

Inhalt

1. Einleitung	11
2. Literaturübersicht	12
2.1 Large Granular Lymphocytes	12
2.2. Lymphome	12
2.2.1. Feline Lymphome	13
2.3. Large Granular Lymphocyte-Lymphom	13
2.3.1. Humanes LGL-Lymphom	14
2.3.2. Felines LGL-Lymphom	14
2.3.3. Zelllinien feline LGL-Lymphome	15
2.4. Therapie feline Lymphome	17
2.4.1 Chemotherapie feline Lymphome	17
2.4.2 Andere Therapieverfahren	22
2.5. Chemotherapie des feline LGL-Lymphoms	23
2.6. Verwendete chemotherapeutische Wirkstoffe	26
2.6.1. Vincristin	26
2.6.2. Doxorubicin	26
2.6.3 Cyclophosphamid	27
2.6.4. Prednisolon	28
2.6.5. Methotrexat	29
2.6.6. L-Asparaginase	29
2.7. Chemotherapieresistenz	31
2.7.1. ATP-Binding-Cassette-Familie	32
2.7.1.1. P-Glykoprotein/MDR-1-Protein	32
2.7.1.2. Broad substrate specificity ATP-binding cassette transporter ABCG2	33
2.7.2. MDR-Inhibitoren	34
2.8. Chemosensitivitäts-Assays in vitro	35

2.8.1. Chemosensitivitäts-Untersuchungen feline Zelllinien	36
2.9. Kanzerogene, mutagene und reprotoxische Substanzen.....	37
2.9.1. Arbeitssicherheit.....	38
2.9.2. Europäische und nationale Rechtslage in der Bundesrepublik Deutschland.....	41
2.9.4 Weitere Normen und Richtlinien.....	45
3. Material und Methoden	47
3.1 Zellkulturtechnik	47
3.1.1 Medien und Zusätze	47
3.1.2 Zellkultivierung	47
3.1.3 Trypanblau-Ausschlussfärbung.....	48
3.1.4 Kryokonservierung von Zellen.....	48
3.1.5 Auftauen von Zellen.....	49
3.1.6 Wachstumskurve/Populationsverdopplungszeit	50
3.2 Vorarbeiten für die Zytotoxizitätsassays	51
3.2.1 Größenbestimmung der S87-Zellen.....	51
3.2.2 Einfluss der Häufigkeit des Mediumswechsels auf das Zellwachstum	51
3.2.3 Arbeitssicherheits-relevante Aspekte im Umgang mit CMR-Stoffen und deren praktische Umsetzung.....	52
3.2.4 Wischproben.....	57
3.2.5 Wachstumskurven in der Chemo-Box.....	58
3.2.6 Chemosensitivitäts-Assay für DMSO (Dimethylsulfoxid).....	58
3.3 Chemosensitivitäts-Assays	61
3.3.1 Ablauf der Chemosensitivitäts-Assays – allgemein	61
3.3.2 Plattenbelegung	63
3.3.3 Arbeitsplan in der Übersicht.....	63
3.3.4 Vincristin	64
3.3.5 Doxorubicin.....	64
3.3.6 4-Hydroperoxycyclophosphamid	64
3.3.7 Prednisolon.....	64

3.3.8 Methotrexat	65
3.3.9 L-Asparaginase.....	65
3.4 Chemosensitivitätsassays unter der Verwendung von Elacridar	66
3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse der Chemosensitivitäts-Assays.....	67
3.6 Bestimmung des IC ₅₀	68
4. Ergebnisse	69
4.1 Wachstumseigenschaften in Zellkultur	69
4.1.1 Wachstumskurve und -eigenschaften	69
4.2 Vorarbeiten für die Chemosensitivitätsassays	71
4.2.1 Größenbestimmung der LGL	71
4.2.2 Einfluss der Häufigkeit des Mediumwechsels auf das Zellwachstum	73
4.2.3 Arbeitssicherheits-relevante Aspekte im Umgang mit CMR-Stoffen und deren praktische Umsetzung.....	74
4.2.4 Vergleich des Zellwachstums in der Chemo-Box	76
4.2.5 Chemosensitivitäts-Assay für DMSO (Dimethylsulfoxid).....	77
4.2.6 Löslichkeit von Prednisolon	79
4.3 Chemosensitivitäts-Assays mit CMR-Stoffen.....	81
4.3.1 Allgemeines.....	81
4.3.2 Vincristin	82
4.3.3 Doxorubicin.....	84
4.3.4 4-Hydroperoxycyclophosphamid	86
4.3.5 Prednisolon	88
4.3.6 Methotrexat	90
4.3.7 L-Asparaginase.....	92
4.4 Chemosensitivitätsassays unter der Verwendung von Elacridar	94
4.4.1 Vincristin + Elacridar	94
4.4.2 Doxorubicin + Elacridar	97
4.5 Signifikanzniveaus der Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse	100
4.6 Ermittlung der IC ₅₀ -Werte	102

4.6.1 Berechnung und grafische Darstellung der Schätzfunktionen.....	102
4.6.2 IC ₅₀ -Werte	111
5. Diskussion	113
5.1 Durchführung von Arbeiten mit CMR-Stoffen in der Zellkultur und Vorarbeiten zur Erstellung eines Versuchsprotokolls	113
5.2 Chemosensitivitäts-Assays als Tool in der veterinärmedizinischen Onkologie.....	117
5.3 Chemosensitivität feline Tumorzelllinien	117
5.4 Chemosensitivität beim feline LGL-Lymphom	119
5.5 Einordnung der Ergebnisse der Chemosensitivitätsassays für S87	121
5.5.1 Vincristin	121
5.5.2 Doxorubicin.....	123
5.5.3 4-Hydroperoxycyclophosphamid	124
5.5.4 Prednisolon	125
5.5.5 Methotrexat	126
5.5.6 L-Asparaginase.....	127
5.6 Übertragbarkeit auf die Klinik.....	128
5.7 Chemosensitivitätsassays mit Elacridar – Ein Ausblick zur Chemotherapieresistenz .	131
6. Zusammenfassung.....	133
6. Summary	134
7. Literaturverzeichnis:.....	135
8. Anhang	149
8.1 Tabellen	149
8.1.1 Messwerte des Chemosensitivitätsassays für DMSO.....	149
8.1.2 Messwerte des Chemosensitivitäts-Assays für Prednisolon mit Ethanol als Lösemittel....	162
8.1.3 Messwerte der Chemosensitivitäts-Assays für Vincristin, Doxorubicin, 4-Hydroperoxycyclophosphamid, Prednisolon, Methotrexat, L-Asparaginase, Vincristin und Elacridar, Doxorubicin und Elacridar.....	171
8.1.4 Daten der Kurvenanpassung der Schätzfunktionen.....	172
8.1.5 Literaturabgaben zur <i>In-vitro</i> -Chemotherapie feline Zelllinien.....	174

8.2 Step-by-Step-Protokoll zur Minimierung des Kontaminationsrisikos beim Arbeiten mit CMR-Stoffen	176
8.3 Lösungen, Puffer und Bezugsquellen	179
8.3.1. Bezugsquellen für Chemikalien, Seren und Geräte	179
8.3.2. Bezugsquellen für Geräte und Verbrauchsmaterialien	181
8.3.3. Lösungen und Puffer:	185
9. Abkürzungsverzeichnis	186