

Aus der Klinik und Poliklinik für
Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. P. Mallmann

HETEROGENITÄT DER ZYTOSTATIKASENSITIVITÄT BEIM
REZIDIVIERENDEN MAMMAKARZINOM ERMITTELT
IN ATP – TCA EX VIVO

Inaugural – Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Vorgelegt von
Tanja Trifunovic-Rakic
aus Cuprija/Serbien

Promoviert am:

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät des Saarlandes

**Universitätsklinikum
des Saarlandes**



Dekan:

Universitätsprofessor Dr. med. Michael D. Menger

1 – Berichterstatter:

Prof. Dr. med.U. Reinhold

2 – Berichterstatter:

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützung von folgender Person erhalten:

Prof. Dr. med. U Reinhold

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 01. 09. 2009

Tanja Trifunovic-Rakic

Trifunović-Rakic, Tanja

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten wurden von mir retrospektiv in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Köln erhoben.

Prof. Dr. med. U. Reinhold danke ich besonders für die Ermöglichung dieser Arbeit, für sehr gute Betreuung und anregende Diskussionen, die mir den Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglichten.

Für meinen Vater, meine Mutter und meinen Bruder.

1 Einleitung.....	11
1.1 Inzidenz und Ätiologie des Mammakarzinoms.....	11
1.2 Diagnose des Mammakarzinoms und TNM-Klassifikation.....	12
1.3 Therapie des lokalen und regionalen Tumorrezidivs.....	14
1.3.1 Definition des Rezidivs.....	14
1.3.2 Therapieformen des metastasierten Mammakarzinoms.....	14
1.3.2.1 Zytostatische Monotherapie.....	15
1.3.2.2 Zytostatische Polychemotherapie.....	15
1.3.2.3 Hormonelle Therapie.....	16
1.3.2.4 Immuntherapie.....	16
1.3.3 Einblick in den Wirkmechanismus antineoplastischer Substanzen	17
1.3.4 Ansätze zur Individualisierung antineoplastischer Therapien	20
1.4 Monopräparate	21
1.4.1 Paclitaxel	21
1.4.2 Taxotere (Docetaxel)	22
1.4.3 Vinorelbin	22
1.4.4 Doxorubicin (Adriamycin)	23
1.4.5 Epirubicin	23
1.4.6 Cisplatin	24

1.4.7 Gemzitabin	24
1.5 Individualisierte Chemotherapie	25
1.6 Die Geschichte der prätherapeutischen Zytostatikatestung	26
1.6.1 Chemosensitivitätsassays und Chemoresistenzassays	26
1.6.2 Human Tumor Clonogenic Assay (HTCA)	26
1.6.3 Radiolabeled DNA-precursor uptake Method (Volm-Assay/ Kern-Assay)	27
1.6.4 Tetrazolium-based semi-automatic Assay (dye reduction Assay MTT-Assay)	27
1.6.5 Fluorescent Cytoprint Assay (FCA)	28
1.6.6 Differential Staining Cytotoxicity Assay (DiSc).....	28
2 ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay (ATP-TCA)	29
3 Zielsetzung der Arbeit	30
4 Material und Methoden	30
4.1.1 Patientenkollektiv	30
4.1.2 Probegewinnung und Transport	32
4.1.3 Probenaufarbeitung	33
4.1.4 Vorbereitung der Zytostatika	34
4.1.5 Messung des ATPs	35
4.1.6 Testauswertung	36
4.1.7 Interpretation der Testergebnisse	37
4.1.8 Verwendete Zytostatika	39

5 Ergebnisse	40
5.1 EVRR/RHS-Werte und Sensivitätstypen	40
5.2 Kreuzreaktivität der getesteten Substanzen	41
5.3 Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Analyse	42
5.4 Präklinische Aktivität von Monosubstanzen bei Mammakarzinomrezidiven	44
6 Diskussion	45
6.1 Klinische Wertigkeit beim Einsatz des ATP-TCA	46
6.2 Bedeutung der Lebensqualität in der Therapie des Mammakarzinoms	48
7 Zusammenfassung	49
8 Literaturverzeichnis	50
9 Lebenslauf	61

Abkürzungsverzeichnis:

AMP	-----	Adenosin – Monophosphat
ATP	-----	Adenosin – Triphosphat
ATP – TCA	-----	ATP –Tumorchemosensitivitäts – Assay
CAM	-----	Complete Assay Medium
CDDP	-----	Cisplatin
dFdC	-----	Gemzitabin
DI	-----	Dosis – Intensität
DNS	-----	Desoxyribonukleinsäure
DOX	-----	Doxorubicin
EPI	-----	Epirubicin
FIGO	-----	Federation Internationale des Gynecologistes et Obstetriciens
GOG	-----	Gynecologic Oncologig Group
GOT	-----	Glutamat – Oxalat – Transaminase
GTP	-----	Glutamat – Pyruvat – Transaminase
LDH	-----	Lactatdehydrogenase
M0	-----	Leerwertkontrolle
Mi	-----	Maximalinhibitionskontrolle
MDG	-----	Multidrug – Resistenz
NCI	-----	National Cancer Institute (der USA)
PTX	-----	Paclitaxel
TDC	-----	Testkonzentration (Test drug concentration)
VEGF	-----	Testkonzentration (Test drug concentration)
WHO	-----	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1 Inzidenz und Ätiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist weltweit der häufigste und bösartigste Tumor bei Frauen mit über einer Million Neuerkrankungen pro Jahr.

In Deutschland erkrankt etwa jede zehnte Frau im Laufe ihres Lebens an einem Mammakarzinom. Innerhalb Deutschlands steht das Mammakarzinom nach wie vor an erster Stelle in der Rangfolge der Krebsinzidenz (vor Darmkrebs, Leukämie und Lymphomen, Tumoren des Gebärmutterkörpers, Magenkrebs, Bronchialkarzinom und Ovarialkarzinom).

Das Mammakarzinom ist ein maligner Tumor der Milchgänge (duktales Karzinom) oder der Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom).

Der wichtigste demographische Risikofaktor ist das Alter der Patientin. Frauen unter 25 Jahren erkranken nur selten an einem Malignom der Brustdrüse (<1 %). Nach dem 30. Lebensjahr steigt das Erkrankungsrisiko kontinuierlich an, erreicht zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr ein Plateau und steigt dann wieder an.

Wichtigste Risikofaktoren sind:

- genetische Disposition
- frühe Menarche, späte Menopause
- Nullipara
- hormonelle Imbalance mit Überwiegen der Östrogene
- Adipositas und fettreiche Ernährung
- Mastopathie Grad III

Man unterscheidet 7 histologische Typen von Mammakarzinomen, wobei das duktales (85%) und das lobuläre (10 - 15%) am häufigsten vorkommen.

Eine modifizierte WHO-Klassifikation teilt die Mammakarzinome in nicht-invasive und invasive Mammakarzinome. Heutzutage wird Krebs als Resultat multipler genetischer Alterationen verstanden. Genetische Alterationen führen letztlich zum Verlust der Proliferationskontrolle. Bösartige Tumoren weisen im Vergleich zu Normalgewebe eine erhöhte Mutationsfähigkeit auf. Der sogenannte „mutator phenotype“ zeichnet sich durch Mutationen in Suppressor-Genen oder Veränderungen im DNA-Repair aus, die normalerweise den Zellzyklus genetisch aberranter Zellen kontrollieren [40,43].

Die Mehrzahl aller Mammakarzinome wird nicht vererbt, sondern tritt sporadisch auf. Bei etwa 5% aller Fälle liegt eine genetische Prädisposition zugrunde. Die BRCA1- und die BRCA2-Gene spielen eine besondere Rolle.

BRCA1 und BRCA2 („Breast Cancer Gene 1 bzw.2“) gehören zur Gruppe der so genannten Tumorsuppressorgene, deren Aufgabe im Schutz der Zelle vor maligner Entartung besteht. Die Wichtigste Funktion von BRCA1 und BRCA2 ist die Beteiligung an DNA-Reparaturvorgängen. Voraussetzung für die Entstehung eines Karzinoms ist der vollständige Funktionsverlust eines Supressorgens, das in der Zelle in Form zweier Allele vorliegt.

Das am häufigsten mutierte Supressor-Gen ist p53, das bei einer Reihe maligner Tumoren bis zu zwei Dritteln der Fälle als Wild Typ (WT) vorkommt [13, 20, 23,24, 50, 60, 69].

Die Inzidenz von Sekundärmutationen kann durch eine Vielzahl interner und externer Mediatoren moduliert werden. Dazu zählen ionisierende Strahlen oder Zytostatika.

Wird die mutierte Form eines Allels des Tumorsuppressorgens mit der Keimbahn vererbt, führt eine spontane Mutation im zweiten Allel auf zellulärer Ebene zur Aufhebung der Tumorsuppression und Transformation der Zelle.

Das BRCA1-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert und besteht aus 24 Exons. Neben seiner Funktion in der DNA-Reparatur fungiert das BRCA1-Protein als Transkriptionsfaktor in der Regulation anderer Gene [47,48]. Für Trägerinnen von Mutationen im BRCA1-Gen besteht ein ca. 45%-iges Risiko bis zum Alter von 50 Jahren und ein 60-85%-iges Risiko, bis zum Alter von 75 Jahren an Brustkrebs zu erkranken.

Das BRCA2-Gen liegt auf Chromosom 13 und kodiert mit 27 Exons für ein Protein mit 3418 Aminosäuren, dessen Funktion bislang nicht geklärt ist. Keimbahnmutationen im BRCA2-Gen gehen vermutlich ähnlich häufig mit einem Mammakarzinom einher, insbesondere ist auch das Risiko für das Mammakarzinom beim Mann sowie für Kolon-und Prostatakarzinome erhöht. Aufgrund einer wachsenden Zahl von Mammakarzinomen hat man in der Gendiagnostik die Methoden entwickelt, die die DNS analysieren und die Gene, die zu Erkrankung führen, erkennen.

1.2 Diagnose des Mammakarzinoms und TNM-Klassifikation

Die Diagnose des Mammakarzinoms stützt sich neben sorgfältigen klinischen Untersuchungen auch auf die Mammographie und Mammosonographie. Der apparativen nichtinvasiven Diagnostik folgt die Gewebeentnahme zur Diagnosesicherung mittels Feinnadelpunktion,

sonographisch geführter Punktion und Stanzbiopsie. Es wird auch Pneumozystographie und Galaktographie durchgeführt. Dies aber erfolgt eher seltener [19,24].

Die Stadieneinteilung wird nach der Empfehlung der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) vorgenommen und beruht auf dem TNM-System (TNM Supplement, 1993). Zum Nachweis oder Ausschluss von Fernmetastasen werden Röntgenuntersuchungen des Thorax, Skelettszintigraphie und Oberbauchsonographie durchgeführt.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Mammakarzinome nach dem p-TNM-System

pTx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
pTis	Carcinoma in situ
pT1	Tumor < 2cm
pT2	Tumor < 2cm - < 5cm
pT3	Tumor > 5cm
pT4	Tumor jede Größe mit direkter Ausdehnung auf Brustwand oder Haut, Ulzeration
pN0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
pN1	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten
pN2	Metastasen in beweglichen ipsilateralen axillären Lymphknoten, untereinander oder an andere Strukturen fixiert
pN3	Metastasen in Lymphknoten entlang der Arteria mammaria interna
pMX	Das Vorliegen von Fernmetastasen kann nicht beurteilt werden
pM0	Fernmetastasen liegen nicht vor
pM1	Fernmetastasen liegen vor

1.3 Therapie des lokalen und regionalen Tumorrezidivs

1.3.1 Definition des Rezidivs

Als „Lokalrezidiv“ wird das erneute Auftreten der Tumorerkrankung nach brusterhaltender Operation im Bereich der Mamma, nach Mastektomie im Bereich der Brustwand bzw. der Narbe, bezeichnet. Als „Regionalrezidiv“ wird ein erneuter Befall homolateraler Lymphknoten, axillär, infra-oder supraklavikulär, bzw. entlang der A. mammaria interna, bezeichnet. Zervikale und alle anderen Lymphknotenmetastasen werden als Fernmetastasen klassifiziert [63, 84]. Ein Lokalrezidiv tritt in der Haut, der Subkutis oder auf der Muskelfaszie, sowie nach brusterhaltender Therapie und auch bei der Mastektomie in ca. 5-20% der Fälle (Fünfjahresrate) auf. Die Überlebenschance nach Lokalrezidiv beträgt nach fünf Jahren zwischen 15-60% [9,23]. Das Lokalrezidiv ist in ca. 25-55% mit einer bereits vorhandenen Metastasierung verbunden [42]. Dieser Prozentsatz ist vor allem von den Prognosefaktoren des Primärtumors abhängig [25]. Das spätere Auftreten des Lokalrezidivs hat eine bessere Prognose, wenn es früh entdeckt wird. Da es einerseits als Prognosefaktor gilt und andererseits Ausgangspunkt einer Generalisierung sein kann, sollte eine mögliche Behandlung so früh wie möglich angestrebt werden [26].

1.3.2 Die Therapieformen des metastasierten Mammakarzinoms

Die Therapie des Mammakarzinoms erfolgt operativ. Das Ausmaß des operativen Eingriffs wird in erster Linie vom diagnostischen und histopathologischen Befund und vom Wunsch der Patientin bestimmt. Die systematische Therapie beinhaltet eine zytostatische und/oder hormonell Behandlung.

Operative Therapie

Drei prinzipielle Vorgehensweisen sind möglich:

- a) Brusterhaltende Therapie
- b) Modifiziert radikale Mastektomie (MRM)
- c) MRM mit simultanem (oder sekundärem) Wiederaufbau der Brust

Beim Brusterhaltenden operativen Vorgehen erfolgt immer eine Bestrahlung der Restdrüse. Beim Befall der axillärer Lymphknoten ist die Bestrahlung von supra- und infraklavikulären Lymphabflussgebieten empfehlenswert, die Bestrahlung der parasternalen Lymphknoten ist fakultativ [49a].

-Die systemische Therapie des metastasierten Mammakarzinoms

Die systemische Therapie des Mammakarzinoms kann man in 4 verschiedene Regime einteilen:

1. zytostatische Monotherapie
2. zytostatische Polychemotherapie
3. hormonelle Therapie
4. Immuntherapie.

Zusätzlich zur systematischen Therapie werden auch Bestrahlungen durchgeführt. Aufgrund des aktuellen Kenntnisstandes muss jede Patientin nach brusterhaltender Operation bestrahlt werden.

1.3.2.1 Zytostatische Monotherapie

Dabei kommen folgende Medikamente zum Einsatz: Doxorubicin, Mitoxantron, Idarubicin, Paclitaxel, Docetaxel, Vinorelbin, Gemcitabin, Mitomycin C, Trofosphamid, Bendamustin und 5-Fluoruracil, die je nach Vorbehandlung eine objektive Tumorremission in Höhe von 15% bis 40% bewirken.

1.3.2.2 Zytostatische Polychemotherapie

Als Therapieregime haben sich unter anderem CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat, 5-Fluoruracil), EC (Epirubicin, Cyclophosphamid), FEC (5-Fluoruracil, Epirubicin, Cyclophosphamid) bewährt. Neuere Kombinationen sind Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel oder Vinorelbin/Epirubicin. Deren Stellenwert wird noch im Rahmen von klinischen Studien überprüft.

1.3.2.3 Hormonelle Therapie

Es hat sich herausgestellt, dass die endokrine Therapie bei postmenopausalen Patientinnen, die den hormonrezeptorpositiven Tumor haben, wirksam ist. Positiver Hormonrezeptor ist eine Voraussetzung für die Therapie. Die Endokrine Therapie wird durchgeführt:

im hohen Alter

- wenn der Tumor nicht sofort operiert werden kann
- wenn die Patientin die Chemotherapie ablehnt
- wenn der Wunsch nach brusterhaltender Operation besteht
- wenn gleichzeitig ein primär nicht brusterhaltender Befund vorliegt

Bei Patientinnen in der postmenopausalen Phase wird bevorzugt das Antiöstrogen Tamoxifen verabreicht. In der Prämenopause werden wiederum GnRH-Analoga (Anastrozol, Letrozol) angewendet.

