

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Professor Dr. med. K. Diedrich

**Ergebnisse der Chemosensitivitätstestung
beim Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri**

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

Vorgelegt von
Rupert Jenz
aus Eutin
Lübeck 2004

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Wolf-Dietrich Husstedt
2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Thomas Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2005

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den: 07.12.2005

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung und Fragestellung | 5 |
| 1.1 | Häufigkeit und Risikofaktoren für das Entstehen eines Zervixkarzinoms | 5 |
| 1.2 | Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms | 5 |
| 1.3 | Klinisches Bild | 5 |
| 1.4 | Diagnostik..... | 6 |
| 1.5 | Therapie | 7 |
| 1.6 | Fragestellung und Zielsetzung..... | 7 |
| 2 | Material und Methode | 8 |
| 2.1 | Tumormaterial | 8 |
| 2.2 | Prinzip der Messung | 8 |
| 2.3 | Testbesteck | 9 |
| 2.4 | Vorbereitung der Tumorproben..... | 10 |
| 2.5 | Dichtegradientenzentrifugation | 11 |
| 2.6 | Vorbereitung der Zytostatikaproben..... | 12 |
| 2.7 | Einbringen der Tumorzellen auf die Mikrotiterplatte..... | 13 |
| 2.8 | Messung des ATP-Gehaltes der Tumorzelle | 14 |
| 2.9 | ATP-Standardkurve | 14 |
| 2.10 | Auswertung..... | 15 |
| 2.11 | Statistische Methoden..... | 17 |
| 3 | Ergebnisse | 18 |
| 3.1 | Konzentrationsabhängige Zellwachstumshemmung der Zytostatika: Ifosfamid, Carboplatin, Cisplatin, 5-Fluorouracil..... | 18 |
| 3.1.1 | Einzelauswertung..... | 18 |
| 3.1.2 | Mittelwerte | 22 |
| 3.2 | Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung bei Primärtumoren und Rezidiven .. | 25 |
| 3.3 | Konzentrationsabhängige Tumorwachstumshemmung bei Patientinnen mit und ohne Diabetes mellitus..... | 27 |
| 3.4 | Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Differenzierung des Tumors. | 30 |
| 3.5 | Einfluß des Rauchens auf die Wachstumshemmung von Tumoren. | 32 |
| 4 | Diskussion | 34 |
| 4.1 | Literaturübersicht | 35 |
| 4.2 | Vergleich der eigenen Untersuchungen mit den Ergebnissen der Literatur | 35 |
| 4.3 | Kritische Beurteilung der eigenen Ergebnisse und Schlussfolgerungen | 37 |
| 5 | Zusammenfassung | 41 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 42 |
| 7 | Anhang | 47 |
| 8 | Danksagung | 51 |
| 9 | Lebenslauf | 52 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|-----------------------------------------------------------|
| ATP | Adenosintriphosphat |
| CA | Karzinom |
| CAM | Complete Assay Medium |
| FICOLL | nonionic synthetic polymer of sucrose |
| FIGO | Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique |
| HLA | human leucocyte antigen |
| HPV | Humanpapillomaviren |
| PE | Probeexzision |
| RPMI | Umdrehungen pro Minute |
| SPSS | Statistical Package for Social Sciences |
| TDC | Test Drug Concentration |
| TGI | Tumor Growth Inhibition |

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Vorkommen und Risikofaktoren des Zervixkarzinoms

Beim Zervix- oder Kollumkarzinom handelt es sich um das zweithäufigste Karzinom der Frau weltweit (30, 36). Jährlich kommt es in Deutschland zu 8.800 Neuerkrankungen. In den Vereinigten Staaten sind es 14.000 Neuerkrankungen im Jahr (30, 36). In den Entwicklungsländern ist vorrangig, wohl wegen der schlechten hygienischen Verhältnisse, das Zervix-CA eines der am häufigsten anzutreffenden Malignome (11) und somit die Haupttodesursache weiblicher Krebspatientinnen.

25% der Patientinnen mit der Diagnose eines Zervix-Ca weisen bereits höhere Stadien nach FIGO auf (II B bis IV A). Ein Grund hierfür ist sicher in den fehlenden, regelmäßigen Kontroll- und Screeninguntersuchungen (16), allgemein als Früherkennungsuntersuchungen bekannt, zu sehen.

1.2 Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms

Ca. 87% des Zervix-Ca sind Plattenepithelkarzinome. Sie werden wahrscheinlich durch eine HPV-Infektion initiiert (4, 15, 19, 30). Bei der Entstehung spielen die HPV-Typen 16 in ca. 80%, 18 in ca. 5 %, sowie 31 und 45 eine Rolle (3, 14, 18, 19, 24, 28). Weitere begünstigende Faktoren sind frühe Kohabitarche, östrogenbetonte Ovulationshemmer, Rauchen, Genitalinfektionen mit anderen Erregern, z.B. mit Chlamydien und Herpes simplex, sowie mangelnde sexualhygienische Maßnahmen, häufiger Partnerwechsel und eine Schwäche des Immunsystems (5, 13). Letztendlich begünstigt somit eine Infektion die andere. Gleichfalls sind HLA-Assoziationen nachgewiesen worden (35, 21).

1.3 Klinisches Bild

Während die Vor- und Frühstadien des Zervixkarzinoms meist symptomlos sind, kann es in höheren Stadien zu unterschiedlichen Arten von Blutungsstörungen z.B. zu Metrorrhagien, aber auch blutigem Fluor und Kontaktblutungen kommen.

Als Spätsymptomatik treten Schmerzen im kleinen Becken, im Sakralbereich und in der Lendengegend auf. Miktions- und Defäkationsbeschwerden treten meist bei Karzinomen auf, die die Organgrenzen überschritten haben. Aber auch Lymphödeme der Beine, die auf eine Einflusstauung hinweisen können, sind mögliche klinische Symptome eines fortgeschrittenen Tumors. Gleichfalls finden sich nicht selten Harnabflussstörungen durch Kompression des oder der Ureteren.

1.4 Diagnostik

Frauen ab dem 20. Lebensjahr sollten sich zur Früherkennung einmal im Jahr einer gynäkologischen Untersuchung unterziehen, wobei die Entnahme eines zytologischen Abstriches obligat sein sollte. Dies gilt gleichfalls für die bimanuelle Tastuntersuchung des Genitales und die rektale Palpation, sowie einer transvaginalen Sonographie.

In Abhängigkeit vom klinischem Befund, besonders aber vom Untersuchungsergebnis des zytologischen Abstrichs sind gegebenenfalls eine PE der Portio, fraktionierte Abrasio oder Konisation durchzuführen, um ein Karzinom oder ein Vorstadium, wie z.B. ein Karzinoma in situ, auszuschließen oder zu bestätigen (1, 7, 12).

Die Therapie richtet sich dann nach dem Tumorstadium und Befund, aber auch nach Alter und möglichen Grunderkrankungen der Patientin. Folgende Angaben sind notwendig, um eine adäquate Behandlung einzuleiten:

- Primärtumorgröße und Ausdehnung entsprechend der TNM-Klassifikation
- Untersuchung der Resektionsränder
- Grading
- Lymph- oder Gefäßeinbruch des Tumors
- Ausdehnung auf die Umgebung
- Beurteilung der Lymphknoten
- Ausschluss oder Nachweis von Metastasen

1.5 Therapie

Wann immer möglich sollte im Stadium I, gegebenenfalls auch im Stadium II, eine Operation erfolgen. Neben den etablierten Verfahren der Operation nach Wertheim-Meigs sowie der kombinierten fraktionierten Bestrahlung (25) wird heute eine Kombination von Bestrahlung und gleichzeitiger Chemotherapie angewendet. Dieses Verfahren ist als Fortschritt anzusehen.

Die kombinierte Radiochemotherapie ist heute Standard bei der Behandlung der Kollumkarzinoms (27, 31).

Grundsätzlich ist das Kollum-CA als wenig chemosensibel anzusehen, sodass eine Chemotherapie des Kollum-CA nur eingeschränkt wirksam ist (38).

Eine Indikation zur Chemotherapie beim Kollum-CA ergibt sich jedoch oft wieder beim Auftreten von Rezidiven und bei der Progression, insbesondere dann, wenn eine Operation oder Bestrahlung nicht mehr möglich ist.

Die kombinierte Radiochemotherapie mit 40 mg Cisplatin/m² Körperoberfläche pro Woche ist heute als die Therapie der ersten Wahl anzusehen, falls keine Operation erfolgte.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

In Anlehnung an die Chemosensitivitätstestung bei Ovarial-Ca stellten wir uns die Frage, wie sich Kollumkarzinom-Gewebe bzw. ein Rezidiv in der Chemosensitivitätstestung verhält (2, 9, 17). Aufgrund der unterschiedlichen Patientinnen-Kollektive boten sich als zusätzliche zu untersuchende Parameter das Vorliegen eines Diabetes mellitus, der Grad der Tumordifferenzierung und der Einfluss eines Nikotinabusus auf die Ergebnisse an. Die Untersuchungen erstreckten sich auf die wichtigsten bei der Behandlung des Kollum-CA angewandten Chemotherapeutika:

Cisplatin, Carboplatin, 5- Fluorouracil und als Negativ-Kontrolle Ifosfamid.

2 Material und Methode

2.1 Tumormaterial

Das Tumormaterial wurde von Patientinnen gewonnen, die im Zeitraum zwischen 1995 bis 1998 an der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universität zu Lübeck in Behandlung waren. Insgesamt wurden von zunächst 30 Patientinnen, die mit der Diagnose eines Kollum-CA zur Aufnahme kamen, eine PE oder ein Exkochleat von der Portio durchgeführt, um die Diagnose histologisch zu sichern. Ein Teil der Probe wurde für die Chemosensitivitätstestung asserviert. Gleichzeitig wurden das Alter, die vollständige Anamnese, Tumorart, Stadieneinteilung und die Behandlung dokumentiert.

In gleicher Weise wurde bei 4 Patientinnen, die mit einem Rezidiv eines Kollumkarzinoms zur Aufnahme kamen, Tumorproben entnommen.

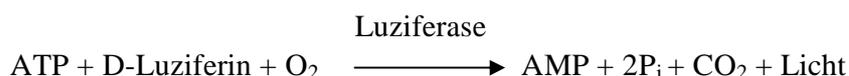
1. Die Lagerung der Biopsien bis zu Ihrer Weiterverarbeitung im Labor erfolgte bei 4 - 8° C. Transportiert wurden die Proben auf Eis im Kulturmedium RPMI-1640 mit Zusatz von 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Kanamycin. Die Zusätze dienten der Erhaltung der Lebensfähigkeit der Zellen und der Vermeidung einer mikrobiellen Kontamination, entsprechend den Testbedingungen, bei Anwendung des TUMORCHEMOSENSITIVITÄTS- ASSAY, BATLE TCA-100, gemäß der Arbeitsanleitung der Firma DCS, Sartori C, Hamburg (1993) (2, 9).

Grundsätzlich wurden die Proben unter sterilen Bedingungen entnommen.

2.2 Prinzip der Messung

Bei Anwendung des ATP-Tumorsensitivitäts-Assay BATLE LE TCA-100 wird die Wirksamkeit von Zytostatika an Tumorzellpopulationen in vitro untersucht. Gemessen wird das zelluläre ATP. Je niedriger der ATP-Gehalt der Zellen ist, desto niedriger sind der Energieladungszustand und damit das Wachstumspotential der Zellen. Beim Zelltod fällt der ATP-Gehalt auf Null (2, 9).

Das Tumormaterial wurde entsprechend den Testbedingungen durch enzymatische Verdauung in eine Einzelzellsuspension gebracht. Proben, welche Tumorzellen enthielten, wurden für sieben Tage in verschiedenen Zytostatikakonzentrationen inkubiert. Ein Luminometer ermittelt die Wachstumshemmung durch Messung von Licht, das bei der Biolumineszenzreaktion in Gegenwart von Luziferin und Luziferase proportional zum Gehalt an ATP emittiert wird:



2.3 Testbesteck und benötigte Reagenzien

Zur Durchführung der Untersuchungen wurden folgende Reagenzien und Materialien entsprechend den Testbedingungen verwendet:

- Zwei sterile Skalpelle für die Zerkleinerung und Vorbereitung der Tumorprobe.
- Eine 10 ml Einwegspritze und ein 0,22 µm Filter zur Sterilfiltration der Tumordissoziations-Enzymlösung
- 250 ml gebrauchsfertiges CAM
- Eine Flasche lyophilisiertes Enzym zur Bindegewebsverdauung wird mit 10 ml CAM rekonstituiert
- Zwei sterile 96-Loch-Mikrotiterplatten zur Kultur von Tumorproben
- Eine Flasche mit 4 ml sterilem Maximum ATP-Inhibitor-Reagenz zur Verwendung als negative ATP-Kontrolle
- Eine Flasche mit 20 ml gebrauchsfertigem, gepuffertem Reagenz für die Extraktion von ATP aus kultivierten Tumorproben
- Eine Flasche mit 20 ml sterilem Puffer pH 7,8 zur Rekonstituierung von Luziferin-Luziferase Reagenz und ATP-Standard
- Eine Flasche mit lyophilisiertem D-Luziferin und Luziferase zur Messung des ATP-Gehalts der Tumorproben

- Eine Flasche mit 500 ng lyophilisiertem *ATP* zur Erstellung von Eichkurven als Qualitätskontrolle

Weiterhin wurden benötigt:

- 15 ml sterile konische Zentrifugenröhrchen
- Sterile Pipetten 0-200 µl, 200-1000 µl, sterile Spitzen
- 8-Kanalpipette 0-200 µl, sterile Spitzen
- Steriles Reagenzienreservoir für Mehrkanalpipette
- Sterile Petrischale 100 x 15 mm
- Kunststoffröhrchen 17 x 100 mm
- Steriles destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Sterile Natrium-Heparinlösung, 10.000 Einheiten/ml
- Steriles FICOLL, 1,077g/ml
- Neubauer-Zählkammer 0,1 mm
- Trypanblaulösung
- Inverses Zellkulturmikroskop
- Klasse II Laminar Flow-Box
- Angefeuchteter Inkubator 37°C, 5% CO₂
- Röhrchen –oder Plattenluminometer mit Messröhrchen und –platten

2.4 Vorbereitung der Tumorproben

Die Tumorprobe von etwa 0,5-1 g wurde zunächst in Einzelzellen (150000-250000 Zellen/ml) überführt. Eine Flasche Tumordissoziationsreagenz wurde dafür mit 10 ml CAM vermischt. Diese Lösung wurde anschließend mittels einer 10-ml-Spritze und eines 0,22 µm-Filters in ein steriles konisches 15 ml Zentrifugenröhrchen filtriert.

Die Probe wurde in eine Petrischale gelegt, danach überschüssiges und sichtbares Fett und Bindegewebe mit Hilfe eines Skalpells entfernt. Kleingeschnittenes Tumormaterial von 0.5-1g wurde dann in die vorbereitete Tumordissoziationslösung gegeben und 2-6 Stunden bei 37°C

inkubiert. Das Röhrchen wurde in waagerechter Lage positioniert, um eine optimale Verteilung des zerkleinerten Gewebes zu erreichen. Das Röhrchen wurde anschließend in 30-45 Minutenintervallen um 180° von Hand gedreht. Die Zellen wurden dadurch voneinander getrennt. Es entstand eine Suspension aus Einzelzellen.

Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation bei 400 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde abpipetiert. Das Sediment wurde anschließend nochmals in 10 ml CAM resuspendiert und zentrifugiert. Am Ende des Waschens erfolgte die Aufnahme des Sediments in CAM. Sofern sich weiter größere Fragmente in der Lösung befanden, wurde das Röhrchen senkrecht aufgestellt. Nach 1 - 2 Minuten erfolgte das Abziehen des Überstandes. Die größeren Fragmente wurden verworfen.

2.5 Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation ist ein Verfahren, das der Entfernung von Erythrozyten und Zelldebris dient.

