC), welche unter Umständen intrazellulär und im Inkubationsmedium unterschiedlich sein könnte, und die Überlagerung dieses Phänomens durch aktiven Transport bzw. passive Diffusion läßt sich unter den gegebenen Bedingungen nicht differenzieren. Für die Untersuchung einer möglichen Stimulation der Akkumulation ist das Vorliegen zweier Formen des Topotecan weniger relevant. Unter diesem Gesichtspunkt wurden für die Stimulationsversuche beide Formen des Topotecan gemeinsam betrachtet, zumal die in extenso durchgeführte Auswertung der Befunde für das Lacton und das HC keine zusätzlichen Informationen erbrachten.

4.3. Stimulierbarkeit der Fremdstoffaufnahme in Nierengewebe von Ratte und Mensch

Die Steigerung der renalen PAH-Transportkapazität durch Vorbehandlung mit dem Glukokortikoid Dexamethason ist *in vivo* wie *in vitro* möglich (FLECK 1997). Als Hypothese wurde von FLECK (1997) hierfür am ehesten eine vermehrte Carrier-*de-novo*-Synthese verantwortlich gemacht. Orientierende PCR-Untersuchungen am Physiologischen Institut der Universität Göttingen (Direktor Prof. Dr. G. Burckhardt) belegen eine vermehrte Carrierexpression nach Dexamethasonvorbehandlung (persönliche Mitteilung Dr. A. Bahn, Göttingen). Gestützt wird dies durch die Untersuchungen von SERRE et al. (1998). Sie beschreiben bei der Ratte nach Dexamethasonapplikation eine veränderte MDR1b-Expression mit sowohl erhöhter (Hepatozyten, Herz, Gehirn, Kolon) als auch bis zu 50% verringerter (Niere, Lunge, Nebenniere) Polyglykoprotein-170-Konzentration. Offen bleibt die Frage, in welchem Umfang sich die erhöhte Stoffwechselleistung unter Dexamethasonzusatz auswirkt (FLECK et al. 1998). Gegen einen gravierenden anabolen Dexamethason-Effekt auf den PAH-Transport sprechen die Ergebnisse von zeitlich parallel durchgeführten Untersuchungen am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FSU Jena, in denen weder der Glutathionstatus noch der Kaliumhaushalt durch den hormonartigen Zusatz signifikant verändert war (persönliche Information Prof. Dr. med. C. FLECK). Auch eine direkte Dexamethason-Wirkung auf die PAH-Austransporter wird diskutiert (ULLRICH 1999). Da Dexamethason selbst ein Substrat des MDR1-Genproduktes ist (SCHINKEL et al. 1995), sind direkte Interferenzen mit dem PAH-Transport denkbar. Da die PAH-Akkumulation nach Umlagerung der NRS in dexamethasonfreies Medium gemessen wurde, dürfte dieses Argument nicht für die Interpretation unserer Ergebnisse relevant sein. Ein Einfluß auf die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) konnte *in vivo* nicht festgestellt werden (BRÄUNLICH et al. 1986, NUSSBAUM 1994) und ist *in vitro* ohnehin bedeutungslos.

Der Stimulationseffekt scheint beim Nierenzellkarzinom größer zu sein als bei gesundem Gewebe. Die Ansprechrate ist jedoch nicht einheitlich. Lediglich die Hälfte der untersuchten Tumoren zeigten den Effekt (FLECK et al. 2000). Eine Korrelation mit dem Tumorstadium konnte wegen der geringen Fallzahl nicht belegt werden, tendenziell reagieren kleinere Tumoren aber eher mit einem Stimulationseffekt. Eine Abhängigkeit von der Histologie konnte bei den damaligen Untersuchungen nicht gefunden werden. Nach TOBE et al. (1995) besteht ein Zusammenhang zwischen dem histopathologischen Differenzierungsgrad und der Polyglykoprotein-170-Konzentration im NZK derart, daß gering differenzierte Karzinome durch eine niedrige Polyglykoprotein-170-Konzentration gekennzeichnet sind.

Im Gegensatz zu den Befunden mit PAH waren bei den untersuchten Zytostatika keine größeren individuellen Unterschiede nachweisbar. Möglicherweise sind diese jedoch aufgrund der jeweils geringen Patientenzahlen nicht erkannt worden. Ebenso war ein Einfluß des Tumorstadiums auf die Zytostatikaakkumulation nicht zu verifizieren.

Dies gilt ebenso für das Schilddrüsenhormon T_3 . Auch dieses Hormon zeigte keine wesentlichen Unterschiede auf die Zytostatikaaufnahme in NRS. Im Gegensatz zu Dexamethason führt die Vorbehandlung der NRS mit T_3 jedoch nicht zu einer gesteigerten PAH-Aufnahme bei menschlichem Gewebe. Bei der Ratte ist sie sogar vermindert (FLECK et al. 1998). Bei jungen Tieren mit unreifer Nierenfunktion (10 Tage alt) zeigt die Vorbehandlung mit beiden Wirkstoffen *in vivo* allerdings eine gleichartige stimulierende Wirkung, z.B. auf die renale Aminosäure-Reabsorption (FLECK 1992a, b). Rückschlüsse auf den PAH- oder Zytostatika-Transport sind jedoch nur spekulativ. Als ein Grund für den Rückgang der PAH-Akkumulation bei der Ratte wurde von FLECK (1998) der metabolische Einfluß des T_3 mit kataboler Stoffwechsellage und verringertem Energiegehalt der Zelle vermutet.

Des Weiteren ist ein stimulierender Effekt auf die Aminosäure-Reabsorption und den PAH-Transport in der Niere auch nach einer EGF-Vorbehandlung *in vivo* nachweisbar. Allerdings ist der Einfluß auf die renale Transportkapazität im Vergleich mit Dexamethason oder T_3 geringer (FLECK und PERTSCH 1999). In eigenen *in vitro* EGF-Stimulationsversuchen konnte für PAH kein Effekt nachgewiesen werden. Bei Kombination von EGF mit Dexamethason blieb der bekannte Stimulationseffekt von Dexamethason sogar aus. Entgegen der einleitenden Vermutung (1.4. Arbeitshypothese) ist damit bei den *in vivo*-Befunden (FLECK und PERTSCH 1999) von einer indirekten EGF-Wirkung auszugehen. Da die direkte Einwirkung des EGF keinen Einfluß auf PAH-Akkumulation zeigte, ist vielmehr anzunehmen, daß der gefundenen *in-vivo* Stimulationseffekt auf der systemische Wirkung des EGF beruht. GOW und PHILLIPS (1994) wiesen z.B. unter anderem nach EGF-Applikation bei Schafen eine erhöhte Vasopressin-Plasmakonzentration nach. Weitere Hormoninteraktionen sind daher wahrscheinlich.

Aufgrund des fehlenden Stimulationseffektes wurde dieser Weg zur Steigerung der Zytostatika-Akkumulation nicht weiter verfolgt. Auch wenn EGF u.a. wegen seines direkten renalen Angriffes (YAMADA et al 1995) für die Grundlagenforschung interessant bleiben dürfte, ist unter klinischen Gesichtspunkten sein Einsatz bei Tumorerkrankungen mit seiner proliferativen Wirkung problematisch.

Die Hormonwirkung auf die MTX-Akkumulation ist ebenso wie beim PAH uneinheitlich. Während T_3 bei den intakten Geweben von Ratte und Mensch eine geringfügige Steigerung bewirkt, läßt sich für das Tumorgewebe kein Effekt nachweisen. Mehrere Gründe können hierfür verantwortlich sein. Zum einen könnte die Entdifferenzierung der Tumoren im Vergleich zum intakten Gewebe eine verringerte Anzahl von T_3 -Bindungsstellen mit reduzierter Ansprechbarkeit zur Folge haben, so daß der postulierte Effekt der Carrier-*de-novo*-Synthese während der Vorinkubation ausbleibt. Außerdem ist bei der Tumorgenese eine veränderte Expression der Transportproteine belegt (FARDEL et al. 1996), wodurch auch eine erhöhte Anzahl stimulierbarer Austransporter möglich erscheint. Insgesamt ist jedoch auch die Steigerung der MTX-Akkumulation bei den intakten Geweben so gering ausgeprägt, daß ähnlich wie beim PAH (FLECK 1998) ein Überwiegen des katabolen Einflusses von T_3 zu diskutieren ist.

