

Aus der Neurochirurgische Klinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. H.D. Herrmann

Labor für Hirntumorbiologie: PD Dr. M. Westphal

**Carboplatin, Tamoxifen und Monoklonale Antikörper gegen EGFR
in der Behandlung des Glioblastoms in vitro und in vivo**

Dissertationsschrift

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

vorgelegt

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

von

Markus Grebe

aus Hamburg

Hamburg im Jahre 1998

gewidmet meiner Familie

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am: 08.11.1999

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg.

Sprecher: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. M. Westphal

Koreferent: Prof. Dr. H. D. Herrmann

Inhaltsverzeichnis:

1. Einführung	6
2. Methoden	
2.1. Zellkulturen	
2.1.1. Primärkulturen	12
2.1.2. Zellkulturlinien	12
2.1.2.1. Wachstumsexperiment in vitro	13
2.1.2.2. Wachstumsexperiment mit Carboplatin Behandlung	14
2.1.2.3. Wachstumsexperiment mit Tamoxifen Behandlung	15
2.1.2.4. Wachstumsexperiment mit EMD 55900 Behandlung	15
2.1.2.5. Kombination von Carboplatin und Tamoxifen	16
2.1.2.6. Kombination von Carboplatin und EMD 55900	17
2.1.2.7. Kombination von Tamoxifen und EMD 55900	17
2.1.2.8. Kombination von Tamoxifen und EMD 55900 und Carboplatin	18
2.2. Tiermodell	
2.2.1. In vivo Tumorlinie	19
2.2.1.1. In vivo Wachstum ohne Behandlung	20
2.2.1.2. In vivo Behandlung mit Carboplatin	20
2.2.1.3. In vivo Behandlung mit Tamoxifen	21
2.2.1.4. In vivo Behandlung mit EMD 55900	21
2.2.1.5. In vivo Behandlung mit Carboplatin und Tamoxifen	21
2.2.1.6. In vivo Behandlung mit Carboplatin und EMD 55900	22
2.2.1.7. In vivo Behandlung mit Tamoxifen und EMD 55900	22
2.3. Histologie	
2.3.1. Standardfärbung	23
2.3.2. Immunperoxidasefärbung (PAP)	23
2.3.2.1. Färbung mit EMD 55900	24
2.3.2.2. Färbung mit MIB 1 gegen Ki 67	24
2.3.2.3. Färbung mit Faktor VIII (v. Willebrand Faktor)	25
2.3.3. Immunfluoreszenzfärbung	25
2.3.4. Messung der Gefäßdichte	26

3. Ergebnisse	
3.1. Zellkultorexperiment	
3.1.1. Carboplatin in vitro	27
3.1.2. Tamoxifen in vitro	29
3.1.3. EMD 55900 in vitro	30
3.1.4. Kombination von Carboplatin und Tamoxifen in vitro	32
3.1.5. Carboplatin, Tamoxifen und EMD in vitro	34
3.2. Tierexperiment	
3.2.1. in vivo Wachstum mit Carboplatin, Tamoxifen und EMD 55900	36
3.2.3. in vivo Wachstum mit Carboplatin und Tamoxifen	38
3.3. Histologie und Zytologie	
3.3.1. in vitro Wachstumsmuster	40
3.3.2.1. in vivo Wachstumsmuster	42
3.3.2.2. Kapillardichte Bestimmung	44
3.3.2.3. MIB Index Bestimmung	47
4. Diskussion	50
5. Literaturnachweis	54
6. verwendete Abkürzungen	60
Danksagungen	62
Erklärung	63
Lebenslauf	64
tabellarischer Anhang	

1. Einführung

Gegenstand dieser Arbeit ist die zytostatische Behandlung des Glioblastoms. Ziel ist es, eine neue Substanzkombination für die Zytostatikatherapie bei diesem kaum erfolgreich zu behandelnden Tumor zu finden.

