

**Bestimmung der Sensitivität von Ovarialkarzinomen gegenüber
Zytostatika:**

**Ein Vergleich von durchflußzytometrischer Apoptosebestimmung
mittels Propidiumjodid-Färbung und ATP-Tumorchemosensitivitäts-
Assay**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

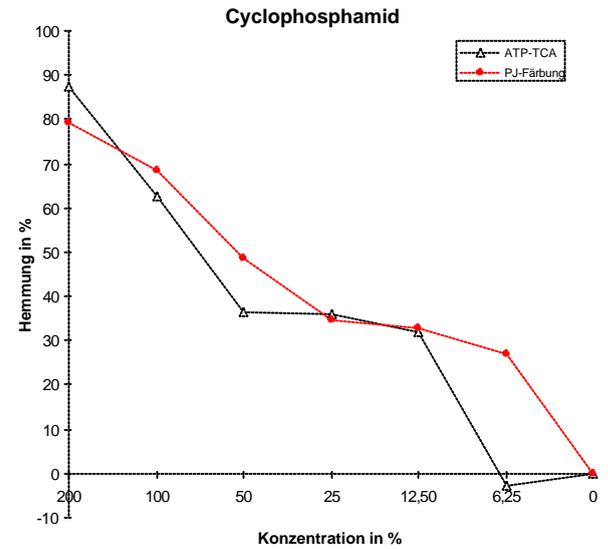
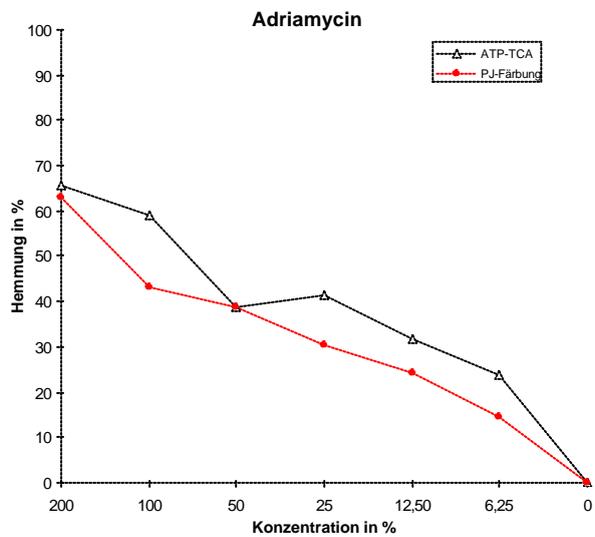
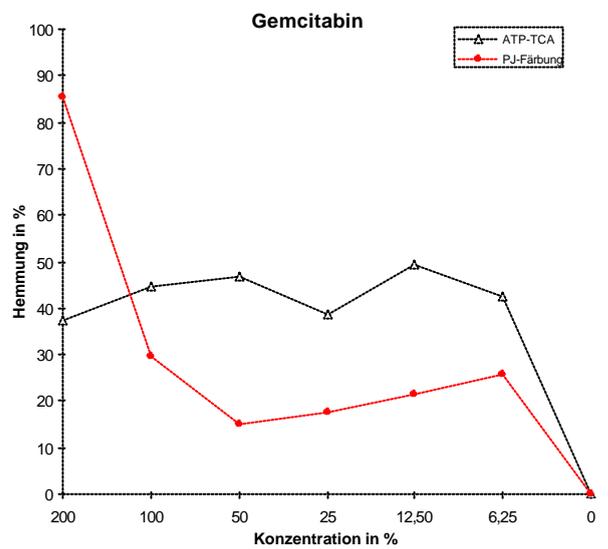
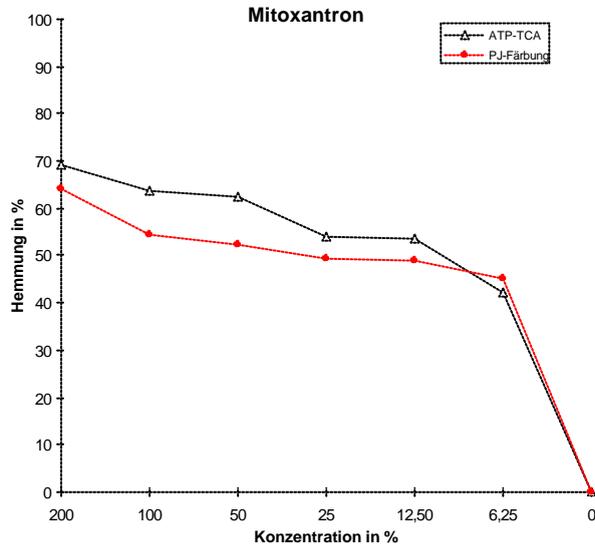
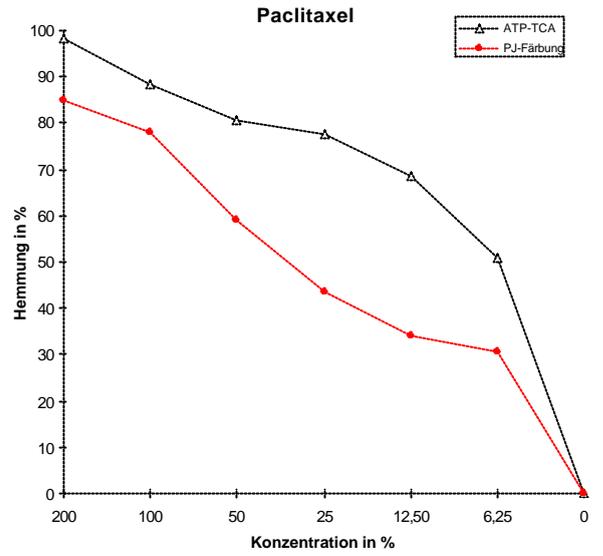
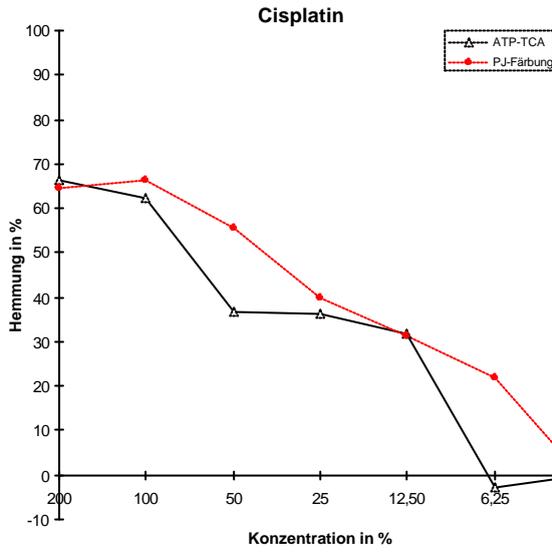
Léonie Zimmermann

aus

Köln

Bonn 2005

Patientin G.T.: Probe: Primäres Ovarialkarzinom, Gewebe; Alter bei O.P.: 56 Jahre



Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. B. Wiedemann
2. Referent: Prof. Dr. C.M. Kurbacher

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1996 bis März 2002 unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Schlebusch in der Abteilung Klinische Chemie & Tumorimmunologie der Frauenklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. B. Wiedemann möchte ich für die Übernahme des Referats und die ebenso freundliche wie geduldige Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit danken.

Meinem Co-Referenten Herrn PD Dr. C.M. Kurbacher möchte ich vielmals für die freundliche und zielführende fachliche Beratung, sowie die Unterstützung bei der Beendigung meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. H. Schlebusch sowie Herrn Prof. Dr. D. Krebs möchte ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der erforderlichen Mittel danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Roswitha Klasen für ihr unglaubliches persönliches Engagement. Ihre Mithilfe sowohl mit Rat als auch mit Tat - namentlich die Erstellung der TCAs - hat maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau Kohlhagen von der Universitäts-Frauenklinik in Köln möchte ich mich ebenfalls für fachlich beratende wie vermittelnde Hilfe bei meiner Arbeit bedanken.

Danken möchte ich außerdem aus dem Institut für klinische Chemie der Universitätskliniken Bonn Herrn Dr. Dr. A. v. Rücker für seine fachliche Beratung sowie auch Frau Alexandra Breuer für ihre praktische Unterstützung am FACS.

Bei Frau Dr. Silke Reinartz möchte ich mich für die Korrekturlesung des technischen Teils meiner Arbeit bedanken sowie für einige wichtige Ratschläge.

Meinen Eltern möchte ich danken, dass sie auf so vielfältige Weise die Unterstützung gewährt haben, die mich überhaupt an diesen Punkt geführt hat.

Bei Peter Zimmermann möchte ich mich für die viele computertechnische Hilfe, sowie geduldiges, konstruktives Korrekturlesen und ebenso viel endloses Zuhören während der gesamten Dauer dieser Arbeit bedanken.

Bonn im Juni 2002

Für Benno und Peter

„Für den Kranken ist das Wenigste das Beste“
(Hippokrates)

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	11
I.1	Resistenzen in der Tumorthherapie	11
I.1.1	Tumorentwicklung	12
I.1.2	Multi drug resistance	14
I.2	Das Ovarialkarzinom.....	17
I.2.1	Eigenschaften	17
I.2.2	Inzidenz	17
I.2.3	Entstehung	17
I.2.4	Diagnose	18
I.2.5	Staging	19
I.3	Therapiemaßnahmen	20
I.3.1	Operative Maßnahmen	20
I.3.2	Zytostatikatherapie: Einsatz und Kombinationen	21
I.3.3	Aktuelle Kombinationstherapie	22
I.3.4	Standardtherapieschemata	23
I.3.4.1	Primärtherapie	23
I.3.4.2	Rezidivtherapie	24
I.3.5	Übersicht über im Test verwendete Zytostatika /Gruppen.....	25
I.3.5.1	Alkylantien:	25
I.3.5.2	Antimetabolite:.....	28
I.3.5.3	Zytostatisch wirkende bzw. interkalierende Antibiotika:.....	29
I.3.5.4	Mitosehemmstoffe:.....	31
I.4	Individualisierung der Chemotherapie	33
I.4.1	Notwendigkeit der Bestimmung von Tumoreigenschaften vor der Chemotherapie/ Möglichkeiten und Grenzen.....	33
I.5	In- vitro-Testsysteme zur Bestimmung der Chemosensibilität	35
I.5.1	Allgemeines zur Messung der Chemosensibilität mit In-vitro- Assays/ Auswahl der Methode	35
I.5.2	Übersicht Chemosensibilitätstests	35
I.5.2.1	DiSC (differential staining cytotoxicity)	35
I.5.2.2	MTT-Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolinum bromide	36
I.5.2.3	HDRA (histoculture drug response assay)	36
I.5.3	Auswahl des ATP-TCA.....	37
I.5.3.1	Testprinzip	37
I.5.3.2	Auswertung.....	38
I.6	Methoden zur Apoptosemessung	39
I.6.1	Allgemeines zur Apoptose	39
I.6.2	Der Mechanismus der Apoptose	39
I.6.3	Apoptosemessung mittels FACS/ Auswahl der PJ-Messung nach Nicoletti ..	42
I.6.4	Testprinzip	44
I.7	Zielsetzung der Arbeit	45
II.	Material und Methoden	46
II.1	Geräteliste	46
II.2	Chemikalienliste	48
II.3	Weitere Materialien.....	49

II.4	Herkunft der Tumorzellen für Versuchsreihen.....	50
II.4.1	Kulturbedingungen.....	50
II.4.1.1	Wachstumsbedingungen.....	50
II.4.2	Kulturmedien.....	50
II.5	Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials für beide Testmethoden.....	51
II.5.1	Aufarbeitung soliden Tumormaterials.....	51
II.5.2	Präparation der Zellsuspension.....	51
II.5.3	Plattierung und Inkubation der Tumorzellen.....	52
II.5.3.1	Plattierungsschema der Tumorzellen für ATP-TCA.....	53
II.5.3.2	Plattierungsschema der Tumorzellen für PJ-Färbung	54
II.5.4	Zytostatika	55
II.5.5	Verdünnungen/ Plasmaspiegelentsprechungen.....	55
II.6	ATP-TCA.....	57
II.6.1	Extraktion und Messung.....	57
II.6.2	ATP Standardkurve	57
II.6.3	Auswertung.....	59
II.6.4	Ausschluß	61
II.7	PJ-Färbung.....	62
II.7.1.1	Aufbau und Funktion des Durchflusszytometers	62
II.7.1.2	Einstellung und Auswertung	66
II.7.1.3	Einstellungen des Durchflusszytometers.....	67
II.7.1.4	Extraktion und Messung.....	69
II.7.1.5	Grundeinstellung:.....	70
II.7.1.6	Auswertung:	72
II.7.2	Bestimmung der Hemmwerte	75
II.7.3	Ausschluß	75
III.	Ergebnisse.....	77
III.1	Vergleich der Testsysteme ATP-TCA und PJ-Färbung	77
III.1.1	Vorversuche: Kulturzellen.....	77
III.1.1.1	Zeitabhängigkeit	77
III.1.1.2	ERGEBNIS für OVCAR 29- und SKOV 3 :.....	82
III.1.1.3	Streuung der Ergebnisse	82
III.1.2	Hauptversuche	87
III.1.2.1	Methodenvergeleich mit Ovarialkarzinom-Zelllinien.....	87
III.1.3	Versuche mit Patientenproben.....	105
III.1.4	Patientinnenbeispiele	106
III.1.4.1	Zeitabhängigkeit von Patientproben (Vorversuche).....	106
III.1.4.2	Patientenbeispiele	111
III.1.4.3	Reaktion von Patientenproben auf zwei Einzelsubstanzen und ihre Kombinationen.....	122
III.2	Auswertung Sensitivität/ Resistenz PJ-Färbung vs ATP-TCA	127
III.2.1	Bewertung der Einzelsubstanzen.....	128
III.2.1.1	I.Zellkulturen.....	128
III.2.1.2	Übersicht der Wirksamkeit nach Anzahl sensitiver Proben für drei Zelllinien	129
III.2.1.3	Patientinnen: Wirksamkeit nach AUC	130
III.2.2	Kombinationen.....	132
III.2.2.1	Zellkulturen	132

III.2.2.2	Kombinationsbehandlung bei Patientenproben.....	134
IV.	Diskussion.....	136
IV.1	Vergleichende Diskussion der Methoden.....	136
IV.2	Vergleich der Ergebnisse von Ovarialkarzinom-Zelllinien und Tumorzellen aus Patientenproben.....	139
IV.3	Vergleich der Ergebnisse ATP-TCA vs PJ-Färbung.....	140
IV.4	Zusammenfassung.....	141
V.	Anhang.....	144
V.1	Ergebnisanhang.....	144
V.2	Exkurs: Quantitative Nachweismethoden der Apoptose.....	144
V.2.1	DNA - Leiter: (Gelelektrophorese).....	144
V.2.2	Anti- PARP (Western Blotting):.....	144
V.2.3	Nukleosomale Histone: (ELISA).....	145
V.2.4	Caspase- Aktivität: (ELISA).....	146
V.2.5	TUNEL-Methode: (Histologie/FACS).....	146
V.2.6	Annexin-V: (Histologie/FACS/ ELISA).....	147
V.2.7	PJ-Färbung: (FACS).....	148
VI.	Literaturverzeichnis.....	149
VII.	Ergebnisanhang.....	155

I. Einleitung

I.1 Resistenzen in der Tumorthherapie

Das Auftreten von Resistenz gegenüber Zytostatika ist in der Chemotherapie von Tumorerkrankungen im Allgemeinen und in der Therapie des Ovarialkarzinoms insbesondere eine gefürchtete Komplikation.

Dabei bereitet die primäre Resistenzentwicklung, die sich in der Tumorentstehung auf zellulärer Ebene ansiedelt, große Schwierigkeiten bei der Suche nach wirksamen Pharmaka, die auch noch ein vertretbares Maß an Nebenwirkungen aufweisen [47].

Ein weiteres und ständig zunehmendes Problem besteht in einer steigenden Inzidenz sekundärer Resistenzentwicklungen. In diesen Fällen entwickelt der Tumor erst unter der Einwirkung der eingesetzten Pharmaka entsprechende Resistenzmechanismen.

Die große Schwierigkeit bei beiden Resistenzformen ist, dass die jeweilige Therapie zum einen nutzlos ist, und zum anderen das Tumorwachstum nicht entscheidend vermindert wird.

Zugleich wird aber in aller Regel eine weitere Verschlechterung des Allgemeinzustandes beim Patienten - insbesondere des meist schon stark beeinträchtigten Immunsystems - in Kauf genommen [24]. Außerdem können erhebliche Organschädigungen durch fehlgeschlagene Behandlung auftreten, die bei ausbleibendem Behandlungserfolg kaum zu rechtfertigen sind.

Es wird oft unterschätzt, dass selbst nach erfolgreicher Chemotherapie nebenwirkungsbedingte Todesfälle durch massive Organschädigungen vorkommen - wie z.B. Herzversagen nach Anthrazyklinbehandlung [24].

Die Heilungschancen bei einer ungeeigneten Substanzauswahl können daher durch die drei Faktoren zytostatikabedingte Immunsuppression, zytostatikabedingte Nebenwirkungen (und Sekundärerkrankungen s.o.) und gleichzeitig unveränderte Tumormasse dramatisch sinken.

Die Umgehung bzw. Vermeidung von Resistenz stellt also eine zentrale und für den Patienten oft therapieentscheidende Aufgabe dar.

Sowohl die Heilungschancen also auch die Lebensqualität der Patienten hängen in hohem Maße von der Wahl geeigneter Substanzen und/ oder deren Kombination ab.

Da eine Chemotherapie durch Faktoren der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik prinzipiell auf Schwierigkeiten stößt, ist es um so wichtiger, etwas über die zellulären Eigenschaften des Tumors - insbesondere dessen Sensitivität gegenüber verschiedenen Zytostatika - a priori zu wissen [52].

Diese Einsicht hat zu einer Ausweitung der Untersuchung ex-vivo gewonnener Gewebeproben in der Onkologie geführt.

So kann Aufschluss über die primären, zellulären Eigenschaften des Tumors gewonnen werden und unter deren Berücksichtigung zielgerichtete Therapiemaßnahmen eingeleitet werden [1].

Mit der Thematik der Tumorchemosensibilitätsmessung befasst sich diese Arbeit.

I.1.1 Tumorentwicklung

Zunächst sollte an dieser Stelle kurz auf die Ursachen des Erkrankungskomplexes eingegangen werden. Zur Entstehung eines malignen Tumors müssen zu erst Schlüsselproteine des Zellzyklus in ihrer Funktion verändert sein. Dabei kommen sowohl Veränderungen der Regulation bei proliferationsfördernden Genen (Protoonkogene) in Frage, als auch Funktionsstörung von Genen, die mit der Apoptoseregulation zusammenhängen [63].

Zur tatsächlichen Entgleisung des Zellzyklus und der Wachstumsregulation kommt es erst nach Veränderungen und Manifestation mehrerer Faktoren, da es dadurch zu einer genetischen Instabilität gekommen ist.

Sind diese zellulären Veränderungen manifest geworden, wird der entstandene Tumor einen zweiten Entwicklungsschritt durchlaufen. Es handelt sich hierbei um den sog. „Immunological Escape“ - die Fähigkeit, sich den humoralen und zellulären Überwachungsmechanismen des Immunsystems - der Immune Surveillance - zu entziehen. Diese Phase ist im Prinzip die Resistenzbildung gegen die körpereigene Immunabwehr und spielt auch in der Resistenzentwicklung gegen verschiedene Therapiemaßnahmen eine entscheidende Rolle. Erstaunlicherweise besitzen Tumorzellen dabei ein umfangreiches Repertoire, das dem von Parasiten nicht unähnlich ist. Einige Escape-Mechanismen werden im Folgenden aufgeführt [24]:

- Die malignen Zellen können durch Fibrin, Antikörper oder Sialomucin maskiert werden.
- Die Rezeptordichte bestimmter Tumorantigene kann abnehmen.
- Durch MHC-I-Rezeptormodulation kann sich der Tumor für zytotoxische T-Zellen, die „Tumorüberwacher“ des Immunsystems, sozusagen unsichtbar machen.
- Außerdem können sich manche Tumoren dem Immunsystem durch sekundäre Immunsuppression entziehen, indem sie Mediatoren ausschütten (wie z.B. Zytokine, Prostaglandine, saure Proteine, lösliche Immunkomplexe, lösliche Antigene und Adhäsionsmoleküle).

Die aus solchen Mechanismen resultierende große Tumormasse überschreitet ab einem bestimmten Punkt die Kapazität des Organismus, mittels körpereigener immunologischer Mechanismen den Tumor erfolgreich zu bekämpfen.

Tumoren entwickeln z.T. auch sekundäre Resistenzmechanismen wie die Abnahme der Rezeptordichte von z.B. MHC II-Rezeptoren oder wie vermehrte Ausschleusung von Zytostatika oder deren metabolische Inaktivierung (darauf wird unter „Multi drug resistance“ detailliert eingegangen).

Die für die Wachstumsentgleisung verantwortlichen Mechanismen sowie die daran anschließenden Escape-Mechanismen sind so individuell wie die daraus resultierenden Eigenschaften eines Tumors. Dabei entstehen häufig Tumorzellen, die nicht mehr monoklonal sind und daher in ihren Eigenschaften untereinander nicht identisch. Diese Möglichkeit muss berücksichtigt werden, da zu den vielen denkbaren Escape-Mechanismen noch weitere Resistenzmechanismen aus dem Bereich der Multi drug resistance kommen können.

I.1.2 Multi drug resistance

Eine leider häufig beobachtete und daher zunehmend beachtete Form der Resistenz ist die sogenannte Multidrug Resistance (auch kurz MDR). Unter diesem Phänomen wird in der Onkologie die Resistenzbildung von Tumoren gegenüber strukturell und funktionell nicht verwandten Substanzen verstanden. Die Mechanismen, die diesem Phänomen zu Grunde liegen, sind zahlreich und sehr verschieden [4].

Bei dem am besten charakterisierten Mechanismus exprimieren betroffene Zellen häufig ein membrangebundenes Transportsystem zur Entgiftung - das P-Glykoprotein 170 (P-gp); es wird auch als multi-drug-resistance-efflux-pump bezeichnet. Dieses kann viele Zytostatika, wie Vinca-Alkaloide, Anthrazykline und Paclitaxel, so effektiv aus der Zelle transportieren bzw. deren Einstrom so effektiv verringern, dass sie damit praktisch wirkungslos werden [7]. Das oben genannte Glykoprotein wird beim Menschen durch das MDR 1-Gen kodiert.

Aus dieser Familie von Genen stammen auch c-fos und c-jun, deren erhöhte Expression mit einer erhöhten Aktivität von Protein Kinase C (PKC) assoziiert sind. PKC seinerseits reguliert die Expression von P-Glykoprotein 170 (s.o.) nach oben, so dass es zu reduzierter Zytostatika-Akkumulation kommt.

Des Weiteren gibt es Multi drug resistance, die Glutathion und glutathion-abhängigen Enzymen zugeordnet wird. Glutathion-S-Transferase kann die Reaktion von reduziertem Glutathion mit Substraten (hier Zytostatika), wie Cyclophosphamid und Doxorubicin, vermitteln und diese damit inaktivieren. Dieses Enzym wird in Tumorzellen häufig vermehrt ausgeschüttet.

Zur Inaktivierung von metallhaltigen Zytostatika - wie Cisplatin - kann es durch die Bildung von Metallothionein (MT) kommen, bedingt durch ein erhöhtes intrazelluläres Cysteinangebot.

Ein weiterer Mechanismus steht im Zusammenhang mit Thymidylatsynthase (TS), die in der DNA-Biosynthese eine zentrale Rolle spielt und das Ziel vieler Zytostatika ist. Sie wird z.B. in Cisplatin- oder Doxorubicin-resistenten Zellen oft in erhöhter Konzentration vorgefunden, so dass eine Verarmung der Zelle an TS umgangen wird .

Auch Heat shock Proteine (HSPs), die in gesunden Zellen die Funktion haben, Schutz vor externen toxischen Stimuli zu bieten, werden in Zusammenhang mit MDR gebracht und führen bei Transfektion in Ovarialkulturzellen zu einer Resistenz u.a. gegen Doxorubicin (offenbar indem sie die allgemeinen „Reparaturmechanismen“ der Zelle aktivieren).

Zwei weitere Gene - bezeichnet als multidrug resistance-associated protein (MDR) und lung resistance-related protein (LRP) - wurden in Zusammenhang gebracht mit Veränderungen der Topoisomerase II, die als Ansatzpunkt der Zytostatikatherapie in Bezug auf Replikation, Rekombination und Transkription eine große Rolle spielt. Die daraus resultierenden Resistenzen werden als atypische MDR bezeichnet.

Es gibt außerdem noch weitere, weniger spezifische Resistenzmechanismen wie den Übergang der Tumorzellen in einen hypoxischen Zustand, erhöhte Proliferationsaktivität, niedrige Vascularisation und eine unzureichende Reaktion auf Signale des apoptotischen Signalwegs und Dysfunktion der sie regulierenden Faktoren (näheres s.u.).

Abschließend ist zum Phänomen Multi drug resistance zu sagen, dass unter multiresistenten Tumoren viele, alle, aber auch keiner der genannten Resistenzfaktoren vermehrt exprimiert werden können [61]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass jeder Tumor sein einzigartiges Resistenz-Faktor-Profil besitzt. Nur zwischen dem Ausmaß der Resistenz und der Anzahl der detektierbaren Faktoren scheint es Zusammenhänge zu geben. Es gilt also nach Möglichkeit vor Therapiebeginn einen möglichst umfassenden Überblick über solche zellulären Resistenzen zu gewinnen.

I.2 Das Ovarialkarzinom

I.2.1 Eigenschaften

Unter dem Begriff Ovarialkarzinom werden im allgemeinen maligne Tumore des Keimepithels, also der undifferenzierten Epithelzellen der Ovaroberfläche verstanden [17]. Diese epithelialen Neoplasien machen 85-90% aller primär bösartigen Ovarialtumoren aus. Tumore anderer Genese (Ursprung im Gonadenmesenchym oder der Keimzellen) spielen wegen der geringen Inzidenz und der dabei guten Heilungsrate keine große Rolle in der gynäkologischen Onkologie. Sie werden auch anders behandelt als solche epithelialen Ursprungs. Daher wird im Folgenden nicht näher darauf eingegangen.

I.2.2 Inzidenz

In Westeuropa und den USA wird jährlich bei 16 von 100.000 Frauen eine Diagnose auf Ovarialkarzinom gestellt. Die bei weitem größte Inzidenz findet sich bei Frauen im Alter von 60 bis 80 Jahren. Rund 57% aller Todesfälle im Bereich der Genitalkarzinome entfallen auf das Ovarialkarzinom [48]; damit hat es unter den weiblichen Genitalkarzinomen die höchste Mortalität und ist daher sehr gefürchtet.

I.2.3 Entstehung

Durch epidemiologische Daten wird die Vermutung gestützt, dass eine größere Anzahl von Ovulationen (durch wenige Schwangerschaften, geringe Einnahme von Ovulationshemmern und höherem Lebensalter) zu einer häufigeren Erkrankungsinzidenz führt.

Dabei scheint die dadurch gehäufte Anzahl an „Verletzungen“ des Ovariepithels und die häufige Proliferation desselben während und vor der Ovulation eine große Rolle in der neoplastischen Entwicklung zu spielen [48]. Dazu kommen noch Faktoren genetischer Vorbelastung, die aber nur bei 5-7% der Gesamterkrankungen eine Rolle spielen. (Liegt allerdings eine Mutation der Tumorsuppressorgene BRCA1 oder BRCA2 vor, steigt das Erkrankungsrisiko auf 87% für ersteres bzw. 63% für letzteres).

1.2.4 Diagnose

Das Ovarialkarzinom ist - wie oben erwähnt - epithelialen Ursprungs und wird wegen anfangs relativ geringer und unspezifischer Symptomatik meist erst in fortgeschrittenem Stadium erkannt. Es lassen sich dabei zwei typische klinische Bilder unterscheiden: Entweder wächst der Tumor bis er die Ovarikapsel durchbricht, rupturiert und sich in der Bauchhöhle ausbreitet. Dabei breiten sich die Tumorzellen in der Peritonealflüssigkeit u.a. durch die Darmbewegungen sehr schnell aus, das heißt, es kommt zu Bildung von Ascites [48].

Im anderen Fall erfolgt die Ausbreitung der Tumorzellen in den Lymphbahnen mit Metastasen in den pelvinen Lymphknoten. Damit ist eine primäre Pleurabeteiligung die häufigste Lokalisation außerhalb der Bauchhöhle. Dies spielt für die Probengewinnung für In-vitro-Tests eine Rolle.

Die Diagnosestellung ist sehr schwierig und außerdem aufwendig. Sie kann mit letztendlicher Sicherheit immer erst nach bzw. bei einem operativen Eingriff gestellt werden. Dies heißt, Tastbefund und abdominale wie vaginale Sonographie geben nur in sehr begrenztem Maße als Diagnostik ausreichend Auskunft [48].

Von der Möglichkeit einer Punktionszytologie muss wegen der Gefahr der Tumorzellverschleppung abgesehen werden. Auch ein Anstieg des Tumormarkers CA 125 im Blut (Nachweis mittels monoklonaler Antikörper), der bei 80% aller Ovarkarzinome gefunden wird, gilt nur als zusätzliche Bestätigung eines Anfangsverdachts auf ein Karzinom. Dieser Marker dient vorwiegend der Verlaufskontrolle einer Therapie [47].

I.2.5 Staging

Das Staging nach FIGO (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstetrique) - die Klassifizierung des Malignitätsgrades - gruppiert die Tumoren in die Klassen I bis IV. Die Stadien I bis III werden noch jeweils in Unterstadien a-c eingeteilt, auf die hier aber nicht näher eingegangen wird, da sie in erster Linie für den Chirurgen von Bedeutung sind.

Im Stadium I ist der Tumor noch auf die Ovarien beschränkt.

Im Stadium II erstreckt sich die Ausdehnung bereits auf das kleine Becken.

Im Stadium III geht die Ausdehnung über das kleine Becken hinaus.

Im Stadium IV haben sich Fernmetastasen gebildet.

Die Stadien III und IV werden als fortgeschrittene Stadien betrachtet, deren 5-Jahres-Überlebensrate nur noch 5-10% beträgt. Zum Vergleich betragen die jeweiligen 5-Jahres-Überlebensraten bei den Stadien Ia 70% und bei Ib 60%; bei den Stadien Ic, IIa, II-b und II-c liegt sie noch bei etwa 50%.

Je später also die Diagnosestellung, desto dramatischer sinkt die Chance auf eine kurative Therapie. Es ist anzumerken, dass bei der Diagnosestellung bereits in 75-80% der Fälle ein fortgeschrittenes Tumorstadium erreicht ist [48].

I.3 Therapiemaßnahmen

I.3.1 Operative Maßnahmen

Betrachtet man nun die typischen Eigenschaften des Ovarialkarzinoms im Ganzen, zeigt sich folgendes Bild:

Es handelt sich um eine schnell proliferierende und intraabdominal metastasierende, schon früh invasive, relativ symptomarme und damit meist spät diagnostizierte Tumorspezies, die zudem im fortgeschrittenen Stadium schwer behandelbar ist. Als Therapien stehen die Chirurgie und die Strahlen- oder Chemotherapie zur Verfügung.

Dabei spielt die Tumorreduktion mittels Chirurgie zunächst die größte Rolle. Angestrebtes Ziel ist dabei die Tumorreduktion auf höchstens 1% der Ausgangsgröße bzw. eine Resttumorgröße von <1 cm, sowie die möglichst vollständige Aspiration von freier Flüssigkeit im Abdomen. Eine gründliche Inspektion und Palpation des Abdomens sind außerordentlich wichtig.

Weitere operative Maßnahmen sind [8] [49]:

- Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie
- Appendektomie und Omentektomie (mit oder ohne Befall)
- Sorgfältige Exploration von Dünn- und Dickdarm mit Exstirpation aller Tumoranteile soweit möglich
- Exploration des gesamten Peritoneums und Entfernung aller makroskopisch suspekten Areale
- bei optimaler Tumorreduktion < 1cm sollte eine pelvine und paraaortale Lymphonoektomie durchgeführt werden

Danach wird grundsätzlich eine Chemotherapie als systemische Maßnahme angeschlossen [8].

Die seltenen Stadien Ia und Ib werden in Abhängigkeit von tumorbiologischen Parametern individuell therapiert. Für die Stadien Ic-IV, die die große Mehrheit der Primärtumoren ausmachen, wurde früher eine platinhaltige Kombinationstherapie mit einem Alkylans (meist Cyclophosphamid) verwendet [17]. Die aktuelle Standardtherapie besteht jedoch aus Paclitaxel und Cisplatin oder neuerlich vermehrt Carboplatin, welches sich durch gleiche Wirksamkeit bei geringerer Toxizität auszeichnet (siehe Kombinationstherapie) [27].

Der Resttumor soll dadurch an einer Remission gehindert bzw. die verbleibenden Zellen sollen zerstört werden. Diese Maßnahme ist unverzichtbar, da die Proliferationsrate bei kleiner Tumormasse verhältnismäßig hoch ist. Die Chemotherapie kann außerdem neoadjuvant eingesetzt werden.

Die neoadjuvante Therapie ist vor allem Rezidivbefunden vorbehalten und zur präoperativen Tumorreduktion gedacht bzw. wirkt der Gefahr der Ausbreitung von Tumorzellen unter der Operation entgegen.

Es kommt insgesamt häufig wegen der fortgeschrittenen Tumorentwicklung zur Rezidivbildung. Auch hier wird sowohl operativ als auch mit Chemotherapie sinnvoll palliativ behandelt [17]. Die Art der Behandlung richtet sich dabei nach rezidivfreiem Intervall, der Tumorlokalisation und -ausbreitung, sowie nach Alter und Allgemeinzustand der Patientin.

I.3.2 Zytostatikatherapie: Einsatz und Kombinationen

Die Auswahl der zur Therapie geeigneten Zytostatika hängt von den oben beschriebenen Zielsetzungen der Behandlung ab, sowie von der Tumorgöße, dem Status des Immunsystems, der Pharmakokinetik, der Pharmakodynamik, vorangegangener Therapie (Resistenzentwicklung/ kumulative Dosis) und dem Allgemeinzustand der Patientin [17].

Zur Auswahl steht eine Vielzahl von verschiedenen Substanzen mit unterschiedlichen pharmakologischen Ansatzpunkten. In jedem Falle ist eine Kombination mit Zytostatika unterschiedlicher Angriffsmechanismen im Zellzyklus von Vorteil, da dadurch ein synergistischer Effekt wahrscheinlich wird. Außerdem muss bei einer Monotherapie berücksichtigt werden, dass bei einer Resistenz, die nur in Teilen der meist phänotypisch heterogenen Tumoren vorliegen kann, eine Selektion von resistenten Zellen betrieben wird oder die Hochregulation von MDR-Mechanismen angeregt wird. Damit wird das Problem weiter zugespitzt. Die Toxizität, die z.T. auch kumulativ zwischen verschiedenen Substanzen auftreten kann, muss bei Rezidivbehandlungen immer berücksichtigt werden, da es sonst in Folge der Behandlung zu schweren Sekundärerkrankungen wie z.B. Herzschäden durch Anthrazykline kommen kann [24].

I.3.3 Aktuelle Kombinationstherapie

In den 1980er Jahren wurde standardisiert eine platinhaltige Chemotherapie kombiniert mit einem weiteren Alkylans (in der Regel Cyclophosphamid oder Treosulfan) verabreicht. Dabei ergab sich häufig das Problem von Kreuzresistenzen. Nach der Einführung von Paclitaxel ging man in den frühen 1990er Jahren dazu über, es in Kombination mit einer platinhaltige Therapie als „First-line-Behandlung“ einzusetzen. Dies führte zu einer merklichen Verbesserung der Ansprechraten sowie einer signifikant verlängerten Lebenserwartung und rezidivfreien Intervallen [27]. Daher ist dieses Schema „state of the art“ in der Primärbehandlung von epithelialen Ovarialkarzinomen geworden.

Im Tiermodell wurden desweiteren synergistische Wirkung mit Cisplatin untersucht, bestätigt wurden diese für die Substanzen Gemcitabin und Adriamycin (=Doxorubicin). Dies spielt im Zusammenhang mit einer Auswahl von „Ausweichtherapeutika“ bei Resistenzen und Unverträglichkeiten gegenüber der Standardtherapie eine zentrale Rolle [34].

I.3.4 Standardtherapieschemata

Im Folgenden sind die gängigen Therapieschemata in der Behandlung des Ovarialkarzinoms qualitativ und quantitativ in graphischer Übersicht aufgeführt.

I.3.4.1 Primärtherapie

In Tabelle 1 sind die Standardtherapieschemata zur Behandlung des primären Ovarialkarzinoms nach Breitbach et al. Aufgeführt [8].

<u>PT-Schema</u>		
Cisplatin	70 mg / m ²	i.v. Tag 1
Treosulfan	5000 mg / m ²	i.v. Tag 1
		Wiederholung Tag 22
<u>PP-Schema</u>		
Paclitaxel	350 mg / m ²	i.v. Tag 1
Cisplatin	600 mg / m ²	i.v. Tag 1
		Wiederholung Tag 29

Tabelle 1: Standardtherapieschemata zur Behandlung des primären Ovarialkarzinoms

I.3.4.2 Rezidivtherapie

In Tabelle 2 sind die Standardtherapieschemata für die Rezidivtherapie des Ovarialkarzinoms nach Breitbach et al. aufgeführt [8].

CB/CTX-Schema		
Carboplatin	175 mg / m ²	Infusion (3h) Tag 1
Cyclophosphamid	80 mg / m ²	Infusion (30 Min.) Tag 1
		Wiederholung Tag 22
Monotherapie		
Paclitaxel	135 mg / m ²	Infusion (3h) Tag 1
		Wiederholung Tag 22
Etoposid	150-200 mg / m ²	Infusion (30 Min.) Tag 1-3
oder		
Etoposid	200 mg / m ²	p.o. Tag 1-5
		Wiederholung Tag 29
Mitoxantron	12 mg / m ²	Infusion (30 Min.) Tag 1
Folinsäure	200 mg / m ²	i.v. Tag 1-5
5-Fluorouracil	375 mg / m ²	i.v. Tag 1-5
		Wiederholung Tag 29
Epirubicin	20-30 mg / m ²	i.v. 1x wöchentl.
Primärtherapie bei schlechtem Allgemeinzustand; als reine Palliation	1,25 g	p.o. Tag 1-7
Treosulfan		Wiederholung Tag 43

Tabelle 2: Therapieschemata in der Behandlung des Ovarialkarzinom-Rezidivs

I.3.5 Übersicht über im Test verwendete Zytostatika /Gruppen

Im Folgenden wird eine Übersicht gegeben über die in den Tests dieser Arbeit verwendeten Zytostatika und die Substanzklassen, denen sie zuordnet sind, sowie eine kurze Substanzcharakteristik. Die Zytostatika werden im allgemeinen pharmakologisch grob in vier Kategorien eingeteilt: Alkylantien, Antimetabolite, zytostatisch wirkende Antibiotika und Mitosehemmstoffe. Die Einzelsubstanzen werden in der jeweiligen Rubrik beschrieben.

[Anmerkung: Neben den Substanzbezeichnungen finden sich jeweils die in der Fachliteratur und auch in dieser Arbeit gebrauchten offiziellen Abkürzungen].

I.3.5.1 Alkylantien:

Sie transferieren Alkylreste auf SH-, NH₂-,COOH- und Phosphatgruppen. Durch falsches Ablesen der DNA wird die Replikation gestört; Schädigungen in allen Phasen des Zellzyklus folgen. Cisplatin und Cyclophosphamid sind Alkylantien, deren substanzspezifische Eigenschaften im folgenden beschrieben werden.

I.3.5.1.1 Cisplatin (CDDP)

Allgemeine Anwendung:

Ovarial-, Cervix-, Endometriumkarzinome, Hodentumore, fortgeschrittene Blasenkarzinome, Osteosarkome, Melanome, Karzinome des Kopf- und Halsbereichs, Bronchialkarzinome, Ösophaguskarzinome.

Pharmakologie :

Cisplatin ist eine Koordinationsverbindung von zweiwertigem Platin. Es gelangt durch passive Diffusion in die Zelle. Durch die niedrige intrazelluläre Chloridkonzentration werden die beiden Chloridliganden durch Wasser ersetzt.

Der resultierende Aquokomplex reagiert bifunktionell mit nukleophilen Gruppen der DNA (insbesondere Guanidin). Durch Bildung von Chelaten mit DNA-Basen kommt es zu Vernetzung der Einzelstränge sowie zu Quervernetzung zwischen Basen komplementärer Stränge. Die DNA-Synthese wird stark gehemmt. Die Wirkung ist konzentrationsabhängig. Sie gilt als eher phasenunspezifisch; eine gewisse Zyklusspezifität für die G1/S-Phase konnte jedoch beobachtet werden. Es ist bekannt, dass Cisplatin Apoptose induzieren kann [22] [29].

In-vitro kann im Modell mit ovariellen Karzinomzellen eine Resistenz gegenüber Cisplatin induziert werden, die auch in der Klinik häufig beobachtet wird. Diese erworbene zelluläre Resistenz scheint ein multifaktorieller Prozess zu sein, dessen Mechanismen u.a. geringere Substanzaufnahme durch bestimmte Zellmembranfaktoren, Anhebung des Thiolgehaltes im Zytosol und/oder eine gesteigerte DNS-Reparatur zu sein scheinen (→ Induktion von MDR).

Toxikologie:

Subchronische/chronische: Cisplatin schädigt die Niere dosisabhängig und bei Mehrfachgabe kumulativ, dies z.T. irreversibel. Die Knochenmarksfunktion wird konzentrationsabhängig beeinträchtigt. Auch Ototoxizität tritt dosisabhängig auf. Der Gastrointestinaltrakt wird reversibel beeinträchtigt und es kann zu meist reversibler peripherer Neurotoxizität kommen. Cisplatin wirkt in verschiedenen in-vitro- und in-vivo Testsystemen mutagen und kanzerogen und steht im Verdacht, sekundär Tumoren zu induzieren.

I.3.5.1.2 Cyclophosphamid (CTX)

Allgemeine Anwendung:

Fortgeschrittene Mamma- und Ovarialkarzinome, Weichteilsarkome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphome

Pharmakologie:

Cyclophosphamid ist ein synthetisches Derivat des Mechloretamins und wird in-vivo in der Leber durch mikrosomale Enzyme, insbesondere Cytochrom P 450, zu 4-Hydrocyclophosphamid und Aldophosphamid metabolisiert. Die Tautomere unterliegen sowohl spontaner wie enzymatischer Konversion in inaktive und aktive Metaboliten (vor allem Phosphamidlost und Acrolein). Die aktiven Metaboliten alkylieren Guanin, so dass es zu Fehlbasenpaarungen sowie zu Exzision von Guanin kommt. Bei der bifunktionellen Alkylierung kommt es außerdem zur Quervernetzung von Guanin mit Cytosin. Alle Angriffsmechanismen führen zu einem erheblichen Funktionsverlust der DNA mit Schwerpunkt auf der Blockade der späten S- und frühen G2-Phase. Cyclophosphamid kann Apoptose induzieren [25] [29].

Toxikologie:

Die Myelosuppression ist meist dosislimitierend. Störungen des Gastrointestinaltraktes sind dosisabhängig. Cyclophosphamid und dessen Metabolite bewirken nach Ausscheidung in den Urin Veränderungen wie Blasenwandödem, suburotheliale Blutungen und interstitielle Entzündungen mit Fibrosen, so dass es zu Blasenwandstarre kommen kann. Nach hohen Dosen (120-240 mg/kg) kann es zu sekundärer Kardiomyopathie kommen. In Folge der Behandlung kann es zu Sekundärtumoren - insbesondere der Blase - kommen, sowie zu Leukämien.

I.3.5.2 Antimetabolite:

Sie hemmen die Synthese bestimmter Vorstufen zur DNA-Synthese durch Verdrängung bzw. führen zum Aufbau falscher Substanzen. Somit wirken sie eher phasenspezifisch. Gemcitabin gehört in die Klasse der Antimetabolite.

I.3.5.2.1 Gemcitabin (dFdC)

Allgemeine Anwendung:

fortgeschrittene Adeno- oder Cystadenokarzinome;

Haupt Einsatzgebiet : lokal fortgeschrittene oder metastasierende, nichtkleinzellige Bronchialkarzinome, Pankreaskarzinom;

in der gynäkologischen Chemotherapie vor allem in Kombination mit anderen Zytostatika .

Pharmakologie:

Gemcitabin (dFdC) wird intrazellulär zu den wirksamen Diphosphat- und Triphosphatnucleosiden (dFdCDP und dFdCTP) metabolisiert. Dabei wirken beide Nucleosidphosphate zytotoxisch. Das Diphosphatnucleosid blockiert die Ribonucleotidreduktase und verhindert damit die Bereitstellung von Desoxynucleotidtriphosphaten für die DNA-Synthese. Die Enzymblockade führt zu einer allgemeinen Verarmung an Desoxynucleotiden, insbesondere aber von dCTP. Durch die intrazelluläre Verarmung an dCTP wird der Einbau von dFdCTP in die DNA begünstigt. Da die DNA-Polymerase Epsilon kaum in der Lage ist, Gemcitabin zu entfernen und die wachsenden Stränge zu reparieren, kommt es zu dem Einbau eines weiteren Nucleotids nach Gemcitabin, was danach zur vollständigen Syntheseinhibition führt (maskierte Ketten-Beendigung). Wenn Gemcitabin in die DNA eingebaut wird, kommt es nach In-vitro-Beobachtungen zu einer Apoptoseinduktion.

Toxikologie

Gemcitabin sollte wegen der erhöhten Toxizität bei hochdosierter Einzelgabe intermittierend verabreicht werden. Das Nebenwirkungsspektrum zeichnet sich vorwiegend durch influenzaartiges Befinden aus. Die Schädigung des Knochenmarks steht im Vordergrund und ist dosislimitierend. Es kommt zu Beeinträchtigung der Nierenfunktion, sowie reversible gastrointestinale Störungen. In Übereinstimmung mit In-vitro-Untersuchungen ist ein kanzerogener Effekt zu erwarten.

I.3.5.3 Zytostatisch wirkende bzw. interkalierende Antibiotika:

Sie interkalieren in die DNA-Helix, so dass es zu einer lokalen Aufdrehung und Verwindung einerseits und dabei zu einer gleichzeitigen Stabilisierung andererseits kommt. Replikation und Transkription werden erheblich behindert und es kann zu Strangbrüchen kommen; die Wirkung ist zellzyklusunabhängig. Adriamycin (auch Doxorubicin genannt) und Mitoxantron sind zytostatisch wirkende Antibiotika.

I.3.5.3.1 Adriamycin (ADR)

Allgemeine Anwendung:

Adriamycin bzw. Doxorubicin wird zur zytostatischen Therapie von soliden Tumoren und Lymphomen sowie von Leukosen eingesetzt. Es wird als „Reservezytostatikum“ in der Therapie des Ovarkarzinoms betrachtet.

Pharmakologie:

Doxorubicin, das zu der Gruppe der Antrazyklin- Antibiotika gehört, interkaliert in die DNA-Doppelhelix über glykosidische Bindung des Daunosominzuckers. Die dabei gebildeten reversiblen Komplexe hemmen die DNA-Matrizenfunktion, so dass es zur Störung von Replikation und Transkription kommt. Darüber hinaus kommt es zu Strangbrüchen, die beim Einzelstrang reversibel, beim Doppelstrang

dagegen irreversibel sind. Als freies Radikal kann Doxorubicin aufgrund seiner Chinon-Hydrochinonstruktur durch Elektronenaufnahme über NADPH-Cytochrom P-450-Reduktase zu einem Semichinon umgewandelt werden und an Redoxreaktionen teilnehmen.

Außerdem begünstigt die Chinon-Hydrochinon-Struktur als Elektronenakzeptor die Bildung von Peroxidradikalen, die ausgeprägt zytotoxische und membranschädigende Eigenschaften besitzen. Die Gesamtwirkung von Doxorubicin ist zwar phasenunspezifisch, wirkt aber auf zellulärer Ebene zyklusspezifisch und bevorzugt auf Zellen in der S- und G2-Phase. Für Adriamycin konnte in ovariellen Karzinomzellkulturen in-vitro eine Apoptoseinduktion beobachtet werden [25] [29].

Toxikologie :

Die kardiotoxische Wirkung steht an erster Stelle und ist insbesondere wegen des kumulativen Effekts (auch im Zusammenhang mit anderen potentiell kardiotoxischen Zytostatika) zu beachten und sehr ausgeprägt; die Kumulation mit anderen Anthrazyklinen ist zu berücksichtigen!

Doxorubicin stört die Knochenmarksfunktion und beeinträchtigt den Gastrointestinaltrakt. Weiterhin kommt es unter der Behandlung häufig zu Alopezie.

1.3.5.3.2 Mitoxantron (MITX)

Allgemeine Anwendung

Die antineoplastische Therapie mit Mitoxantron wird hauptsächlich bei Mammakarzinom eingesetzt; dies auch im fortgeschrittenen Stadium mit lokalen und Fernmetastasen. Es findet Anwendung in der Rezidivtherapie von Ovarialkarzinomen, bei Non-Hodgkin-Lymphomen, akuter Leukämie von Erwachsenen sowie Blastenschub der chronischen myeloischen Leukämie und hepatozellulären Karzinomen.

Pharmakologie

Mitoxantron ist ein Anthrachinon-Derivat. Es interkaliert in die DNA und ruft dabei Quervernetzungen innerhalb und zwischen den Strängen hervor. Außerdem gibt es Anhaltspunkte für eine Hemmung der Nukleinsäure-Synthese. Mitoxantron inhibiert wirkungsvoll sowohl DNA- wie RNA-Synthese und verursacht Abberationen des Zellkerns - sowohl Einzel- wie Doppelstrangbrüche. Typisch ist das Auftreten eines chromosomalen „Scatterings“. Die Wirkung ist eher phasenunspezifisch, aber zyklusspezifisch. Der Zellzyklus wird hauptsächlich in der S- und G2-Phase blockiert, bei gleichzeitiger Zunahme an zellulärer RNA und Polyploidie.

Toxikologie

Hervorstechend bei der chronischen Toxizität ist die reversible Suppression der Hämatopoese (Leukozytopenie). Die herausragende Rolle in der Toxizität spielt die Kardiotoxizität, bei der die Kumulation mit anderen Anthrazyklinen unbedingt zu beachten ist - genau wie die kumulative Dosis. Die Störung der gastrointestinalen Funktionen sowie Alopezie und neurologische Ausfälle gehören zu weiteren chronischen Auswirkungen einer Mitoxantron-Therapie.

I.3.5.4 Mitosehemmstoffe:

Sie greifen gezielt in die Proliferationsaktivität der Zellen ein. Sie fungieren meist als Spindelgifte und unterbinden den korrekten Ablauf der Mitose.

I.3.5.4.1 Paclitaxel (Taxol, TX)

Allgemeine Anwendung

Paclitaxel wird zur Therapie des metastasierenden Ovarialkarzinoms nach Versagen einer Cisplatin-Standardtherapie eingesetzt, ausserdem in der

Polychemotherapie des Ovarialkarzinoms in Kombination mit platinhaltigen Zytostatika.

Pharmakologie

Paclitaxel gehört zu den Taxanen und wirkt als Spindelgift. Es fördert die Bildung anomaler Mikrotubuli aus Tubulin-Dimeren und stabilisiert diese. Außerdem verhindert es die Depolymerisation von Tubulin-Polymeren. Dadurch steht den Zellen nicht genug Tubulin für die Synthese funktionsfähiger Mikrotubuli und Spindeln zur Verfügung; es bewirkt eine abnormale Bündelstruktur der Mikrotubuli und multiple Spindelbildung während des Mitosevorgangs. Somit gehört Paclitaxel zu den phasenspezifisch wirkenden Zytostatika. Es ist bekannt, dass Paclitaxel in-vitro Apoptose induzieren kann [22] [25] [29].

Toxikologie

An erster Stelle steht die Knochenmarksuppression, die dosislimitierend ist. Außerdem ist eine erhöhte Neurotoxizität zu beachten, die sich in Neuropathien, Arthralgien und Myalgien äußert. Weiterhin kann es zu totaler Alopezie, kardialen- und Leberfunktionsstörungen kommen. Paclitaxel gehört zu den potentiell karzinogenen und genotoxischen Substanzen.

Antimetabolite und Pflanzenalkaloide wirken in erster Linie phasenspezifisch, da sie auf Stoffwechselforgänge der Proliferation relativ gezielt ausgerichtet sind. Zytostatisch wirkende Antibiotika und Alkylantien dagegen wirken eher phasenunspezifisch, da sie aber dennoch vom Ausmaß der Proliferationsaktivität abhängen, wirken sie zyklusspezifisch.

I.4 Individualisierung der Chemotherapie

I.4.1 Notwendigkeit der Bestimmung von Tumoreigenschaften vor der Chemotherapie/ Möglichkeiten und Grenzen

In der Onkologie wird auf eine Individualisierung der Therapie zunehmend großer Wert gelegt. Die Erkenntnisse darüber, wie multifaktoriell die Entstehung und Manifestation von Tumoren sind, hat zu der - auch klinisch belegbaren - Erkenntnis geführt, dass nur mit Standard-Therapieregimen keine weiteren, wesentlichen Fortschritte in den Ansprechraten erzielt werden [57].

Es wäre daher ein großer Fortschritt, sich vor Beginn einer herkömmlichen Therapie ein Bild über die Eigenschaften des Tumorgewebes und seiner Reaktion zu verschaffen, da der genetischen wie der phänotypischen Heterogenität der Tumoren Rechnung getragen werden muss [1]. Erkenntnisse über vorliegende Resistenzen auf zellulärer Ebene sind für den Patienten und die Therapie entscheidend, da wie z.B. bei der Beschreibung des Phänomens MDR dargelegt, eine große Spannbreite an möglichen Resistenzmechanismen existiert. Das Hauptproblem bleibt dabei die Auswahl effektiver Substanzen.

Die Kombination von Zytostatika gehört zur aktuellen Standardtherapie, da häufig Synergien erzielt und Resistenzen umgangen werden können. Um bei solchen Kombinationen wirksame Einzelsubstanzen auszuwählen, die auch einen ausreichenden individuellen Effekt erzielen, ist die Möglichkeit der Ex-vivo-Testung außerordentlich wichtig. Im übrigen können Synergie-Effekte auch in-vitro durch Behandlung der Zellen mit Kombinationen beobachtet werden. So können nicht nur nutzlose Zytostatikagaben vermieden werden, sondern auch Zeit gespart und dem Patienten unnötige Therapiebelastungen erspart bleiben.