Unter Dexamethason ergibt sich in Hinblick auf die therapeutische Anwendbarkeit ein günstigeres Bild. Die intakten Gewebe reichern MTX signifikant geringer an. Im Tumorgewebe findet sich eine erhöhte Akkumulationsrate für MTX. Dies würde eine praktische Anwendung sinnvoll erscheinen lassen, doch leider sind die Effekte nur gering ausgeprägt. Zu berücksichtigen bleiben ferner die Nebenwirkungen einer hochdosierten Steroidtherapie, die in Anbetracht des geringen Nutzens in einem ungünstigen Verhältnis stehen. Außerdem ist es fraglich, ob die *in vitro* Befunde sich ohne weiteres auf einen intakten Organismus übertragen lassen. Durch den gewählten Versuchsansatz werden, wie oben erläutert, Transportvorgänge über die basolaterale Zellmembran erfaßt. Eine Stimulationswirkung auch auf der luminalen Seite mit Induktion verstärkter Austransportmechanismen ist zumindest nicht unwahrscheinlich.

Beim Cisplatin liegen die Verhältnisse ähnlich wie beim MTX. Auch hier ist die, wenn auch geringe, Dexamethason - bedingte Stimulation der CP-Akkumulation im NZK im therapeutischen Sinne als günstig anzusehen. Die für MTX genannten Einschränkungen hinsichtlich einer praktischen Anwendung gelten hier sinngemäß. T_3 bewirkt hingegen eine geringe, aber teilweise signifikante Steigerung der Akkumulation von CP in allen untersuchten Geweben. Dieser Effekt stellt eine klinische Anwendung allerdings in Frage, da eine vermehrte CP-Akkumulation in intakten Tubuluszellen bei der ohnehin schon beträchtlichen Nephrotoxizität (APPENROTH et al. 1991) einer CP-Therapie unerwünscht ist. Allerdings existieren Berichte, nach denen Methylprednisolon die cisplatinbedingte Nephrotoxizität abschwächt (UOZUMI et al. 1995). Eine Risiko-Nutzenabwägung kann anhand der vorliegenden Daten nicht erfolgen.

Neben Dexamethason und T_3 scheinen auch andere, physiologische Einflüsse auf den Cisplatintransport zu existieren. So berichten MASEREEUW et al. (2000) über den Einfluß von Endothelin auf transzelluläre Fremdstofftransporte. Endotheline sind wichtige Regulatoren des renalen Blutflusses und der Natrium- und Wasserhomöostase. Es ist bekannt, daß MRP2 und Polyglykoprotein-170 als wichtige Faktoren der multidrug resistance durch Endothelin beeinflußt werden. MASEREEUW et al. (2000) konnten eine, durch die Proteinkinase C vermittelte Endothelinwirkung, die mit einer Verminderung des ATP-abhängigen transzellulären (Medikamenten-)Transportes im proximalen Tubulus einhergeht, zeigen. Damit liegen weitere Ergebnisse über die hormonelle Regulation der multidrug resistance vor. Hier wäre gegebenenfalls ein weiterer Ansatz für Untersuchungen zur Überwindung der MDR gegeben.

Die Untersuchungen zur Akkumulation von Tomudex[®] zeigten für menschliches Gewebe unter T_3 -Stimulation ein ähnliches Verhalten wie die mit PAH: Es kommt zu einer Verringerung der Aufnahme. Denkbar wäre, daß zumindest teilweise jeweils die gleichen Transporter an der Aufnahme von PAH und Tomudex[®] beteiligt sind, wofür es in der Literatur jedoch bisher keine Hinweise gibt. Naheliegenderweise scheint auch hier der katabole T_3 -Effekt (FLECK 1998) im Vordergrund zu stehen. Die Strukturverwandtschaft von TDX mit MTX und daraus resultierender Affinität zu Transportsystemen mit überlappender Substratspezifität wie dem RFC, hätte bei diesen beiden Substanzen analoge Ergebnisse erwarten lassen. Wie bereits angedeutet, scheinen neben parallelen Transportwegen auch Unterschiede zu bestehen. Die angesprochenen Mutationen des RFC (WHETSTINE et al. 2001) ist ein erster Hinweis und kann zur Erklärung von Unterschieden beim Transport von TDX und MTX herangezogen werden.

Der Dexamethason-Einfluß war, wie bereits erwähnt, vernachlässigbar. Auch dies legt die Vermutung nahe, daß für TDX weitere, bisher unbekannte Transporter existieren, welche prinzipiell auch bidirektional wirken könnten. Die Dexa-Vorbehandlung hätte dann sowohl einen gesteigerten Ein- als auch Austransport zur Folge, so daß kein meßbarer Nettoeffekt verbliebe. Betrachtet man die therapeutisch ungünstige T_3 -Wirkung und das Ausbleiben des Dexa-Effektes auf den TDX-Transport, scheint eine hormonelle Beeinflussung damit für die Steigerung der TDX-Aufnahme in die Nierenzelle nicht geeignet zu sein.

Für Topotecan konnte weder nach Inkubation mit T_3 noch mit Dexamethason *in vitro* ein Einfluß auf den Transport nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, daß entsprechend des Ansatzes der vorliegenden Arbeit keine Transportmechanismen für TPT existieren, deren Expression sich durch T_3 bzw. Dexamethason modifizieren läßt. Leider liegen bisher nur sehr

unzureichende Daten über den transmembranösen Austausch von TPT vor. Lediglich das BCRP ist bislang als Effluxsystem charakterisiert worden (SCHELLENS et al. 2000, KAWABATA et al. 2001), eine direkte Hemmung mit konsekutivem Anstieg der intrazellulären TPT-Konzentration gelang ERLICHMAN et al. (2001) mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor CI1033. Die Expression des BCRP ist jedoch beim NZK noch fraglich. Das Mykotoxin Fumitremorgin C erwies sich nach RABINDRAN et al. (1998) bei TPT-resistenten Zelllinien als geeignet, die zytotoxische Wirkung von TPT durch Steigerung der TPT-Akkumulation zu erhöhen. Ob die Wirkungsweise dabei auf der Hemmung des Austransportes oder auf einer Steigerung der Aufnahme beruht, ist bislang ungeklärt. Unter klinischen Gesichtspunkten stellt die überwiegende Akkumulation der eigentlichen Wirkform (TPT-Lacton) auch im Tumorgewebe einen möglicherweise nutzbaren Effekt zur Überwindung der MDR dar. Eine weiterführende Prüfung der Kombinationsbehandlung mit Dexamethason bzw. T₃ und Topotecan bezüglich der Anreicherung von TPT-Lacton im NZK erscheint zumindest sinnvoll.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß in der vorliegenden Arbeit erstmals *in vitro* Hormonwirkungen auf die oben im Detail beschriebenen Transportmechanismen für Zytostatika untersucht wurden. Im Vergleich zu vielen in der Literatur beschriebenen Versuchsreihen, bei denen mit ausgewählten Zellkulturen gearbeitet wird, verdient dabei die Verwendung von menschlichem Nierengewebe besondere Beachtung, sind doch dadurch direkte Rückschlüsse auf die Anwendbarkeit der gewählten Therapiestrategien beim Menschen möglich.