Gliome sind vom Hirnparenchym ausgehende Tumore, die etwa die Hälfte aller intrakraniellen Tumore ausmachen (Westphal, Hermann, 1992). Man kann die Hirntumore nach ihrem Ursprungsgewebe unterscheiden. Hirneigene Tumore gehen vom Hirnparenchym aus. Andere Tumore sind die der Hirnhäute, der Schädelkalotte und die große Gruppe der Hirnmetastasen. Glioblastome, nach der WHO Einteilung Grad IV, stellen meist die Endstufe der Progression von Astrozytomen (WHO Grad II und III) dar. Das Glioblastom sui generis ist ein Tumor des älteren Menschen und ist mit einem mittleren Überleben unter 12 Monaten behaftet..

Insgesamt sind die hirneigenen Tumore eine seltene Erkrankung. Man beobachtet deutliche Unterschiede in bezug auf Lebensalter und Häufigkeit der Tumore. Bei Kindern und Jugendlichen bis 21 Jahre treten Hirntumore im Zusammenhang mit der Bestrahlung bei Leukosen auf. Hier liegt die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bei 3/100.000 Kinder/Jahr. Bei Erwachsenen treten hirneigene Tumore zwar insgesamt häufiger auf, aber im Vergleich zu anderen malignen Tumorformen sind sie deutlich weniger zu finden. Die Inzidenz der Hirnmetastasen nimmt in den letzten Jahren zu, was durch eine erhebliche Lebenszeitverlängerung bei besserer onkologischer Therapie der Primärtumore bedingt ist. Neu ist die Zunahme der primären zerebralen Lymphome, die zum Teil auf HIV Infektionen und Langzeitimmunsuppression nach Organtransplantationen zurückzuführen sind. Die Inzidenz eines Hirntumors, also auch der Metastasen, wird in der Literatur mit 12-16/100.000 Einwohner pro Jahr angegeben.

Für die Entstehung der Hirntumore gibt es bis jetzt keine sicheren Risikofaktoren. Es gibt keine generelle Vererbbarkeit der Hirntumore, aber im Verlauf genetischer Krankheiten, wie der M. v. Recklinghausen, die tuberöse Sklerose und das Li-Fraumeni Syndrom, können Hirntumore gehäuft auftreten. Molekulargenetische Untersuchungen konnten in den letzten Jahren zeigen, daß der Verlust von p53, einem Tumorsuppressorgen, schon bei niedriggradigen Stufen beobachtet werden kann.

Klinisch auffällig werden Hirntumore durch ihre Infiltration oder Kompression von funktionellen Strukturen. Fokale neurologische Ausfälle, Krampfanfälle,

Wesensveränderungen, Hirndruckzeichen und Kopfschmerzen sind häufige Symptome. Besonders eine kurze Anamnese und eine rasche Progredienz der Symptome sind hochverdächtig auf einen rasch wachsenden Hirntumor. Die Primärdiagnostik erfolgt meist mit dem CCT, das durch seine breite Verfügbarkeit und die hohe Befundssicherheit für die Ausschlußdiagnostik geeignet und dadurch anderen Untersuchungsmethoden überlegen ist. Das MRT kann Tumore im Bereich der Sella, des Sinus Kaverosus und den Stammganglien besser darstellen. Häufig ergänzen sich CCT und MRT. Sie haben die zerebrale Angiographie zum Tumornachweis verdrängt. So kann die Operationsindikation gestellt werden. Wenn es Gründe gegen die primäre Operation gibt, kann unter Umständen eine stereotaktische Hirnbiopsie primäre Hirntumore von Metastasen abgrenzen. Daher erfolgt bei metastasenverdächtigen Raumforderungen eine Primärtumorsuche parallel zu Operation des symptomatisch gewordenen Hirntumors.