Hierzu wurden fünf Milliliter steriles FICOLL bei Raumtemperatur in ein konisches 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend erfolgte die vorsichtige Überschichtung mit 10 ml Einzelzellsuspension in CAM und Zentrifugation bei 400 x g für 30 Minuten.

Der Überstand wurde mit einer 5 ml-Pipette abgezogen und verworfen.

Nun konnten in der Grenzschicht zwischen CAM und FICOLL die Tumorzellen mit einer Pipette abgehoben und in ein weiteres steriles, konisches Zentrifugenröhrchen gegeben werden.

Die Zellen wurden noch zweimal durch Zentrifugation wie o.g. mit 10 ml CAM gewaschen und anschließend in CAM resuspendiert.

Die Gesamtzellkonzentration und der Lebendzellanteil wurden mittels Neubauer-Zählkammer und Trypanblaulösung, da intakte Zellen keinen Farbstoff aufnehmen, bestimmt. Der Lebendanteil sollte mindestens 60 % betragen. Alle genannten Einzelschritte erfolgten entsprechend den Herstellerangaben des Testes (2, 9).

Zur Vorbereitung wurden Stammlösungen für jedes Zytostatikum hergestellt. Die Stammlösungen wurden zur Herstellung von 800 %-TDC-Lösungen entsprechend verdünnt, d.h. das angegebene Volumen Stammlösung in μl wurde in 10 ml CAM gelöst. (Tab. 2.2)

Tab. 2.2 Vorbereitung von Stammlösungen. Die Werte geben die zur Herstellung von 800 %- Zytostatika-Lösungen verwendeten Mengen an.

| Medikament | 100 % TDC $\mu\text{g/ml}$ | Stammlösung mg/ml | μl Stammlsg. zu 10 ml CAM \rightarrow 800%-Lsg. |
|----------------|----------------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------|
| Ifosfamid | 50,00 | 40,00 | 100,00 |
| Carboplatin | 15,80 | 10,00 | 126,00 |
| Cisplatin | 3,80 | 2,00 | 150,00 |
| 5-Fluorouracil | 22,50 | 50,00 | 36,00 |

Mit einer Pipette wurden jeweils 100 μl des Maximum ATP-Inhibitor-Reagenz in die Vertiefungen F1 – F12 einer Mikrotiterplatte als MI-Kontrollen pipettiert. Weiterhin wurden jeweils 100 μl CAM in jede Vertiefung pipettiert, auch in die Vertiefungen E1 – E12 für die M0-Kontrollen. Anschließend wurden jeweils 100 μl der 800 %-Zytostatika-Lösung in die Vertiefungen der Reihe A nebeneinander gegeben. Die Zytostatikakonzentration der Reihe A betrug nun 400 %. Mit einer Mehrkanalpipette wurden dann jeweils 100 μl Testkonzentrationen aus der Reihe A durch die Reihen B - D der Platte seriell verdünnt.

2.7 Einbringen der Tumorzellen auf die Mikrotiterplatte

Die Anzahl der Tumorzellen wurden vor jeder Messung in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die gewaschenen und gezählten Zellen wurden in CAM resuspendiert, sodass eine Konzentration von 150.000-250.000 Zellen/ml erreicht wurde.

100 µl der Zellpräparation wurden in die für die Zytostatika-Testung bestimmten Vertiefungen pipettiert. Die Zellmenge betrug 15.000 – 25.000 pro Vertiefung in 0,2 ml CAM bei Zytostatika-Konzentrationen von 200 - 25 % in Reihe A-D (Tab. 2.1).

Mit vier Spitzen der Mehrkanalpipette wurden die Spalten A1 - D1, A2 - D2, A3 - D3 gemischt. Nach Wechseln der Pipettenspitzen wurde mit den Spalten A4 - D4 bis A 12- D12 (Tab. 2.1) gleichermaßen verfahren. Mit einer Mehrkanalpipette wurden jeweils 100 µl der Zellpräparation in die für die M0- und für die MI-Kontrollen vorgesehenen Reihen pipettiert.

Die abgedeckte Mikrotiterplatte wurde bei 37° C, 5 % CO₂ und > 95 % relativer Luftfeuchtigkeit sechs Tage inkubiert.

2.8 Extraktion und Messung

Zur Vorbereitung der Messung wurde das Luziferin-Luziferase-Lyophilisat mit 15 ml Verdünnungspuffer rekonstituiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Wegen seiner Lichtempfindlichkeit wurde das Reagenz durch Aluminiumfolie geschützt.

Mit einer Mehrkanalpipette wurden in die M0- und MI-Kontrollreihen jeweils 50 µl Tumorzelleextraktionsreagenz eingebracht. Anschließend wurden die weiteren Reihen auch mit 50 µl Tumorextraktionsreagenz versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden aus jeder Vertiefung 50 µl entnommen und in 12 x 75 mm große Zählröhrchen pipettiert. Die Röhrchen wurden dann in das Luminometer eingesetzt. Das vorbereitete Luziferin-Luziferase-Gemisch wurde nun in das Gerät gestellt und 5 x gewaschen. Die Messzeit wurde auf 10-15 s eingestellt. Anschließend wurden 50 µl des Luziferin-Luziferase-Gemisches je Röhrchen automatisch injiziert.

2.9 ATP-Standardkurve

Die ATP-Standardkurve wurde zur Überprüfung der Linearität der Messergebnisse in Abhängigkeit vom ATP-Gehalt der Probe gemessen. Standardmessungen erfolgten nach jeder dritten

Versuchsdurchführung. Dafür wurde ein lyophilisierter ATP-Standard mit 2 ml Verdünnungspuffer rekonstituiert. Die Konzentration der Stammlösung betrug 250 ng ATP/ml.

Je 300 µl des Verdünnungspuffers wurden in neun Rörchen pipettiert. Mit 150 µl ATP-Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Dazu wurden 150 µl der Stammlösung in das erste der neun Rörchen gegeben, durchmischt, 150 µl entnommen und in das zweite Rörchen gegeben. Die sich ergebenden Konzentrationen sind wie folgt:

Tab. 2.3 Konzentrationen der ATP-Standardkurve bei einer Stammlösung von ATP.

| | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|
| Verdünnung | 1:3 | 1:9 | 1:27 | 1:81 | 1:243 | 1:729 | 1:2187 | 1:6561 | 1:19683 |
| Konzentration von ATP in ng/ml | 83,33 | 27,76 | 9,253 | 3,084 | 1,028 | 0,342 | 0,114 | 0,038 | 0,012 |

Je 50 µl aus den neun Rörchen wurden in ein Messgefäß pipettiert; zusätzlich wurden die ATP-Stammlösung und der Verdünnungspuffer (ATP = 0) mit 3 mal 50 µl eingesetzt.

Die Durchschnittswerte der Dreifachmessungen der ATP-Standardkurve wurden gegen die Verdünnungsstufen aufgetragen. Der Korrelationskoeffizient R sollte > 0,975 bleiben.

2.10 Auswertung

Die auszuwertenden Tumorproben umfassten zunächst 30 Patientinnen. Da die Daten von zwei Patientinnen fehlerhaft bzw. unvollständig waren, reduzierte sich die Zahl auf 28. Sechs weitere Tumorproben mussten aus der Untersuchung herausgenommen werden, da es sich bei diesen Patientinnen um Adenokarzinome der Zervix uteri handelte.

Abschließend mussten noch einmal sechs Proben aus der Auswertung herausgenommen werden. Bei diesen Patientinnen wurde bei der M0-Messung ein so geringer ATP-Gehalt gemessen, dass davon auszugehen war, dass bereits zum Zeitpunkt der Inkubation die Zellsuspension vollständig oder weitgehend abgestorben war.

Die Wachstumshemmung wurde mit dem Luminiszenzmessgerät quantifiziert

Somit blieben 16 Proben für die Auswertung.

Diese unterteilten sich noch einmal in 12 Primär- und 4 Rezidiv-Tumoren von Plattenepithelkarzinomen der cervix uteri.

Zur Auswertung und Dokumentation der Testergebnisse wurde eine spezielle Software, Quatro Pro für Windows (2, 9), genutzt. Da diese Software für das statistische Analyseverfahren, SPSS (Statistical Package for Social Sciences), nicht kompatibel ist, mussten die Daten in eine adäquate Excel-Datei transferiert werden. Zur Umsetzung mussten aus den Dreifachmessungen der getesteten Zytostatikakonzentrationen der mittlere Wert sowie aus den M0- und MI-Kontrollen Mittelwerte gebildet werden.

Die Wachstumshemmung (TGI: Tumor Growth Inhibition) der Tumorprobe für jede Konzentration einzelner Medikamente wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$1,0 - (\text{TEST} - \text{MI}) / (\text{M0} - \text{MI}) = \text{TGI}$$

bzw. $\times 100\% = \text{TGI in \%}$

wobei

TEST = Durchschnitt der drei Messwerte pro Konzentration eines Zytostatikums

MI = Durchschnitt der zwölf Maximum Inhibitor-Kontrollen

M0 = Durchschnitt der zwölf Kontrollen ohne Zytostatika-Zusatz

Niedrige Zellzahlen (entsprechend hoher zytostatischer/zytozider Wirkung) ergeben hohe Hemmungen und umgekehrt. Die vom Hersteller zur Verfügung gestellte Auswertungssoftware, Quatro Pro für Windows, benutzt die oben angegebene Gleichung.

Im Einzelnen wurden folgende Richtlinien bei der Bestimmung von Sensitivität und Resistenz eines Zytostatikums zugrundegelegt (2, 9, 20).

1. Sensitivität wird durch hohe TGI-Werte angezeigt. Hohe Sensitivität wird durch erhöhte TGI-Werte auch im unteren Konzentrationsbereich wiedergegeben.
2. Resistenz wird durch niedrige TGI-Werte angezeigt. Starke Resistenz wird durch niedrige TGI-Werte auch im hohen Konzentrationsbereich wiedergegeben.

2.11 Statistische Methoden

Nachdem sämtliche Daten überprüft waren und bestimmte Daten mittels der explorativen Datenanalyse, Boxplot, unter SPSS auf Ausreißer im Institut für Medizinische Biometrie und Statistik untersucht waren, erfolgte die Wiedergabe der Ergebnisse in Diagrammen.

Da die Daten de-Moivre verteilt sind, wurden diese mit dem t-Test für gepaarte Messwerte auf Signifikanz überprüft. Sowohl Formulierung der Hypothesen, als auch Festsetzung des Signifikanzniveaus auf 5%, erfolgte vor Ziehung der Stichproben.

Die Hypothesen waren:

Nullhypothese (H0): Die Koinzidenz zwischen geänderter Anzahl der Zellen und verabreichtem Medikament ist rein zufällig.

Alternative Hypothese (H1): Die Koinzidenz zwischen geänderter Anzahl der Zellen und verabreichtem Medikament ist nicht zufällig. Medikament hat gewirkt.

Weiter wurden mit Hilfe der in SPSS integrierten Toolbox für t-Test, die Daten überprüft.

Die Ergebnisse sind den entsprechenden Abbildungen zugeordnet.

3 Ergebnisse

3.1 Konzentrationsabhängige Zellwachstumshemmung der Zytostatika :

Ifosfamid, Carboplatin, Cisplatin, 5-Fluorouracil.

3.1.1 Einzellauswertung

Bei dem Vergleich der Einzelergebnisse der unterschiedlichen Proben (n= 15 bzw. 16) finden sich sowohl im Einzelvergleich als auch konzentrationsabhängig vom Zytostatikum Unterschiede.

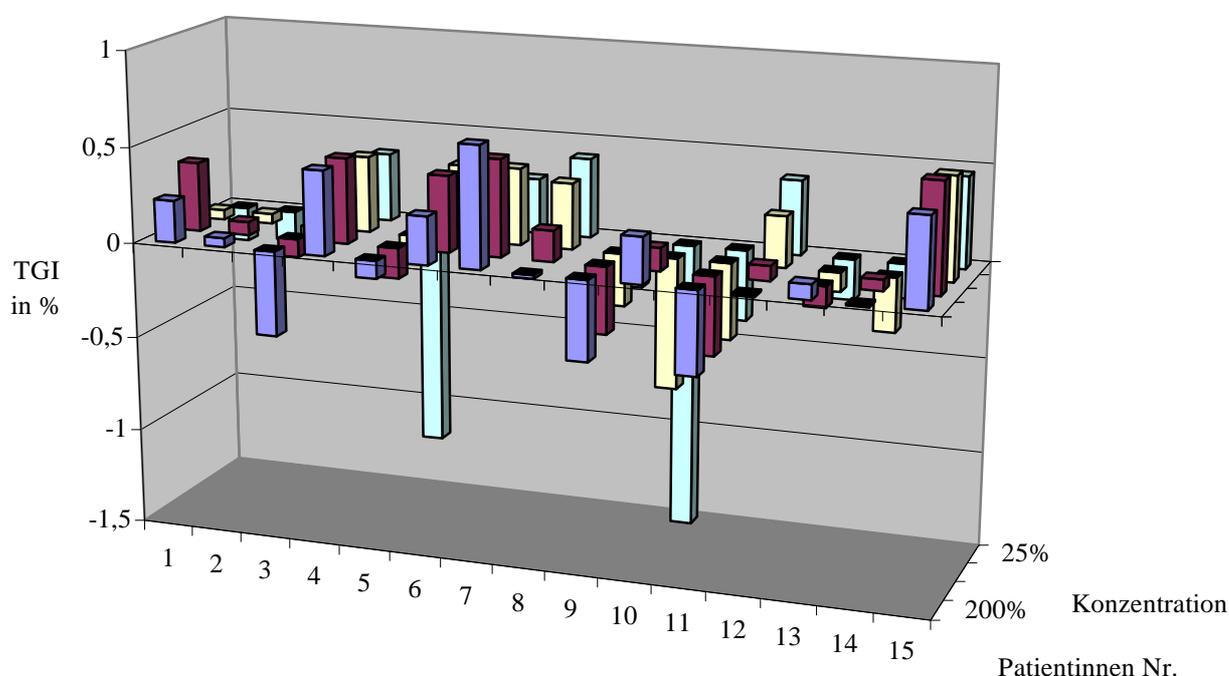


Abb. 3.1 Wachstumshemmung (TGI) von Ifosfamid bei unterschiedlichen Konzentrationen g 200% g 100% g 50% g 25% von 15 Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri..