Es gelang der Nachweis der prinzipiellen Beeinflussung der Transporte von Methotrexat, Cisplatin und Tomudex[®] durch Dexamethason und T₃ *in vitro*. Für die klinische Anwendung sind die gemessenen Effekte wahrscheinlich zu gering ausgeprägt, so daß von einer direkten praktischen Umsetzung nicht ausgegangen werden kann. Außerdem sind bei der Applikation von hohen Dosen T₃ bzw. Dexamethason deren spezifische, teilweise erheblichen systemischen Nebenwirkungen zu bedenken. Stellvertretend seien die Ausbildung einer iatrogen bedingten diabetogenen Stoffwechsellage (Dexamethason) oder die Provokation kardialer Rhythmusstörungen (T₃) aufgeführt. Im Falle des T₃ mit seiner unselektiven Stimulationswirkung am intakten Gewebe und am Nierenzellkarzinom wäre außerdem eine gesteigerte Zytostatikawirkung am gesunden Gewebe zu befürchten. Somit kommt eine zytostatische Kombinationstherapie mit T₃ sicherlich nicht infrage.

Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen bietet es sich an, weitere hormonelle Modulatoren zellulärer Transportmechanismen wie das bereits genannte Endothelin auf ihre Eignung zur Überwindung der MDR hin zu untersuchen. Der Gesichtspunkt einer gesteigerten Zytostatikaaufnahme, wie er mit dieser Arbeit verfolgt wurde, verdient dabei mehr Beachtung, als ihm derzeit in der Literatur beigemessen wird.

Neben der Hemmung von Effluxmechanismen, z.B. durch den Einsatz von Kalzium-Antagonisten (MICKISCH et al. 1990c), durch die Anwendung des Triazinoaminopiperidin-Derivates S9788 (EFFERTH et al. 1993b, PUNT et al. 1997) zur Blockade des Polyglykoprotein-170 oder durch Zusatz des Tyrosinkinase-Inhibitors CI1033 zur Blockierung des BCRP (ERLICHMAN et al. 2001), scheint die Beeinflussung der Regulation der Expression der genannten Mechanismen, die zur MDR beitragen, ein weiterer erfolgversprechender therapeutischer Angriffspunkt zu sein.

Das klassische Verfahren zur Überwindung von Resistenzen durch Kombination verschiedener Wirkprinzipien mit dem Ziel, einen insgesamt verstärkten Effekt zu erzielen, bzw. die Selektion von Resistenzmechanismen im Therapieverlauf zu unterdrücken, ist nach wie vor aktuell. Für die Optimierung von Zytostatikakombinationen stellt Topotecan mit seinem neuen Wirkmechanismus und seinem von uns herausgefundenen Akkumulationsverhalten in der Niere in dieser Hinsicht eine interessante Substanz dar. Die Daten von JIANGUO et al. (1998) über die Kombination von Topoisomerase-Inhibitoren mit Cisplatin sind ermutigend.

Da neben dem lokal begrenzten Nierentumor vor allem Metastasen limitierend für die Lebensqualität und die Überlebensprognose sind, sollten in Hinblick auf eine effektive Chemotherapie weitere genetische und funktionelle Unterschiede zum Primärtumor ermittelt werden. Einen wichtigen Aspekt stellt dabei die weitere Charakterisierung der beteiligten Transportproteine dar - vor allem für TDX liegen in dieser Hinsicht nur sehr begrenzte Daten vor - da hier am ehesten Ansatzmöglichkeiten bestehen, die multidrug resistance des Nierenzellkarzinoms zu überwinden.

5. Zusammenfassung

Die medikamentöse Therapie des Nierenzellkarzinoms (NZK) ist, insbesondere wenn bereits Metastasen vorliegen, durch eine weitreichende Resistenz gegen eine Vielzahl unterschiedlicher Chemotherapeutika stark eingeschränkt. Dieses Phänomen hat seine Ursache unter anderem in Transportmechanismen, die Zytostatika aus der Tumorzelle transportieren und damit therapeutisch relevante Zytostatikakonzentrationen verhindern.

Bisherige Ansätze zur Überwindung dieser sogenannten multidrug resistance (MDR) zielten auf eine Verringerung des Austransportes ab. Mit der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Aufnahme von Fremdstoffen durch eine Vorbehandlung mit Dexamethason (Dexa), T₃ und EGF in Rattennierengewebe, in intaktes menschliches Nierengewebe und NZK-Gewebe zu steigern ist. Die Arbeitshypothese geht dabei von einer vermehrten Expression von Transportproteinen für den Eintransport aus. Auswirkungen auf den efflux werden mit unseren Versuchen zwar nicht erfaßt, sie wären aber auch von untergeordneter Bedeutung, wenn es gelänge, die Zytostatikakonzentration im NZK zu steigern.

Grundlage bilden Ergebnisse, nach denen sich die zelluläre Aufnahme von p-Aminohippurat (PAH) sowohl in Rattennierengewebe als auch in intaktem menschlichen Nieren- und Tumorgewebe durch eine Dexamethasonvorbehandlung steigern läßt (FLECK et al. 2000). Die für PAH etablierte Methode beruht auf der Vorinkubation (24h) von Nierenrindenschnitten (NRS) in Dexamethason-, T₃- bzw. EGF-haltigem Inkubationsmedium. Anschließend erfolgt eine Umlagerung in PAH-haltiges Medium (2h). Durch Ermittlung der Gewebe- und Mediumkonzentration am Versuchsende steht mit dem Schnitt-Medium-Quotienten ($Q_{S/M}$) ein Maß für die Transportleistung des NRS zur Verfügung. Dieses *ex vivo*-Verfahren konnte in der vorliegenden Arbeit für die Untersuchung der Einflüsse von Dexa, T₃ und EGF auf das Akkumulationsverhalten von Methotrexat (MTX), Cisplatin (CP), Tomudex[®] (TDX) und Topotecan (TPT) adaptiert werden.

In Vorversuchen wurde die Akkumulationskapazität des Nierengewebes für die verwendeten Zytostatika ohne Vorbehandlung ermittelt, um die prinzipielle Eignung der Methode für die unterschiedlichen Substanzen zu überprüfen. Es zeigten sich deutliche Unterschiede der Akkumulation der Zytostatika, welche insbesondere auch von der des PAH abweicht. Eine dem PAH vergleichbare Akkumulationsrate erreichte lediglich TDX ($Q_{S/M} \sim 5$) bei der Ratte. MTX und TPT werden, wenn auch deutlich geringer ebenfalls angereichert ($Q_{S/M} \sim 2-3$). Cisplatin erreicht ein $Q_{S/M}$ von maximal 1,2 und wird somit nahezu nicht im Nierengewebe angereichert. Menschliches intaktes Nierengewebe akkumuliert die Testsubstanzen ähnlich

wie das Rattengewebe. Die maximal erzielten Akkumulationsraten sind im allgemeinen jedoch niedriger. Ausnahmen bilden MTX und TPT, welche sogar stärker als bei der Ratte in den NRS aufgenommen werden. Bei den Versuchen mit NZK-Gewebe finden sich bei keiner Substanz Akkumulationsraten von >1 , was die Unfähigkeit zur aktiven Aufnahme belegt. Unter anaeroben Inkubationsbedingungen blieb die Akkumulation der Testsubstanzen ebenfalls aus ($Q_{S/M} < 1$). Dies weist auf energieabhängige, aktive Transportvorgänge hin, die der Fremdstoffakkumulation im NRS zugrunde liegen.

Nach Dexa- und T_3 -Vorinkubation zeigen sich für TDX und TPT bei keinem der untersuchten Gewebe gesteigerte Akkumulationswerte. TDX wird unter T_3 -Einfluß sogar in intaktem menschlichen Nieren- und Tumorgewebe weniger akkumuliert. Ähnliches wurde bereits früher für PAH beobachtet. Bei MTX und CP ergibt sich in Hinblick auf eine klinische Anwendung nach Dexa-Vorbehandlung ein günstigeres Bild: Rattengewebe und intaktes menschliches Gewebe reichern beide Substanzen weniger, NZK-Gewebe geringfügig stärker an. T_3 bewirkt bei MTX und CP den gegenteiligen Effekt. Die Akkumulationsrate nimmt bei den intakten Geweben von Ratte und Mensch zu, im NZK ist sie verringert.