Am Beginn der etablierten und derzeit effektivsten Therapie des operablen Glioblastoms steht die chirurgische Intervention und die möglichst radikale Resektion des Tumors. Durch moderne mikrochirurgische Techniken und perioperatives Management konnte die Mortalität auf unter 5% gesenkt werden. Weiterhin ist eine Steigerung der operativen Radikalität durch intraoperative Neuronavigation und moderne bildgebende Verfahren möglich, aber das frühe infiltrative Wachstum des Tumors, die Nähe zu funktionell wichtigen Strukturen des Gehirns und die meist späte Diagnose in einem fortgeschrittenen Stadium, erschweren die Therapie und machen das Glioblastom nicht radikal entfernbar. Die proportional zum belassenen Tumorrest ansteigende Morbidität und damit sinkende Lebenserwartung und Lebensqualität, unterstreicht die prognostische Wertigkeit der operativen Radikalität.

Zum derzeitigen Standard gehört die adjuvante Strahlentherapie in einer Dosis von 54 Gy bis 60 Gy in 30 Einzeldosen. Einen gewissen Erfolg stellt die Therapie mit Nitrosoharnstoffen, besonders BCNU und ACNU, dar, die das Mittel der Wahl zur adjuvanten Chemotherapie sind (Westphal, 1992). Mit adjuvanten Therapien, wie Strahlentherapie und Chemotherapie, ist es jedoch bis jetzt nicht gelungen die mittlere Überlebenszeit deutlich zu verlängern. Im Experimentalstadium befinden sich derzeit weiterführende Therapien wie andere Chemotherapeutika, die Gentherapie und immunterapeutische Ansätze.

Die entscheidende Einflußgröße für die Überlebenszeit ist das histologische Grading, die erreichte operative Radikalität, das Alter und der Karnofky Index.

Eines der neueren Zytostatika ist das Carboplatin. Bei diesem Medikament konnten einerseits die Nebenwirkungen wie Neurotoxizität, Myelosuppression und Nephrotoxizität gesenkt

werden, andererseits ist Carboplatin äußerst effizient gegen Tumore (Elliot, 1994; Treskes, 1994). Cisplatin und Carboplatin sind Komplexverbindungen mit einem zentralen Platinatom. Intrazellulär bilden sie mit den Basen Guanin, Adenin und Cytosin kovalente Bindungen, die die DNA Stränge quervernetzen, ähnlich wie bifunktionelle Alkylantien. Sie sind in allen Zellzyklen wirksam und nicht an die S-Phase, die DNA Synthesephase, in der die meisten Zytostatika wirksam sind, gebunden. Alkylantien, Platinverbindungen und Pyrimidin-antagonisten wirken auch in der G₀ Phase des Zellzyklus, sie treffen also auch ruhende Tumorzellen.

Einen weiteren Vorteil in der Tumorthherapie stellt die gute Gewebegängigkeit des Carboplatins dar, da die Blut-Hirn Schranke zum Erreichen therapeutischer Konzentrationen intrazerebral, insbesondere im Tumorrandgebiet, überwunden werden muß. Im Bereich der atypischen Tumorgefäße kann das Zytostatikum seine Wirkung durch Diffusion in den Tumor gut entfalten. Weiterhin ist es möglich, die Blut-Hirn Schranke gezielt zu durchbrechen um so eine höhere intrazerebrale Konzentration zu erreichen (Williams, 1995).

Carboplatin und seine Metaboliten werden renal, mit einer Halbwertszeit von bis zu 40 Stunden, eliminiert. Die mittlere Eliminationshalbwertszeit für Carboplatin beträgt 6 Stunden. Platinderivate haben ein ähnliches Nebenwirkungsspektrum wie Alkylantien. Sie sind stark emetisch, nephrotoxisch und ototoxisch. 30 % der mit Cisplatin behandelten Patienten entwickeln im Lauf der Behandlung eine Tubulusfunktionsstörung, die in eine irreversible Tubulusnekrose übergehen kann. Ohrensausen und ein irreversibler Hörverlust kann in 10% der Fälle auftreten. Carboplatin ist durch seine abgewandelte Molekülstruktur besser verträglich (Estler, 1992).