1.3.2.4 Immuntherapie

Der murine monoklonale Antikörper muMAb4D5 hat eine hohe in vitro Aktivität gegen Mammakarzinomzellen mit HER-2-Überexpression.

Der Antikörper ist bekannt als Herceptin, ist seit September 2000 in Deutschland in der Therapie des HER-2-neu metastasierten Mammakarzinoms zugelassen und wird in mehreren adjuvanten und neoadjuvanten Protokollen international untersucht.

Der Antikörper Herceptin (Wirkstoffname: Trastuzumab) kann schon nach der ersten Diagnose eingesetzt werden. Laut neuester Studien aus den USA und von Dr. Untch, dem leitenden Oberarzt der Frauenklinik Großhadern der Universität München, wird der Antikörper Herceptin als Infusion gegeben. Voraussetzung für die Verabreichung von Herceptin ist, dass die Tumorzellen zahlreiche HER-2-Rezeptoren besitzen, an welche Wachstumsfaktoren andocken, und die Zellteilung fördern. Herceptin blockiert genau die Rezeptoren und bringt die Krebszelle dazu, ihr eigenes Abwehrsystem als Feind zu erkennen, wodurch diese sich schließlich selbst zerstört.

1.3.3 Einblick in den Wirkmechanismus antineoplastischer Substanzen

Der Einblick in molekulare Wirkmechanismen antineoplastischer Substanzen hat in den letzten Jahren zunehmend zur Kombination nicht kreuzreagenter oder synergistisch wirkender Zytostatika geführt [18, 19, 30].

Die meisten positiven Erfahrungen mit dem Einsatz adjuvanter Systemtherapien liegen gegenwärtig für das Mammakarzinom vor. Weitere Tumorformen, bei denen sich bei Hochrisikopatienten eine postoperative Chemotherapie als sinnvoll erwiesen hat, sind kolorektale Karzinome, Harnblasenkarzinome, Osteosarkome, einige pädiatrische Tumore sowie Keimzelltumore und epitheliale Tumore des Ovars [96, 82, 42, 55, 63, 30, 78, 86]. Ein weiteres Prinzip ist die maximale Tumorreduktion vor Beginn einer Chemotherapie. So sind Polychemotherapien bei vielen Tumoren im fortgeschrittenen oder rekurrenten Stadium Einzelsubstanzen zumindest hinsichtlich des krankheitsfreien Intervalls keineswegs immer überlegen. Typische Beispiele sind Ovarialkarzinomrezidive, metastasierende Mammakarzinome und fortgeschrittene Tumoren des Gastrointestinaltraktes [3, 12, 10, 79]. Neben der Suche nach neuen Substanzen hat die exakte Beschreibung von Resistenzmechanismen und die Aufdeckung ihrer molekularen Mechanismen die Ansätze ermöglicht, durch die die Chemomodulation Resistenzentwicklung verhindert oder bereits eingetretene Resistenz konvertiert.

Eine Vielzahl an Untersuchungen war auf die Modulation der MDR1 gerichtet. Klinische Erfahrungen mit MDR1- Modulatoren liegen vor allem für razemisches und R-Verapamil, Cyclosporin, A(CsA), Chidin und hoch dosiertes Tamoxifen (TAM) vor [11, 18, 40, 61, 62, 94, 87]. In der letzten Zeit sind jedoch insbesondere für das metastasierte Mammakarzinom und für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom ermutigende Resultate durch den Einsatz von MDR1-Modulatoren berichtet worden [8, 88, 90, 45]. Die oft unbefriedigenden klinischen Resultate können vor allem in der parallelen Existenz einer Vielzahl von Resistenzmechanismen in einem individuellen Tumor begründet sein. Eine Antrazyklinresistenz kann z.B. neben einer erhöhten Expression von Pgp auch durch Überexpression von MRP, Veränderungen des Zytoskeletts, Alteration der Topo 2 und durch gesteigerte intrazelluläre Detoxifikation begründet sein. Die zunehmenden Kenntnisse der übermolekularen Wirkmechanismen von Zytostatika und die Entschlüsselung vieler biochemischer Resistenzmechanismen haben in den letzten Jahren zu zahlreichen Ansätzen geführt, bestimmte Resistenzen zu umgehen oder sie auf pharmakologischem Weg auszuschalten.

Durch gezielte Strukturveränderungen wurde eine Reihe neuer Medikamente entwickelt, die sich von verwandten Zytostatika bei erhaltener Wirkung vor allem durch eine geringe Kreuzresistenz unterscheiden. Typische Beispiele sind das Anthrazyklin, Idarubicin (IDA) oder verschiedene Platin II und Platin IV Komplexe. So scheint die IDA-Aktivität im Gegensatz zu Dauno- oder Doxorubicin (DOX) weniger stark MDRI abhängig zu sein [36]. Neben einer geringeren Beeinflussung durch klassische Resistenzmechanismen wie intrazelluläre Detoxifikation oder gesteigerter DNS-Reparatur scheint vor allem auch eine verbesserte zelluläre Aufnahme der neuen Substanzen hier eine Rolle zu spielen, während ein kürzlich identifiziertes Transportprotein von 36 kD zu einer verminderten Aufnahme und damit zur Resistenz gegenüber DDP führt [55,73]. Neben der Suche nach neuen Substanzen hat die exakte Beschreibung von Resistenzmechanismen und die Aufdeckung ihrer molekularer Mechanismen von Resistenzmolekülen, die sogenannte Chemomodulation, Resistenzentwicklung zu verhindern oder bereits eingetretene Resistenzen zu konvertieren.

Die in der klinischen Routine derzeit am häufigsten angewandte Form biochemischer Modulation betrifft 5-FU. Durch Vorbehandlung mit MTX wird die Synthese des auf die RNA wirkenden 5-Fluorouridin-Triphosphat (FUTP) erhöht, während eine Kombination mit Folsäure die Bindung von 5-Fluoro-Desoxyuridin-Monophosphat (FdUMP) an die TS und damit die Hemmwirkung auf die DNA-Synthese verstärkt (1972). Vor allem bei fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen haben sich derartige Ansätze bewährt, was dazu geführt hat, dass hier die Kombination aus 5-FU und Folsäure gegenwärtig als Standard angesehen wird [25, 46].

Eine Vielzahl an Untersuchungen war auf die Modulation der MDRI gerichtet. Ähnlich wie Pgp zur Kreuzresistenz gegen viele chemische und pharmakologisch völlig unterschiedliche Zytostatika führt, kann die Funktion auch durch eine Reihe verschiedener Substanzen, deren einzige Strukturgemeinsamkeit eine hydrophile N-Alkylgruppe in Nachbarschaft eines lipophilen aromatischen Rings ist, gehemmt werden [96]. Dazu gehören Kalziumantagonisten, Calmodulin-inhibitoren, Rauwolfia-Alkaloide, Chinoline, lysosomotrope Substanzen, Steroide, Triparanol-Analoga, zyklische Peptidantibiotika und verschiedene Detergenzien [18, 93, 96], die nach heutigem Kenntnisstand teilweise auch in der Lage sind, MRP zu modulieren [45]. Klinische Erfahrungen mit MDRI Modulatoren liegen vor allem für R-Verapamil, Cyclosporin A (CsA), Chinidin und hoch dosiertes Tamoxifen (TAM) vor [49, 18, 40, 61, 62, 93, 99].

In der letzten Zeit sind jedoch insbesondere für das metastasierende Mammakarzinom und für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom ermutigende Resultate durch den Einsatz von MDR1-Modulatoren berichtet worden [46, 90]. Aufgrund des klar definierten Resistenzmechanismus und der Möglichkeit der spezifischen Inhibition sind die MDRI und ihre Überwindung bis heute ein zentrales Thema der modernen Resistenzforschung geblieben. Neuere Ansätze zur MDRI umfassen unter anderem die Kombination mehrerer Chemosensitizer, um so bei erhaltenem Modulationseffekt die teilweise erheblichen Nebenwirkungen der einzelnen Substanzen zu verringern [60].

Moderne, effektivere und möglicherweise weniger toxische MDRI-Modulatoren sind in der Entwicklung. Die Verhinderung der „mdr-Transkription“ durch Einsatz von Antisense-Oligonuklotiden scheint als neuer Ansatz eine spezifischere Inhibition der MDR1 zu ermöglichen [9, 21, 22, 81, 94].

Die oft unbefriedigenden klinischen Resultate können vor allem in der parallelen Existenz einer Vielzahl von Resistenzmechanismen in einem individuellen Tumor begründet sein. Auch wenn ein bestimmter Resistenzfaktor nachgewiesen werden konnte, wird seine Modulation klinisch erfolglos sein, wenn ein multifaktorielles Resistenzgeschehen vorliegt. Aus experimentellen Tumormodellen lässt sich ableiten, dass viele der oben beschriebenen Resistenzformen als relativ anzusehen sind und daher neben dem Einsatz von Chemomodulatoren auch durch Anwendung extrem hoher Zytostatikadosen überwunden werden können [30, 35]. Es scheint, dass die hohen Dosen an Zytostatika auch bei Verlust von p53-Funktion Apoptose erzwingen können. Das Mammakarzinom ist gegenwärtig weltweit der häufigste mit Hochdosisschemata behandelte Organtumor [10, 57, 18, 19, 88]. Beim Mammakarzinom sind dies im wesentlichen relativ junge, organisch gesunde Patientinnen mit primärer Hochrisikoerkrankung, d.h. mit mindestens 10 befallenen axillären Lymphknoten, zumal diese von einer konventionell dosierten adjuvanten Chemotherapie kaum zu profitieren scheinen [12, 8, 55, 57, 53].

Neben den teilweise erheblichen Nebenwirkungen, den hohen Kosten und den nicht immer abzusehenden Spätfolgen, vor allem beim Einsatz ultrahoch dosierter Alkylanzien [42], ist eines der Hauptprobleme der HDC das oft tumorbiologisch nur unzureichend abgesicherte Design der angewandten Protokolle. Der Bereich, bis zu dem Zytostatika im Rahmen von HDC-Protokollen eskaliert werden, orientiert sich in der Regel an der Toxikologie der jeweiligen Substanz. Es ist aber nicht klar, ob die maximal tolerable Dosis (MTD) zur Erzielung des optimalen antitumoralen Effekts immer erforderlich ist. Die meisten Daten zur antineoplastischen Effektivität hoch dosierter Zytostatika wurden bislang an experimentellen Tumormodellen,

Zelllinien und xenotransplantierten Tumoren gewonnen. Insgesamt hat die moderne Chemotherapie in den letzten Jahren beachtliche Erfolge erbracht. Die Resistenzforschung hat Voraussetzungen geschaffen, Chemoresistenzen zu verhindern oder zu überwinden. Die simple Evaluierung eines bestimmten Parameters reicht oft nicht aus um für den individuellen Tumor eine Sensitivitäts- oder Resistenzaussage zu machen. Dieses Problem wird umso bedeutender, je komplexer die Funktion des entsprechenden Moleküls ist.

Wie oben erwähnt, kann der p53-Verlust sowohl in einer starken Chemoresistenz als auch in einer Sensitivität resultieren, wobei der genaue Mutationsort von erheblicher Bedeutung sein kann [70, 21, 76].

Therapeutische Konzepte, die die Individualität einer Tumorerkrankung unberücksichtigt lassen, werden daher einen Teil der Patienten stets nur unvollständig erreichen.

1.3.4 Ansätze zur Individualisierung antineoplastischer Therapien

In der klinischen Routine sind bislang überwiegend molekulare Methoden zur Abschätzung des individuellen Ansprechens eines Patienten auf eine Behandlung in Gebrauch. Das am längsten etablierte Verfahren ist die Bestimmung des Östrogens (ER) und Progesteron (PR)-Rezeptorstatus beim Mammakarzinom [31, 44, 86].

Vor allem profitieren postmenopausale Patientinnen mit ER- und/oder PR-positivem Mammakarzinom von einer endokrinen Behandlung und zwar im adjuvanten als auch im palliativen Ansatz [21, 22, 43, 74].

Die Bestimmung des Rezeptorstatus ist eine obligate Untersuchung beim Mammakarzinom. Relativ zuverlässig ist insbesondere die Resistenzvorhersage, sodass der Versuch einer endokrinen Therapie beim Rezeptornegativen Mammakarzinom als nahezu aussichtslos eingestuft werden muss [44]. Dem gegenüber ist die Assoziation zwischen positivem Steroidrezeptornachweis und Ansprechen auf eine Hormontherapie wesentlich lockerer. Trotz nachgewiesenem ER und/oder PR profitieren nur ca. 55% der Patientinnen von einer Therapie mit TAM, dem weltweit am häufigsten eingesetztes Medikament. Die Gründe für eine TAM-Resistenz bei Nachweis funktionell intakter Steroidrezeptoren sind bislang unzureichend geklärt. Nach Bindung an den ER führt TAM über eine komplexe Reaktionskette, in der die Erniedrigung von Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) und die Erhöhung von Transforming Growth Factor β (TFG- β) eine zentrale Rolle spielen, zu einem G1-Arrest der Tumorzelle [64].

Bei intakter p53-Funktion führt dies zur Apoptoseinduktion, während p53-Verlust in einer TAM-Resistenz resultieren kann, was jedoch nicht zwingend notwendig ist [22, 23, 24, 78, 54]. Eine hohe Expression von Bcl-2, die in der Regel an die Präsenz von WT-p53 gebunden ist und möglicherweise einen Marker hoher Differenzierung darstellt, scheint demgegenüber zumeist auf eine Sensitivität gegenüber TAM hinzuweisen [23, 33, 54, 81, 78]. Viele andere Faktoren wie z.B. die Existenz von ER-Mutanten könnten den eingeschränkten positiv-prädiktiven Wert einer Rezeptorbestimmung bedingen. Bei der Planung einer deutlich toxischen Chemotherapie wäre die Existenz eines prädiktiven Verfahrens zur Abschätzung des individuellen Ansprechens wünschenswert. Letztlich kann nur ein biologisches Verfahren, in dem die Reaktion einer Population intakter Tumorzellen auf zytotoxische Substanzen im Ganzen beurteilt werden kann, über die Chemosensitivität eines individuellen Tumors eine Aussage machen.

Ein solcher Chemosensitivitätsassay sollte idealerweise valid, sensitiv, effektiv, kostengünstig und reproduzierbar sein und sich durch einfache standardisierte Handhabung, günstige Versuchsdauer und Anwendbarkeit bei unterschiedlichen Tumoren und die Möglichkeit möglichst viele Substanzen in einer ausreichend großen Konzentrationsspanne unter Einschluss von Kombinationen testen zu können, auszeichnen [33, 36].

1.4 Monopräparate

1.4.1 Paclitaxel

Paclitaxel wurde erstmals 1971 aus der Rinde der pazifischen Eibe isoliert. Heute wird es entweder partiellsynthetisch oder weiterhin aus der Biomasse gewonnen. Es inhibiert den Abbau von Mikotubuli und somit wird die Zellteilung gestoppt. Die Zelle verharrt somit in der Teilungsphase und stirbt letztendlich ab.

Paclitaxel wird in Form einer dreistündigen oder 24-stündigen Infusion appliziert. Infusionen, die lange dauern (96 Std.), haben in ersten Studien höhere Ansprechraten bei Patientinnen mit Mammakarzinom erzielt [86].

Die Clearance von Paclitaxel kann gesättigt werden und nimmt mit steigenden Einzeldosen oder häufigeren Dosierungen ab. Der Tod der Zelle hängt von der Konzentration der Substanz und von der Expositionsdauer ab.