Aufgrund von stimulierenden Effekten einer EGF-Vorbehandlung auf die renale PAH-Ausscheidung bei der Ratte (FLECK und PERTSCH 1999) wurde EGF als potentiell geeigneter Stimulator untersucht. Da jedoch unter *in vitro*-Bedingungen bei der Ratte die EGF-Vorinkubation eine Abnahme der PAH-Akkumulation bewirkt und in Kombination mit Dexa dessen Stimulationseffekt sogar ausbleibt, wurde auf weiterführende Versuche verzichtet.

Insgesamt gelang der Nachweis der prinzipiellen Beeinflussung der renalen Transporte von MTX, CP und TDX durch Dexa und T_3 unter *in vitro*-Bedingungen. Besondere Bedeutung ist dabei den an menschlichem Gewebe erhobenen Befunden beizumessen, da so direkte Rückschlüsse auf die klinische Anwendung möglich sind. Die therapeutisch sinnvollen Effekte der Dexa-Vorbehandlung auf die MTX- und CP-Akkumulation mit erhöhten Akkumulationsraten im Tumor und verringerter Anreicherung im intakten Gewebe sind für eine praktische Umsetzung zu gering ausgeprägt und müssen aufgrund der Nebenwirkungen einer hochdosierten Dexa-Therapie kritisch gesehen werden. Die unselektive Stimulationswirkung von T_3 ist unter klinischen Gesichtspunkten ebenfalls problematisch, da auch eine Zunahme der renalen Zytostatikanebenwirkungen in gesundem Gewebe zu befürchten ist.

In weiterführenden Untersuchungen sollte versucht werden, besser geeignete Modulatoren renaler Transportprozesse zu finden. Die Strategie, eine gesteigerte Zytostatikaaufnahme

durch erhöhte Expression der Transportproteine zu erzielen, wie sie mit dieser Arbeit verfolgt wurde, stellt dabei eine interessante Alternative zur konventionellen Therapie des NZK dar.

6. Literaturverzeichnis

AGGARWAL SK (1993)

A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and analogues.
J. Histochem. Cytochem. 41: 1053-1073

AHN H, LEE E, KIM K, LEE C (1994)

Effect of glutathione and its related enzymes on chemosensitivity of renal cell carcinoma and bladder carcinoma cell lines.
J. Urol. 151: 263-267

ALBERTIONI F, PETTERSSON B, BECK O, RASK C, SEIDEMANN P, PETERSON C (1994)

Simultaneous quantitation of methotrexate and its two main metabolites in biological fluids by a novel solid-phase extraction procedure using high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. B 665: 163-170

ALVAREZ M, PAULL K, MONKS A, HOSE C, LEE JS, WEINSTEIN J, GREVER M, BATES S, FOJO T (1995)

Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute Anticancer Drug Screen.
J. Clin. Invest. 95: 2205-2214

APPENROTH D, BRÄUNLICH H (1984)

Age differences in cisplatin nephrotoxicity.
Toxicol. 32: 343-353

APPENROTH D, WINNEFELD K, BRÄUNLICH H (1988)

Nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin in young and adult rats.
Biomed. Biochem. Acta 47: 791-797

APPENROTH D, KESSLER S, WINNEFELD K, BRÄUNLICH H (1991)

Comparative nephrotoxicity studies of cisplatin and its iodinated derivative in rats.
Arch. Toxicol. 14: 209-212

AUBEL VAN RA, KUIJCK VAN MA, KOENDERINK JB, DEEN PM, OS VAN CH, RUSSEL FG (1998)

Adenosine triphosphate-dependent transport of anionic conjugates by the rabbit multidrug resistance-associated protein Mrp2 expressed in insect cells.
Molec. Pharmacol. 53: 1062-1067

BANNWARTH B, PEHOURCQ F, LEQUEN L (1997)

Pharmacokinetics of methotrexate in rheumatoid arthritis: therapeutic implications.
Therapie 52: 129-132

BESSEGHIR K, MOSIG D, ROCH-RAMEL F (1989)

Transport of methotrexate by in vitro isolated rabbit proximal tubule.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 250: 688-695

- BOERNER P, RESNICK RJ, RACKER E (1985)
Stimulation of glycolysis and amino acid uptake in NRK-49F cells by transforming growth factor beta and epidermal growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82: 1350-1353
- BORST P, KOOL M, EVERS R (1997)
Do cMOAT (MRP2), other MRP homologues, and LRP play a role in MDR?
Semin. Cancer. Biol. 8: 205-213
- BOSCH I, CROOP J (1996)
P-glycoprotein multidrug resistance and cancer.
Biochim. Biophys. Acta 1288: 37-54
- BRÄUNLICH H, KÖHLER A, SCHMIDT J (1986)
Acceleration of p-aminohippurate excretion in immature rats by dexamethasone treatment.
Med. Biol. 64: 267-270
- BRÄUNLICH H, RASSBACH H, VOGELSANG S (1992)
Stimulation of renal tubular transport of p-aminohippurate in rats of different ages by treatment with adrenocortical steroids.
Devel. Pharmacol. Ther. 19: 1-5
- BRATTON AC, MARSHALL EK, BABITT D, HENDRICKSON AR (1939)
J. Biol. Chem. 128: 537-550
- BURCKHARDT G, BAHN A, WOLFF NA (2001)
Molecular physiology of renal p-aminohippurate secretion.
News Physiol. Sci. 16: 114-118
- BURRIS HA, FIELDS SM (1994)
Topoisomerase I-inhibitors. An overview of the camptothecin analogs.
Hematol. Oncol. Clin. North Am. 8: 333-355
- CHANG AY, GARROW G, BOROS L (1995)
Clinical and laboratory studies of topotecan in breast cancer.
Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 14: 105
- CHAPMAN AE, GOLDSTEIN LJ (1995)
Multiple drug resistance: Biologic basis and clinical significance in renal-cell carcinoma.
Seminars Oncol. 22: 17-28
- CHARCOSSET JY, SOUES S, LAVAL F (1993)
Poisons of DNA topoisomerases I and II.
Bull. Cancer 80: 923-954
- CHEN TS, WENCZAK BA, HUANG KC (1983)
Transport of methotrexate in cortical slices of monkey kidney: effects of organic anions and vincristine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 226: 645-649

- CHIN KV, LIU B (1994)
Regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene expression.
InVivo 8: 835-841
- CHOW WH, GRIDLEY G, FRAUMENI JF, JARVHOLM B (2000)
Obesity, hypertension, and the risk of kidney cancer in men.
N. Engl. J. Med. 343: 1305-1311
- COCCONI G (1997)
Results of an European multicentre trial of tomudex versus 5-FU/high dose LV.
Tumori 83: 72-73
- COLE DE, BLANEY SM, BALIS FM (1995)
Topotecan in fluidis: depot of activ drug in red blood cells.
Proc. Am. Cancer Res. 36: 363-365
- CUI Y, KÖNIG J, BUCHHOLZ JK, SPRING H, LEIER I, KEPPLER D (1999)
Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells.
Mol. Pharmacol. 55: 929-937
- CUNNINGHAM D, ZALCBERG J, SMITH I, GORE M, PAZDUR R, BURRIS III H, MEROPOL NJ, KENNEALEY G, SEYMOUR L & the „TOMUDEX“ INTERNATIONAL STUDY GROUP (1996)
„Tomudex“ (1694): A novel thymidylate synthase inhibitor with clinical antitumour activity in a range of solid tumours.
Ann. Oncol. 7: 179-182
- DANTZLER WH, SILBERNAGL S (1988)
Amino acid transport by juxtamedullary nephrons: distal reabsorption and recycling.
Am. J. Physiol. 255: F397-F407
- DEGEN H, LORSCHIED P (2001)
Schließende Statistik. In: Statistik-Lehrbuch mit Wirtschafts- und Bevölkerungsstatistik. Oldenbourg Verlag, München-Wien, S.279-343
- DEMEULE M, BROSSARD M, BELIVEAU R (1999)
Cisplatin induces renal expression of P-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter.
Am. J. Physiol. 277: F832-F840
- EDELMAN IS (1974)
Thyroid thermogenesis.
N. Engl. J. Med. 290: 1303-1308
- EFFERTH T, VOLM M (1993)
Increase of alkaline phosphatase in multidrug-resistant tumor cells and their cross-resistance to 6-thioguanine.
Drug Res. 43: 1118-1121