Das Tamoxifen ist durch seine antiöstrogene Wirkung ein etabliertes Medikament in der Brustkrebstherapie, wenn Hormonrezeptoren nachgewiesen werden konnten. Aber auch bei Östrogen- und Progesteronrezeptor negativen Tumoren konnte eine positive Wirkung bei ca. 15% der mit Tamoxifen behandelten Frauen beobachtet werden.

Neuere Untersuchungen belegen einen hormonrezeptorunabhängigen, hemmenden Effekt auf die Proteinkinase C. In unterschiedlichen experimentellen Systemen konnte gezeigt werden, daß im Zusammenhang mit der Proteinkinase C (PKC) Apoptose induziert oder gehemmt werden kann (Evans, 1993). Höhergradige Gliome besitzen im Vergleich zur nicht transformierten Glia eine sehr hohe PKC Aktivität. Die PKC Aktivität korreliert eng mit der Wachstumsrate der Tumore (Couldwell, 1991, 1992; Yong, 1992). Der Vergleich frischer

Operationspräparate mit etablierten Gliom-Zellkulturlinien zeigte genauso erhöhte PKC Werte in den kultivierten Zellen (Couldwell, 1992). Tamoxifen ist ein Präparat mit dem klinische Erfahrungen, auch in der Hochdosisbehandlung von Gliomen, gesammelt werden konnten. Sein Nebenwirkungsspektrum ist, bis auf das Thromboserisiko und das Endometriumkarzinom der Frau, im Vergleich zu anderen Zytostatika, gering (Couldwell, 1990, 1993; Baltuch, 1993).

Immunologische Ansätze der Tumorthherapie werden derzeit mit gutem Erfolg in der Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt. Mit Lymphokin aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) und Interleukin-2 (IL-2) konnte beim Nierenzellkarzinom eine Tumorreduktion um mindestens 50% bis zur Vollremission in 35% der Fälle erreicht werden (Rosenberg, 1988). Vorteil einer Immuntherapie ist es, daß auch Mikrometastasen und einzelne Tumorzellen an jeder, dem Immunsystem zugänglichen Stelle des Körpers erreicht werden und dort zerstört werden können.

Viele maligne Tumore exprimieren spezifische Antigene oder veränderte Proteine und Rezeptoren oder überexprimieren Wachstumsfaktorrezeptoren, um möglicherweise ihr Zellwachstum zu steigern. Wachstumsfaktorrezeptoren gehören unter anderem der Klasse der Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) an, die nach Aktivierung durch ihren Liganden sich selbst und andere Proteine an bestimmten Tyrosinen phosphorylieren. (Ullrich, Schlessinger, 1990). Für eine Therapie hat sich bei Gliomen das EGF-EGFR System als mögliches Ziel erwiesen, da Glioblastome in vivo sehr häufig EGFR, im Vergleich zu normalem Gliagewebe, überexprimieren. (Westphal, 1994 ; Bigner, 1988). EGFR gehört wie HER2 und HER3 zu den Typ I Protein Tyrosin Kinasen (nach Ullrich und Schlessinger, 1990). Ligand des EGFR ist der Epidermal Growth Factor (EGF) und der Transforming Growth Factor α (TGF α), der von Gliomen sezerniert werden kann (Westphal, 1994). Die gleichzeitige Überexpression eines Wachstumsfaktorrezeptors und die Sekretion des zugehörigen Liganden, kann dabei im Sinne einer Wachstumsautonomie zu einer autokrinen Stimulation der Zellproliferation führen. In der Therapie konnten zwei Wirkqualitäten des EGFR Antikörpers (EGFR Ak) unterschieden werden. Mendelson (Mendelson, 1988) postuliert im Tierexperiment eine wachstumshemmende Wirkung des EGFR Ak. Möglicherweise wird die autokrine Selbststimulation des Tumors durch den Antikörper unterbrochen, oder es besteht eine direkte hemmende Wirkung des Antikörpers auf das Zellwachstum (Bigner, 1988; Pirak, 1988;

Rodeck, 1987; Werner, 1988). Die Autoren kommen jedoch nicht zu einem einheitlichen Ergebnis.