Die Einzeldaten, die der Abb. 3.1 zugrunde liegen, wurden mit Hilfe des t-Tests auf Signifikanz überprüft. Dabei ergaben sich im Einzelnen für Ifosfamid:

| Konzentration | 200% | 100% | 50% | 25% |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| t-Test Wert | 0,19475376 | 0,1841861 | 0,18405543 | 0,18628479 |
| Vergl. Variable | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 |
| Signifikanz | Nicht Signifikant | Nicht Signifikant | Nicht Signifikant | Nicht Signifikant |

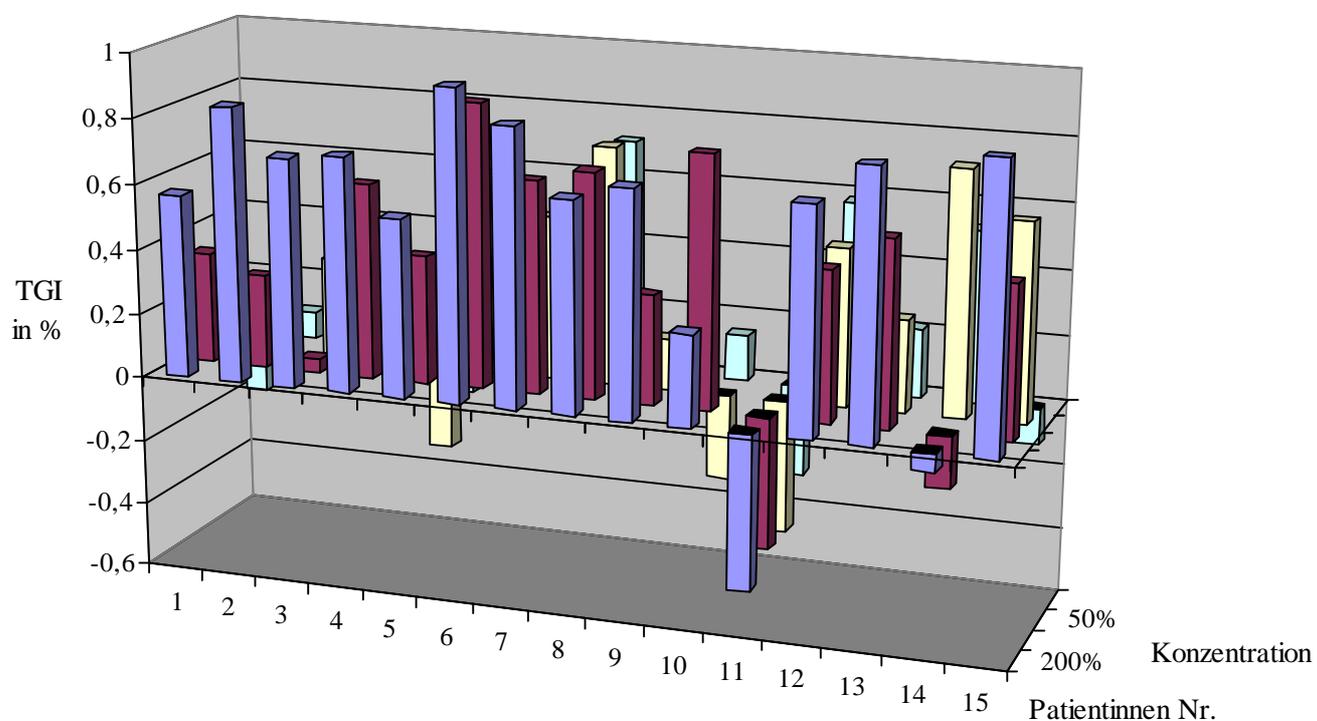


Abb. 3.2 Wachstumshemmung (TGI) von Carboplatin bei unterschiedlichen Konzentrationen
g 200% g 100% g 50% g 25% von 15 Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri.

Der t-Test ergab im Einzelnen für Carboplatin:

| Konzentration | 200% | 100% | 50% | 25% |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| t-Test Wert | 0,16092856 | 0,16490389 | 0,17118925 | 0,1667057 |
| Vergl.Variable | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 |
| Signifikanz | Signifikant | Signifikant | Signifikant | Signifikant |

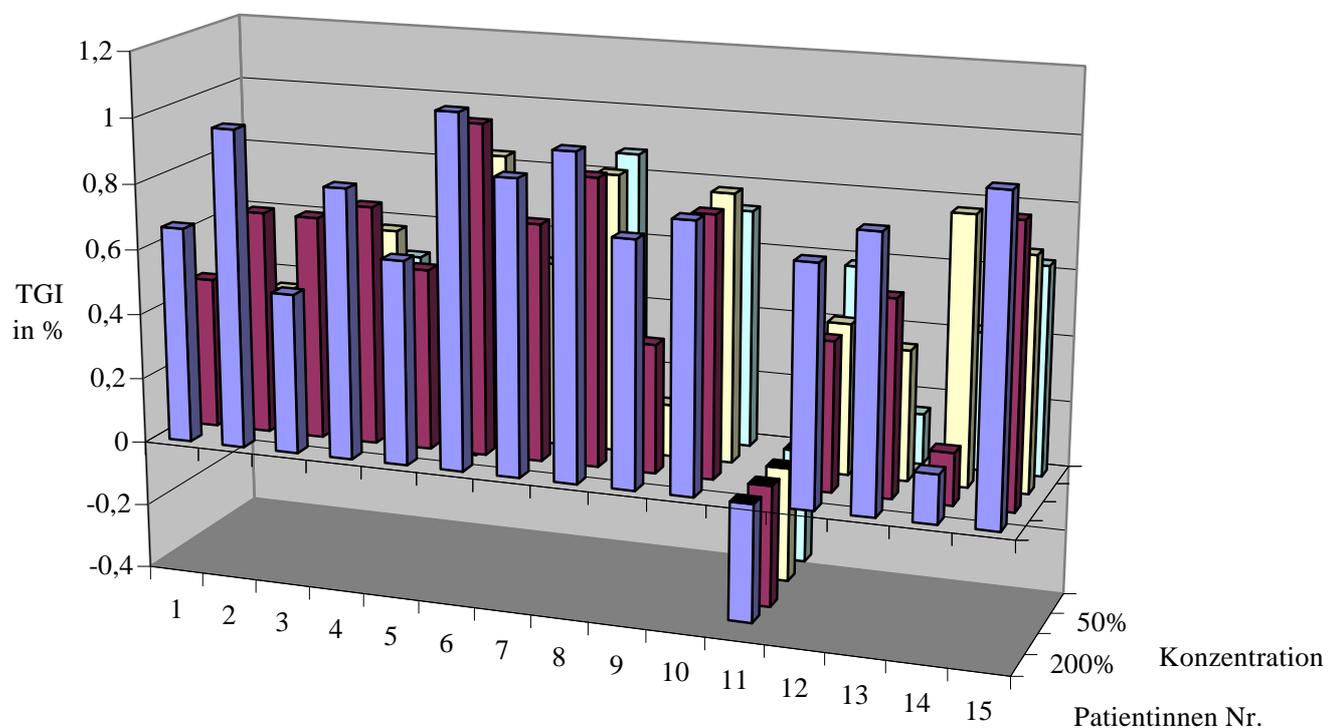


Abb. 3.3 Wachstumshemmung (TGI) von Cisplatin bei unterschiedlichen Konzentrationen g 200%
g 100% g 50% g 25% von 15 Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri.

Der t-Test ergab im Einzelnen für Cisplatin:

| Konzentration | 200% | 100% | 50% | 25% |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| t-Test Wert | 0,14143712 | 0,15217013 | 0,15719748 | 0,16352788 |
| Vergl.Variable | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 |
| Signifikanz | Signifikant | Signifikant | Signifikant | Signifikant |

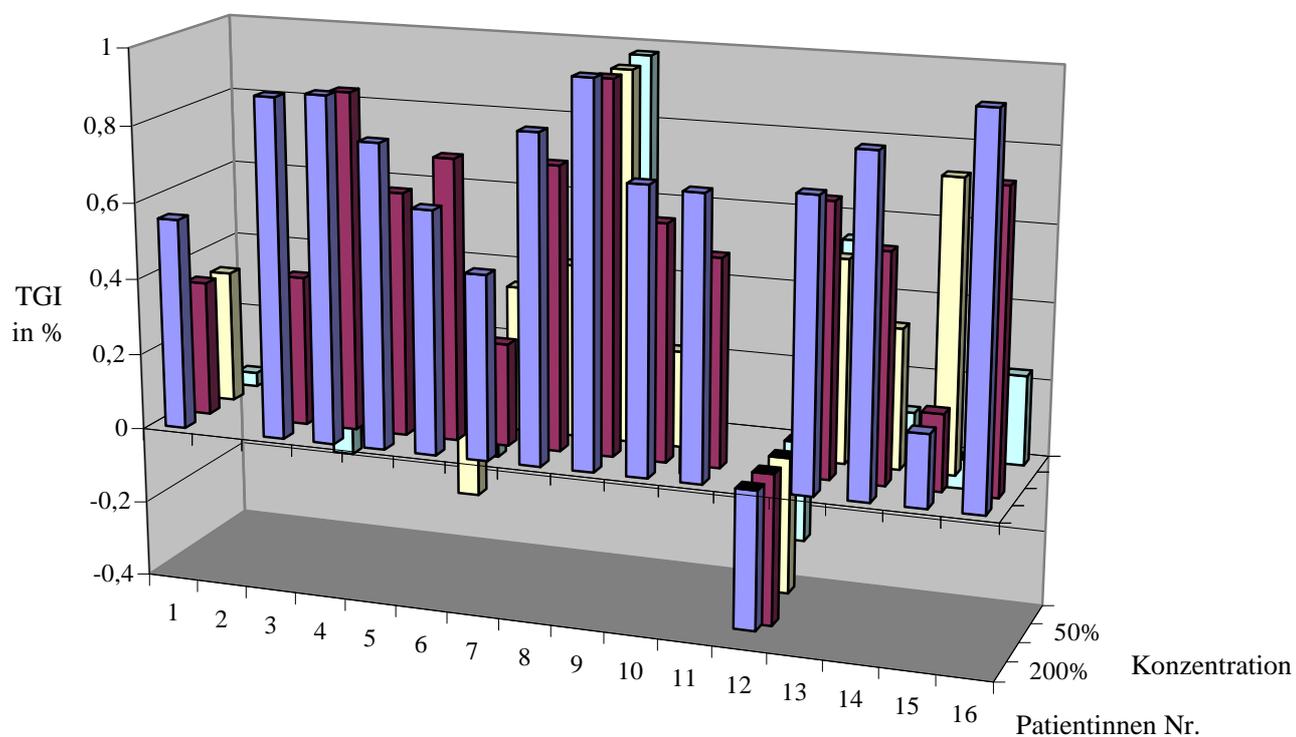


Abb.3.4 Wachstumshemmung (TGI) von 5-Fluorouracil bei unterschiedlichen Konzentrationen
g 200% g 100% d 50% g 25% von 16 Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri.

Der t-Test ergab im Einzelnen für 5-Fluorouracil:

| Konzentration | 200% | 100% | 50% | 25% |
|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|
| t-Test Wert | 0,14714139 | 0,16671251 | 0,17094457 | 0,29923864 |
| Vergl.Variable | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 | 0,17858445 |
| Signifikanz | Signifikant | Signifikant | Signifikant | Nicht Signifikant |

Die Daten der Einzelauswertung und der sich daraus ergebenden Diagramme sind im Anhang (7) in entsprechender Tabelle angeführt.

3.1.2 Mittelwerte

Die folgenden Ergebnisse stellen Summenpotentiale von Mittelwerten errechnet aus den Daten von 15 bzw. 16 untersuchten Proben dar (Abb. 3.5-3.8).

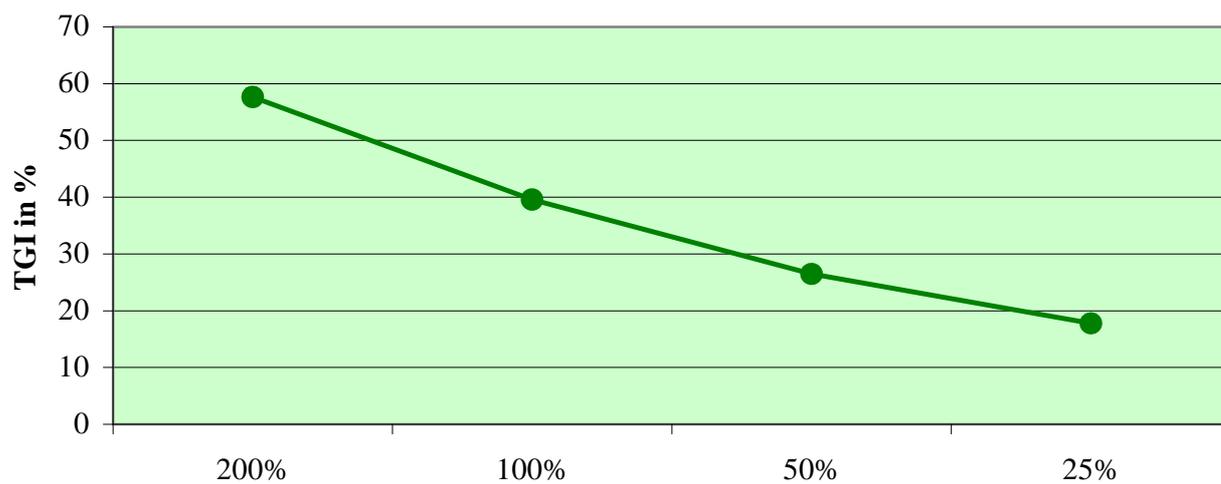


Abb. 3.5 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) von Carboplatin in %.

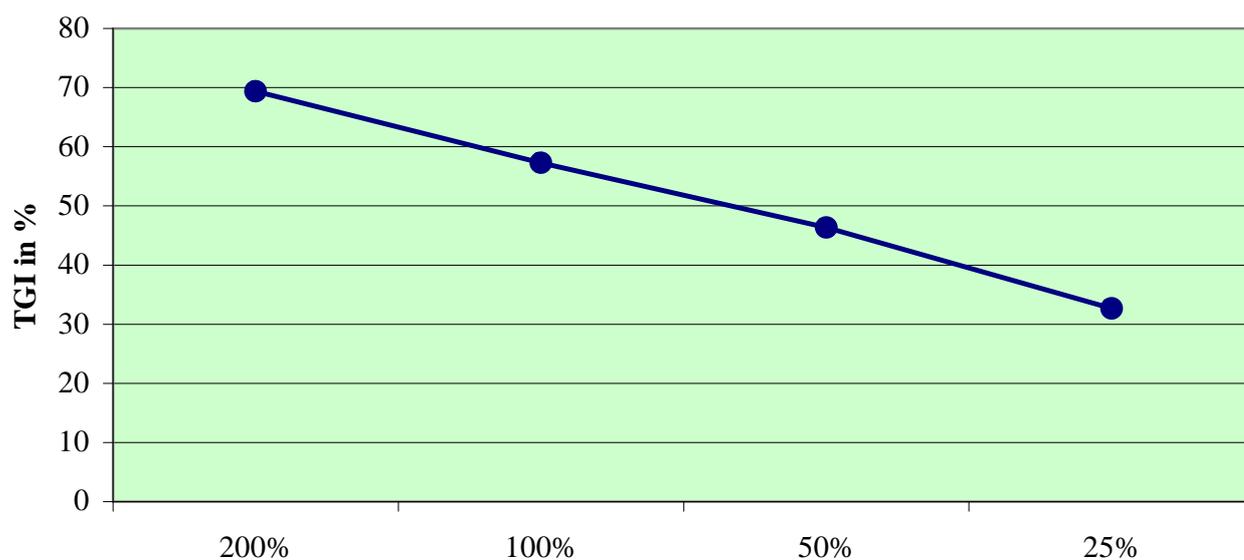


Abb. 3.6 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) von Cisplatin in %.

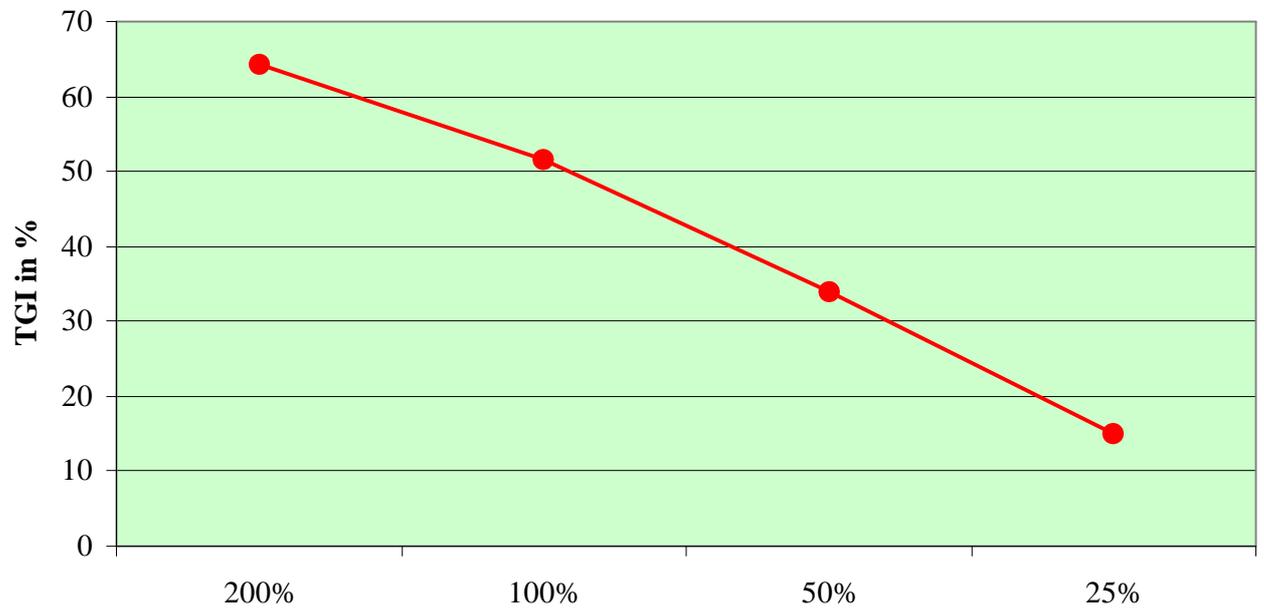


Abb. 3.7 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) von 5-Fluorouracil in %.