- EFFERTH T, DUNN TA, BERLION M, LANGENBAHN H, POMMERENKE EW, VOLM M (1993)
Reversal of inherent multidrug-resistance in primary human renal cell carcinoma cell cultures by S9788.
Anticancer Res. 13: 905-908
- EFFERT T, FABRY U, OSIEKA R (1995)
Is there a realistic chance for the clinical modulation of multidrug resistance?
Onkologie 18: 258-260
- ERLICHMAN C, BOERNER SA, HALLGREN CG, SPIEKER R, WANG XY, JAMES CD, SCHEFFER GL, MALIEPAARD M, ROSS DD, BIBLE KC, KAUFMANN SH (2001)
The HER tyrosine kinase inhibitor CI1033 enhances cytotoxicity of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and topotecan by inhibiting breast cancer resistance protein-mediated drug efflux.
Cancer Res. 61: 739-748
- ERNEST S, RAJAMARAN S, MEGYESI J, BELLO-REUSS EN (1997)
Expression of MDR1 (multidrug resistance) gene and its protein in normal human kidney.
Nephron 77: 284-289
- ERNEST S, BELLO-REUSS E (1998)
P-glycoprotein functions and substrates: Possible roles of MDR1 gene in the kidney.
Kidney Int. 53: 11-17
- FARDEL O, LECUREUR, V GUILLOUZO A (1996)
The P-glycoprotein multidrug transporter.
Gen. Pharmacol. 27: 1283-1291
- FISHER RL, SANUIK JT, GANDOLFI AJ, BRENDDEL K (1994)
Toxicity of cisplatin and mercuric chloride in human kidney cortical slices.
Human Exp. Toxicol. 13: 517-523
- FISCHER CG, OBERNEDER R, ALTWEIN J, WIRTH M, MILLER K (2000)
Immuntherapie des Nierenzellkarzinoms.
Dt. Ärzteblatt 97: A 2781-2784
- FLECK CH (1992a)
Renal transport of endogenous amino acids. I. Comparison between immature and adult rats.
Renal Physiol. Biochem. 15: 257-265
- FLECK CH (1992b)
Renal transport of endogenous amino acids. II. Influence of treatment with triiodothyronine or dexamethasone in immature and adult rats.
Renal Physiol. Biochem. 15: 266-276

FLECK CH (1997)

In vitro stimulation of renal tubular p-aminohippurate transport by dexamethasone in kidney tissue of immature and adult rats.

Exp. Toxic. Pathol. 49: 487-492

FLECK CH, PERTSCH J (1999)

Epidermal growth factor (EGF) increases the renal amino acid transport capacity in amino acid loaded rats.

Amino Acids 15: 307-320

FLECK CH, GÖCKERITZ S, SCHUBERT J (1996)

Tubular PAH transport capacity in human kidney tissue and in renal cell carcinoma-correlation with various clinical and morphological parameters of the tumor.

Urol. Res. 25: 167-171

FLECK CH, KRATOCHWIL E, WINTERSTEIN K, GÖCKERITZ S, SCHUBERT J (1998)

A new approach to overcome the multidrug resistance in human renal cell carcinoma (RCC).

Nova Acta Leopoldina 78 (306): 275-285

FLECK C, BACHNER B, GÖCKERITZ S, KARGE E, STROHM U, SCHUBERT J (2000)

Ex vivo stimulation of renal tubular p-aminohippurate transport by dexamethasone and triiodthyronine in human renal cell carcinoma.

Urol. Res. 28: 383-390

FLECK C, KRETZSCHEL I, SPERSCHNEIDER T, APPENROTH D (2001)

Renal amino acid transport in immature and adult rats during chromate and cisplatin-induced nephrotoxicity.

Amino Acids 20: 201-215

FROMM MF (2000)

P-glycoprotein: a defense mechanism limiting oral bioavailability and CNS accumulation of drugs.

Int. J. Clin. Pharmacol. 38: 69-74

FUJINAMI K, IKEDA I, MIURA T, KONDO I (1996)

Combination therapy with 5-fluorouracil (5-FU), cisplatin (CDDP) and interferon alpha-2b (IFN alpha-2b) for advanced renal cell carcinoma.

Gan To Kagaku Ryoho 23: 1689-1691

GAMELIN E, MERTINS SD, REGIS JT, MICKLEY L, ABATI A, WORRELL RA, LINEHAN WM, BATES SE (1999)

Intrinsic drug resistance in primary and metastatic renal cell carcinoma.

J. Urol. 162: 217-224

GENNE P, DUCHAMP O, SOLARY E, MAGNETTE J, BELON JP, CHAUFFERT B (1995)

Cinchonin per os: efficient circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance

Anticancer Drugs 10: 103-118

- GOTTESMAN MM, HRYCYNA CA, SCHOENLEIN PV, GERMAN UA, PASTAN I (1995)
Genetic analysis of the multidrug transporter.
Ann. Rev. Genet. 29: 607-649
- GOW CB, PHILLIPS PA (1994)
Epidermal growth factor as a diuretic in sheep.
J. Physiol. 477: 27-33
- HÄNNINEN EL, KIRCHNER H, ATZPODIEN J (1996)
Interleukin-2 based home therapy of metastatic renal cell carcinoma, risks and benefits in 215 consecutive simple institution patients.
J. Urol. 155: 19-25
- HARRIS RC (1991)
Potential physiologic roles for epidermal growth factor in the kidney.
Am. J. Kidney Dis. 17: 627-630
- HARTMANN JT, BOKEMEYER, C (1999)
Chemotherapy for renal cell carcinoma.
Anticancer Res. 19: 1541-1543
- HARTUNG G, STEHLE G, SINN H, WUNDER A, SCHRENK HH, HEEGER S, KRANZLE M, EDLER L, FREI E, FIEBIG HH, HEENE DL, MAIER-BORST W, QUEISSER W (1999)
Phase I trial of methotrexate-albumin in a weekly intravenous bolus regime in cancer patients. Phase I Study Group of the Association for Medical Oncology of the German Cancer Society.
Clinic Cancer Res 5: 753-759
- HERMANEK P, SCHROTT KM (1990)
Evaluation of the new tumor, nodes and metastases classification of renal cell carcinoma.
J. Urol. 144: 238-242
- HJELLE JT, BAURAIN R, MASQUELIER M, TROUET A (1984)
Cellular pharmacology of amino acid derivates of daunorubicin and doxorubicin in suspension of renal proximal tubules.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 229: 372-380
- HOFFMEISTER H (1987)
Bevölkerungsbezogene Krebsregister in der Bundesrepublik Deutschland.
BGA-Schriften 2/87
- HONSCHA W, DOTSCHE KU, THOMSEN N, PETZINGER E (2000)
Cloning and functional characterization of the bile acid-sensitive methotrexate carrier from rat liver cells.
Hepatology. 1296-304