Der Wert von In-vitro-Tests zur Bestimmung von Chemosensibilität wird zunehmend anerkannt [1]. Da gerade beim Ovarialkarzinom nach

Diagnosestellung in der Regel Tumormaterial ex-vivo in ausreichender Menge zur Verfügung steht, ist es naheliegend, es für Untersuchungen auf zelluläre Tumoreigenschaften zu nutzen. Die Messung der Apoptoseaktivität stellt dabei eine Diagnosemöglichkeit dar [26] [28], ebenso wie die Ermittlung des ATP-Gehaltes nach Zytostatika-Exposition.

I.5 In-vitro-Testsysteme zur Bestimmung der Chemosensibilität

I.5.1 Allgemeines zur Messung der Chemosensibilität mit In-vitro-Assays/ Auswahl der Methode

Bei der derzeit gängigen In-vitro-Chemosensibilitätsbestimmung werden grundsätzlich zwei Prinzipien vertreten:

Im ersten Fall wird davon ausgegangen, dass Tumoren mono- bzw. oligoklonalen Ursprungs sind und daher durch Gewinnung definierter Zellpopulationen (Klone) eine für die Resistenz/ Sensitivität repräsentative Population zu gewinnen ist.

Dabei spielt die meist begrenzte Masse an Tumorzellen aus Ex-vivo-Tumormaterial eine große Rolle. Sie werden als „clonogenic Assays“ bezeichnet.

Im zweiten Testprinzip wird davon ausgegangen, dass Tumoren genetisch wie phänotypisch heterogen sind. Dies wird in neueren Studien bestätigt [1]. Tests, die auf dieser Annahme basieren, werden als „nonclonogenic Assays“ bezeichnet. Zu dieser Kategorie zählt der ATP-TCA. Sie haben den Vorteil, nicht im gleichen Maße wie die „clonogenic Assays“ auf die Proliferationsaktivität und allgemein gute Vitalität angewiesen zu sein.

I.5.2 Übersicht Chemosensibilitätstests

Im folgenden werden die gebräuchlichsten Chemosensibilitätstestungen für ex-vivo Material kurz vorgestellt und die Auswahl des ATP-TCA erläutert.

I.5.2.1 DiSC (differential staining cytotoxicity)

Ein Assay, der für Tumortypen jeglicher Herkunft, bevorzugt aber hämatogener, geeignet ist. Die Testdauer beträgt 4-6 Tage. Die Auswertbarkeit liegt bei 86%, die predictive Kraft bei 83% (dies gilt hauptsächlich für nicht kleinzellige Lungenkarzinome). Der Test ist technisch aufwändig, erfordert aber keine

Einzelzellsuspensionen oder pure Tumorzellpopulationen und gehört in die Gruppe der nicht klonogenischen Assays. Die Zellen werden den Zytostatika ausgesetzt und dann mit „fast green/nigrosin blue“ gefärbt. Dann wird mikroskopisch ausgewertet, welche Zellen nicht gefärbt sind. Diese stellen die Fraktion toter Zellen dar. Aus beiden Fraktionen wird ein Index gebildet. Die Auswertung kann nur von einem zytologischen Experten gemacht werden, der die malignen von den normalen Zellen zu unterscheiden vermag [35].

I.5.2.2 MTT-Assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolinum bromide

Der MTT-Assay ist für hämatogene Tumortypen geeignet, vor allem für akute Leukämien. Die Testdauer liegt bei 4-5 Tagen. 85% der Tests sind evaluierbar und die Vorhersagekraft liegt bei 62%. Er gehört zu den nicht klonogenischen Tests. Im Test wird im Prinzip die Vitalität der Zellen indirekt gemessen, indem das Substrat (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolinumbromid zu einer zuvor behandelten Zellsuspension gegeben wird. Mitochondriale Succinatdehydrogenase setzt dieses Substrat zu einem fluoreszierenden Farbstoff um, der luminometrisch bestimmt wird. Dieser Assay fußt auf einem ähnlichen Prinzip wie der ATP-TCA, ist aber mit einigen praktischen Problemen behaftet. Dazu gehört, dass die Substratumsetzung von verschiedenen Zytostatika beeinträchtigt wird; pH- Wert und metabolischer Zellstatus sowie die Qualität der Reagenzien haben einen großen Einfluß auf die Messung. Auch das Wachstum der Normalzellen in der Probe kann Probleme aufwerfen [35].

I.5.2.3 HDRA (histoculture drug response assay)

Der als HDRA bezeichnete Assay gilt als Vorläufer des MTT-Assays, entstammt der Gruppe der micro-organ culture assays und ist damit ein klonogischer Assay. Er kann auch für solide Tumoren eingesetzt werden. Er hat mit 7 Tagen eine relativ lange Inkubationszeit, ist zu 96% evaluierbar und hat einen prädivitiven

Wert von ca. 96%. Das Testprinzip und die praktische Umsetzung sowie auch die Schwierigkeiten sind ähnlich dem MTT-Assay. Es erfordert große Erfahrung in der Zellkultivierung, um korrekte und auswertbare Ergebnisse zu erzielen [35].

I.5.3 Auswahl des ATP-TCA

Der ATP-TCA ist ein ein nicht klonogener Assay [33]. Er wurde als Standardmethode zum Vergleich mit der PJ-Färbung ausgewählt, weil er neben einem aussagekräftigen Überblick über die Gesamtheit der Tumorzellen und ihrer Eigenschaften nur relativ geringe Mengen an Probenmaterial erfordert und nicht durch die starken technischen Limitierungen der bislang verfügbaren Verfahren eingeschränkt wird. Außerdem konnte nach retrospektiven Studien eine Rate von 85% prädiktiver Aussagekraft der Chemosensitivität und von über 90% für Chemoresistenz ermittelt werden [3], so dass der Test eine hohe klinische Relevanz aufweist.

Dies spielt vor allem bei der Resistenzdetektion des rekurrenten Ovarialkarzinoms eine entscheidende Rolle [1]. Dabei ist die Aufbereitung und Kultur der Tumorzellen bei weitem weniger aufwändig als bei den anderen oben genannten Tests - und er hat In Bezug auf Handhabung und Auswertung die Qualität eines Routinetests. Zudem ist er nicht so zeitintensiv wie die anderen Tests, und es werden durch das serumfreie Medium selektiv Tumorzellen kultiviert, während andere Zellen unter diesen Bedingungen nicht lange überleben können.

I.5.3.1 Testprinzip

Der Test ist vor allem für solide Tumoren geeignet. Die gesamte Testdauer liegt bei 5-7 Tagen mit einer Auswertbarkeit von >97%. Die prädiktive Aussagekraft beträgt ca. 85% [36].

Der ATP-TCA beruht auf der Messung des zellulären ATP-Gehalts und gibt damit indirekt Aufschluss über den „Energieladungszustand“ der Zelle (dieses Prinzip ist

aus Chemosensitivitätsmessungen in der Mikrobiologie bereits bekannt). Der ATP-Gehalt der Zellen sinkt bei Erreichen des statischen Zustands drastisch ab und geht bei Zelltod auf Null, bedingt durch die Aktivität lysosomaler ATPasen.

Die Bestimmung des ATP-Gehalts der Probe erfolgt bioluminometrisch nach folgendem Prinzip:

Die Chemosensibilität wird über einen Bereich von 6 Konzentrationen in einer absteigenden geometrischen Verdünnungsreihe gemessen (wobei jede Verdünnung jeweils der Hälfte der vorhergehenden entspricht).

In diesem Test werden sowohl proliferierende wie nicht proliferierende Tumorzellen erfasst, und er wird durch Makrophagen sowie Erythrozyten nicht gestört. Diese selektive Messung der Tumorzellaktivität geht auf die Tatsache zurück, dass die Zellsuspension bei der Präparation über Ficoll zuerst „gereinigt“ und in speziellem, serumfreiem Medium für eine Mindestdauer von 4 Tagen inkubiert wird. Verbliebene epitheliale Zellen und Restlymphozyten überleben unter diesen Bedingungen nicht und stören daher nicht .

1.5.3.2 Auswertung

Auf das genaue Plattierungsschemata und die Berechnung der Hemmwerte wird im Teil Material und Methoden im Detail eingegangen.

Für die Bewertung eines Zytostatikums als sensitiv muss die „Area under the curve“ (AUC) einen bestimmten Mindestwert annehmen und damit eine minimale Dosis/ Wirkbeziehung zeigen. Außerdem kann eine Unterteilung in starke, mittlere und schwache Sensitivität sowie von Resistenz vorgenommen werden, entsprechend der bei festgelegten Konzentrationen gemessenen Hemmwerte.

Die höchste Konzentration der Kurve, entsprechend 200% [36], geht dabei vom oberen Plasmaspiegel im steady-state aus. Die 25-prozentige Zytostatikakonzentration repräsentiert den unteren Plasmawert im steady-state .

I.6 Methoden zur Apoptosemessung

I.6.1 Allgemeines zur Apoptose

In einem gesunden Organismus besteht ein Gleichgewicht zwischen dem gesteuerten Aufbau von Gewebe und der Elimination von schädlichen, bzw. geschädigten Zellen. Daher verfügen alle Zellen über ein Selbsteliminierungsprogramm, das für das Überleben des Organismus bzw. der Organe und Gewebe von vitaler Bedeutung ist [10].

Dieses Programm wird Apoptose genannt und verläuft im Prinzip nach einem ubiquitären Mechanismus - dieser kann über verschiedene Wege eingeleitet werden. Je nach Art des zu erwartenden Schadens wird das Apoptoseprogramm von der Zelle selber (über verschiedene Proteine wie p53), von Zellen des Immunsystems (über Rezeptoren wie FAS bzw. CD95) oder von Nachbarzellen durch Entzug von Wachstumsstoffen getriggert [63]. In der Onkologie spielt die Störung des Gleichgewichts von Proliferation und Apoptose, ebenso wie eine gestörte Funktion des Apoptoseprogramms genetisch defekter Zellen eine zentrale Rolle [40]. Es kann neben unkontrolliertem Zellwachstum auch zu einer Weitergabe von veränderter Erbinformation kommen, so dass Vermehrungsrate und physiologische Gleichgewichte entgleisen. Funktionsveränderungen in diesen Zellprogrammen spielen in der Entstehung und Manifestation von Tumoren ebenso eine entscheidende Rolle wie in der Entwicklung von Resistenzen [53].

I.6.2 Der Mechanismus der Apoptose

Die Apoptose kann von verschiedenen Stimuli extern oder intern angeregt werden. Als Stimuli sind verschiedene Rezeptoren wie der FAS-Rezeptor (auch als CD 95 bezeichnet) geeignet, der jedoch nicht auf allen Zellen exprimiert wird, und vor allem vom Immunsystem zur Apoptoseeinleitung genutzt wird. Außerdem gibt es

intrazellulär beheimatete Apoptoseinitiatorproteine wie z.B. das Protein p53, das auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet wird, da es bei schweren DNA-Schädigungen zunächst die Zellproliferation stoppt und bei irreparablen Schäden die Apoptose einleitet. Auch der Entzug von Wachstumsfaktoren durch Nachbarzellen oder die Herabregulation von apoptoseinhibierende Zellproteinen kann zur Aktivierung des Apoptoseprogramms führen.

Das Programm folgt morphologisch dabei in der Regel dem nachstehenden Schema [50] [63].

Zunächst kommt es zum Schrumpfen der Zelle unter Ablösung von ihren Nachbarzellen (im Gegensatz zum typischen Anschwellen von nekrotischen Zellen); gleichzeitig findet eine Kondensation des Chromatins statt, und zwar zumeist in der Peripherie des Zellkerns. In den Mitochondrien kommt es zum Abfall des Transmembranpotentials durch die sogenannte Permeabilitätstransition, eine Porenbildung für Moleküle bis zu ca. 1500 Da Gewicht.

Hier können weitere Faktoren der Apoptosekaskade aktiviert werden.

Dann beginnen verschiedene Schlüsselenzyme der Apoptosekaskade, die sogenannten Caspasen in den Kern einzuwandern (Caspasen steht für Cystein-Aspartasen).

Dort beginnen sie DNA-Regulationsenzyme abzubauen, so dass das Chromatin von Endonukleasen, die ebenfalls in den Kern einwandern, auf molekularer Ebene fragmentiert wird. Dabei wird die DNA in Bruchstücke definierter Länge fragmentiert - zwischen den Nukleosomen, den DNA-Schutzproteinen. Dadurch entstehen DNA-Stücke mit einer Länge von 200 Basenpaaren und ihren ganzzahligen Vielfachen. Diese Fragmentbildung gilt bisher als unstrittiges Merkmal der Apoptose.

Wenn es zum Verlust der Zellmembranstabilität kommt, setzt die sogenannte Zeiose ein, die Bildung von Ausstülpungen. Es werden Membranbläschen abgeschnürt und an die Umgebung abgegeben, welches als „blebbing“ bezeichnet

wird. Durch den Verlust der Membransymmetrie werden außerdem auf der äußeren Zellmembran vermehrt Phosphatidylserinreste exprimiert, die sonst nur auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert sind. Im folgenden beginnen weitere Caspasen diverse Zellproteine u.a. des Zell-Stützgerüsts, wie Actin und Plectin, zu zerschneiden.

In den Abschnürungen der Zellmembran, den apoptotischen Körperchen, wird das Zellmaterial „verpackt“ nach und nach an die Umgebung abgegeben. Es wird von den umgebenden Zellen oder Granulozyten aufgenommen und verdaut. Es kommt dabei nicht, wie bei der unkontrolliert ablaufenden Nekrose, zu einer inflammatorischen Reaktion durch austretende Enzyme und Zellorganellbestandteile. Je nach einleitendem Stimulus für die Apoptose unterscheiden sich die frühen molekularen Mechanismen, denen die Signalkaskade folgt.

Es sind drei Hauptaktivierungswege bekannt [32]. Der erste - bei sogenannten Typ-I-Zellen - wird über die Aktivierung von CD 95, also dem Fas-Rezeptor, eingeleitet. Durch Interaktion der (Rezeptor-) Todeseffektordomänen FADD und Procaspase 8 kommt es zur Bildung eines Proteinkomplexes, der als DISC (Death Inducing Signaling Complex) bezeichnet wird. Dieser Komplex aktiviert seinerseits die Caspase-8, die als Schlüsselinduktor der Apoptosekaskade betrachtet wird. Bei der zweiten Aktivierungsmöglichkeit - in sogenannten Typ-II-Zellen - wird durch eine geringe Aktivität der Caspase-8 bereits das Molekül Bid gespalten und mit einer Signalamplifikation über gespaltenes Bid die Mitochondrien aktiviert, Cytochrom C frei zu setzen. Dieses bildet mit Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor) ein sogenanntes Apoptosom, an dem Caspase-9 aktiviert wird. Außer den genannten Hauptsignalwegen gibt es noch die Möglichkeit der Freisetzung von AIF (Apoptosis Inducing Factor) aus den Mitochondrien im Rahmen der Permeabilitätstransition. Sie münden jedoch im Prinzip alle in der

Aktivierung der Caspase-Familie und führen ab einem bestimmten Punkt zu den gleichen morphologischen Veränderungen.

Die verschiedenen Enzyme der DNA-Fragmentierung sowie auch deren Substrate werden häufig als spezifische Indikatoren bei der Messung von Apoptose herangezogen [46].

I.6.3 Apoptosemessung mittels FACS/ Auswahl der PJ-Messung nach Nicoletti

In der Bewertung des Behandlungserfolgs einer Chemotherapie können grundsätzlich zwei Mechanismen auf zellulärer Ebene verfolgt werden: zum einen die Zytostase, zum anderen die Apoptose, die therapeutisch gesehen eher anzustreben ist [23]. Zur Messung steht eine breite Auswahl an quantitativen Tests auf z.B. histochemischer und durchflußzytometrischer Basis zur Verfügung. Eine Analysetechnik, die sich nicht nur durch gute Messgenauigkeit auszeichnet, sondern auch eine gute Aussagekraft über zelluläre Vorgänge zulässt, ist die fluoreszenzaktivierte Durchflußzytometrie (kurz FACS; Beschreibung Durchflußzytometrie siehe Teil II Material und Methoden). Sie erlaubt als Meßmethode durch die Messung mehrerer Parameter wie Größe und Granularität sowie bestimmter Anfärbetechniken von Zellbestandteilen eine Eingrenzung der gesuchten Zellpopulation und deren quantitativer Erfassung.

Im Prinzip ist sie eine technisch verfeinerte Form der - in der Tumordiagnose als Standard geltenden - Histologie. Die Durchflußzytometrie erlaubt allerdings die Untersuchung sehr viel größerer Zellpopulationen. In der FACS-Analyse gibt es verschiedene Färbemethoden für die Apoptose, die sich vor allem durch die verschiedenen Messzeitpunkte im apoptotischen Ablauf unterscheiden (siehe auch Anhang).

Aus den grundsätzlich für die Fragestellung möglichen musste eine Meßmethode ausgewählt werden, die einen breiten Zeitrahmen im apoptotischen Prozess

abdeckt, die von der Disaggregation des Gewebes zu Einzelzellen wenig Beeinträchtigung erfährt (es durfte nicht durch die Anfärbung zur Induktion von Apoptose kommen und reproduzierbare Anfärbbarkeit mußte gewährleistet sein) und die nicht zu stark durch enge Zeitabläufe eingeschränkt ist (da dies die Möglichkeit zur Messung großer Probenanzahlen einschränkt). Außerdem musste die für die Messung erforderliche Zellzahl in einem Rahmen liegen, der realistisch aus Ex-vivo-Tumorgewebe zu gewinnen ist.

Zwei spezifischere Apoptosetests - die Anfärbung mittels Annexin V und die TUNEL-Methode - mussten beide nach ersten Versuchen verworfen werden. Die TUNEL-Methode, die auf der Markierung von Strangbrüchen mit fluoreszenzgelabeltem BrDU mittels einer terminalen Transferase basiert, hatte bei der Permeabilisierung der Zellmembran Schwierigkeiten ergeben. Diese führte zu unterschiedlicher Durchlässigkeit für die Färbesubstrate.

Für die Annexin V- Färbung, die auf dem Integritätsverlust der Zellmembran und der extrazellulären Exprimierung von Phosphatidylserin während der Apoptose gründet, war die Zellvereinzelung offenbar mit so großen Membranschädigungen verbunden, dass eine einwandfreie Anfärbung nicht gewährleistet war [60].

Dadurch war die Farbkompensation (siehe Physikalische Grundlagen) der Proben zum Teil unmöglich und damit technisch nicht durchführbar.

Für die angestrebte Messung von Apoptoseraten in Zellsuspensionen aus soliden Tumoren schien die DNA-Gehaltsbestimmung via Propidiumjodid – als indirekte Apoptosemessung – die o.g. Bedingungen am besten auf sich zu vereinen [55]. Sie gibt sowohl über die Apoptosefähigkeit als auch deren quantitativem Ausmaß guten Aufschluss und leidet nicht, wie die meisten anderen Methoden, unter der Einschränkung, dass nur ein sehr kurzes Zeitfenster beobachtet werden kann.

I.6.4 Testprinzip

Die indirekte Apoptosemessung via Propidiumjodid (kurz PJ) nach Nicoletti et al. [44] stützt sich auf folgendes Prinzip:

Während der Apoptose wird die DNA von Endonukleasen an bestimmten Punkten in Fragmente einer bestimmten Größe bzw. deren Oligomere geschnitten. Werden die Zellen in einen hypotonischen und tensidhaltigen Lysepuffer gegeben, dann werden die niedermolekularen DNA-Fragmente ausgewaschen. Mit der Substanz PJ liegt ein in die DNA interkalierender, rot fluoreszierender Farbstoff vor, der (nur) durch die lysierte Membran ins Zellinnere gelangt und den Zellkern anfärbt.

Da in der Apoptose fortgeschrittene Zellen sich durch einen geringeren DNA-Gehalt - durch Verlust niedermolekularer Kernfragmente - auszeichnen als Normalzellen, kann indirekt an der Abnahme der Menge der „normal“ PJ-gefärbten Zellen die Abnahme der Normalzellpopulation gemessen werden. Die Zellen, die schwächer mit Propidiumjodid angefärbt sind als Normalzellen, sind somit in die Apoptose eingetreten. Außerdem wird durch die Kondensation des Chromatins und die Abschnürung apoptotischer Körper die Granularität erhöht. Dieses Phänomen zeigt sich in einer erhöhten Side-Scatter-Lichtstreuung, die eine indirekte Bestimmung für die Granularität ist. So können die Normalpopulation und apoptotische Zellen gegeneinander abgegrenzt werden [46]. Die Zunahme der apoptotischen Aktivität erlaubt damit eine Aussage über die Ansprechrate von Tumorzellen auf ein bestimmtes Zytostatikum ex-vivo. Im Teil Durchflusszytometer/ Physikalische Grundlagen wird die Methode im Detail erläutert.

I.7 Zielsetzung der Arbeit

In der Therapie des Ovarialkarzinoms ist eine Individualisierung der Chemotherapie anzustreben - zum Nutzen der Patientinnen. Dazu gibt es verschiedene Bestimmungsmethoden für die Chemosensibilität ex-vivo. Eine geeignete Methode zur dirigierenden Chemotherapie ist nach klinischen Studien der ATP-TCA. Ein Vergleich mit der indirekten Apoptosemessung nach Nicoletti sollte zu beiden Methoden Aufklärung über Aussagekraft und Einsatz in der Klinik bringen.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind es, zu überprüfen ob:

1. die Messung der Apoptosefähigkeit von Tumormaterial mittels PJ-Färbung nach Nicoletti im FACS Aussagen über die Chemosensibilität von Probematerial ermöglicht, die von denen des ATP- TCA als Referenzmethode gestützt werden.
2. die Chemosensibilitätsmessung mittels PJ-Färbung präzisere Aussagen über den Mechanismus der Chemosensibilität (Zytostase vs. Apoptose) ermöglicht.
3. die Messung der Apoptoseaktivität eines Tumors eventuell in der dirigierenden zytostatischen Tumorbehandlung als ergänzender Test von Interesse sein kann.

II. Material und Methoden

II.1 Geräteliste

Gerät	Hersteller	Optionen
Durchflusszytometer	FACSCalibur, Becton Dickinson	- 5 Detektoren (Vorwärts- Seitwärtsstreulicht, Grün-, Rot-, Orangefluoreszenz) - Argonlaser, luftgekühlt (488nm, 15mW) - Signalverstärkungen linear und logarithmisch für alle Detektoren über 4 Dekaden
	Cell Quest	Software für die Datenanalyse von List Mode-Daten, Format FCS 2.0 - Dotplots, Konturgraphen und Histogramme - Analytische Marker und Statistik für die Datenauswertung - mehrdimensionale Gates in allen Parametern - 3-dimensionale Gates in allen Parametern - Kolomogorov-Smirnov-Statistik
Luminometer	Autolumat LB 953 EG&G Berthold	bestückt mit Röhrchen Polystyrene No. 55476, 5 ml 75x12 mm Fa. Sarstedt Nümbrecht
Zentrifuge	Megafuge 10R, Kendro Laboratory Products	
Sterile Werkbank	Microflow biological safety Cabinet	Bio-Flow Technik

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Optionen
Brutschrank	Heraeus CO ₂ - Brutschrank EC/CO ₂	
Pipetten	1.Eppendorf	Kolbenhubpipetten mit Kunststoffspitzen zum Einmalgebrauch für die Volumina 10-100 ul, 100-1000ul
	2. Bibby-Dunn Labortechnik	Mehrkanalpipetten (8 Kanäle) mit Kunststoffspitzen zum Einmalgebrauch für 100 µl Volumen
Zählkammer, hämatologische	Assistent	Neubauer Zählkammer
Zellkultur- Mikroskop, inverses	Leica	Typ 090-131-001

Tabelle 3: Fortsetzung

II.2 Chemikalienliste

ATP-TCA Testkit	DCS Innovative Diagnostik Systeme
Inhalt:	
Tumordissoziations-Enzymreagenz	s.o.
Maximum ATP Inhibitor	s.o.
Tumorzell-Extraktionsreagenz Zur ATP-Extraktion aus kultivierten Tumorproben	s.o.
Luziferin-Luziferase Reagenz	s.o.
ATP-Standard/ Rekonstitutionspuffer ("dilution buffer")	s.o.
Weitere:	
Posphate Buffered Saline	Biochrom
Propidiumjodide	Sigma
Triton X-100	Merck
Natriumcitrat	Merck
Ficoll	Biochrom
Trypanblau	Serva

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

II.3 Weitere Materialien

Zentrifugenröhrchen, 15 ml, steril konisch	Falcon/ Becton Dickinson
Pipetten 1,2,5,10,20 ml, steril	Sarstedt
Petrischalen, steril 100 x 15 mm	Corning
Kunststoffröhrchen 17 x 100 mm	Falcon
Mikrotiterplatten, 96 well,U-bottom, Polypropylen, steril	Costar
Skalpelle, steril	DCS Innovative Diagnostik Systeme
Polystyrenröhrchen, 5 ml, zur Einmessung am FACS	Falcon/ Becton Dickinson

Tabelle 5: Weitere verwendete Materialien

II.4 Herkunft der Tumorzellen für Versuchsreihen

II.4.1 Kulturbedingungen

II.4.1.1 Wachstumsbedingungen

Alle Zellkulturen - also Tumorzellkulturen und Ex-vivo-Material - wurden im Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von < 95% und einer 5%-igen CO₂-Begasung kultiviert.

II.4.2 Kulturmedien

In der folgenden Tabelle sind die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Kulturmedien aufgeführt.

Kulturmedien	
Nährmedium für Zellkulturen	- RPMI 1640 w/o L-Glutamine (Fa. Biochrom/Seromed) - Fetales Kälberserum 10% (Fa. Biochrom/Seromed) -L-Glutamin 0,2 mM (Fa. Biochrom/Seromed) -Natriumpyruvat 0,05 mM (Fa. Biochrom/Seromed) -Gentamicin 25 mg/ml (Fa. Gibco)
Nährmedium für ex-vivo gewonnene Tumorzellen (Im folgenden als <u>C</u> omplete- <u>A</u> ssay- <u>M</u> edium bezeichnet; kurz CAM)	-RPMI 1640 w/o Glutamine (Fa. Biochrom/Seromed) -Ultrosor G 10% (Fa. Gibco) -L-Glutamin 0,12 mM (Fa. Biochrom/Seromed) -Penicillin/Streptomycin 30000 U.I./ 3000 µg/ml

Tabelle 6: Zusammensetzung der Kulturmedien

II.5 Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials für beide Testmethoden

Die Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials wird entsprechend der Anweisung des Hersteller des ATP-TCA ausgeführt. Das Probenmaterial (Ex-vivo-Tumorgewebe, Ascites oder Pleurapunktat) wird unter aseptischen Bedingungen aus dem O.P. zur Bearbeitung ins Labor transportiert.

II.5.1 Aufarbeitung soliden Tumormaterials

In einer sterilen Petrischale wird Fett und Bindegewebe entfernt. Dann wird die Probe in 0,5-2,0 mm³ große Stücke geschnitten und in ein steriles konisches Zentrifugenröhrchen mit Tumordissoziations-Enzymreagenz gegeben. Daraufhin wird die Probe 2-6 Stunden bei 37° C unter 5-10maligem Drehen pro 30 Minuten inkubiert. Hierdurch wird das Tumormaterial in Einzelzellen dissoziiert. Ist dies als Zellsuspension erkennbar, wird die Zellpräparation bei 400 g für 5-8 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Das Sediment wird in 10ml Complete-Assay-Medium (kurz CAM) resuspendiert und erneut wie oben abzentrifugiert. Nach erneuter Abnahme des Überstands wird wieder in 10 ml CAM resuspendiert. Danach wird das Probenröhrchen ca. 2 Minuten senkrecht gelagert, um größere Fragmente sedimentieren zu lassen. Der Überstand wird vorsichtig abpipetiert und in ein weiteres steriles Zentrifugenröhrchen überführt.

II.5.2 Präparation der Zellsuspension

Sofern genug Einzelzellen in der nun vorliegenden Suspension vorhanden sind, schließt sich eine Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll an.

Dadurch können Erythrozyten und Zelldebris entfernt werden. Dies wird für die dissoziierten Proben sowie für Einzelzellsuspensionen - wie aus Ascites - durchgeführt. Für die Dichtegradientenzentrifugation werden 5 ml steriles Ficoll bei

Raumtemperatur in ein steriles konisches 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben und vorsichtig mit 10 ml der Einzelzellsuspension überschichtet. Es wird für 30 Minuten bei 400 g abzentrifugiert. Danach wird 5 ml des Überstands (CAM) vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellen in der Grenzschicht zwischen Ficoll und CAM werden vorsichtig in kreisenden Bewegungen abgesaugt und in ein steriles, konisches Zentrifugenröhrchen überführt. Dann wird zwei mal gewaschen und abzentrifugiert - wie nach der Zerkleinerung des Gewebes. Zuletzt wird mit Trypanblau-Ausschluß die Gesamtzellkonzentration sowie der Lebendzellanteil bestimmt. Dieser muß mindestens 60% betragen.

II.5.3 Plattierung und Inkubation der Tumorzellen

Um optimale Ergebnisse zu erzielen, können zwischen 15.000 - 25.000 lebende Zellen pro Vertiefung auf den Mikrotiterplatten eingesetzt werden. Bei den vorliegenden Versuchen wurde standardisiert eine Zellzahl von 20.000 Zellen vorgelegt. Diese werden in je 200 µl CAM-Medium pro Kavität einpipettiert. Die optimale Inkubationszeit für die Zellpräparationen wurde zunächst in den Vorversuchen ermittelt. Sie war für die Zelllinien und die Zellen aus Patientenmaterial unterschiedlich.

Die Zellkulturen wurden 96h inkubiert.

Offenbar war durch eine meist sehr hohe Wachstumsgeschwindigkeit die Vitalitätsgrenze schon am 4. Tag erreicht (siehe Ergebnisse).

Die Zellpräparationen aus Patientenmaterial wurden 120h inkubiert.

Längere Inkubationszeiten konnten auch hier wegen rapide abfallender Vitalität der Proben nicht gewählt werden.

Es wurde nach folgenden Schemata einpipettiert:

II.5.3.1 Plattierungsschema der Tumorzellen für ATP-TCA

Medik. 1 200%	Medik. 1 200%	Medik. 1 200%	Medik. 2 200%	Medik. 2 200%	Medik. 2 200%	Medik. 3 200%	Medik. 3 200%	Medik. 3 200%	A
Medik. 1 100%	Medik. 1 100%	Medik. 1 100%	Medik. 2 100%	Medik. 2 100%	Medik. 2 100%	Medik. 3 100%	Medik. 3 100%	Medik. 3 100%	B
Medik. 1 50%	Medik. 1 50%	Medik. 1 50%	Medik. 2 50%	Medik. 2 50%	Medik. 2 50%	Medik. 3 50%	Medik. 3 50%	Medik. 3 50%	C
Medik. 1 25%	Medik. 1 25%	Medik. 1 25%	Medik. 2 25%	Medik. 2 25%	Medik. 2 25%	Medik. 3 25%	Medik. 3 25%	Medik. 3 25%	D
Medik. 1 12,5%	Medik. 1 12,5%	Medik. 1 12,5%	Medik. 2 12,5%	Medik. 2 12,5%	Medik. 2 12,5%	Medik. 3 12,5%	Medik. 3 12,5%	Medik. 3 12,5%	E
Medik. 1 6,25%	Medik. 1 6,25%	Medik. 1 6,25%	Medik. 2 6,25%	Medik. 2 6,25%	Medik. 2 6,25%	Medik. 3 6,25%	Medik. 3 6,25%	Medik. 3 6,25%	F
MO Kontrolle	MO Kontrolle	MO Kontrolle	MO Kontrolle	MO Kontrolle	MO Kontrolle	MO Kontrolle	MO Kontrolle	MO Kontrolle	G
MI Kontrolle	MI Kontrolle	MI Kontrolle	MI Kontrolle	MI Kontrolle	MI Kontrolle	MI Kontrolle	MI Kontrolle	MI Kontrolle	H

Abbildung 1: Pipettierschema ATP-TCA; für 3 Zytostatika zur Testung von 6,25-200% Test Drug Concentration

II.5.3.2 Plattierungsschema der Tumorzellen für PJ-Färbung

Es wurde für je ein Zytostatikum eine komplette Mikrotiterplatte mit den Verdünnungen siehe Abbildung 2 bestückt.

Medik.												
200%	200%	200%	200%	200%	200%	200%	200%	200%	200%	200%	200%	200%
Medik.												
100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Medik.												
50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%	50%
Medik.												
25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%	25%
Medik.	Medi.	Medik.	Medik.	Medik.								
12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%	12,5%
Medik.												
6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%	6,25%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wert												
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Wert												

Abbildung 2: Pipettierschema PJ-Färbung; für 1 Zytostatikum zur Testung von 6,25 % - 200 % Test Drug Concentration. Anmerkung: Die als 0-Kontrolle bezeichneten Felder repräsentieren die unbehandelten Zellen bzw. biologischen Negativkontrollen.

II.5.4 Zytostatika

Für die Versuchsreihen dieser Arbeit, die mit Tumorzell-Linien ovarialen Ursprungs und ex-vivo gewonnenen Zellen aus Ascites, Pleurapunktat und solidem Ovarialgewebe durchgeführt wurden, wurde aus jeder Zytostatikakategorie mindestens ein Vertreter ausgewählt, der in der Therapie des Ovarialkarzinoms Einsatz findet oder hierzu in der Erprobung ist. Die Substanzen wurden in der Einleitung bereits vorgestellt. Im folgenden wird eine Übersicht über die Testsubstanzen und ihre Dosierungen gegeben.

II.5.5 Verdünnungen/ Plasmaspiegelentsprechungen

Die Zytostatika wurden in den angegebenen Konzentrationen für die Versuchsreihen eingesetzt:

(Testkonzentrationen und klinische Entsprechungen

laut: Chemosensibilitätstestungen in der gynäkologischen Onkologie, Kurbacher, Mallmann, Kurbacher, Hübner, Krebs)

Adriamycin (bzw. Doxorubicin)

Konzentrationen: 1 µg/ml=200% / 0,5 µg/ml=100% / 0,25 µg/ml=50% / 0,125 µg/ml=25% / 0,0625 µg/ml=12,5% / 0,03125 µg/ml=6,25%

→ 0,5 µg/ml oder 200% im TCA entsprechen einer klinischen Referenz von 60 mg/m² i.v.

Cisplatin

Konzentrationen: 7,6 µg/ml=200% / 3,8 µg/ml=100% / 1,9 µg/ml =50% / 0,95 µg/ml=25% / 0,475 µg/ml= 12,5% / 0,2375 µg/ml=6,25%

→ 3,8 µg/ml oder 200% im TCA entsprechen einer klinischen Referenz von 100 mg/m² i.v

4-Hydroperoxycyclophosphamid: Hauptmetabolit von Cyclophosphamid

Konzentrationen: 6,0 µg/ml=200% / 3,0 µg/ml=100% / 1,5 µg/ml=50% / 0,75 µg/ml=50% / 0,375 µg/ml=25% / 0,1875 µg/ml=12,5% / 0,09375 µg/ml=6,25%
→ 3,0 µg/ml oder 200% im TCA entsprechen einer klinischen Referenz von 600 mg/m² i.v.

Gemcitabin

Konzentrationen: 50 µg/ml=200% / 25 µg/ml=100% / 12,5 µg/ml=50% / 6,25 µg/ml=25% / 3,125 µg/ml=12,5% / 1,5625 µg/ml=6,25%

Mitoxantron

Konzentrationen: 1,3 µg/ml=200% / 0,65 µg/ml=100% / 0,325 µg/ml=50% / 0,1625 µg/ml=25% / 0,08125 µg/ml=12,5% / 0,040625 µg/ml=6,25%
→ 0,65 µg/ml oder 200% im TCA entsprechen einer klinischen Referenz von 10-12 mg/m² i.v.

Paclitaxel

Konzentrationen : 27,2 µg/ml=200% / 13,6 µg/ml=100% / 6,8 µg/ml=50% / 3,4 µg/ml=25% / 1,7 µg/ml=12,5% / 0,85 µg/ml=6,25%
→ 13,6 µg/ml oder 200% im TCA entsprechen einer klinischen Referenz von 180 mg/m² i.v.

II.6 ATP-TCA

II.6.1 Extraktion und Messung

1. Luziferin-Luziferase-Lyophilisat aus dem ATP-TCA-Testkit wird mit 15 mL Verdünnungspuffer (Dilution buffer) rekonstituiert und 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Lichtempfindlichkeit des Reagenzes ist stets zu achten.
2. Mit einer Mehrkanalpipette werden jeweils 50 μ L Tumorzell-Extraktionsreagenz in die Reihen H und G (MI und MO) pipettiert und sofort gemischt durch 4maliges Aufsaugen und Herablassen mit der Mehrkanalpipette.
3. Mit einer Mehrkanalpipette werden jeweils 50 μ L Tumorzell-Extraktionsreagenz in die Reihen A-F (Tumorzellen) pipettiert und in dieser Reihenfolge gemischt.
4. Inkubiert ca. 20-30 Min. bei Raumtemperatur. (Optimale Ergebnisse werden bei Messung innerhalb 60 Min. nach Zugabe des Tumorzell-Extraktionsreagenz erhalten.)
5. Mit einer einstellbaren Pipette werden 50 μ L aus jeder Vertiefung entnommen, in 12 x 75 mm Zählröhrchen pipettiert und diese in das Luminometer gesetzt. Das Luziferin-Luziferase-Gemisch wird in das Gerät gestellt und 5mal gewaschen. Die Messzeit wird auf 10-15 Sekunden eingestellt. Anschließend werden 50 μ L des Luziferin-Luziferase-Gemisches je Röhrchen automatisch injiziert.
6. Nach der Messung wird das Schlauchsystem des Luminometers zur Vermeidung bakterieller Kontaminierung gewaschen.

Anmerkung: Die bereits extrahierten Platten können problemlos bei -20 °C gelagert werden. Vor der Messung bei 37 °C tauen lassen.

II.6.2 ATP Standardkurve

Die ATP Standardkurve dient zur Überprüfung der Linearität der Messergebnisse in Abhängigkeit vom ATP-Gehalt der Probe. Es wird empfohlen, eine

Standardkurve an jedem Messtag vor der eigentlichen Messung zu erstellen. Das Waschen (Spülen) des Schlauchsystems mit Luziferin-Luziferase-Gemisch - mit fünf Leerröhrchen - sollte in diesem Fall vor der Messung der ATP-Standardkurve erfolgen.

1. Der lyophilisierten ATP-Standard wird mit 2 mL Verdünnungspuffer rekonstituiert, vorsichtig gemischt und einige Minuten inkubiert. Die Konzentration der Stammlösung beträgt 250 ng ATP/mL
2. Mit einer einstellbaren Pipette werden je 300 µL des Verdünnungspuffers in neun Röhrchen (17 x 100 oder 12 x 75 mm) pipettiert.
3. Mit 150 µL ATP-Stammlösung wird eine Verdünnungsreihe durchgeführt: Dazu wird die Stammlösung in das erste der 9 Röhrchen gegeben, dann gemischt, 150 µL entnommen und in das zweite Röhrchen gegeben usw. Die sich ergebenden Verdünnungen (Konzentrationen) sind in der folgenden Tabelle gelistet:

Verdünnung :	Konzentration:
3	83,33 (ng/mL)
9	27,76 (ng/mL)
27	9,253 (ng/mL)
81	3,084 (ng/mL)
243	1,028 (ng/mL)
729	0,342 (ng/mL)
2187	0,114 (ng/mL)
6561	0,038 (ng/mL)
19683	0,012 (ng/mL)

Tabelle 7: Konzentrationsreihe ATP-Stammlösung

4. Aus diesen neun Röhrchen werden je Verdünnungsstufe 50 µL in drei 12 x 75 mm-Meßröhrchen pipettiert; zusätzlich werden die ATP-Stammlösung und der Verdünnungspuffer (ATP = 0) mit 3mal 50 µL eingesetzt. Es wird empfohlen, die 33 Röhrchen in fallender Konzentration (fallende Messwerte) zu messen.

5. Die Durchschnittswerte der Dreifachmessungen der ATP-Standardkurve (y-Achse; logarithmisch) werden gegen die Verdünnungsstufen (linear) aufgetragen.

II.6.3 Auswertung

Die Wachstumshemmung (TGI: "Tumor Growth Inhibition") der Tumorprobe für jede Konzentration (TDC: Tumor Drug Concentration) einzelner Medikamente oder Kombinationen wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$\frac{1,0 - (TEST - MI)}{(MO - MI)} \times 100 = TGI(\%)$$

wobei

TEST = arithmetischer Mittelwert der drei Messwerte pro Konzentration eines Zytostatikums

MI = arithmetischer Mittelwert der zwölf Maximum-Inhibitor-Kontrollen,

MO = arithmetischer Mittelwert der zwölf Kontrollen ohne Zytostatika-Zusatz.

Niedrige Zellzahlen (entsprechend hoher zytostatischer/ zytozider Wirkung) ergeben hohe Hemmungen und umgekehrt. Die durch DCS/ Innovative Diagnostik Systeme zur Verfügung gestellte Auswertungssoftware benutzt die oben angegebene Gleichung.

Die Ergebnisse werden in einem Diagramm als Hemmkurven gegeneinander aufgetragen. Die Zytostatikakonzentrationen werden in Prozent auf der x-Achse, die relativen Wachstumshemmwerte (TGI) auf der y-Achse aufgetragen. Es ergeben sich hierdurch prozentuale Wachstumshemmkurven.

Es wird außerdem eine „Area-under-Curve“ berechnet nach der folgenden Formel:

$$AUC = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^{i=0} (x_{i+1} - x_i)(y_i + y_{i+1})$$

Die nachfolgenden Richtlinien sollten zur Beurteilung von Sensitivität und Resistenz einer Zellkultur gegenüber einem Zytostatikum zugrundegelegt werden:

Sensitivität wird durch hohe TGI- bzw. AUC-Werte angezeigt. Hohe Sensitivität wird durch erhöhte TGI-Werte auch im unteren Konzentrationsbereich wiedergegeben.

Notwendige Bedingung: die AUC muss einen Wert über 12.000 annehmen.

Resistenz wird durch niedrige TGI- bzw. AUC-Werte angezeigt. Starke Resistenz wird durch niedrige TGI-Werte auch im hohen Konzentrationsbereich wiedergegeben.

Notwendige Bedingung: die AUC-Werte liegen unterhalb von 12.000.

Die Feineinteilung der Sensitivität entsprechend der TGI-Werte ist in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Sensitivitätsniveau	Wachstumshemmung je Zytostatikakonzentration	
	200 % (Zytost.)	25 % (Zytost.)
nicht sensitiv (-)	kleiner 95 %	kleiner 50 %
schwach sensitiv (+)	kleiner 95 %	größer 50 %
mäßig sensitiv (++)	größer 95 %	50 – 70 %
sensitiv (+++)	größer 95 %	größer 70 %

Tabelle 8: Einteilung der Sensitivitätsniveaus laut ATP-TCA

II.6.4 Ausschluß

Es wurden Proben nicht berücksichtigt, wenn die Anzahl der „relativ light units“ geringer als 20.000 (MO-Wert) ausfiel, die MI/ MO-Ratio (maximaler Inhibitor/ biologische Negativkontrolle) geringer als 0,01 ausfiel, oder es Anzeichen für eine mikrobiologische Kontamination gab.

II.7 PJ-Färbung

II.7.1.1 Aufbau und Funktion des Durchflusszytometers

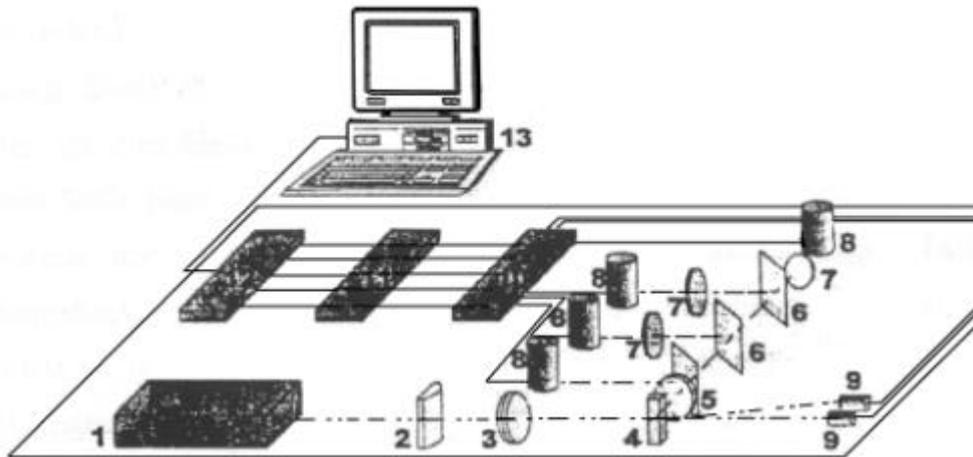


Abbildung 3: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers; Detailansicht der Meßkammer

Erklärungen für oben: 1=Laser, 2=Strahlerweiterung, 3=Fokussierlinse, 4=Meßkammer, 5=Sammellinse, 6=Teilerspiegel, 7=Lichtfilter, 8=Photomultiplier, 9=Photodiode, 10=Vorverstärker, 11=Impulsanalysatoren, 12=Analog-Digital-Konverter, 13=Datenverarbeitung

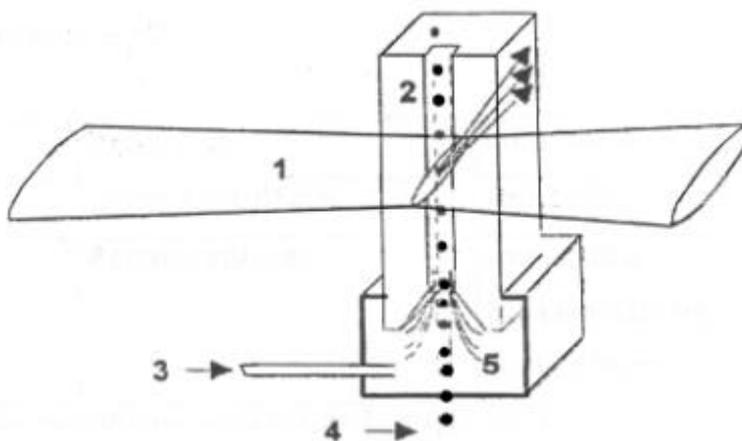


Abbildung 4: Schematischer Aufbau: angeschnittene Meßkammer

Erklärung für oben: 1=Laserstrahl, 2=Meßküvette, 3=Trägerflüssigkeit, 4=Zellsuspension, 5=hydrodynamische Fokussierung

Beim Kontakt eines Teilchens mit einem Lichtstrahl entstehen optische „Signale“ wie Reflexion, Streuung oder Fluoreszenz, die von einem Durchflusszytometer gemessen werden können. Dazu werden Zellen, die sich in einer Suspension befinden, durch ein Ansaugsystem in eine Meßküvette (Quarzküvette) geleitet, wo sie vom fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle beleuchtet werden (siehe Abb. 2). Durch eine Verengung des Kapillarquerschnitts werden die Zellen auf eine Geschwindigkeit von ca. 7m/sec beschleunigt. Durch die laminare Strömung in der Meßküvette wird gewährleistet, dass die Zellen als Einzelzellen wie Perlen an einer Perlenkette den Meßpunkt an einer definierten Stelle passieren („Hydrodynamische Fokussierung“). Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie in Abhängigkeit von ihren physikalischen Eigenschaften, wie Querschnittsfläche, Refraktionsindex, Struktur der Membran und intrazelluläre Bestandteile Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität (zum Aufbau des Durchflusszytometers siehe Abb.3). Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist im Kleinwinkelbereich (0-10°) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter [FSC]) am größten, ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter [SSC]).

Streulicht	Sensitiv für	Information
Vorwärtsstreulicht	Querschnittsfläche	Zellgröße
Seitwärtsstreulicht	Refraktionsindex	Granularität Membranfaltung Äußere Form

Tabelle 9: Informationsgehalt des Vorwärtsstreulichtes und des Seitwärtsstreulichtes

Durch Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen zellspezifische Oberflächenrezeptoren oder mit Farbstoffen, die intrazelluläre Strukturen anfärben, kann eine Klassifizierung von Zellgemischen erfolgen oder Populationen mit spezifischen Eigenschaften detektiert werden. Das optische Detektionssystem und die Elektronik erfassen sowohl die Fluoreszenz-, als auch die Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle.

Unter Fluoreszenz wird die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlen verstanden.

Fluoreszierende Verbindungen, sog. Fluorochrome, absorbieren Lichtenergie über einen vergleichsweise weiten, für sie jeweils charakteristischen Wellenlängenbereich. Diese Energie hebt die Elektronen auf ein höheres Energieniveau. Beim definierten Rücksprung zum Grundniveau emittiert das Elektron ein Photon. Fluoreszenz ist die Bezeichnung dieses Strahlenüberganges. Der Frequenzbereich, der eine fluoreszierende Verbindung anregen kann, ist das für den Farbstoff charakteristische Anregungs- bzw. Exzitationsspektrum. Dieses stimmt weitgehend mit dem Absorptionsspektrum überein. Bei der Rückkehr zum Grundniveau geht ein Teil der Energie in Form von Wärme verloren. Aus diesem Grund ist das gebildete Licht (Emissionsspektrum) energieärmer und damit langwelliger als das Anregungslicht.

Lichtquellen, die in der Durchflusszytometrie eingesetzt werden sollen, müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllen:

- eine hohe Intensität besitzen, um ausreichende Fluoreszenz- und Streulichtsignale zu erzeugen.
- ein Emissionsspektrum im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe besitzen.
- eine konstante Strahlungsleistung gewährleisten.

Geeignete Lichtquellen sind Bogenlampen und Laser, wobei der Laser inzwischen die weiteste Verbreitung gefunden hat. Der Laser emittiert Licht, das monochromatisch und von hoher Energiedichte ist. Das Licht selbst muß gerichtet und kohärent sein. Kohärent bedeutet, dass die Lichtwellen gleichphasig und von einheitlicher Amplitude sind. In den meisten Durchflusszytometern ist ein Argonlaser mit einer 488-nm-Emissions-Linie eingebaut, da zunehmend mehr Fluorochrome für diesen Anregungsbereich zur Verfügung stehen. Die weiteren Emissionslinien werden durch eingebaute Filter ausgeschaltet.

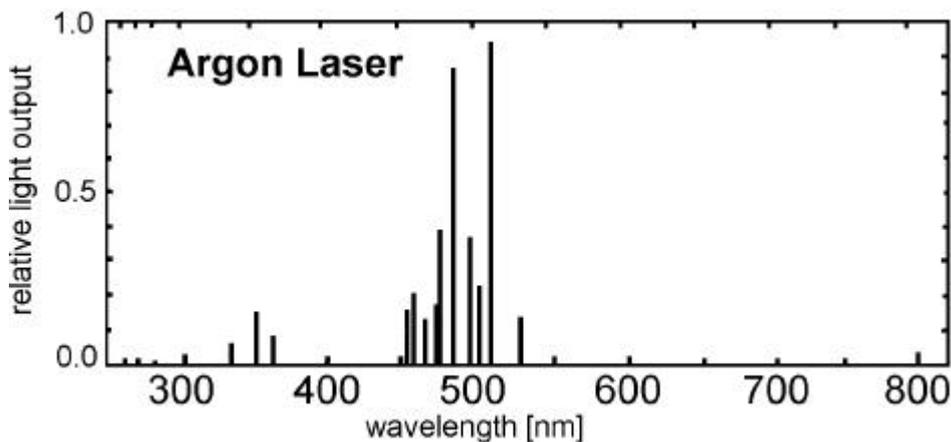


Abbildung 5: Linienspektrum eines Argonlasers

Die Signalumwandlung erfolgt durch Photodetektoren, die die optischen Signale in elektrische Pulse konvertieren, deren Höhe mit der Höhe des Lichtsignals korreliert. Es finden hierbei zwei verschiedene Systeme von Photodetektoren Verwendung: Photoröhren (photomultiplier tube, PMT) und Photodioden. Eine Photodiode erzeugt eine elektrische Spannung, sobald Photonen auf die licht-sensitive Photokathode treffen. Sie funktioniert ohne eine externe Spannungsquelle. Photodioden finden zur Messung vergleichsweise intensiver Lichtsignale, wie beim Vorwärtsstreulicht, Verwendung.

Photoröhren werden zur Verstärkung der wesentlich schwächeren Fluoreszenz- und Seitwärtsstreulichtsignale eingesetzt.

II.7.1.2 Einstellung und Auswertung

Moderne Durchflusszytometer eröffnen verschiedene Anwendungsmöglichkeiten, wie z.B. mit der Mehrfarben-Fluoreszenzanalyse zur Charakterisierung einzelner Zellpopulationen. Dazu stehen eine Reihe verschiedener Farbstoffe zur Verfügung. Sie können mit Oberflächenantikörpern gekoppelt werden und so spezifische zelluläre Antigene detektieren; dadurch können z.B. zur Apoptosebestimmung Annexin V und BrDU mit dem Farbstoff Fluorescein (FITC) gekoppelt und zur Anfärbung apoptotischer Zellen eingesetzt werden. Es gibt auch Farbstoffe wie Propidiumjodid, die bestimmte intrazelluläre Strukturen wie die DNA anfärben.

Die Voraussetzung für die korrekte Identifizierung relevanter Zellpopulationen, ist eine exakte Einstellung des Gerätes anhand einer ungefärbten Negativkontrolle vor der eigentlichen Einmessung. Hierbei erfolgt zunächst eine Anpassung der physikalischen Parameter SSC und FSC, sowie ein Nullabgleich der Fluoreszenzkanäle zum Ausschluß von unspezifischer Fluoreszenz (zB. Autofluoreszenz der Zelle).

Die Farbstoffe werden entsprechend ihrer Emissionswellenlänge in bestimmten Fluoreszenzkanälen eingemessen und die Signalverstärkung bei jeder Probenmessung so gewählt, das die gesuchte/n Population/en gut in der gewählten Einstellungs- und Auswertungsgraphik erkennbar sind.

Bei Mehrfarbenmessung muß u.U. eine Überlappung der Emissionsspektren der gewählten Farbstoffe beachtet werden und durch Kompensation vor der eigentlichen Probemessung rechnerisch korrigiert werden. Da die Mehrfarbenmessung im Rahmen dieser Arbeit nicht genutzt wurde, wird hier nicht näher auf diese Problematik eingegangen.

II.7.1.3 Einstellungen des Durchflusszytometers

II.7.1.3.1 Allgemeines zur Einmessung und Auswertung

Sowohl für die Gerätegrundeinstellung als auch für die Auswertung werden die Proben in einem Koordinatensystem nach ein oder zwei Parametern gegeneinander aufgetragen. Daraus ergibt sich bei nur einem Parameter ein Histogramm, in welchem die Häufigkeitsverteilung im jeweiligen Fluoreszenzkanal abgebildet wird. Bei zwei gegeneinander aufgetragenen Parametern ergibt sich ein sogenannter dot blot.