Man hat unterschiedliche Wechselwirkungen von Paclitaxel mit anderen Stoffen beobachtet. Es zeigte sich eine geringe Wirkung, wenn Cisplatin vor Paclitaxel gegeben wurde [67, 68].

Paclitaxel wurde bei Patientinnen mit Ovarial- und Mammakarzinomen eingesetzt. Es wirkt toxisch auf das Knochenmark. Weitere Nebenwirkungen können in Form von Myalgien, Haarausfall und Neuropathie auftreten.

1.4.2 Taxotere (Docetaxel)

Docetaxel gehört zur Gruppe der Anthracyclinantibiotika genau so wie Doxorubicin. Taxotere wird in Kombination mit Doxorubicin zur Behandlung von Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem Brustkrebs ohne vorherige Chemotherapie eingesetzt. Taxotere wird als Monotherapie zur Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs eingesetzt, wenn eine Chemotherapie versagt hat. Taxotere kann man bei lokal fortgeschrittenem oder metastasierendem, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ansetzen, wenn die vorherige Therapie keine zufriedenstellende Wirkung gezeigt hat. Bei Patientinnen mit Brustkrebs wird Taxotere alle drei Wochen als einstündige Infusion verabreicht. Die empfohlene Dosis bei der Monotherapie beträgt 100 mg/m^2 . Therapiedosis bei den nicht vorbehandelten Patientinnen beträgt 75 mg/m^2 in Kombination mit Doxorubicin (50 mg/m^2). Die Nebenwirkungen von Docetaxel sind denen von Paclitaxel ähnlich, außer dass bei Docetaxel zusätzlich vermehrt Hautveränderungen und intestinale Ödeme auftreten.

1.4.3. Vinorelbin

Vinorelbin (Navelbine) gehört zur Gruppe mitosehemmender Vincaalkaloide. Es wird aus Alkaloiden des Madagaskarimmergrüns (*Catharanthus roseus* G.Don) mittels halbsynthetischer Verfahren hergestellt. Die Alkaloide werden aus den getrockneten Blättern der Pflanze extrahiert. Vincaalkaloide sind zellzyklusabhängige Substanzen. Diese blockieren während der Mitose den Zellzyklus. Diese Substanzen binden Tubuli und hemmen dadurch die Polymerisation. Vinorelbin wird als Monopräparat oder in Kombination mit anderen Zytostatika eingesetzt. In der Behandlung von Mammakarzinomen wies sich die Kombination Vinorelbin-Trastuzumab (Herceptin) als sehr wirkungsvoll, sofern der Tumor einen entsprechenden Rezeptorstatus (HER 2 neu) aufweist.

Vinorelbin wird in physiologischer Kochsalzlösung als Infusion von 30 mg/m^2 über sechs bis zehn Minuten gegeben. Es wird zunächst wöchentlich als Monosubstanz verabreicht.

Nebenwirkung: Granulozytopenie bei mäßig ausgeprägter Thrombozytopenie; Neurotoxizität ist weniger stark ausgeprägt.

1.4.4 Doxorubicin (Adriamycin)

Doxorubicin gehört zur Gruppe der Anthracyclinantibiotika, die zu den wichtigsten Zytostatika gehören. Sie werden von dem Pilz *Streptomyces peucetius var caesi* gebildet. Diese können mit der DNS interkalieren. Folglich kommt es zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen.

Doxorubicin besitzt eine breitere zytostatische Wirksamkeit. Es wird intravenös verabreicht und auch schnell aus dem Plasma eliminiert.

Nebenwirkungen: Stomatitis, Kardiomyopathie, gastrointerstinale Störungen, reversibler Haarausfall, ist mutagen und kanzerogen.

1.4.5. Epirubicin

Epirubicin entstammt der Gruppe der Antracyclinantibiotika und hat starke antineoplastische Aktivität, vor allem über eine Hemmung der DNS-abhängigen RNS-Polymerase. Wegen der höheren Lipophilie kann es besser in die Zelle penetrieren. Das Zytostatikum wird unter den Geschäftsnamen Ellence, Farmorubicine, Farmorubicina und Pharmorubicin auf dem Markt gefunden. Es wird bei Mammakarzinomen, Ovarialkarzinomen, Sarkomen und auch bei Hodgkin-Lymphomen eingesetzt.

Die Wirkung von Epirubicin basiert auf der Hemmung des Wachstums von Krebszellen und auf der Abtötung der Zellen.

Epirubicin ist ein Doxorubicinanaloga. Es hat sich herausgestellt, dass es weniger kardiotoxische Wirkung aufweist als Doxorubicin. Epirubicin kann wöchentlich in einer Dosierung von 20-25 mg/m^2 i.v. oder in einer Dosierung von 60-90 mg i.v. in einer dreiwöchentlichen Wiederholung verabreicht werden. Die empfohlene kumulative Höchstdosis für Epirubicin beträgt 900-1000 mg/m^2 . Bei fraktionierter wöchentlicher Epirubicingabe ist es vertretbar, auch eine höhere kumulative Dosis unter Kontrolle der kardialen Funktionsparameter zu applizieren.

1.4.6. Cisplatin

Die Platinkomplexverbindungen wurden 1965 von Rosenberg und Mitarbeitern als zytotoxische Wirkung identifiziert.

Cisplatin führt in der DNS zu Quervernetzungen zwischen verschiedenen DNS-Strängen. Dadurch kommt es zur Hemmung der Replikation und Transkription, was zu Strangbrüchen und Ablesefehlern führt. Obwohl Cisplatin mutagen, teratogen und kanzerogen ist, sind Fälle von Leukämie bei mit Platin behandelten Patienten selten beschrieben. Die Ursache der Resistenz von Tumorzellen gegen Cisplatin und seine Analoga ist nicht vollständig geklärt. Die intravenöse Dosis von Cisplatin beträgt 20 mg/m^2 täglich über fünf Tage oder 100 mg/m^2 einmalig alle vier Wochen.

Außer der Nierentoxizität ist auch die Ototoxizität nicht durch diuretische Maßnahmen zu beeinflussen. Es manifestiert sich als Tinnitus und Hörverlust im hochfrequenten Bereich (4000-8000 Hz).

Bei fast allen Patienten treten Symptome wie schwere Übelkeit und Erbrechen auf, die mit Ondansetron oder hochdosierten Glukokortikoiden therapiert werden. Cisplatin besitzt eine hohe Zytotoxizität, die sowohl schnellwachsende Tumorzellen aber auch gesunde Körperzellen angreift und zerstört.

1.4.7 Gemzitabin

Gemzitabin gehört zur Gruppe der Cytidinanaloga an. Es enthält als Zucker fluorsubstituierte Desoxyribose. Der primäre Wirkmechanismus besteht im Einbau von Gemzitabin in die DNA und führt als falsches Nukleosid zu Strangabbrüchen der DNA und somit zum Zelltod. In der Monotherapie ist die empfohlene Dosis für Gemzitabin auf 1000 mg/m^2 der Körperoberfläche als 30-minütige Infusion am Tag 1,8 und 15 eines Vierwochenzyklus festgelegt.

Gemzitabin zeigt eine geringere Toxizität im Vergleich zu anderen Zytostatika. Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und Alopezie wurden selten beobachtet. Es können aber grippeähnliche Symptome auftreten wie z.B. Gliederschmerzen, Myalgien und geringe Temperaturerhöhung. Solche Erscheinungen können gut mit Paracetamol 1000 mg behandelt werden.

Gemzitabin wurde ursprünglich bei Pankreaskarziomen eingesetzt. Seit 2003 wird es zusammen mit Paclitaxel bei der Behandlung von Mammakarzinomen verwendet.

1.5 Individualisierte Chemotherapie

Bis vor kurzem basierte die Planung einer antineoplastischen Chemotherapie ausschließlich auf empirischen Erkenntnissen [77].

Diese Art der Therapie hat den Nachteil, dass es am Anfang ungewiss ist, ob der Tumor auf dem applizierten Zytostatikum sensitiv ist oder nicht. Das bedeutet: sollte der Tumor nicht sensitiv sein, müssen unnötig hohe Therapiekosten in Kauf genommen werden [E.B.C.T. Collaborative Group].

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte auf dem Gebiet der Wirkstoffentwicklung gemacht wurden, ist das individuelle Ansprechen auf eine zytostatische Behandlung immer noch ungewiss.

In letzter Zeit gewinnen Methoden zur Abklärung des individuellen Ansprechens zunehmend an Bedeutung [42].

Zur effizienten Planung einer Chemotherapie ist die Existenz eines prädiktiven Verfahrens zur individuellen Therapieansprechbarkeit von großer Bedeutung. Neben den oben genannten Ansätzen wird in einigen Kliniken versucht, durch prätherapeutische Sensitivitätstestung von Tumorzellen eine individuelle Chemotherapie für die Patientinnen zu ermitteln.

Der Test, der an der Universitäts-Frauenklinik zu Köln verwendet wird, ist der sogenannte „ATP Tumor Chemosensitivity Assay“ [4]. Dieser Test basiert auf dem Nachweis des Adenosintriphosphats (ATP), dem primären Energiespender der Zelle [3].

ATP ist ein wichtiges Endprodukt aller wesentlichen biochemischen Energiegewinnungsprozesse. Der Gehalt von ATP spiegelt das jeweilige spezifische Vitalitätsmaß der untersuchten Zellen wider.

Zwischen dem Logarithmus der Lumineszenz und dem Logarithmus der lebenden Zelle besteht eine lineare Beziehung [71]. Sie kann mittels einer Enzymreaktion über die Lumineszenz das vorhandene ATP gemessen werden.

So wird ein direkter Parameter für das Zellüberleben bzw. die Chemosensitivität wiedergespiegelt.

1.6 Die Geschichte der prätherapeutischen Zytostatikatestung

Das Mammakarzinom wird bis auf wenige Ausnahmen chemotherapeutisch behandelt. Aufgrund des Einsatzes von Zytostatika in der Therapie des Mammakarzinoms ist die prätherapeutische Austestung ideal.

Der Test, der bis heute die meiste Verbreitung erfahren hat, ist der von Hamburger und Mitarbeitern entwickelte Human Tumor Clonogenic Assay (HTCA) [32]. Trotz positiver Korrelation in vitro/vivo, hat sich der Test, aufgrund aufwendiger Methodik, der langen Versuchsdauer von 14 Tagen und der hohen Anzahl der benötigten Zellen, nicht durchsetzen können. Ein weiterer Grund, dass der Test nicht funktioniert hat, ist dass die Zytostatikakombinationen nicht getestet werden können [7].

In den ersten Untersuchungen an nativen Tumoren ergab sich eine Korrelation zwischen dieser als ATP Cell Viability Assay (ATP-CVA) oder ATP Tumor Chemosensitivitätsassay (ATP-TCA) bezeichneten Methode und dem HTCA [3]. Der Test liefert gute Ergebnisse und geringe Störanfälligkeit. Im Laufe der letzten Jahrzehnte wurde eine Reihe von Testansätzen zur prätherapeutischen Testung von Chemotherapeutika entwickelt [7, 37].

Keines dieser Testverfahren konnte sich in der Praxis als Routineverfahren etablieren. Folgend werden die wichtigsten Testverfahren kurz aufgeführt.

1.6.1 Chemosensitivitätsassays und Chemoresistenzassays

Clonogenicassays zeigen den Effekt von Zytostatika durch die Hemmung der in der Kultur proliferierenden Zellen. Nonclonogenicassay bestimmt die verbleibende Vitalität des behandelnden Tumors, einschließlich aller proliferierenden und nichtproliferierenden Zellen. Zu den Clonogenicassays zählen der „Human Stam Cell Assay“ (HTCA) oder „Radiolabeled DNA-Precursor Uptake Method“. Der Nonclonogenicassay wird vertreten durch „Differenzial staiging cytotoxicity assay“ (DiSC), den „Fluorescent Cytoprint Assay“ (FCA) und „ATP-Tumorchemosensitivity Assay“ (ATP-TCA).

1.6.2 Human Tumor Clonogenic Assay (HTCA)

HTCA oder "Stammzellassay" wurde als erste Methode zur Zytostatikatestung von Hamburger und Salmon 1977 etabliert. Das Prinzip beruht auf Zellkulturen, die aus Einzelzellsuspensionen

des Tumorgewebes gewonnen werden. Das Tumorgewebe wurde mechanisch und enzymatisch zerkleinert in Einzelzellsuspension gebracht und 10-21 Tagen auf doppelsichtigem Agar-Agarose-Kultursystem inkubiert. Danach erfolgte die Auswertung, bei welcher man zur Feststellung kam, dass der positiv prädiktive Vorhersagewert des HTCA zwischen 40-75% und der negativ prädiktive Vorhersagewert bei 80-99% lag [12a]. Die Methode ist aufwendig, weil die Zellkulturen sehr empfindlich und stör anfällig sind. Und man braucht eine große Anzahl von Zellen, um ausreichenden Koloniewachstum zu erzeugen.

1.6.3 Radiolabeled DNA-precursor uptake Method (Volm-Assay/ Kern-Assay)

Dieser Test basiert auf der Markierung von DNA und RNA-Basen und der Messung des proliferierenden Zellanteiles. Es sind zwei verschiedene Assaysmodelle bekannt. Das erste (Short-Term Assay) wurde von Volm beschrieben. Eine Einzelsuspension wird zwei bis drei Stunden mit dem zu testenden Zytostatikum inkubiert und danach mit markierten DNA-Basen, H-Thymidin oder H-Uridin vermischt. Die Ergebnisse konnten nach 24 Stunden abgelesen werden. Das Kern-Assay ist eine Kombination der HTCA und der DNA precursor Methode. Die Tumorzellen werden im flüssigen Medium auf Agarboden geschichtet, drei bis vier Tage mit dem Zytostatikum inkubiert und danach werden die radioaktiven Basen zugefügt. Die Radioaktivität von behandelten und nicht behandelten Kontrollen wird im Szintillationszähler gemessen und verglichen. Die radioaktive Markierung von DNA- und RNA-Basen zur Messung proliferierender Zellen erhöhte die Evaluierbarkeitsrate auf 74 und sogar auf 80%. Daraus kann man schließen, dass sich dieser Test schnell durchführen lässt und somit eine hohe Voraussagekraft für die Resistenz erreicht wird. Jedoch liefert es eine geringe Voraussagekraft für die Sensibilität.

1.6.4 Tetrazolium-based semi-automatic assay (dye reduction assay MTT-Assay)

Das Prinzip des MTT-Assays beruht darauf, dass die Mitochondrien gelbes MTT Tetrazoliumsalz in ein dunkelblaues Formazanprodukt dehydrieren. Das Tumorgewebe wird zerkleinert und 48 Stunden den Zytostatika ausgesetzt. Danach wird mit MTT inkubiert und dabei entstehen wasserunlösliche Formazankristalle, die mittels Dimethylsulfoxid (DMSO) wieder in eine Lösung gebracht werden. Die Farbintensität wird spektralphotometrisch gemessen. Die Auswertbarkeitsrate liegt bei 80%. Platinhaltige Zytostatika ergaben in vitro/vivo

einen positiv prädiktiven Kollationswert von 60% und für voraussagbare Resistenz einen Wert von 90%. Die Studie von Sargent hat dieses Resultat bestätigt.

Dieser Technik geht die Annahme voraus, dass die Dehydrierungskapazität der Zellen während des Assays stets konstant bleibt. Die Methode ist zuverlässig und schnell, denn sie liefert die Ergebnisse in ca. 48 Stunden. Zudem ist sie mit einem geringen laboratorischen Aufwand durchführbar.