- HONSCHA W, PETZINGER E (1999)
Characterization of the bile acid sensitive methotrexate carrier of rat liver cells.
Arch. Pharmacol. 359: 411-419
- HSIANG YH, HERTZBERG R, HECHT S, LIU LF (1985)
Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I.
J. Biol. Chem. 260: 14873-14878
- JACKMAN AL, FARRUGIA DC, GIBSON W, KIMBELL R, HARRAP KR, STEPHENS TC, AZAB M, BOYLE FT (1995a)
ZD 1694 (Tomudex): A new thymidylate synthase inhibitor with activity in colorectal cancer.
Eur. J. Cancer 31A: 1277-1282
- JACKMAN AL, KELLAND LR, KIMBELL R, BROWN M, GIBSON W, AHERNE GW, HARDCASTLE A, BOYLE FT (1995b)
Mechanisms of acquired resistance to the quinazoline thymidylate synthase inhibitor ZD1694 (Tomudex) in one mouse and three human cell lines.
Br. J. Cancer 71: 914-924
- JENNINGS AS, FERGUSON DC (1984)
Effect of dexamethasone on triiodothyronine production in the perfused rat liver and kidney.
Endocrinol. 114: 31-36
- JUNKER K, MORAVEK P, PODHOLA M, WEIRICH G, HINDERMANN W, JANITZKY V, SCHUBERT J (2000)
Genetic alterations in metastatic renal cell carcinoma detected by comparative genomic hybridization: correlation with clinical and histological data.
Int. J. Oncol. 17: 903-908
- KAMEN BA, CAPDEVILA A (1986)
Receptor-mediated folate accumulation is regulated by the cellular folate content.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 5983-5987
- KATE RE, TOZER RN, SORBY DL (1976)
Increased methotrexate toxicity due to concurrent probenecid administration.
Biochem. Pharmacol. 25: 1485-1488
- KAWABATA S, OKA M, SHIOZAWA K, TSUKAMOTO K, NAKATOMI K, SODA H, FUKUDA M, IKEGAMI Y, SUGAHARA K, YAMADA Y, KAMIHIRA S, DOYLE LA, ROSS DD, KOHNO S (2001)
Breast cancer resistance protein directly confers SN-38 resistance of lung cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280: 1216-1223
- KINNE RK (1991)
Selectivity and direction: plasma membranes in renal transport.
Am. J. Physiol. 260: F153-F162

- KITAMURA Y, WATANABE M, KOMATSUBARA S, SAKATA Y (1995)
Renal cell carcinoma with regional lymph node metastasis.
Hinyokika Kyo 41: 433-438
- KLEIN LE, HISAO P, BARTOLOMEI M, LO CS (1984)
Regulation of rat renal (Na⁺-K⁺)-adenosine triphosphatase activity by triiodothyronine and corticosterone.
Endocrinol. 115: 1038-1042
- KOEPSSELL H (1998)
Organic cation transporters in intestine, kidney, liver, and brain.
Ann. Rev. Physiol. 60: 243-266
- KOOL M, VAN DER LINDEN M, DE HAAS M, SCHEFFER GL, DE VREE JM, SMITH AJ, JANSEN G, PETERS GJ, PONNE N, SCHEPER RJ, ELFERINK RP, BAAS F, BORST P (1999)
MRP3, an organic anion transporter able to transport anticancer-drugs.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 6914-6919
- KRONING R, KATZ D, LICHTENSTEIN AK, NAGAMI GT (1999)
Differential effects of cisplatin in proximal and distal renal tubule epithelial cell lines.
Br. J. Cancer 79: 293-299
- LANNING CL, FINE RL, SACHS CW, RAO US, CORCORAN JJ, ABOU DONIA MB (1996)
Chlorpyrifos oxon interacts with the mammalian multidrug resistance protein, P-glycoprotein.
J. Tox. Environ. Health 47: 395-407
- LATHAN E, PHREUNSCUH M, DIEHL V (1991)
Leukämie.
In: Innere Medizin. Hrsg.: CLASSEN M, DIEHL V, KOCHSIEK K, Urban & Schwarzenberg, München: S. 151-162
- LAW TM, ILSON DH, MOTZER RJ (1994)
Phase II trial of topotecan in patients with advanced renal cell carcinoma.
Invest New Drugs 1: 143-145
- LEIER I, JEDLITSCHKY G, BUCHHOLZ U, CENTER M, COLE SP, DEELEY RG, KEPPLER D (1996)
ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump.
Biochem. J. 314: 433-437
- LEIER I, HUMMEL-EISENBEISS J, CUI Y, KEPPLER D (2000)
ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2.
Kidney Int. 57: 1636-1642

- LILLY MB, OMURA GA (1985)
Clinical pharmacology of oral intermediate-dose methotrexate with or without probenecid.
Cancer Chemother. Pharmacol. 15: 220-222
- LOOS WJ, STOTER G, VERWEIJ J, SCHELLENS JHM (1996)
Sensitive high-performance liquid chromatographic fluorescence assay for the quantitation of topotecan (SKF 104864-A) and its lactone ring-opened product (hydroxy-acid) in human plasma and urine.
J. Chromatography B 678: 309-315
- LUM BL, GOSLAND MP (1995)
MDR expression in normal tissues. Pharmacologic implications for the clinical use of P-glycoprotein inhibitors.
Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 9: 319-336
- MA J, MALIEPAARD M, NOOTER K, LOOS WJ, KOLKER HJ, VERWEIJ J, STOTER G, SCHELLENS JHM (1998a)
Reduced cellular accumulation of topotecan: a novel mechanism of resistance in a human ovarian cancer cell line.
Br. J. Cancer 77: 1645-1652
- MA J, MALIEPAARD M, KOLKER HJ, VERWEIJ J, SCHELLENS JHM (1998b)
Abrogated energy-dependent uptake of cisplatin in a cisplatin-resistant subline of the human ovarian cancer line IGROV-1.
Cancer Chemother. Pharmacol. 41: 186-192
- MAGNAN SDJ, SHIROTA FN, NAGASAWA HAT (1982)
Drug latentiation by γ -glutamyl transpeptidase.
J. Med. Chem. 25: 1018-1021
- MASEREEUW R, TERLOUW SA, VAN AUBEL RA, RUSSEL FG, MILLER DS (2000)
Endothelin B receptor-mediated regulation of ATP-driven drug secretion in renal proximal tubule.
Molec. Pharmacol. 57: 59-67
- MASUDA S (2000)
Tubular localization and drug recognition of kidney-specific organic anion transporters, OAT-K1 and OAT-K2.
Yakugaku Zasshi 120: 275-281
- MASUDA S, IBARAMOTO K, TAKEUCHI A, SAITO H, HASHIMOTO Y, INUI K (1999a)
Cloning and functional characterization of a new multispecific organic anion transporter, OAT-K2, in rat kidney.
Molec. Pharmacol. 55: 743-752

- MASUDA S, TAKEUCHI A, SAITO H, HASHIMOTO Y, INUI K (1999b)
Functional analysis of rat renal organic anion transporter OAT-K1: bidirectional methotrexate transport in apical membrane.
FEBS Lett. 459: 128-132
- MERKEL U, JURKUTAT S, SCHIMSKE A, FLECK C, HOFFMANN A (2001)
Determination of Topotecan in intact human renal tissue and in renal cell carcinoma for in vitro accumulation studies.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 363, R121-R121
- MICKISCH GH (1991)
Multidrug resistance.
Urologe (A) 35: 370-377
- MICKISCH GH (1994)
Chemoresistance of renal cell carcinoma: 1986-1994.
World J. Urol. 12: 214-223
- MICKISCH GH, BIER H, BERGLER W, BAK M, TSCHADA R, ALKEN P (1990a)
P-170 glycoprotein, glutathione and associated enzymes in relation to chemoresistance of primary human renal cell carcinomas.
Urol. Int. 45: 170-176
- MICKISCH GH; FAJTA S; KEILHAUER G; SCHLICK E; TSCHADA R; ALKEN P (1990b)
Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT).
Urol. Res. 18: 131-136
- MICKISCH GH, KOSSIG J, KEILHAUER G, SCHLICK E, TSCHADA RK, ALKEN PM (1990c)
Effects of calcium antagonists in multidrug resistance primary human RCC.
Cancer Res. 50: 3670-3674
- MICKISCH GH, ROEHRICH K, KOESSIG J, FORSTER S, TSCHADA R, ALKEN PM (1990d)
Mechanisms and modulation of multidrug resistance in primary human renal cell carcinoma.
J. Urol. 144: 755-759
- MICKISCH GH, FAJTA S, BIER H, TSCHADA R, ALKEN P (1991a)
Cross-resistance patterns related to glutathione metabolism in primary human renal cell carcinoma.
Urol. Res. 19: 99-103
- MICKISCH GH, MERLINO GT, AIKEN PM, GOTTESMAN MM, PASTAN I (1991b)
New potent verapamil derivatives that reverse multidrug resistance in human renal carcinoma cells and in transgenic mice expressing the human *mdr1* gene.
J. Urol. 146: 447-453