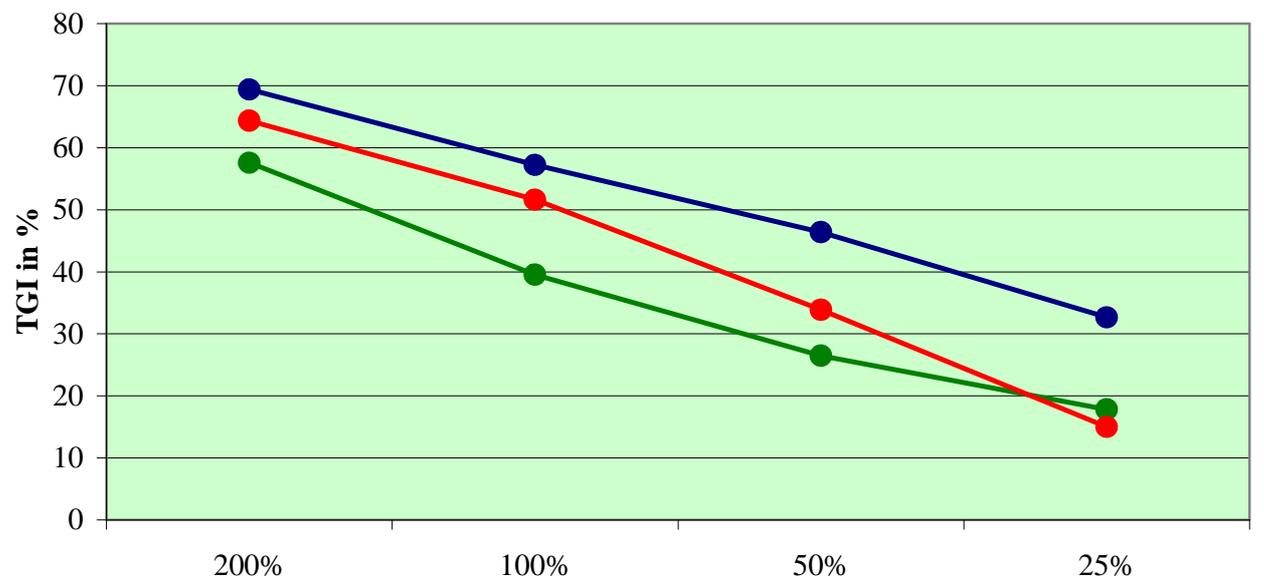


Abb. 3.8 Konzentrationsabhängige vergleichende Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika: ■ Carboplatin, ■ Cisplatin und ■ 5-Fluorouracil (n= 16).

Im Vergleich der drei getesteten Zytostatika ließ sich mit Cisplatin die stärkste Wachstumshemmung erzielen. Es ergaben sich TGI-Werte zwischen 32,7% und 69,4%. Dabei war im Bereich der getesteten Konzentrationen zwischen 25 und 200 % ein annähernd linearer Zusammenhang feststellbar: Ein Verdoppelung der Konzentration verbesserte die Wachstumshemmung um etwa 10 Prozent (Abb. 3.8).

Ähnlich verhielten sich 5-Fluorouracil und Carboplatin. Insgesamt war die Wirksamkeit dieser Zytostatika etwas geringer als bei Cisplatin.

Alle Tumorzellen zeigten sich gegenüber den Zytostatika Cisplatin, 5-Fluorouracil und Carboplatin als sensibel.

3.2 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung bei Primärtumoren und Rezidiven

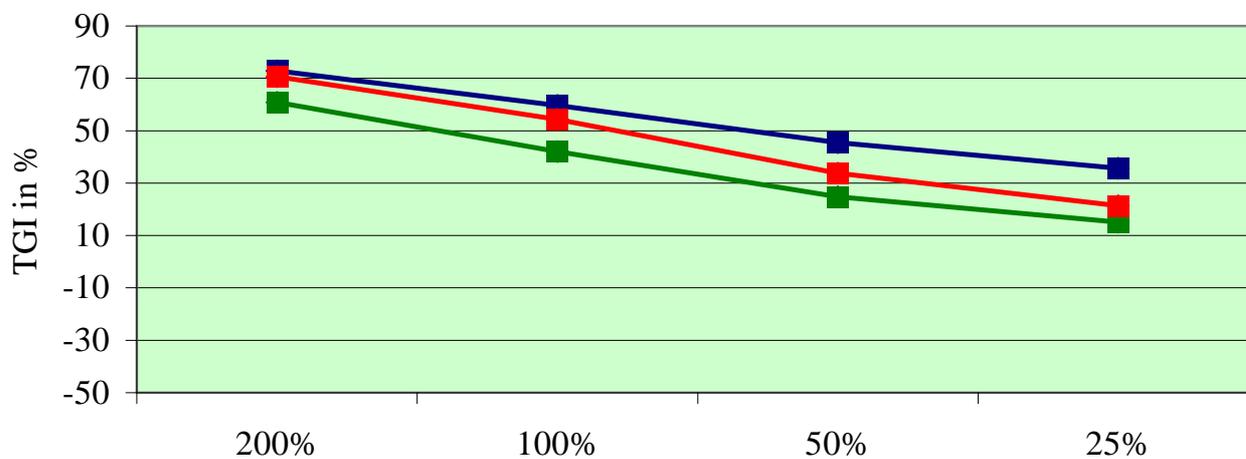


Abb. 3.9 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 g Cisplatin, g Carboplatin und g 5-Fluorouracil bei Primärtumoren (n= 12).

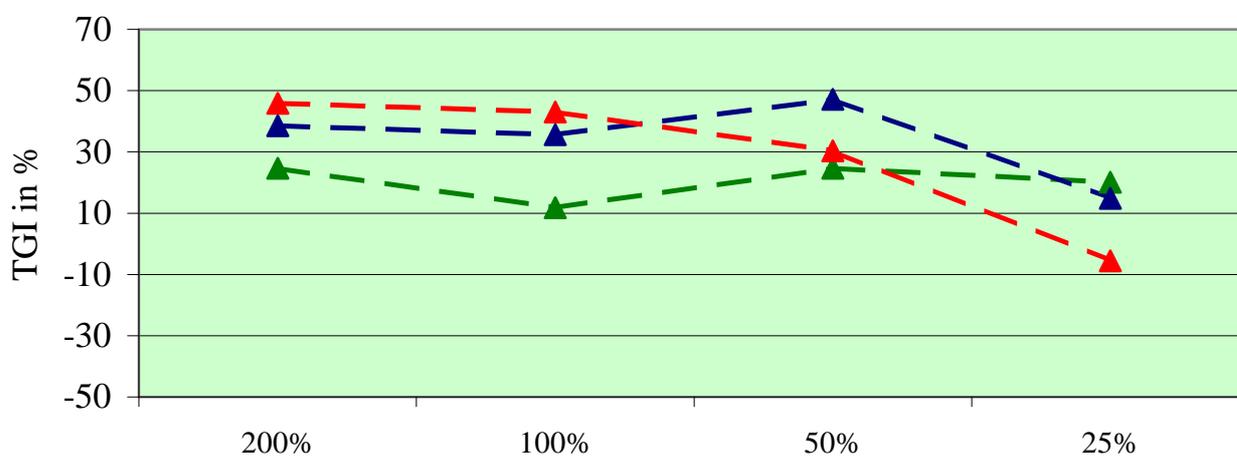


Abb. 3.10 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 p Cisplatin, p Carboplatin und p 5-Fluorouracil bei Rezidiven (n= 4).

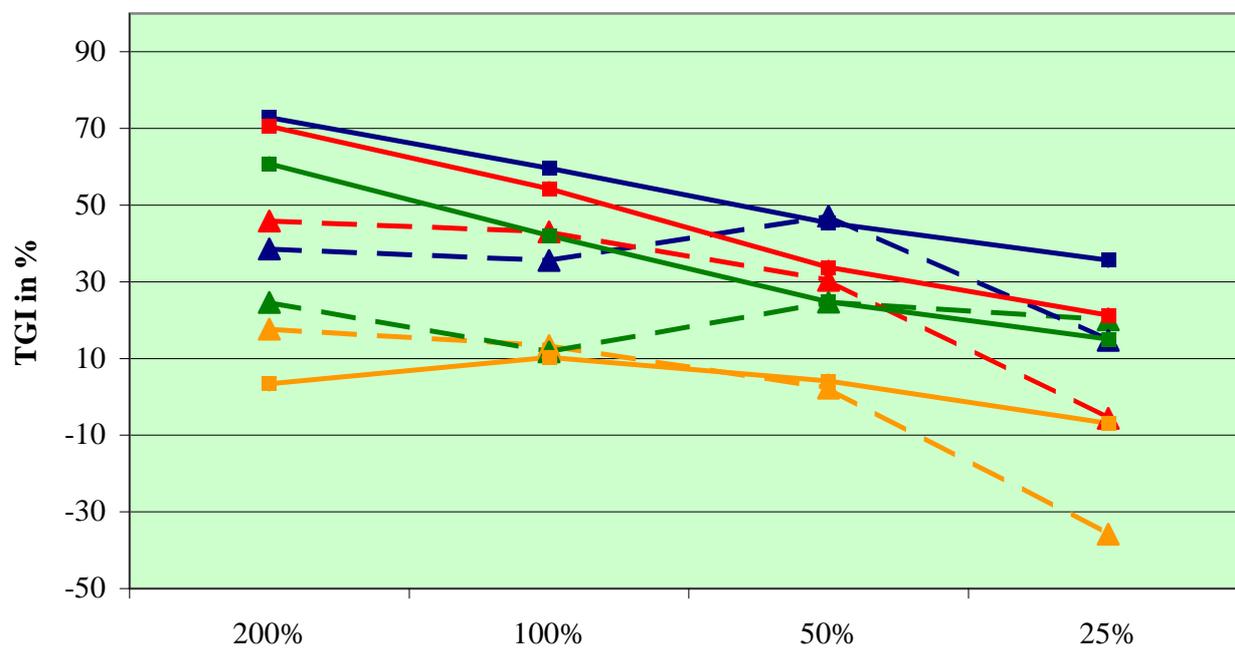


Abb. 3.11 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 g Ifosfamid, g Cisplatin, g Carboplatin und g 5-Fluorouracil bei Primärtumoren (n= 12);
 p Ifosfamid, p Cisplatin, p Carboplatin und p 5-Fluorouracil bei Rezidiven (n= 4).

Vergleicht man die Wachstumshemmung zwischen Primärtumoren und Rezidiven so zeigt sich, dass – von Ifosfamid als Negativ-Kontrolle abgesehen – Proben von Primärtumoren sensibler als Rezidive auf die getesteten Zytostatika reagieren (Abb. 3.11).

Die Tumorproben beider Vergleichsgruppen zeigen Resistenz gegenüber Ifosfamid.

3.3 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung von Patientinnen mit und ohne Diabetes mellitus

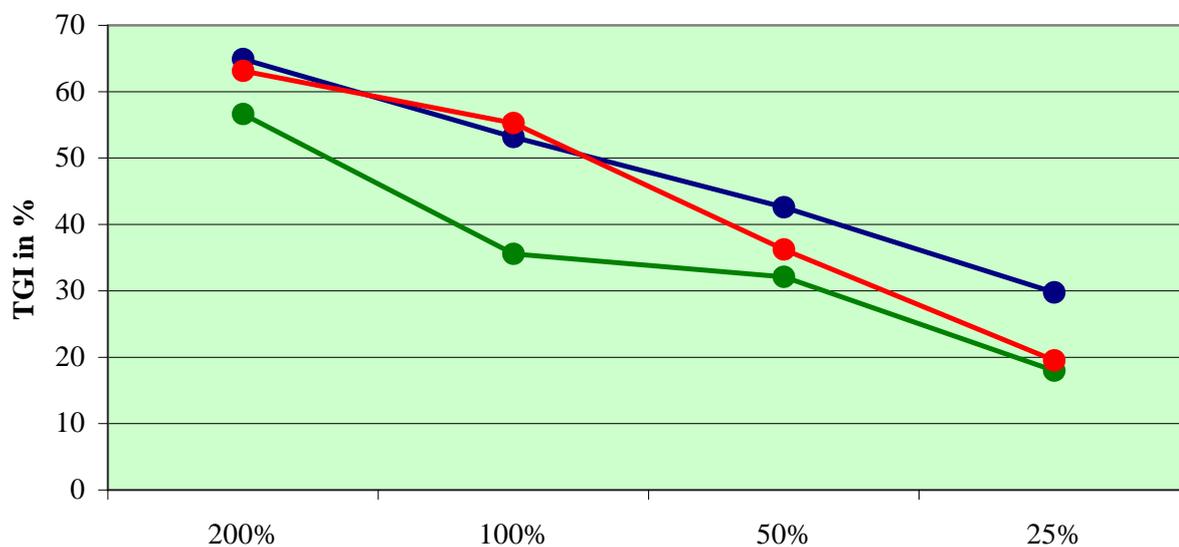


Abb. 3.12 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 n Cisplatin, n Carboplatin und n 5-Fluorouracil bei Proben von Patientinnen ohne Diabetes mellitus
 (n= 13).

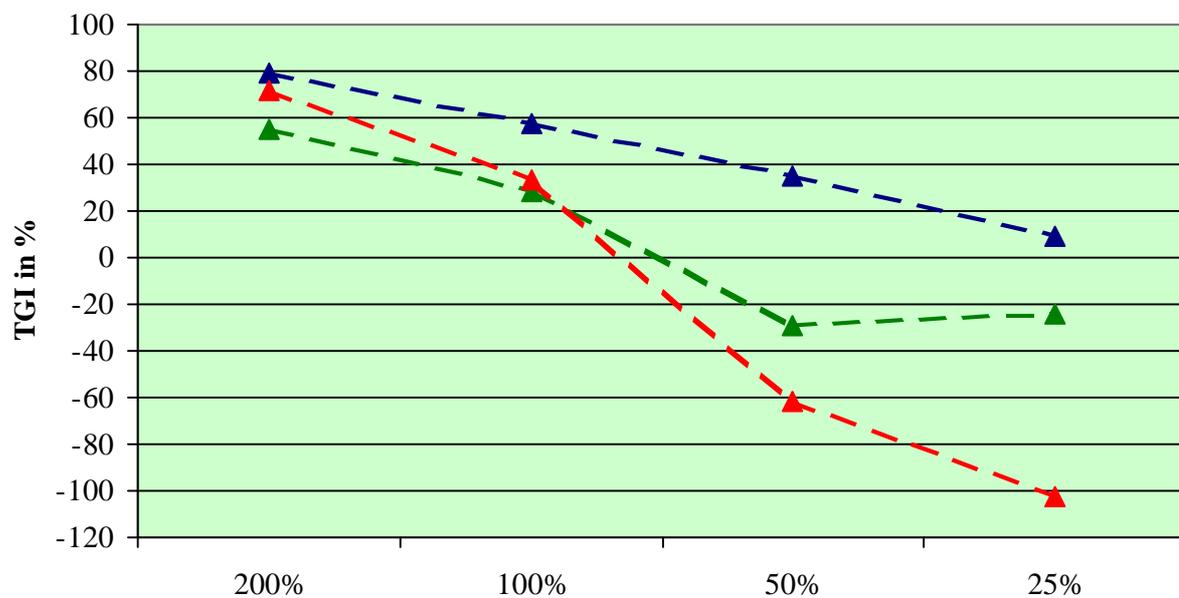


Abb. 3.13 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 p Cisplatin, p Carboplatin und p 5-Fluorouracil bei Proben von Patientinnen mit Diabetes mellitus
 (n= 3).