Im dot blot werden die Zellen einzeln meist in Form von Punktwolken (Messpunkte=dots) abgebildet. Diese Punktwolken bilden die Populationen ab, die in bestimmten Parametern (z.B. Anfärbung und Granularität) übereinstimmen. Die gesuchten Populationen lassen sich durch sogenannte Gates isolieren, deren Lage manuell vom Auswerter bestimmt wird. Die in den Gates eingegrenzten Messereignisse können in Bezug zu allen eingemessenen Ereignissen (events) gesetzt werden oder durch Verknüpfung mehrerer Gates ins Verhältnis zueinander.

Bei der Geräteeinstellung wird zunächst in dem Messkanal, der dem Farbstoff zugeordnet ist (in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge des Farbstoffs), die Verstärkung des Fluoreszenzsignals so eingestellt, dass die gesuchte Population gut im Bild ist. Dann können unerwünschte Partikel ausgeschlossen werden, indem ein Schwellenwert der sogenannte Threshold eingestellt wird. Er wird mit Hilfe einer ungefärbten Zellsuspension eingestellt. Alle Partikel, die Impulse unterhalb des Schwellenwertes erzeugen, werden dadurch automatisch von der Analyse ausgeschlossen. Durch diesen Ausschluss irrelevanter Daten wird die Menge an relevanten Messereignissen erhöht. Dann folgt die Probeneinmessung.

II.7.1.3.2 Allgemeines zur ausgewählten Messmethode

Die Verwendung von Propidiumjodid in der Durchflußzytometrie erstreckt sich von der klassischen Vitalitätsprüfung bis hin zur quantitativen DNA-Analyse einzelner Zellen. Dabei können über die Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellen u.a. Aussagen bzgl. der Zellzyklusphase oder der Apoptose getroffen werden.

Die in dieser Arbeit heran gezogene Methode zur Apoptosebestimmung wurde nach Nicoletti et al. ausgeführt [44] und in der Auswertung leicht modifiziert nach Maciorowski et al. [39]

Die Zellen wurden mit Propidiumjodid gefärbt, welches ein in die DNA-interkalierender Farbstoff ist. Es kann dabei eine intakte Zellmembran nicht passieren und wird daher auch zur Vitalitätsprüfung eingesetzt.

Um die Abnahme des DNA-Materials in einer Zelle zu ermitteln, ist es erforderlich dem Farbstoff mit Hilfe eines Lysepuffers die Passage durch die Membran zu ermöglichen. Dann kann unter Zuhilfenahme von weiteren physikalischen Messparametern wie dem SideScatter, als Maß für die Granularität, eine Population bestimmt werden.

Die gesuchte Population der Normalzellen kann, bedingt durch den ähnlichen DNA-Gehalt zum einen und die relativ schwache Granularität zum anderen, eingegrenzt werden. Geringerer DNA-Gehalt und erhöhte Granularität durch die DNA-Kondensation sind typische Merkmale apoptotischer Zellen. Sie zeichnen sich durch niedrige SSC-Werte und niedrige Fluoreszenz aus.

II.7.1.4 Extraktion und Messung

II.7.1.4.1 Probenpräparation/ Anfärbung

Nach der Probeninkubationszeit von 4 bzw. 5 Tagen (abhängig von der Zellherkunft) wurde die Zellsuspension einer Zytostatikakonzentration aus der jeweiligen Reihe der Mikrotiterplatten pipettiert und in einem Röhrchen vereinigt. Somit wurden pro Zytostatikum 8 Röhrchen der Konzentrationsreihe s.o. gewonnen, die bei 200 x g für 15 Minuten abzentrifugiert wurden.

Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, verworfen und der Rückstand in 1,5 ml PBS resuspendiert und erneut bei 200 x g für 15 Minuten abzentrifugiert.

Das PBS wurde abgenommen, verworfen und die Zellen in dem hypotonischem Färbepuffer resuspendiert.

Dabei wurden pro Probe 200 µl Färbepuffer zugegeben und bei 4° C vor Licht geschützt über Nacht inkubiert und dann eingemessen. Die Messung mußte innerhalb von 24 Stunden erfolgen. Zur Auswertung wurden nur Proben herangezogen, die eine Vitalität von mindestens 60% nach der Inkubation aufwiesen. (Im Ergebnisteil werden zwei Proben mit schlechter Vitalität gesondert vorgestellt, um auf die Auswertbarkeit näher einzugehen.)

Zur Voreinstellung des Gerätes wurde eine Probe mit Normallymphozyten parallel gefärbt und vor den eigentlichen Proben eingemessen.

II.7.1.4.2 Zusammensetzung des Färbepuffers:

50 µg/ml Propidiumjodid in 0,1% Natriumcitratlösung plus 0,1% Triton X-100, Sigma (dabei werden pro 100.000 Zellen 100 µl Färbepuffer eingesetzt)

II.7.1.4.3 Geräteeinstellung/ Einmessung:

Für die Einmessung und Auswertung wurde folgende Darstellung gewählt:

DNA-Gehalt: x-Achse FL2-H (PJ-Färbung) gegen y-Achse SSC (Granularität)
(FL2-H entspricht dem Messkanal für PJ-Färbung)

Es wurden folgende Kontrollen durchgeführt

Methodische Positivkontrolle:

- Probe von Normallymphozyten zur Bestimmung der Lage der Normalzellen im FL2-H vs SSC-dot blot
- Zur Voreinstellung des Thresholds ungefärbte beads der Firma Becton Dickinson

Methodische Negativkontrolle:

- In Lysepuffer (0,1%igem Natriumcitratpuffer mit 0,1% Triton X-100) suspendierte, ungefärbte Tumorzellen

Biologische Negativkontrollen:

- In Nährlösung mitinkubierte Tumorzellen ohne Behandlung mit voller Anfärbung

II.7.1.5 Grundeinstellung:

Die Grundeinstellung wurde entsprechend der Vorgabe von Nicoletti et al.

vorgenommen und durch die Darstellung im Dot blot erweitert wie von

Maciorowski et al. vorgeschlagen (siehe Abb.4) [44].

In der Grundeinstellung werden zuerst ForwardScatter (FSC) und SideScatter (SSC) auf lineare Einmessung eingestellt.

Die Fluoreszenzverstärkung des Fluoreszenzkanals (FH-L2) wird in

logarithmischem Einmessungsmodus eingestellt. Die logarithmische Einstellung

erhöht die Signal-Schärfe.

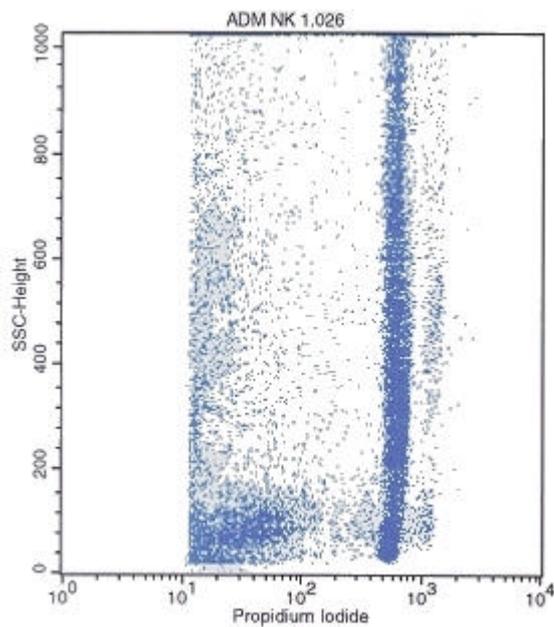


Abbildung 6: Grundeinstellung des Durchflusszytometers; Dot blot mit DNA-Gehalt auf der x-Achse und Granularität (=SSC) auf der y-Achse; nach Einmessung ungegatedet

- Mit Hilfe einer ungefärbten Tumorzell-Negativkontrolle werden zunächst FSC und SSC so eingestellt, dass die Population gut im Bild ist.
- Die Einstellung der Fluoreszenzverstärkung wird in einem Dot blot mit PJ als x-Achse und SSC als y-Achse vorgenommen. Hier wird die Lage der G₁-Population im PJ vs SSC-dot blot mit einer Normallymphozyten- Kontrolle gut sichtbar voreingestellt. (Die Normallymphozyten bilden besonders einheitliche G₁-Populationen und eignen sich daher zur Grundeinstellung)
- Mit einer komplett ungefärbten Negativkontrolle wird der Threshold (Schwellenwert) so eingestellt, dass ungefärbte Partikel nicht eingemessen werden.
- Dann erfolgt eine Probenmessung. Es werden pro Probe 20.000 - 25.000 events eingemessen.

II.7.1.6 Auswertung:

Die Auswertung orientiert sich im wesentlichen an der von Maciorowski et al. gewählten zweidimensionalen Darstellung im Dot blot mit PJ als x- Achse und SSC als y-Achse.

Dabei werden größere Zelltrümmer durch ein Gate ausgeschlossen während kleinere unterhalb des Thresholds liegen. Zelltrümmer zeichnen sich aus durch einen sehr niedrigen SSC-Wert (geringe Granularität) und geringe, unspezifische PJ-Anfärbung. Durch das Ausgaten werden die Zelltrümmer quantitativ nicht mehr weiter berücksichtigt.

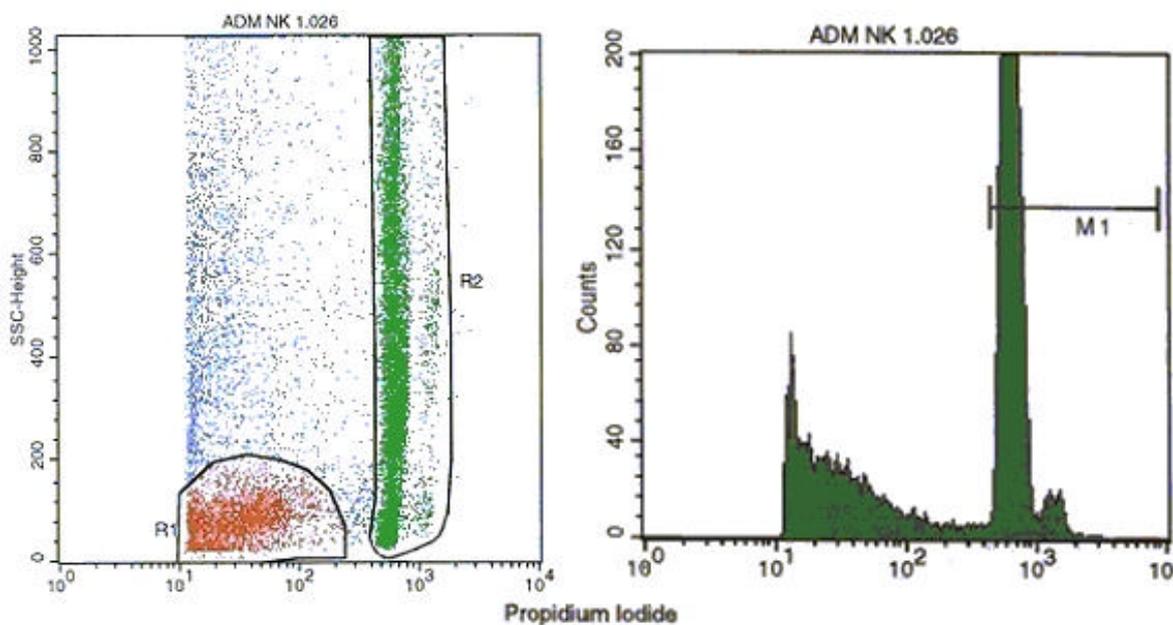


Abbildung 7: Ausgaten der Trümmer; rechts Dot blot DNA-Gehalt/ Granularität; links identische Probe abgebildet im Histogramm.

Im Dot blot links wurden Zelltrümmern rot eingegatetet in R1 und Normalzellen grün eingegatetet in R2. Die blaue Fraktion außerhalb der Gates R1 und R2 bildet die apoptotischen Zellen ab.

Im Histogramm rechts wurde die Fraktion der Normalzellen durch den Marker M1 eingegrenzt. Unterhalb des Markers M1 sind die apoptotischen Zellen angesiedelt

Danach wird die Normalpopulation in Gate 2 eingegated. Die hier identifizierte Population umfasst sowohl die Zellen der G1-Phase als auch der G2-Phase. Die in Gate 2 liegende Population der Normalzellen wird für jede Probe quantitativ ausgewertet.

Die verbleibenden Zellen, die außerhalb von Gate1 (Zelltrümmer) und Gate 2 (Normalzellen) liegen, sind die apoptotische Fraktion der Probe. Die Auswertung ist in Abb. 6 sowohl im Dot blot als auch im Histogramm exemplarisch dargestellt. Danach wird für jede Probe die prozentuale Anzahl der Normalzellen - und ihre Abnahme durch Behandlung - bestimmt. Im Umkehrschluss kann auf die Zunahme der in die Apoptose gegangenen Zellen geschlossen werden (Die Summe dieser beiden Populationen ergibt daher für jede Probe immer 100%).

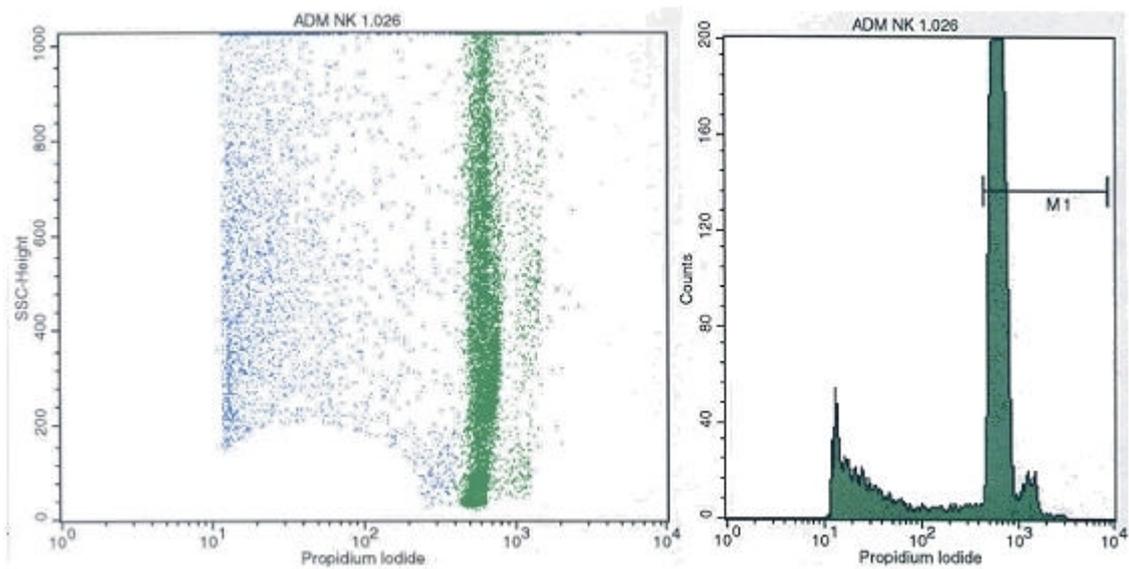


Abbildung 8: quantitative Bestimmung der Normalzellfraktion; links Dot blot DNA-Gehalt/Granularität; rechts identische Probe im Histogramm

Im Dot blot links lassen sich die in R 2 bestimmten Normalzellen prozentual ins Verhältnis den blau abgebildeten, (apoptotischen) Zellen setzen

Die Zelltrümmer aus R1 wurden hier ausgegätet und rechnerisch nicht mehr berücksichtigt.

Das Histogramm rechts zeigt ebenfalls die Normalpopulation im Markerbereich von M1 und die apoptotischen Zellen darunter abzüglich der in R2 ausgegäteten Trümmer.

Wegen der besseren Übersichtlichkeit wurden die Umrandungen der Gates in diesem Dot blot weggelassen.

II.7.2 Bestimmung der Hemmwerte

Die Hemmwerte der Apoptosemessung mit PJ werden folgendermaßen berechnet:

Anzahl der Normalzellen aus R2 für die unbehandelte Negativkontrolle in Prozent
 $= A_N$

Auf jeder Platte wurden zwei unbehandelte Negativkontrollen mitinkubiert, deren Mittelwert jeweils der Berechnung für A_N zu Grunde gelegt wurde

Anzahl der Normalzellen für die mit Zytostatika behandelten Proben in Prozent =
 A_P

$A_P / A_N \times 100 =$ Prozent Hemmung durch Behandlung

Auswertung:

Die nach der oben angegebenen Rechnung ermittelten Hemmwerte wurden in einem Koordinatensystem - mit den Zytostatikakonzentrationen in abfallender Reihenfolge auf der x-Achse und der prozentualen Wachstumshemmung auf der y-Achse eingetragen. Danach wurde deren AUC ermittelt.

Die Hemmkurven und deren AUC wurden mit denen der ATP-TCA-Messung verglichen.

Im folgenden Auswertungsteil werden Wachstumskurven wie oben beschrieben verwendet. Die AUC der Hemmkurven wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt .

II.7.3 Ausschluß

Da sich die Hemmwerte (durch Zytostatikaeinwirkung) auf die Größe der Normalpopulation beziehen, mußte die unbehandelte Kontrollpopulation mindestens 60% vitale Normalzellen bei der Auswertung erreichen.

Andernfalls verstärken sich Fehler im Berechnungsquotienten unverhältnismäßig.

Eine schlechte Grundvitalität der Zellen wirft zudem die Frage auf, ob die Zellen noch regulär reagieren oder z.B. auf schädigende Einflüsse stärker.

Weiterhin mußte eine Anzahl von mindestens 10.000 „events“ - also relevanten Messereignissen - erreicht werden.

III. Ergebnisse

III.1 Vergleich der Testsysteme ATP-TCA und PJ-Färbung

III.1.1 Vorversuche: Kulturzellen

Die vorliegenden Zellkulturversuche dienten zunächst der Überprüfung der allgemeinen Eigenschaften der PJ-Färbung als ex-vivo Testmethode. Bei der Kultivierung der Zellen wurden deren Standardwachstumsbedingungen beibehalten.

Es hat sich in früheren Versuchen gezeigt, dass Zell-Linien stärker sensitiv auf Chemotherapeutika reagieren als Zellen aus originärem Gewebe [11].

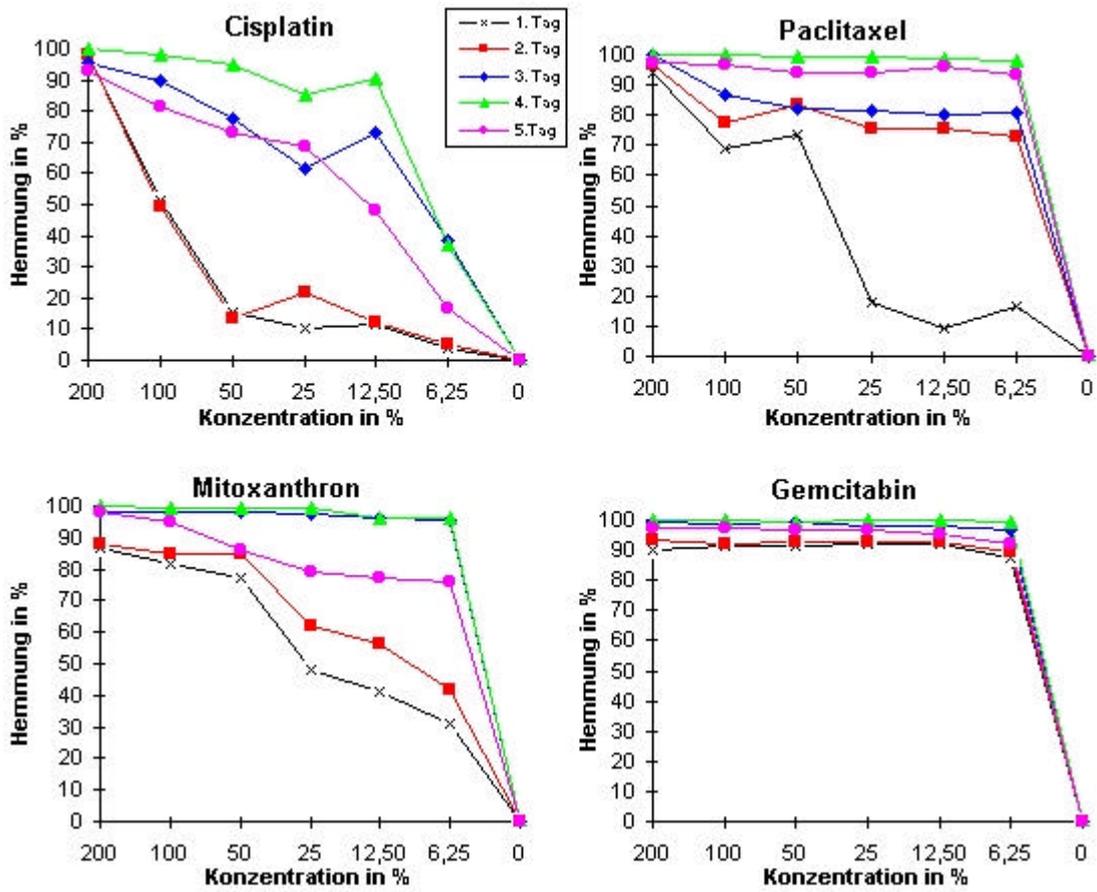
III.1.1.1 Zeitabhängigkeit

III.1.1.1.1 ZIEL:

Es sollte der optimale Messzeitpunkt für die Kulturen von OVCAR 29- und SKOV 3 mit 4 Zytostatika bestimmt werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Hemmkurven und dazugehörigen AUC-Werte der PJ-Messung an den Tagen 1-5 für die Zelllinien OVCAR 29- und SKOV 3.

III.1.1.1.2 Grafische Darstellung für Zeitabhängigkeit: OVCAR 29-



Grafik 1: Hemmkurven für Zeitverlauf von OVCAR 29- mit PJ-Färbung (Tage 1-5: siehe Legende)

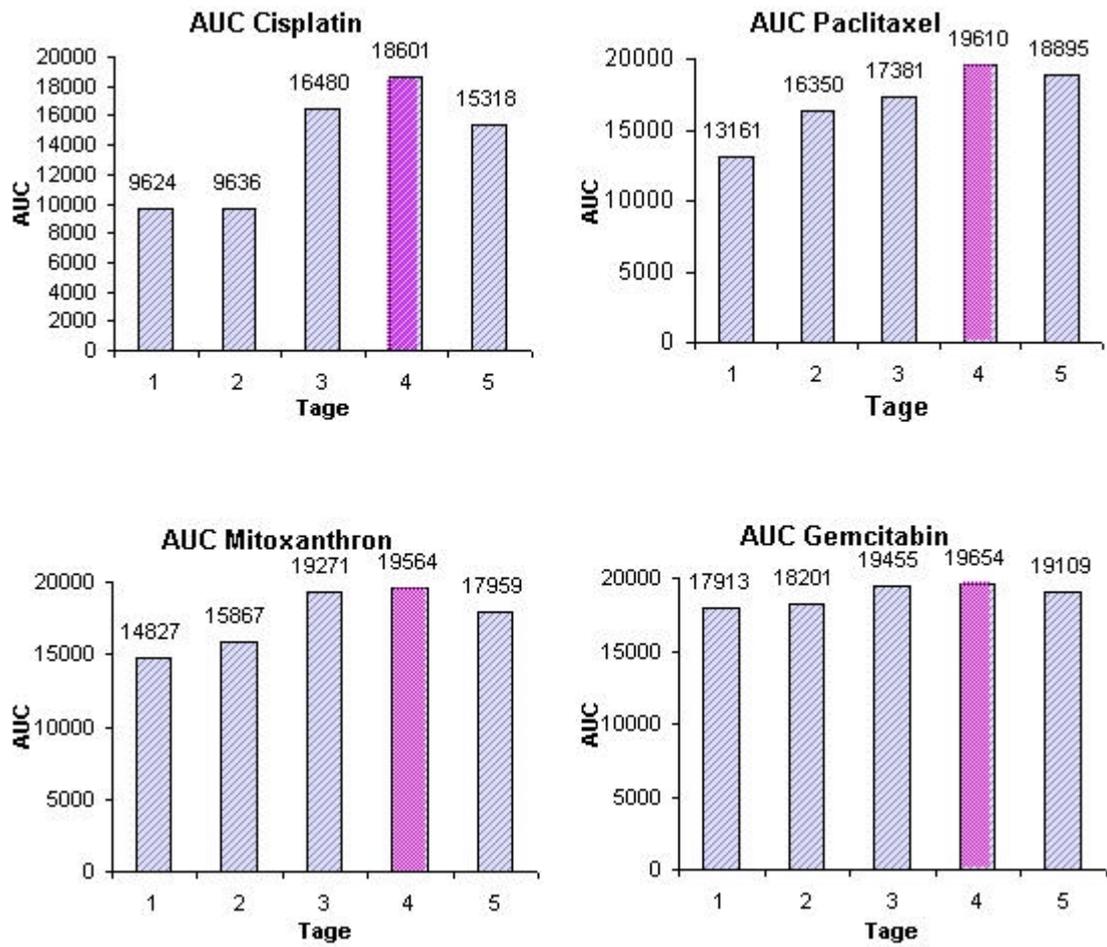


Diagramm 1: AUC-Vergleich der Zeitverlaufskurven für OVCAR 29- mit PJ-Färbung

(Tage 1-5 siehe Legende)

III.1.1.1.3 Grafische Darstellung für Zeitabhängigkeit: SKOV 3

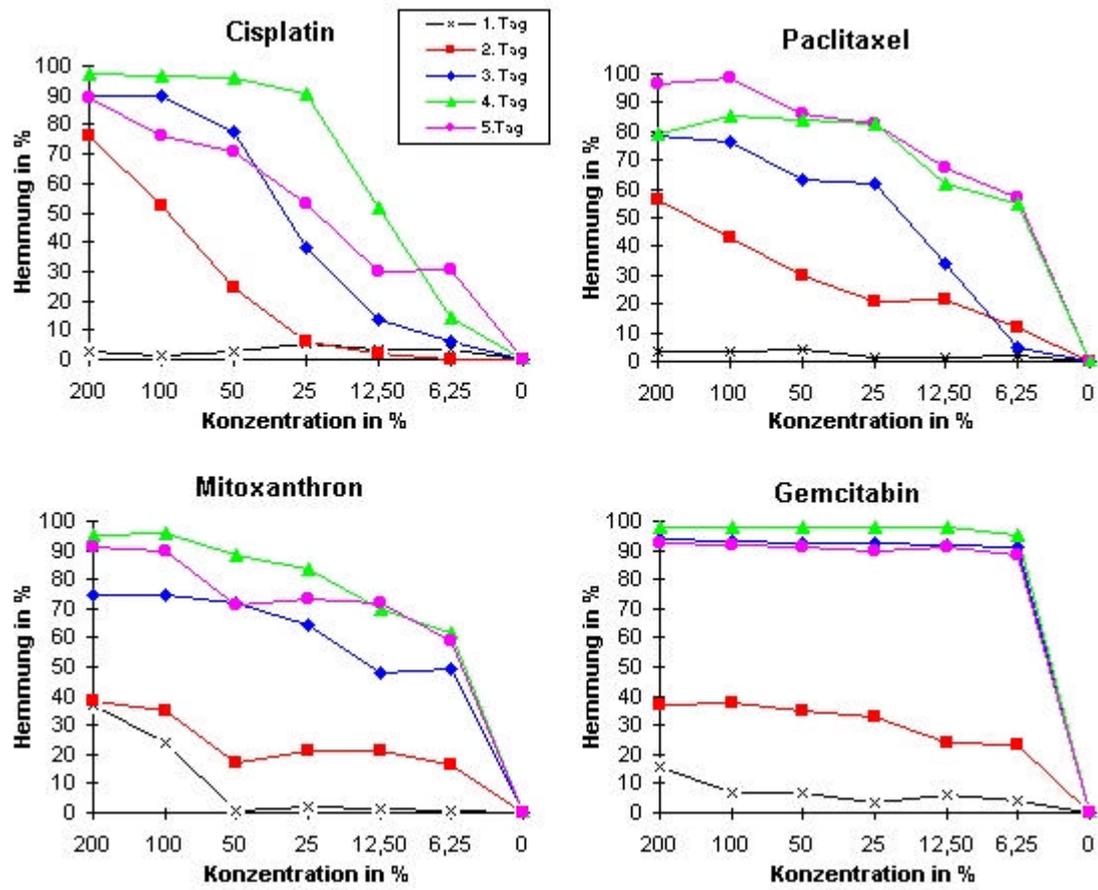


Diagramm 2: Hemmkurven für Zeitverlauf von SKOV 3 für PJ-Färbung (Tage 1-5: siehe Legende)

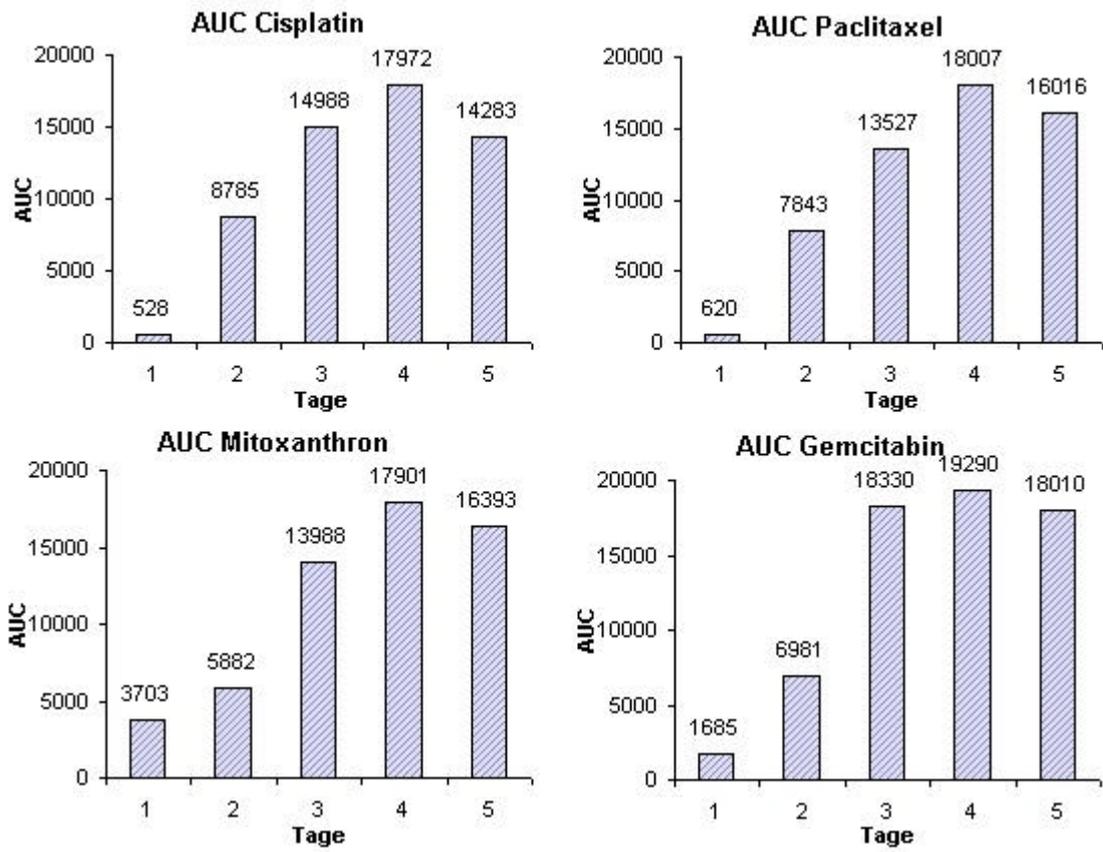


Diagramm 3: AUC-Vergleich der Zeitverlaufskurven für SKOV 3 mit PJ-Färbung

(Tage 1-5 siehe Legende)

III.1.1.2 ERGEBNIS für OVCAR 29- und SKOV 3 :

Sowohl die Hemmkurven als auch die Höhe der dazugehörigen AUC-Werte lassen für beide Zelllinien und alle Medikamente erkennen, dass der optimale Zeitpunkt zur Messung der Proben nach 96h erreicht ist.

Der Abfall der AUC-Werte nach 96h kann vermutlich durch Nachlassen der Vitalität und Überschreiten der maximalen Reaktionszeitspanne erklärt werden.

III.1.1.3 Streuung der Ergebnisse

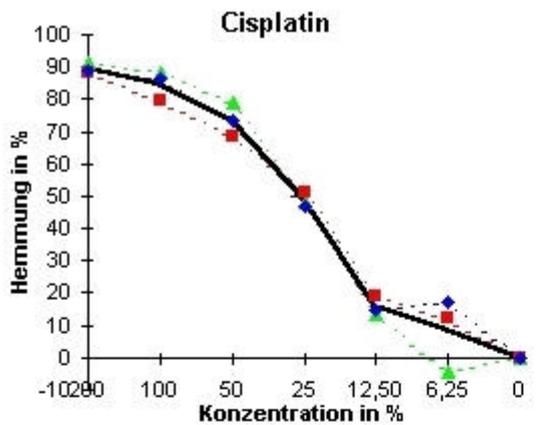
III.1.1.3.1 ZIEL:

Bestimmung der Reproduzierbarkeit bzw. der Abweichung:

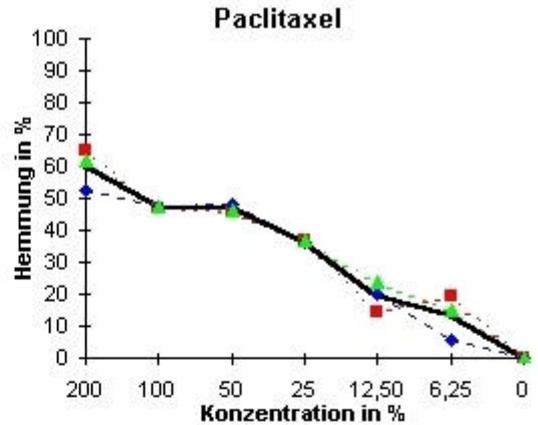
Es wurden die quantitativen Abweichungen bei Mehrfachpräparation unter identischen Rahmenbedingungen ermittelt, um einen Überblick über die methodische Streuung der PJ-Färbung zu erhalten.

Dazu wurden 3-fach Ansätze der Zellkulturen OVCAR 29-, SKOV 3 und A 2780 parallel präpariert, 96h inkubiert, nacheinander eingemessen und ausgewertet. Alle Zellkulturen wurden mit 6 Zytostatika behandelt. Die Ergebnisse sind in den Grafiken 2, 3 und 4 dargestellt. Die gestrichelten Linien repräsentieren die Einzelmessungen, die fettgedruckte Linie jeweils die Mittelwertkurve. Unterhalb der Grafik ist der Mittelwert der Standardabweichung der einzelnen Messpunkte angegeben.

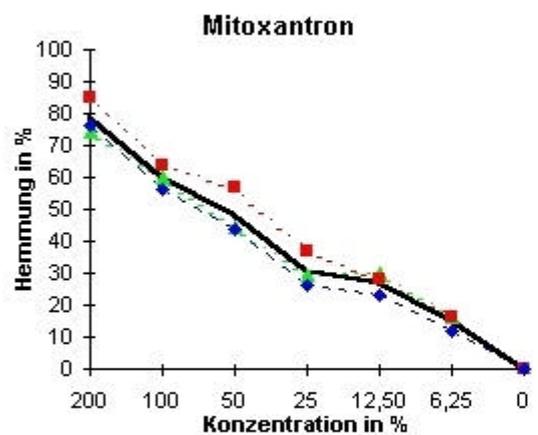
III.1.1.3.2 GRAFIK: Streuung der Ergebnisse OVCAR 29-



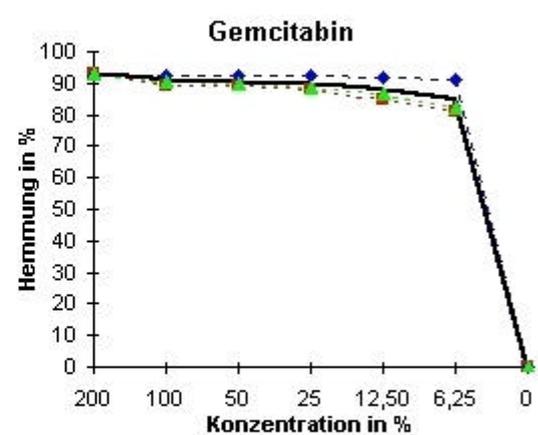
Mittlere Standardabweichung für Cisplatin: 4,72



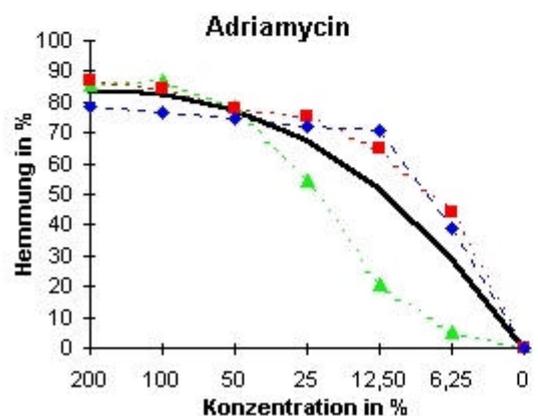
Mittlere Standardabweichung für Paclitaxel: 3,34



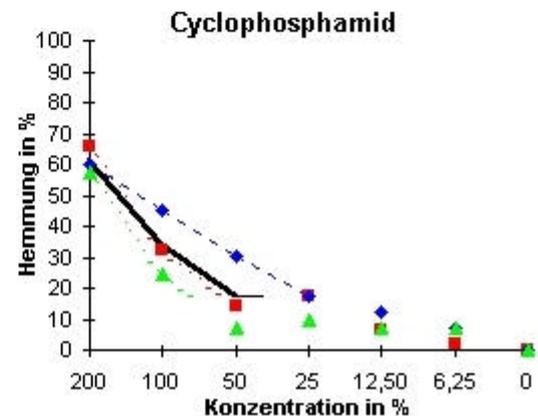
Mittlere Standardabweichung für Mitoxantron: 4,81



Mittlere Standardabweichung für Gemcitabin: 2,56



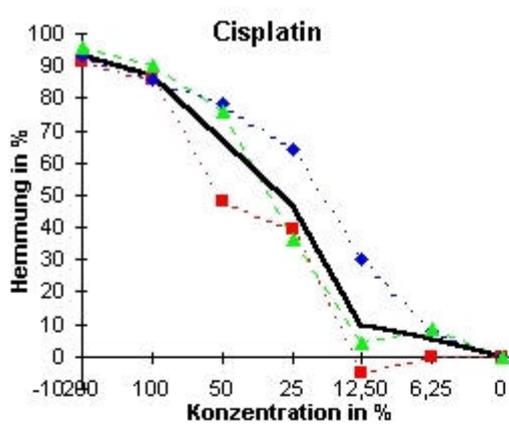
Mittlere Standardabweichung für Adriamycin: 12,03



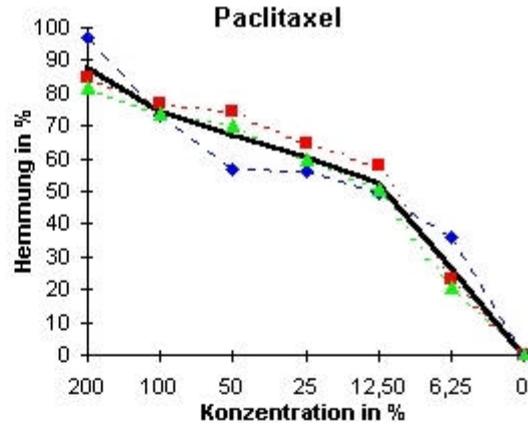
Mittlere Standardabweichung für Cyclophosphamid: 6,22

Grafik 2: Streuung der Ergebnisse für OVCAR 29-: Kurven aus dreifachen Inkubationsansätzen und Einmessung mit PJ; gestrichelten Linien zeigen Einzelmessungen, fettgedruckte Linie jeweils die Mittelwertkurve.

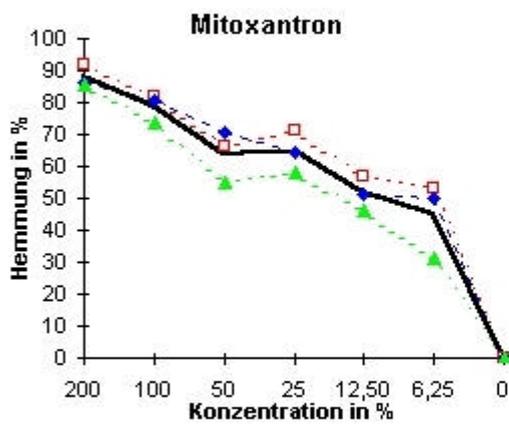
III.1.1.3.3 GRAFIK: Streuung der Ergebnisse SKOV 3



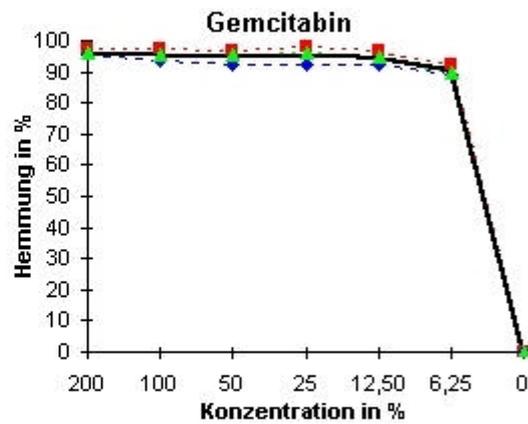
Mittlere Standardabweichung für Cisplatin: 9,91



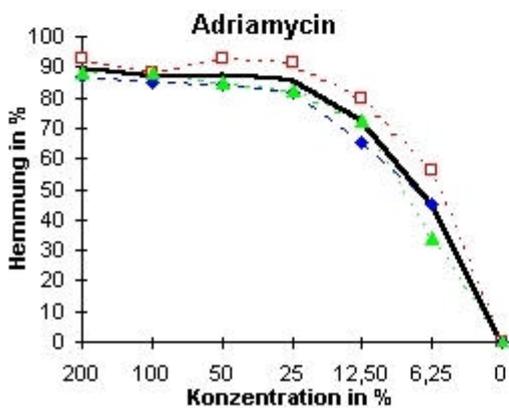
Mittlere Standardabweichung für Paclitaxel: 6,04



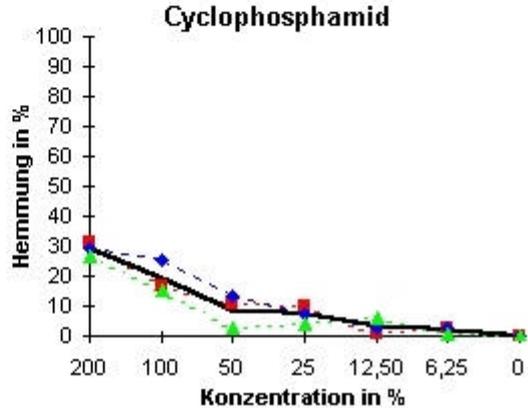
Mittlere Standardabweichung für Mitoxantron: 6,53



Mittlere Standardabweichung für Gemcitabin: 2,03



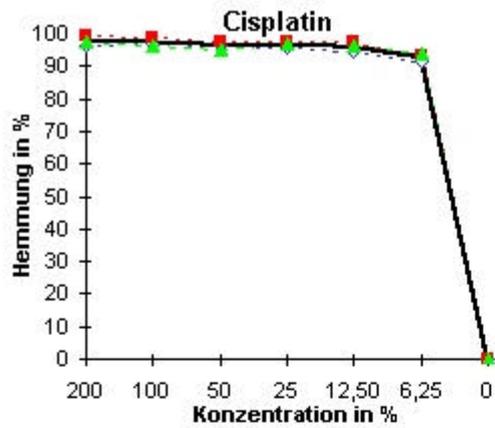
Mittlere Standardabweichung für Adriamycin: 5,59



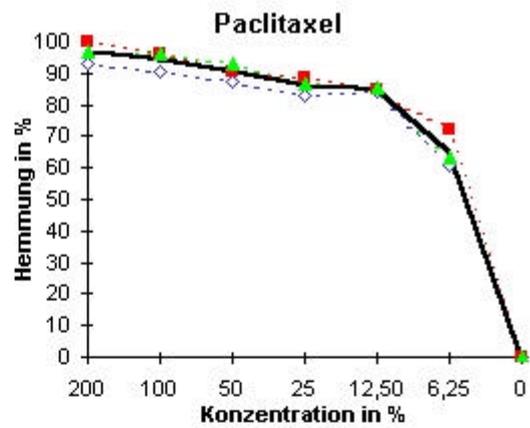
Mittlere Standardabweichung für Cyclophosphamid: 3,41

Grafik 3: Streuung der Ergebnisse für SKOV 3 (n=3); Kurven aus dreifachen Inkubationsansätzen und Einmessung mit PJ; gestrichelten Linien zeigen Einzelmessungen, fettgedruckte Linie jeweils die Mittelwertkurve.

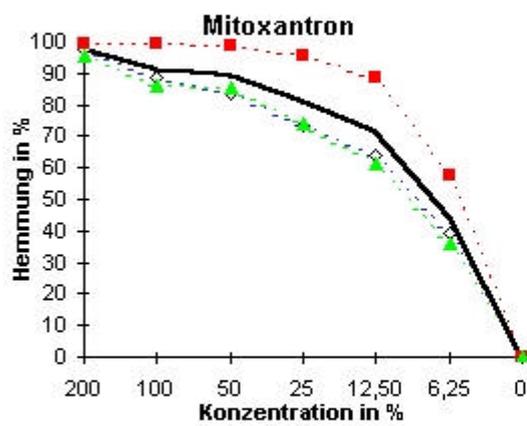
III.1.1.3.4 GRAFIK: Streuung der Ergebnisse A2780



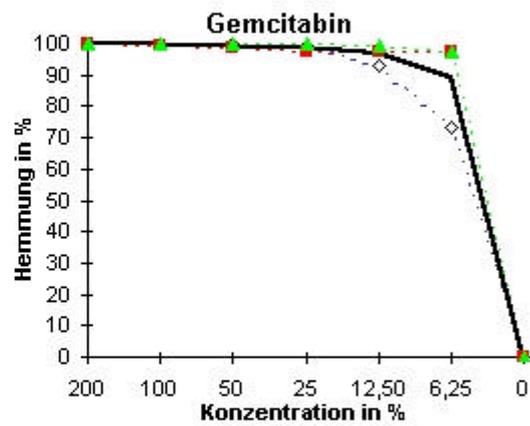
Mittlere Standardabweichung für Cisplatin: 1,17



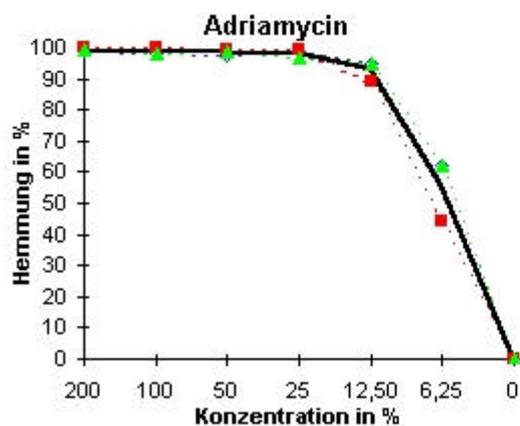
Mittlere Standardabweichung für Paclitaxel: 3,17



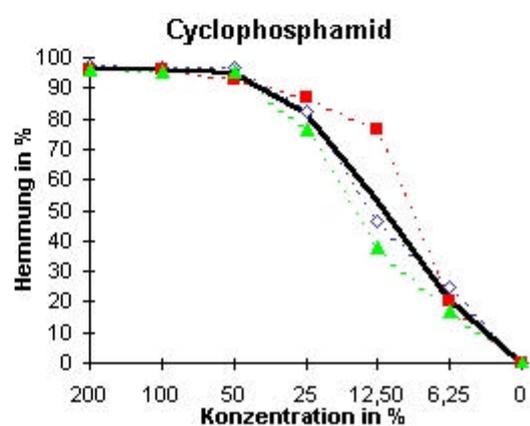
Mittlere Standardabweichung für Mitoxantron: 9,35



Mittlere Standardabweichung für Gemcitabin: 3,26



Mittlere Standardabweichung für Adriamycin: 2,95



Mittlere Standardabweichung für Cyclophosphamid: 5,47

Grafik 4: Streuung der Ergebnisse für A 2780 (n=3); Kurven aus dreifachen Inkubationsansätzen und Einmessung mit PJ; gestrichelten Linien zeigen Einzelmessungen, fettgedruckte Linie jeweils die Mittelwertkurve.

III.1.1.3.5 ERGEBNIS

Die Angabe der mittleren Standardabweichung für jedes Zytostatikum zu jeder Zelllinie ist unterhalb der Hemmkurven abzulesen.

Für die Zytostatika im Einzelnen, bestimmt aus dem arithmetischen Mittelwert der drei Zelllinien, wird im Folgenden eine Übersicht gegeben:

1. Cisplatin mittlere Standardabweichung: 5,27
2. Paclitaxel mittlere Standardabweichung: 4,18
3. Mitoxantron mittlere Standardabweichung: 6,90
4. Gemcitabin mittlere Standardabweichung: 2,62
5. Adriamycin mittlere Standardabweichung: 6,86
6. Cyclophosphamid mittlere Standardabweichung: 5,03

III.1.2 Hauptversuche

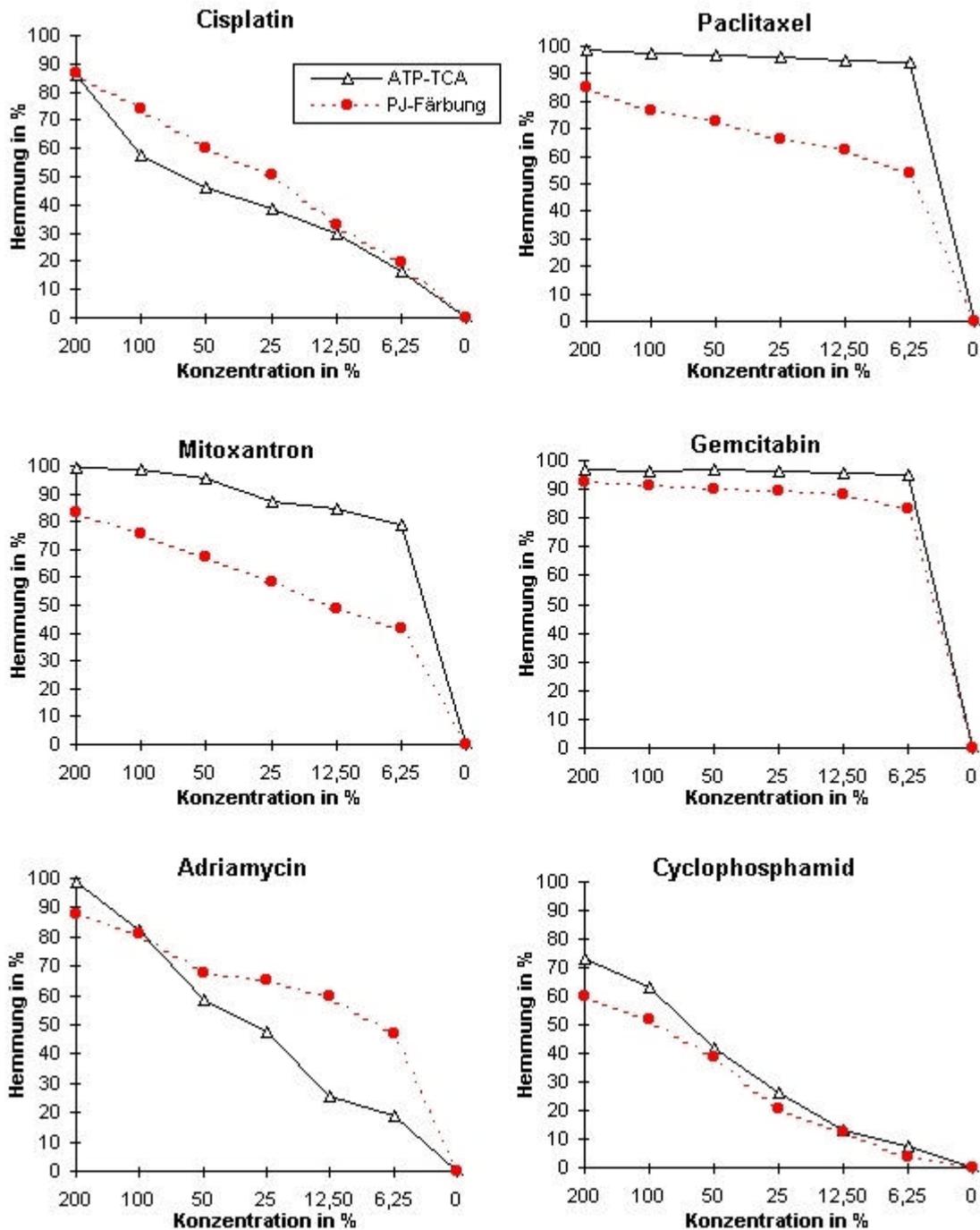
III.1.2.1 Methodenvergleich mit Ovarialkarzinom-Zelllinien

III.1.2.1.1 Einzelsubstanzen

III.1.2.1.1.1 ZIEL:

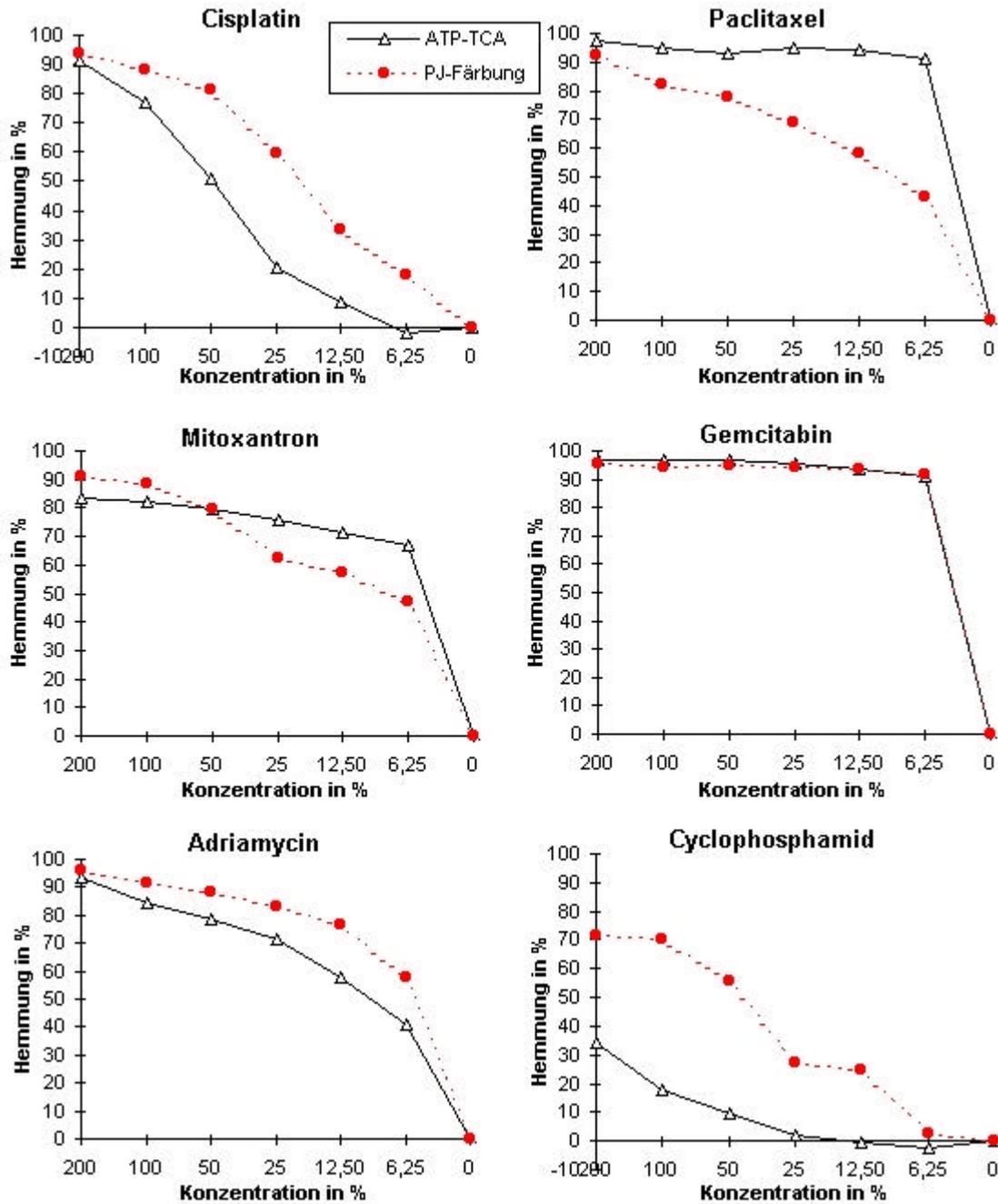
Es sollte die quantitative Übereinstimmung von PJ-Analysen mit parallel inkubierten ATP-TCAs bestimmt werden. Dazu wurden aus fünf aufeinander folgenden Passagen der jeweiligen Zellkulturen je ein Ansatz für die PJ-Färbung und einer für den ATP-TCA unter identischen Bedingungen inkubiert. Danach wurden die Proben eingemessen und die jeweiligen Hemmkurven (Mittelwerte aus den 5 Ansätzen) sowie deren AUC`s gegenüber gestellt.