Zum anderen konnte eine immunologische Komponente der Antikörperwirkung beobachtet werden. Sutter bemerkte nach EGFR Ak Behandlung eine Zytolyse durch antikörperabhängige, zytotoxische T-Zellen in der Mikroglia (Sutter, 1991). Die Markierung der Tumorzelle für die T-Zellen kann zu einer Lyse der Tumorzellen führen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Effekte des Antikörpers auf die isolierten Tumorzellen untersucht. Zusätzlich wurden in vivo die immunologischen Aspekte in einem Maustumormodell verfolgt.

So kann die Wirkung des EGFR Ak in seinen unterschiedlichen Qualitäten untersucht werden. Wenn eine Unterbrechung der autokrinen Stimulation möglich ist und die Tumorzelle auf den EGF Rezeptor für ihr Wachstum angewiesen ist, müßte eine Wirkung in vitro an der isolierten Tumorzelle gegeben sein.

Verwendung findet der von Merck entwickelte EGF Rezeptor Antikörper EMD 55900. EMD 55900 ist ein muriner IgG2a Antikörper gegen den EGF Rezeptor, der von Merck Darmstadt, zur Verfügung gestellt wurde. Er war bereits in einer Phase 1b einer klinischen Studie (Westphal, 1994).

Ziel der Kombination von Medikamenten in der Tumorthherapie ist es, die Wirkung der einzelnen Medikamente zu steigern und dadurch den Tumor effektiver zu schädigen.

Limitierend in der Dosierung sind jedoch die toxischen Nebenwirkungen der Medikamente. Dadurch ist keine beliebig hohe Dosierung möglich.

McClay fand einen Synergismus zwischen Carboplatin und Tamoxifen in der Behandlung einer humanen Melanom Zelllinie (McClay, 1992). Dieser Synergismus trat bei einer Tamoxifen Konzentration von 0,1 bis 1 μ molar auf. Dieser Effekt war nach McClay's Untersuchungen von der Sensibilität gegenüber Tamoxifen abhängig. Im Vergleich dazu konnte Mohammed an anderen untersuchten Melanom Zelllinien keinen Synergismus bei den genannten Konzentrationen finden, aber eine Hemmung des Zellwachstums bei einer Tamoxifen Konzentration ab 5 μ molar (Mohammed, 1995). Kirchner untersuchte die Kombination von Carboplatin mit DTIC, BCNU und Tamoxifen. Anschließend führte er eine Immuntherapie mit Interleukin-2 und Interferon-alpha2a durch. Unter dem Behandlungsregime mit Tamoxifen konnte die Zahl der Vollremissionen von 7,5% auf 11% und die der partiellen Remissionen von 27,5% auf 38% gesteigert werden. Die Immuntherapie verlängerte das mittlere rezidivfreie

Überleben um 4 Monate (Kirchner, 1996). Pietras untersuchte die Kombination von Carboplatin und einem monoklonalen Antikörper gegen den HER2 Rezeptor. Diese Kombination steigerte hier die Wirkung der Einzelsubstanzen erheblich (Pietras, 1994). Die untersuchten Kombinationstherapien können offensichtlich unterschiedliche Angriffspunkte der Tumorzelle treffen, und so durch einen bisher ungeklärten Synergismus das Tumorzellwachstum hemmen. Gerade die neu entdeckten östrogenunabhängigen Wirkungen des Tamoxifen in Kombinationsbehandlungen kann ein mögliches Potential für die Behandlung des Glioms enthalten.