Von den 16 Patientinnen, deren Tumorproben auf Chemosensitivität hin untersucht wurden, hatten 3 Patientinnen einen insulinpflichtigen Diabetes mellitus.

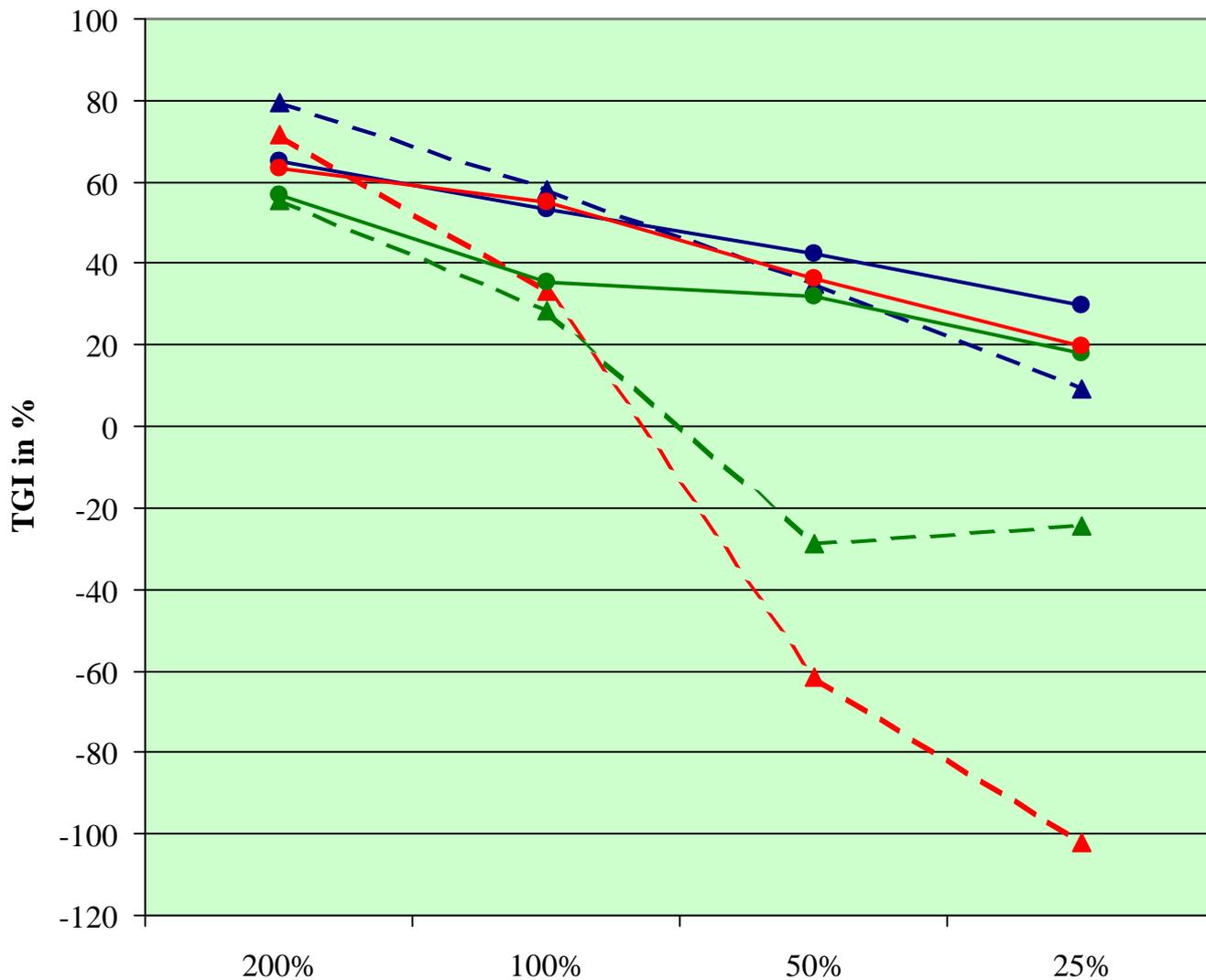


Abb. 3.14 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 n Cisplatin, n Carboplatin und n 5-Fluorouracil ohne Diabetes mellitus (n= 13);
 p Cisplatin, p Carboplatin und p 5-Fluorouracil bei Proben von Patientinnen mit Diabetes mellitus (n= 3).

Vergleicht man die Mittelwerte beider Klientel, so zeigt sich, dass bei Patientinnen mit Diabetes mellitus, sich eine stärkere Wachstumshemmung findet (Abb. 3.14).

Cisplatin, Carboplatin und 5-Fluorouracil zeigten Sensitivität.

Dabei konnten deutlich stärkere Wachstumshemmungen bei 100% und 200% Zytostatikakonzentration von Cisplatin, bei Proben von Patientinnen mit Diabetes mellitus, festgestellt werden. Hierbei ergaben die TGI- Werte 58% bzw. 79%. Die errechneten TGI- Werte der Vergleichsgruppe von Patientinnen ohne Diabetes mellitus ergaben 53% bzw. 65%.

Carboplatin zeigte bei hoher Zytostatikakonzentration annähernd gleiche Wachstumshemmung beider Vergleichsgruppen.

Das Zytostatikum 5-Fluorouracil bewirkte bei 200% iger Konzentration eine stärkere Wachstumshemmung um 8% bei Proben von Patientinnen mit Diabetes mellitus.

3.4 Wachstumshemmung in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors

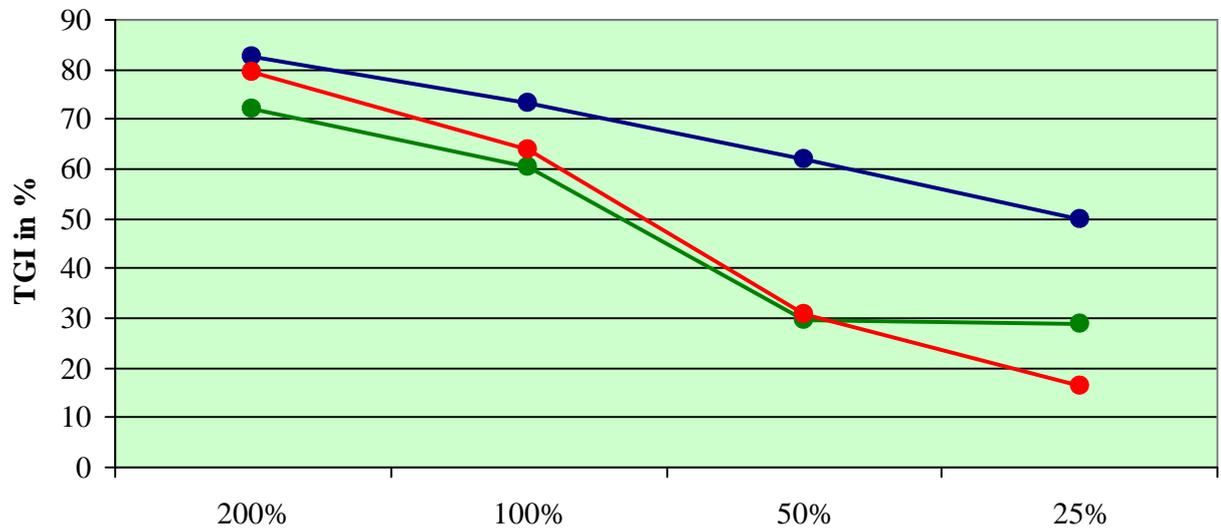


Abb. 3.15 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 n Cisplatin, n Carboplatin und n 5-Fluorouracil bei gut (G1) differenzierten Tumoren (n= 10).

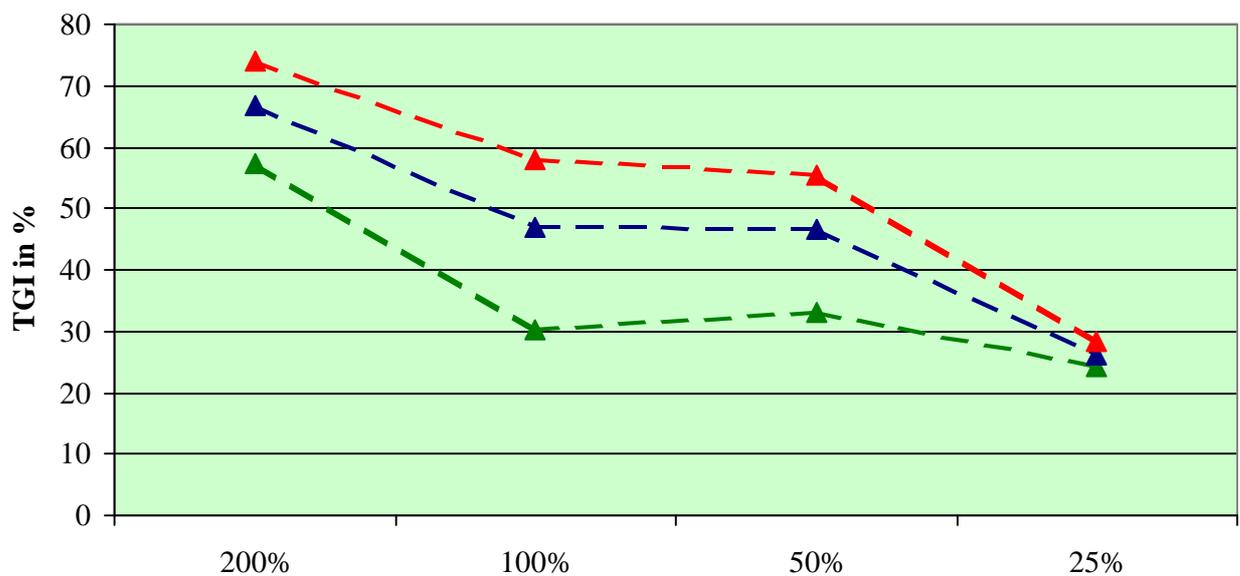


Abb. 3.16 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 p Cisplatin, p Carboplatin und p 5-Fluorouracil bei schlecht (G3) differenzierten Tumoren (n= 6).

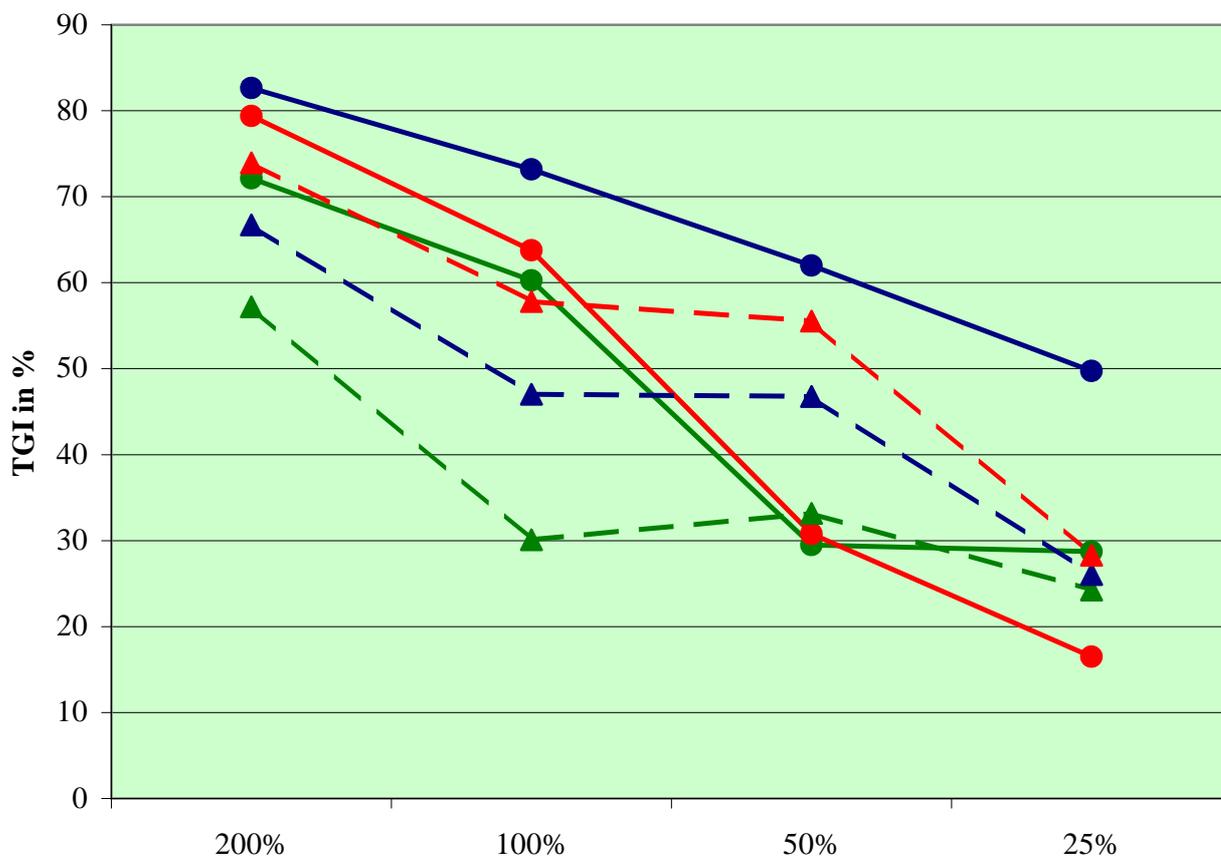


Abb. 3.17 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika

n Cisplatin, n Carboplatin und r 5-Fluorouracil bei gut differenzierten Tumoren G1 (n= 10);

p Cisplatin, p Carboplatin und r 5-Fluorouracil bei schlecht differenzierten Tumoren G3 (n= 6).

Bei dem Vergleich der Wachstumshemmung gut und schlecht differenzierter Tumoren

(Abb. 3.17) zeigten alle Tumorproben Chemosensitivität. Dabei ergab sich, dass im Bereich hoher Konzentrationen, besonders bei 100 %-igen Lösungen, die Wirkung auf gut differenzierte Tumoren stärker war. Bei niedrigen Konzentrationen von 5-Fluorouracil und Carboplatin war die Wachstumshemmung von gut und schlecht differenzierten Tumoren jeweils ähnlich.

3.5 Einfluss des Rauchens auf die Wachstumshemmung

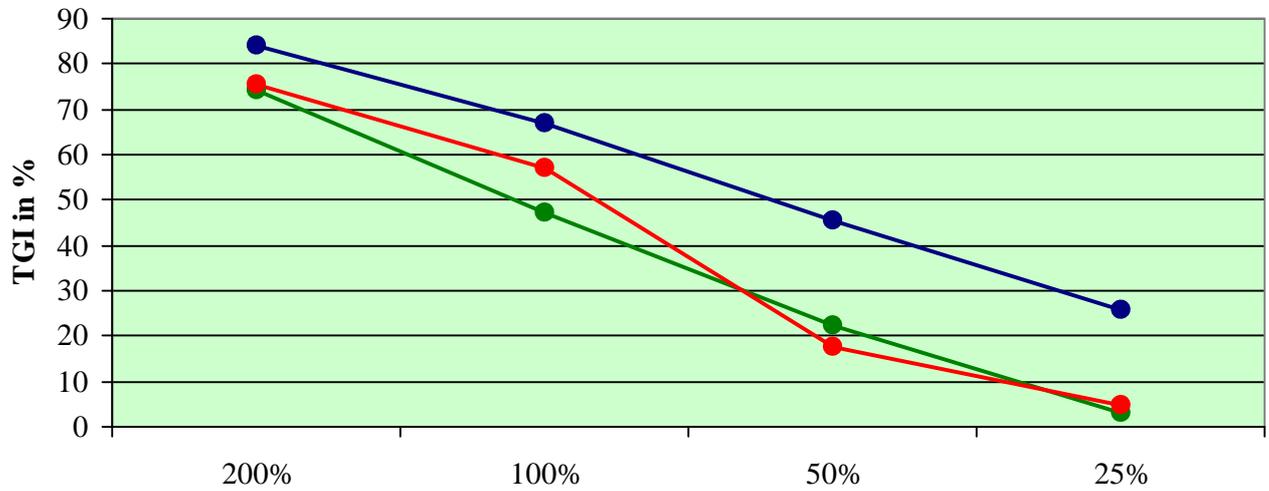


Abb. 3.18 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika :
 n Cisplatin n Carboplatin n 5-Fluorouracil bei nicht rauchenden Patientinnen (n= 9).