III.1.2.1.1.2 GRAFIK: Quantitativer Vergleich der Hemmwerte von ATP-TCA und PJ-Färbung; OVCAR 29- (n=5)



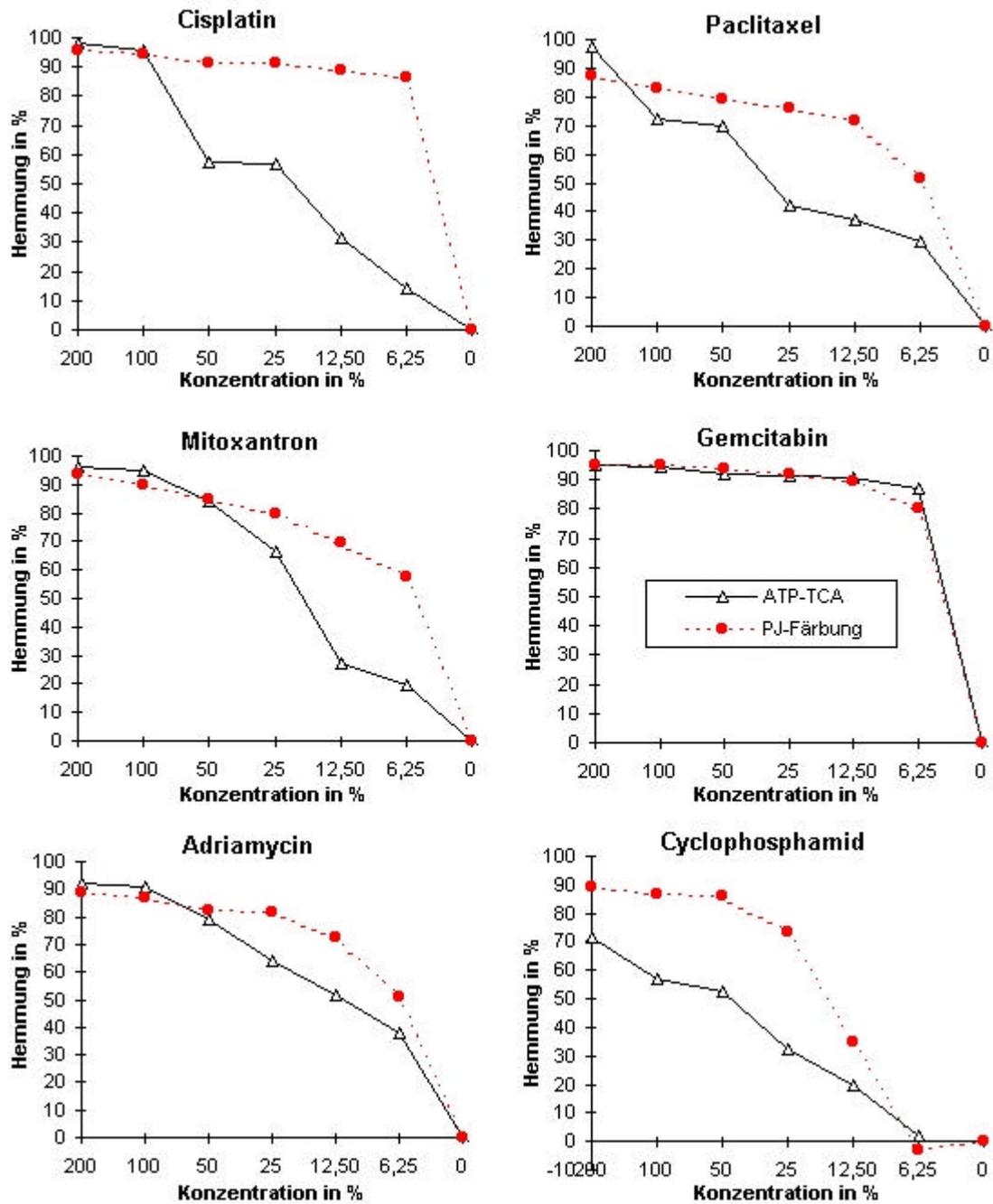
Grafik 5: Hemmkurven OVCAR 29-: Mittelwerte aus 5facher Bestimmung von ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung

III.1.2.1.1.3 GRAFIK Quantitativer Vergleich der Hemmwerte von ATP-TCA und PJ-Färbung; SKOV 3 (n=5)



Grafik 6: Hemmkurven SKOV 3-: Mittelwerte aus 5facher Bestimmung von ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung

III.1.2.1.1.4 GRAFIK: Quantitativer Vergleich der Hemmwerte von ATP-TCA und PJ-Färbung; A 2780 (n=5)



Grafik 7: Hemmkurven A 2780-; Mittelwerte aus 5facher Bestimmung von ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung

III.1.2.1.1.5 Diagramm 4: Vergleich der AUC-Werte der Hemmkurven von ATP-TCA und PJ-Färbung (Mittelwerte, n=5) für die Zelllinien OVCAR 29-, SKOV 3 und A 2780

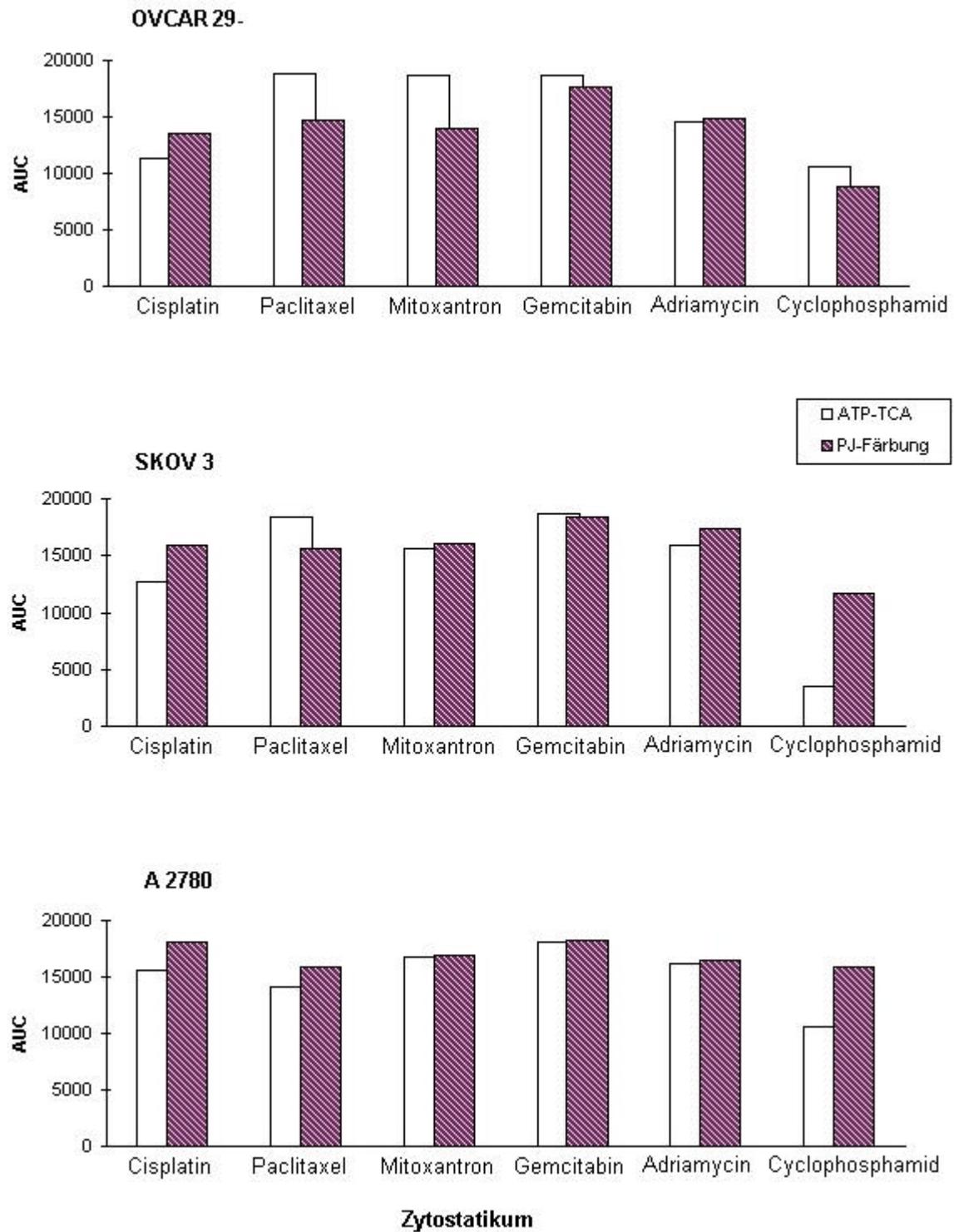


Diagramm 4: Vergleich der AUC-Werte der Hemmkurven für die Zelllinien OVCAR 29-, SKOV 3 und A 2780

III.1.2.1.1.6 ERGEBNIS:

Die Verläufe der Hemmkurven waren überwiegend parallel. Für die Zelllinie A 2780 waren die stärksten Abweichungen voneinander zu beobachten.

Erstaunlicherweise wurden mit PJ-Färbung z.T. stärkere Reaktionen gemessen als mit ATP-TCA. Dies ist offenbar teilweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass bei hoher Wachstumsgeschwindigkeit im ATP-TCA auch negative Hemmwerte (also ein Wachstumsvorteil) gemessen wurden. Diese Negativwerte senkten das Niveau der Mittelwertkurven stark ab. Die Vermutung wird dadurch bestärkt, dass die Anzahl abweichender Kurven zunahm in der Reihenfolge der Proliferationsraten der einzelnen Zelllinien.

OVCAR 29- hatte die niedrigste Proliferationsaktivität und zeigte bei den Kurvenverläufen wie auch den AUC-Werten die höchste Übereinstimmung mit den zu erwarteten Werten. SKOV 3 mit etwas höherer Proliferationsaktivität wich in den Tests deutlich stärker von den zu erwarteten Werten ab. Bei A 2780 zeigte sich ein klarer Wachstumsvorteil bei niedrigen Zytostatikakonzentrationen gegenüber der Negativkontrolle, der nur in-vitro zu beobachten sein dürfte. Dieses Phänomen nahm mit der Anzahl der Passagen und der damit verbundenen Proliferationsbeschleunigung deutlich zu.

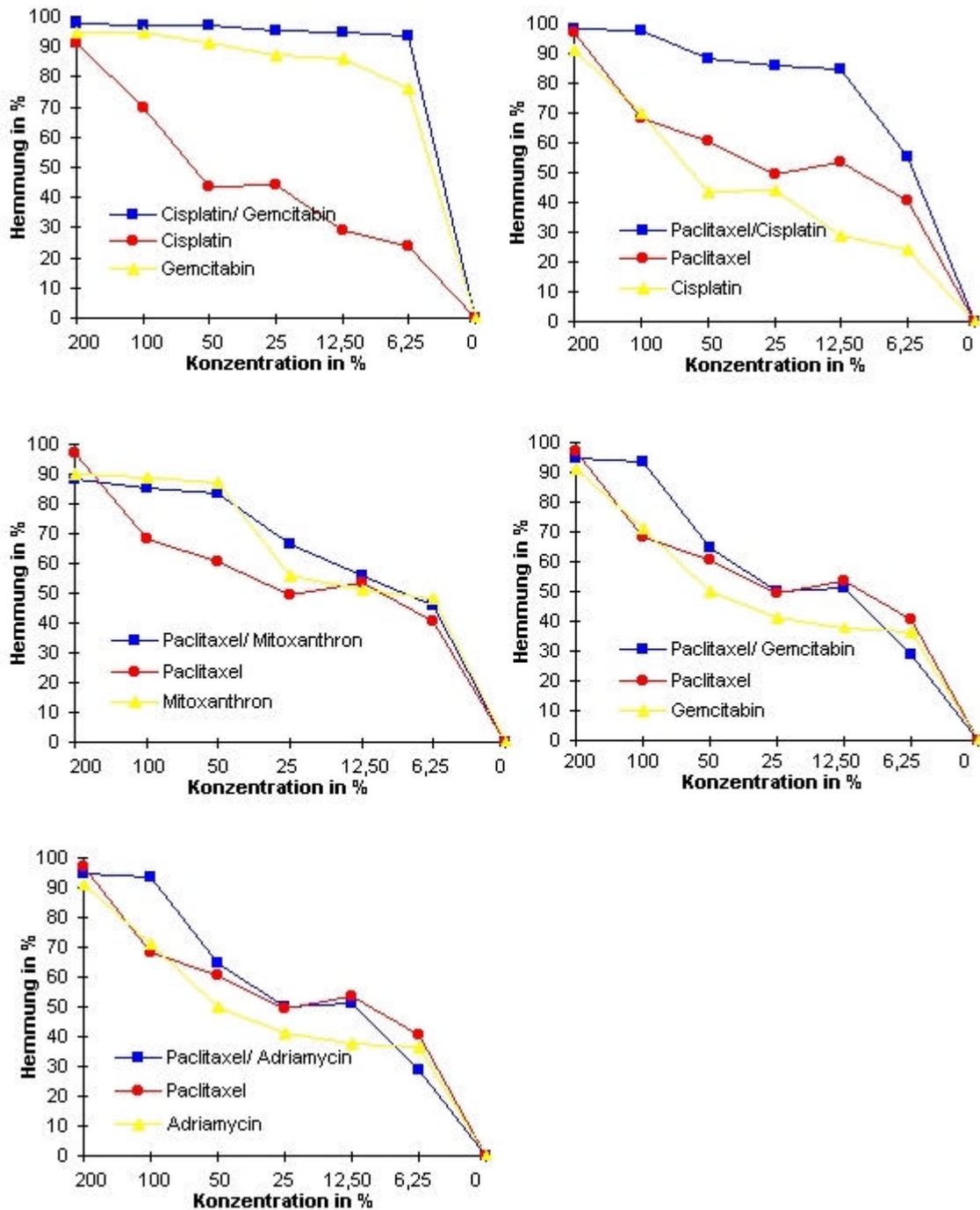
Fazit aus den Beobachtungen war, dass eine Inkubation in serumfreiem Milieu nicht nur zum Ausschluß von Normalzellen bei Patientenmaterial von Bedeutung ist. Eine durch fetales Kälberserum verursachte Proliferationsaktivierung scheint zu einer frühen Absterbephase der unbehandelten Zellen und damit zu möglicherweise falschen Aussagen zu führen.

III.1.2.1.2 Substanzkombinationen

III.1.2.1.2.1 ZIEL:

Es sollte ein Vergleich der Apoptoseinduktion durch Einzelsubstanzen gegenüber Substanzkombinationen gezogen werden. Dazu wurden in allen drei Zellkulturen parallel jeweils die Einzelsubstanzen sowie bestimmten Kombinationen inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 96h wurden die Proben mit PJ-gefärbt und das Ausmaß der Apoptoseaktivität anhand der Hemmkurven und ihrer AUC`s verglichen.

III.1.2.1.2.2 Substanzkombinationen: GRAFIKEN für OVCAR 29-



Grafik 8: Apoptosebestimmung mit PJ-Messung OVCAR 29-; Hemmkurven aus der Behandlung mit Einzelsubstanzen und deren Kombinationen im Vergleich.

III.1.2.1.2.3 Substanzkombinationen: OVCAR 29- AUC-Vergleich

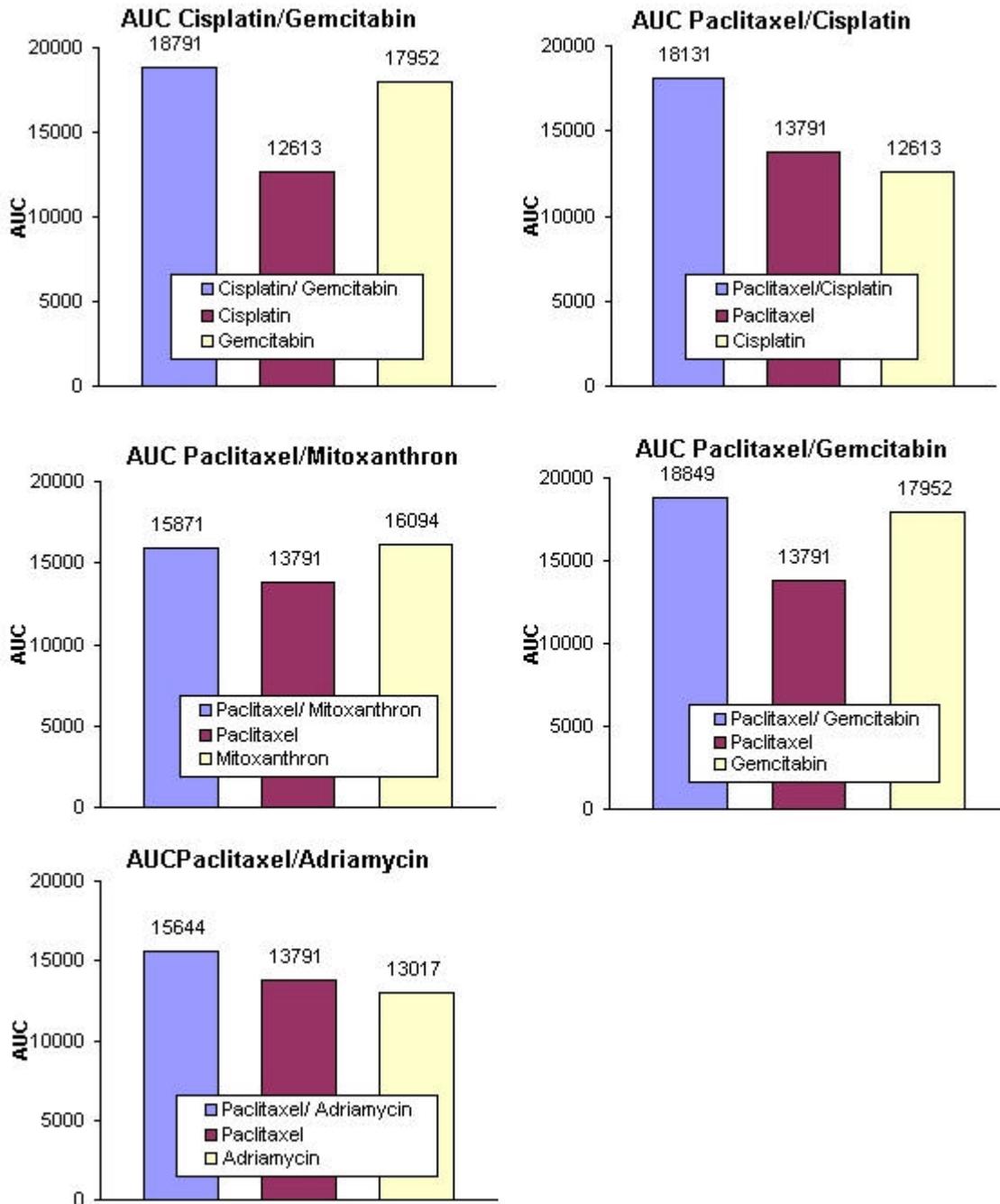
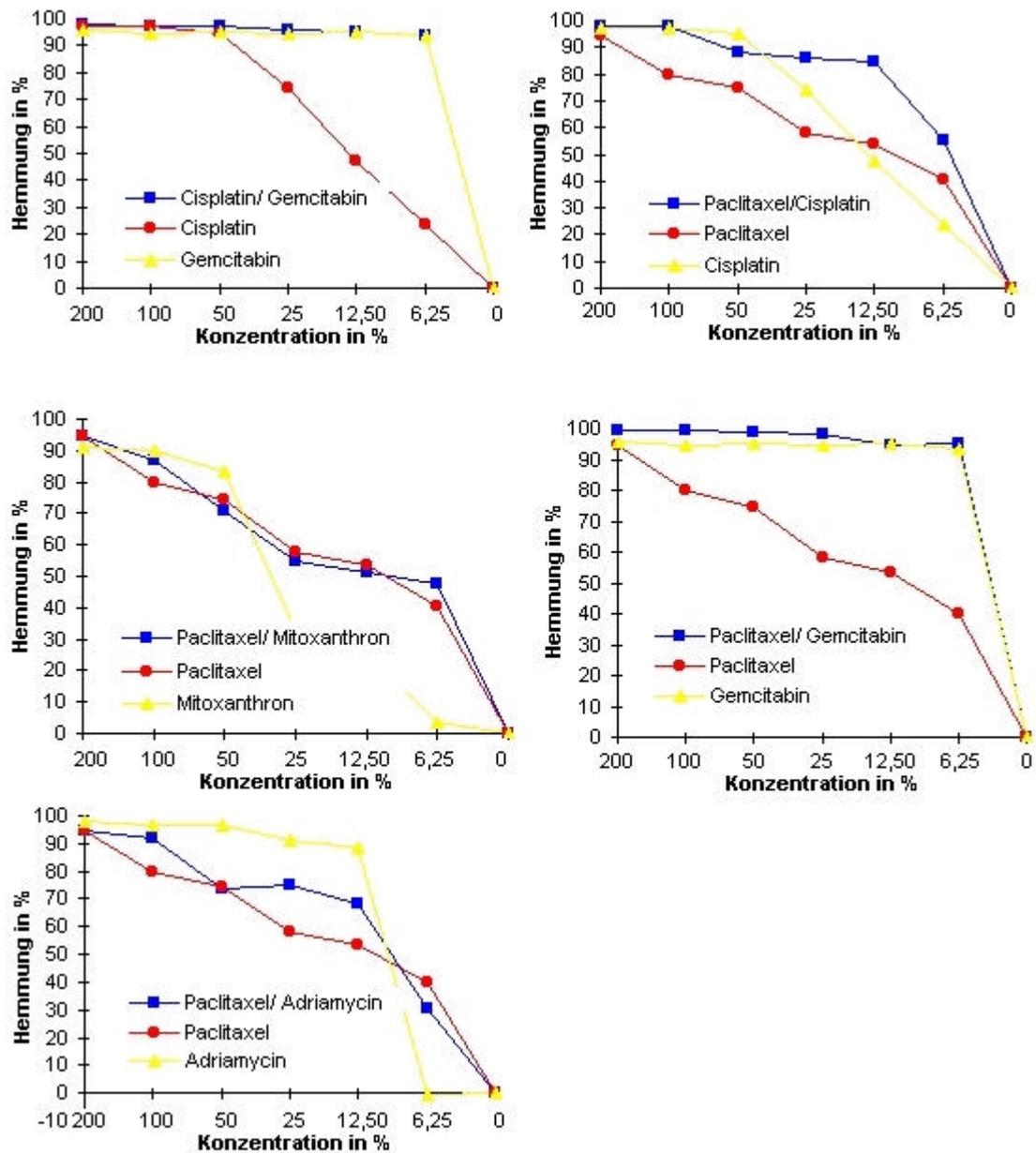


Diagramm 5: Apoptosebestimmung mit PJ-Messung OVCAR 29- ;AUC der Hemmkurven aus der Behandlung mit Einzelsubstanzen und deren Kombinationen im Vergleich.

III.1.2.1.2.4 Substanzkombinationen: GRAFIKEN für SKOV 3



Grafik 9: Apoptosebestimmung mit PJ-Messung SKOV 3; Hemmkurven aus der Behandlung mit Einzelsubstanzen und deren Kombinationen im Vergleich.

III.1.2.1.2.5 Substanzkombinationen: SKOV 3 AUC-Vergleich

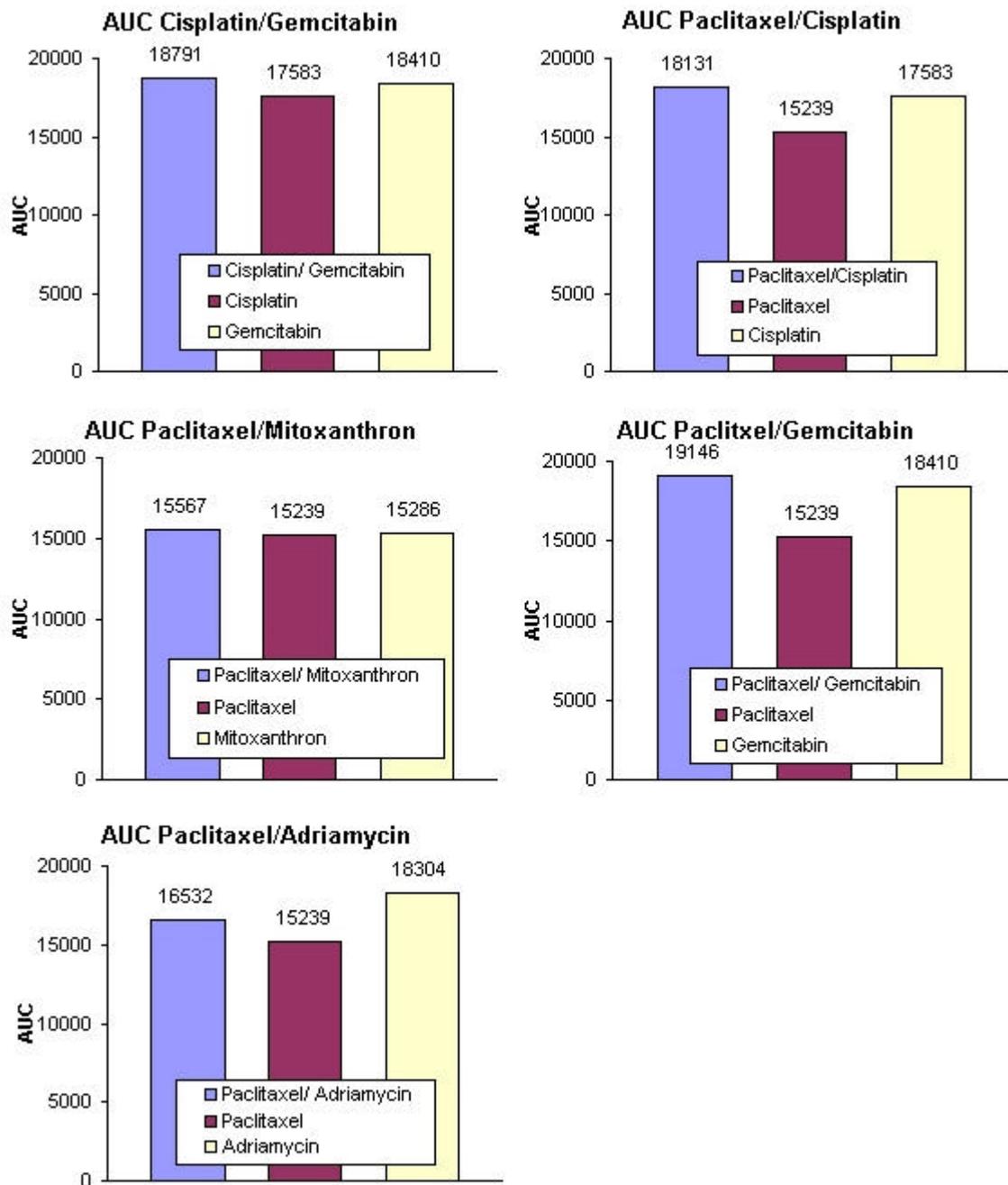
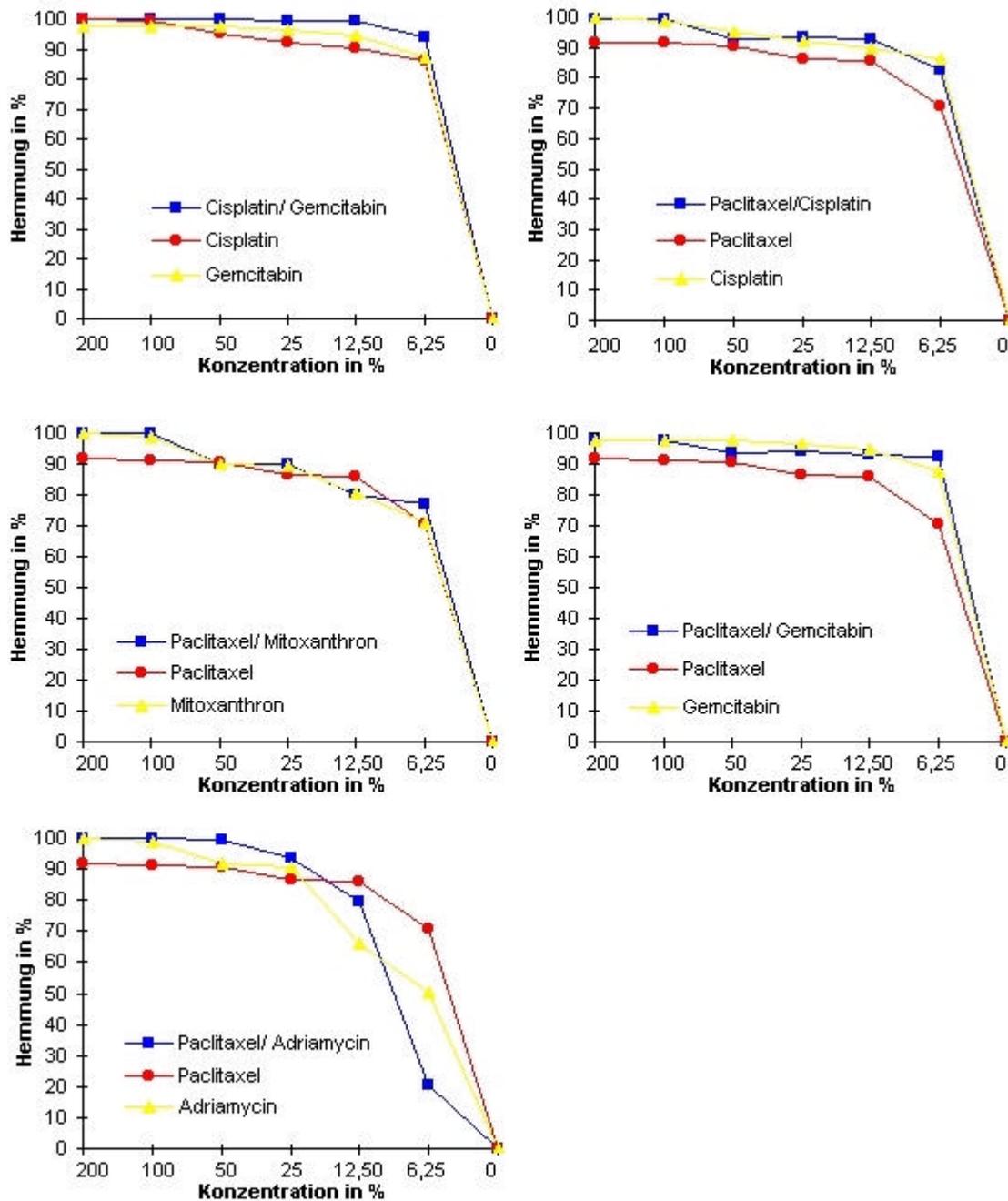


Diagramm 6: Apoptosebestimmung mit PJ-Messung SKOV 3; AUC der Hemmkurven aus der Behandlung mit Einzelsubstanzen und deren Kombinationen im Vergleich.

III.1.2.1.2.6 Substanzkombinationen: GRAFIKEN für A 2780



Grafik 10: Apoptosebestimmung mit PJ-Messung A 2780: Hemmkurven aus der Behandlung mit Einzelsubstanzen und deren Kombinationen im Vergleich.

III.1.2.1.2.7 Substanzkombinationen: A2780 AUC-Vergleich

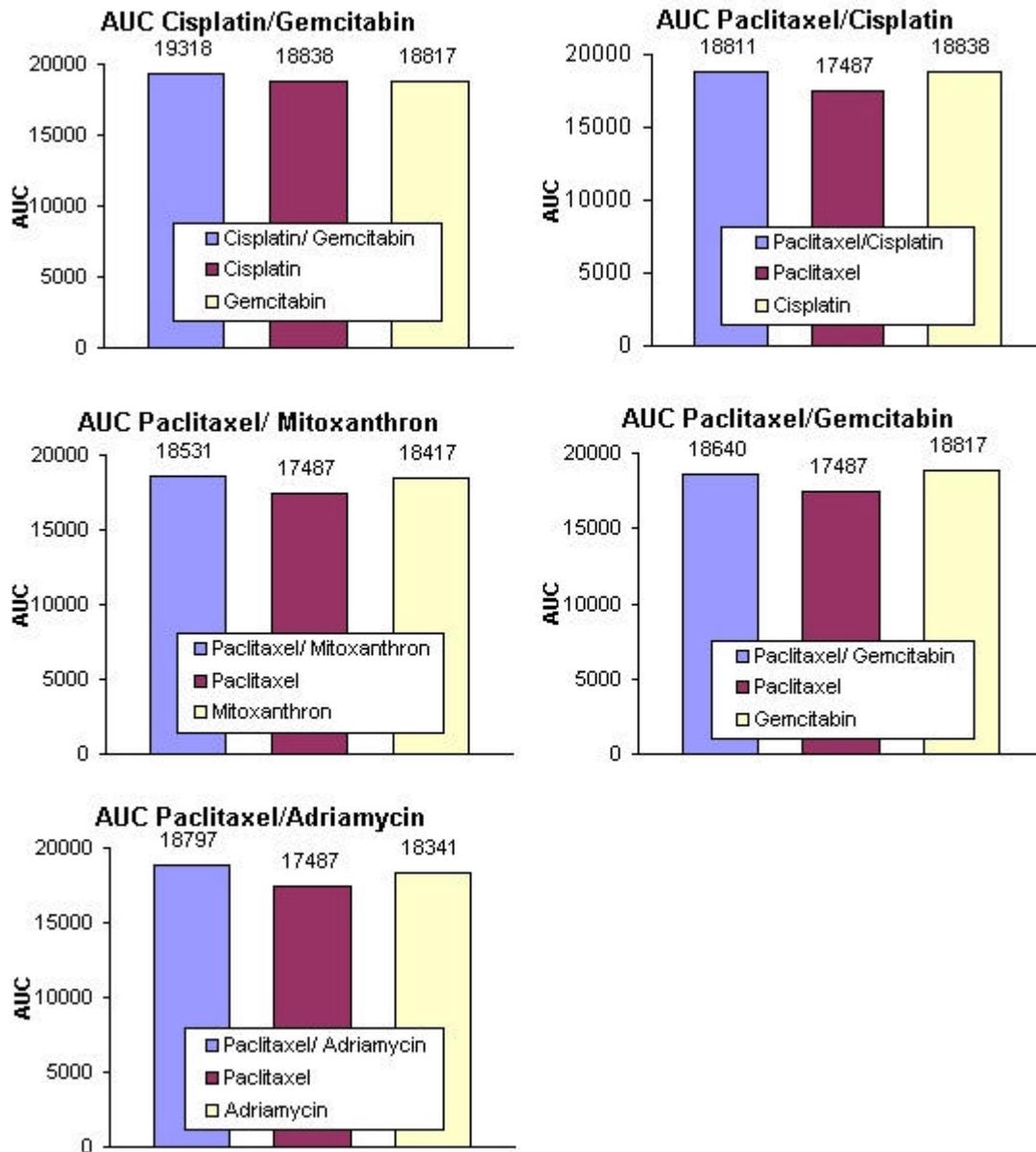


Diagramm 7: Apoptosebestimmung mit PJ-Messung A 2780; AUC der Hemmkurven aus der Behandlung mit Einzelsubstanzen und deren Kombinationen im Vergleich.

III.1.2.1.2.8 ERGEBNISSE:

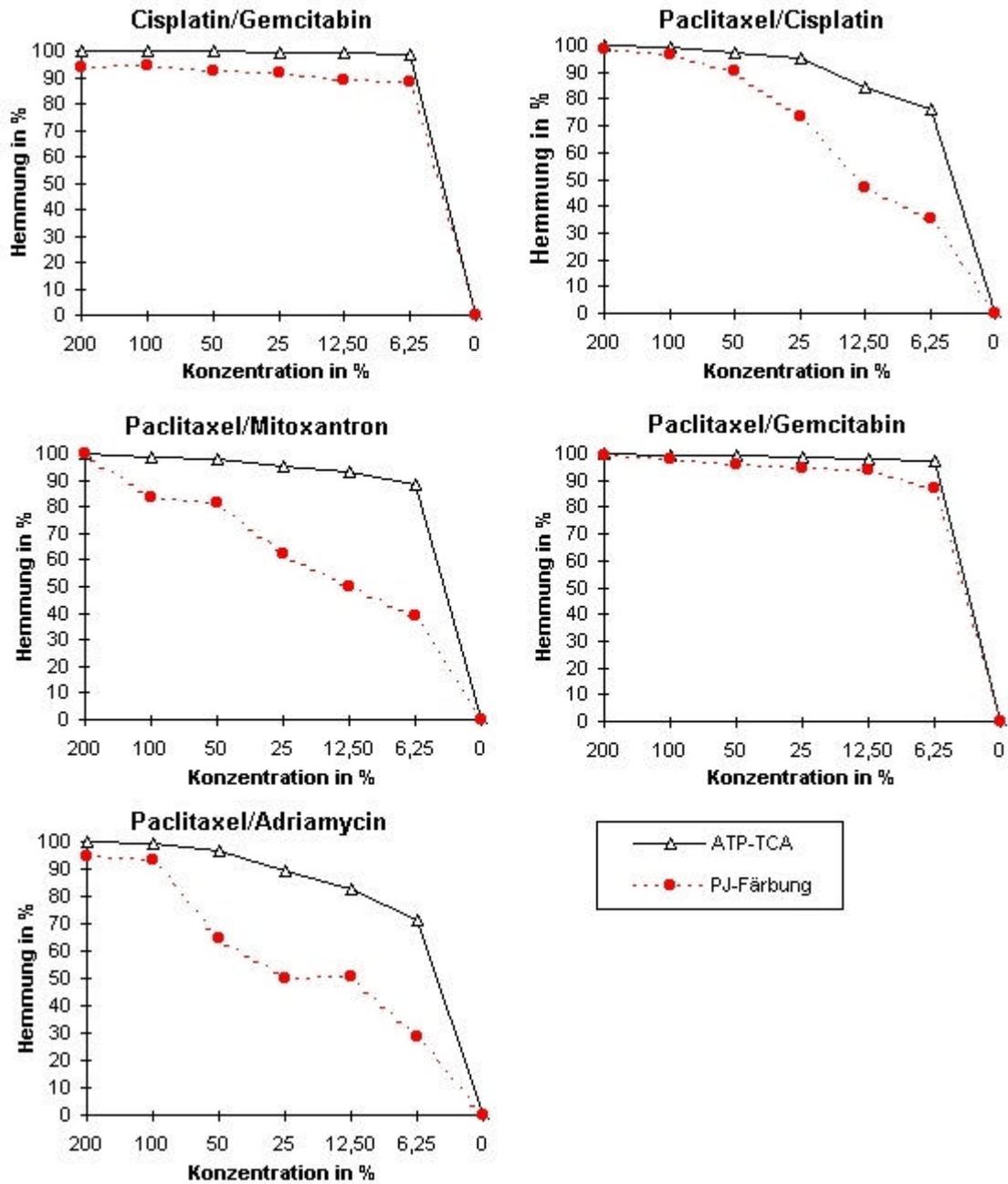
Bei allen drei Zelllinien zeigte der Vergleich von Einzelsubstanzen und ihren Kombinationen ein einheitliches Bild. Die Kombinationen waren nur geringfügig effektiver als die Behandlung mit Einzelsubstanzen. Das heisst, dass starke Synergie-Effekte In Bezug auf eine Apoptoseinduktion nicht beobachtet werden konnten. Dabei zeigten sich die relativ größten synergistischen Tendenzen für OVCAR 29-, gefolgt von SKOV 3; bei A 2780 waren nur marginale Unterschiede zu erkennen.

III.1.2.1.3 Substanzkombinationen in Gegenüberstellung beider Tests

III.1.2.1.3.1 ZIEL:

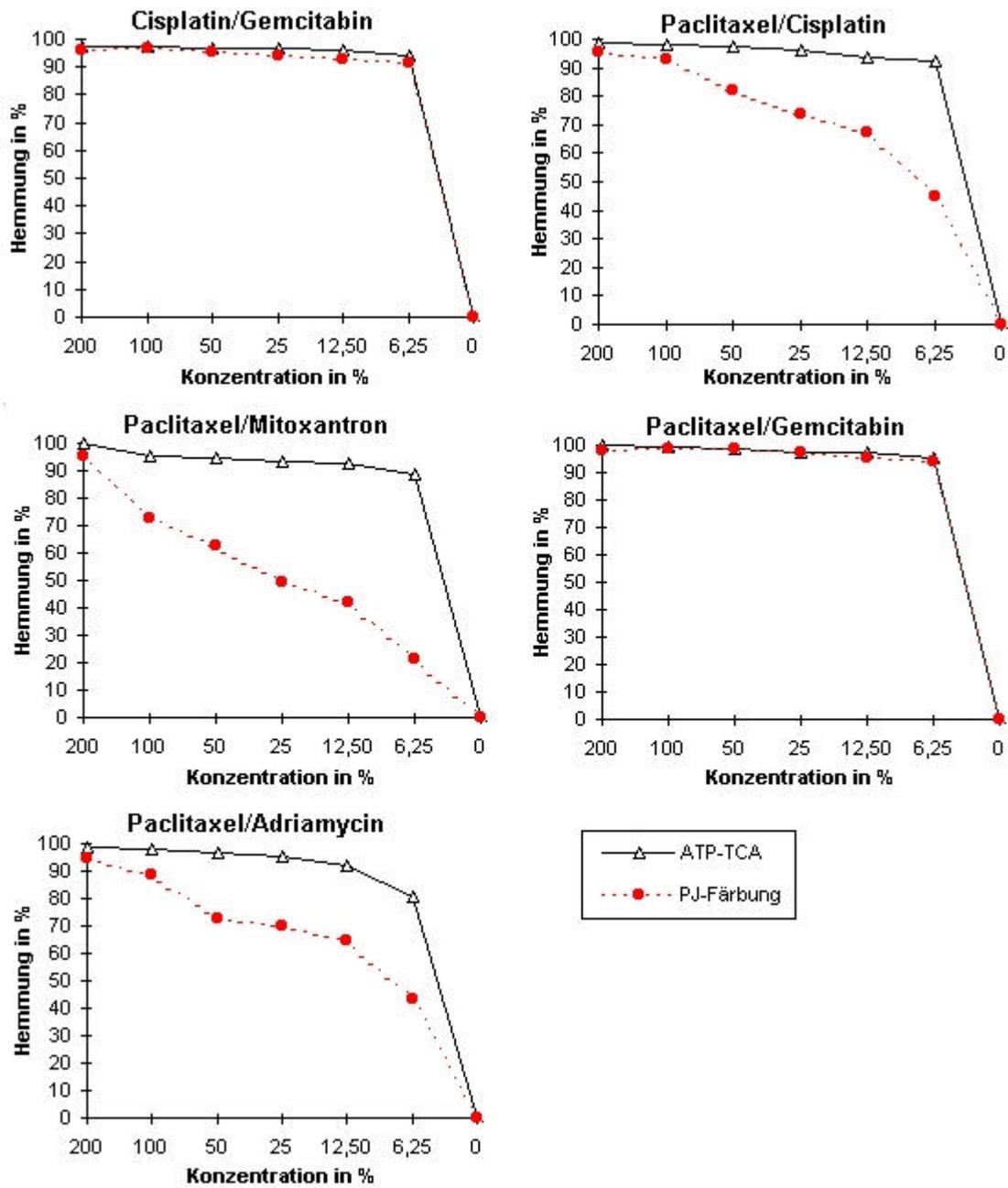
Unter den im vorherigen Versuch genannten Bedingungen wurden zu den PJ-Färbungen parallel ATP-TCA´s angefertigt. Damit sollte die Übereinstimmung der Hemmkurven und AUC von ATP-TCA und PJ-Färbung ermittelt werden.

III.1.2.1.3.2 GRAFIK OVCAR 29-: Hemmkurven Substanzkombinationen bestimmt mit ATP-TCA und PJ-Färbung



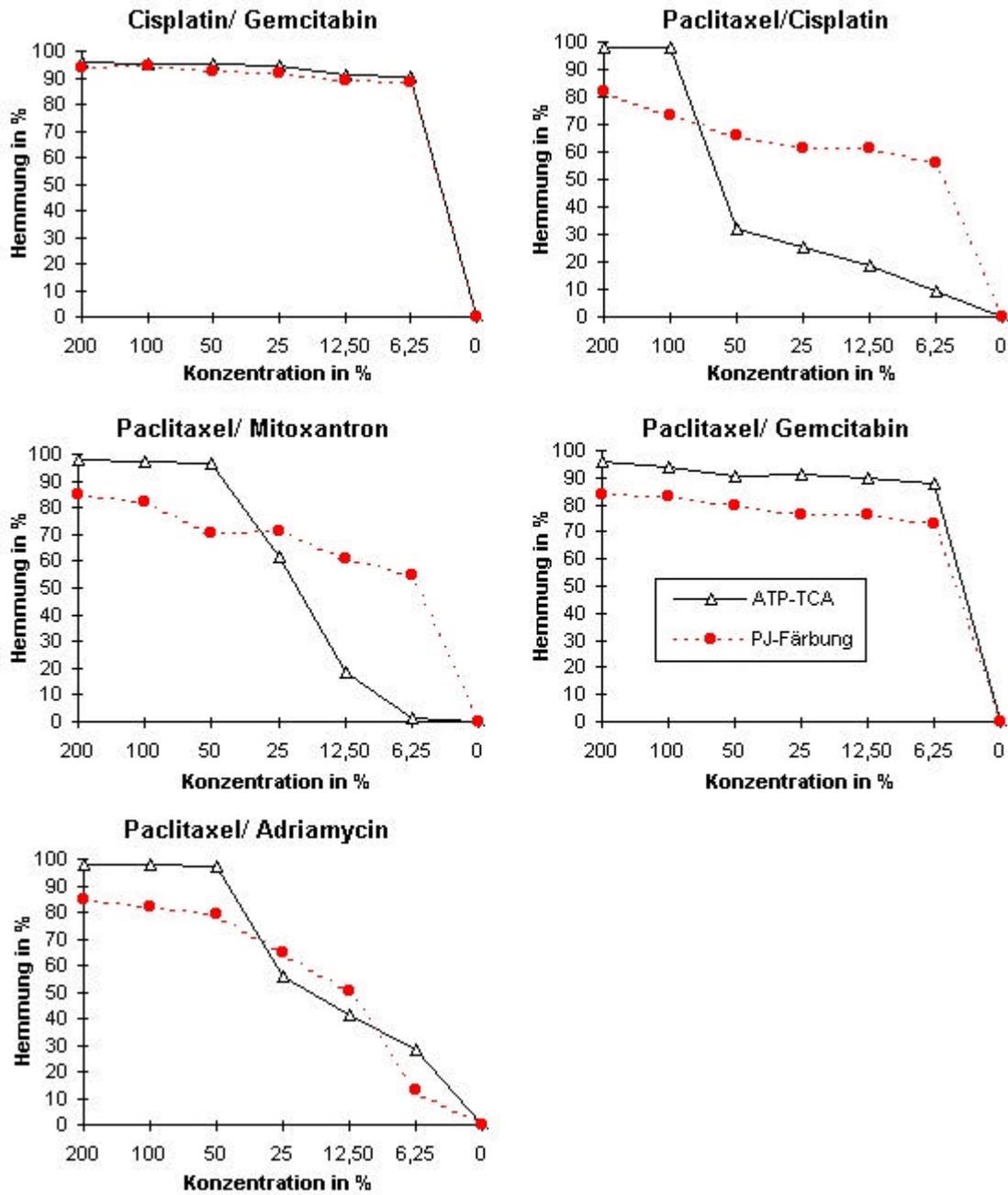
Grafik 11: Hemmkurven Substanzkombinationen bestimmt mit ATP-TCA und PJ-Färbung für OVCAR 29-

III.1.2.1.3.3 GRAFIK SKOV 3: Hemmkurven Substanzkombinationen bestimmt mit ATP-TCA und PJ-Färbung



Grafik 12: Hemmkurven Substanzkombinationen bestimmt mit ATP-TCA und PJ-Färbung für SKOV3

III.1.2.1.3.4 GRAFIK A 2780: Hemmkurven Substanzkombinationen bestimmt mit ATP-TCA und PJ-Färbung



Grafik 13: Hemmkurven Substanzkombinationen bestimmt mit ATP-TCA und PJ-Färbung für A 2780

III.1.2.1.3.5 Substanzkombinationen : AUC-Vergleich der Hemmkurven OVCAR 29-, SKOV 3 , A 2780 für ATP-TCA und PJ-Färbung

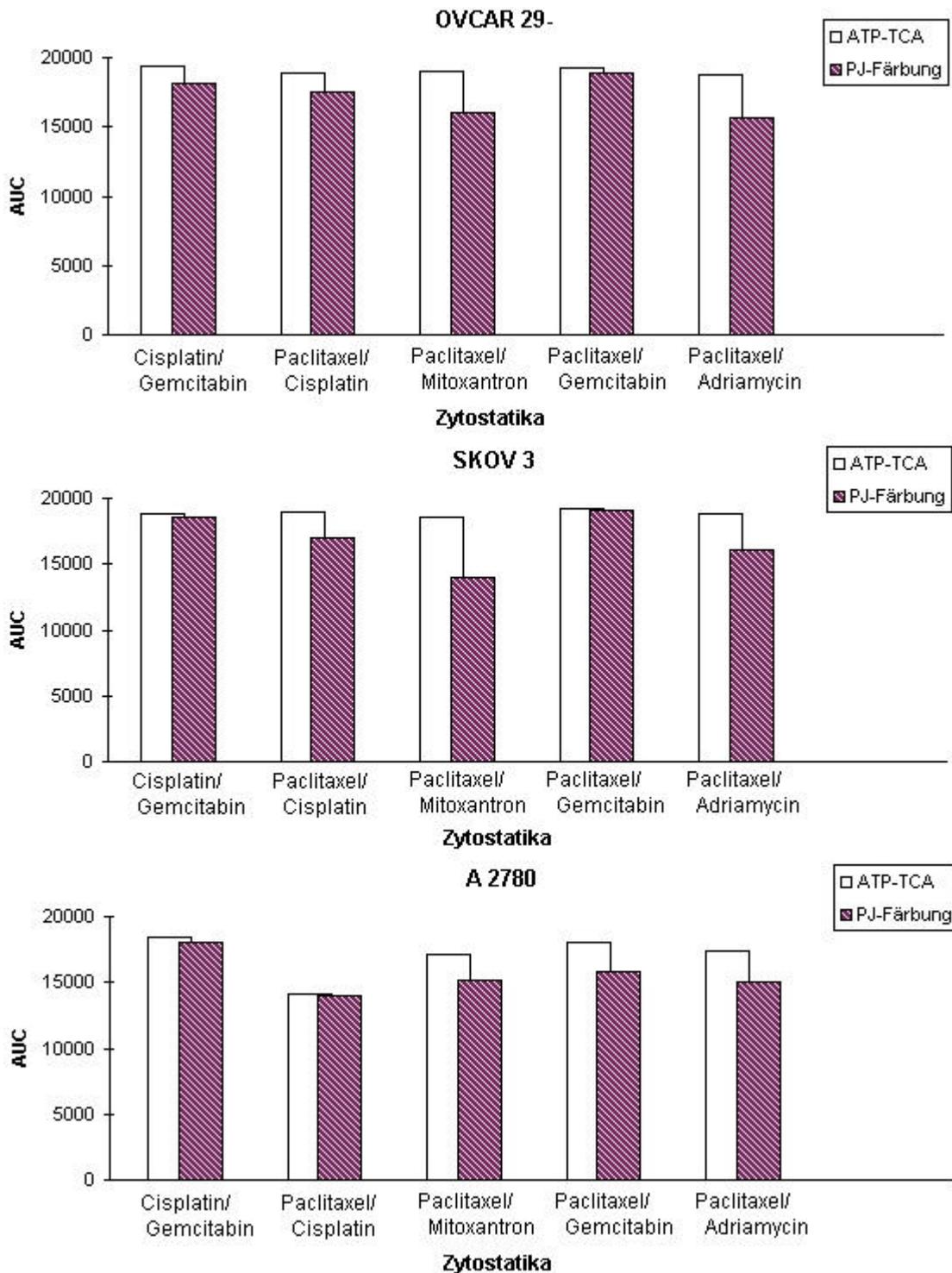


Diagramm 8: Substanzkombinationen; AUC-Vergleich der Hemmkurven für die Zelllinien OVCAR 29-, SKOV 3 und A 2780

III.1.2.1.3.6 Ergebnisse

Die Hemmkurvenverläufe der beiden Tests wiesen zum großen Teil starke Ähnlichkeit auf, und dies bei allen drei Zelllinien. Die Reaktionsmuster wichen für A 2780 am deutlichsten voneinander ab.