2. Methoden

2.1. Zellkulturen

Die untersuchten Tumorzellen wurden aus bestehenden Zellkulturlinien der Neurochirurgie UK Eppendorf verwendet. Diese Zelllinien sind aus frischen OP-Präparaten etabliert worden und wurden in vitro in Nährmedium und in vivo in Nacktmäusen kultiviert. Die Zelllinien **NCE G-28**, **NCE G-55**, **NCE G-122** und **NCE G-124** sind seit 1988 in der Nacktmaus NuNuBalbC und seit 4/95 in NMRI Nacktmäusen etabliert.

2.1.1. Primärkultur

Zur in vitro Untersuchung der Tumorkulturen wurden aus den bestehenden, in der Maus kultivierten Tumorkulturen, frische Tumorgewebeproben entnommen. Diese wurden in Hank's Medium (HBSS Dulbecco) mit der Schere zerkleinert und bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in Earle's MEM resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 15 ml Zellkulturflaschen (Falcon) in 7 ml Medium bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium, die abgeschwommenen Zelltrümmer und Gewebereste abgesaugt und neues Medium überschichtet. Bei konfluierendem Zellrasen, nach ca. 7 bis 10 Tagen, wurden die Zellen trypsiniert (Trypsin EDTA, Dulbecco) und auf 75 ml Zellkulturflaschen (Falcon) mit 25 ml Medium ausgesät. Die Tumorkulturen **NCE G-55 T**, **G-122 T** und **G-124 T** ließen sich auf diese Art in vitro kultivieren. Die Tumorkultur NCE G-28 T, die auch im Maustumormodell am langsamsten wuchs, ließ sich in vitro nicht anzüchten.

2.1.2. Zellkulturlinien

Die so gewonnenen Zelllinien wurden in Plastik Zellkulturflaschen (Costar, Cambridge, USA) bei 37 °C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Als Wachstumsmedium diente Earle's MEM mit 10% foetalem Kälberserum, 2 mM Glutamin, 5000 IU Amphotericin B und 100 mg/l Streptomycin. Zum Zellinienerhalt wurden die Zellen in einem 7-Tage-Rhythmus mit 10% Trypsin/EDTA (Gibco, Gaithersburg, USA) trypsiniert

und vereinzelt. Dazu wurde das Medium mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt und 4 ml Trypsin/EDTA in die Kulturflasche gegeben. Nach 5 min bei 37 °C im Brutschrank waren alle Zellen abgekugelt und von der Kunststoffoberfläche abgeschwommen. Diese wurden nun durch wiederholtes Aufziehen und Ausblasen mit einer sterilen Einmalpipette vereinzelt. Eine Probe wurde in einer Neubauer Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop (Leica) gezählt. Bei diesem Rhythmus konnten am Ende der 7-Tage-Periode zwischen 4×10^6 und 1×10^7 vitale Zellen pro Kulturflasche gezählt werden.

Ca. 1×10^6 Zellen wurden in der Kulturflasche belassen und mit 25 ml frischem Medium weiter inkubiert. Die restlichen Zellen standen für zytologische Untersuchungen und Experimente zur Verfügung. Um einen Anpassungseffekt an die neue Umgebung zu minimieren, wurden nur Passagen der Nr.: 3 bis 10 verwendet.