- MILLER DS, PRITCHARD JB (1997)
Dual pathways for organic anion secretion in renal proximal tubule.
J. Exp. Zool. 279: 462-470
- MORAN RD, COLMAN PD, ROSOWSKY A (1985)
Structural features of 4-amino folates required for substrate activity with mammalian foyllypolyglutamate synthetase.
Mol. Pharmacol. 27: 156-166
- MUNSHI CB, MI Z, BURKE TG (1995)
The biophysics underlying the favorable stability of the topotecan anticancer drug in human blood.
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 36: 444-445
- MUSUDA H, OZOLS RF, LAI GM, FOJO A, ROTHERBERG M, HAMILTON TC (1988)
Increased DNA repair as a mechanism of aquired resistance to cis-diamminedichloro-platinum(II) in human ovarian cell lines.
Cancer Res. 48: 5713-5715
- NAITO S, SAKAMOTO N, KOTOH S, GOTO K, MATSUMOTO T, KUMAZAWA J (1993)
Expression of p-glycoprotein and multidrug resistance in renal cell carcinoma.
Eur. Urol. 24: 156-160
- NEUMANN F, SCHENK B, SCHLEUSENER H, SCHWENKERT HU (1992)
Endokrinopharmakologie.
In: Pharmakologie und Toxikologie. Aufl. 6 Hrsg.: FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W, BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich: 528-579
- NISHIYAMA K, SHIRAHAMA T, YOSHIMURA A, SUMIZAWA T, FURUKAWA T, ICHIKAWA-HARAGUCHI M, AKIYAMA S, OHI Y (1993)
Expression of the multidrug transporter, P-glycoprotein, in renal and transitional cell carcinomas.
Cancer 71: 3611-3619
- NOOTER K, STOTER G (1996)
Molecular mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy.
Path. Res. Pract.192: 768-780
- NOOTER K, WESTERMAN AM, FLENS MJ, ZAMAN GJ, SCHEPER RJ, VAN WINGERDEN KE, BURGER H, OOSTRUM R, BOERSMA T, SONNEVELD P (1995)
Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in human cancers.
Clin. Cancer. Res. 1: 1301-1310
- NUSSBAUM RP (1994)
Einfluß einer Vorbehandlung mit Triiodthyronin bzw. Dexamethason auf die renale Ausscheidung von Aminosäuren bei gleichzeitiger Gabe mehrerer Aminosäuren.
Diplomarbeit, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät der Universität Jena

OBERG KC, CARPENTER G (1991)

Dexamethason and retinoic acid regulate the expression of epidermal growth factor receptor mRNA by distinct mechanisms.

J. Cell. Physiol. 149: 244-251

OKUDA M, TSUDA K, MASAKI K, HASHIMOTO Y, INUI K (1999)

Cisplatin-induced toxicity in LLC-PK1 kidney epithelial cells: role of basolateral membrane transport.

Toxicol. Lett. 106: 229-235

OHMORI T, NISHIO K, OHTA S, KUBOTA N, ADACHI M, KOMIYA K, SAIJO N (1994)

Ouabain-resistant non-small-cell-lung-cancer cell line shows collateral sensitivity to Cis-diamminedichloroplatinum (CDDP).

Int. J. Cancer 57: 111-116

PORTA C, PASSALACQUA C, CAMINITI C, CENGARLE R, POTENZONI D, CAMISA R, PAVONE L, BIDIN L, FRASSASOLDATI A, CONTU A, BUZIO C (2001)

Chronic low-dose s.c. interleucin-2 (IL-2) and α -interferon (α -IFN) in advanced renal cell carcinoma (ARCC): preliminary efficacy results of an Italian oncology group for clinical research (GOIRC) trail.

Poster, Second International Kidney Cancer Symposium 26.-28.10.01 Chicago, USA

PUNT CJ, VOEST EE, TUENI E, VAN OOSTEROM AT, BACKX A, DE MULDER PH, HECQUET B, LUCAS C, GERARD B, BLEIBERG H (1997)

Phase Ib study of doxorubicin in combination with the multidrug resistance reversing agent S9788 in advanced colorectal and renal cell cancer.

Br. J. Cancer 76: 1376-1381

RABINDRAN SK, HE H, SINGH M, BROWN E,L COLLINS KI, ANNABLE T, GREENBERGER LM (1998)

Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C.

Cancer Res. 58: 5850-5858

RACUSEN LC, MONTEIL C, SGRIGNOLI A, LUCSKAY M, MAROUILLAT S, RHIM JG, MORIN JP (1997)

Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines.

J. Lab. Clin. Med. 129: 318-329

RIEDE UN (1989)

Uropoetisches System. Nierentumoren

In: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4. Aufl., Hrsg.: RIEDE UN, SCHAEFER HE, WEHNER H, Thieme, Stuttgart: S. 752-755

RINI BI, VOGELZANG NJ, DUMAS MC, WADE JL, TABER DA, STADLER WM (2000)

Phase II trial of weekly intravenous gemcitabine with continuous infusion of fluorouracil in patients with metastatic renal cell cancer.

J. Clin. Oncol. 18: 2419-2426

- ROBERTS J (1983)
Cisplatin.
In: CHABNER BA, PINEDO HM: The Cancer Pharmacology.
Ann. Excerpta Medica: S. 95-117
- ROCHLITZ CF, LOBECK H, PETER S, REUTER J, MOHR B, DE KANT E, HUHN D, HERRMANN R (1992)
Multiple drug resistance gene expression in human renal cell cancer is associated with the histologic subtype.
Cancer 69: 2993-2998
- ROWINSKY EK, VERWEIJ J (1997)
Review of phase I clinical studies with topotecan.
Semin. Oncol. 24: 20-23
- SAFIRSTEIN R, WINSTON J, GOLDSTEIN M, MOEL D, DIKMAN S, GUTTENPLAN J (1986)
Cisplatin nephrotoxicity.
Am. J. Kidney Dis. 8: 356-367
- SAITO H, MASUDA S, INUI K (1996)
Cloning and functional characterization of a novel rat organic anion transporter mediating basolateral uptake of methotrexate in the kidney.
J. Biol. Chem. 271: 20719-20725
- SCHAUB TP, KARTENBECK J, KONIG J, SPRING H, DORSAM J, STAEBLER G, STORKEL S, THON WF, KEPPLER D (1999)
Expression of the MRP2 gene-encoded conjugate export pump in human kidney proximal tubules and in renal cell carcinoma.
J. Am. Soc. Nephrol. 10: 1159-1169
- SCHELLENS JH, MALIEPAARD M, SCHEPER RJ, SCHEFFER GL, JONKER JW, SMITH JW, BEIJNEN JH, SCHINKEL AH (2000)
Transport of topoisomerase I inhibitors by the breast cancer resistance protein. Potential clinical implications.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 92: 188-194
- SCHEPP W (1994)
Peptisches Ulkus.
In: Innere Medizin. Hrsg.: CLASSEN M, DIEHL V, KOCHSIEK K, Urban & Schwarzenberg, München: S. 548-562
- SCHINKEL, A H, MOL CA, WAGENAAR E, VAN DEEMTER L, SMIT JJ, BORST P (1995)
Multidrug resistance and the role of P-glycoprotein knockout mice.
Eur. J. Cancer : 1295-1298