Die AUC-Werte und damit die Bewertung von Sensitivität lagen sehr dicht beieinander.

III.1.3 Versuche mit Patientenproben

Es wurden 27 Patientenproben mit beiden Tests parallel gemessen. Davon waren 7 Proben z.B. wegen unzureichender Vitalität nach der Inkubation nicht auswertbar. Ein einmessen war wegen zu starker Verunreinigungen oder zu niedriger Eventzahlen nicht möglich. Zwei der verbliebenen 20 Proben konnten bei der PJ-Färbung technisch zwar eingemessen und ausgewertet werden, wurden aber wegen der schlechten Vitalität (unter 60% in der Negativkontrolle) im Gesamtergebnis nicht berücksichtigt. Sie sind im Folgenden gesondert aufgeführt, da sie die Vermutung bestätigen, dass Zellkulturen mit schlechter Vitalität nicht „regulär“ reagieren.

III.1.4 Patientinnenbeispiele

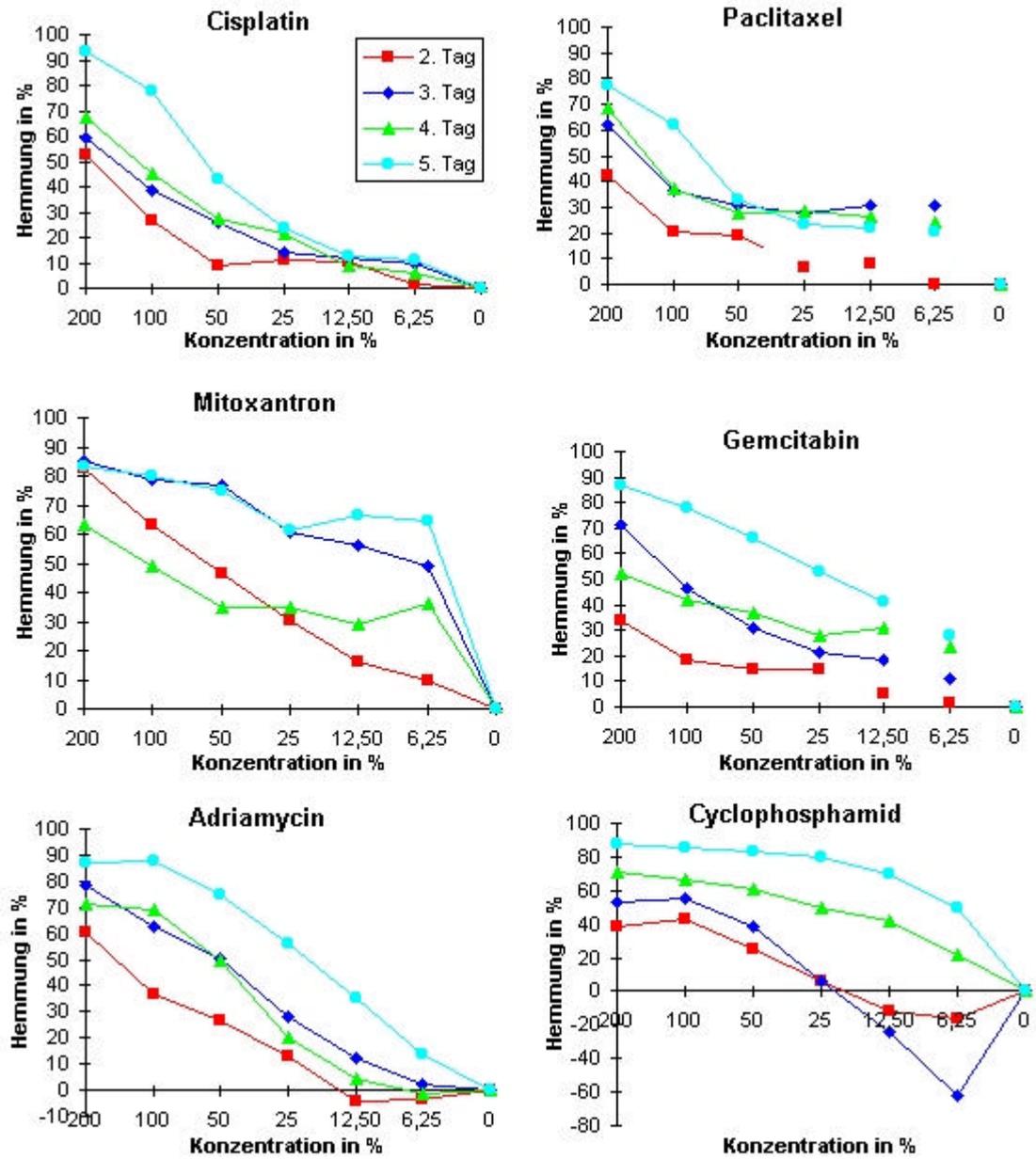
III.1.4.1 Zeitabhängigkeit von Patientproben (Vorversuche)

III.1.4.1.1 ZIEL:

Es sollte der optimale Messzeitpunkt für Ex-vivo-Material ermittelt werden. Dazu wurden Tumorzellen von zwei Patientinnen untersucht.

Daten für Hemmkurven nach dem ersten Inkubationstag wurden nicht erhoben, da aus den Zellkulturversuchen ersichtlich war, dass am ersten Tag nur marginale Reaktionen zu erwarten waren. Gleichzeitig war die Menge an ex-vivo gewonnenem Probenmaterial begrenzt und reichte nur für ca. 4 x 6 Platten aus. So wurde entschieden, auf den 1. Inkubationstag zu verzichten.

III.1.4.1.2 GRAFIK: Zeitabhängigkeit des Apoptoseverlaufs bei Patientenproben



Grafik 14: Zeitverlauf; Hemmkurven der P-J-Färbung von Patientin M.N.

III.1.4.1.3 Diagramm: Zeitabhängigkeit des Apoptoseverlaufs bei Patientenproben; AUC-Vergleich von Patientin M.N

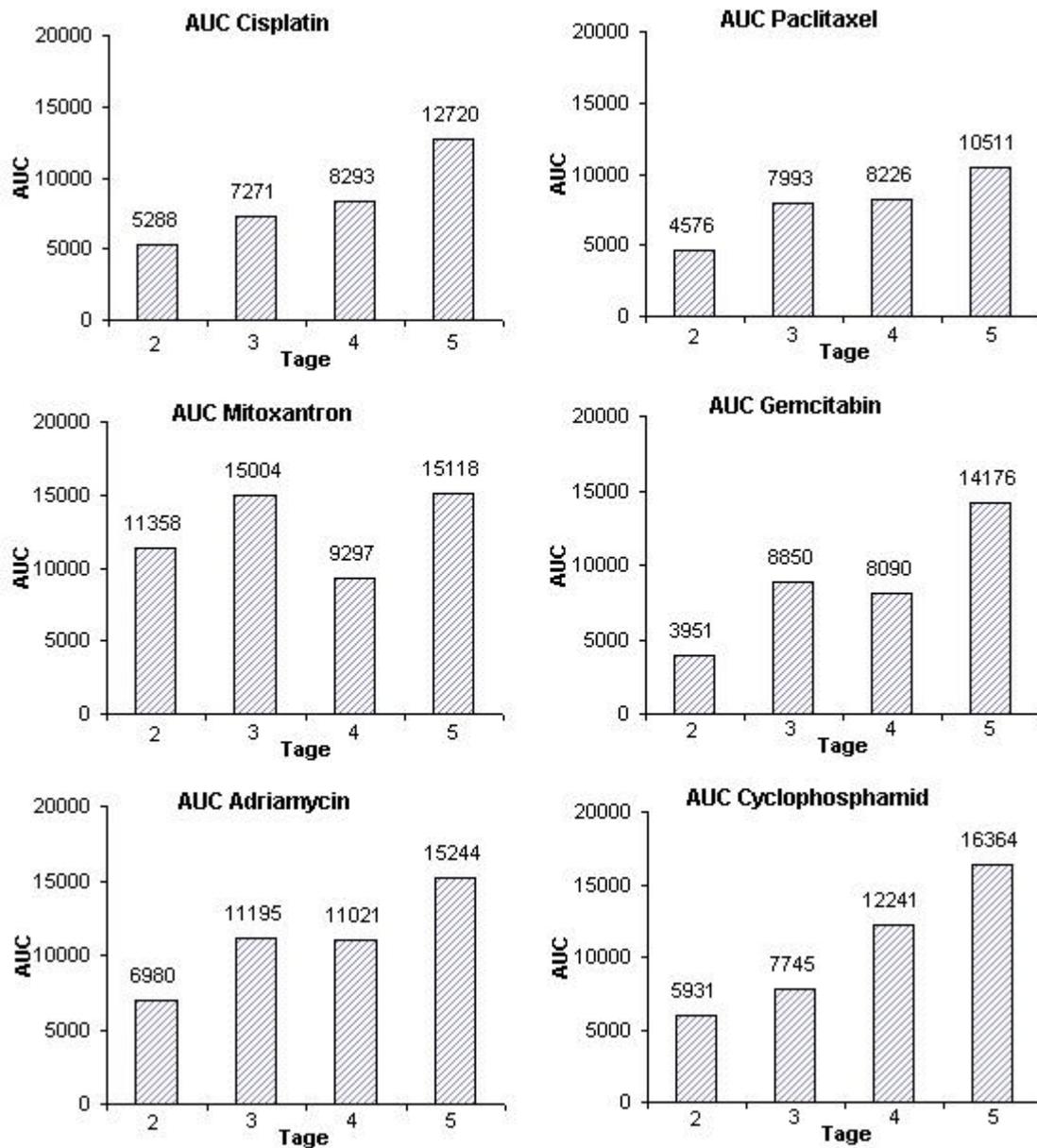
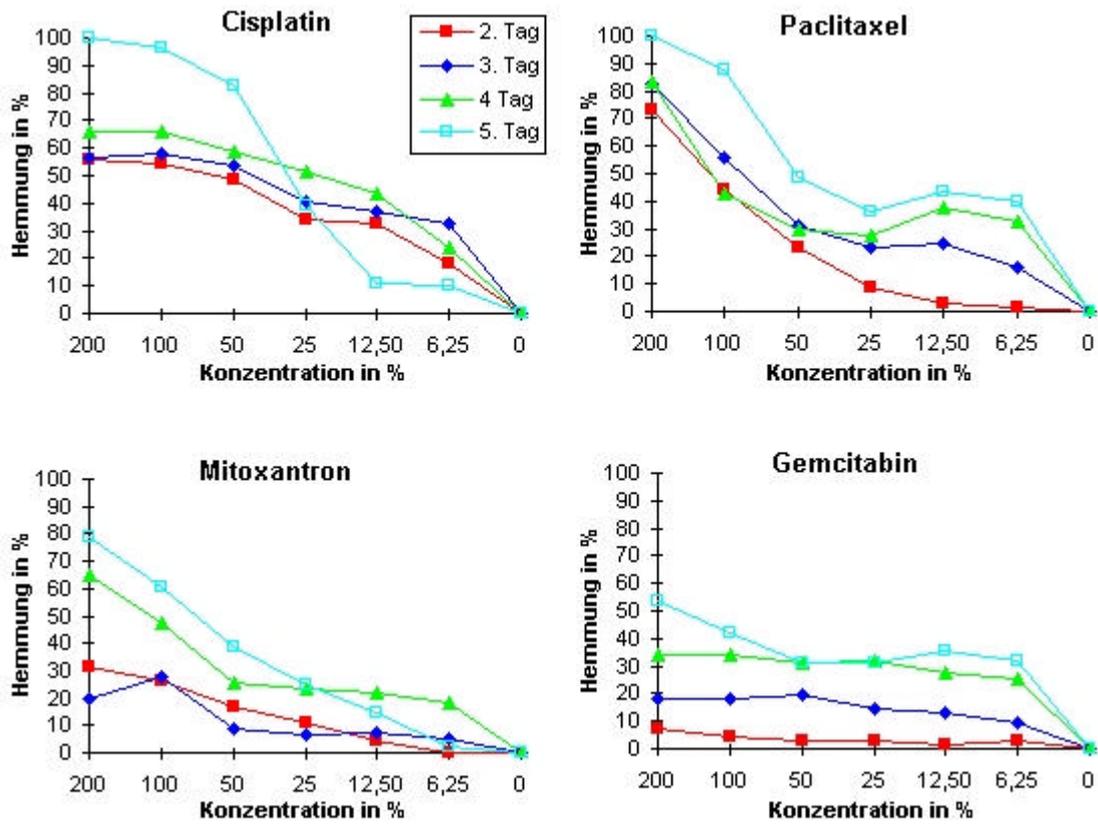


Diagramm 9: Zeitverlauf; AUC der Hemmkurven mit PJ-Färbung von Patientin M.N.

III.1.4.1.4 GRAFIK: Zeitabhängigkeit des Apoptoseverlaufs bei Patientenproben



Grafik 15: Zeitverlauf; Hemmkurven der PJ-Färbung von Patientin H.H.

III.1.4.1.5 DIAGRAMM: Zeitabhängigkeit des Apoptoseverlaufs bei Patientenproben; AUC-Vergleich von Patientin H.H.

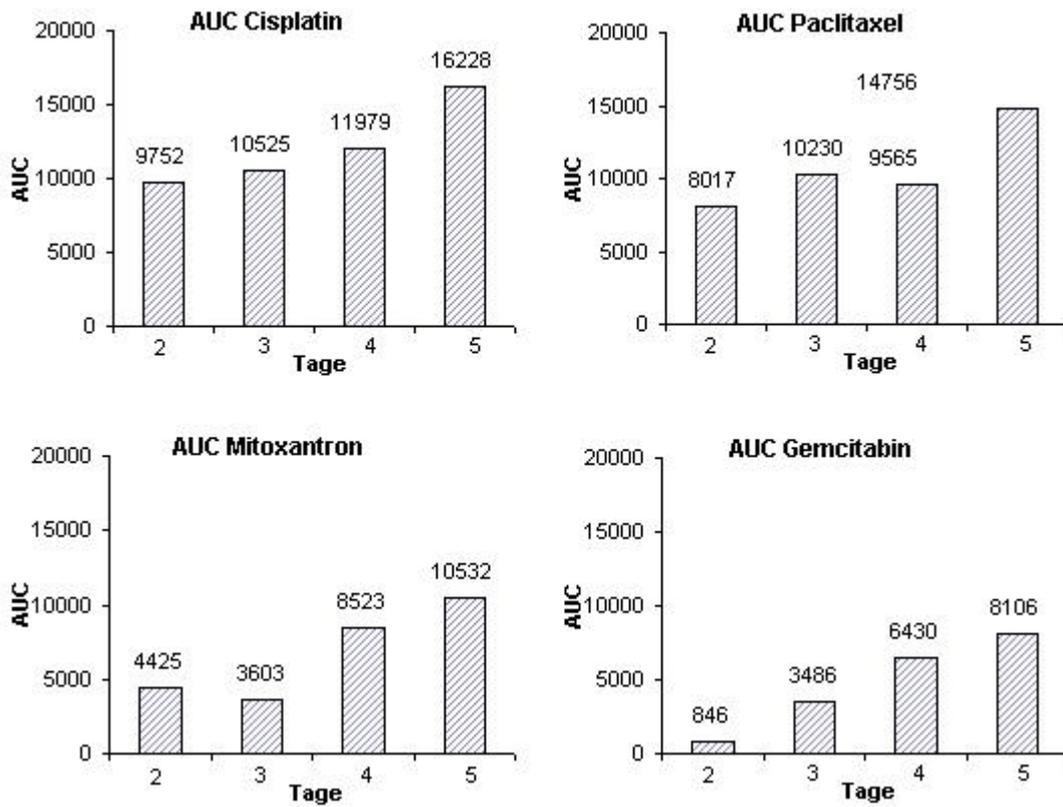


Diagramm 10: Zeitverlauf; AUC der Hemmkurven mit PJ-Färbung von Patientin H.H.

III.1.4.1.6 ERGEBNIS:

Der optimale Messzeitpunkt, ermittelt anhand der maximalen AUC-Werte der Hemmkurven, war bei beiden Patientinnen und für alle Zytostatika der 5. Tag

III.1.4.2 Patientenbeispiele

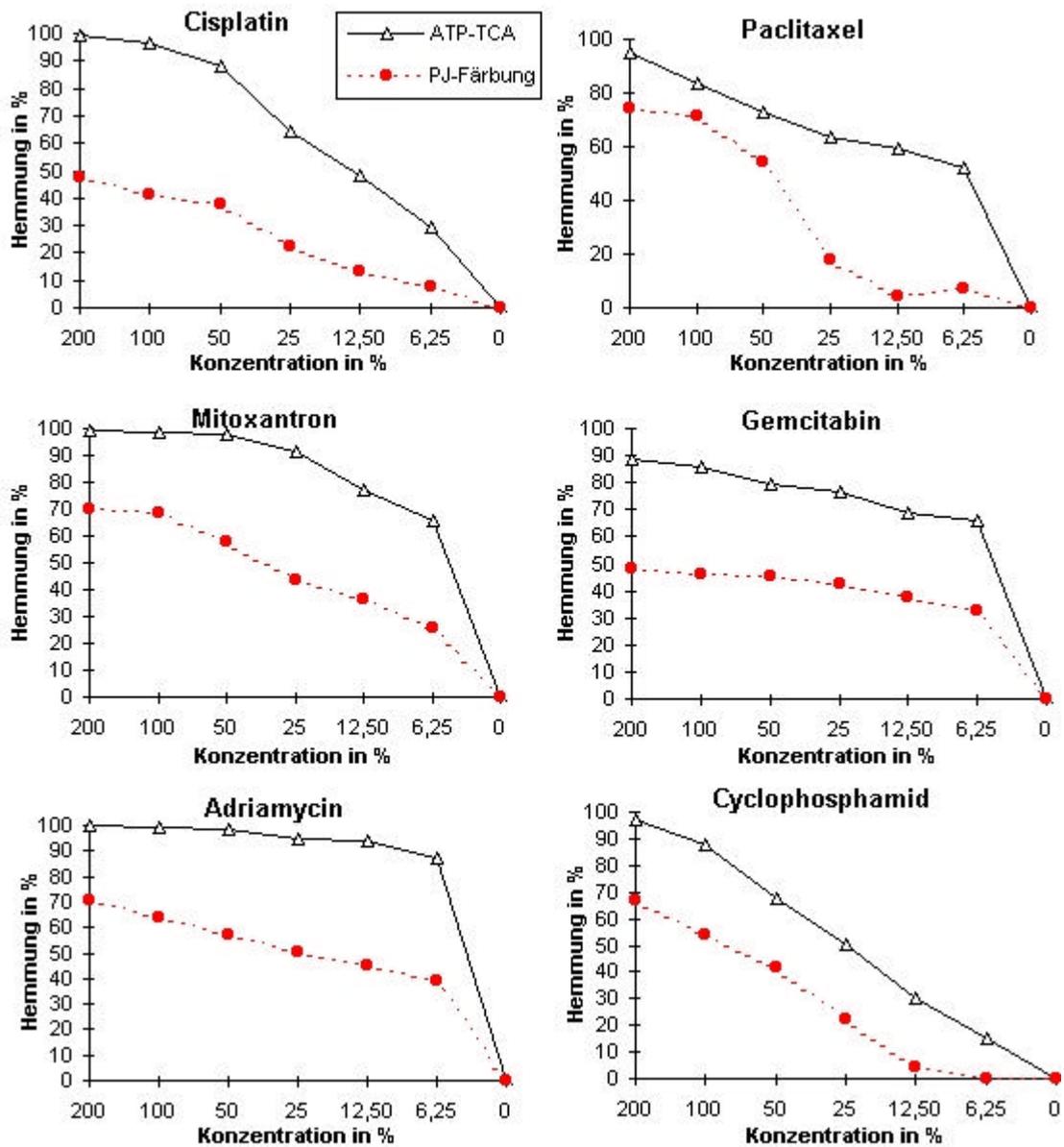
III.1.4.2.1 Vergleich von Material unterschiedlicher anatomischer Herkunft

Material einer Patientin: solides Tumorgewebe, Pleurapunktat.

III.1.4.2.1.1 ZIEL:

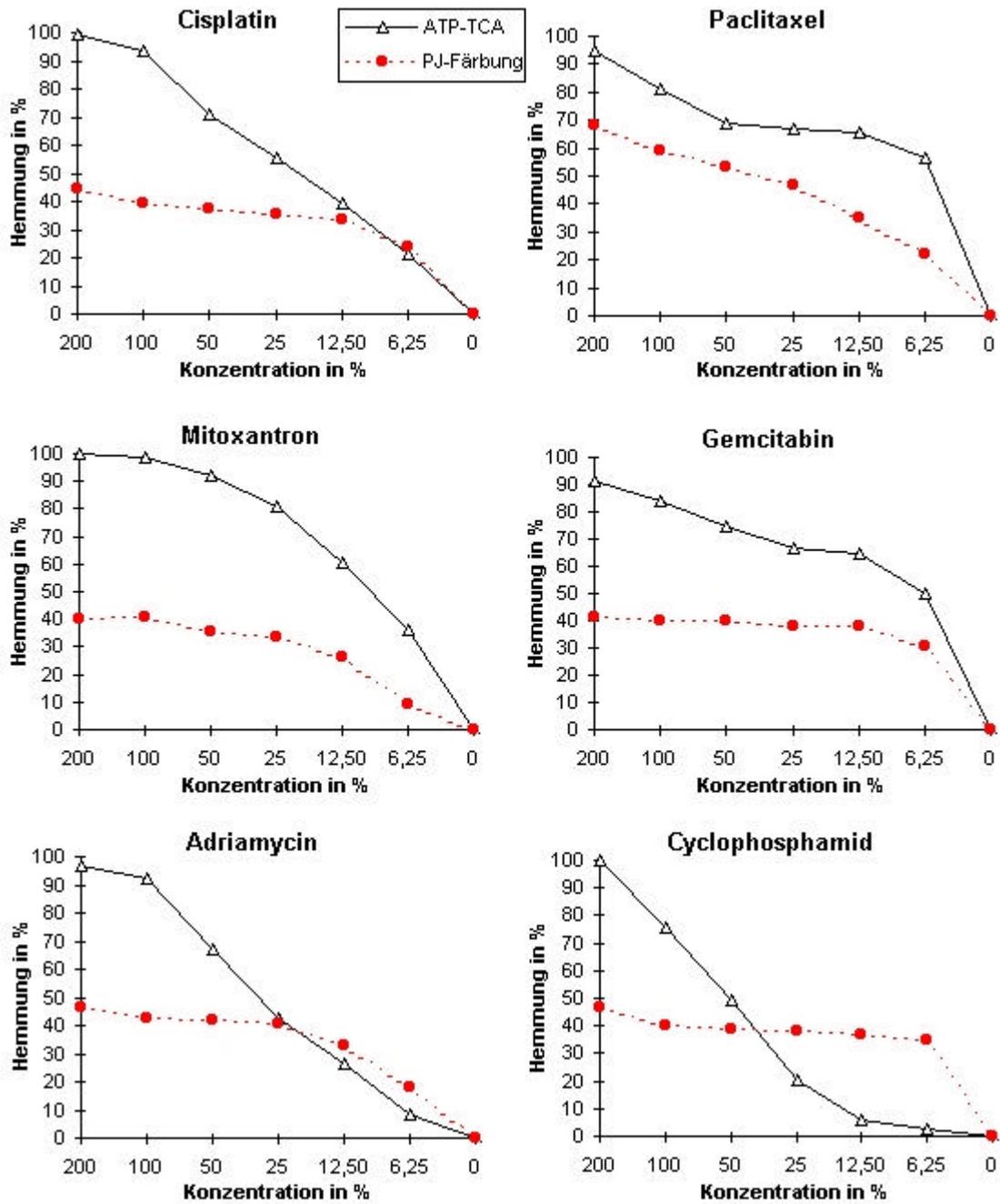
In diesem Versuch war das Ziel, die Ansprechrate von Proben verschiedener anatomischer Herkunft einer Patientin zu vergleichen und zu überprüfen, ob sie zu gleichen Ergebnissen führen. Dies hätte für die Praxis große Bedeutung, da Ascites oder Pleurapunktat häufig in größerem Umfang zur Verfügung stehen als solides Tumorgewebe - es ist jedoch unklar, wie groß die Aussagekraft von Proben aus Ascites oder Pleurapunktat im Vergleich zum solidem Tumor einzuschätzen ist.

III.1.4.2.1.2 GRAFIK :.Solider Tumor: Hemmkurven-Vergleich



Grafik 16: Hemmkurven-Vergleich ATP-TCA und PJ-Färbung von solidem Tumor, Patientin E. S.

III.1.4.2.1.3 GRAFIK :Pleura-Punktat Hemmkurven-Vergleich



Grafik 17: Hemmkurven-Vergleich ATP-TCA und PJ-Färbung von Pleura-Punktat, Patientin E. S.

III.1.4.2.1.4 AUC-Vergleich von Tumormaterial verschiedener anatomischer Herkunft derselben Patientin

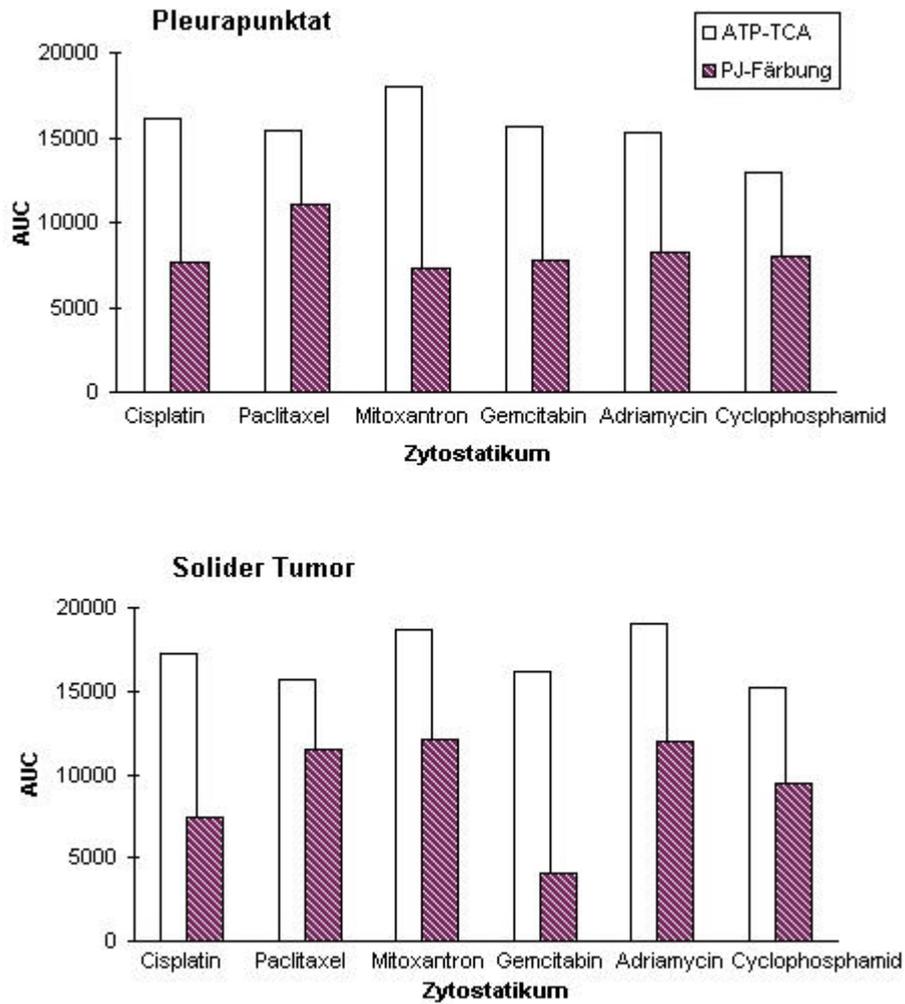


Diagramm 11: AUC-Vergleich (Hemmkurven von ATP-TCA und PJ-Färbung); Pleura-Punktat-Solider Tumor von Patientin E.S.

III.1.4.2.1.5 ERGEBNIS:

ATP-TCA: Die Ergebnisse zwischen der Probe aus Pleurapunktat und der aus dem originären Tumor stimmten weitgehend überein. Die Abweichungen waren als sehr gering zu bewerten (bei durchschnittlich 92% Übereinstimmung im Verhältnis Pleura/ Tumor).

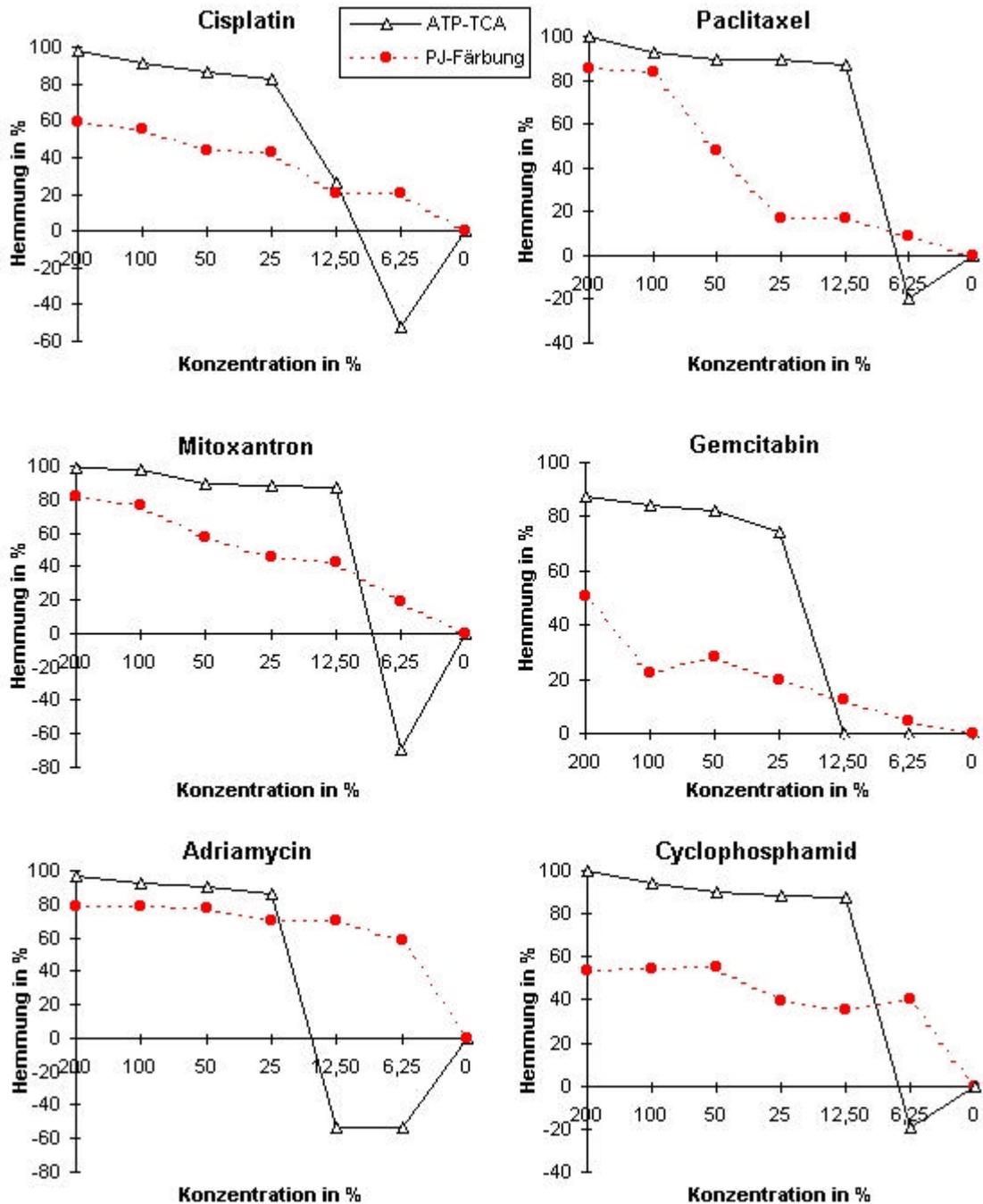
PJ-Färbung: Hier zeigte sich ebenfalls aus qualitativer Sicht eine gute Übereinstimmung, da alle Zytostatika als negativ getestet wurden. Allerdings waren die Abweichungen zwischen Pleurapunktat und Tumor quantitativ sehr viel größer als beim ATP-TCA (durchschnittlich 71% Übereinstimmung im Verhältnis Pleura/ Tumor). Das solide Tumormaterial zeigte auch hier - bis auf Gemcitabin - höhere bzw. gleiche Hemmwerte im Vergleich zur Probe aus Pleurapunktat. Obwohl die qualitative Bestimmung von Chemosensitivität bzw. -resistenz in beiden Tests offenbar unabhängig von der Probenherkunft identisch ausfiel, schien die Bestimmung der Apoptoseinduktion größere Unterschiede zwischen den Proben aufzuzeigen als der ATP-TCA.

III.1.4.2.2 Auswirkung schlechter Vitalität des Ausgangsmaterials auf die Messung

III.1.4.2.2.1 ZIEL:

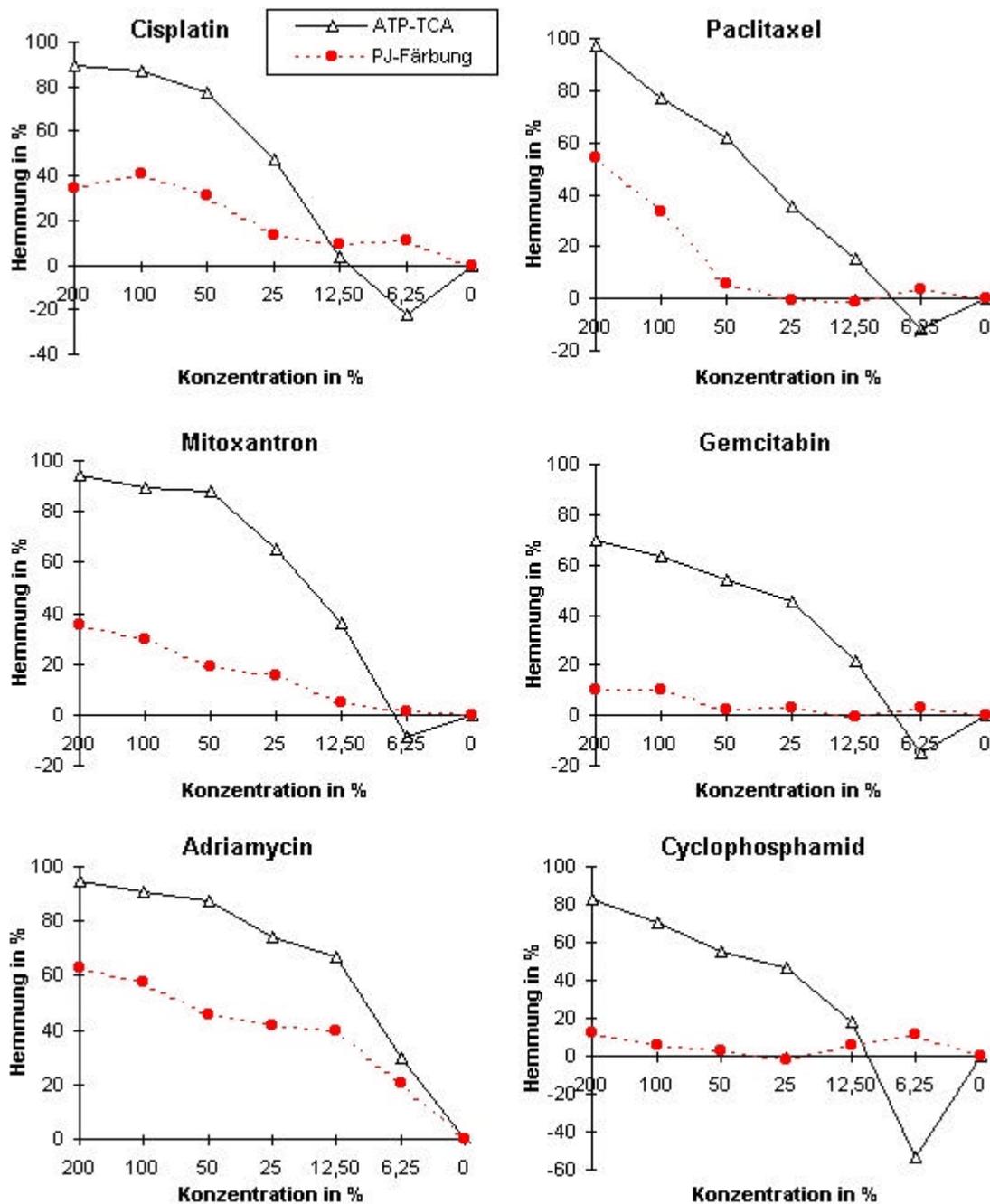
Die mangelhafte Bewertbarkeit von Proben mit schlechter Ausgangsvitalität sollte mit Hilfe der Gegenüberstellung der Hemmkurven beider Tests aufgezeigt werden.

III.1.4.2.2 GRAFIK: Beispiel für unzureichende Vitalität einer Patientenprobe; Hemmkurven ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung



Grafik 18: Beispiel für unzureichende Vitalität; Hemmkurven ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung bei Patient A.J.

III.1.4.2.3 GRAFIK: Beispiel für unzureichende Vitalität einer Patientenprobe;
Hemmkurven ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung



Grafik 19: Beispiel für unzureichende Vitalität; Hemmkurven ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung bei Patient E.V.

III.1.4.2.3.1 Patientenproben mit schlechter Ausgangsvitalität: AUC-Vergleich ATP-TCA vs PJ-Färbung

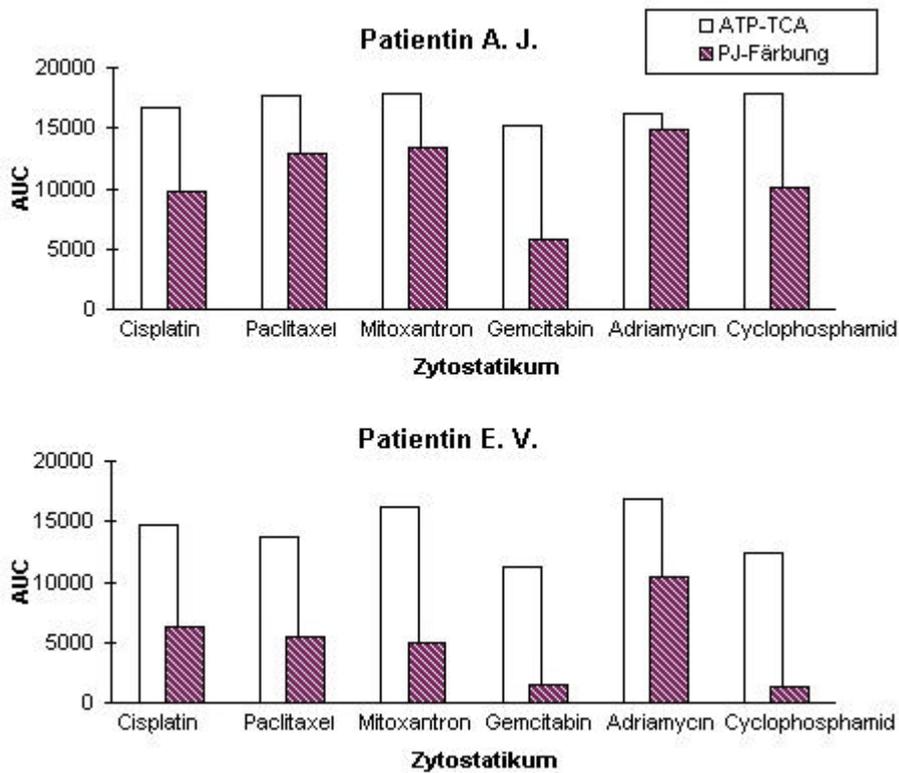


Diagramm 12: Patientenbeispiele für schlechte Ausgangsvitalität; Gegenüberstellung AUC der Hemmkurven für ATP-TCA vs PJ-Färbung

III.1.4.2.3.2 ERGEBNIS:

Die Verläufe der Hemmkurven für den ATP-TCA und die PJ-Färbung unterscheiden sich qualitativ wie quantitativ erheblich. Im ATP-TCA traten häufiger negative Hemmwerte auf, die einen Wachstumsvorteil von zytostatikabehandelten Zellen gegenüber unbehandelten Zellen anzeigen. Die Auswertung solcher Proben ist nicht sinnvoll.

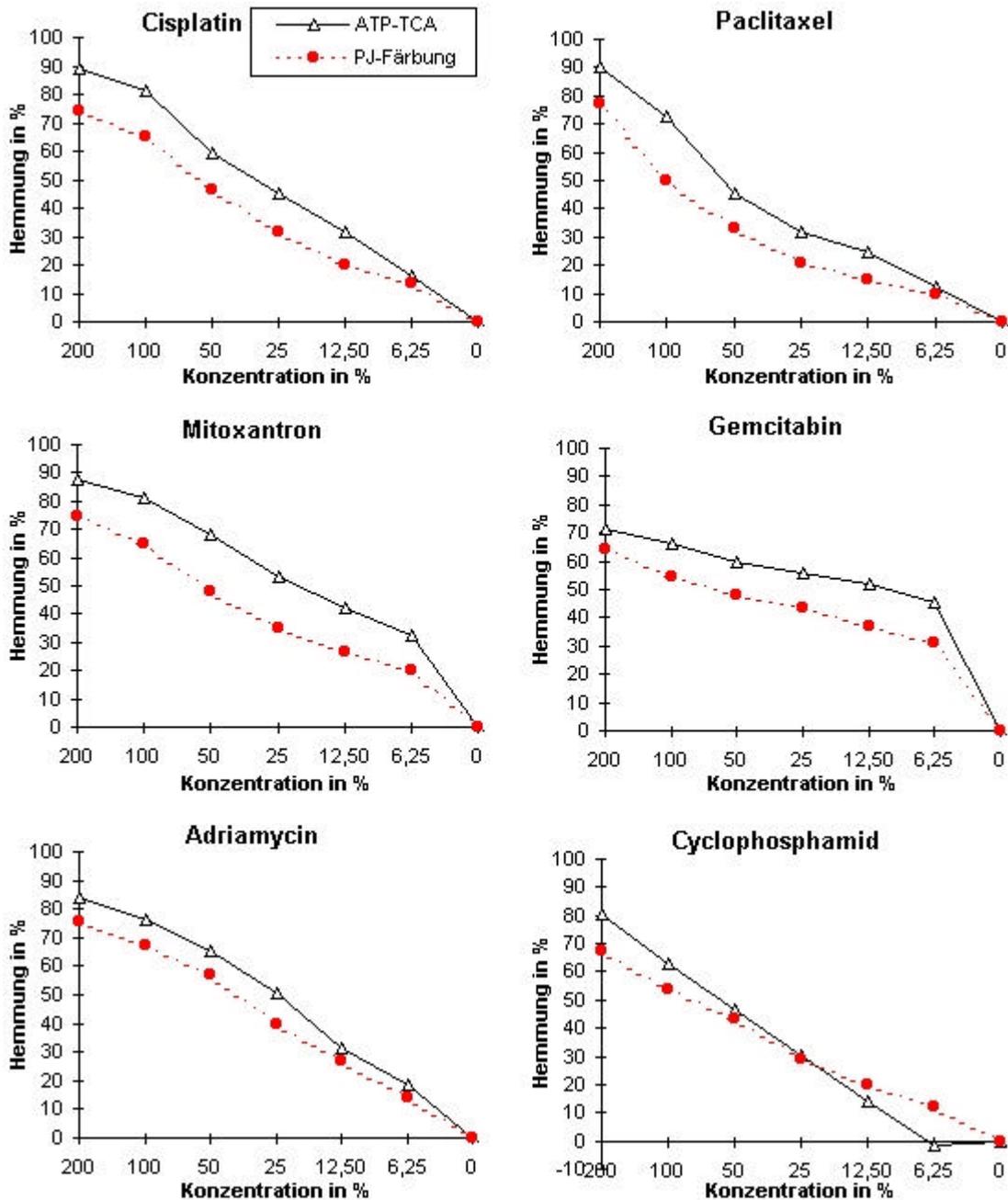
III.1.4.2.4 Hauptversuche mit Patientenproben

III.1.4.2.4.1 ZIEL:

Ziel dieser Arbeit war, zu vergleichen, inwieweit die im ATP-TCA messbaren Hemmwerte auf Apoptoseaktivität zurück zu führen waren. Daher wurde in den Hauptversuchen das Tumormaterial von 18 Patientinnen präpariert, mit verschiedenen Zytostatika inkubiert und die Chemosensitivität parallel mit ATP-TCA und PJ-Messung bestimmt. Die folgenden Kurven resultieren aus den Mittelwerten der Messungen dieser 18 Patientinnen. Die Einzelergebnisse finden sich im Anhang.

Wegen der eingeschränkt verfügbaren Menge von Patientenmaterial konnten nicht immer alle 6 Zytostatika getestet werden. Die Anzahl der im Mittelwert zu Grunde liegenden Proben ist unterhalb des AUC-Vergleichs angegeben. Die Priorität bei der Auswahl der getesteten Substanzen entspricht ihrer Reihenfolge.

III.1.4.2.4.2 GRAFIKEN: Vergleich der Hemmkurven-Verläufe für ATP-TCA und PJ-Färbung bei 18 Patientinnen



Grafik 20: Hauptversuche Ergebnisvergleich der Testmethoden ATP-TCA und PJ-Färbung, Vergleich an 18 Patientenproben; Cisplatin n=18, Paclitaxel n= 18, Mitoxantron n= 18, Gemcitabin n=17, Adriamycin n=15, Cyclophosphamid n=15

III.1.4.2.4.3 Diagramm: AUC`s der Hemmkurven ATP-TCA vs PJ-Färbung für 18 Patientinnen

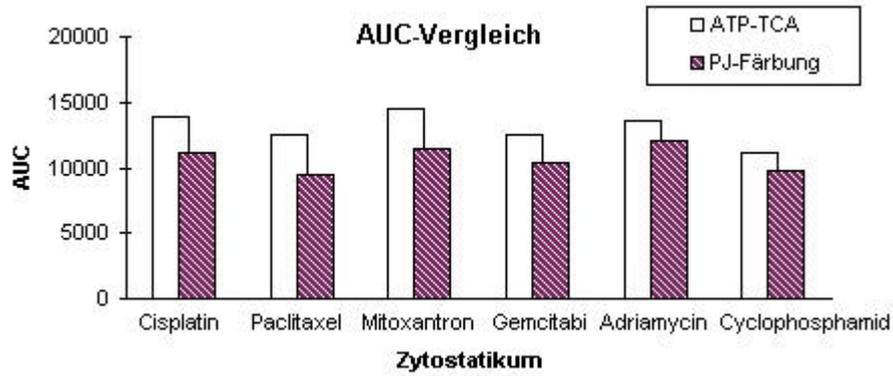


Diagramm 13: AUC-Vergleich der Hemmkurven von ATP-TCA und PJ-Färbung für 18 Patientenproben

III.1.4.2.4.4 ERGEBNIS:

Qualitativ zeigten die Verläufe der Mittelwertkurven sehr ähnliche Reaktionsmuster. Aus quantitativer Sicht zeigte die Auswertung der AUC, wie groß die Unterschiede in der detektierten Hemmung zwischen den Tests war. So zeigt der Quotient aus Hemmung_{PJ-Färbung}/Hemmung_{ATP-TCA} den Anteil an apoptotischer Aktivität an der Gesamthemmwirkung der einzelnen Zytostatika. Diese Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammen gefaßt.

Zytostatikum	Hemmung _{PJ-Färbung} / Hemmung _{ATP-TCA}
Cisplatin	80%
Paclitaxel	75%
Mitoxantron	79%
Gemcitabin	83%
Adriamycin	88%
Cyclophosphamid	88%

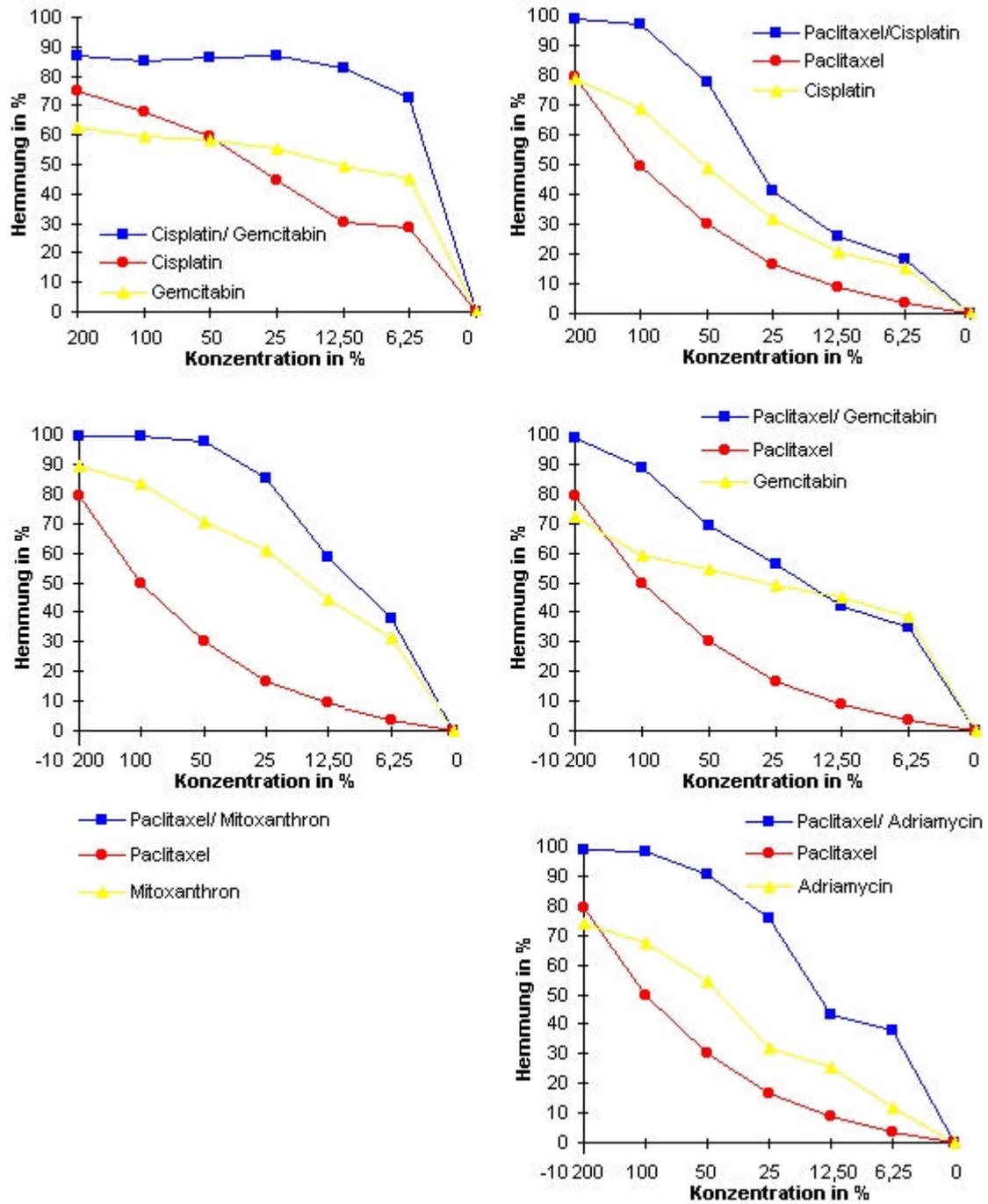
Tabelle 10: Anteil der apoptotischen Akitivität an der Gesamthemmung

III.1.4.3 Reaktion von Patientenproben auf zwei Einzelsubstanzen und ihre Kombinationen

III.1.4.3.1 ZIEL:

Es sollte ein Vergleich der Apoptoseaktivierung durch Einzelsubstanzen versus ihrer Kombinationen für originäres Tumormaterial erstellt werden. Dargestellt sind die Mittelwertkurven und ihre AUC von vier Patientinnen, die sowohl mit der PJ-Färbung als auch mit dem ATP-TCA ermittelt wurden..