Das Testsystem ist jedoch sehr empfindlich, was durchaus ein Nachteil ist. Schwankungen des pH-Wertes, intrazelluläre Ionenkonzentration und Zellzyklusvariationen können die metabolische Aktivität verändern. Für die genaue Auswertung muss der Tumorzellanteil < 80% sein, bei einer Mindestmenge von 25.000 Tumorzellen pro Testeinheit, was in bindegewebsreichen Mammakarzinomen oft nicht der Fall ist [12, 40, 66].

1.6.5. Fluorescent Cytoprint Assay (FCA)

Im Fluorescent Cytoprint Assay wird Fluorescein-Monoacetat über einen hydrolytischen Vorgang in fluoreszierendes Fluorescein umgewandelt. Innerhalb der Zelle wird Fluoresceinester zu Fluorescein hydrolysiert. Die Zytotoxizität der getesteten Substanzen wird mit Hilfe von Fluorescein sichtbar gemacht. Sobald die Zellmembran intakt ist, akkumuliert Fluorescein in der Zelle und macht sie fluoreszent. Nach zwei Stunden diffundiert das Fluorescein wieder raus. Der Vorgang kann mehrfach wiederholt werden. Die Ergebnisse erhält man innerhalb von fünf bis zehn Tagen. Auswertbarkeitsraten liegen zwischen 73-95% [40]. Als günstig erweist sich einerseits die Möglichkeit, mit um die 50 Zellen zu arbeiten, andererseits hat man die Ungewissheit über den Mechanismus der Zellzerstörung.

1.6.6 Differential Staining Cytotoxicity Assay (DiSc)

Der „Differential Staining Cytotoxicity Assay“ kann von Färbereigenschaften auf die Tumorzellen schließen. Weisenthal beschrieb als erster diese Methode für hämatologische Neoplasmen [78]. Die Tumorzellen werden erst im flüssigen Medium vier bis sechs Tage inkubiert. Dabei trennen die zwei Färbekomponenten die nekrotischen von den vitalen Zellen. Durch die nekrotisierende Zellmembran dringt die grüne Farbe, während Hämatoxilin-Eosin oder Wright-Giemsa-Färbung vitale Zellen mit intakten Zellmembran identifiziert. Unter dem Mikroskop wird nun das Verhältnis zwischen Tumorzellen und nekrotischen Zellen verglichen.

Die Methode erreicht eine Evaluationsrate von >77%. In der Literatur ergab sich eine mittlere Sensitivität von 74% und Spezifität von 93%. Die meisten dieser vielversprechenden Daten entstammen jedoch Untersuchungen an hämatologischen Neoplasmen.

2. ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay (ATP-TCA)

Endogenes Adenosin Triphosphat (ATP) ist ein Produkt der Atmungskette jeder Zelle und somit ein Maß für die Zellvitalität. Bereits 1984 beschreiben Hanganu und seine Kollegen die von ihm entwickelte Methode der Chemosensitivitätsmessung, die den ATP-Gehalt der Zellen als Indikator für die Vitalität benutzt [33].

ATP-TCA misst den ATP-Gehalt, sowohl der proliferierenden als auch nichtproliferierenden Tumorzellen [30, 40, 43, 85]. Unter dem Einfluss von Zytostatika sinkt der ATP-Gehalt der Zellen durch Einleitung des Zelltodes. Diese Veränderung kann man als sensitive Methode zur Vitalitätsänderung messen.

Der ATP-Tumorchemosensitivitätsassay (ATP-TCA) arbeitet mit frischem und sterilem Tumorgewebe. Die Tumorzellen werden zerkleinert und in einem serumfreien Nährmedium (Complete Assay Medium, CAM) angesetzt. Der Test ist leicht zu bedienen. Er hat eine standardisierte Auswertung bei einer Inkubationszeit von sechs bis sieben Tagen. Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte bietet Raum für die Testung von jeweils 4 Zytostatika bzw. Zytostatikakombinationen in sechs Konzentrationen und Dreifachansätzen sowie für deren Kontrollen. Da jeweils nur 12000-16000 Zellen pro Well erforderlich sind, bietet sich der Assay auch für Tumorproben mit niedriger Tumorzellenanzahl an, z.B. für Mammakarzinom, Feinnadelaspirate oder Aszitespunktate.

Die Wirksamkeit von Zytostatika *in vitro* korreliert streng mit dem ATP Gehalt der Zellen. Da die Messung alle Zellen erfasst, müssen die nichtmalignen Zellen am Wachsen gehindert werden, um sie von den malignen Zellen unterscheiden zu können. Durch das serumfreie Nährmedium und die beschichteten Polypropylenplatten werden selektiv Stromazellen gehemmt, die auf Serumbestandteile angewiesen sind.

3. Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit untersucht die präklinische Testung von Zytostatika mit dem ATP-TCA an nativen Mammakarzinomen. Die systemische zytostatische Therapie stellt den wesentlichen Aspekt in

der Therapie des Mammakarzinoms dar. Aufgrund der starken Gewichtung der medikamentösen Therapie ist eine prätherapeutische Testung beim Mammakarzinom sinnvoll.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Möglichkeit aufgezeigt werden, wie native Tumore (Mammatumore) mit Hilfe des ATP-TCA zur präklinischen Zytostatikatestung eingesetzt werden können:

- Evaluation des ATP-TCA als prätherapeutischer Assay zur Zytostatikatestung beim Mammakarzinom (Auswertbarkeit, Interpretation der in vitro Daten)
- Darstellung der präklinischen Einsatzmöglichkeit im ATP-TCA bei bereits verwendeten Zytostatika (Paclitaxel, Gemzitabin, Epirubicin, Docetaxel, Doxorubicin, Cisplatin).

4. Material und Methoden

Beim Mammakarzinom hat die Chemotherapie eine große Bedeutung und zwar sowohl kurativ als auch palliativ. Der Nachteil ist, dass die Chemotherapie noch nicht selektiv und effizient genug ist. Sehr wünschenswert wäre eine Chemotherapie, die individualisierbar ist. In der Frauenklinik Köln zum Beispiel wird die zurzeit sensitive Methode (ATP-TCA) zur prätherapeutischen Überprüfung der Chemosensitivität von Mammakarzinom verwendet. Der ATP-TCA stellt einen neuen methodischen Ansatz zur prätherapeutischen Austestung der Chemotherapeutika dar. Mit dem ATP-TCA können die Substanzen einzeln oder als Kombination getestet und erkannt werden.

Diese Untersuchungen sind sowohl an Frischtumoren als auch an Zelllinien möglich. Mit den ATP-TCA könnten Patientinnen unerwünschte Nebenwirkungen und unnötige Therapien erspart bzw. neue oder bessere Therapien angeboten werden.

4.1.1 Patientenkollektiv

Das Tumorgewebe stammt von Patientinnen, die an rezidivierendem Mammakarzinom leiden. Es wurden 100 Patientinnen getestet. Man konnte aber nicht von allen Patientinnen das Gewebe entnehmen. Es waren auch die Proben aus Aszitisflüssigkeit, Pleuraflüssigkeit und Lymphknotengewebe dabei, die auf maligne Zellen getestet wurden (s. Tabelle 4).

Tabelle 4: Anzahl der Proben aus verschiedenen Bereichen

<i>Probe</i>	<i>Anzahl</i>
Gewebe	64
Pleuraflüssigkeit	28
Aszites	5
Hautmetastasen	1
Hirnmetastasen	2

Anhand der Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass das Auftreten des Mammakarzinoms in einer Zeitspanne zwischen dem 20. bis 75. Lebensjahr lag. Am häufigsten betroffen sind Patientinnen zwischen dem 25. und dem 35. Lebensjahr (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Häufigkeit der erkrankten Patientinnen im Verhältnis zum Lebensjahr

<i>Patientinnenzahl</i>	<i>Lebensjahr</i>
5	19 bis 24 Lj
40	25 bis 35 Lj
24	36 bis 45 Lj
23	46 bis 55 Lj
6	56 bis 65 Lj
2	>75 Lj

4.1.2 Probegewinnung und Transport

Die Materialgewinnung erfolgte unter aseptischen Kautelen entweder im Rahmen einer Operation (Primär- oder Interventionslaparotomie) oder durch Punktion eines Körperhöhlenergusses. Intraoperativ gewonnenes Gewebe wurde unmittelbar nach Entnahme noch am Operationstisch vom Material für die histologische Begutachtung separiert und in sterilen, fest verschließbaren Plastikgefäß mit physiologischer Kochsalzlösung (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) oder GSH-freiem Zellkulturmedium wie z.B. Minimal Essential Medium (MEM) oder Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)) übersichtet, um das Austrocknen zu vermeiden.

Maligne Ergüsse wurden entweder im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs steril aspiriert oder durch Körperhöhlenpunktion, die unter Wahrung aseptischer Bedingungen in üblicher Technik unter Ultraschalllicht durchgeführt wurde, gewonnen.

Die Aspirate wurden in sterilen Auffangbeuteln aus Polypropylen aufgenommen, die zuvor mit 20.000 IU konservierungsmittelfreiem Na-Heparin beschichtet worden waren.

Bei soliden Tumoren wurde das Transportmedium durch MEM mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 *IU/ml* Penicillin und 100 *µg/ml* Streptomycin ersetzt. Exsudate konnten nach Antikoagulation in nativer Form ohne weitere Zusätze in gleicher Weise aufbewahrt werden. Eine Probelagerung bei 4-8 °C war nur bei einer Umgebungstemperatur von mehr als 25°C notwendig. Die aus auswärtigen Kliniken zugesandten Proben wurden prinzipiell in gleicher Weise behandelt.

Aus technischen Gründen wurden solide Proben in diesen Fällen nicht mit Zellkulturmedium, sondern mit steriler isotonischer Infusionslösung (0,9% NaCl oder Ringer Laktat) überschichtet. Der Probetransport erfolgte auch durch Angehörige der Patientinnen, wobei in der Regel die Probenverarbeitung noch am selben Tag möglich war. In den anderen Fällen wurden die Proben stoßsicher in fest verschließbaren Gefäßen verpackt und per Expressdienst versandt.

Leichte Kühlung war auch hier nur bei Außentemperatur über 20°C erforderlich. Der Großteil der so zugesandten Proben konnte am Folgetag bearbeitet werden.

4.1.3. Probenaufarbeitung

Es wurden ausschließlich Proben mit eindeutigem histologischen oder zytologischen Malignitätsnachweis bearbeitet. Probenaufarbeitung und Testdurchführung erfolgten mit Hilfe von ATP-TCA-Kits (TCA 100) die sämtliche benötigten Medien, Reagenzien und Zellkulturmaterialien enthielten.

Nach Ankunft im Labor wurden solide Proben unter Zugabe von serumfreien DMEM mit steriler Pinzette und Schere von nekrotischen Anteilen, Fett, Blut und Bindegeweberesten getrennt und mit dem Skalpell in Fragmente von ca. 2 mm Durchmesser zerteilt. Die Tumorpartikel wurden anschließend in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 10 ml Tumor-Dissoziations-Enzym (TDE)-Lösung, welche zuvor durch Rekonstruktion von lypophilisiertem TDE in 10 ml Complete Assay Medium (CAM) hergestellt worden war, versetzt. Die anschließende enzymatische Digestion erfolgte entweder bei 37°C über zwei Stunden im Schüttelwasserbad oder über Nacht im Inkubator bei 37°C, bei 5%-iger CO₂- und Wasserdampfsättigung. Das Tumorslysate wurde danach durch eine Nybolt-Filtergaze (Maschenweite 80 µm) passiert, um grobe Gewebepartikel auszusondern.

Das Filtrat wurde zweimal bei 200 µg unter Zugabe von DMEM zentrifugiert, um Reste der Enzymlösung auszuwaschen. Anschließend wurde das Zentrifugat in DMEM resuspendiert. Flüssige Proben wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen allquartiert und anschließend bei 200 µg über 10 min zentrifugiert. Nach Dekantierung des Überstandes wurde das Tumorzellen enthaltende Pellet in DMEM resuspendiert. Anschließend wurde bei sämtlichen vorbereiteten Tumorsuspensionen zur weiteren Anreicherung neoplastischer Zellen eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden je 5 ml Ficoll in einem 15 ml Rundbodenzentrifugenröhrchen mit jeweils 5 ml der Tumorzellsuspension überschichtet und anschließend bei 250 g über 20 min zentrifugiert.

Die so entstandene Interphase wurde dann vorsichtig mit einer sterilen Pasticur-Pipette aufgenommen, mit DMEM versetzt und gewaschen, bei 200 g über 10min zentrifugiert und erneut mit 1 bis 5 ml CAM aufgenommen. Die resultierenden, einzelne Tumorzellen und kleine organoide Tumorpartikel enthaltende Suspension wurden anschließend auf Vitalität und Qualität hin überprüft.

Die Vitalitätsbestimmung eines Aliquots der Tumorzellsuspension erfolgte mit Trypanblaufarbstoffausschlußverfahren in üblicher Technik [24] unter Verwendung von 0,14% Trypanblau in 2% Essigsäure.

Die Zählung vitaler Zellen erfolgte in einem Neubauer-Hämozytometer unter dem Phasenkontrastmikroskop bei 200facher Vergrößerung. Durch Zugabe von weiterem CAM wurde die Suspension auf $1-2 \times 10^6$ vitale Tumorzellen/ml eingestellt.

4.1.4 Vorbereitung der Zytostatika

Die Testdurchführung folgte exakt der im ATP-TCA-Kit enthaltenen Arbeitsanleitung und den Angaben früherer Publikationen [5, 16, 34, 44, 46].

Zunächst wurden 84 Vertiefungen einer 96-Well Rundbogenmikrotiterplatte aus Polypropylen unter Verwendung einer Mikropipette mit jeweils $100 \mu\text{l}$ CAM befüllt. Zu 12 dieser Wells wurden anschließend $100 \mu\text{l}$ der jeweiligen Medikamentengebrauchslösung (800% TDC) hinzugefügt. Danach wurden die übrigen Konzentrationsstufen unter Ausnutzung von insgesamt 72 Vertiefungen der Mikrotiterplatte durch sterile Verdünnung im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die restlichen 12 mit CAM gefüllten Wells dienten als Leerwertkontrolle (M0).

In die frei gebliebenen 12 Wells wurden als Maximalinhibitionskontrolle (M1) je $100 \mu\text{l}$ Maximum ATP Inhibitor pipetiert. Alle 96 Wells der Mikrotiterplatte wurden zum Schluss mit jeweils $100 \mu\text{l}$ der eingestellten Zellsuspension beschickt und gut durchgemischt, sodass die resultierende Zellkonzentration bei $1-2 \times 10^{(4)}$ vitale Zellen/Well bzw. $5-10 \times 10^4$ vitale Zellen/ml lag. Die Gesamtmenge vitaler Zellen pro Mikrotiterplatte lag bei $1-2 \times 10^6$. Jedes Medikament bzw. jede Kombination wurde in Duplikation oder Tripplikation in sechs verschiedenen Konzentrationen von 6,25 bis 200% TDC untersucht.

Die verwendeten Pipettierschemata finden sich in den Abbildungen 1 und 2.