2.1.2.1. Wachstumsexperiment in vitro

Aus den aus den Zelllinien gewonnenen Zellen wurden für Wachstumsexperimente eine Zellsuspension mit 25000 Zellen pro ml hergestellt, von der dann 100 µl = 2500 Zellen/Napf auf sterile 96 Napf Zellkulturplatten (Falcon) ausgesät wurden. Die Zellen konnten 48 Stunden im Brutschrank sedimentieren und sich anheften. Danach wurden 100 µl Medium als Kontrolle oder 100 µl Zytostatika im Medium verdünnt dazugegeben. Die Näpfe wurden zu je 3 vertikalen Reihen zusammengefaßt und alle 24 h, beginnend mit dem Tag der ersten Behandlung, eine komplette horizontale Reihe fixiert. Dazu wurden 100 µl einer 3%igen Glutaraldehyd Lösung pipettiert. Nach 15 min offenem Fixieren unter einer laminar airflow Arbeitsbank, wurde das Glutaraldehyd abgesaugt und zweimalig mit PBS 1N ausgewaschen. Die fixierten Zellen wurden bis zur Auswertung mit 100 µl PBS 1N abgedeckt. Die Zytostatikazusätze wurden einheitlich 48 Stunden mit den Zellen inkubiert. Aus allen noch nicht fixierten Näpfen wurde dann das Gemisch vorsichtig abgesaugt und die Zellen in der Zellkulturplatte zweimalig mit steriler PBS Lösung gewaschen. Danach wurden die Zellen mit je 200 µl MEM ohne Zytostatikazusätze weiter inkubiert.

So ergab sich folgende Anordnung: (horizontal: Fixierdatum ; vertikal: Behandlungsgruppe)

Kontrolle	Behandlung 1	Behandlung 2	Behandlung 3	Fixierung nach:
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	48 h
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	3. d
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	4. d
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	5. d
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	6. d
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	7. d
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	8. d
○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	○ ○ ○	9. d

Abb.: 1 ; 96 Nöpfe Zellkulturplatten

Die komplett fixierte Kulturplatte wurde nach Absaugen der PBS Lösung mit je 50 μ l Kristallviolett pro Napf für 1 Stunde gefärbt. Dann wurde das nicht gebundene Kristallviolett unter fließendem Wasser abgespült und der Farbstoff mit 100 μ l/Napf SDS 10% gelöst. Die Extinktion wurde bei 540 nm in einem Multireader gemessen. Durch diese Anordnung wurde eine vergleichbare 3-fach Bestimmung gewährleistet.

2.1.2.2. Wachstumsexperiment mit Carboplatin

Die vorbereiteten Zellen wurden nach 48 Stunden mit Carboplatin nach einer Verdünnungsreihe zur Ermittlung der zytostatischen und zytotoxischen Konzentrationen behandelt. Hierzu wurde Carboplat 450 (Bristol) Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml Carboplatin verwendet und auf Endkonzentrationen von 1000 μ g/ml bis 0,1 μ g/ml mit Earles MEM (Dulbeco) verdünnt. Zu den in 100 μ l MEM inkubierten Zellen wurden nun je 100 μ l Carboplatin in MEM verdünnt zugemischt und für 48 Stunden inkubiert.

Verdünnungsreihe:

Endkonzentrationen der verdünnten Lösungen:

Carboplatin: 1000 µg/ml, 200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 20 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,1 µg/ml

2.1.2.3. Wachstumsexperiment mit Tamoxifen

Die Zellen wurden nach 48 Stunden mit Tamoxifen nach einer Verdünnungsreihe behandelt. Die freie Base Tamoxifen wurde, da sie nicht wasserlöslich ist, in DMSO (Dulbeco) gelöst und steril filtriert. Sie lag in einer Konzentration von 40 mmolar vor. Zur Kontrolle von Effekten auf das Zellwachstum wurden die Zellen mit DMSO ohne Tamoxifen zur Kontrolle in einer Verdünnung von 1 : 2000 behandelt. Dies ist die höchste Konzentration in von DMSO in der mit Tamoxifen behandelten Gruppe. Tamoxifen wurde in Endkonzentrationen von 20 µmolar bis 0,625 µmolar in Earles MEM eingesetzt. Die Behandlung erfolgte für 48 Stunden.