III.1.4.3.2 Hemmkurven von zwei Einzelsubstanzen und ihren Kombinationen bei PJ-Messung für Patientenmaterial



Grafik 21: PJ-Färbung: Gegenüberstellung des Apoptose-Effekts von zwei Einzelsubstanzen und ihrer Kombination bei Patientenproben (n=4)

III.1.4.3.3 AUC-Vergleich: Einzelsubstanzen und Kombinationen in der PJ-Färbung

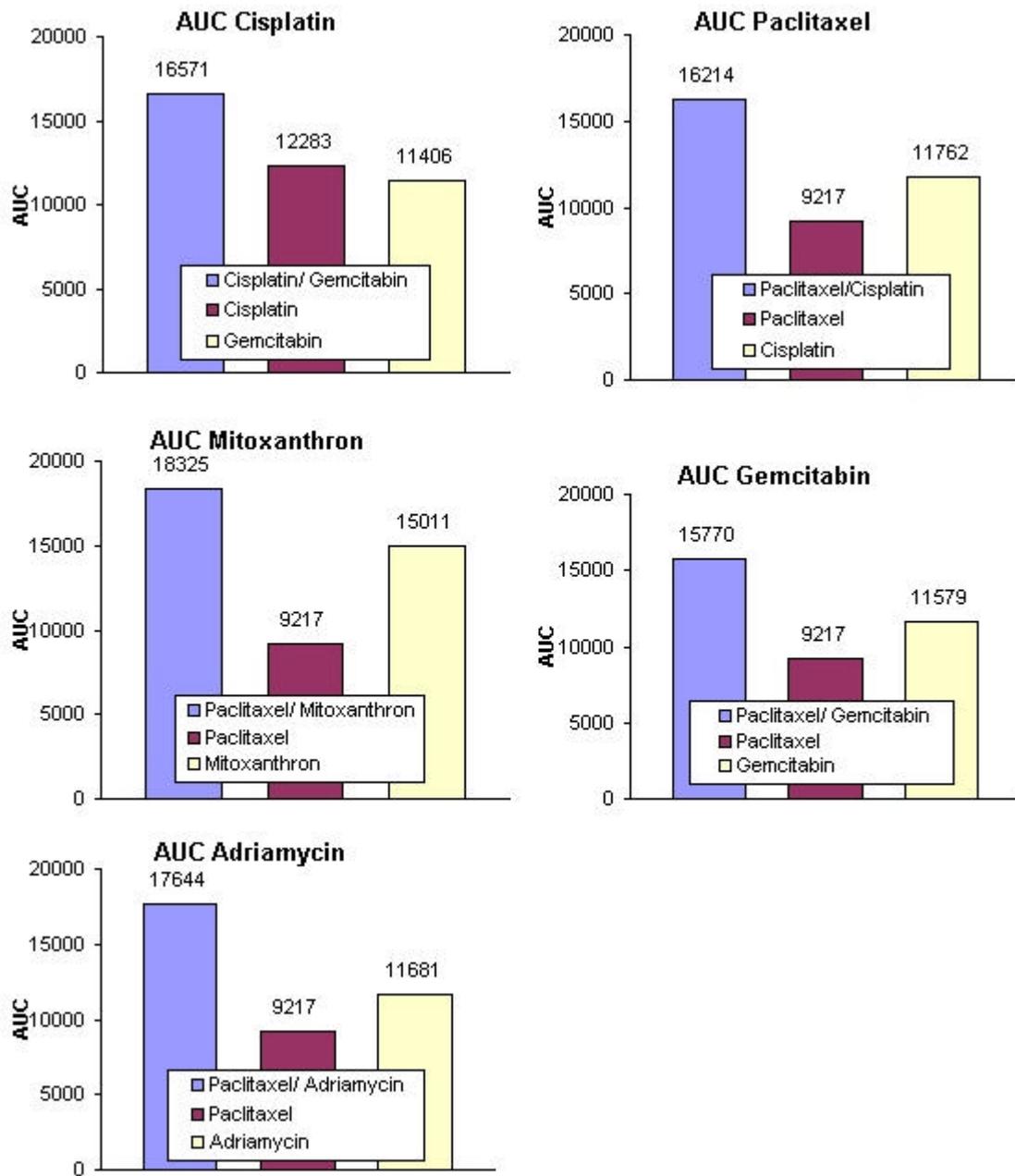
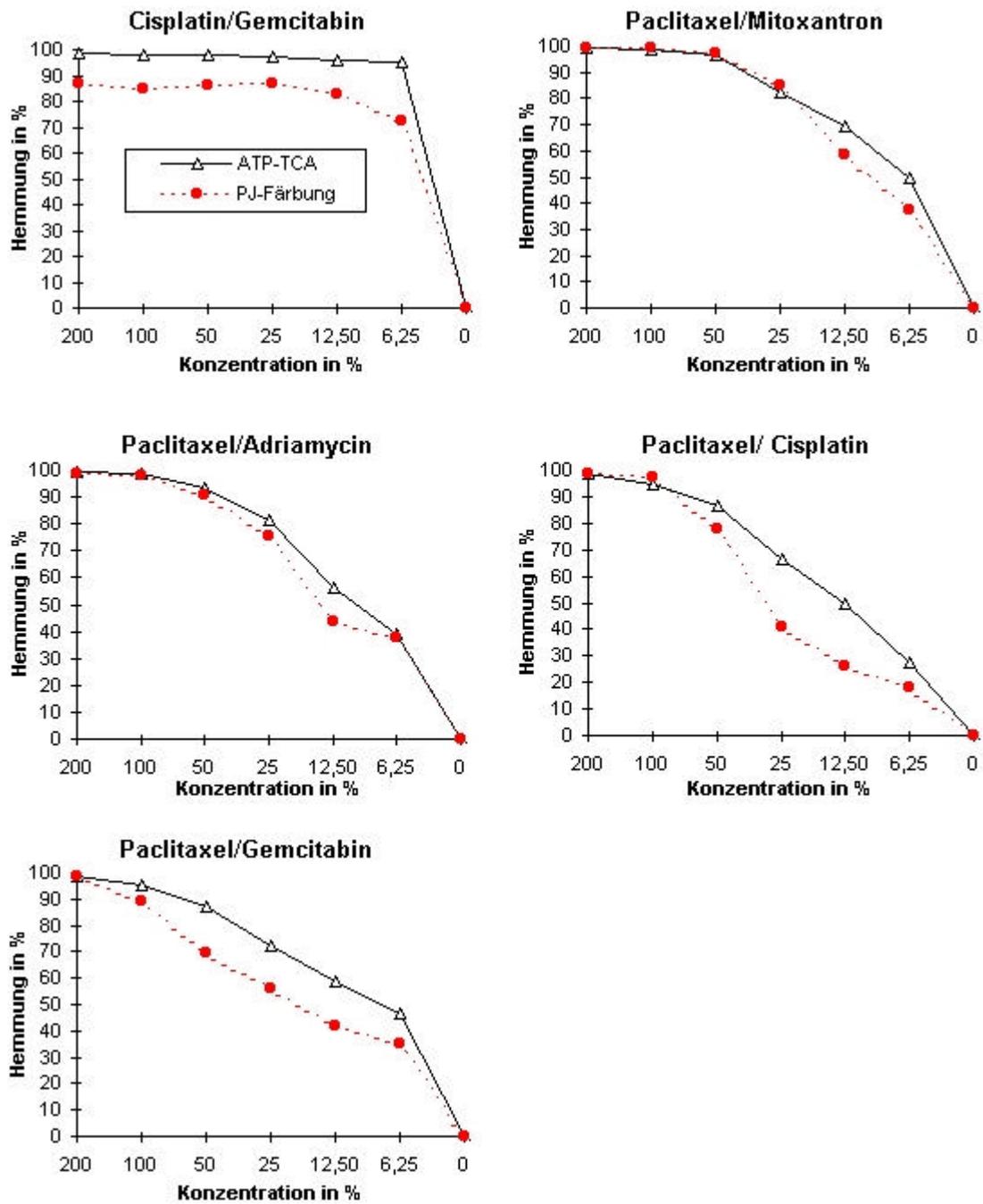


Diagramm 14: PJ-Färbung, Gegenüberstellung der AUC der Hemmkurven von zwei Einzelsubstanzen und ihrer Kombination bei Patientenproben (n=4)

III.1.4.3.4 GRAFIK: Hemmkurven ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung für Wirkstoffkombinationen bei vier Patientenproben



Grafik 22: Hemmkurvenverläufe fürSubstanzkombinationen im Vergleich von ATP-TCA und PJ-Färbung bei Patientenmaterial (n=4)

III.1.4.3.5 Patientinnen (n=4) AUC`s der Hemmkurven ATP-TCA im Vergleich zu PJ-Färbung für Substanzkombinationen

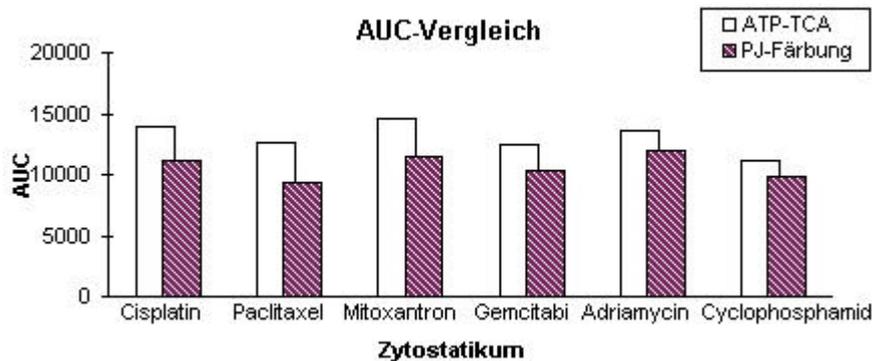


Diagramm 15: AUC-Vergleich der Hemmkurven für Substanzkombinationen im Vergleich von ATP-TCA und PJ-Färbung bei Patientenmaterial (n=4)

III.1.4.3.6 ERGEBNISSE:

Trotz der geringen Probenanzahl läßt sich eine synergistische Wirkung bei allen Substanzkombinationen erkennen. Vor allem konnte mit der Kombination der Substanzen Sensitivität erzielt werden, die bei den Einzelsubstanzen nicht ersichtlich wurde.

Die Übereinstimmung In Bezug auf das Ausmaß von Apoptoseaktivität und Hemmung im ATP-TCA war sehr groß.

III.2 Auswertung Sensitivität/ Resistenz PJ-Färbung vs ATP-TCA

Nachfolgend werden die Übersichten über die Sensitivitätsbewertung beider Tests gegenüber gestellt. Dabei werden die Anzahl sensitiv bewerteter Proben und die mittlere AUC der jeweiligen Hemmkurven als Bewertungskriterien für die Wirksamkeit verglichen.

In den folgenden Säulendiagrammen werden zuerst die mittlere AUC der Hemmkurven für den jeweiligen Test und von jeder Substanz aufgelistet.

Anschließend wird in einer Graphik die prozentuale Häufigkeit von Sensitivität in den beiden Tests miteinander verglichen. Die Maßgabe für Sensitivität ist dabei eine AUC für die Hemmkurven von mindestens 12.000.

Abschließend wird dargestellt, wie häufig identische Bewertungen in beiden Tests erzielt wurden.

III.2.1 Bewertung der Einzelsubstanzen

III.2.1.1 I.Zellkulturen

Diagramme 16 und 17: Wirksamkeit nach AUC: Übersicht der Sensitivitätsbewertung der Zelllinien

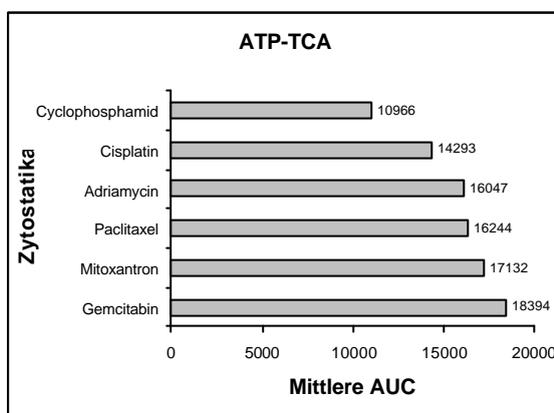


Diagramm 16: Sensitivität der Zelllinien nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=15) für ATP-TCA

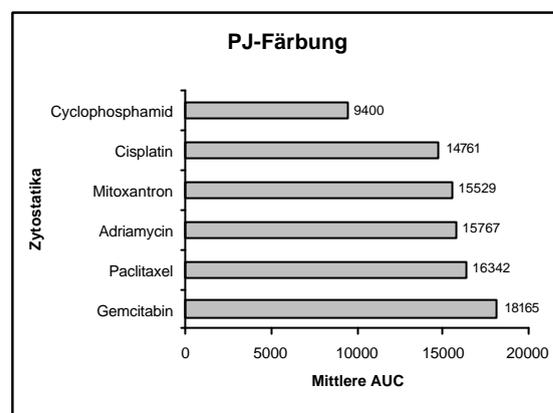


Diagramm 17: Sensitivität der Zelllinien nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=15) für PJ-Färbung

III.2.1.2 Übersicht der Wirksamkeit nach Anzahl sensibler Proben für drei Zelllinien

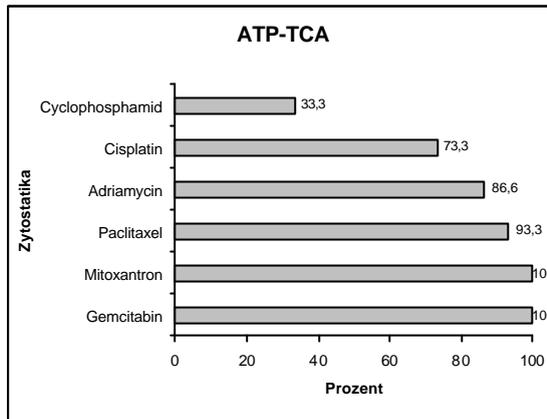


Diagramm 18: Übersicht Sensitivitätsbewertung aller Zelllinien bei ATP-TCA nach Anzahl positiv getesteter Proben in Prozent (n=15)

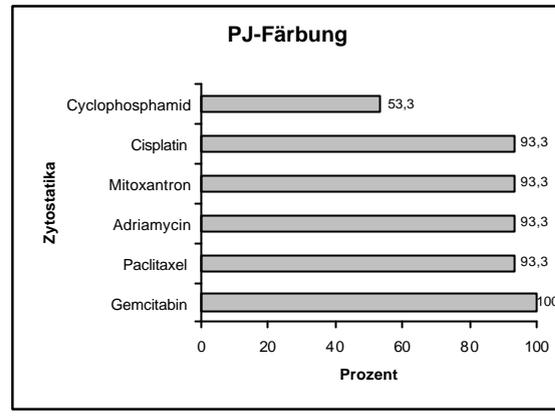


Diagramm 19: Übersicht Sensitivitätsbewertung aller Zelllinien für PJ-Färbung nach Anzahl positiv getesteter Proben in Prozent (n=15)

Zytostatika	Ergebnis-Übereinstimmung zwischen ATP-TCA und PJ-Färbung:
Gemcitabin	100 %
Mitoxantron	93%
Paclitaxel	87%
Adriamycin	80%
Cisplatin	73%
Cyclophosphamid	40%

Tabelle 11: Übersicht über die Häufigkeit gleicher Sensitivitätsbewertung in beiden Tests (Mindest-AUC der Hemmkurve: 12.000)

Im Vergleich waren die quantitativen Unterschiede in der Wirksamkeitsbewertung für die mittleren AUC der Hemmkurven relativ gering. Deutlicher wird der Unterschied der Tests in Bezug auf die Anzahl sensitiv bewerteter Proben. Es

zeigte sich, dass mit steigender Chemosensitivität eine höhere Ergebnisübereinstimmung erreicht wird.

III.2.1.3 Patientinnen: Wirksamkeit nach AUC

III.2.1.3.1 Im Folgenden wird eine Übersicht der Sensitivitätsbewertung beider Tests laut AUC der Hemmkurven für die Patientenproben im Mittelwert gegeben.

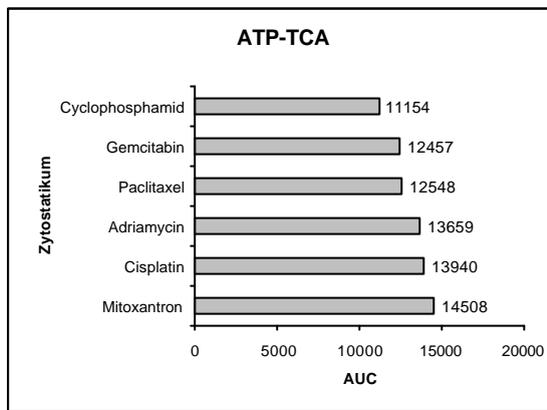


Diagramm 20: Sensitivität der Patientenproben nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=18) für ATP-TCA

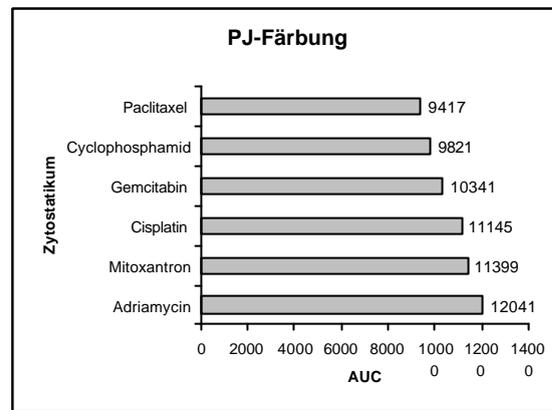


Diagramm 21: Sensitivität der Patientenproben nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=18) für PJ-Färbung

III.2.1.3.2 Patientinnen: Wirksamkeit nach Anzahl sensibler Proben

III.2.1.3.3 Patientinnen: Im Folgenden wird eine Übersicht der Sensitivitätsbewertung beider Tests laut Anzahl positiv getesteter Proben für die Patientinnen im Mittelwert gegeben.

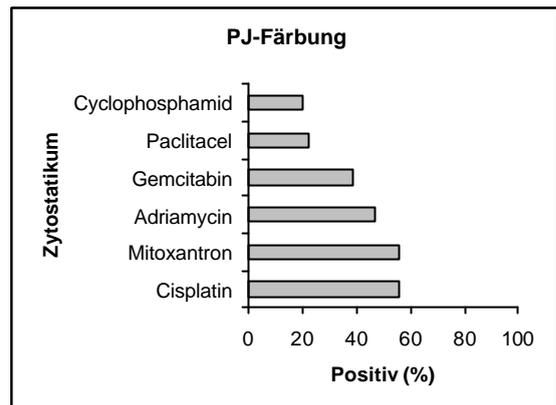
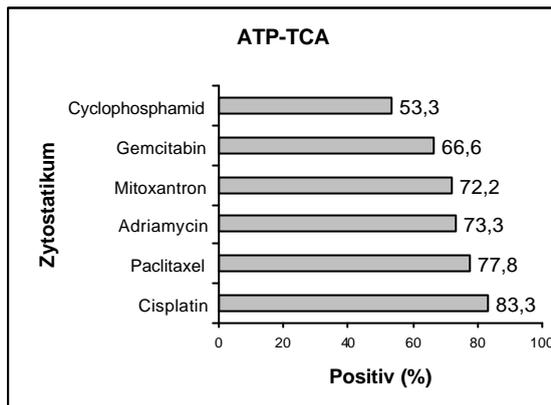


Diagramm 22: Wirksamkeit nach Anzahl positiv getesteter Patientenproben nach ATP-TCA (n=18)

Diagramm 23: Wirksamkeit nach Anzahl positiv getesteter Patientenproben nach PJ-Färbung (n=18)

Zytostatika	Ergebnis-Übereinstimmung:
Mitoxantron	72,2%
Cyclophosphamid	62,5%
Cisplatin	61,1%
Adriamycin	56,3%
Gemcitabin	55,5%
Paclitaxel	44,4%

Tabelle 12: Übersicht über die Häufigkeit gleicher Sensitivitätsbewertung in beiden Tests (Mindest-AUC der Hemmkurve 12.000)

III.2.1.3.4 Ergebnis:

Ausgehend von der Anzahl positiv getesteter Patientenproben im jeweiligen Test, zeigten sich im ATP-TCA die in der first-line-Therapie bevorzugten Substanzen Paclitaxel und Cisplatin als wirksamste Zytostatika. Dann folgten in der Reihenfolge abnehmender Wirksamkeit: Adriamycin, Mitoxantron, Gemcitabin und zuletzt Cyclophosphamid.

In der Apoptoseinduktion zeigten sich als potenteste Substanzen Cisplatin und Mitoxantron, gefolgt von Adriamycin, Gemcitabin, Paclitaxel und zuletzt das eher als ungeeignet zu bewertende Cyclophosphamid.

Im Vergleich der AUC (der Hemmkurven) ergeben sich Größenordnungen in den Substanzwirkung, die insgesamt ähnlich in beiden Tests verliefen.

Deutliche qualitative Unterschiede zwischen den Tests zeigen sich in der Anzahl der jeweils positiv bewerteten Proben.

Eine deutliche Diskrepanz ergibt sich in der Wirksamkeitsbewertung, je nachdem, ob die mittleren AUC-Hemmwerte oder die quantitative Auswertung positiv getesteter Patientenproben zu Grunde gelegt werden.

III.2.2 Kombinationen

Versuche mit Kombinationen von Zytostatika wurden durchgeführt, um einen Ausblick auf Synergie-Effekte zu gewinnen. Die Fragestellung bestand darin, ob die Tests stark abweichende Ergebnisse erzielen würden. Die Anzahl untersuchter Proben ist daher sehr niedrig.

III.2.2.1 Zellkulturen

In der anschließenden Tabelle sind die Ergebnisse der Kombinationsbehandlung der Zellkulturen aufgeführt - es konnte jeweils nur ein Versuch ausgewertet werden.

Zytostatika	ATP-TCA	PJ-Färbung	Ergebnis- Übereinstimmung:
Paclitaxel/ Cisplatin	100% positiv	100% positiv	100%
Paclitaxel/ Mitoxantron	100% positiv	100% positiv	100%
Paclitaxel/ Gemcitabin	100% positiv	100% positiv	100%
Paclitaxel/ Ariamycin	100% positiv	100% positiv	100%
Cisplatin/ Gemcitabin	100% positiv	100% positiv	100%

Tabelle 13: Übersicht der Sensitivitätsbewertung für Kombinationen: Mittelwert der Zelllinien, ATP-TCA vs PJ nach Anzahl positiv getesteter Proben in Prozent (n=3)

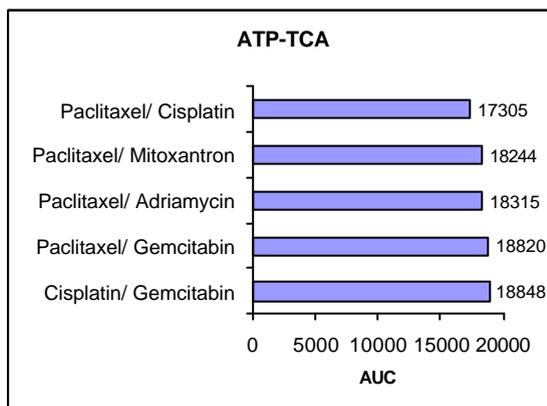


Diagramm 24: Übersicht der Sensitivitätsbewertung für Kombinationen: Mittelwert aller Zelllinien; ATP-TCA nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=3)

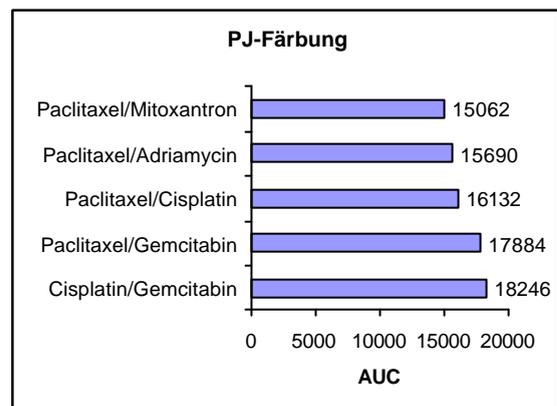


Diagramm 25: Übersicht der Sensitivitätsbewertung für Kombinationen: Mittelwert aller Zelllinien; PJ nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=3)

III.2.2.1.1 Ergebnis:

Die Kombination von Zytostatika zeigten in beiden Tests und bei beiden Bewertungsmöglichkeiten übereinstimmend sehr hohe Ansprechraten.

III.2.2.2 Kombinationsbehandlung bei Patientenproben

Von 4 Patientinnen gab es ausreichend Zellmaterial, um Kombinationen zusätzlich zu den Einzelsubstanzen testen zu können.

Zytostatika	ATP-TCA	PJ-Färbung	Ergebnis-Übereinstimmung:
Paclitaxel/ Cisplatin	100% positiv	100% positiv	100%
Paclitaxel/ Mitoxantron	100% positiv	100% positiv	100%
Paclitaxel/ Gemcitabin	100% positiv	100% positiv	100%
Paclitaxel/ Ariamycin	100% positiv	100% positiv	100%
Cisplatin/ Gemcitabin (n=1)	100% positiv	100% positiv	100%

Tabelle 14: Übersicht der Sensitivitätsbewertung der Patientenproben für Kombinationen, im Mittelwert (n=4): ATP-TCA vs PJ-Färbung

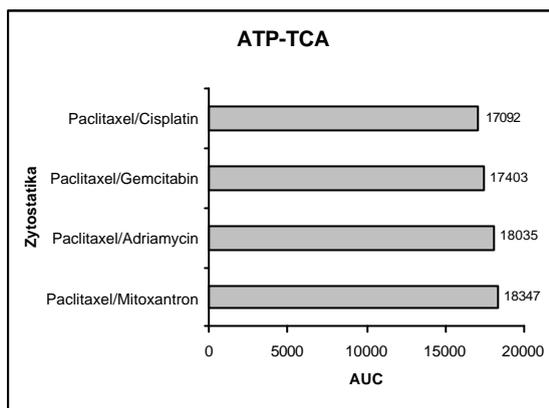


Diagramm 26: Übersicht der Sensitivitätsbewertung für Kombinationen; Mittelwert der Patientinnen; ATP-TCA nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=4)

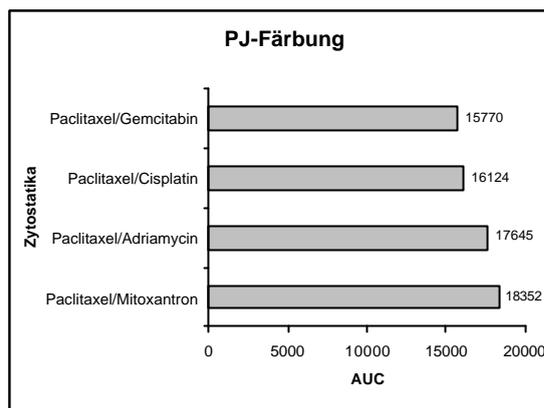


Diagramm 27: Übersicht der Sensitivitätsbewertung für Kombinationen; Mittelwert der Patientinnenproben; PJ nach mittlerer AUC der Hemmkurven (n=4)

III.2.2.2.1 Ergebnis:

Bei den Patientenproben zeigten sich sehr deutliche Synergie-Effekte durch Kombination von Zytostatika, die auch in beiden Tests übereinstimmten.

IV. Diskussion

IV.1 Vergleichende Diskussion der Methoden

In der Testung von ex-vivo-Präparationen stellt sich ein generelles Problem: Ex-vivo-Präparate werden, obwohl sie die originären Tumoreigenschaften besitzen, in den realen, phänotypischen Eigenschaften durch die Isolation vom übrigen Gewebe verändert. Art und Ausmaß der Interaktionen mit den Zellen des umgebenden Gewebes unterscheidet sich: In einer Studie von Fidler et al. [19] wird gezeigt, dass die Entfernung von Fibroblasten aus Kolontumoren in-vitro zu einer reduzierten Expression von MDR1 - und damit zu erworbener Sensitivität gegenüber Doxorubicin - führen kann. Die Chemosensitivität muss also immer als „*context sensitivity*“ betrachtet werden; dieses ist bei der Interpretation der Ex-vivo-Tests zu berücksichtigen. Die hier erzielten Ergebnisse können also von den In-vivo- Eigenschaften des Tumors abweichen [2].

Im Vergleich der Methoden waren die Vorteile des ATP-TCA die geringe benötigte Probenmenge ($4,8 \times 10^5$ Zellen pro Zytostatikum), die leichte Durchführbarkeit und die gute Übersicht über die Gesamtheit der Tumorzellen in ihrer möglichen Heterogenität. Die Präparation war nicht unverhältnismäßig aufwändig und die Proben konnten nach der Färbung sogar eingefroren und später vermessen werden.

Zu den eindeutigen Nachteilen zählte, dass durch die luminometrische Auswertung keinerlei Aufschluß über die Struktur und Beschaffenheit sowie die Vitalität der untersuchten Zellen gewonnen werden konnte.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der apoptotischen Aktivität mittels PJ-Färbung hatte den Vorteil, ein sehr gutes Bild der zellulären Beschaffenheit der Zellen zu vermitteln. Sie war allerdings aufwändiger, zeitintensiver und benötigte

vor allem im Vergleich sehr viel größere Probenmengen ($1,92 \times 10^6$ pro Zytostatikum). Zudem war Erfahrung im Umgang mit dem FACS-System und bei der Interpretation der ermittelten Daten nötig. Die Methode erforderte somit eine Einarbeitung in die Technik der Durchflußzytometrie.

In der Praxis hat sich die PJ-Färbung - im Vergleich zu anderen durchflusszytometrischen Messmethoden für Apoptose - als durchaus praktikabel und wenig störanfällig erwiesen. Vorversuche mit Annexin V- und TUNEL-Färbung zeigten, dass beide Methoden für ex-vivo gewonnenes Gewebe wenig geeignet sind. Für Annexin V, das häufig zur Apoptosefärbung von Suspensionszellen genutzt wird, ergaben sich technische Probleme bei der FACS-Messung. Häufig war die Einstellung der Farbkompensation nicht möglich. Dieses schien mit der Behandlung durch Verdauungsenzyme zur Zellvereinzelung aus solidem Gewebe zusammen zu hängen; vermutlich beeinträchtigte diese Behandlung die Zelloberfläche so stark, dass es zu einer vermehrten unspezifischen Anfärbung kam.

Bei der sogenannten TUNEL-Färbung gab es präparative Probleme bei der Permeabilisierung der Zellmembranen, um Farbstoff und Enzyme passieren zu lassen. Dieses führte häufig zu falschen positiven Ergebnissen und trat sowohl in Vorversuchen mit der histologischen Färbung als auch bei der FACS-Analyse auf. Für das generell heterogene Zellmaterial aus OP-Material musste eine reproduzierbare Färbung in Frage gestellt werden.

Da sich für diese Arbeit die Frage nach der apoptotischen Aktivität nicht auf den Wirkmechanismus der Zytostika bezog (von allen Substanzen ist bekannt, dass sie Apoptose induzieren), sondern auf deren Gesamteffektivität gegenüber originären Tumorzellen, war es unproblematisch, keine der beiden beschriebenen Methoden zu wählen, sondern die dritte Möglichkeit der PJ-Färbung.

Die weniger apoptosespezifische PJ-Färbung war im Vergleich weder präparativ, noch technisch schwierig oder störanfällig. Die Reproduzierbarkeit war gewährleistet.

Im Vergleich zum ATP-TCA ergab sich bei der PJ-Färbung eine zeitliche Beschränkung der Gesamtinkubationszeit.

Obwohl die PJ-Färbung im Unterschied zu den anderen durchflusszytometrischen Apoptosenachweisen eine relativ lange Zeitspanne abbildet, werden Zellen in der sogenannten sekundären Nekrose [14] nicht mehr erfasst und fehlen daher quantitativ in der Gesamtanalyse. Die sekundäre Nekrose umfasst die apoptotischen Zellen, die soweit zerfallen sind, dass sie von primär nekrotischen - also nicht geregelt zerfallenden - Zellen nicht zu differenzieren sind. Sie bilden in der FACS-Grundeinstellung eine Population mit geringer Fluoreszenz unterhalb der apoptotischen Zellfraktion im PJ-Histogramm [39]; sie werden aber bei der Geräteeinstellung über den Schwellenwerte (Threshold) - wegen einer zu geringen Fluoreszenz- ausgeschlossen. Es ergibt sich so eine Situation, in der die Population der apoptotischen Zellen um den Anteil sekundär-nekrotischer Zellen verkleinert wird: damit fällt die Größe der Normalpopulation prozentual zu hoch aus. Daher muss die Inkubationszeit mit den Zytostatika auf maximal 5 Tage beschränkt werden; andernfalls würde der Anteil sekundärer Nekrose zu hoch und das Ergebnis fehlerhaft.

Dieses Problem stellt sich für den ATP-TCA nicht, da hier grundsätzlich die Gesamtheit der vorhandenen ATP-Menge betrachtet wird und tote wie sekundär nekrotische Zellen gleichermaßen kein ATP enthalten.

Ein weiterer Nachteil der PJ-Färbung war die relativ hohe Zellzahl, die benötigt wurde; ausserdem die deutlich höheren Anforderungen an die Ausgangsvitalität als im ATP-TCA. Die große Zellzahl ist im Fall des Ovarialkarzinoms selten problematisch, da meist ausreichend Tumormaterial vorliegt. Die Störung durch

nicht optimale Ausgangsvitalität erschien dagegen größer als bei dem ATP-TCA. Obwohl Zelltrümmer durch ein Gate ausgeschlossen werden konnten, wurde deren genaue Ausgrenzung bei großer Menge schwierig.

Dafür ergab sich bei der PJ-Färbung ein differenzierteres Bild von der untersuchten Probe, z.B. In Bezug auf Vitalität oder Menge von Zelltrümmern.

Damit wurde ein indirektes Bild von der „Güte“ der Probe möglich.

Es muss abschließend darauf hingewiesen werden, dass bei der FACS-Analyse grundsätzlich ein gewisses „Augenmaß“ und damit eine subjektive Komponente eine Rolle spielt, die bei der luminometrischen Auswertung des ATP-TCA nicht existiert.

IV.2 Vergleich der Ergebnisse von Ovarialkarzinom-Zelllinien und Tumorzellen aus Patientenproben

Es zeigten sich in den Versuchen deutliche Unterschiede der Sensitivität von Zelllinien und Patiententumorzellen. Die Beobachtung von Cree und Andreotti, dass kultivierte Zellen tendenziell stärkere Chemosensitivität aufweisen als originäre Tumorzellen, konnte ebenfalls bestätigt werden [1]. Die Autoren Cree und Andreotti hatten dies auf die höhere Wachstumsrate der Zelllinien zurückgeführt. Dies scheint plausibel und stimmte mit der Tatsache überein, dass die Inkubationszeit für die Zellkulturen wegen der hohen Proliferationsraten kürzer gewählt werden mußte als bei den ex-vivo Präparaten. Das Phänomen der negativen Wachstumshemmung, das in einigen ATP-TCAs bei Kulturzellen auftrat, schien ebenfalls mit der hohen Proliferationsaktivität zusammen zu hängen. Es wurde mit der Testung der Zellen unterschiedlicher Herkunft die Tatsache unterstrichen, dass die Verwendung von originärem Tumormaterial für Substanztests wichtig ist für eine realitätsnahe Bewertung. Zellkulturen geben nur einen Teil der möglichen zellulären Reaktionsmuster wieder, da die realen Wachstumsbedingungen unvollkommen nachgebildet sind [2].

IV.3 Vergleich der Ergebnisse ATP-TCA vs PJ-Färbung

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse aus beiden Tests ergaben sich bei den Patientenproben überwiegend ähnliche Reaktionsmuster in Form paralleler Hemmkurvenverläufe. Reaktionsmuster wie z.B. zeit- oder konzentrationsabhängige Hemmung entsprachen sich weitgehend.

Dabei lagen - mit sehr wenigen Ausnahmen - die mit PJ-Färbung ermittelten Hemmwerte (AUC) niedriger als die mit dem ATP-TCA detektierten. Es waren hier in weniger als 1% der verglichenen Testergebnisse (Patientenversuche) die AUC-Werte im PJ-Test höher als im ATP-TCA.

Bei den Kulturzellen ergab sich in diesem Punkt ein heterogeneres Bild, das vor allem vom Ausmaß der Proliferationsaktivität der Zellkultur abzuhängen schien. Die Hemmkurvenverläufe waren mehrheitlich ähnlich, aber die Übereinstimmung war nicht so groß wie bei den Patientenzellen. Die quantitativen Ansprechraten lagen dafür in beiden Tests für die Zelllinien deutlich stärker beieinander.

Werden die Ergebnisse aller sechs Einzelsubstanzen für die drei Zelllinien verglichen, so kommt man zu einer identischen Bewertung von Sensitivität bzw. Resistenz in 79% der Fälle.

Bei den Patientenproben stimmten in der Bewertung von Sensitivität bzw. Resistenz 61% der Versuche überein.

Die Übereinstimmung in den Kombinationsversuchen, die allerdings wegen geringer Probenzahlen nur als Ausblick gewertet werden dürfen, lag bei allen Proben bei 100%. Es gab also in diesem Vergleich unabhängig von der In-vitro- oder Ex-vivo-Herkunft keine Unterschiede. Eine Kombination von Zytostatika scheint also bei den gewählten Substanzen insgesamt synergistische Effekte hervorzurufen.

IV.4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollten die praktischen Möglichkeiten und Grenzen zweier Chemosensibilitätstestsysteme verglichen und bewertet werden.

Die Arbeit sollte aufzeigen, ob die Ergebnisse des, in der Klinik therapiedirigierend bereits eingesetzten, ATP-TCA auch auf Basis gesteigerter Apoptoseaktivität erklärt werden können. Es gibt bisher Erkenntnisse aus klinischen Studien, die darauf hindeuten, dass der ATP-TCA eine gute Prognosekraft vor allem für primäre Resistenzen besitzt [1] [34]. Es fehlte aber eine Bestätigung, dass es sich dabei um mehr als eine Vitalitätsprüfung handelt.

Grundsätzlich sollte festgestellt werden, ob die Apoptosebestimmung mittels PJ-Färbung eine sinnvolle und praktikable Ergänzung darstellt, oder sogar als Ersatz für den ATP-TCA dienen könnte.

Ähnlichkeiten gab es zwischen den Tests bei der Mehrzahl der Proben In Bezug auf die Verläufe der Hemmkurven. Es zeigte sich, dass bei der PJ-Färbung die Reaktionsschemata - wie zeit-oder konzentrationsabhängige Hemmung - mit denen im ATP-TCA im Wesentlichen übereinstimmten.

Es zeigte sich auch in der überwiegenden Zahl der Zellkultur- und Patientenproben, dass die im ATP-TCA beobachteten Effekte in großem Ausmaß auf die Apoptoseaktivität zurück zu führen waren. Somit entstammt der Effekt dieser Chemotherapeutika - entgegen ihrer Namensgebung - nicht vorwiegend aus der Induktion von Zytostase. Alle Substanzen waren in der Lage, in größerem Umfang Apoptose zu induzieren.

Die Abweichungen der beiden Tests zeigten, dass mehrheitlich der ATP-TCA höhere Hemmwerte (AUC-Werte) für die Proben anzeigte als die PJ-Färbung. In der Tat ergab die PJ-Färbung in weniger als 1% der Fälle höhere Werte als der ATP-TCA. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da der ATP-TCA von einem früheren Punkt in der zellulären Veränderung durch Zytostatikabehandlung

an detektiert - nämlich dem Übergang in Stase. Er konnte als sensitiver in Bezug auf den Gesamteffekt bewertet werden, dagegen weniger präzise in der Aussage über den Mechanismus des Effekts. Die Bewertung nach Sensitivität oder Resistenz auf der Grundlage der im ATP-TCA geforderten Gesamthemmwerte (AUC-Höhe) wich immerhin in 40% der Fälle voneinander ab.

Die PJ-Färbung verschaffte einen guten Überblick über die therapeutisch wichtigere apoptotische Effektivität und erlaubte damit gerade auf dem Gebiet der Erkennung primärer Chemoresistenz genauere Aussagen. Sehr wichtig war die Detektion der Apoptoseaktivität vor allem in niedrigen Substanzkonzentrationen. Tumoren reagieren wegen ihrer häufig relativ großen phänotypischen Heterogenität nicht immer einheitlich [2]. Einzelne Fraktionen eines Tumors können eine Chemoresistenz aufweisen oder unter einer Zytostatikabehandlung ausbilden und gehen oft zunächst nur in Stase. Lässt dann die Einwirkung nach, kann es in-vivo zu ausgesprochenen Wachstumsschüben der verbliebenen, resistenten Populationen kommen [24] [36].

Daher kommt es durch eine Behandlung schlimmstenfalls zu einer Selektion resistenter Zellen oder der sekundären Ausbildung von Resistenzmechanismen und damit zu einer Zuspitzung des primären Problems. Den quantitativen Unterschied zwischen Zytostase und Apoptose festzustellen, kann also ein entscheidender Faktor bei der Substanzbewertung sein.

In Bezug auf die Bewertung von Kombinationsbehandlungen konnten zwar wegen geringer Versuchszahlen nur Ausblicke gewonnen werden, diese waren aber in beiden Tests sehr viel versprechend. Die in-vitro erreichten Erfolge stimmten im Vergleich der beiden Tests wesentlich stärker überein als dies bei den Einzelsubstanzen der Fall war. Dies lässt die Vermutung zu, dass Kombinationstherapien stärkere Apoptoseinduktion vermitteln. Die Ansprechraten lagen bei Kombinationsschemata insgesamt wesentlich höher als bei

Monotherapie. Diese Schlußfolgerungen müßten aber durch weitere Tests untermauert werden.

In der abschließenden Bewertung der Testsysteme kann die PJ-Färbung als sehr aufschlussreiche Ergänzung zum ATP-TCA betrachtet werden, um eine dirigierte Chemotherapie zu gestalten. Die Korrelation der Ergebnisse zwischen den Tests war ermutigend. Die Apoptosemessung könnte als Entscheidungskriterium bei der Auswahl zwischen den im ATP-TCA positiv getesteten Substanzen dienen. Ob sie als adäquater Ersatz einsetzbar wäre, kann mit letzter Sicherheit nur eine weitergehende klinische Studie zeigen. Die zusätzlich gewonnenen Informationen über die „apoptotische Potenz“ kann in der Substanzauswahl für die Therapie als wertvolle Hilfestellung dienen.

V. Anhang

V.1 Ergebnisanhang

Patientinnen: Hemmkurven ATP-TCA und PJ im Vergleich; einzeln;
Gewebeherkunft, Alter bei OP

V.2 Exkurs: Quantitative Nachweismethoden der Apoptose

V.2.1 DNA - Leiter: (Gelelektrophorese)

Aus der Suspension der zu untersuchenden Zellen wird zunächst die DNS extrahiert. Dies wird wahlweise mit Hilfe von Filtration oder Zentrifugation durchgeführt. Dann wird das gereinigte Material auf ein 1%-iges Agarosegel, das mit Ethidiumbromid versetzt ist, gegeben und in TBE bei 75V 1,5h laufen gelassen. Die Detektion unter der UV-Lampe zeigt bei einer Apoptose das typische Leitermuster, das mit einer Positivkontrolle verglichen wird.

Anzahl der Zellen : 1.000.000

Zeitpunkt: späteres Stadium der Apoptose

Zeitaufwand: ca. 2-2,5h

Probleme: die genauen Extraktions- und Gellaufbedingungen müssen erst mühsam selber festgestellt werden.

V.2.2 Anti- PARP (Western Blotting):

Das in der Apoptose fragmentierte Enzym PARP (Funktion ist die Bindung an DNS-Strangbrüche), wird in Extraktionspuffer separiert und dann auf SDS-PAGE gegeben.

Von dort wird es mit einem Elektrobplot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die

PARP-Fragmente werden nach Zusatz von Blockierungspuffer mit polyklonalen Antikörpern behandelt und nach zwei weiteren Blockierungsschritten mit einem sekundären Antikörper detektiert. Die Auswertung kann wahlweise mit Chemolumineszenz oder POD- bzw. AP-Konjugaten erfolgen.

Anzahl an Zellen: 100.000- 10.000.000

Zeitpunkt: sehr frühes Stadium

Zeitaufwand: 6-7h

Probleme : die hohe Anzahl an benötigten Zellen ist auf die geringe Sensitivität des Tests zurückzuführen.

V.2.3 Nukleosomale Histone: (ELISA)

In der Apoptose fragmentierte DNS-Bausteine sind mit spezifischen Proteinen, den Histonen, assoziiert. Für den Test wird das Lysat der zu untersuchenden Zellen abzentrifugiert um die Nuklei zu entfernen. Dann wird der Überstand, in dem sich die lösliche niedrigmolekulare DNS befindet, auf eine Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und mit einem Antihiston-Ak und einem Anti-DNS-POD-Ak gleichzeitig inkubiert. Nachdem nicht gebundenes Material 3x ausgewaschen wurde, verbleibt die nukleosomale DNS an die Mikrotiterplatte gebunden. Der auf der "anderen" Seite gebundene POD-gekoppelte Antikörper setzt das nun zugegebene ABTS- Substrat um.

Anzahl der Zellen: 10.000

Zeitpunkt: späteres Stadium

Zeitaufwand: 3h

Probleme: Der Test ist zwar sehr sensitiv und kann aus Ex-vivo Material erstellt werden, muss aber sehr rasch nach der Apoptoseinduktion durchgeführt werden.

Verzögerungen bis zur Messung sind nicht akzeptabel.

V.2.4 Caspase- Aktivität: (ELISA)

Die Caspase 3 ist eines der Schlüsselenzyme in der Initiierungsphase der Apoptose. Nach der Apoptoseinduktion werden die Zellen zunächst lysiert, dann abzentrifugiert. Das Lysat wird auf eine zuvor mit Anti-Caspase beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und inkubiert. Nach der Anbindung von Caspase 3 werden überflüssige Zellkomponenten ausgewaschen und Ac-DEVD-AFC-Substratlösung zugegeben. Das angebundene Enzym setzt aus dem Substrat das Fluorochrom AFC frei, welches fluorimetrisch quantifiziert werden kann.

Anzahl der Zellen: ca. 2.000.000

Zeitpunkt: frühes Stadium

Zeitaufwand: ca. 5h

Probleme: Der Test ist in erster Linie geeignet, die Aktivierung zur Apoptose festzustellen. Außerdem wird eine sehr hohe Zahl an Zellen benötigt. Der Test ist zur Untersuchung eines vermuteten apoptotischen Wirkmechanismus geeignet.

V.2.5 TUNEL-Methode: (Histologie/FACS)

Die in der Apoptose auftretenden Strangbrüche der DNS können mit Hilfe einer terminalen Transferase um ein Fluorescein gelabeltes dUTP-Nukleotid verlängert werden. Dazu werden die Zellen zunächst mit PFA fixiert und später permeabilisiert, um sowohl der Transferase als auch dem dUTP den Zugang zum Zellkern zu gewähren. Diese Färbung kann sowohl für die Durchflußzytometrie (mit großen Vorbehalten) als auch für histologische Präparate genutzt werden. Dabei werden die apoptotischen Zellkerne fluoreszierend.

Anzahl der Zellen: 2.000.000-5.000.000

Zeitpunkt: fortgeschrittene Apoptose

Zeitaufwand: für Histologie 2-2,5 h / für FACS-Analyse 4-5h

Probleme: Der Test ist im Prinzip sehr spezifisch. Er ist aber ausgesprochen laborintensiv und für die Durchflußzytometrie nur bedingt geeignet. Hierbei kann es zu Problemen mit der reproduzierbaren Permeabilisierung (und damit der Anfärbbarkeit) der Zellen kommen.

V.2.6 Annexin-V: (Histologie/FACS/ ELISA)

Die auf der Zellmembran in der frühen Apoptose exprimierten Phosphatidylserinreste können mit Annexin-V gebunden werden. Annexin-V kann nun seinerseits an Fluorescein (oder Biotin) gebunden sein. So kann in einer direkten Färbung die Zelloberfläche für Histologie oder Durchflußzytometrie sichtbar gemacht werden. Um eine Abgrenzung gegen die Nekrose vorzunehmen, wird mit PJ (DNS-Anfärbung) auf Vitalität gegengefärbt.

Die Färbung von mit Biotin gekoppeltem Annexin-V (ELISA) beruht auf einer Antikörperreaktion mit dem Biotinrest. Diese Antikörper sind ihrerseits mit POD oder AP gekoppelt und können mit entsprechenden Substraten zur fluorimetrischen Analyse eingesetzt werden. Dabei ist nur eine Zunahme der Fluoreszenz auswertbar. Im Gegensatz dazu kann sowohl bei der FACS - als auch bei der histologischen Analyse - die Quantität der apoptotischen Zellen bestimmt werden.

Anzahl der Zellen: 1.000.000

Zeitpunkt: frühes Stadium der Apoptose

Zeitaufwand: 30 Minuten Annexin-V:

Probleme: Die Färbung kann nicht an Zellen vorgenommen werden, deren Zellmembran beeinträchtigt ist. Das heißt, enzymatisch vereinzelte oder fixierte Zellen können nicht eingesetzt werden. Die Färbung ist aber darüber hinaus sehr gut geeignet, um Apoptose spezifisch (mit PJ-Gegenfärbung!) nachzuweisen.

V.2.7 PJ-Färbung: (FACS)

Da in der Apoptose die DNS degradiert wird, ist die Färbung mit PJ auf den DNS-Gehalt eine einfache Methode, um die Verkleinerung der Zellkerne nachzuweisen. Ein Vorteil ist, dass weder eine Vorbehandlung der Zellen erforderlich noch hinderlich ist. Die Zellen werden für die Färbung in einem hypotonen Detergentienpuffer lysiert und die Kerne gleichzeitig mit PJ über Nacht gefärbt. Es ist bei der Auswertung aber zu beachten, dass die Veränderung der Kerngranularität (Kondensation des Chromatins) als zweiter Meßparameter in der FACS-Analyse zu Rate gezogen wird, um sekundär nekrotische Zellkerne auszuschließen.

Anzahl der Zellen: ca. 200.000

Zeitpunkt: fortgeschrittene Apoptose

Zeitaufwand: 8-12h

Probleme: Es handelt sich nicht um einen absolut apoptosespezifischen Nachweis. Die Differenzierung von Zytostase und Apoptose ist jedoch möglich. Nekrose, gegen die hier abgegrenzt werden soll, zeichnet sich aber ohnehin durch einen schnelleren Verlauf aus und ist bei der Behandlung mit Zytostatika im Prinzip nicht zu erwarten. Die PJ-Färbemethode bietet sich auch für große Probenumfänge an.