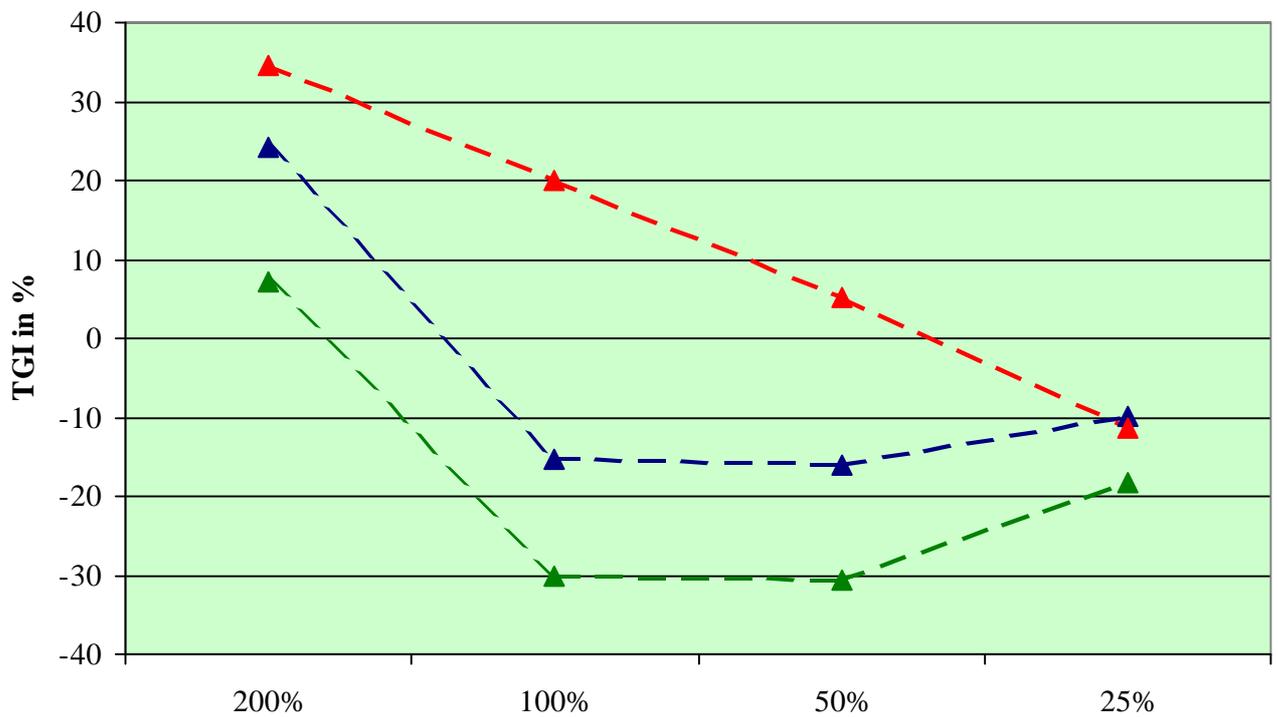


Abb. 3.19 Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika
 p Cisplatin, p Carboplatin, und p 5-Fluorouracil bei rauchenden Patientinnen (n= 7).

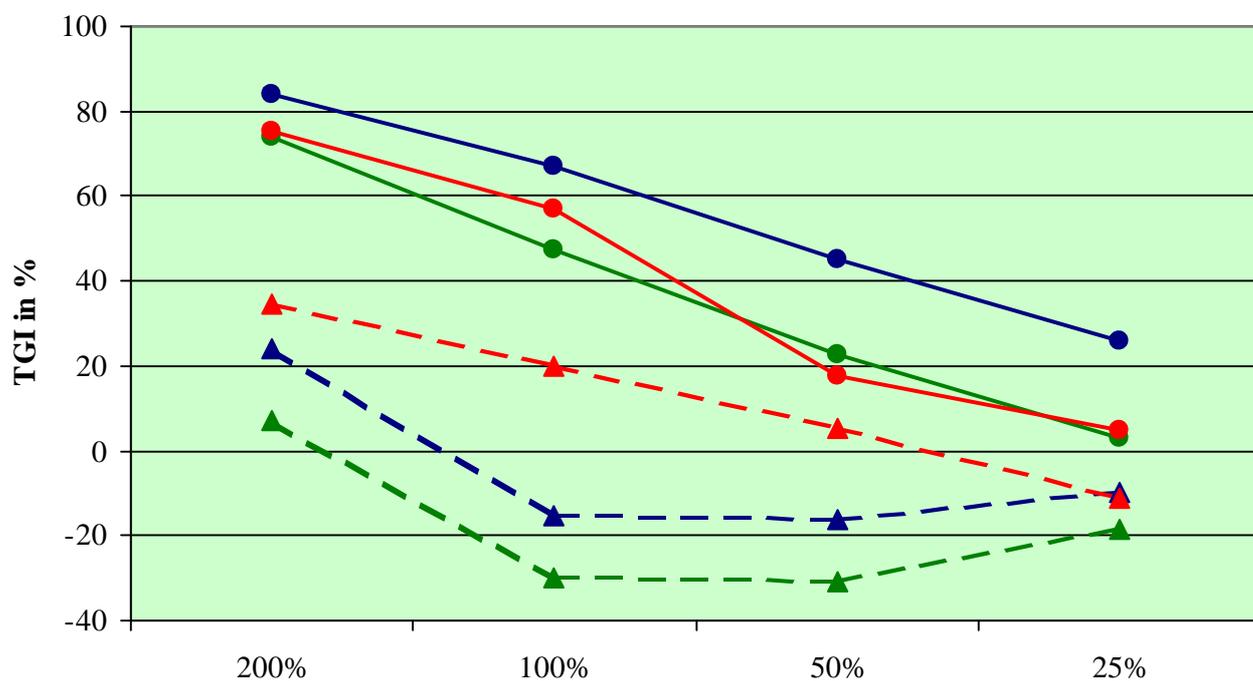


Abb. 3.20 Wachstumshemmung (TGI) der Zytostatika

n Cisplatin n Carboplatin n 5-Fluorouracil bei nicht rauchenden Patientinnen (n= 9),
 p Cisplatin p Carboplatin p 5-Fluorouracil bei rauchenden Patientinnen (n= 7).

Untersucht man den Einfluss des Rauchens auf das Zellwachstum bzw. die Wachstumshemmung durch Zytostatika, so zeigt ein Vergleich der Ergebnisse von Nichtraucherinnen eine intensivere Wachstumshemmung als die der Raucherinnen (Abb. 3.20).

4 Diskussion

4.1 Literaturübersicht

Chemotherapien gehören seit Jahrzehnten zur Standardtherapie bei der Behandlung von Karzinomen. In der Gynäkologie spielt die Chemotherapie besonders beim Ovarial- und Mamma-Karzinom eine entscheidende Rolle. Bei dem Versuch die insgesamt schlechten Ergebnisse beim Ovarial-Ca zu verbessern, wurde u.a. 1993 der Tumorsensitivitätstest entwickelt (2, 33, 39).

Es handelt sich bei diesem Test um ein seit Jahren etabliertes Verfahren zur Bestimmung von Sensitivität und Resistenz von Tumorzellen gegenüber Zytostatika (31,33, 34, 37, 38). Untersucht wurde insbesondere die Wirkung von Zytostatika beim Ovarialkarzinom (22, 33, 34, 38), um gegebenenfalls in Anlehnung an die Testung von Antibiotika eine gezielte und wirksame Therapie durchzuführen.

Während in Einzelfällen bei der Anwendung der in vitro erhaltenen Ergebnisse gute Erfolge erzielt wurden, ließen sich insbesondere beim Ovarialkarzinom die insgesamt schlechten Ergebnisse nur unwesentlich verbessern (22, 33, 34).

Positive Ergebnisse ergaben sich vor allem beim platinresistenten Rezidiv des Ovarialkarzinom, aber auch Rezidiven anderer Karzinome (20, 22).

Chemosensitivitätstestungen wurden ebenfalls bei anderen Malignomen wie z.B. Magen- und Ösophaguskarzinomen (26), Melanomen (37), sowie colorektalen Adenokarzinomen (42) durchgeführt und die Ergebnisse therapeutisch angewandt.

Insgesamt zeigt die alleinige Chemotherapie beim Kollum-Ca nur wenig Wirkung. Bessere therapeutische Ergebnisse lassen sich bei der Kombination mehrerer Zytostatika wie z.B. Cisplatin und Ifosfamid erzielen (7, 31). Ihre Indikation liegt vor allem beim Auftreten von Rezidiven und Metastasen. Dabei können Remissionsraten von 30-40 % erreicht werden.

4.2 Vergleich der eigenen Untersuchungen mit den Ergebnissen der Literatur.

Abgesehen vom Prodrug Ifosfamid zeigte sich in unseren Untersuchungen eine direkte Abhängigkeit des Zellwachstums von der Konzentration des Zytostatikums (Abb. 3.5-3.7).

Die Auswertungen der in-vitro-Messungen bestätigen die klinischen Erfahrungen, dass bei der zytostatischen Behandlung des Kollumkarzinoms Platinverbindungen an erster Stelle stehen, gefolgt von 5-Fluorouracil.

Weiterhin zeigt Cisplatin in der Testung, dass dieses in der gewählten und allgemein üblichen Äquivalentdosis von 1:3,5 eine deutlich stärkere Wirksamkeit als Carboplatin aufweist (32).

Dies entspricht der klinischen Erfahrung, dass beim Kollumkarzinom, das grundsätzlich als wenig chemosensibel gilt, im Allgemeinen mit Cisplatin die besseren Ergebnisse erzielt werden (31).

Bei der Beurteilung von Primärerkrankungen versus Rezidiv fällt auf, dass die Tumorzellen aus Rezidiven eine schlechtere Chemosensitivität aufweisen (Abb. 3.11). Eine Erklärung hierfür ergibt sich unter anderem dadurch, dass Rezidive oft in den zentralen hypoxischen Anteilen des Tumors entstehen, und es dort durch Genmutationen zur Entwicklung neuer Zelllinien kommen kann (10 17, 40).

Modernere Therapieverfahren ergeben oft eine bessere Prognose und Verträglichkeit der Zytostatika bei gleichzeitiger Gabe von Erythropoetin. Der Effekt beruht auf einer Vermehrung der Erythrozyten und somit einer erhöhten Sauerstoffversorgung des Gewebes (23, 40).

Die Chemosensitivitätstestung der Gewebeproben von Patientinnen mit und ohne Diabetes mellitus zeigt, dass die zwar nur wenigen Fälle erkrankter Frauen bei gleicher Zytostatikakonzentration eine bessere Wachstumshemmung aufweisen (Abb. 3.14).

Eine mögliche Erklärung ist die gestörte Glukoseverwertung der Zellen. Eventuell kommt es hier zu einer Veränderung der Insulinrezeptoren. Ungeklärt ist, ob eine up-down-Regulation bzw. zelluläre Transportmechanismen versagen oder sich verändern, sodass insgesamt der

Energieumsatz der Zellen minimiert ist. Dies könnte durch das geringere ATP-Angebot wiederum zu einer Einschränkung bekannter Reparationsmechanismen führen, so dass die Zellen auf jegliche Einwirkung toxischer Substanzen empfindlicher reagieren (6).

Der Vergleich der Ergebnisse der Chemosensitivitätstestung hoch und niedrig differenzierter Tumorzellen zeigt, dass gering differenzierte Zellen eine geringere Chemosensitivität aufweisen (Abb. 3.17). Das Ergebnis bestätigt die klinischen Erfahrungen, je entdifferenzierter das Ursprungsgewebe ist, umso autonomer und somit unempfindlicher wird dieses auf toxische Reize(6).

Ein Vergleich der Ergebnisse der Chemosensitivitätstestung von Raucherinnen und Nichtraucherinnen zeigt, dass Tumorzellen von Raucherinnen weniger chemosensibel sind (Abb. 3.20).

Dies wird durch zahlreiche Literaturverweise bestätigt (10, 13, 40).

Vor allem die im Rauch enthaltenen Benzpyrene werden nach Resorption in allen Organen durch Bioaktivierung (Hydroxylierung) in die karzinogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe überführt (6).

4.3 Kritische Beurteilung der eigenen Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Meine Ergebnisse beziehen sich auf eine Stichprobe von 16 Patientinnen. Um eine wissenschaftlich fundierte Aussage zu treffen, bedarf es nach statistischen Berechnungen, aus dem Institut für Medizinische Biometrie und Statistik, eines Patientenpools > 1000. Dies ist jedoch im Rahmen dieser Untersuchungen nicht durchführbar, sodass die Ergebnisse als Trend anzusehen sind.

Wie zu erwarten, zeigte das Prodrug Ifosfamid keine erkennbare Wirkung.

Ifosfamid ist ein Zytostatikum der Oxazaphosphoringruppe. Es ist chemisch mit Stickstofflost verwandt und ein synthetisches Analogon des Cyclophosphamids. Ifosfamid ist in vitro inaktiv und wird vorzugsweise in der Leber durch mikrosomale Enzyme, Cytochrom P450, aktiviert. Dabei wird die Substanz am C-4-Atom des Oxazaphosphorinringes hydroxyliert. Es entsteht der Primärmetabolit 4-Hydroxy-Ifosfamid ("aktiviertes Ifosfamid"), der mit seinem tautomeren Isoaldophosphamid im Gleichgewicht steht. Isoaldophosphamid zerfällt spontan in Acrolein und den alkylierenden Metaboliten (29, 41).

Isophosphamid-Lost. Acrolein wird für die urotoxischen Effekte von Ifosfamid verantwortlich gemacht. Diese Nebenwirkungen lassen sich durch die zeitgleiche Applikation von Mesna verhindern (41). Ein alternativer Metabolisierungsweg ist die Oxidation und Dealkylierung der Chlorethylseitenketten. Die zytotoxische Wirkung von Ifosfamid beruht auf einer Interaktion seiner alkylierenden Metaboliten mit DNS. Der bevorzugte Angriffspunkt sind die Phosphodiesterbrücken der DNS. Folge der Alkylierung sind Strangbrüche und Quervernetzungen der DNS. Im Zellzyklus wird eine Verlangsamung der Passage durch die G2-Phase verursacht. Die zytotoxische Wirkung ist nicht zellzyklusphasenspezifisch (29, 41).

Ifosfamid wurde in der Einzelauswertung (Abb. 3.1) als Negativkontrolle eingesetzt.

Wenn es dennoch zu einer nennenswerten Hemmung unter Ifosfamid gekommen wäre, so wäre dies ein Hinweis gewesen, dass das Plattenepithelkarzinom der Zervix uteri über mikrosomale Enzyme, Cytochrom P450, verfügt.

Den gleichen Hintergrund für den Einsatz von Ifosfamid ergab sich für eine evtl. abweichende Hemmwirkung bei Primärtumoren und Rezidiven (Abb. 3.11).

Cisplatin wird bei der kombinierten Radiochemotherapie des Kollum-Ca als Standardtherapeutikum eingesetzt. (31, 32). Die *in vitro* –Ergebnisse zeigen eine Wachstumshemmung in Abhängigkeit von der Konzentration des Zytostatikums. Von den ausgetesteten Zytostatika erzielt Cisplatin die größte Wachstumshemmung unter Zugrundelegung des maximalen therapeutischen Blutspiegels *in vivo* (Abb. 3.8).