MI	MI	MI	MI	MI	MI	MO	MO	MO	MO	MO	MO
MI	MI	MI	MI	MI	MI	MO	MO	MO	MO	MO	MO
Drug 1 200%	Drug 1 200%	Drug 2 200%	Drug 2 200%	Drug 3 200%	Drug 3 200%	Drug 4 200%	Drug 4 200%	Drug 5 200%	Drug 5 200%	Drug 6 200%	Drug 6 200%
Drug 1 100%	Drug 1 100%	Drug 2 100%	Drug 2 100%	Drug 3 100%	Drug 3 100%	Drug 4 100%	Drug 4 100%	Drug 5 100%	Drug 5 100%	Drug 6 100%	Drug 6 100%
Drug 1 50%	Drug 1 50%	Drug 2 50%	Drug 2 50%	Drug 3 50%	Drug 3 50%	Drug 4 50%	Drug 4 50%	Drug 5 50%	Drug 5 50%	Drug 6 50%	Drug 6 50%
Drug 1 25%	Drug 1 25%	Drug 2 25%	Drug 2 25%	Drug 3 25%	Drug 3 25%	Drug 4 25%	Drug 4 25%	Drug 5 25%	Drug 5 25%	Drug 6 25%	Drug 6 25%
Drug 1 12,5%	Drug 1 12,5%	Drug 2 12,5%	Drug 2 12,5%	Drug 3 12,5%	Drug 3 12,5%	Drug 4 12,5%	Drug 4 12,5%	Drug 5 12,5%	Drug 5 12,5%	Drug 6 12,5%	Drug 6 12,5%
Drug 1 6,25%	Drug 1 6,25%	Drug 2 6,25%	Drug 2 6,25%	Drug 3 6,25%	Drug 3 6,25%	Drug 4 6,25%	Drug 4 6,25%	Drug 5 6,25%	Drug 5 6,25%	Drug 6 6,25%	Drug 6 6,25%

Abbildung 1. Pipellierschema bei Testung von 6 Medikamenten pro Mikroblenplatte in Doppelansätzen

MI	MI	MI	MI	MI	MI	MO	MO	MO	MO	MO	MO
MI	MI	MI	MI	MI	MI	MO	MO	MO	MO	MO	MO
Drug 1 200%	Drug 1 200%	Drug 1 200%	Drug 2 200%	Drug 2 200%	Drug 2 200%	Drug 3 200%	Drug 3 200%	Drug 3 200%	Drug 4 200%	Drug 4 200%	Drug 4 200%
Drug 1 100%	Drug 1 100%	Drug 1 100%	Drug 2 100%	Drug 2 100%	Drug 2 100%	Drug 3 100%	Drug 3 100%	Drug 3 100%	Drug 4 100%	Drug 4 100%	Drug 4 100%
Drug 1 50%	Drug 1 50%	Drug 1 50%	Drug 2 50%	Drug 2 50%	Drug 2 50%	Drug 3 50%	Drug 3 50%	Drug 3 50%	Drug 4 50%	Drug 4 50%	Drug 4 50%
Drug 1 25%	Drug 1 25%	Drug 1 25%	Drug 2 25%	Drug 2 25%	Drug 2 25%	Drug 3 25%	Drug 3 25%	Drug 3 25%	Drug 4 25%	Drug 4 25%	Drug 4 25%
Drug 1 12,5%	Drug 1 12,5%	Drug 1 12,5%	Drug 2 12,5%	Drug 2 12,5%	Drug 2 12,5%	Drug 3 12,5%	Drug 3 12,5%	Drug 3 12,5%	Drug 4 12,5%	Drug 4 12,5%	Drug 4 12,5%
Drug 1 6,25%	Drug 1 6,25%	Drug 1 6,25%	Drug 2 6,25%	Drug 2 6,25%	Drug 2 6,25%	Drug 3 6,25%	Drug 3 6,25%	Drug 3 6,25%	Drug 4 6,25%	Drug 4 6,25%	Drug 4 6,25%

Abbildung 2. Pipellierschema bei Testung von 4 Medikamenten pro Mikroblenplatte in Dreifachansätzen

Die so vorbereiteten Ansätze wurden danach in einer feuchten Kammer fünf bis sieben Tage lang bei 37°C und Wasserdampfsättigung in einer Inkubationsatmosphäre von 95% Luft und 5% CO₂ in einem Wassermantelinkubator kultiviert.

Nach Ende der Kulturzeit wurde der Inhalt von insgesamt sechs MO- Wells zur erneuten zytologischen Analyse asserviert. In die Vertiefungen der Kulturplatte wurden 50 µl Tumorzellextraktionsreagenz (TCER) gegeben.

4.1.5 Messung des ATPs

Nach gründlicher Durchmischung erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur über 20 min. Die Zellen wurden lysiert, das zelluläre ATP freigesetzt und gleichzeitig durch Inaktivierung der ATPasen stabilisiert. Danach wurden Aliquots sämtlicher Lysate zu jeweils 50 µl in 15 ml Messröhrchen aus Polyesterol überführt, die in einem Kettenluminometer positioniert wurden. Im Luminometer erfolgte die automatische Zugabe von jeweils 50 µl Luziferin-Luziferase-

Lichtreagenz (Lu-Lu) zu jedem Lysat. Dadurch wurde die Biolumineszenzreaktion in Gang Besetzt:



Die Messzeit betrug 10 Sekunden. Die so generierte Lichtmenge, gemessen in relativen Lichteinheiten (engl. Relative Light Units RLU= Photonen/10), steht über einen weiten Konzentrationsbereich mit der freigesetzten ATP-Menge in linearer Beziehung [28, 384, 423]. Für jeden Messtag wurde außerdem eine ATP-Standardkurve angelegt.

4.1.6 Testauswertung

Es galten nur die Ansätze als auswertbar, deren RLU-Wert in der M0-Kontrolle bei 20000 lag. Zudem wurde ein Verhältnis $\text{RLU M1}/\text{RLU M0}$ 0,01 erwartet. Als weiteres Kriterium eines erfolgreich durchgeführten Tests wurde zumindest für einige ex vivo untersuchten Regime die Existenz sigmoidaler DWB gefordert. Tumore, welche die genannten Kriterien nicht erfüllten, galten ebenso als nicht evaluierbar wie die Proben, bei denen makroskopisch oder mikroskopisch eine mikrobielle Kontamination nachzuweisen war [16, 34, 44].

Bei allen evaluierbaren Proben wurden durch Vergleich mit den entsprechenden M1 und M0 Kontrollen für jede Konzentration (x) eines Zytostatikums bzw. einer Kombination die individuelle relative Wachstumshemmung (TGI= Tumor Growth Inhibition) in Prozent bestimmt.

$$2) \text{ TGI}_x [\%] = [1 - (\text{RLU}_x - \text{RLU}_{mi}) / (\text{RLU}_{m0} - \text{RLU}_{mi})] \times 100$$

Die so ermittelten TGI-Werte wurden in individuelle Dosis-Wirkungs-Kurven (DWK) überführt, anhand derer die jeweilige 50% (IC 50), 70% (IC 70) und 90%-ige Inhibitionskonzentrationen (IC 90) durch lineare Interpretation ermittelt wurden [2]. Als dimensionsloses Maß, welches eine Information über das gesamt getestete Konzentrationspektrum ermöglichte, wurde stets zusätzlich die Fläche unter der Inhibitionskurve (AUIC= area under the inhibition curve), auch als Sensitivitätsindex (SI) bezeichnet, berechnet [5, 45, 46, 47]. Hohe AUIC-Werte korrespondierten mit hoher Chemosensitivität ex vivo und niedrige Werte mit Chemoresistenz.

4.1.7 Interpretation der Testergebnisse

In Anlehnung an Hunter [33] und Sevin [74a] wurde ein semiquantitativer Score entwickelt, nach dem fünf verschiedene Sensivitätstypen definiert wurden [45].

Sensitiv (S)	Inhibition < 70% bei allen Konzentrationen
Intermediäre Sensivität (I):	Inhibition bei TDC 50-200% Inhibition 50-70% bei TDC 6,25-25%
Partielle Sensivität (P)	Inhibition bei allen Konzentrationen 50-70%
Schwache Sensivität (W)	Inhibition > 50% bei TDC 50-200% Inhibition > 50% bei TDC 6,25-25%
Resistenz (R)	Inhibition < 50% bei allen

Die verschiedenen Sensivitätstypen und die dazu gehörigen Inhibitionskurven sind in Abbildung 3 schematisch wiedergegeben.

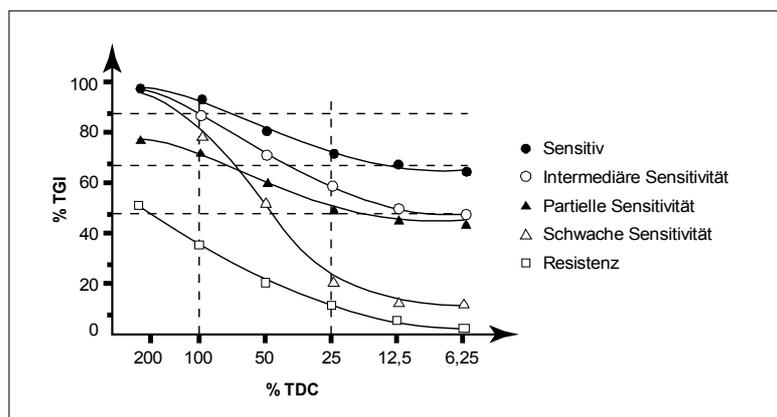


Abbildung 3. Schematische Darstellung der fünf verschiedenen Sensivitätstypen in ATP-TCA

Die Unterscheidung zwischen S und I erfolgte im Wesentlichen aus praktischen Gesichtspunkten, um Tumoren mit hoher Zytostatikaempfindlichkeit noch weiter differenzieren zu können.

Da die Bedeutung dieser Unterteilung für das tatsächliche Verhalten des jeweiligen Tumors in vivo von eher untergeordneter Bedeutung zu sein scheint [5, 16, 34, 46], wurden beide Resistenztypen auch als Tumoren mit hoher Sensitivität zusammengefasst.

Dem gegenüber wurden die Kategorien P und W auch als unvollständige Sensitivität subsumiert. Als RR ex vivo (EVRR) wurde der Anteil an nicht resistenten Tumoren an der Gesamtheit der auswertbaren Ansätze für ein bestimmten Zytostatikaregime definiert:

$$3) \text{ EVRR [\%]} = [(S + I + P + W) / (S + I + W + R)] \times 100$$

Die Rate an Tumoren hoher Sensitivität ex vivo (RHS) ergab sich demnach von:

$$4) \text{ RSH [\%]} = [(S+I) / (S+I+P+W+R)] \times 100$$

Die Kombinationswirkung verschiedener Zytostatika wurde mit Hilfe des Sigmoid-Modells nach Pösch analysiert. Durch den Vergleich der theoretischen mit der experimentell ermittelten DWK ergaben sich so vier verschiedene Typen von Zytostatikawechselwirkungen, die in Abbildung 4 schematisch wiedergegeben sind.

Das Ausmaß von Kreuzreaktivität bzw. Kreuzresistenz zwischen unterschiedlichen Einzelsubstanzen wurde mittels linearer Regression unter Berücksichtigung der jeweiligen AUIC- Werte bei allen gegen beide Medikamente getesteten Proben bestimmt.

Der so ermittelte Korrelationskoeffizient nach PEARSON (r) diente als Maß für die Kreuzreaktivität der beiden miteinander verglichenen Monosubstanzen und Zytostatikakombinationen erfolgten mit einem nicht-linearen Regressionsmodell auf Populationsbasis [46, 47]. Im Gegensatz zur Methode von Hoff, wurden diese sechs Datenpunkte nicht mit einer linearen, sondern mit einer nicht-linearen Regression unter Zuhilfenahme eines statistischen Softwarepakets [Prism, Graph PAD, San Diego, USA] approximiert.

Solche DWK wurden anschließend im Bezug auf Kurvenform, Ausmaß linearer Abschnitte, Abschnitte maximaler Steigung, Linearitätsverlust und Auftreten von Plateaus analysiert. Der ATP-TCA liefert valide Ergebnisse bei Mammakarzinomen. An den untersuchten Tumorproben waren sieben Präparate getestet worden, die in Einzelfall durchaus Abweichungen zeigten. Insgesamt aber konnte man feststellen, dass die Monotherapie eine gute Wirksamkeit gegenüber Tumorzellen aufweist.

4.1.8 Verwendete Zytostatika

Für die Untersuchung wurden kommerziell erhältliche Lösungen der Substanzen verwendet. Die Lagerung von Stammlösungen erfolgte unter Berücksichtigung der Herstellerangabe und nach Literaturhinweisen [4, 12, 33].

Vor dem Gebrauch wurden die Stammlösungen in CAM (Complete Assay Medium) bis auf 800% Testkonzentration (TDC) verdünnt. Anschließend verteilen sich die Zytostatika in sechs Verdünnungen entsprechend 200%, 100%, 50%, 12,5% und 6,25% TDC 6,25 - 200% durch Verdünnungen der Ausgangslösungen von 800% TDC im Verhältnis 1:1 in CAM. Der Konzentrationsbereich war für jede Substanz so gewählt, dass sowohl therapeutische, wie auch supratherapeutische Konzentrationen approximiert wurden.

Pro Tumorprobe wurden 7 Monosubstanzen getestet. Eine Übersicht gibt folgende Tabelle:

Tabelle 6: Übersicht der untersuchten Monosubstanzen und ihrer klinischen Referenzdosierungen

<i>Medikament</i>	<i>100% TDC $\mu\text{g/ml}$</i>	<i>klinische Referenzdosis mg/m^2 i.v.</i>
Epirubicin	0,5	75
Gemzitabin	25,0	1000
Paclitaxel	13,6	180
Vinorelbin	0,94	30
Cisplatin	3,8	100
Doxorubicin	0,5	60
Docetaxel	13,6	100

5. Ergebnisse

5.1 EVRR/RHS-Werte und Sensivitätstypen

Die höchsten EVRR-Werte für Mammakarzinomrezidive wurden mit Werten über 42% für Paclitaxel, 58% für Docetaxel und für Gemzar sogar 59% gemessen.

Diese Substanzen haben auch relativ hohe RHS-Werte aufgewiesen: Paclitaxel hat 40% und Docetaxel 30%, Gemzar dagegen hat nur 0% erreicht.

Andere untersuchte Substanzen haben Werte für EVRR zwischen 15 und 35% aufgewiesen. Dementsprechend waren auch die RHS-Werte niedrig. Die Werte lagen nur zwischen 10 bis 18%.

Tabelle 7: Verhältnis von Zytostatika bei EVRR und RHS in %

<i>Substanz</i>	<i>EVRR</i>	<i>RHS</i>
PCT	42%	40%
DCT	58%	30%
VRB	35%	18%
CIPLATIN	15%	10%
DOX	22%	12%
GEMZAR	59%	0%
EPI	18%	18%

- Sensivitätstypen

Die untersuchten Monosubstanzen wurden nach verschiedenen Sensivitätstypen aufgliedert. Vom Sensivitätstyp bis zum Resistenztyp, letzterer erhielt noch eine zusätzliche Aufteilung in intermediär sensitiv und partiell sensitiv. Aus der Tabelle kann man entnehmen, dass Taxotere in 25 Fällen von allen untersuchten Monosubstanzen als Sensitiv reagiert hat. Eine relativ hohe Resistenz haben Taxol, Doxorubicin, Navelbin und Epirubicin gezeigt.

Tabelle 8: Sensitivität bei Zytostatika

<i>Medikament</i>	<i>S</i>	<i>I</i>	<i>P</i>	<i>W</i>	<i>R</i>
TAX	13	6	0	2	29
CDDP	2	1	0	0	17
ADM	4	2	0	2	29
GEMZAR	1	13	0	6	14
NAVEL	25	0	5	10	8
TAXO	5	0	1	0	27
EPI	5	0	1	0	27

5.2 Kreuzreaktivität der getesteten Substanzen

Für die Analyse der Kreuzreaktivität bzw. Kreuzresistenz zwischen den sieben unterschiedlichen Monosubstanzen wurden die AUC-Werte für die Fälle, in denen zwei unterschiedliche Monosubstanzen simultan getestet wurden, mittels linearer Korrelation gegenübergestellt (s. Tabelle 9).