VI. Literaturverzeichnis

- [1] **Andreotti P, Cree IA, Kurbacher CM, Hartmann D, Linder D, Harel G, Gleiberman I, Caruso P, Ricks S, Untch M, Sartori C, Bruckner HW:** Cemosensitivity Testing of Human Tumors Using a Microplate Adenosine Triphosphate Luminescence Assay: Clinical Correlation for Cisplatin Resistance or Ovarian Carcinoma. *Cancer Research* **55**, 5276-5282 (1995)
- [2] **Andreotti PE, Linder D, Hartmann DM et al.:** ATP-TCA tumor chemosensitivity assay: differences in sensitivity between cultured tumour cell lines and clinical studies. *J Biolumin Chemilumin* **9**: 373-8 (1994)
- [3] **Andreotti PE:** Development and Validation of the DCS-TCA. Abstracts, 3. DCS Workshop:ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay Nov. (1998)
- [4] **Arceci R:** Review: Can multidrug resistance mechanisms be modified? *British Journal of Haematology* **110**, 285-291 (2000)
- [5] **Bellamy W.T.:** Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro assays. *Drugs* **44**: 690-708 (1992)
- [6] **Bissery M, Armand J, Khoury S:** Pre-clinical in vitro screening of chemotherapeutic agents. *Handbook of Chemotherapy in Clinical Oncology*, 2nd edition: 50-57 (1993)
- [7] **Bradshaw DM, Arceci RJ:** Clinical Relevance of Transmembrane Drug Efflux as a Mechanism of Multidrug Resistance. *J. Clin. Oncol.* **16** (11): 3674-90 (1998)
- [8] **Breitbach, Distler, Dornoff, Frick, Ziegler:** Empfehlungen zur Therapie: *Onkologie* **8**. Auflage 146-53 (1996)
- [9] **Bruckner HW, Lee JM, Runowicz CD, Goldberg GL, Smith HO, Caruso PA, Gleiberman I, Hartmann DH, Linder DH, Harel GH, Cuttner J, Andreotti PE:** ATP bioluminescence tests the sensitivity of human tumors to Adriamycin, Taxol, Cisplatin and the combinations. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.;* **35**: 201 (1994)
- [10] **Chinnaiyan AM, Dixit VM:** The cell-death machine. *Current Biology* **6**: 555-562 (1996)
- [11] **Cree IA, Andreotti PE:** Measurement of Cytotoxicity by ATP-based Luminescence Assay in primary Cell Cultures and Cell Lines. *Toxicology in vitro* **2**: 553-556 (1997)

- [12] **Cree IA, Kurbacher CM:** Review paper: Individualizing chemotherapy for solid tumors- is there any alternative?. *Anti-Cancer Drugs* **8**, pp. 541-548 (1997)
- [13] **Darzynkiewicz Z, Juan G, Gorczyca W, Murakami, Traganos F:** Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**: 1-20 (1997)
- [14] **Dive C:** Avoidance of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Journal of Internal Medicine* **242** (Supplement 740): 139-45 (1997)
- [15] **Eastman A:** Activation of programmed cell death by anticancer agents: Cisplatin as a model system. *Cancer Cells*, **2**:275-80 (1990)
- [16] **Efferth T, Fabry U, Osieka R:** Apoptosis and resistance to daunorubicin in human leukemic cells. *Leukemia* **11**: 1180-1186 (1997)
- [17] **Engst R, Pätzold C, Stecher J, Tshisuaka BI:** *Psychyrembel Therapeutisches Wörterbuch*, Walter de Gruyter Verlag Berlin 2. Auflage: 655 (2001)
- [18] **Fessler B:** Molekulare Onkologie: Krebs - eine Krankheit der Gene. *DAZ* **140**: 2 (2000)
- [19] **Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A, Radinsky R, Dong Z, Fan D:** Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metast. Rev.* **13**: 209-22 (1994)
- [20] **Fisher D:** Apoptosis in cancer therapy: Crossing the threshold. *Cell* **78**: 539-742 (1994)
- [21] **Furukawa T, Kubota T, Hoffmann R M:** Clinical Applications of the Histoculture Drug Response Assay. *Clinical Cancer Res. Vol.* **1**: 305-311 (1995)
- [22] **Gibb R, Taylor D, Wan T, O'Connor D, Doering D, Gercel-Taylor C:** Apoptosis as a measure of chemosensitivity to Cisplatin and Taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecologic Oncology* **65**: 13-22 (1997)
- [23] **Gibb RK, Taylor DD, Wan T, O'Connor DM, Doering DL, Gercel-Taylor C:** Apoptosis as a Measure of Chemosensitivity to Cisplatin and Taxol Therapy in Ovarian Cancer Cell Lines. *Gynecol Oncol* **65**: 13-22 (1997)
- [24] **Hager E:** Komplementäre Onkologie: adjuvate, additive, supportive, Forum Medizin Verlags Gesellschaft Gräfelfing (1996)

- [25] **Hannun YA:** Review Article: Apoptosis and the Dilemma of Cancer Chemotherapy. *Blood* Vol 89, **6**: 1845-53 (1997)
- [26] **Havrilesky L, Elbendary A, Hurteau JA, Whitaker RS, Rodriguez GC, Berchuck A:** Chemotherapy-Induced Apoptosis in Epithelial Ovarian Cancers. *Obstret Gynecol*, **85** (6):1007-10 (1995)
- [27] **Herrin VE, Thigpen JT:** Chemotherapy for ovarian cancer: current concepts. *Semin Oncol* 1999 Oct-Nov; **17** (3): 181-8 (1999)
- [28] **Hickman JA:** Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev* **11**:121-39 (1992)
- [29] **Iwadate Y, Fujimoto S, Sueyoshi K, Namba H, Tagawa M, Yamaura A:** Prediction of drug cytotoxicity in 9L rat brain tumor by using flow cytometry with desoxyribonucleic acid-binding dye. *Neurosurgery* **40**: 782-788 (1997)
- [30] **Kerr J, Winterford C, Harmon B:** Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**: 2013-2026 (1994)
- [31] **Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH:** Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* **84**: 1415-1420 (1994)
- [32] **Krammer PH:** *Apoptose*, Dt Ärztebl (Heft 25) ; **97**: A-1752-1759 (2000)
- [33] **Kurbacher CM, Cree IA, Brenne U, Bruckner HW, Kurbacher JA, Mallmann P, Andreotti PE, Krebs D:** Heterogeneity of *in vitro* Chemosensitivity in perioperative breast cancer cells to mitoxantrone *versus* doxorubicin evaluated by a microplate ATP bioluminescence assay: *Breast Cancer Research and Treatment* **41**: 161-179 (1996)
- [34] **Kurbacher CM, Bruckner HW, Cree IA, Kurbacher JA, Wilhelm L, Poech G, Indefrei D, Mallmann P, Andreotti PE:** Mitoxantrone Combined with Paclitaxel as Salvage Therapy for Platinum-refractory Ovarian Cancer: Laboratory Study and Clinical Pilot Trial. *Clinical Cancer Research* Vol. **3**, 1527-1533 (1997)
- [35] **Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, Brenne U, Kurbacher JA, Muller K, Ackermann T, Gilster TJ, Wilhelm LM, Engel H, Mallmann PK, Andreotti PE:** Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direct chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* Jan; **9** (1): 51-7 (1998)

- [36] **Kurbacher CM, Mallmann P, Kurbacher JA, Hübner H, Krebs D:** Chemosensibilitätstestungen in der gynäkologischen Onkologie, Geburtshilfe und Frauenheilkunde **56**, 70-78 (1996)
- [37] **Leith C:** Multi drug resistance in leukemia. Current Opinions in Hematology 5: 287-291 (1998)
- [38] **Ling V:** Multi drug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. Cancer Chemotherapy and Pharmacology 40:3-8 (1997)
- [39] **Maciorowski Z., Delic J, Padoy E, Klijanienko J, Dubray B, Cosset JM, Dumont J, Magdelénat H, Vielh P:** Comparative analysis of apoptosis measured by Hoechst and flow cytometry in Non-Hodkin´s lymphomas. Cytometry 32: 44-50 (1998)
- [40] **Majano G, Joris I :** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. American Journal of Pathology 146:3-15 (1995)
- [41] **Mc Guire WP, Hoskins WJ, Brady MF, Kucera PR, Partridge EE, Look KY, Clarke-Pearson DL, Davidson M:** Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. N. Engl. J. Med. **334**:1-6 (1996)
- [42] **Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M:** Arzneimittelwirkungen; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage: 884-899 (2001)
- [43] **Nagata S:** Review: Apoptosis by death factor. Cell 355-365 (1999)
- [44] **Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C:** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, Journal of Immunological Methods 139, 271-279 (1991)
- [45] **Ormerod MG, O`Neill C, Robertson D, Kelland LR, Harrap KR:** *Cis-Diamminedichloroplatinum(II)*-induced cell death through apoptosis in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines. Cancer Chemother Pharmacol **37**: 463-71 (1996)
- [46] **Ormerod MG:** Review: The study of apoptotic cells by flow cytometry. Leukemia **12**: 1013-1025 (1998)
- [47] **Partridge EE, Barnes MN:** Epithelial ovarian cancer: prevention, diagnosis, and treatment. CA Cancer J Clin Sep-Oct; **49** (5): 297-320 (1999)

- [48] **Pfleiderer A, Brechwooldt M, Martius G (Hrsg):** Maligne Tumoren der Ovarien aus *Gynäkologie und Geburtshilfe*, Thieme Verlag Stuttgart (2000)
- [49] **Preiß J, Dornoff W, Hagmann FG, Schmieder A:** Empfehlungen zu Therapie , Onkologie 1996, **8.** Auflage, 145-53 (1996)
- [50] **Roitt J, Brostoff J, Male D:** Essential Immunology. **8.** Ausgabe. Mosby London (1994)
- [51] **Sachs L:** Angewandte Statistik, **8.** Auflage 1992
- [52] **Sadeé W:** *Commentary*; Genomics and Drugs: Finding the Optimal Drug for the Right Patient. *Pharm Res* Vol 15, **7:** 959-63 (1998)
- [53] **Sheets E, Yeh J:** The Role of Apoptosis in Gynaecological Malignancies. *Ann Med* **29:** 121-26 (1997)
- [54] **Steck K, McDonnell T, Sneige N, el-Neggar A:** Flow cytometric analysis of apoptosis and bcl-2 in primary breast carcinomas: clinical and biological implications. *Cytometry* **24:** 116-122 (1996)
- [55] **Telford W, King L, Fraker P:** Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry* **13:** 137-143 (1992)
- [56] **Therapiekonzepte für Klinik und Praxis. Forum- Medizinische-Verlagsgesellschaft.,(1996)**
- [57] **Thigpen JT:** Chemotherapy for advanced ovarian cancer: overview of randomized trials. *Semin Oncol* 2000 Jun; **27** (3 Suppl 7) :11-6 (2000)
- [58] **Türkeri L, Akdas G, Özyürek M, Akdas A:** the role of in vitro tests to predict the clinical efficacy of antineoplastic agent in genito-urinary tumors. *Arch. Esp de Urol.* **51**,4:398-404 (1998)
- [59] **Untch M, Crohns C, Konecny G, Meier W, Kurbacher CM, Andreotti PE, Bruckner HW:** Correlation of *in vitro* tumor chemosensitivity assay with outcome in ovarian cancer patients given carboplatin and cyclophosphamide. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol*, **15:** 302 (1996)
- [60] **Van Engeland M, Nieland L, Ramaekers F, Schutte B, Reutelingsperger C:** Review Article: Annexin V-Affinity A: A review on an apoptosis detection system based on Phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31:** 1-9 (1998)

[61] **Volm M:** Multidrug Resistance and its Reversal. Anticancer Res Jul-Aug; 18 (4C): 2905-17 (1998)

[62] **Vossebeld P, Sonneveld P:** Reversal of multi drug resistance in hematological malignancies. Blood Review, 13: 67-78 (1999)

[63] **Wagener C:** Einführung in die Molekulare Onkologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1996)

Arzneimittel-Fachinformationen der Hersteller

Adriblastin (Doxorubicin): Firma FARMITALIA CARLO ERBA GmbH, Freiburg

Stand der Information Februar 1987

Cyclostin (Cyclophosphamid): Firma Pharmacia Upjohn GmbH, Erlangen

Stand der Information Dezember 1995

Gemzar (Gemcitabin): Lilly Deutschland GmbH, Gießen

Stand der Information Februar 1996

Novantron (Mitoxantron): Lederle Arzneimittel GmbH & Co., Wolfratshausen

Stand der Information: Januar 1996

Plastiblastin (Cisplatin): Pharmacia Upjohn GmbH, Erlangen

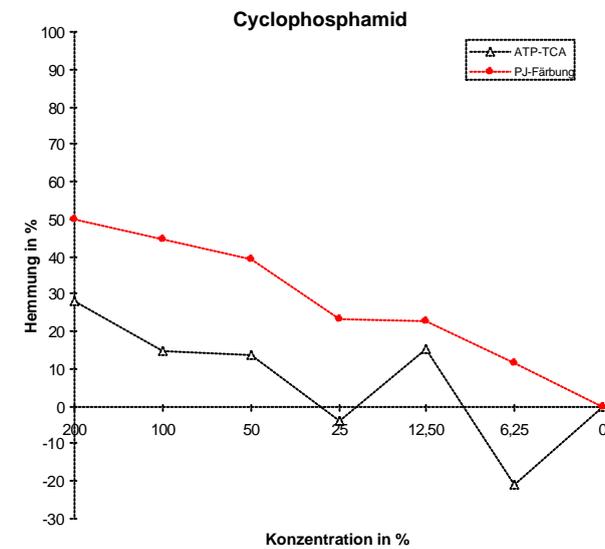
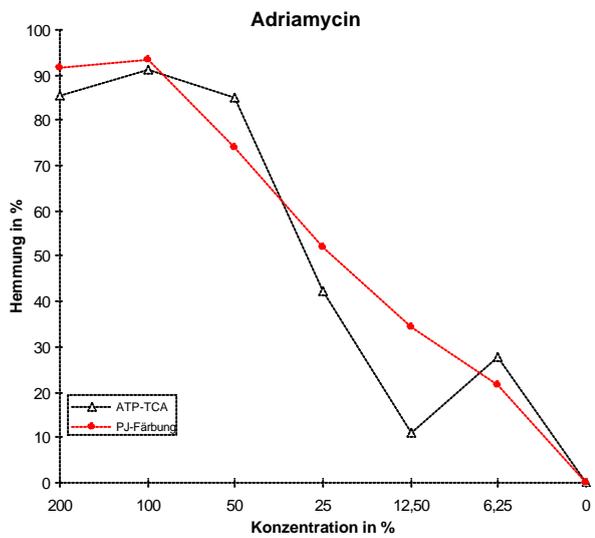
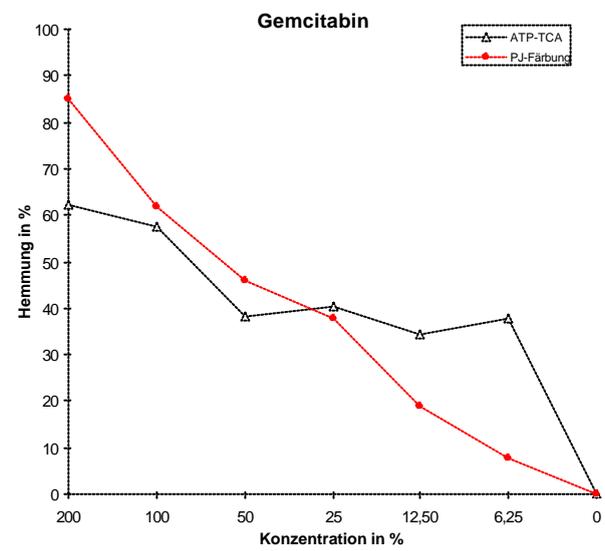
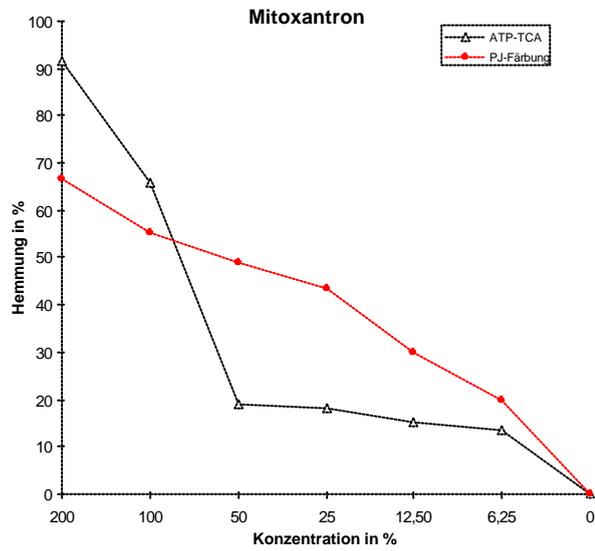
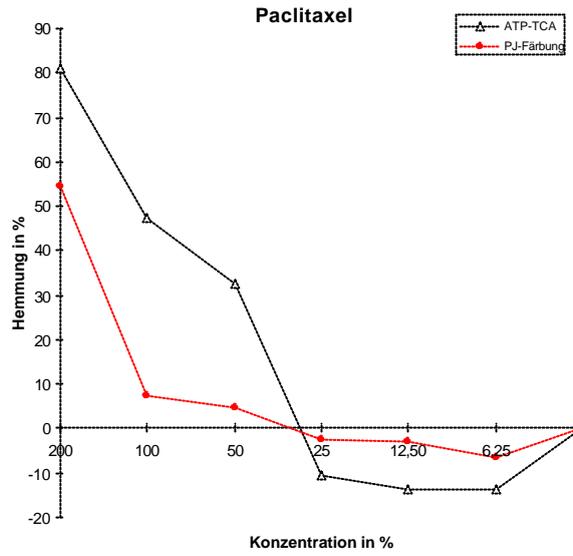
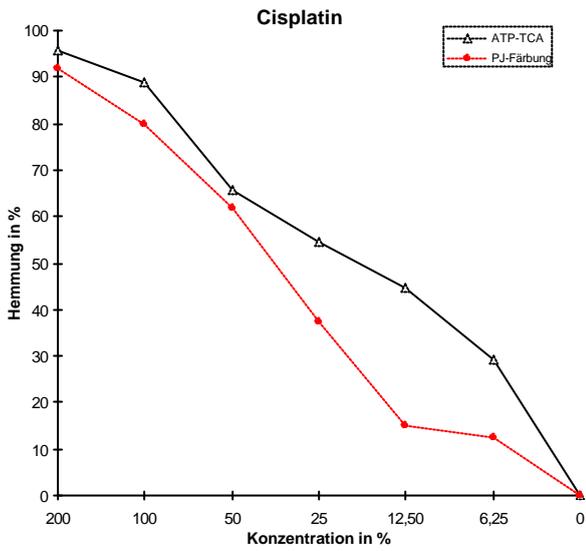
Stand der Information April 1997

Taxol (Paclitaxel): Bristol Arzneimittel GmbH, München

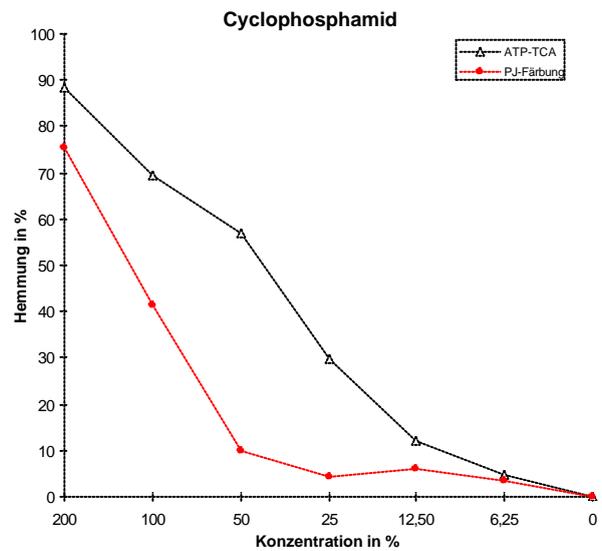
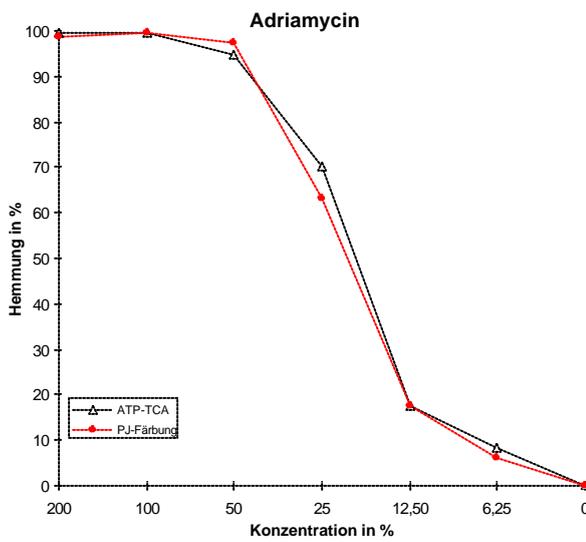
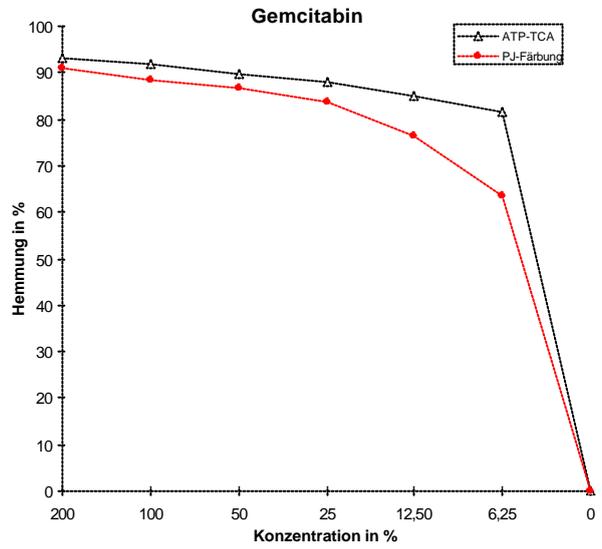
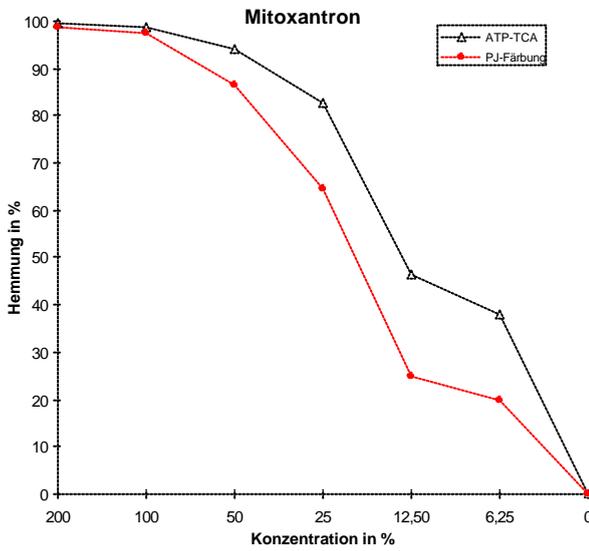
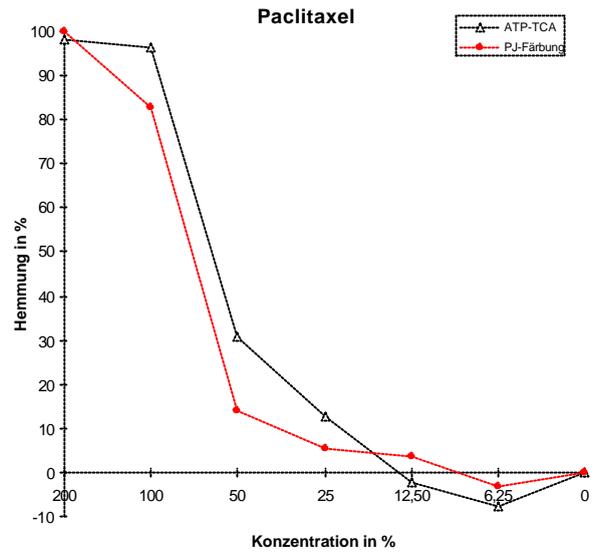
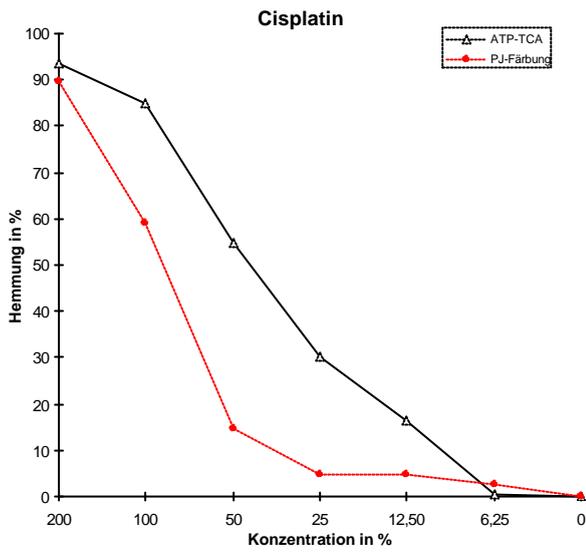
Stand der Information: März 1995

VII. Ergebnisanhang

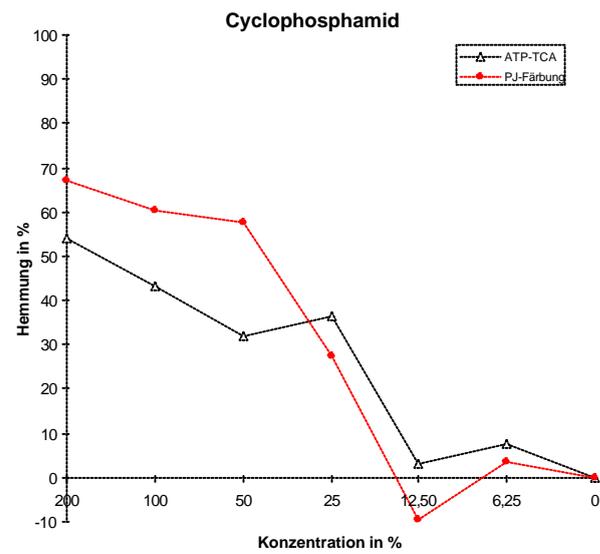
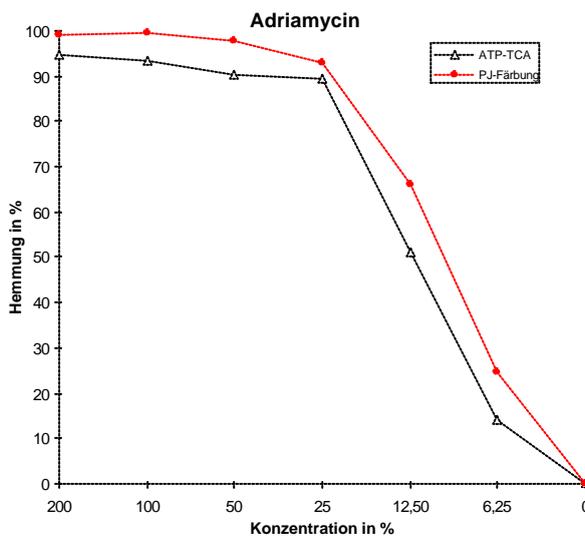
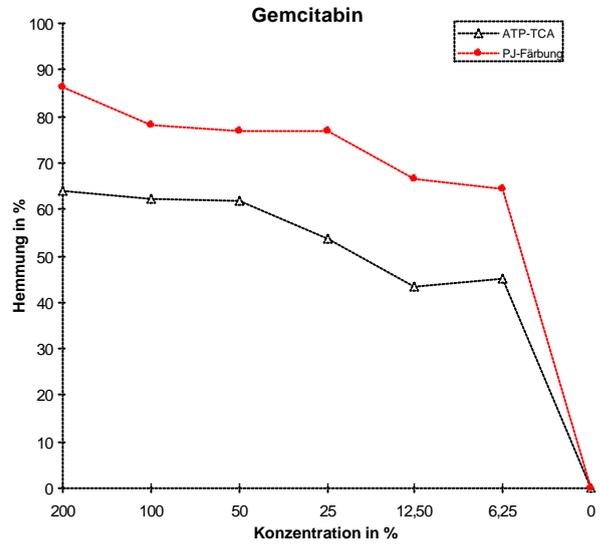
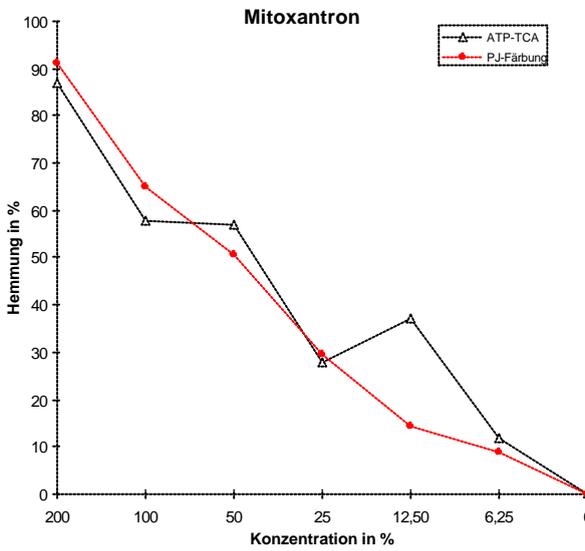
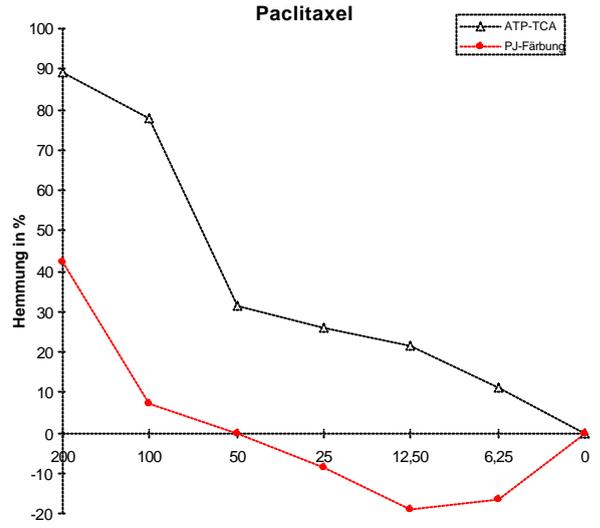
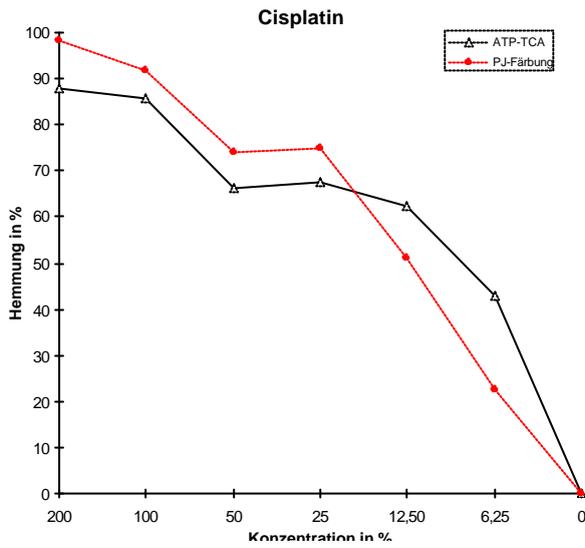
Patientin E. B.: Probe: Primäres Ovarialkarzinom, Ascites; Alter bei O.P.: 43 Jahre



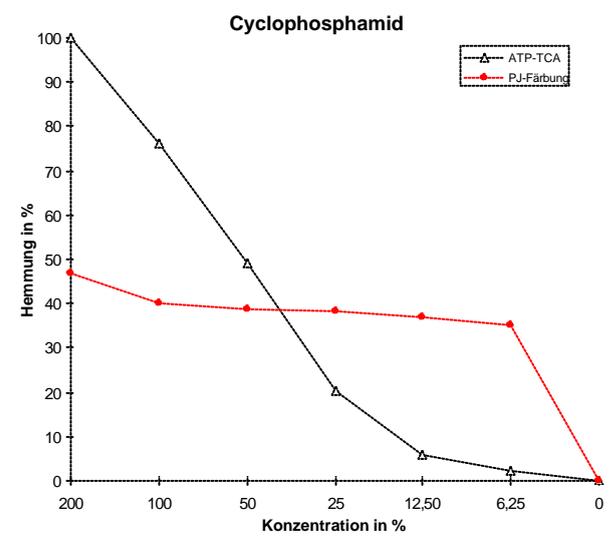
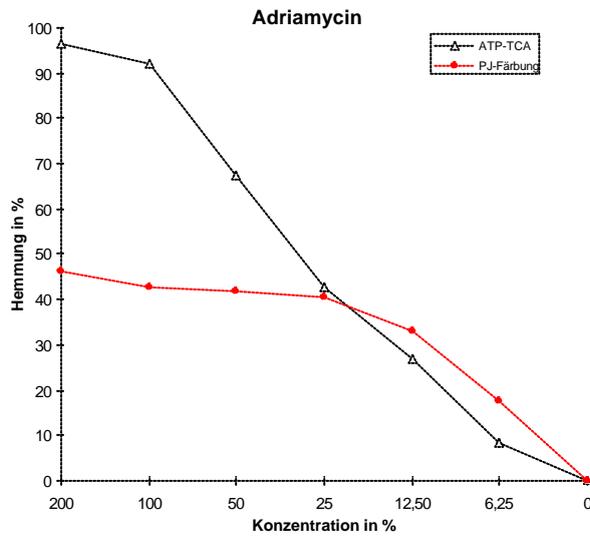
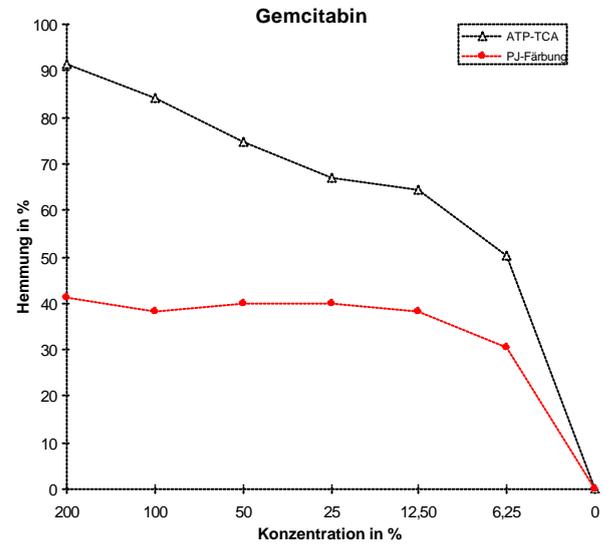
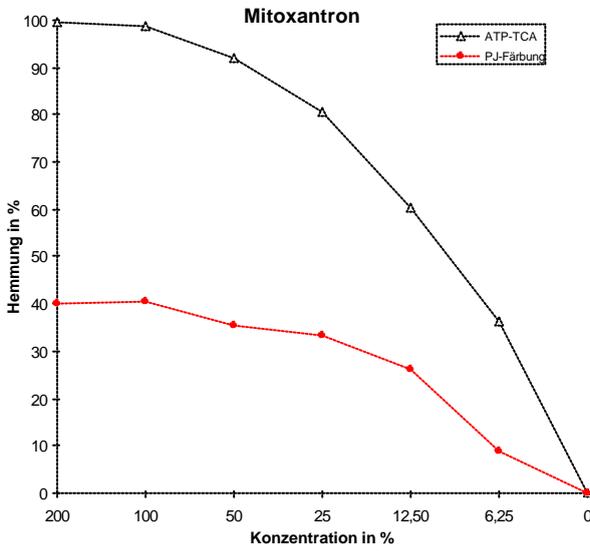
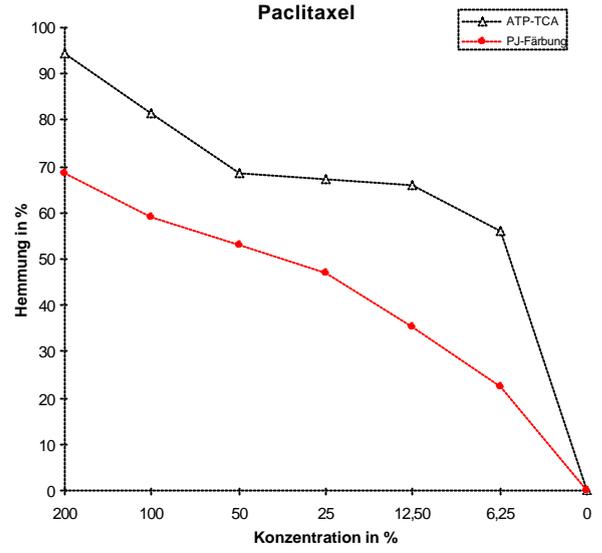
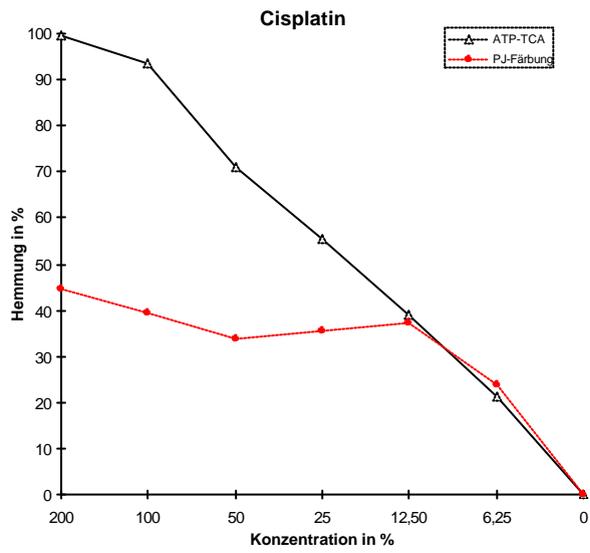
Patientin I. S.: Probe: Rezidiv Ovarial- und Mammakarzinom, Ascites; Alter bei O.P.: 64 Jahre



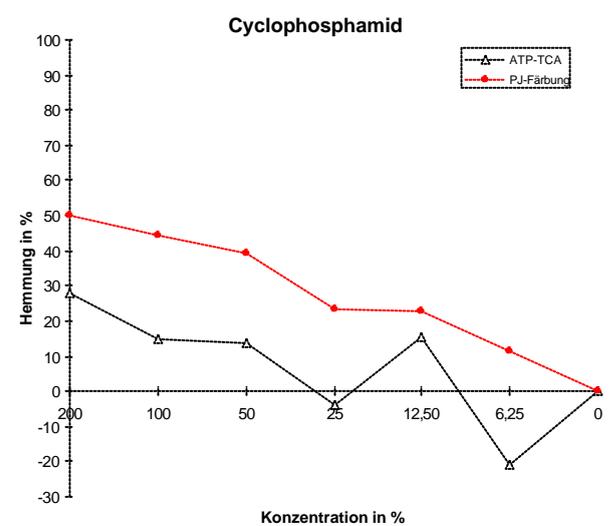
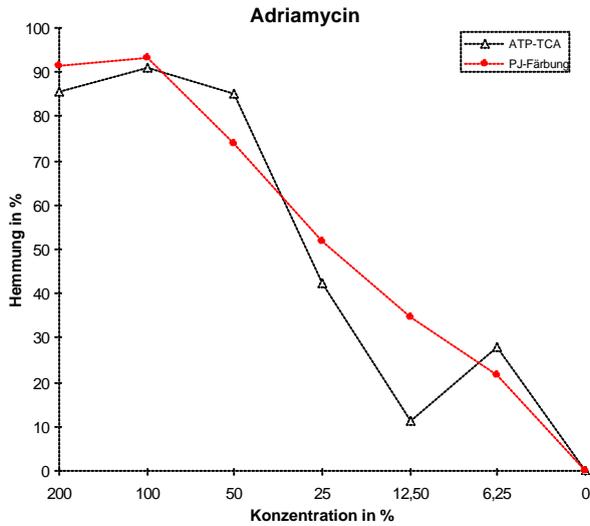
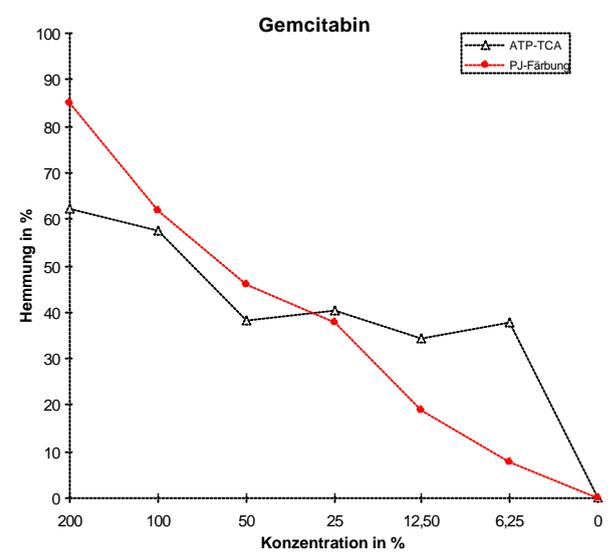
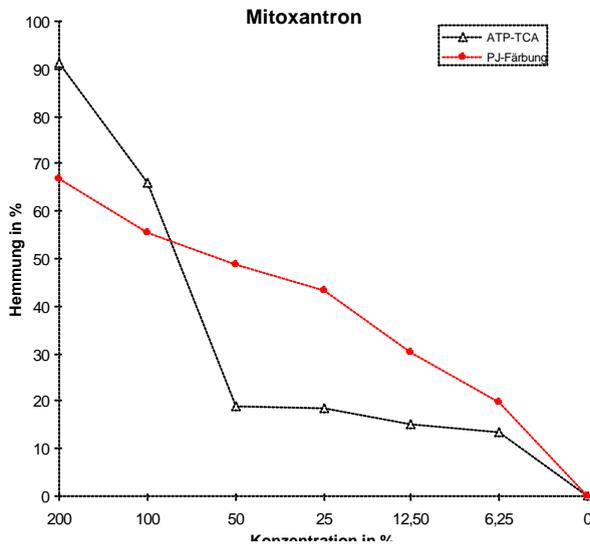
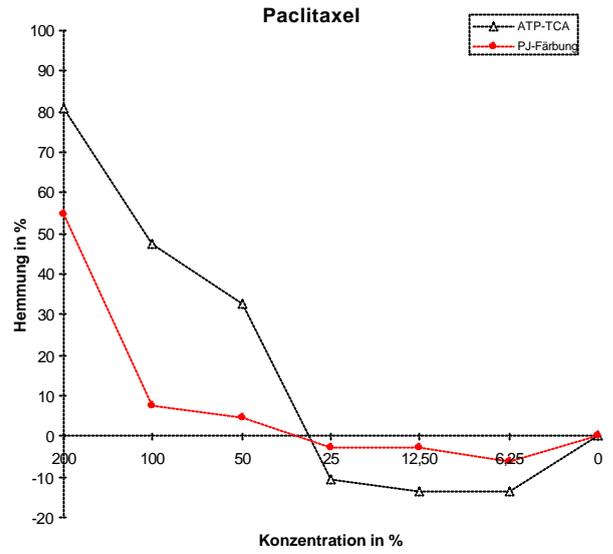
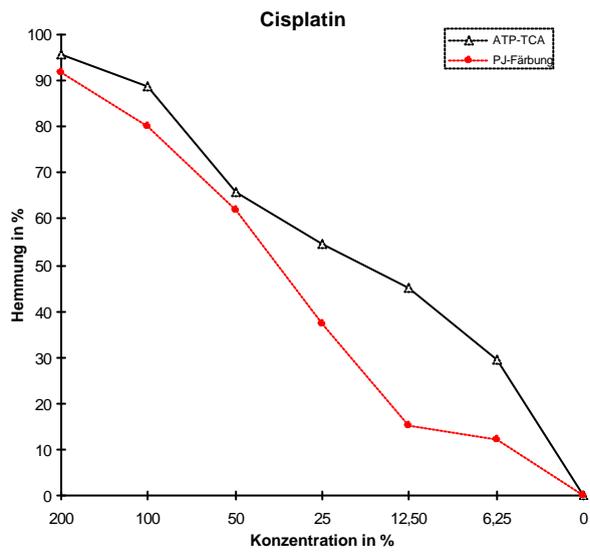
Patientin R.K. Probe: Primäres Ovarialkarzinom, Pleurapunktat; Alter bei O.P.: 54 Jahre



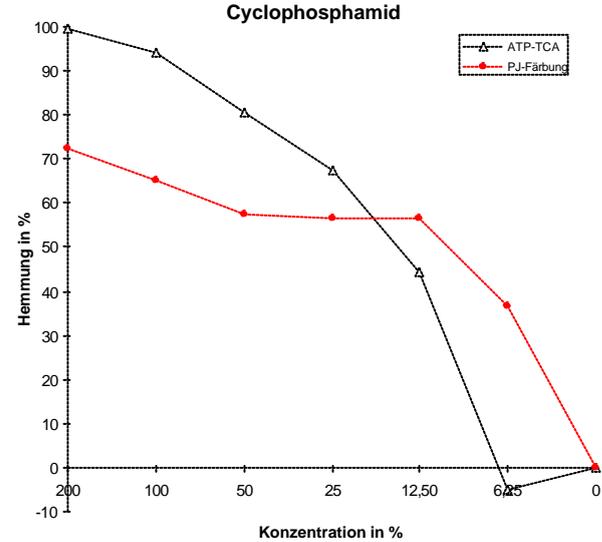
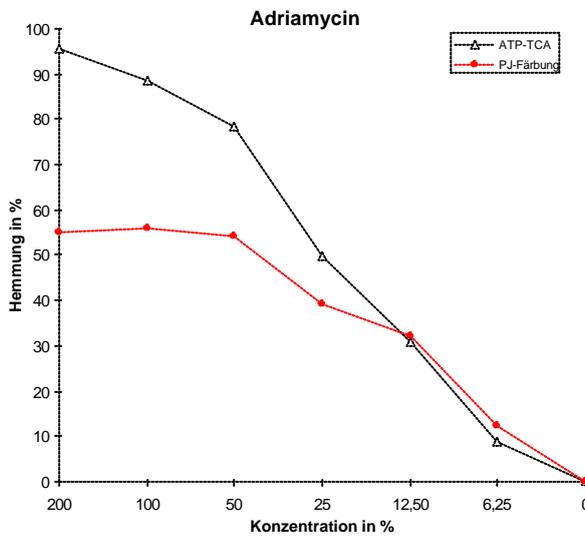
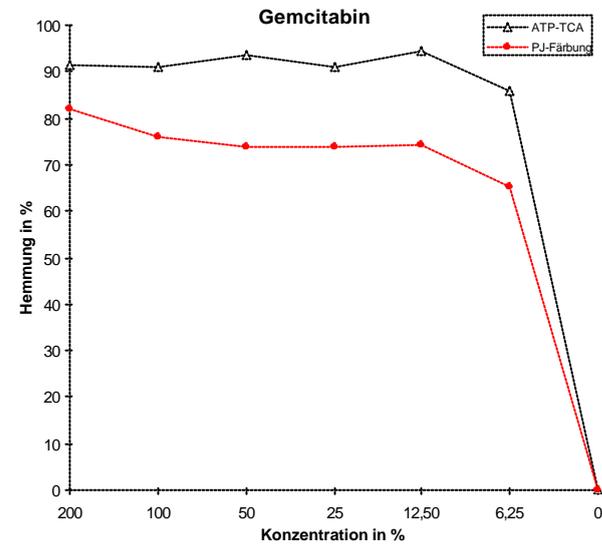
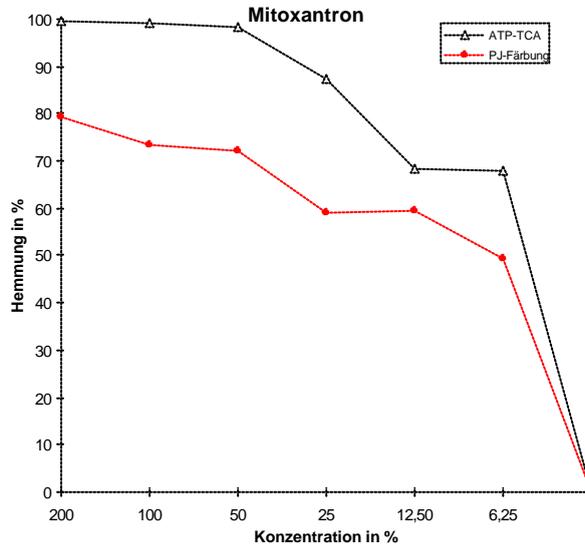
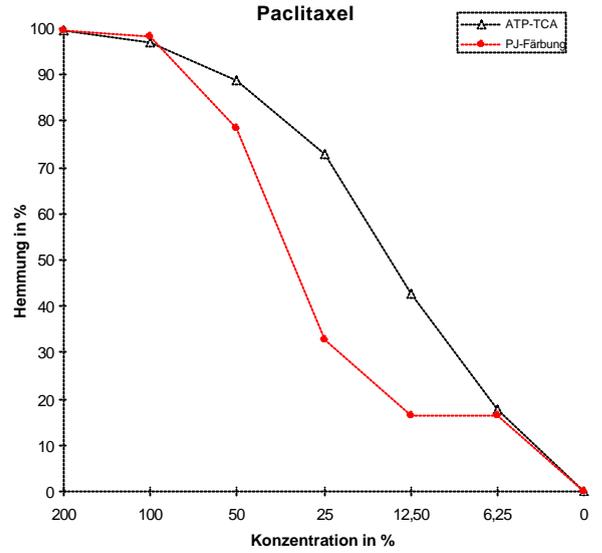
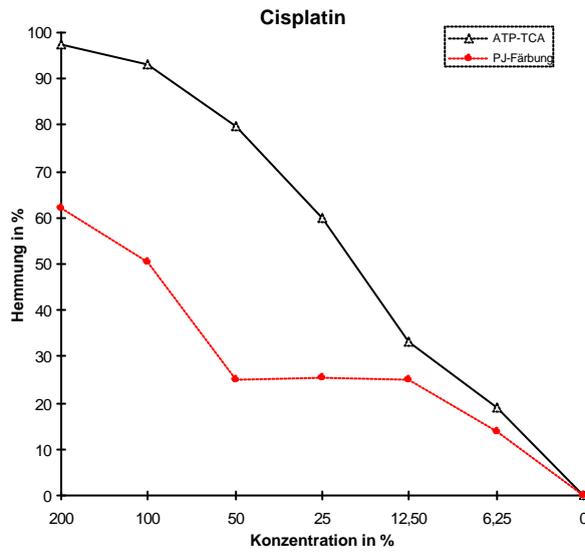
Patientin E. S.: Probe: Mamma- und Ovarialkarzinom, Pleura- Punktat; Alter bei O.P.: 60 Jahre



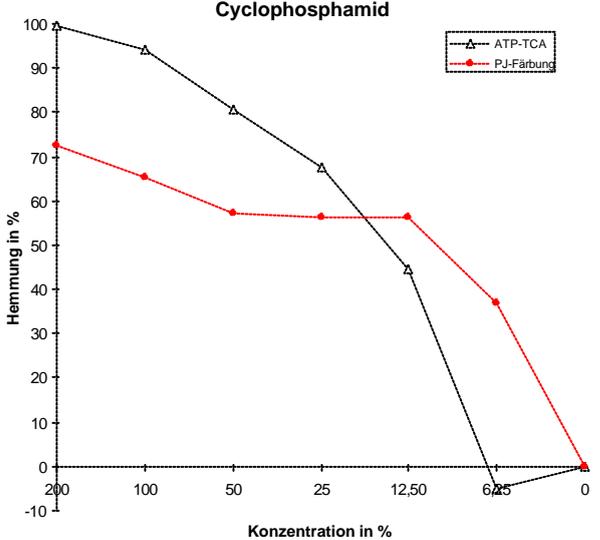
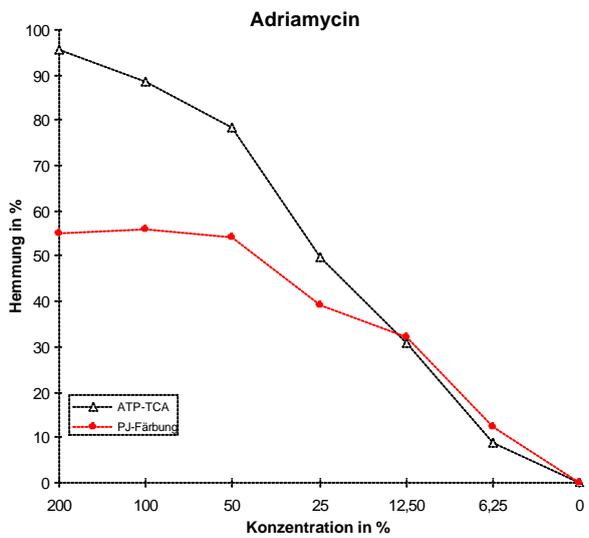
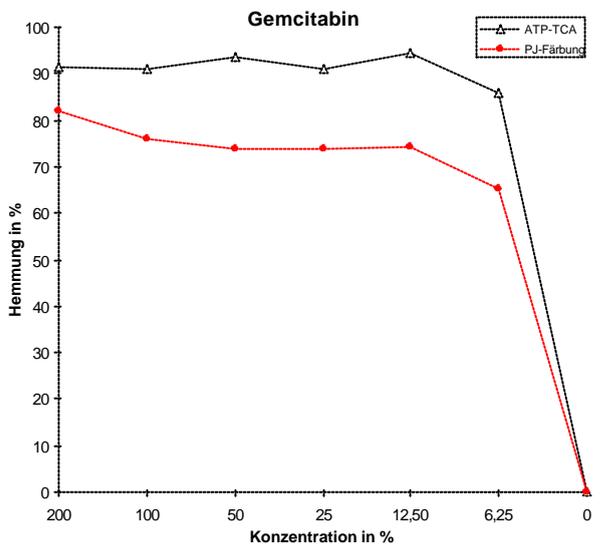
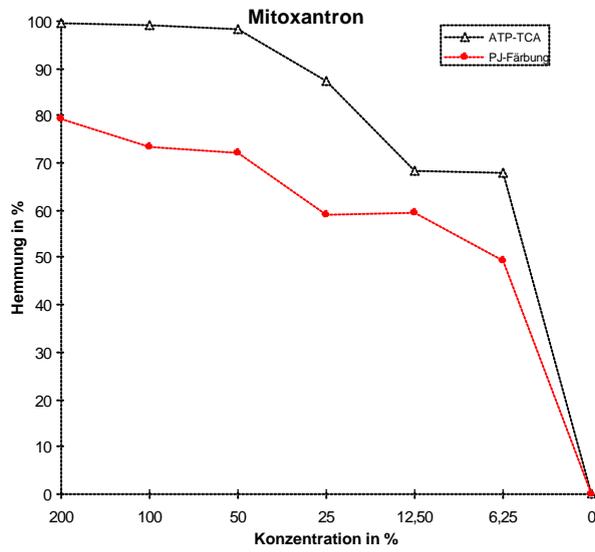
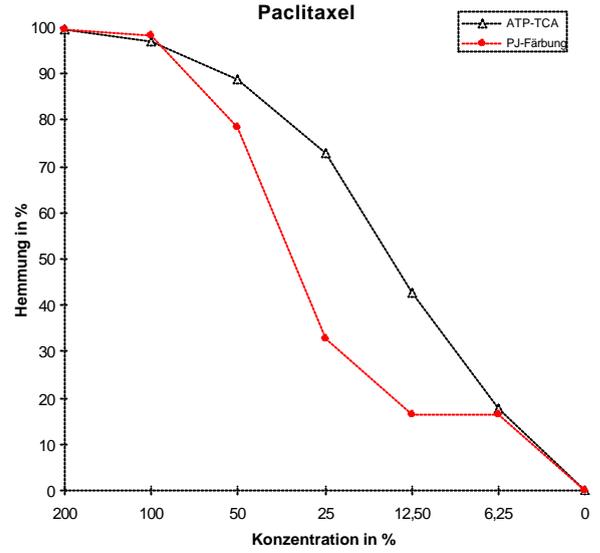
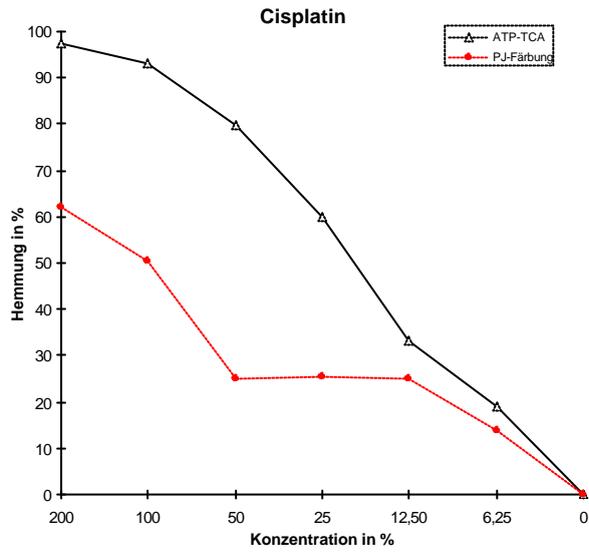
Patientin F. C.: Probe: Rezidiv Ovarialkarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 47 Jahre



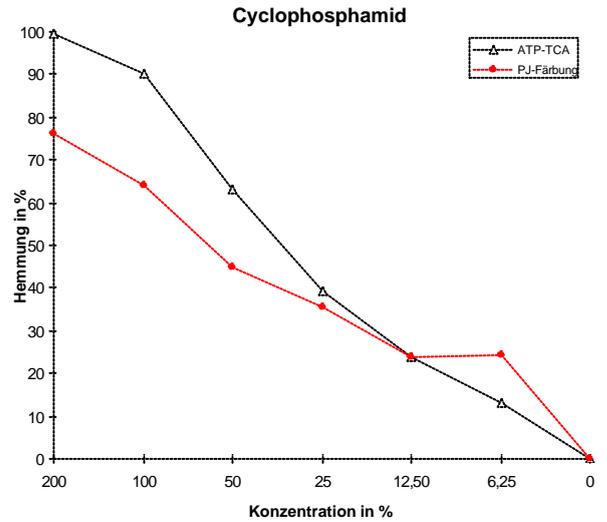
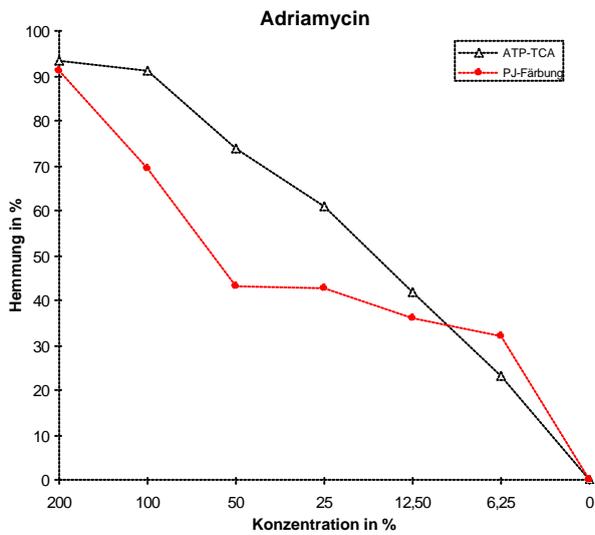
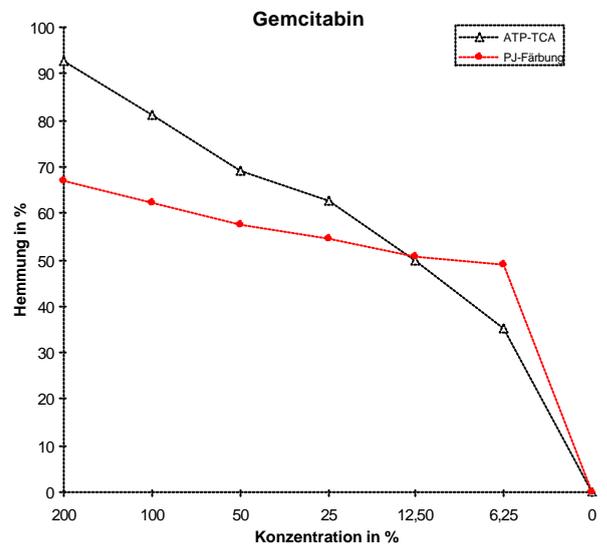
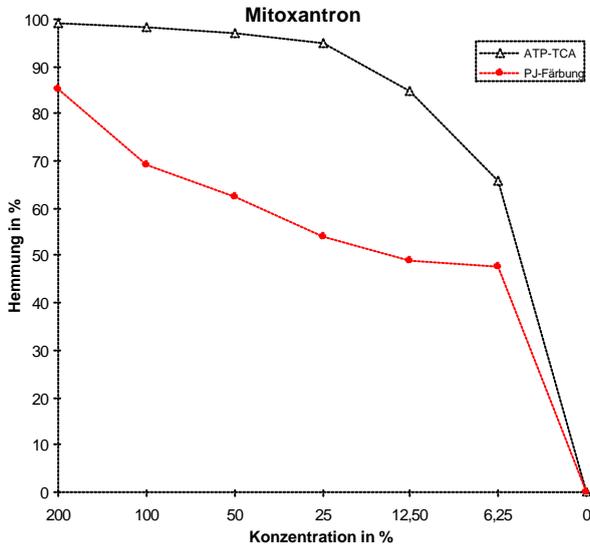
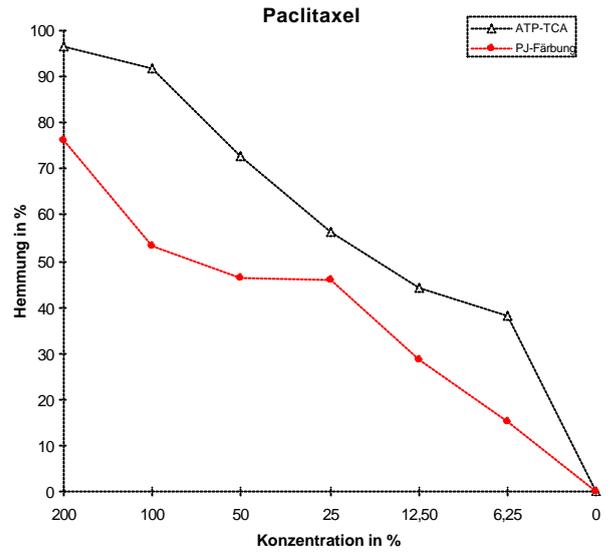
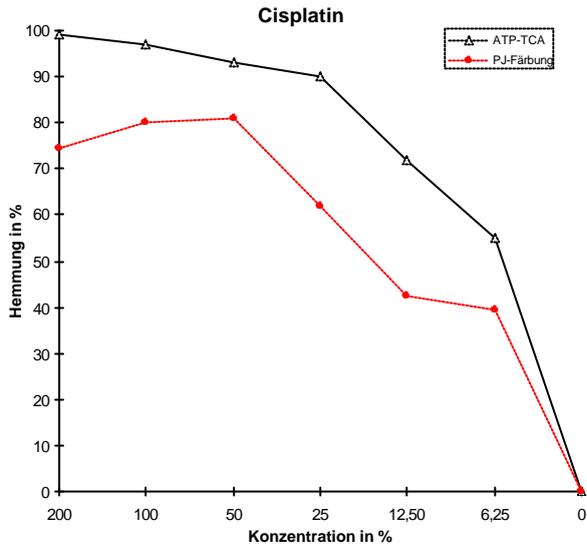
Patientin H. G.: Probe: Rezidiv Mamma- und Ovarialkarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 65 Jahre