Es fällt allerdings auch auf, dass in der *in-vitro* –Dosierung, die 200% der normalen maximalen Plasmakonzentration der *in-vivo*-Konzentration entspricht (31, 32), nur ca. 70% der Tumorzellen zerstört werden. Möglicherweise werden die restlichen 30% der Zellen durch das Chemotherapeutikum soweit geschädigt, dass eine weitere Teilung oder ein Wachstum nicht mehr möglich sind.

Nach dem Summationsdiagramm (Abb. 3.8) der drei Zytostatika, Carboplatin, Cisplatin und 5-Fluorouracil ergibt sich die Schlussfolgerung, dass bei den *in vitro*-Messungen das platinhaltige Medikament Cisplatin eine deutlich stärkere Wachstumshemmung aufweist als 5-Fu.

Die Untersuchungen von Primärkarzinomen (Abb. 3.9) und Rezidiven (Abb. 3.10) decken sich mit den klinischen Erfahrungen, dass Rezidive eine schlechtere Prognose aufweisen, insbesondere weniger chemosensibel sind als der Primärtumor (10, 17, 40).

Inwieweit bei meinen Untersuchungen die Prognose bei Patientinnen, die an Diabetes mellitus erkrankt sind, günstiger ist als bei gesunden Patientinnen, ist kritisch zu beurteilen (Abb. 3.14). Zum einen handelt es sich um eine sehr geringe Fallzahl von erkrankten Patientinnen (n=3), d.h. hohe Fehlerwahrscheinlichkeit. Zum anderen gibt es in der Literatur keinerlei

Hinweise, dass ein künstlich erzeugter Diabetes mellitus in Verbindung mit einer kombinierten Radio-Chemotherapie die Prognose verbessert. Daher müssten hier weitere Untersuchungen erfolgen, um sichere Aussagen treffen zu können.

Bei dem Vergleich des Differenzierungsgrades der Tumoren findet sich in der Chemosensitivitätstestung eine direkte Abhängigkeit von der Konzentration des Zytostatikums (Abb. 3.17), wobei gut differenzierte Tumoren klinisch im Allgemeinen eine bessere Prognose aufweisen (6). Gut differenzierte Tumoren erreichen bei mittleren und hohen Zytostatikakonzentrationen von Carboplatin eine größere Wachstumshemmung als entdifferenzierte.

Vergleicht man die Ergebnisse der Chemosensitivitätsmessung bei Geweben von Raucherinnen und Nichtraucherinnen so zeigt sich, dass Tumorzellen von Raucherinnen weniger chemosensibel sind (Abb. 3.20), was auch den klinischen Erfahrungen einer schlechteren Prognose entspricht (10, 13, 40).

Aussagekräftige in-vitro-Testungen erlauben zum einen, neue Medikamente, z.B. Taxane, zu erproben, zum anderen, hierdurch möglicherweise die Therapie eines Tumors zu optimieren.

Neuste Studien auf dem Gebiet der ex vivo -Chemosensitivität nativer Endometriumkarzinome belegen, dass sich mit dem ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay zeitsparende und rationell wirksame Chemotherapieregime entwickeln lassen (8).

Weitere aktuelle Untersuchungen mit dem ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay beschreiben bei der klinischen Anwendung der durch sie erhaltenen Ergebnisse eine günstigere therapeutische Prognose auch aus anderen Fachdisziplinen. So wurden unter anderem beim Magen- und Ösophaguskarzinom (26), bei Hauterkrankungen (37), sowie bei colorektalen Adenokarzi-

men (42) individuell, aber auch durch die Medikation von Kombinationen verschiedener Chemotherapeutika entsprechend den Ergebnissen der Chemosensitivitätstestung in Einzelfällen günstigere Ergebnisse berichtet.

Sicherlich liegt ein weiterer Vorteil in dem ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay, dass Tierversuche eingespart werden können, zumal deren Ergebnisse teilweise mit Vorbehalt zu werten sind, da Tiere auf Medikamente nicht immer die gleiche Reaktion zeigen wie der menschliche Organismus.

Gleichfalls sind moralethische Bedenken gegenüber Tierversuchen teilweise zu entkräften, da diese durch die Anwendung der Chemosensitivitätstestung auf ein notwendiges Maß reduziert werden können.

Grundsätzlich sollten aus den vorher genannten Gründen weitere Studien mit dem ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay durchgeführt werden, um die erzielten Ergebnisse in die Therapie einfließen zu lassen. Möglicherweise sind hierdurch wie in Einzelfällen beschrieben Verbesserungen der Prognose möglich (26, 42).

Unabhängig hiervon ist die Bedeutung der kombinierten Radio- Chemotherapie unbestritten. Zum Einsatz kommen vor allem Platinverbindungen wie Cisplatin und das nebenwirkungsärmere Carboplatin. Die Überlegenheit einer kombinierten Radiochemotherapie mit Cisplatin gegenüber einer alleinigen Bestrahlung wurde in jüngerer Zeit nachgewiesen (27, 31). Es wird angenommen, dass die Medikamente die Strahlensensibilität erhöhen, indem sie die Reparatur des geschädigten Tumorgewebes hemmen (1). Rose et al. (31) verglichen unterschiedliche Kombinationstherapien und konnten insbesondere beim Kollum-Ca die Wirksamkeit von platinhaltigen Zytostatika belegen. Ergänzend wird seit vielen Jahren beim Kollum-Ca Ifosfamid mit Erfolg eingesetzt.

Trotz der Verbesserung der Prognose bei der Primärbehandlung des Kollum-Ca mittels kombinierter Radio- Chemotherapie ist die Prognose bei Rezidiven oder progradientem Kollum-Ca, wie bei vielen anderen Karzinomen auch, trotz partiellem Ansprechens einer Zytostatikatherapie nach wie vor schlecht (31).

5 Zusammenfassung

Bei 16 Plattenepithelkarzinomen der Zervix uteri wurden Chemosensitivitätstestungen mit dem ATP-TCA-100 durchgeführt.

Getestet wurden die Zytostatika: Cisplatin, Carboplatin 5-Fluorouracil und als Negativkontrolle Ifosfamid.

Im Allgemeinen findet sich eine dosisabhängige Wirkung der Zytostatika. Nur Ifosfamid zeigt erwartungsgemäß keine erkennbare Wirkung.

Der Vergleich zwischen primären Plattenepithelkarzinomen (n=12) und Rezidiven (n=4) zeigt, dass Rezidive eine geringere Chemosensitivität aufweisen.

Die Gegenüberstellung der konzentrationsabhängigen Wachstumshemmung der Proben von Patientinnen mit (n=3) und ohne (n=)13) Diabetes mellitus zeigt, dass die Proben von Patientinnen mit Diabetes mellitus chemosensitiver sind.

Bei dem Vergleich der Wachstumshemmung in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad des Tumors ergab die Auswertung, dass die gut differenzierten Tumorzellen G1 (n=10) gegenüber schlecht differenzierter Tumorzellen G3 (n=6) deutlich chemosensitiver reagierten.

Der Einfluss des Rauchens auf die Wachstumshemmung durch Zytostatika bestätigt, dass die Gewebe von Nichtraucherinnen (n=9) eine intensivere Wachstumshemmung aufweisen als die der Raucherinnen (n=7).

Bezogen auf den maximalen therapeutischen Serumspiegel zeigt Cisplatin die stärkste Wirkung, was auch den klinischen Erfahrungen entspricht.

6 Literaturverzeichnis

1. Almendral AC, Szalmay G, Jochum L, Muller H: Pre-and early stages of cervical carcinoma. Diagnosis and treatment. *Fortschr Med* 92, 1009-1014 (1974)
2. Andreotti PE, Linder D, Hartmann DM, Cree IA, Pazzagli M, Bruckner HW. TCA-100 Tumor Chemosensitivity Assay: Differences in sensitivity between cultured tumor cell lines and clinical studies. *J Biolumin Chemilumin* 9, 373-378 (1994)
3. D'Anna R, Le Buanec H, Bizzini B, Burney A, Giannouli C, Zygyry JF, Gallo RC, Zagury D, D'Álessio P: Human papillomavirus-16-E7 oncoprotein enhances the expression of adhesion molecules in cervical endothelial cells but not in human umbilic vein endothelial cells. *J Hum Virol* 4, 85-95 (2001)
4. Bar JK, Markowska J, Harlozinska A, Sedlaczek P, Nowak M, Roszak A: Relation between infection with human papilloma viruses and expression p21 and p53 oncoproteins in patients with cancer of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 17, 183-185 (1996)
5. Berget A: Relation of dysplasia and carcinoma of the uterine cervix to age at onset sexual life and number of coital partners. *Dan Med Bull* 25, 172-176 (1978)
6. Böcker W, Denk H, Heitz Ph U: Pathologie. München, 6, 162, 180-181, 47, 958-959 (1997)
7. Bohm W: Current status of classification, diagnosis and therapy of the preliminary and early stages of cervix carcinoma. *Zentralbl Bakteriol* 91, 513-524 (1975)
8. Cramer EM, Hünseler MGM, Schäfer R, Cree IA, Warm M, Kurbacher CM, Mallmann P: Heterogenität der Ex Vivo Chemosensitivität nativer Endometriumkarzinome. *Arch Gynecol Obstet* 270, Suppl 1, 46 (2004)
9. Cree IAPazzagli M Mini E, Mazzei T, Hunter EMM, Sutherland LA, Pinzani P, Gerli A, Andreotti PE. Methotrexate chemosensitivity by ATP luminescence in human leukaemia cell lines and in breast cancer primary cultures: Comparison of the TCA-100 assay with a clonogenic assay. *Anti-Cancer Drugs* 6, 398-404 (1995)
10. Dachs GU, Tozer GM: Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 36, 1649-1660 (2000)

11. Frost O: Some aspects of the problem of carcinoma of the cervix in Zimbabwe. *Cent Afr J Med* 27, 169-171 (1981)
12. Girardi F: The role of coloscopy for cervix cancer prevention. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 33, 122-124 (1993)
13. Greenberg ER, Vessey M, Mc Pherson K, Yeates D: Cigarette smoking and cancer of the uterine cervix. *Br J Cancer* 51, 139-141 (1985)
14. Grussendorf-Conen EI, Ikenberg H, Gissmann L: Demonstration of HPV-16 genomes in the nuclei of cervix carcinoma cells. *Dermatologica* 170, 199-201 (1985)
15. Hennig EM, Nesland JM, Di Lonardo A, Venuti A: Multiple primary cancers and HPV infection: are they related? *J Exp Clin Cancer Res* 18, 53-54 (1999)
16. Horn LC, Bilek K: Cancer register for cervix carcinoma—useful and necessary? *Zentralbl Gynekol* 123, 311-314 (2001)
17. Husstedt W, Jenz R, Bauer O, Diedrich K: Gibt es in der Chemosensibilitätstestung des Kollumkarzinoms Unterschiede zwischen Primärtumor und Rezidiv. 117 Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe, 157(2001)
18. Kedzia H, Gozdicka-Jozefiak A, Wolna M, Tomczak E: Distribution of human papillomavirus 16 in the blood of women with uterine cervix carcinoma. *Eur J Gynaecol Oncol* 13, 522-526 (1992)
19. Knobler RM, Schneider S, Radlwimmer B, Bodemer W, Gebhart W, Soltz-Szots J: Human papillomavirus in cervix carcinoma and condylomata acuminata identification of HPV-DANN by improved dot-blot-hybridization. *Clin Exp Dermatol* 17, 392-396 (1992)
20. Köchli OR, Perras JP, Sevin BU: ATP-cell viability assay methodology in both fresh gynecologic tumors and cell lines. In: Köchli OR, Sevin BU, Haller U (Hrsg.): Chemosensitivity testing in gynecologic malignancies and breast cancer. *Contrib Gynecol Obstet* 19, 108-121 (1994)
21. Koenig UD: Cervix carcinoma as an immunological model. Part 2. In vitro studies and HLA system typing. *Fortschr Med* 14, 1727-1730 (1978)

22. Kurbacher CM, Grcu OM, Stier U, Gilster TJ, Janat MM, Untch M, Konecny G, Bruckner HW, Cree IA: ATP chemosensitivity testing in ovarian and breast cancer. *Early clinical Recent Results Cancer Res*; 161, 159-79. (2003)
23. Lavey RS, Liu PY, Greer BE, Robinson WR 3rd, Chang PC, Wynn RB, Conrad ME, Jiang C, Markmann M, Alberts DS: Recombinant human erythropoetin as an adjunct to radiation therapy and Cisplatin for stage IIB-IVA carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol Jun* 97, 980 (2005)
24. Le Buanec H, D'Anna R, Lachgar A, Zagury JF, Bernard J, Ittele D, d'Alessio P, Hallez S, Giannoulli C, Burny A, Bizzini B, Gallo RZ, Zagury D: HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. *Biomed Pharmacother* 53, 424-431 (1999)
25. Lorvidhaya V, Tonusin A, Changwiwit W, Chitapanarux I, Srisomboon J, Wanwilairat S, Chawapun N, Sukthomya V: High-dose-rate afterloading brachytherapy in carcinoma of the cervix: an experience of 1992 Patients *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 46, 1185-1191 (2000)
26. Mercer SJ, Somers SS, Knight LA, Whitehouse PA, Sharma S, Di Nicolantonio F, Glaysher S, Toh S, Cree IA, Portsmouth Upper GI Cancer Multi-Disciplinary Team. Heterogeneity of chemosensitivity of esophageal and gastric carcinoma. *Anticancer Drugs* 14, 397-403 (2003)
27. Morris M, Eifel PJ, Jiandong L, Grigsby PW, Levenback C, Stevens RE, Rotman M, Gershanson DM, Mutch DG: Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. *N Engl J Med* 340, 1137-1143 (1999)
28. Munoz N, Bosch FX, De Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Keerti VS, Snijders PJF; Meijer CJLM: Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med* 348, 518-527 (2003)
29. Mutschler E, Schäfer-Korting M: *Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart 7. Aufl 748-750 (1997)
30. Rock CL, Michael CW, Reynolds RK, Ruffin MT: Prevention of cervix cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 33, 169-185 (2000)

31. Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maimann MA, Clarke-Pearson DL, Insalaco S: Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* 340, 1144-1153 (1999)
32. Schmidt-Matthiesen H, Bastert G, Wallwiener D: Gynäkologische Onkologie. Diagnostik, Therapie und Nachsorge – auf der Basis der AGO-Leitlinie. Stuttgart 7. Aufl, 222 (2002)
33. Sevin BU, Perras JP, Averette HE, Donato D, Penalver M: Chemosensitivity testing in ovarian cancer. *Cancer* 71, 1613-1620 (1993)
34. Sharma S, Neale MH, Di Nicolantonio F, Knight LA, Whitehouse PA, Mercer SJ, Higgins BR, Lamont A, Osborne R, Hindley AC, Kurbacher CM, Cree IA: Outcome of ATP-based tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in heavily pre-treated recurrent ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 3, 19 (2003)
35. Southern SA, Herrington CS: Molecular events in uterine cervical cancer. *Sex transm Infect* 74, 229-40 (1998)
36. Terris M, Wilson F, Nelson JH Jr.: Comparative epidemiology of invasive carcinoma of the cervix, carcinoma in situ, and cervical dysplasia. *AM J Epidemiol* 112, 253-257 (1980)
37. Ugurel S, Tilgen W, Reinhold U: Chemosensitivity testing in malignant melanoma. *Recent Results Cancer Res* 161, 81-92 (2003)
38. Untch M, Ditsch N, Langer E, Kurbacher C, Crohns C, Konecny G, Kahlert S, Bauerfeind I, Hepp H. Chemosensitivity testing in gynecologic oncology—dream or reality? *Recent results cancer Res* 161,146-58 Review (2003)
39. Untch M, Sevin BU: Evaluation of new drugs and combinations in gynecologic tumors and cancer cell lines with the ATP-cell viability assay. In: Köchli OR, Sevin BU, Haller U (Hrsg.): Chemosensitivity testing in gynecologic malignancies and breast cancer. *Contrib Gynecol Obstet* 19, 145-155 (1994)
40. Vaupel P, Kelleher DK: Tumor Hypoxia: Pathophysiology, Clinical Significance and Therapeutic Perspectives. Stuttgart (1999)
41. Wagner T: Ifosfamide. *Clin Pharmacokinet* 26, 439-456 (1994)