- SERRE E, VILLARD PH, HEVER A, GUIGAL N, PUYOOU F, CHARVET B, POINT SCOMMA H, LECHEVALIER E, LACARELLE B, BARRA Y (1998)
Modulation of MDR1 and CYP3A expression by dexamethasone: evidence for an inverse regulation in adrenals.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 252: 392-395
- SHAMASH J, STEELE JPC, WILSON P, NYSTROM M, ANSELL W, OLIVER RTD (2001)
IPM chemotherapy in cytokine-refractory renal cell carcinoma (RCC).
Vortrag 2nd Int. Kidney Cancer Symp. Chicago, 26.-28.10. 2001
- SIKIC BI, FISHER GA, HALSEY J, BEKETIC-ORESKOVIC L, CHEN G (1997)
Modulation and prevention of multidrug resistance by inhibitors of P-glycoprotein.
Cancer Chemother. Pharmacol. 40: 13-19
- STOPP M, BRÄUNLICH H (1974)
Optimale, altersgerechte Inkubationsbedingungen für die Akkumulation von p-Aminohippursäure (PAH) in Nierenrindenschnitten verschieden alter Wistarratten (Uje: WIST).
Z. Versuchstierkd. 16: 131-141
- STOPP M, BRÄUNLICH H (1975)
Die Akkumulation von p-Aminohippursäure und Zyklopentiazid in Nierenrindenschnitten verschieden alter Ratten und ihre Abhängigkeit von der Energiebereitstellung.
Acta biol. med. germ. 34: 89-98
- STRAUB E (1976)
Effects of L-thyroxine in acute renal failure.
Res. Exp. Med. Berl. 168: 81-87
- SUSUMU O, KAORU T, HIROAKI F, YASUSHI A (1999)
The effect of cis-Diamminedichloroplatinum II on Na⁺ and K⁺ transport in the rabbit cortical collecting duct.
Eur. J. Pharmacol. 378: 63-68
- TAKEMURA Y, JACKMAN AL (1997)
Folate-based thymidylate synthase inhibitors in cancer chemotherapy.
Anticancer Drugs 8: 3-16
- TAKIMOTO CH, ALLEGRA CJ (1995)
New antifolates in clinical development.
Oncology Huntingt. 9: 649-656
- TAMAKI M, MAEDAS, IWATA H, YAMAMOTO N, KURIYAMA M, BAN Y, KAWADA Y (1995)
A case of lung metastasis from renal cell carcinoma showing complete response by a combination chemotherapy with methotrexate, vinblastine and bleomycin (MVP).
Hinyokika Kiyo 41: 205-207

TOBE SW, NOBLE-TOPHAM SE, ANDRULIS IL, HARTWICK RW, SKORECKI KL, WARNER E (1995)

Expression of the multidrug resistance gene in human renal cell carcinoma depends on tumor histology, grade, and stage.
Clin. Cancer Res. 1: 1611-1615

TOFFOLI G, CORONA G, TOLUSSO B, SARTOR F, SORIO R, MINI E, BOIOCCHI M (2000)

Resistance to methotrexate in SKOV-3 cell lines after chronic exposure to carbamazepine is associated with a decreased expression of folate receptor.
Int. J. Cancer 85: 683-690

TOUROUTOGLOU N, PAZDUR R (1996)

Thymidylate synthase inhibitors.
Clin. Cancer Res. 2: 227-243

TUOMELA T, MIETTINEN P, PESONEN K, VIINIKKA L, PERHEENTUBAJ (1990)

Epidermal growth factor in mice: effects of estradiol, testosterone and dexamethasone.
Acta Endocrinol. Copenh. 123: 211-217

ULLRICH KJ (1999)

Affinity of drugs to the different renal transporters for organic anions and organic cations. In situ K_i values.

In: Membrane transporters as drug targets. Hrsg.: AMIDON GL, SADEE W, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, S. 159-179

VOLM M, POMERENKE E, EFFERTH T, LOEHRKE H, MATTERN J (1991)

Circumvention of multidrug resistance in human kidney and kidney carcinoma in vitro
Cancer 67: 2484-2489

WADA T, HOUJOU T, KUBO R, YASUTOMI M, KURITA T (1993)

A combined chemo-endocrine treatment with tegafur, adriamycin, methotrexate and tamoxifen for advanced renal cell carcinoma.
Anticancer Res. 13: 2465-2467

WALKER AM, OLIVER J (1941)

Am. J. Physiol. 134: 526-527

WARDEN DH, STOKES JB (1993)

EGF and PGE₂ inhibit rabbit CCD Na⁺ transport by different mechanisms: PGE₂ inhibits Na⁺-K⁺ pump.
Am. J. Physiol. 264: F670-F677

WESTERHOF GR, RIJNBOUTT S, SCHORNAGEL JH, PINEDO HM, PETERS GJ, JANSEN G (1995)

Functional activity of the reduced folate carrier in KB, MA104, and IGROV-I cells expressing folat-binding protein.
Cancer Res. 55: 3795-3802

WHETSTINE JR, GIFFORD AJ, WITT T, LIU XY, FLATLEY RM, NORRIS M, HABER M, TAUB JW, RAVINDRANATH Y, MATHERLY LH (2001)

Single nucleotide polymorphisms in the human reduced folate carrier: characterization of a high-frequency G/A variant at position 80 and transport properties of the His(27) and Arg(27) carriers.

Clin. Cancer Res. 7: 3416-3422

WILLIAMS PD, HOTTENDORF GH (1985)

Effect of cisplatin on organic ion transport in membrane vesicles from rat kidney cortex.

Cancer Treat. Rep. 69: 875-880

WINNEFELD K, SCHRÖTER H, STRECH S (1992)

Mitteilungen aus dem Applikationslabor Carl Zeiss Jena GmbH.

AAS 6/92

YAMADA T, TERADA Y, HOMMA MK, NONOGUCHI H, SASAKI S, YUASA Y, TOMITA K, MARUMO F (1995)

AVP inhibits EGF-stimulated MAP kinase cascade in Madin-Darby canine cells.

Kidney Int. 48: 745-752

YAMAMOTO K (1985)

Steroid receptor regulated transcription of specific genes networks.

Ann. Rev. Genet. 19: 209-252

YOUNG RC (1998)

Metastatic renal cell carcinoma: What induces occasional dramatic regressions?

N. Engl. J. Med. 338: 1305-1306

YU DS, SUN GH, MA CP, CHANG SY(1999)

Cocktail modulator mixtures for overcoming multidrug resistance in renal cell carcinoma.

Urology 54: 377-381

ZAMBONI WC, HOUGHTON PJ, JOHNSON RK, HULSTEIN JL, CROM WR, CHESHIRE PJ, HANNA SK, RICHMOND LB, LUO X, STEWART CF (1998)

Probenecid alters topotecan systemic and renal disposition by inhibiting renal tubular secretion.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 284: 89-94

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erklären wir, daß uns die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,

wir die Dissertation selbst angefertigt haben und alle von uns benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in unserer Arbeit angegeben sind,

uns folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Christian Fleck,
MTA Frau Annegret Berthold,
MTA Frau Hannelore Prager,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von uns für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß wir die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht haben und

daß wir die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht haben.

Folgende Abschnitte entstanden in Verantwortung von:

1. Einleitung:	Andreas Schimske
2. Material und Methoden:	Steffen Jurkutat
3. Ergebnisse Methotrexat/ Tomudex [®] :	Andreas Schimske
Cisplatin/Topotecan:	Steffen Jurkutat
4. Diskussion Methotrexat/ Tomudex [®] :	Andreas Schimske
Cisplatin/Topotecan:	Steffen Jurkutat

Die nicht erwähnten Abschnitte wurden von beiden Autoren gemeinsam erarbeitet.

Jena, Juni 2002

Steffen Jurkutat

Andreas Schimske

Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ch. Fleck für die fachliche Anleitung bei der Durchführung der Versuche sowie für die intensive Betreuung und zahlreichen Anregungen beim Schreiben der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. J. Schubert danken wir für die Bereitstellung des menschlichen Nierengewebes und die gute Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Urologischen Klinik.

Frau A. Berthold und Frau H. Prager danken wir für die wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Nicht zuletzt möchten wir auch unseren Familien und Freunden für ihr Verständnis und ihre Nachsicht danken, wenn wir ihnen Zeit und Zuwendung entzogen haben, die statt ihnen der Anfertigung dieser Arbeit zugekommen ist.

Jena, Juni 2002

Steffen Jurkutat

Andreas Schimske