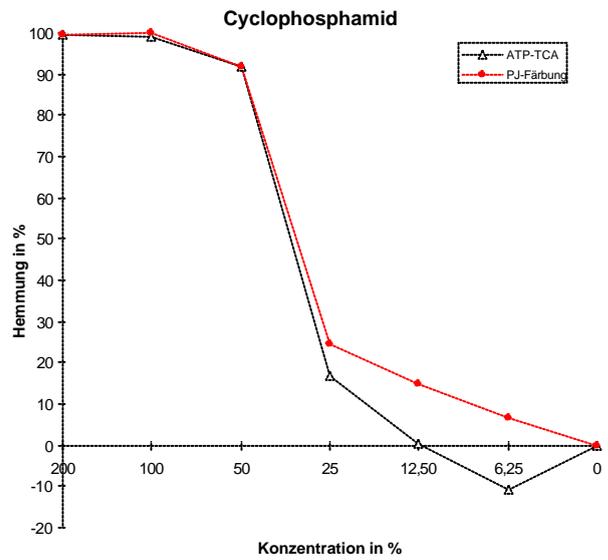
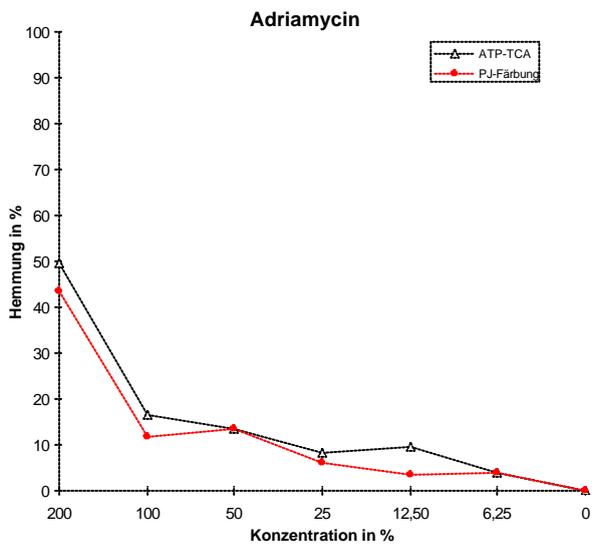
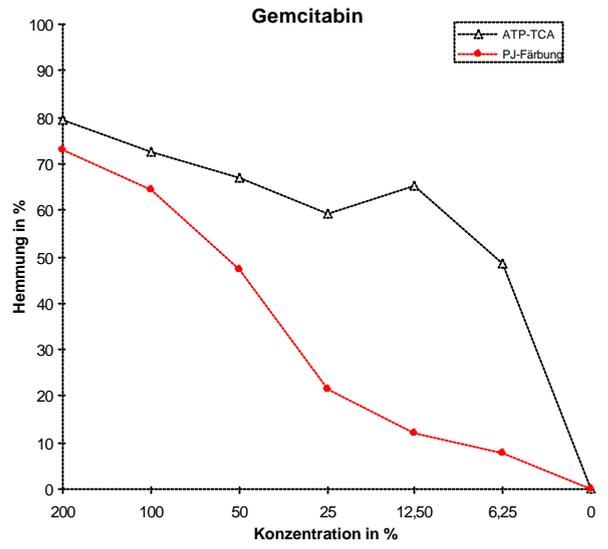
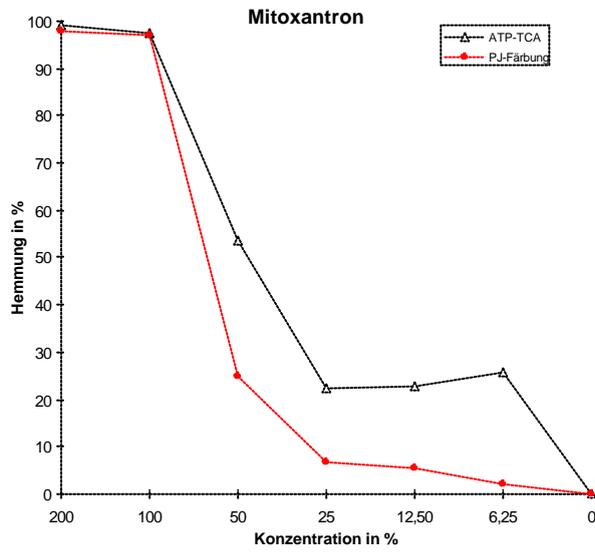
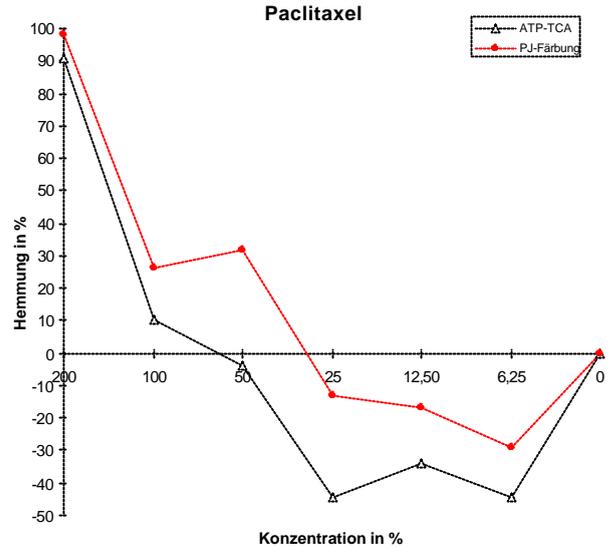
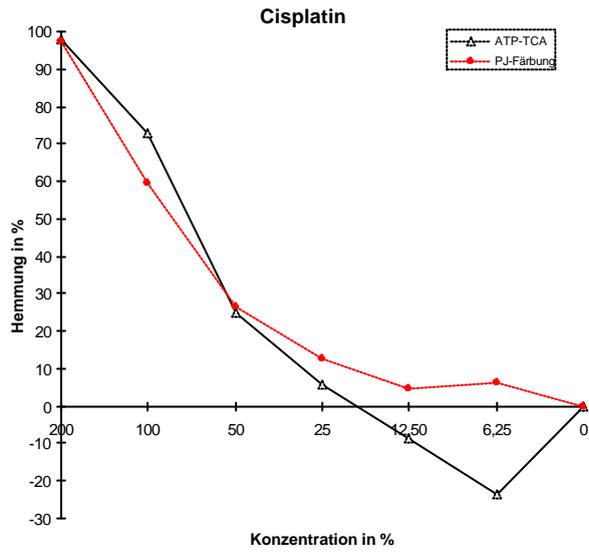
Patientin H. G.: Probe: Rezidiv Mamma- und Ovarialkarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 65 Jahre



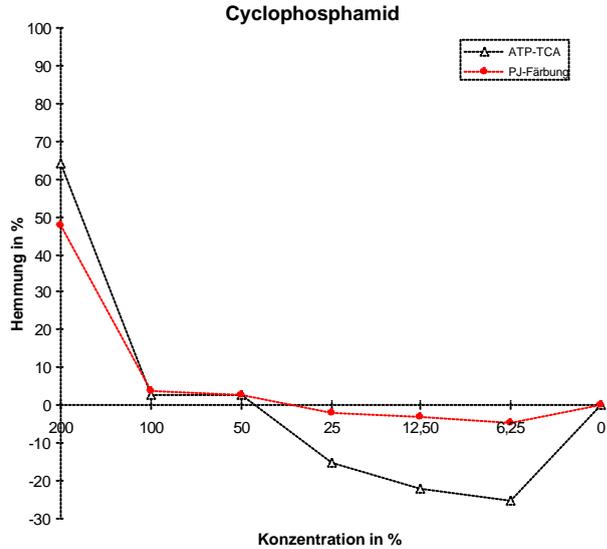
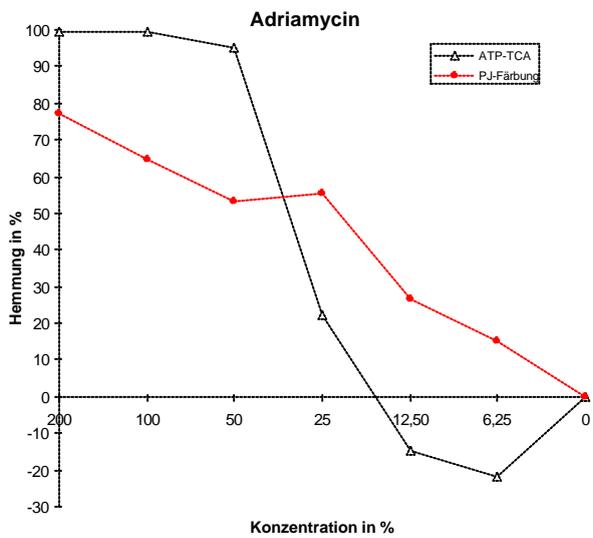
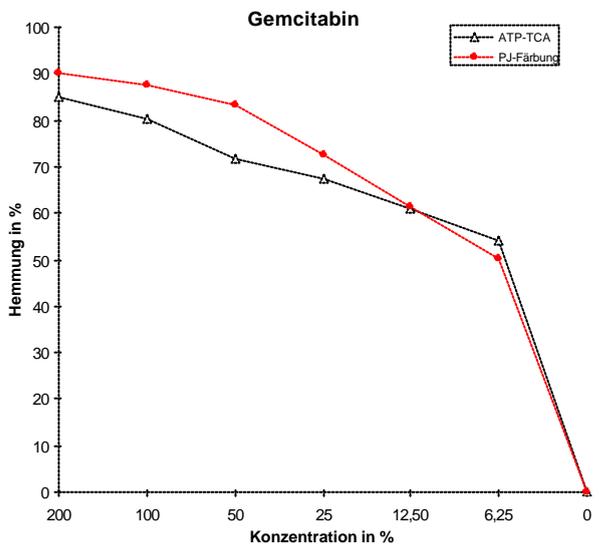
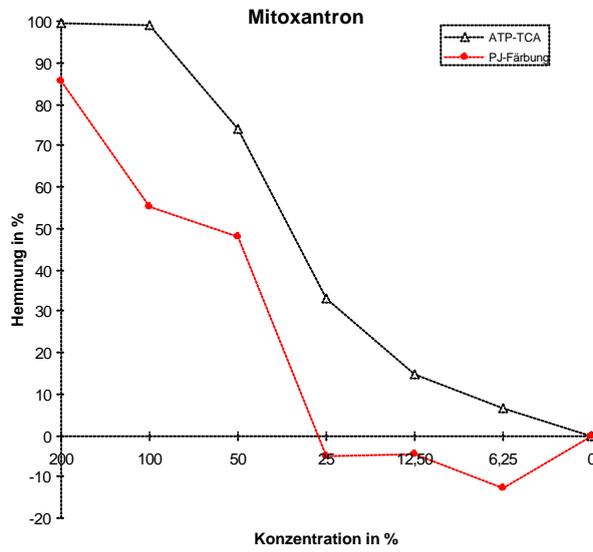
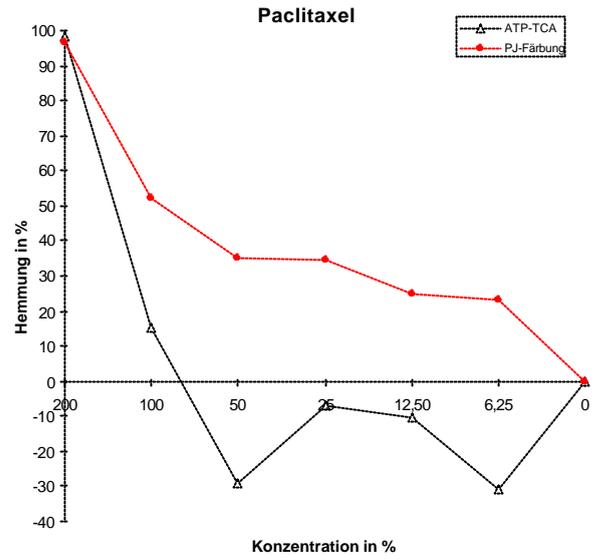
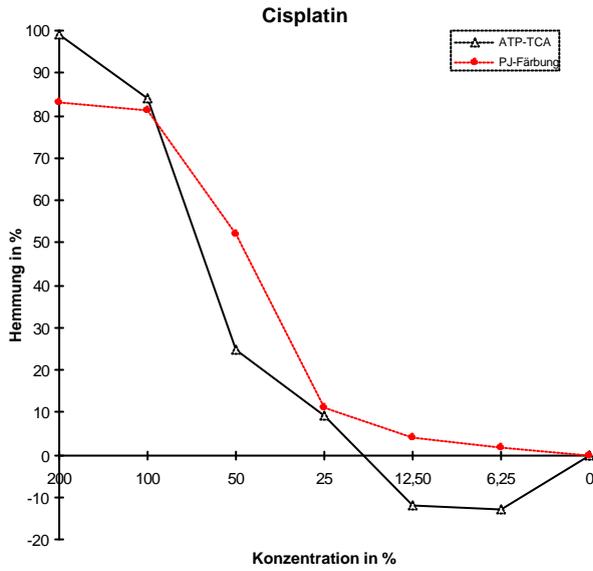
Patientin G.H.: Probe: Rezidiv Ovarialkarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 56 Jahre



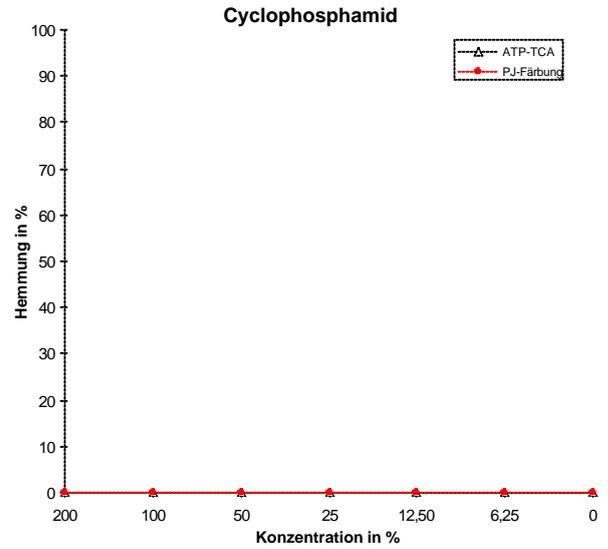
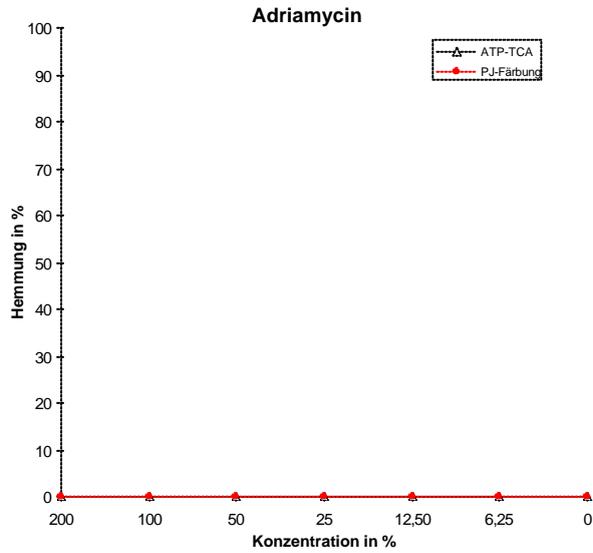
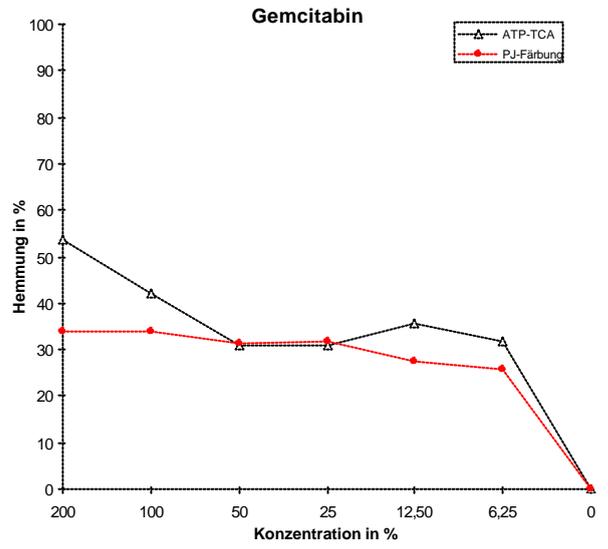
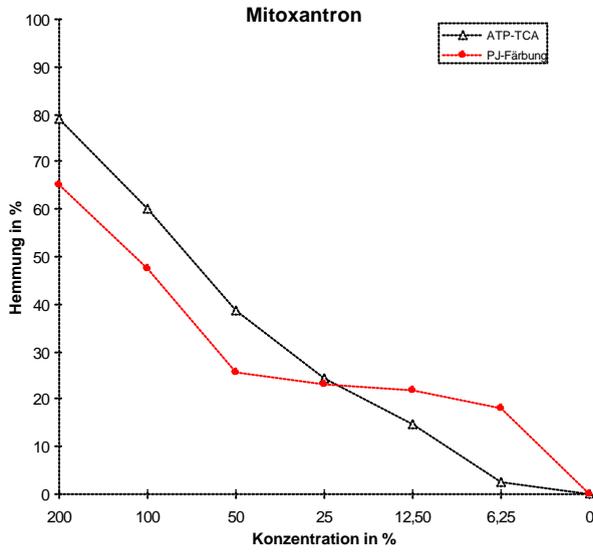
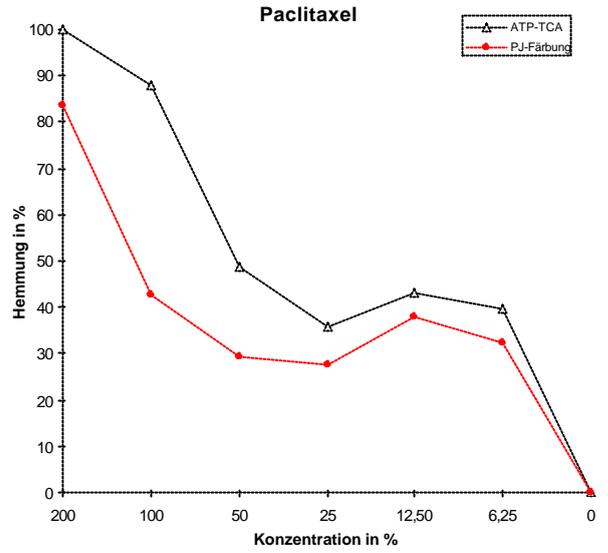
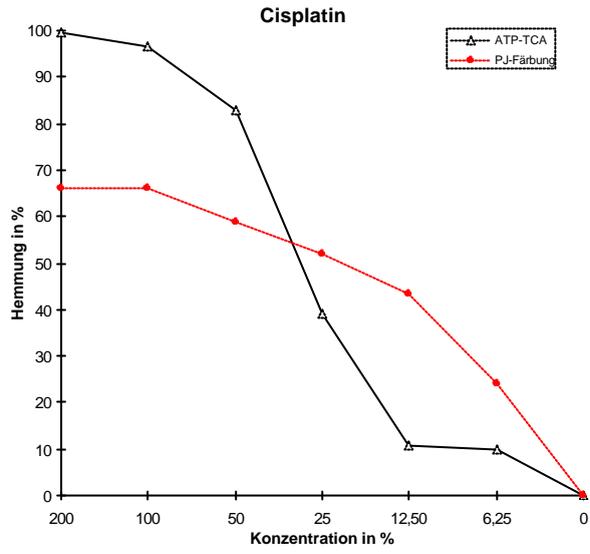
Patientin K.H.: Probe: Primäres Ovarialkarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 76Jahre



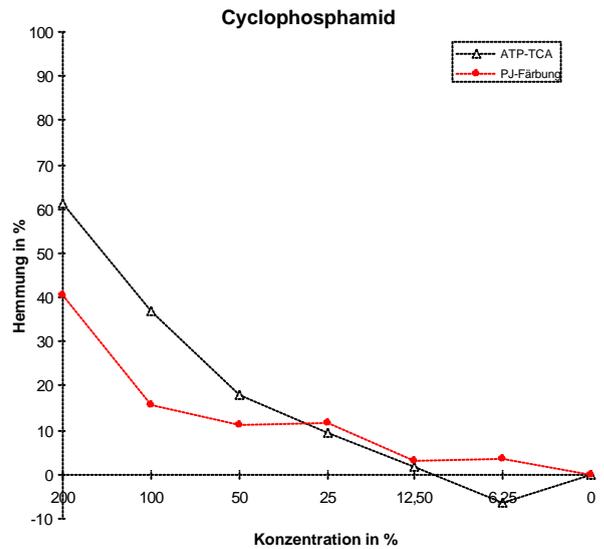
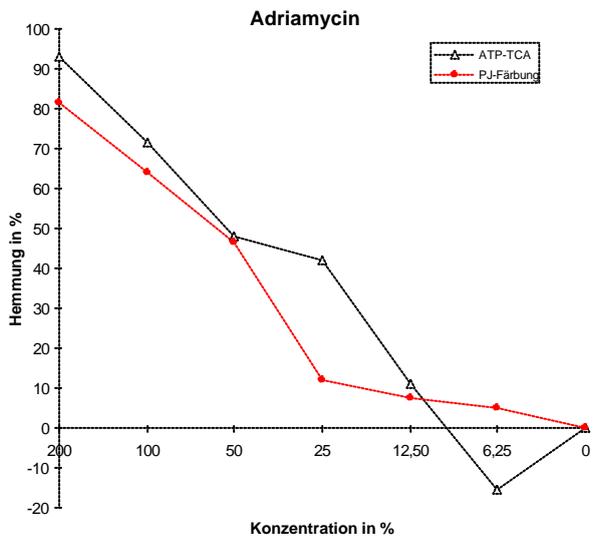
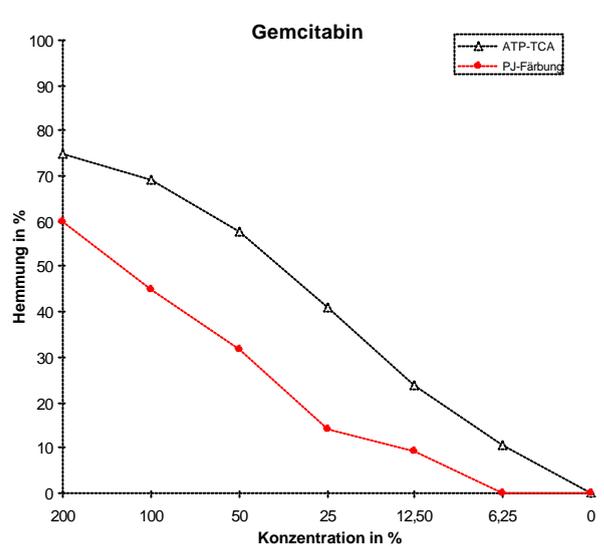
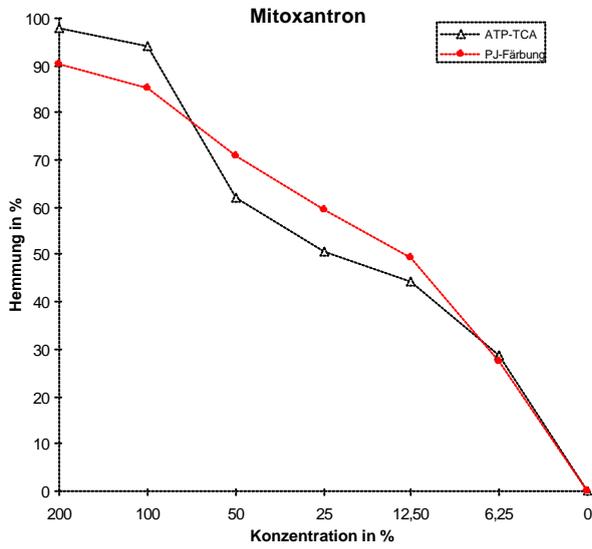
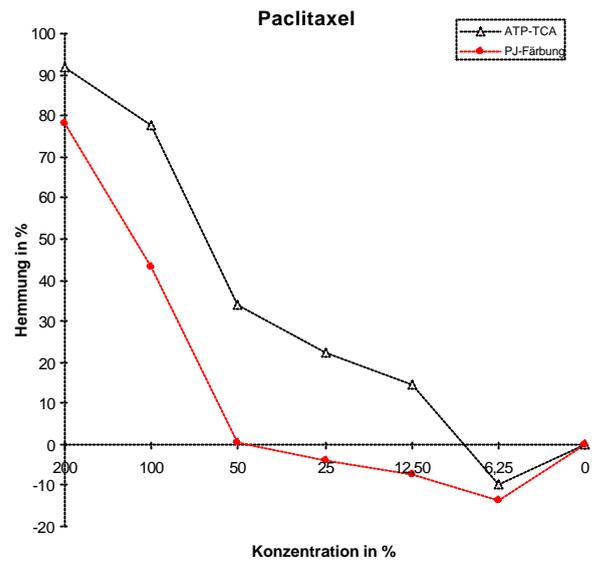
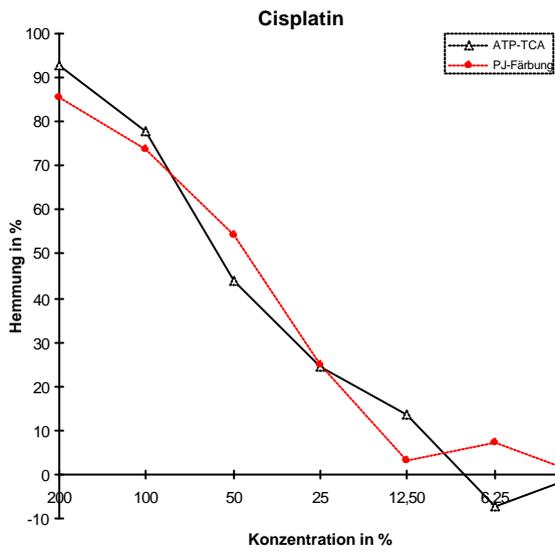
Patientin K.H.: Probe: Ovarialkarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 76 Jahre



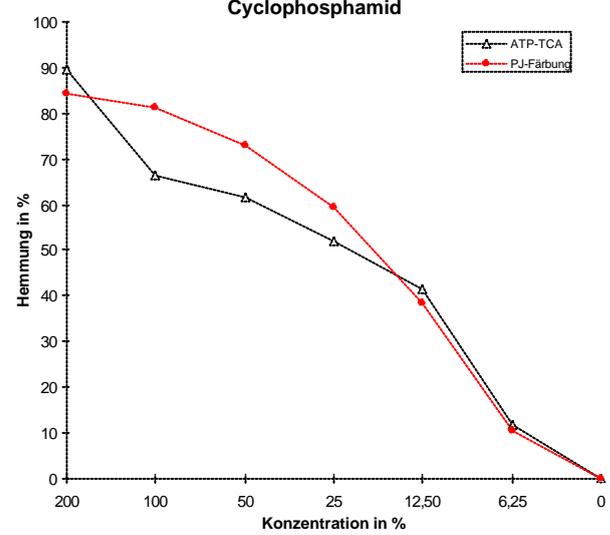
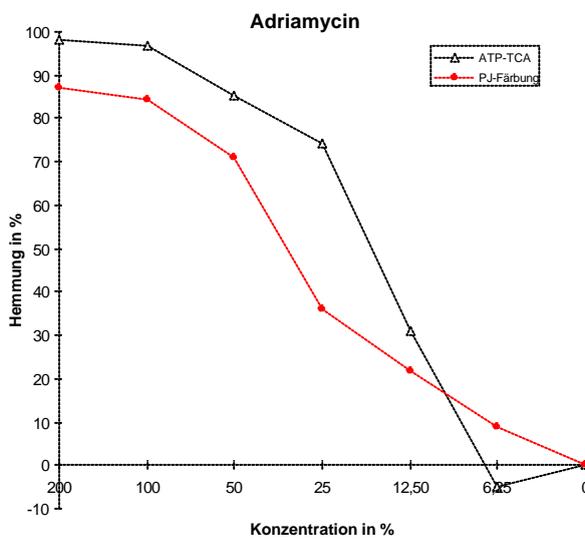
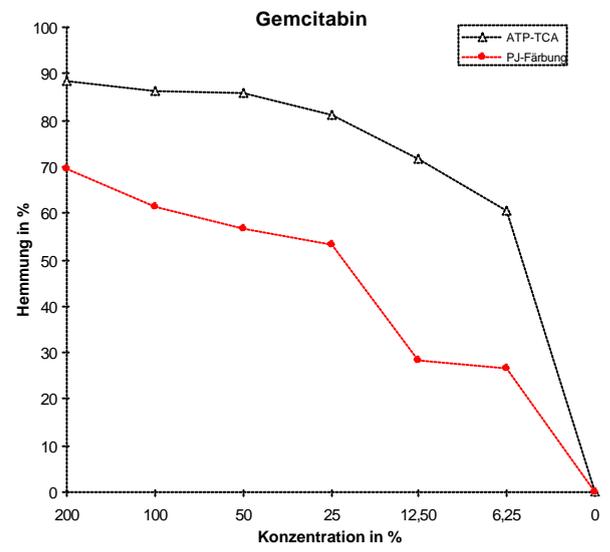
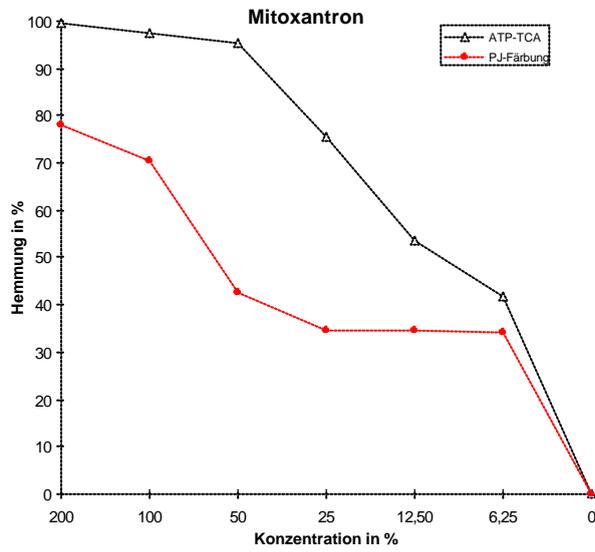
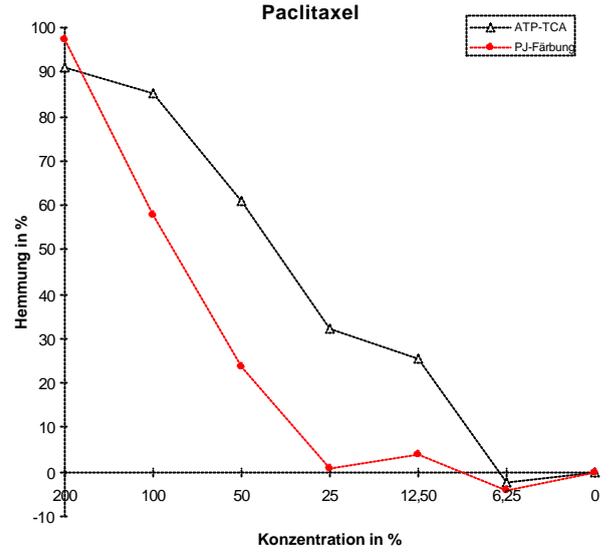
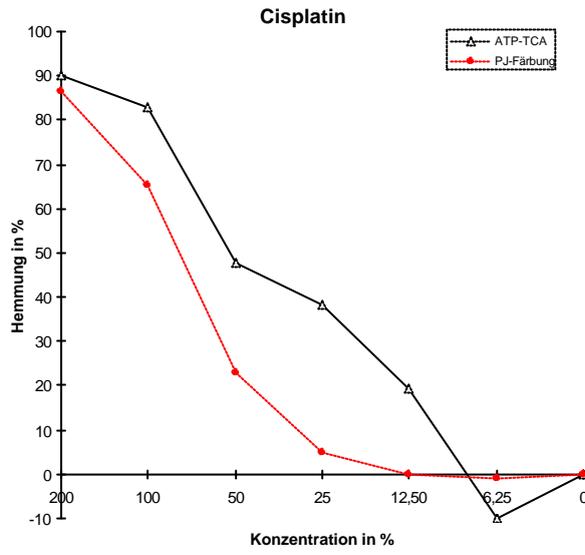
Patientin H.H.: Probe: Primäres Ovarialkarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 67 Jahre



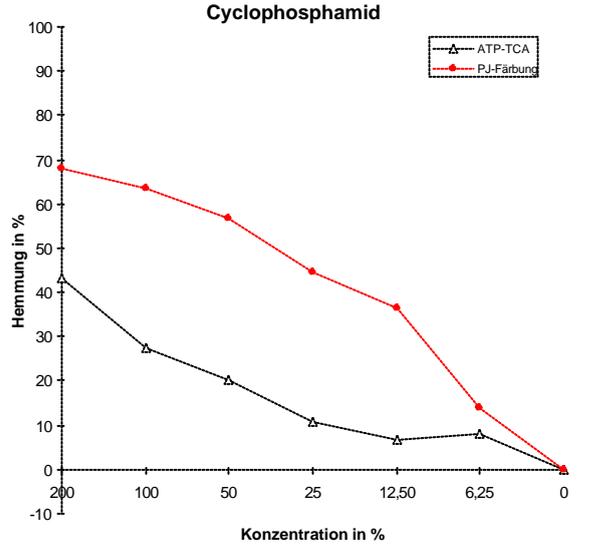
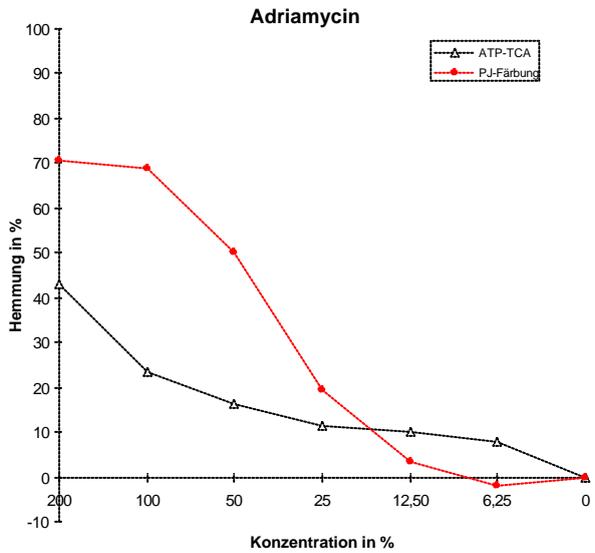
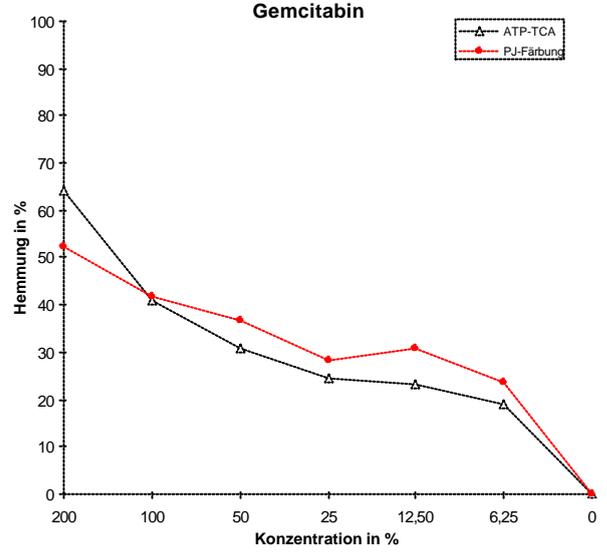
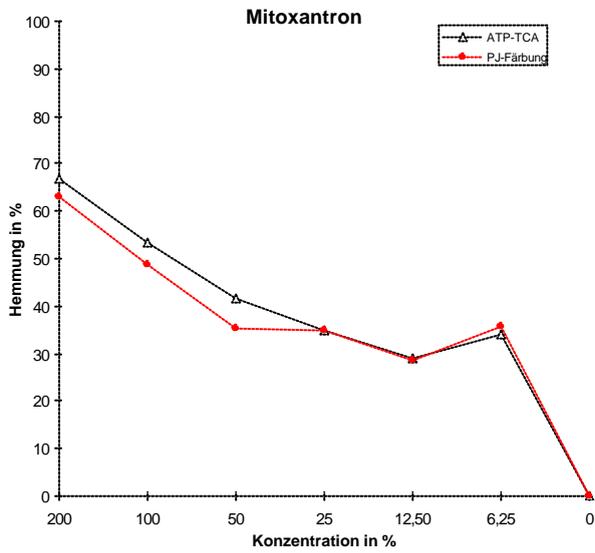
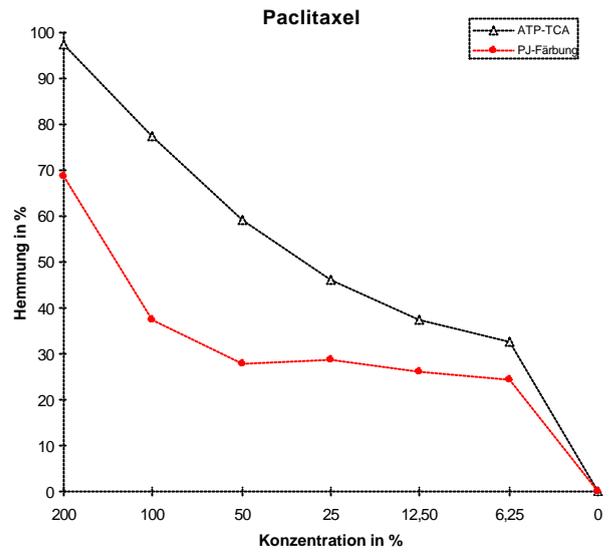
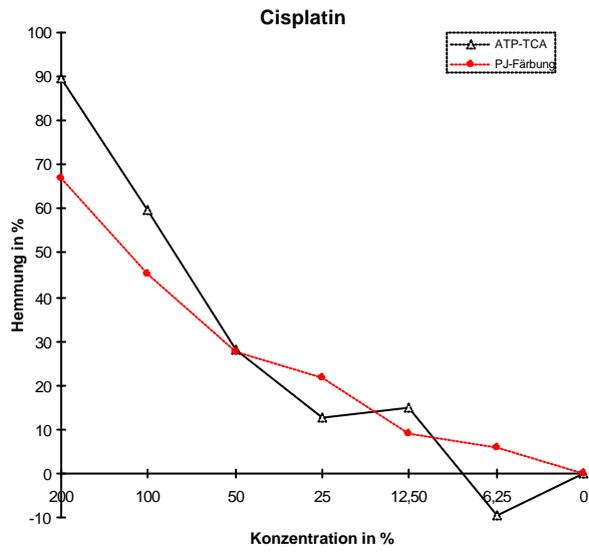
Patientin H.K.: Probe: Rezidiv Ovarial- und Mammakarzinom, Tumorgewebe; Alter bei O.P.: 68 Jahre



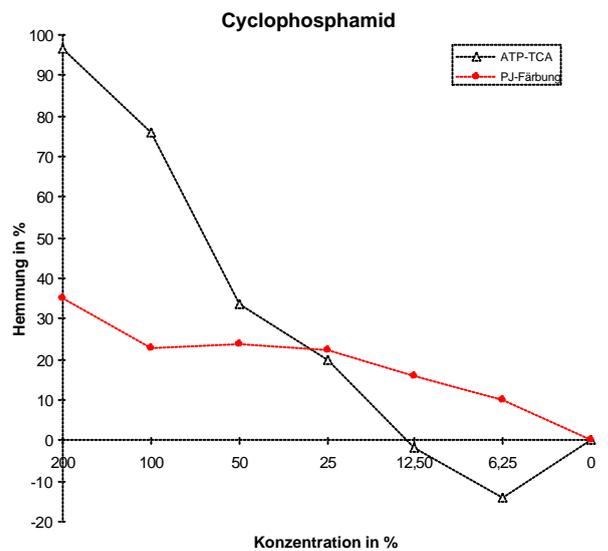
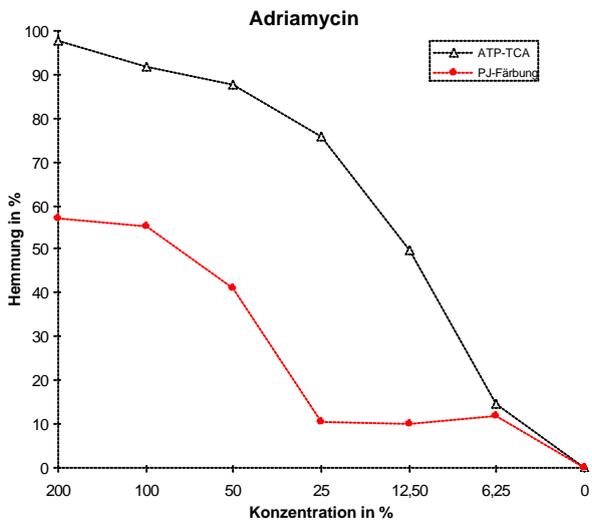
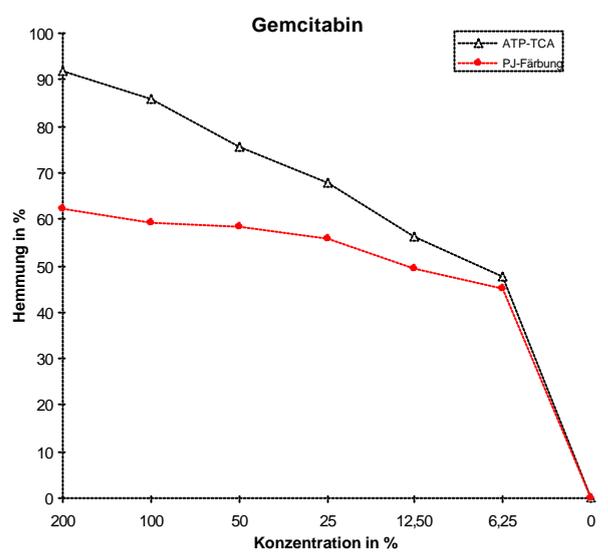
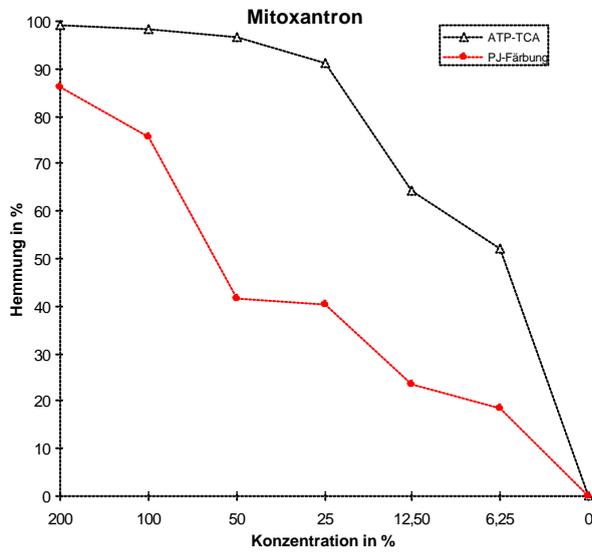
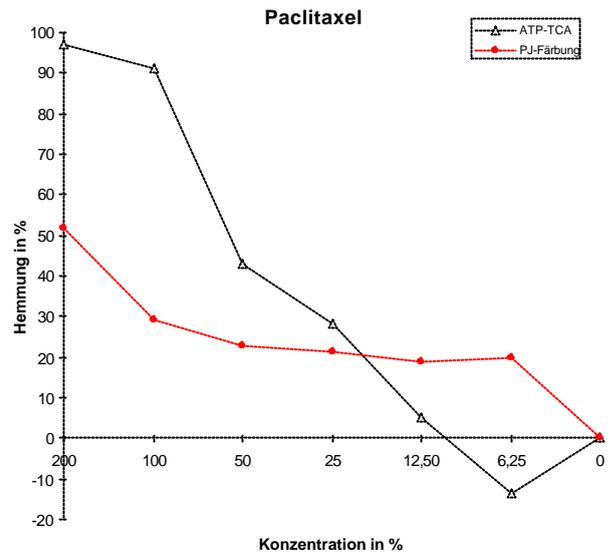
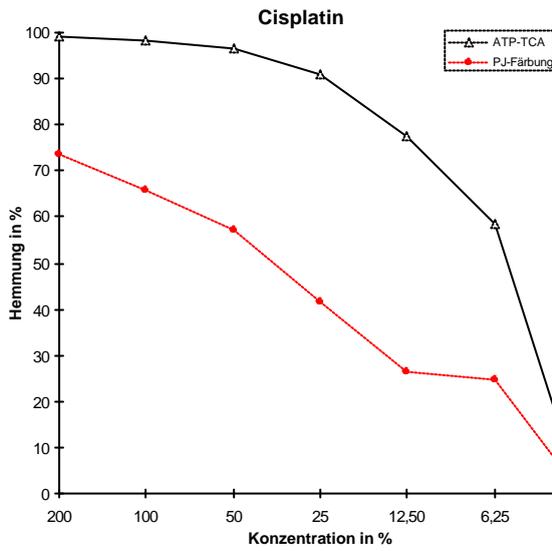
Patientin E.M.: Probe: Primäres Ovarial-und Mammakarzinom, Gewebe; Alter bei O.P.: 80Jahre



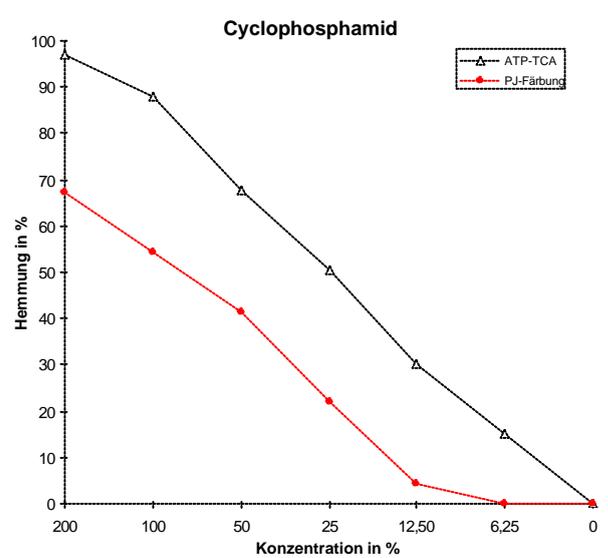
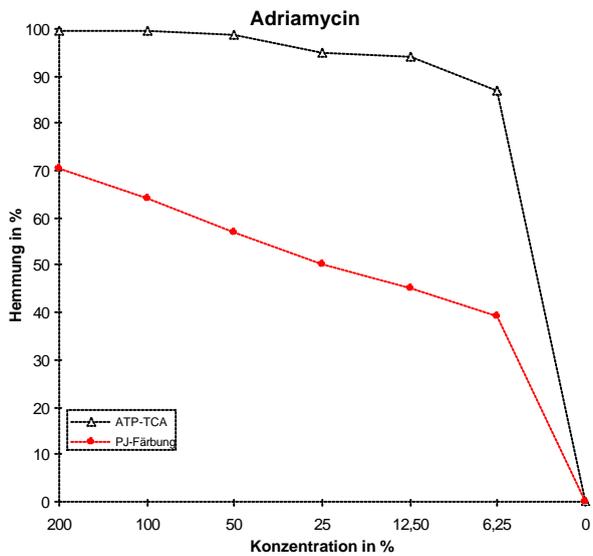
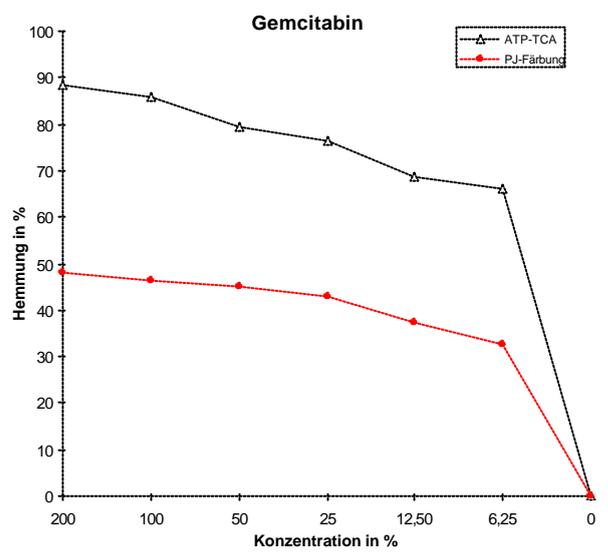
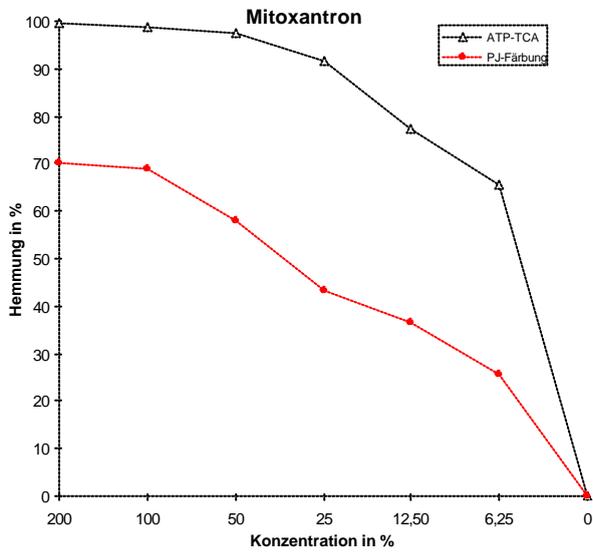
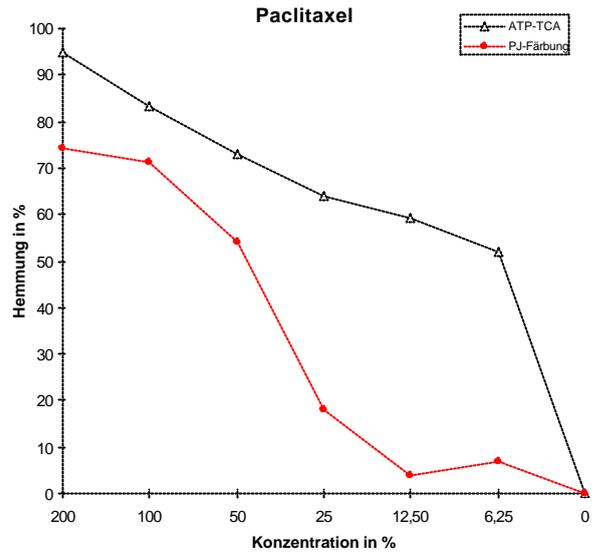
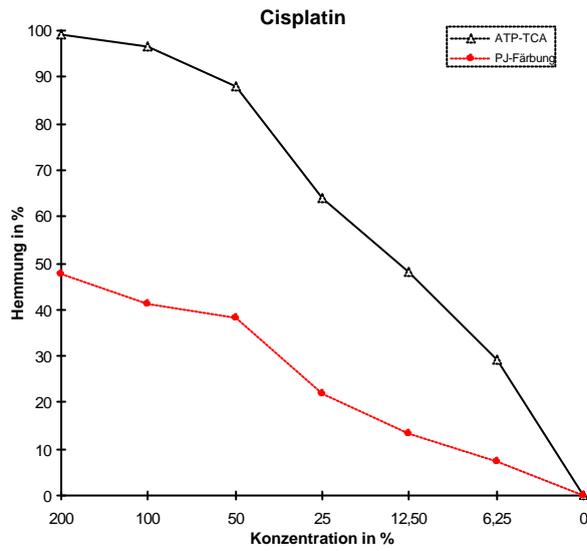
Patientin M.N.: Probe: Primäres Ovarialkarzinom, Gewebe; Alter bei O.P.: 63 Jahre



Patientin M.P.: Probe: Rezidives Ovarialkarzinom, Gewebe; Alter bei O.P.: 62 Jahre



Patientin K. S.: Probe: Mamma- und Ovarialkarzinom, Solider Tumor; Alter bei O.P.: 59 Jahre



Patientin E.S.: Probe: Rezidives Ovarialkarzinom, Gewebe; Alter bei O.P.: 66 Jahre