Tabelle 9: Kreuzreaktivität von 7 Zytostatika bei Mammakarzinom ermittelt im ATP-TCA

Korrelation der AUC-Werte (r)

	<i>Anzahl an Paaren</i>	<i>TX</i>	<i>CDDP</i>	<i>ADM</i>	<i>GEM</i>	<i>NAV</i>	<i>TAX</i>	<i>EPI</i>
TX	41	/	0,17***	0,2718*	0,1834*	0,056*	0,082*	0,5404**
CDDP	31	27	/	0,1456	-0,2781*	0,089*	0,163**	0,00628*
ADM	32	31	30	/	0,1654	0,012	0,048**	0,4305*
GEM	22	17	15	20	/	0,022**	0,2194	-0,2658
NAV	25	20	18	17	18	/	-0,3453	-0,2528
TAX	30	28	26	25	22	20	/	0,2545***
EPI	19	18	15	16	14	15	16	/

Signifikanzniveau für r: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001

Relativ hohe Korrelationskoeffizienten der AUIC-Werte mit $r > 0,4$ fanden sich für die Substanzpaare ADM und EPI (p jeweils $< 0,01$). Eine schwache inverse Korrelation fand sich für TX und TAX (P= 0,082). Alle übrigen Paare zeigten schwache Signifikanz.

Um einen Aufschluss über die DWB der sieben Einzelsubstanzen bei Mammakarzinomrezidiven zu erhalten, wurde das Modell von Von Hoff [94] genutzt. Der kumulative Anteil an Tumorproben, bei denen eine mindestens 50 bzw. 90%-ige Tumorzellinhibition beobachtet werden konnte, wurde den steigenden TDC gegenübergestellt.

Die Verteilung der so erhaltenden sechs Datenpunkte wurde mittels nicht-linearer Regression approximiert [50]. Auf diese Weise könnten insgesamt 200 Testungen analysiert werden:

TX, n=41; CDDP, n=31; ADM, n=32; GEMZAR, n=22; NAVEL, n=25; TAXO, n=30; EPI, n=19. Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Analysen sind in den Abbildungen 1 bis 4 wiedergegeben.

5.3 Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Analyse

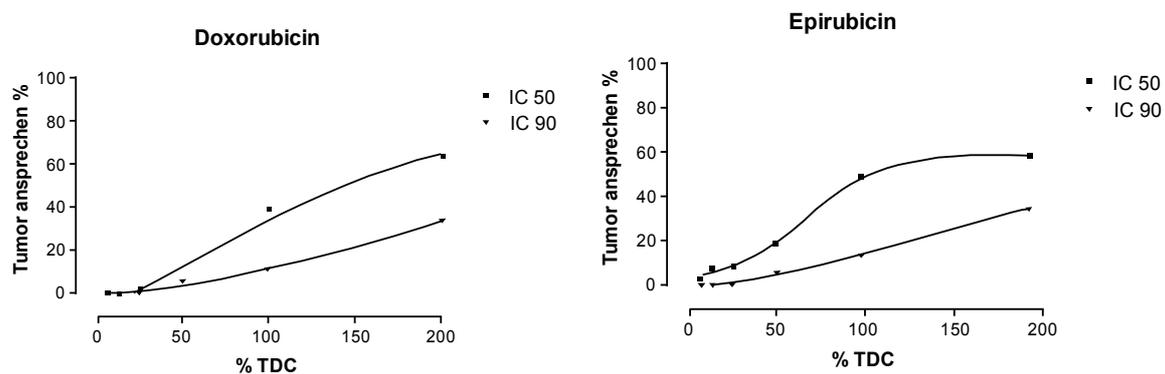


Abbildung 1:

Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die beiden Anthrazykline Doxorubicin und Epirubicin.

Symbole:

Quadrat: Tumoransprechen auf dem IC90 Niveau

Dreieck: Tumoransprechen auf den IC50 Niveau

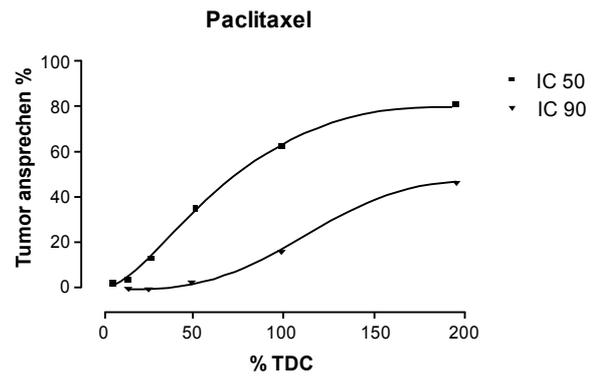
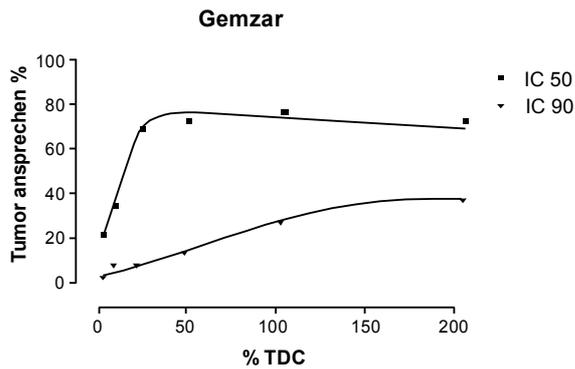


Abbildung 2: Dosis-Wirkungs-Beziehungen für Taxan und Antimetabolit. Symbole: Quadrat: Tumoransprechen auf dem IC 90 Niveau; Dreieck: Tumoransprechen auf dem IC 50 Niveau

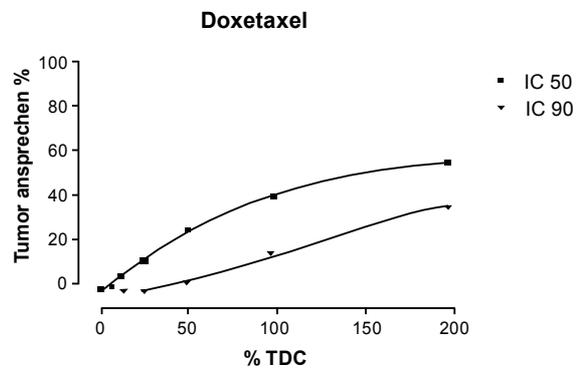
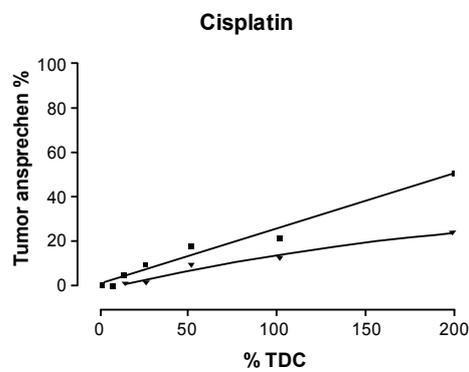


Abbildung 3: Dosis-Wirkungs-Beziehung für Cisplatin und Antrazyklin. Symbole: Quadrat: Tumoransprechen auf dem IC 90 Niveau; Dreieck: Tumoransprechen auf dem IC 50 Niveau

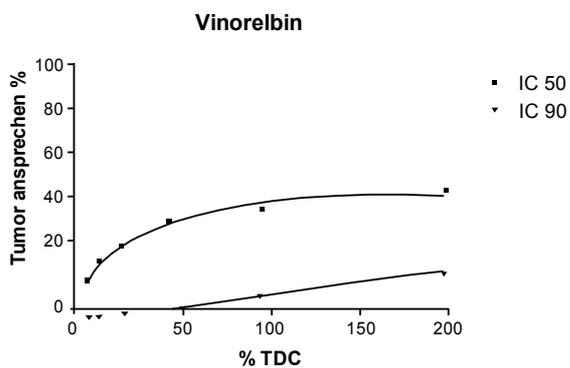


Abbildung 4: Wirkungskurve für Vinka-Alkaloid. Symbole: Quadrat: Tumoransprechen auf dem IC 90 Niveau; Dreieck: Tumoransprechen auf dem IC 50 Niveau

5.4 Präklinische Aktivität von Monosubstanzen bei Mammakarzinomrezidiven

Bei rezidivierenden Mammakarzinomen wurden insgesamt sieben Einzelsubstanzen auf ihre Aktivität ex vivo untersucht, die in Tabelle 8 näher spezifiziert sind. Eine Übersicht der qualitativen Sensitivitätstypen ist in Tabelle 9 wiedergegeben. In Tabelle 10 sind für die zehn oben genannten Zytostatika die EVRR und die RHS den klinischen Ansprechraten, soweit bekannt, gegenübergestellt.

Für die Analyse der Kreuzreaktivität bzw. Kreuzresistenz zwischen den 7 unterschiedlichen Monosubstanzen wurden die AUIC-Werte für die Fälle, in denen zwei unterschiedliche Medikamente simultan getestet wurden, mittels linearer Korrelation gegenübergestellt. Die Verteilung der so erhaltenen sechs Datenpunkte wurde mittels nicht-linearer Regression approximiert [46, 47]. Insgesamt konnten auf diese Weise Testungen analysiert werden. Man konnte einen Überblick über die Substanzen und letztlich ihre Auswirkung auf die Tumorzellen gewinnen. Diese Testung ist von großer Wichtigkeit, weil anhand der Ergebnisse zwischen den gut wirksamen und den eher wenig wirksamen Substanzen unterschieden werden kann. Das ist enorm wichtig für die anschließende Therapie, da dadurch mögliche Nebenwirkungen wegen mangelnder Wirksamkeit vermindert werden. Anhand der Kurven von verwendeten Zytostatika konnte festgestellt werden, dass diese einen unterschiedlichen Kurvenverlauf hatten. Die Dosis-Wirkungs-Kurve stellt den kumulativen Anteil der Assayergebnisse in Prozent (%) bei einer Wachstumshemmung von 50% (bei IC 50) sowie 90% (bei IC 90) dar. Ein steiler Kurvenanstieg zeigt ein gutes Ansprechen, d.h. es liegt ein hoher Anteil von Assayergebnissen mit einer IC 50 und IC 90 bereits im unteren Dosisbereich vor. Auf der X-Achse wird die Konzentration aufgetragen, auf der Y-Achse das Ansprechen der Tumorprobe in Prozent(%). Eine Plateaubildung der Kurve zeigt, dass eine Konzentrationssteigerung zu keiner effektiven Wachstumshemmung der Tumorzellen führt. Die Zytostatika wurden bei sechs verschiedenen Konzentrationen getestet: 6,25 bis 200% der TDC (Test Drug Concentration).

Aus den dargestellten Abbildungen ist ersichtlich, dass manche getesteten Substanzen wie ADM (Abb.1) und Taxotere (Abb.3) auf dem IC 90 Niveau eine lineare DWB zeigten. Eine deutliche lineare DWB wurde bei CDDP beobachtet. Nur für Paclitaxel (Abb.2) wurde im untersuchten Konzentrationsbereich bei mehr als der Hälfte der Tumore mindestens 90% TDI erreicht.

Für die übrigen untersuchten Zytostatika lag demgegenüber das Tumoransprechen auf dem IC 90 Niveau deutlich niedriger. Eine angedeutete Plateaubildung konnte für EPI und ADM beobachtet werden (Abb.1, 2). Das Antimetabolit Gemzar und das Vinca-Alkaloid induzierten selbst bei

maximaler Konzentration nur selten eine mehr als 80%-ige TG1 (Abb. 2,4).

Anhand der dargestellten Graphiken zeigte PTX einen exponentiellen Kurvenverlauf. Für dieses Zytostatikum ist daher bei einer weiteren Konzentrationserhöhung über 200% TDC noch eine Erhöhung des Anteils an Tumoren mit einer mindestens 90%-igen Wachstumsinhibition zu erwarten.

Die Analyse des kumulativen Ansprechens auf dem IC 50 Niveau erbrachte prinzipiell für alle sieben Zytostatika deutliche DWB.

Für alle Zytostatika mit Ausnahme von Gemzar und Vinorelbin ließen sich lineare oder annähernd lineare DWB bis fast 80% TDC feststellen. Eine Abflachung der DWK wurde bei Docetaxel ab ca. 50% sowie bei ADM und EPI bei 80% festgestellt. Am geringsten ausgeprägt war dieser Effekt bei CDDP.

Abweichende Verläufe der IC 50 wurden für Gemzar und Vinorelbin ermittelt. Ein sehr steiler Anstieg bis 25% TDC wurde von einer frühen Kurvenabflachung zwischen 25% und 50% TDC gefolgt. Ab 50% TDC zeigten beide DWK einen asymptotischen Verlauf, sodass einer weiteren Konzentrationserhöhung keine wesentliche Aktivitätssteigerung mehr folgte (Abb.2,4). Aus den gewonnenen Daten konnte man feststellen, dass **Paclitaxel** die effektivste Monosubstanz ist.

6 Diskussion

Die in der klinischen Anwendung am häufigst verwendeten Zytostatika zur Sensitivitätstestung sind **Anthrazykline** und **Taxane**.

Sie gehören derzeit zu den Schlüsselsubstanzen bei der Therapie des metastesierenden Mammakarzinoms, kommen allerdings auch vermehrt in der adjuvanten und neoadjuvanten Behandlung zum Einsatz. Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass **Paclitaxel** und **Epirubicin** sowohl auf dem IC 50 als auch auf dem IC 90 Niveau sich effektiv zeigten. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit früheren Untersuchungen anderer Autoren [43].

Köchli und Mitarbeiter zeigten an 3 Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, T 47, BT 20) unter den getesteten Substanzen (Doxorubicin, Pirarubicin, 5-FU, 4-OH-Cyclophosphamid und Paclitaxel), dass **Paclitaxel** die effektivste Substanz in vitro ist.

Meist enthält die Chemotherapie in der metastasierten Situation das Medikament Epirubicin oder Doxorubicin, entweder alleine oder in Form einer Kombination. Eine aktuelle Analyse aller publizierten randomisierten Studien zeigt in den metastasierten Stadien die Besserung der anthrazyklinhaltigen Schemata durch das verbesserte Ansprechen [24]. Der hohe Stellenwert der

Antrazykline in der Therapie des Mammakarzinoms wird durch seine ausgeprägte Wirksamkeit definiert. Köchli und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Pirarubicin in vitro etwa zehnfach wirksamer ist als Adrimycin [43]. Dies wurde bereits von Untch und seinen Mitarbeitern beschrieben [81]. Taxol (Generikaname: Paclitaxel) hat sich bei metastasierten Tumoren als dreiwöchentliche Monotherapie mit 175 mg/m² KOF über drei Stunden intravenös [73] oder als wöchentliche Therapie in der Dosierung von 90 mg/m² als intravenöse Infusion über eine Stunde etabliert [73].

Mit einer wöchentlichen Gabe von 80-100 mg/m² von Paclitaxel kann eine deutliche Minderung der Hämatotoxizität erreicht werden. Aufgrund der niedrigen Toxizität erlaubt die wöchentliche Behandlung eine Steigerung der Dosisintensität. Dies ist von Vorteil bei älteren und geschwächten Patientinnen, denen eine volle Taxandosierung nicht zugemutet werden kann. Unsere in vitro-Daten konnten bestätigen, dass Paclitaxel als Monosubstanz sehr effektiv ist. Jedoch konnte Paclitaxel in der Klinik eine geringe Wirksamkeit als first-line Monotherapie erzielen.

6.1 Klinische Wertigkeit beim Einsatz des ATP-TCA

In den vergangenen Jahren wurden große Anstrengungen unternommen Tests zu entwickeln, die es ermöglichen einzelne Patientinnen entsprechend ihrer individuellen Chemotherapieempfindlichkeit zu therapieren.

Es wurden Tumorbiopsien genommen, aus denen später Einzelzellen gewonnen wurden. Einzelzellen wurden in vitro mit Zytostatika inkubiert und die individuelle Empfindlichkeit der Testsubstanz gegenüber beurteilt.

Die zur Zeit sensitive und relativ am wenigsten störanfällige Methode zur Überprüfung der Chemosensitivität von Zelllinien und nativem Tumorgewebe ist der ATP-Tumor-Chemosensitivitätsassay (ATP-TCA).