42. Whitehouse PA, Knight LA, Di Nicolantonio F, Mercer SJ, Sharma S, Cree IA:
Portsmouth Colorectal Cancer Multidisciplinary Team. Hetrogeneity of chemosensitivity of colorectal adenocarcinoma determined by a modified ex vivo ATP-tumor chemosensitivity assay (ATP-TCA). *Anticancer Drugs* 14, 369-75 (2003)

7 Anhang

Tab. 1.1: Einzelwerte der ATP-Messung bei Ifosfamid.

| Code-Nr. | M0 (ohne Zytostatikum) | Mi (Max. Zytostatikakonzentration) | Mi200 (entspricht 200% Zytostatikakonzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatikakonzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatikakonzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatikakonzentration) |
|----------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| C5/95 | 2030356 | 45832 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C9/95 | 149578 | 921 | 116879 | 96041 | 142093 | 175952 |
| C12/95 | 71981 | 429 | 68611 | 67031 | 68308 | 83088 |
| C1/96 | 1444 | 439 | 1891 | 1538 | 1528 | 1594 |
| C2/96 | 3938 | 261 | 2317 | 2298 | 2477 | 2628 |
| C3/96 | 2366 | 195 | 2568 | 2713 | 2474 | 4933 |
| C4/96 | 1205 | 220 | 958 | 813 | 819 | 862 |
| C3/97 | 13700 | 79 | 5094 | 6836 | 8277 | 9805 |
| C4/97 | 220955 | 647 | 225282 | 185479 | 145545 | 129880 |
| C7/97 | 3100 | 162 | 4327 | 4128 | 3903 | 3816 |
| C8/97 | 1906 | 508 | 1571 | 1739 | 2861 | 3998 |
| C10/97 | 568943 | 675 | 816777 | 800505 | 794915 | 778593 |
| C11/97 | 38000 | 145 | 38402 | 35074 | 28055 | 23435 |
| C12/97 | 10134 | 194 | 9357 | 11218 | 11107 | 12209 |
| C13/97 | 6378 | 89 | 6437 | 6016 | 8138 | 7494 |
| C15/97 | 3661 | 82 | 2018 | 1641 | 1759 | 1982 |

Tab. 1.2: Prozentuale TGI-Berechnung der Ifosfamid-Einzelwerte.

| Code-Nr. | Mi200 (entspricht 200% Zytostatikakonzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatikakonzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatikakonzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatikakonzentration) |
|------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| C5/95 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| C9/95 | 22,00% | 36,01% | 5,04% | -17,74% |
| C12/95 | 4,71% | 6,92% | 5,13% | -15,52% |
| C1/96 | -44,48% | -9,35% | -8,36% | -14,93% |
| C2/96 | 44,08% | 44,60% | 39,73% | 35,63% |
| C3/96 | -9,30% | -15,98% | -4,97% | -118,24% |
| C4/96 | 25,08% | 39,80% | 39,19% | 34,82% |
| C3/97 | 63,18% | 50,39% | 39,81% | 28,60% |
| C4/97 | -1,96% | 16,10% | 34,23% | 41,34% |
| C7/97 | -41,76% | -34,99% | -27,33% | -24,37% |
| C8/97 | 23,96% | 11,95% | -68,31% | -149,64% |
| C10/97 | -43,61% | -40,75% | -39,77% | -36,89% |
| C11/97 | -1,06% | 7,73% | 26,27% | 38,48% |
| C12/97 | 7,82% | -10,91% | -9,79% | -20,88% |
| C13/97 | -0,94% | 5,76% | -27,99% | -17,75% |
| C15/97 | 45,91% | 56,44% | 53,14% | 46,91% |
| Mittelwert | 6,24% | 10,91% | 3,74% | -12,68% |

Tab. 2.1: Einzelwerte der ATP-Messung bei Carboplatin.

| Code-Nr. | M0 (ohne Zytostatikum) | Mi (Max. Zytostatikakonzentration) | Mi200 (entspricht 200% Zytostatikakonzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatikakonzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatikakonzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatikakonzentration) |
|----------|------------------------|------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| C5/95 | 2030356 | 45832 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C9/95 | 149578 | 921 | 65523 | 98180 | 140016 | 177720 |
| C12/95 | 71981 | 429 | 11550 | 51396 | 66148 | 65727 |
| C1/96 | 1444 | 439 | 737 | 1404 | 1127 | 1329 |
| C2/96 | 3938 | 261 | 1285 | 1722 | 2854 | 2882 |
| C3/96 | 2366 | 195 | 1177 | 1510 | 2916 | 2632 |
| C4/96 | 1205 | 220 | 266 | 345 | 593 | 1089 |
| C3/97 | 13700 | 79 | 2115 | 4798 | 6834 | 7413 |
| C4/97 | 220955 | 647 | 78173 | 68471 | 59612 | 63512 |
| C7/97 | 3100 | 162 | 1059 | 2112 | 2629 | 2716 |
| C8/97 | 1906 | 508 | 1514 | 826 | 2268 | 1709 |
| C10/97 | 568943 | 675 | 839876 | 798826 | 799931 | 727718 |
| C11/97 | 38000 | 145 | 11813 | 20499 | 19779 | 16050 |
| C12/97 | 10134 | 194 | 2052 | 4486 | 7306 | 8033 |
| C13/97 | 6378 | 89 | 6724 | 7379 | 1681 | 3084 |
| C15/97 | 3661 | 82 | 589 | 1988 | 1503 | 4051 |

Tab. 2.2: Prozentuale TGI-Berechnung der Carboplatin-Einzelwerte.

| Code-Nr. | Mi200 (entspricht 200% Zytostatikakonzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatikakonzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatikakonzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatikakonzentration) |
|------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| C5/95 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| C9/95 | 56,54% | 34,57% | 6,43% | -18,93% |
| C12/95 | 84,46% | 28,77% | 8,15% | 8,74% |
| C1/96 | 70,35% | 3,98% | 31,54% | 11,44% |
| C2/96 | 72,15% | 60,27% | 29,48% | 28,72% |
| C3/96 | 54,77% | 39,43% | -25,33% | -12,25% |
| C4/96 | 95,33% | 87,31% | 62,13% | 11,78% |
| C3/97 | 85,05% | 65,35% | 50,41% | 46,16% |
| C4/97 | 64,81% | 69,21% | 73,24% | 71,46% |
| C7/97 | 69,47% | 33,63% | 16,03% | 13,07% |
| C8/97 | 28,04% | 77,25% | -25,89% | 14,09% |
| C10/97 | -47,68% | -40,45% | -40,65% | -27,94% |
| C11/97 | 69,18% | 46,23% | 48,13% | 57,98% |
| C12/97 | 81,31% | 56,82% | 28,45% | 21,14% |
| C13/97 | -5,50% | -15,92% | 74,69% | 52,38% |
| C15/97 | 85,83% | 46,74% | 60,30% | -10,90% |
| Mittelwert | 57,61% | 39,55% | 26,47% | 17,80% |

Tab. 3.1: Einzelwerte der ATP-Messung bei Cisplatin.

| Code-Nr. | M0 (ohne Zytostatikum) | Mi (Max. Zytostatika Konzentration) | Mi200 (entspricht 200% Zytostatika-Konzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatika-Konzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatika-Konzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatika-Konzentration) |
|----------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| C5/95 | 2030356 | 45832 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| C9/95 | 149578 | 921 | 51053 | 80815 | 109834 | 144281 |
| C12/95 | 71981 | 429 | 2098 | 22887 | 42955 | 64290 |
| C1/96 | 1444 | 439 | 951 | 756 | 1194 | 1084 |
| C2/96 | 3938 | 261 | 900 | 1247 | 1659 | 2109 |
| C3/96 | 2366 | 195 | 1012 | 1163 | 2081 | 2638 |
| C4/96 | 1205 | 220 | 145 | 211 | 341 | 631 |
| C3/97 | 13700 | 79 | 1492 | 3864 | 6064 | 9287 |
| C4/97 | 220955 | 647 | 3596 | 28230 | 34434 | 28495 |
| C7/97 | 3100 | 162 | 906 | 1950 | 2636 | 2884 |
| C8/97 | 1906 | 508 | 766 | 796 | 763 | 890 |
| C10/97 | 568943 | 675 | 773544 | 780697 | 768703 | 767062 |
| C11/97 | 38000 | 145 | 10604 | 20887 | 20678 | 15838 |
| C12/97 | 10134 | 194 | 1921 | 4235 | 6207 | 8608 |
| C13/97 | 6378 | 89 | 5450 | 5387 | 1271 | 3732 |
| C15/97 | 3661 | 82 | 189 | 627 | 1127 | 1387 |

Tab. 3.2: Prozentuale TGI-Berechnung der Cisplatin-Einzelwerte.

| Code-Nr. | Mi200 (entspricht 200% Zytostatika-Konzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatika-Konzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatika-Konzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatika-Konzentration) |
|------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| C5/95 | 0,00% | 0,00% | 0,00% | 0,00% |
| C9/95 | 66,28% | 46,26% | 26,74% | 3,56% |
| C12/95 | 97,67% | 68,61% | 40,57% | 10,75% |
| C1/96 | 49,05% | 68,46% | 24,88% | 35,82% |
| C2/96 | 82,62% | 73,18% | 61,98% | 49,74% |
| C3/96 | 62,37% | 55,41% | 13,13% | -12,53% |
| C4/96 | 107,61% | 100,91% | 87,72% | 58,27% |
| C3/97 | 89,63% | 72,21% | 56,06% | 32,40% |
| C4/97 | 98,66% | 87,48% | 84,66% | 87,36% |
| C7/97 | 74,68% | 39,14% | 15,79% | 7,35% |
| C8/97 | 81,55% | 79,40% | 81,76% | 72,68% |
| C10/97 | -36,00% | -37,26% | -35,15% | -34,86% |
| C11/97 | 72,37% | 45,21% | 45,76% | 58,54% |
| C12/97 | 82,63% | 59,35% | 39,51% | 15,35% |
| C13/97 | 14,76% | 15,76% | 81,21% | 42,07% |
| C15/97 | 97,01% | 84,77% | 70,80% | 63,54% |
| Mittelwert | 69,39% | 57,26% | 46,36% | 32,67% |

Tab. 4.1: Einzelwerte der ATP-Messung bei 5-Fluorouracil.

| Code-Nr. | M0 (ohne Zytostatikum) | Mi (Max. Zytostatika-Konzentration) | Mi200 (entspricht 200% Zytostatika-Konzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatika-Konzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatika-Konzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatika-Konzentration) |
|----------|------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| C5/95 | 2030356 | 45832 | 929444 | 1326175 | 1338699 | 1956898 |
| C9/95 | 149578 | 921 | | | | |
| C12/95 | 71981 | 429 | 8221 | 43883 | 62870 | 83754 |
| C1/96 | 1444 | 439 | 535 | 552 | 962 | 1084 |
| C2/96 | 3938 | 261 | 1019 | 1593 | 2806 | 3331 |
| C3/96 | 2366 | 195 | 989 | 766 | 2781 | 2642 |
| C4/96 | 1205 | 220 | 731 | 942 | 830 | 914 |
| C3/97 | 13700 | 79 | 2125 | 3623 | 7550 | 10689 |
| C4/97 | 220955 | 647 | 2386 | 8034 | 8371 | 5553 |
| C7/97 | 3100 | 162 | 924 | 1293 | 2363 | 3447 |
| C8/97 | 1906 | 508 | 884 | 1152 | | |
| C10/97 | 568943 | 675 | 775900 | 796053 | 773867 | 719795 |
| C11/97 | 38000 | 145 | 9704 | 11382 | 18028 | 17462 |
| C12/97 | 10134 | 194 | 1540 | 4268 | 6525 | 9058 |
| C13/97 | 6378 | 89 | 5196 | 5133 | 1639 | 6866 |
| C15/97 | 3661 | 82 | 140 | 897 | | 2831 |

Tab. 4.2: Prozentuale TGI-Berechnung der 5-Fluorouracil-Einzelwerte.

| Code-Nr. | Mi200 (entspricht 200% Zytostatika-Konzentration) | Mi100 (entspricht 100% Zytostatika-Konzentration) | Mi50 (entspricht 50% Zytostatika-Konzentration) | Mi25 (entspricht 25% Zytostatika-Konzentration) |
|------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| C5/95 | 55,47% | 35,48% | 34,85% | 3,70% |
| C9/95 | | | | |
| C12/95 | 89,11% | 39,27% | 12,73% | -16,45% |
| C1/96 | 90,45% | 88,76% | 47,96% | 35,82% |
| C2/96 | 79,39% | 63,77% | 30,79% | 16,51% |
| C3/96 | 63,43% | 73,70% | -19,12% | -12,71% |
| C4/96 | 48,12% | 26,70% | 38,07% | 29,54% |
| C3/97 | 84,98% | 73,98% | 45,15% | 22,11% |
| C4/97 | 99,21% | 96,65% | 96,49% | 97,77% |
| C7/97 | 74,06% | 61,50% | 25,09% | -11,81% |
| C8/97 | 73,10% | 53,93% | | |
| C10/97 | -36,42% | -39,97% | -36,06% | -26,55% |
| C11/97 | 74,75% | 70,32% | 52,76% | 54,25% |
| C12/97 | 86,46% | 59,01% | 36,31% | 10,82% |
| C13/97 | 18,79% | 19,80% | 75,35% | -7,76% |
| C15/97 | 98,38% | 77,23% | | 23,19% |
| Mittelwert | 64,35% | 51,64% | 33,88% | 15,02% |

8 Danksagung

Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. med. W. Husstedt für die Vergabe des Dissertationsthemas, für Ermunterung und intensive sowie zeitaufwendige Unterstützung beim Heranreifen der Arbeit, herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. O. Bauer, ehemals leitender Oberarzt der Klinik, der leider viel zu früh verstorben ist, danke ich für wertvolle Hinweise und Anregungen.

Des Weiteren danke ich der medizinisch technischen Assistentin Frau Stehling für ihre tatkräftige Hilfe bei umfangreichen Laborarbeiten sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. physiol. H.-J. Friedrich und seinen Mitarbeitern vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik für die Unterstützung beim statistischen Teil der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Leif Dibbelt vom Institut für Klinische Chemie verdanke ich wertvolle Hinweise zur technischen Konzeption der Untersuchung.

Gleichfalls möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. K. Diedrich, Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, bedanken, der es mir ermöglichte, an seiner Klinik diese Untersuchungen durchzuführen.

Lebenslauf

Name: Rupert Jenz
 Geburtsdatum: 18.08.1958
 Geburtsort: Eutin
 Nationalität: Deutsch
 Konfession: evangelisch
 Heirat: 22.Mai 1987
 Ehefrau: Kristina Jenz
 geborene Bohnhoff

Schulbildung:
 Grundschule: 1964 – 1968 in Eutin
 Gymnasium: 1968 – 1971 in Eutin
 Internat 1971 – 1980 mit Abschluß der allgemeinen Hochschulreife

Bundeswehr: 1980 – 1981 7. Sanitätsbataillon in Hamburg-Harburg

Berufsausbildung: 1981 – 1983 Studium der Rechtswissenschaften in Hamburg
 1983 – 1985 Verkaufsfahrer einer Getränkefirma in Hamburg
 1985 – 1986 Umschulung zum Tischler beim BfW in Lübeck
 1986 Gesellenprüfung mit Abschluß
 1986 – 1991 Tätigkeit als Tischlergeselle
 1994 – 1995 AdA-Lehrgang mit Abschluß vor der Handwerkskammer Lübeck (Teilbereich der Meisterprüfung)

Medizinstudium: 1991 – 2002 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Lübeck
 02.12.2002 3.Staatsexamen mit der Erlaubnis für die Tätigkeit als Arzt im Praktikum (AiP)

Berufstätigkeit: 2003 – 2004 AIP Marienkrankenhaus in Lübeck
 August 2004 Vollapprobation als Arzt
 Seit 2005 Assistenzarzt Gyn. Sana-Klinik Oldenburg