Die Wertigkeit des ATP-TCA lässt sich trotz vielversprechender präklinischer Ergebnisse nur im klinischen Einsatz bestimmen.

Frühere Verfahren konnten sich nicht im onkologischen Routineeinsatz etablieren, wahrscheinlich wegen den unbefriedigenden positiv-prädiktiven Werten dieser Sensitivitätstests. Die Ergebnisse haben sich geändert, nachdem neue klonogene Verfahren entwickelt wurden. Die neueren ATP-Lumineszenzassays erreichen bei soliden Tumoren teilweise Werte von über 90%. In einigen der Untersuchungen zeigten sich jedoch relativ niedrige negativ-prädiktive Werte, was

möglicherweise in einer uniparametrischen Auswertungsstrategie begründet war [14, 81].

Die Testergebnisse in dieser Arbeit wurden mit Hilfe von neu entwickelten multiparametrischen Auswertungsrastern ausgewertet, in das neben der Schwellenkonzentration IC 50 und IC 90 auch die Fläche unter der Inhibitionskurve (AUC) einfluss [44, 45, 46, 47]. Die Wertigkeit der in dieser Untersuchung eingesetzten ATP-TCA im Vergleich zu anderen prädiktiven Assays ist in der Vergangenheit mehrfach untersucht worden [4, 14, 81]. Es hat sich gezeigt, dass der ATP-TCA wegen seines hohen positiv-prädiktiven Wertes der Hauptanforderung an einen echten Sensitivitätstest in besonderer Weise gerecht wird. Ein wesentlicher Vorteil ist die Möglichkeit der routinemäßigen Testung von sieben Konzentrationsstufen pro Zytostatikaregime, wodurch eine Charakterisierung von Dosiswirkungsbeziehungen ermöglicht wird.

Eine zusätzliche Effizienzsteigerung beruht nicht nur auf dem Testen von Einzelsubstanzen, sondern auch auf der Möglichkeit, Zytostatikakombinationen untersuchen zu können. In Verbindung mit einem multiparametrischen Auswertungsraster, das durch Verwendung verschiedener Parameter möglichst viele Informationen der individuellen Dosiswirkungskurve auszuschöpfen sucht, liegt mit dem ATP-TCA ein valides Verfahren vor, das sowohl im positiven als auch im negativen Bereich für ein biologisches System sehr hohe Voraussagegenauigkeit erreicht [7, 14, 43].

In der Therapie primärer Mamma- oder Ovarialkarzinome, auch bei malignen Keimzelltumoren oder kleinzelligen Bronchialkarzinomen, werden bereits heute hohe Remissionsraten erzielt. Bei diesen Tumoren könnte ATP-TCA zur Therapieoptimierung führen, da Toxizität und Kosten reduziert werden.

Eine weitere Besonderheit des Tests ist die hohe prädiktive Genauigkeit, die als sehr gut zu bewerten ist. ATP-TCA hat sich als ein ideales Verfahren zur präklinischen Aktivitätsbestimmung neuer Zytostatika, zur Untersuchung ihrer Dosiswirkungscharakteristika und Evaluierung eventueller Kreuzresistenzen zu anderen Zytostatika erwiesen.

Mit diesem Test sind Medikamenteninteraktion und Resistenzmodulationen gut erfassbar.

6.2 Bedeutung der Lebensqualität in der Therapie des Mammakarzinoms

Die Erhaltung und, wenn möglich, die Verbesserung der Lebensqualität ist bei Patientinnen mit Mammakarzinomen von großer Bedeutung.

Bei der Lebensqualität spielt die Früherkennung eine enorm wichtige Rolle, besonders für den Ansatz der adäquaten Therapie.

Auch die Nebenwirkungen von Chemotherapien oder eingesetzten Strahlentherapien bestimmt die Lebensqualität.

Somit rückt heutzutage die Befindlichkeit der Patientin unter der Therapie an die vorderste Stelle des Interesses. Während der Begriff der Lebensqualität nicht einheitlich definiert ist, besteht doch Einigkeit darüber, dass Lebensqualität durch verschiedene Komponenten wie psychisches Befinden, Leistungsfähigkeit, Schmerzen und Bewegungseinschränkungen bestimmt wird. Entscheidend sind die Maßnahmen, welche eine Beeinträchtigung der Lebensqualität durch Chemotherapie vermeiden helfen. Dabei sollten alle zur Verfügung stehender Möglichkeiten wie der prophylaktische Einsatz von Antiemetika und nebenwirkungsarmer Zytostatika eingesetzt werden.

Individualisierte Therapieauswahl mittels ATP-TCA könnte dazu auch einen wichtigen Beitrag leisten.

7. Zusammenfassung

Beim Mammakarzinom gewinnt die Chemotherapie sowohl in der palliativen als auch in der kurativen Behandlung zunehmend an Bedeutung. In Anbetracht der Heterogenität der Tumorerkrankung wäre eine individualisierte Chemotherapie sehr wünschenswert. Der ATP-TCA stellt hinsichtlich seines Ansprechens und seiner Sensibilität einen neuen methodischen Ansatz zur prätherapeutischen Austestung verschiedener Chemotherapeutika dar. Ebenso kann man mit dem ATP-TCA wie an Zelllinien neue Substanzen testen und erkennen an Frischtumoren. Er kann nicht nur bei der Planung individueller antineoplastischer Therapie, sondern auch zur Beschleunigung der präklinischen und frühen klinischen Entwicklung neuer aktiver Substanzen eingesetzt werden. Mit dem ATP-TCA könnten Patientinnen unerwünschte Nebenwirkungen und unnötige Therapien erspart und neue oder bessere Therapieansätze angeboten werden.

Das Ziel war die Etablierung des ATP-TCA beim Mammakarzinom.

Das Prinzip des ATP-TCA beruht auf der Messung des intrazellulären ATP. Mittels ATP-TCA können wir Frischtumorengewebe von Patientinnen mit Mammakarzinom untersuchen. Das Tumorgewebe stammt von 100 Patientinnen, die in der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe im Klinikum der Universität zu Köln operiert worden sind. Frisch asserviertes Tumorgewebe wurde steril verarbeitet. Die Verarbeitung erfolgte mechanisch und enzymatisch. Es wurde das Gewebe auf einer 96-Mikrotiter Platte verteilt und mit Zytostatika inkubiert. Die Inkubationszeit dauerte sechs bis sieben Tage. Es wurden die Dreifachansätze und die Kontrollplatte untersucht. Nach Zufügen von Luciferase wurde ATP frei gesetzt und konnte photometrisch quantifiziert werden.

Wie unsere Untersuchungen zeigen, sind die *in vitro*-Testergebnisse auswertbar und reproduzierbar. Von sieben Monosubstanzen, die wir *in vitro* getestet haben, sind Paclitaxel und Epirubicin als die effektivsten zu bewerten.

Die Anwendung des ATP-TCA könnte vor Beginn einer Chemotherapie das Ansprechen des Tumors erfassen und somit die Therapie individualisieren. ATP-TCA kann gerade in der Primärbehandlung des Mammakarzinoms zu einer raschen und effektiven Therapieentscheidung beitragen. Deswegen ist es sehr wünschenswert, das ATP-TCA zur prätherapeutischen Chemosensitivitätstestung in den Kliniken als Routine zu etablieren.

8. Literaturverzeichnis

1. Aas, T., Berresen, A.L. Geisel, S., Smith-Gorensen, B., Johnson, H. Varhang, J.E., Akselen, L.A., Lonning, P.E.: Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients. *Nature Med.* 2: 811-814 (1996).
2. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project: Modulation of fluorouracil by leukovorin inpatients with advanced CRC: evidence in terms of response rate. *J. Clin. Oncol.* 10: 896-903 (1992).
3. Ahmann, D.L., Schaid, D. Biese, H.F.: The effect on survival of initiating chemotherapy in advanced breast-cancer polychemotherapy versus single drug. *J. Clin. Oncol.* 5:1928-1932 (1987).
4. Anderotti, P.E., Linder, D., Hartmann, D.M., Becker, K., Herbst, K., Cree, I.A. Bruckner, H.W.: ATP tumor chemosensitivity assay: application for solid tumor and leukaemia. In: Szalay. A.A., Stanley, P.E., Kricka, I.J (eds.): *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status* John Wiley & Sons, Chichester, 1993 (pp. 271-275).
5. Armitage, J.O., Bierman, P., Vose, J.: Non-Hodgkin's lymphoma. In: Perry. M.C. ed: *The Chemotherapy Source Book*, 2nd ed. Milliams & Wilkins, Baltimore 1996 (pp.1361-1377).
6. Ballou, R.J., Tseng, M.T.: Chemosensitivity of cultured human breast cancer. In: Donegan W.L., Spratt, J.S. (eds.): *Cancer of the Breast*: W.B. Sanuders, Philadelphia 1995 (pp.529-533).
7. Bellamy, W.T.: Prediction of response to drug therapy of cancer. A review of in vitro-assays. *Drugs* 44: 690-708 (992).
8. Bertram, J.Palfner, Killian, M., Brysch, W., Schlingensiepen, K.-H., Hiddemann, W. Kneba, M.: Reversal of multiple drug resistance in vitro by phosphorothisate ologonucleotides and rybozymes. *Anti-Cancer Drugs* 6: 124-134 (1990).

9. Bezwoda, W.R., Seymour, L., Dansey, R.D.: High-dose Chemotherapy with hematopoietic rescues primary treatment for metastatic breast cancer: a randomized trial. *J. Clin Oncol. B*: 2483-2489 (1995).
10. Bissett, D., Kerr, D.J., Cassidy, J., Meredith, P., Traugott, U., Kaye, S. B.: Phase I and pharmacokinetic Study of D-verapamil and doxorubicin *Br. J. Cancer* 64: 1168-1171 (1991).
11. Bonadona, G., Valagussa, P., Moliterni, A., Brambilla, C: Adjuvant cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil in node-positive breast cancer. The results of 20 years of follow up. *N.Engl. J. Med.* 332: 901-906 (1995).
12. Bosanquet, A.G.: Stability of solutions for antineoplastic agents during preparation and storage for in vitro assays. III Antimetabolites, tubulin binding agents, platinum drugs, amsacrine, L-asparaginase, interferons, steroids and other miscellaneous antitumor agents *Cancer Chemother. Pharmacol.* 23: 197-207(1989).
- 12.-a Bradly, G., Juranka, P.F., Ling, V.: Mechanism of multidrugresistance. *Biochem. Biophys. Acta* 948: 87-128 (1988).
13. Cote, R.J. Esrig, D., Groshien, S., Jones, P.A. Skinner, D.G.: p53 and treatment of bladder cancer. *Nature* 385. 123-125 (1997).
14. Cree, L.A., Kurbacher, C.M., Untch, M., Sutherland, I.A., Hunter, E. M., Subedi, A.M.C., James, E.A., Dewar, J.A., Preece, P.E., Anderotti, P.E., Bruckner, H.W.: Correlation of the cilical response to chemotherapy in breast cancer with ex vivo chemosensitivity. *Anticancer Drugs* 7: 630-635 (1996).
15. Cristian, M.C.: The current status of new platinum analogs *Semin, Oncol.* 19: 720-733 (1992).

16. Dalton, W.S.: Overcommng the multidrug-resistant phenotype. In: Devita, V.T. Jr, Hellman, 8., Rosenberg,,S.A. (eds): Cancer: Principles and Practice of Oncology, 4th ed., J.B. Lippincott, Philadelphia 1993 (pp. 2655- 2666).
17. Damon L.E., Cadman, E.C.: Advances in rational combination chemotherapy. *Cancer Invest* 45: 421-444(1986).
- Damon, L.E., Cadman, E.C.: The metabolic basis for combination chemotherapy. *Pharmacol. Ther.* 38: 73- 127(1998).
18. Delia, D., Mizulani, S., Lamorte, G., Goi, K., Iwat, S., Pienotti, M.A.: p53 activity and chemotherapy. *Nature Med.* 2: 724-725 (1996).
19. Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group: Systematic treatment of early cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. *Lancet* 339: 1-15 (1992).
20. Early Breast Cancer Trialist's Collaborativa Group: Systematic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. *Lancet* 339: 71-85 (1992).
21. Elledge, R., Green, S., Howes, L., Berardo, M., Allred, D.C., Clark, G., Giocca, D., Osbome, CK. Ravdin, P., O'Sullivan, J., Langone, G.: bcl-2, p53 and response to tamoxifen in ER-positive metastatic breast cancer. *Proc. Amer. Soc. Clin. Oncol.* 15-123 (1996).
22. Engel J. et al (1997) Breast cancer: Local recurrence and survival. UICC Management Meeting, Vienna, abstracts
24. Faller H. (1997) Beeinflussen psychologische Faktoren die Überlebenszeit bei Krebskranken?Teil 1:Literaturübersicht, *Psychother Psychosom Med.Psychol* 47:163-169
- 24.-a Fossati R, Confaloneri C, Tom V et al (1998) Cytotoxic and hormonal treatment for metastatic breast cancer; a systematic review of published randomized trials involving 31,510 women. *J. Clin. Oncol.* 16:3439-3460

25. Fischer B, Mamounas EP. Preoperative Chemotherapy: A model for studying the biology and therapy of primary breast cancer *J. Clin. Oncol.* Mar. 13 (3): 537-540 (1995)
26. Fischer B et al (1989) Eight years result of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and lymphectomy with or without irradiation in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 320: 822-828
27. Frei, E. III, Teicher, B.A. Holden, S.A., Cathcart, K.N., Wang, Y.Y.: Preclinical studies and clinical correlations of the effect of alkylating dose. *Cancer Res.*: 6417-6423 (1988).
28. Friedland, M.L.: Combinations chemotherapy. In: Perry, M.C. ed.: *The Chemotherapy Source Book*, 2nd, ed. Williams & Wilkins, Baltimore 1996 (pp. 101-107).
29. Fugua, S.A.W.: Estrogen and progesterone receptors and breast cancer. In. Harris, J.R., Lippman, M.E., Morrow, M., Hellman, S.(eds) *Diseases of the Breast*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996 (pp.261-272).
30. Gasparini, G., Barbareschi, M., Doglion, C, Dalla Palma, P., Mauri, FA., Boracchi, P., Berilacqua P., Caffo, O., Morelli, L., Verderio, P., Pezzella, F., Harris, A.L.: Expression of bcl-2-Protein predicts efficacy of adjuvant treatments in operable node positive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* I: 189-198 (1995).
31. Goldie. J.H.: Drug resistance In: Perry. M.C. ed: *The Chemotherapy Source Book*, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996 (pp. 63-78).
32. Hamburger, A.W., Salomon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197 161-163(1997).
33. Hunter, E.M., Sutherland, L.A., Cree, I.A., Dewar, J.A., Preece, P.E.: Heterogenic of chemosensitivity in human breast carcinoma: use of an adenosine triphosphate (ATP) chemiluminescence assay. *Eur. J. Surg. Oncol.* 19-242-249 (1993).
34. Issacs, J.R., Davies, S.L., Wells, N.C., Harris, A.L.: Topoisomerase II as therapy targets in breast cancer *Anti-Cancer Drugs* 6:195-211 (1995).

35. Jones S., Winer EP., Vogel CL, et al: Randomized comparison of vinorelbine and melphalan in anthracycline-refractory advanced breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13: 2567-2574.
36. Jones, R.D., Kerr, D.J., Harnett, A.N., Rankin, E.M., Kay, S., Kaye, S.B.: A pilot study of chinidine and epirubicin in the treatment of advanced breast cancer. *Br. J. Cancer* 62: 133-135 (1990).
37. Kangas, I, Gronroos, M., Nieminen, A.: Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *Med. Biol.* 62 (1984) 338-343.
38. Karp, J.E., Smith, M.A.: The molecular pathogenesis of treatment- included (secondary) leukemias: foundations for treatment and prevention *sem. Oncol.* 24: 103-113 (1997).
39. Kardinal, CG.: Endocrine Therapy of breast cancer. In: Donegan, W.L., Spratt, J.S. eds: *Cancer of the Breast (4+L ed)*. W.B. Saunders, Philadelphia, 1995 (pp. 534-580).
40. Kardinal, CG., Cole, LT.; Chemotherapy of breast cancer. In: Perry, M.C. (ed): *The Chemotherapy Source Book, 2nd*, ed Williams & Wilkins, Baltimore. 1996 (pp. 1125-1183).
41. Kavallaris, M.: The role of multidrug resistance associated protein (MRP) expression in multidrug resistance. *Anti-Cancer Drugs* 8: 17-25 (1997).
42. Kemeny, N.: Colorectal cancer an undertreated disease. *Anti-Cancer Drugs* 7: 623-629 (1996).
43. Köchli Or, Sevin BU, Perras J, Angioli R, Untch M, Steren A, Ramachadan C, Averette HE: Comparative chemosensitivity profiles in three human breast cancer cells lines with the ATP-Cell-Viability-Assay *Oncology* 552-558 (1994).
44. Kurbacher, CM., Cree, I.A., Brenne, U., Bruckner, H.W., Kurbacher, J.A., Mallmann, P., Andneotti, P.G., Kreb, D.: Heterogeneity of in vitro chemosensitivity in preoperative breast cancer cells to mitoxantrone versus doxorubicin evaluated by a microplate ATP bioluminescence assay. *Breast Cancer Res. Treat.* 41: 161-170 87 (1996).

45. Kurbacher, C.M., Mallmann, P., Kurbacher, J.A., Hübner, H., Krebs, D.: Chemosensibilitätstestungen in der gynäkologischen Onkologie: Erfahrungen mit einem ATP-Biolumineszenzassay. *Geburtsh. Frauenklin.* 56: 70-78 (1996).
46. Kurbacher, C.M., Brenne, U., Kurbacher, J.A., Mallmann, P., Krebs, D.: Vergleich der zytostatischen Wirkung von Epirubicin und Mitoxantron auf native Mammakarzinomzellen mit Hilfe des ATP-Tumor-Chemosensitivitätsassays *Zentralbl. Gynäkol.* 118: 271-278 (1996).
47. Kurbacher, C.M., Cree, J.A., Brenne, U., Bruckner, H.W., Kurbacher, J.A., Mallmann, P., Andreotti, P.E., 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 Re. Treat* 41: 161-170 (1996).
48. Leek, R.D., Kaklamanis, L., Pezella, F., Gatter, K.C., Harris, A.L.: bcl-2 in normal breast and carcinoma. Association with ER-positive EGFR-negative tumors and in situ cancer. *Br. J. Cancer* 1994; 69: 135-139.
49. Loeb, L.A., Christians, F.C.: Multiple mutations in human cancers. *Mutat. Res.* 350: 279-286 (1996).449a.
- 49.-a Lindner, H., Prof. Dr. med., Institut für Strahlentherapie und radiologische Onkologie Klinikum Ingolstadt, MANUAL Mammakarzinome Tumorzentrum München, 9. Auflage (2003).
50. Loeb, L.: Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis *Cancer Res.* 51: 3075-3079(1991).
51. Leonard, R.C.F.: The importance of dose and schedule in cancer chemotherapy: breast cancer. *Anti-Cancer-Drugs* 6 (Suppl: 5); 17-27 (1995).
52. Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T., Houseman, D.E.: p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents *Cell* 74: 957-967 (1993).

53. Lyubimov, E., Lan. L-B., Pashinsky, I., Ayesh, S., Stein, W.D.: Saturation reversal of the multidrug pump using may reversers in low-dose combinations. *Anti-Cancer Drugs* 6 727-735 (1995).
54. Macmillian, R.D. et al (1996) Local recurrence after breast-conserving surgency for breast cancer. *Bnl. Surg.* 83: 149-155.
55. Moertel, C.G.: Chemotherapy and colorectal cancer *N. Engl. J. Med.* 330: 1136-1142 (1994).
56. Miller, T.P., Grogan, T.M., Dalton, W.S., Spier, CM., Scheper, R.J., Salmon, S.E.: P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance wirb chemotherapy plus high dose verapamil. *J. Clin. Oncol.* 9: 17-24 (1991).
57. Mirski, S.E.L., Gerlach, J.H., cde, S.P.C.: Multidrug resistance in Human small cell lung cancer cell line selected in Adriamycin. *Cancer Res.* 47: 2594-2598 (1987).
58. McGuire, W.L., Kern, D.H., Von Hoff, D.D., Weisenthal, L.M.: In vitro Assays to predict drug sensitivity and drug resistance. *Breast Cancer Res. Treat.* 12: 7-21 (1988).
59. Morrow, C.S., Cowan, K.H.: Mechanismus of antineoplastic drug resistance. In: Devita, V,T. Jr., Hellmann, S., Rosenberg, S A. (eds.). *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4th ed: J.B. Lippincott, Philadelphia, 1993 (pp. 340-348).
60. Noble, R.L., Beer, C.T., and Cutts, J.H.: Further biological activities of vincal leukoblastine an alkaloid isolated from *Vinca rasea* (L.) *Biochem. Pharacol.*, 19581:347-348.
61. Osborne, C.K., Clark, G.M., Ravdin, P.M.: Adjuvanc systemic therapy of primary breast cancer. In: Harri, J.R., Lippman, M.E., Morrow, M., Hellman, S. (eds.), *Diseases of the Breast* Lippincott-Raven Philadelphia (pp. 548-578) 1996.
62. Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J.: Global cancer statistic *CA cancer J. Clin* 1999; 49: 33-34.

62. a Pappenheimer, A.M.: Experimental Studies upon lymphocytes I, The reaction of lymphocytes under various experimental conditions. *J. Exp. Med.* 25: 633 (1917).
63. Peters, W.P.: High-dose chemotherapy for breast cancer. In: Harris, J.R., Lippman, M.E., Morrow, M., Hellman, S. (eds.): *Disease of the Breast*. Lippincott-Raven, Philadelphia 1996 (pp.735-743).
64. Peety, R.D., Sutherland, L.A., Hunter, E.M., Cree, I.A., Lane, D.P., Newman, L., Preece, P Andreotti, P.E.: Expression of the p53 tumor suppressor gene product is a determinant of chemosensitivity, *Biophys Biochem. Res. Commun.* 195: 264-270 (1994).
- 64a. Petty, RJD., Sutherland, L.A., Hunter, E.M., Cree, I.A.: Comparison of MTT and ATP-bast assays for the measurement of viable cell number *J. Biolum. Chemilum.* 10: 29-54 (1995).
65. Recht A. et al (1996) Local-regional recurrence after mastectomy or breast-conserving surgery. In: Harris, J.R. (ed) *Diseases of the breast*; Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 649-667
66. Ries: NCI SEER Cancer statistics Review (1-3) & National Cancer Institute 1997
67. Rowinsky, E.K., Gilbert, M., McGuire, W.P., Noe, DA., Grochow, L.B., Forastiere, AA, Ettinger, D.S., Lubjenko, B.G., Clark, B., Sartorius, S.E., Cornblath, D.R., Hendricks, CB,, and Donehower, R.C., Sequences of taxol and cisplatin: a phase I and pharmacologic study. *J. Clin. Oncol.* 1991. 9: 1692-1703.
68. Rowinsky, E.K., McGuire, W.P., and Donehower, R.C. The current status of Taxol. *Prin. Pract. Gynecol. Oncol. Updates*, 1993. (1) 1-16.
69. Sargent, J., Elgie, E., Taylor, E.G., Wilson, J., Alton, P., Hili, J.G.: The identification of drug resistance in ovarian cancer and breast cancer application of the MTT assay (1994) pp. 64-75.
70. Sharp, S.Y., Rogers, P.M., Kelland, L.R.: Transport of cisplatin and bis-acetato-ammine-dichlorocyclohexylamine-platin (IV) (JM216).

71. Schnüren, H.-G.: Medikamentöse Therapie bei Mammakarzinomkrankungen. In: Bender, H.G. (Hsg): Gynäkologische Onkologie (2. Aufl.) Thieme Stuttgart (S. 376-423) 1991.
72. Silverstini, R., Benini, E., Veneroni, S., Diadone, M.G., Tomasic, G., Squicciarini, P., Salvatoris B.: p53 and bcl-2-expression correlates with clinical outcome in a series of node-positive breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.* 14:1604-1610 (1996).
73. Seidman, A.D.: Single-agent paclitaxel in the treatment of breast cancer: phase I and II development. *Semin. Onvol.* Jun; 26 (3 Suppl 8): 14-20 (1999).
74. Steel, M.: Cancer genes: complexes and complexities. *Lancet* 342: 754-755 (1993).
- 74.-a Servin, B.-U., Perras, J.P., Averette, H.F., Donato, D.M., Penalver, M.: Application of ATP bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol. Onkol.* 31:191 -204 (1988).
75. Strickland, D.K., Hakmi, N.: Chemotherapy of pediatric solid tumors. In: Perry, M.C., ed. *The Chemotherapy Source Book*, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1906 (pp. 1333-1342).
76. Thierry, A.R., Dahman, A., Dritschilo, A.: Overcoming multidrug resistance in human tumor cells using free and liposomally encapsulated antisense oligodeoxynucleotides *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 952-960 (1990).
77. Thigpen, T., Blessing, J., Ball, H., et al: Phase II trial of Taxol as second-line therapy for ovarian carcinoma: A gynaecologic Oncology study. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 1990; 9:604 (Abstract).
78. Terenziani, M., Demicheli, R., Brambilla, C, et al: Vinorelbine an active, non-cross-resistant drug in advanced breast cancer: Results from a phase II study. *Breast Cancer Res. Treat.* 1996; 39; 285-291.

79. Tripathy, D., (2002) Gemcitabine as single agent for therapy of advanced breast cancer. *Clkt Breast Cancer* 3 (suppl 1): 8-11
80. Tsuruo, T., Tomida, A.: Multidrug resistance, *Anti-Cancer Drugs* 6: 213-218 (1995).
81. Untch, M. Pretherapeutic in vitro Testing in Gynecological Tumors: The Use the ATP-CSA (ATP-Chemosensitivity Assay) Presented at the International Symposium on Emerging Clinical & Pharmaceutical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence. Ft. Lauderdale USA Feb. 14-16 (1993).
82. Wadler, S.: Gynecology Malignomics. In: Kirkwood, J.M., Lotze, M.T., Yasko, J.M. (eds): *Current Cancer Therapeutics* (2nd ed) Current Medicine, Churchill Livingstone, Philadelphia 1996 (pp 215-224).
83. Waldmann, T., Lengauer, C, Kinzler, K.W., Vogelstein, B.: Uncoupling of S-Phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p 21. *Nature* 381: 713-716 (1996).
84. Wood, W.C., Budman, D.R., Korzun, A.H., Cooper, M.R., Younger, J., Hart, KD., Moore, A., Ellerton, J.A., Norton, L., Ferree, CR., Ballow, A.C., Frei, E.III, Henderson, J.C.: Dose and doseintensity of adjuvant chemotherapy for stage II, node-positive breast carcinoma. *N.Engl. J. Med.* 330: 1254-1259 (1994).
85. Wilkes, J.: Chemotherapy of gastrointersinal cancer. In: Perry. M.C. ed: *The Chemotherapy Source Book*, 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore 1996 (pp. 1185-1199).
86. Wilson, W.H., Berg, S.L., Bryant, G., Wittes, R.E., Bates, S., Fojo, A., Steinberg, S.M., Goldspiel, B.R., Herdt, J., O'Shaughnessy, J., Balis, F.M., and Chabner, B.A., Paclitaxel in doxorubicin-refractory or mitoxantrone-refractory breast cancer: a phase I/II trial of 96-hour infusion. *J. Clin. Oncol.*, 1994,12: 1621-1629.
87. Wittliff, J.L.: Hormone and growth factor receptors. In: Donegan, W.H., Spratt, J.S. (eds): *Cancer of the Breast* (4th ed) W.B. Saunders, Philadelphia 1995 (pp. 346-374).

88. Wishart, G.C., Biset, D., Paul: Quinidine as a resistance modular of epirubicin in advanced breast caocer mature results of a placebo-controlled randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 12:1777-1777(1994).
89. Vahdat. L., Antman, K.H.: Dose-intensive Therapy in breast cancer. In: Armitage, J.O., Antman, K.H. (eds): *High-Dose Cancer Therapy: Pharmacology, Hematoproteins, Stemcelis* (2nd, ed). Williams & Wilkins, Baltimore, 1995 (pp. 802-823).
90. Verelle, P., Meissonier, F., Fonk, Y., Feilled, V., Dionet, C, Kwiatkowski, F., Plagne, R., Chassagne, J.: Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. *J. Nath. Cancer. Inst.* 83: 111-116 (1991).
91. Verweij, J., Herweijer, H., Dosterom, R.: A phase II Study of epidoxorubicin in coiorected cancer and the use of cyclosporin A in an attempt to reverse mustidrug resistance. *Br. J, Cancer* 64: 361 (1991).
92. Volm, M., Pommerneke, E.W.: Durchbrechung der Resistenz durch Pharmaka *Tumordiagnose Ther.* 12: 219-225(1991).
93. Volm, M., Pommerneke, E.W.: Überwindung der Multidrug-Resistenz bei Tumoren II neue Ansätze *Tumor Diagn. Ther.* 13: 1-5 (1992).
94. Von Hoff, D.D., Clark, G.M., Weiss, GJL, Marschall, M.M., Buchok, J.B., Knight, WAJII, Le Maistre, C.F.: Use of in vitro dose response effects to select antineoplastics for high-dose or administration regimens. *J. Clin. Oncol.* 4:1827-1834 (1986).
95. Ziegler, L.D., Conelly, J.H., Frye, D., Smith, T.L., Hortobaggi, G.N.: Lack of correlation between histologic findings and response to chemotherapy in metastatic breast cancer. *Cancer* 68; 628-633 (1991).
96. Zhou, XJ., and Rahmani, R. Preclinical and clinical pharmacology of vinca alkaloids. *Drugs*, 1992, 44 Suppl.4: 1-16.
97. Yarbio, J.W.: The scientific basis cancer chemotherapy. In: Perry, M.C. ed.: *The 3iemotherapy Source Book* 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996 (pp. 3-18).

9. Lebenslauf

1. Angaben zur Person

Name: Tanja Trifunovic-Rakic
Wohnort: Pommernstr. 12
51379 Leverkusen
Geburtstag/Ort: 19.02.1974, Cuprija
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: serbisch
Eltern: Mileva Trifunovic, geb. Stojadinovic
Stanisav Trifunovic

2. Schulausbildung

1981 – 1989 Grundschole Djura Jaksic in Cuprija
1989 – 1993 Medizinische Schule Danilo Dimitrijevic in Cuprija
1993 Fachhochschulausbildung

3. Universitäre Ausbildung

1993 – 1994 Erwerb der Deutschkenntnisse an dre Philosophischen
Fakultät, Köln
1996 – 2006 Studium der Humanmedizin
2001 Ärztliche Vorprüfung in Köln
2003 1. Teil der Ärztlichen Vorprüfung in Köln
2005 2. Teil der Ärztlichen Vorprüfung in Köln
Apr. 2005 – März 2006 Praktisches Jahr im Krankenhaus Holweide, Köln
Mai 2006 3. Staatsexamen

4. Ärztliche Tätigkeit

Seit 11/2006 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Klinik Löwenstein
von 12/2006 bis 11/2008 als Assistenzärztin in der Abteilung Onkologie
seit 11/2008 als Assistenzärztin in der Abteilung Pneumologie tätig

Leverkusen, den 01.09.2009

Tanja Trifunovic-Rakic

Trifunovic-Rakic, Tanja