Verdünnungsreihe:

Endkonzentration der verdünnten Lösungen:

DMSO 1:2000, Tamoxifen: 20 µmolar, 10 µmolar, 5 µmolar, 2,5 µmolar, 1,25 µmolar, 0,625 µmolar

2.1.2.4. Wachstumsexperiment mit EMD 55900

Die Zellen wurden nach 48 Stunden mit EMD 55900 behandelt. EMD 55900 (mAb 425) ist ein muriner Antikörper der IgG2a Klasse, der an ein extrazelluläres Protein des menschlichen epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR) bindet. Er wurde von E. Merck Darmstadt zur Verfügung gestellt und befand sich 1991 in der Phase 1b der klinischen Studie unter anderem in der Neurochirurgie des UK Eppendorf (Westphal, 1994). Zur Kontrolle wurde normales Maus Immunglobulin (Sigma) als 2. Negativkontrolle eingesetzt. Die Antikörper

wurden in Earles MEM in Endkonzentrationen von 250 µg/ml bis 3,125 µg/ml verdünnt und für 48 Stunden inkubiert.

Verdünnungsreihe:

Endkonzentration der verdünnten Lösungen:

Maus IgG: 250 µg/ml, EMD 55900: 250 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,25 µg/ml, 3,125 µg/ml

2.1.2.5. Kombination von Carboplatin und Tamoxifen

Um additive und synergistische Effekte der verwendeten Medikamente zu untersuchen, wurden vorbereitete Zellen mit Carboplatin und Tamoxifen in zytostatischen und nicht mehr zytostatischen Konzentrationen behandelt. Die Experimente wurden im unmittelbaren Anschluß an die Vorexperimente mit den Einzelsubstanzen durchgeführt, damit die Anpassungseffekte der Tumorzellen an das Wachstum auf einer Kunststoffoberfläche so gering wie möglich bleiben. Carboplatin wurde in Konzentrationen von 5 µg/ml bis 1 µg/ml, Tamoxifen in Konzentrationen von 5 µmolar und 2,5 µmolar in Earles MEM appliziert. Die Medikamente wurden vor der Applikation verdünnt, gemischt und dann je 100 µl/Napf pipettiert.

Verdünnungsreihe:

Konzentrationen der verdünnten Lösungen:

Carboplatin	Tamoxifen
5 µg/ml	5 µmolar
2,5 µg/ml	5 µmolar
1,66 µg/ml	5 µmolar
1,25 µg/ml	5 µmolar
1 µg/ml	5 µmolar
5 µg/ml	2,5 µmolar
1 µg/ml	2,5 µmolar

2.1.2.6. Kombination von Carboplatin und EMD 55900

Um Synergismen zwischen Carboplatin und EMD 55900 zu untersuchen, wurde Carboplatin in Konzentrationen von 5 µg/ml und 1 µg/ml mit EMD 55900 in einer Konzentration von 50 µg/ml kombiniert.

Verdünnungsreihe:

Konzentrationen der verdünnten Lösungen:

Carboplatin	EMD 55900
5 µg/ml	50 µg/ml
1 µg/ml	50 µg/ml

2.1.2.7. Kombination von Tamoxifen und EMD 55900

Tamoxifen als Proteinkinase C Inhibitor und EMD 55900 als Wachstumsfaktor Rezeptor Antikörper könnten einen möglichen Synergismus haben. Daher wurden sie in Konzentrationen von Tamoxifen mit 5 µmolar und 2,5 µmolar und EMD 55900 mit einer Konzentration von 50 µg/ml in Earles MEM kombiniert. Die Substanzen wurden vor der Applikation gemischt und dann zu je 100 µl/Napf pipettiert.

Verdünnungsreihe:

Konzentrationen der verdünnten Lösungen:

Tamoxifen	EMD 55900
5 µmolar	50 µg/ml
2,5 µmolar	50 µg/ml

2.1.2.8. Kombination von Carboplatin, Tamoxifen und EMD 55900

In Anwendung aller verwendeten zytostatischen Substanzen wurden Carboplatin mit 5 µg/ml und 1 µg/ml, Tamoxifen mit 5 µmolar und 2,5 µmolar und EMD 55900 mit 50 µg/ml miteinander kombiniert.

Verdünnungsreihe:

Konzentrationen der verdünnten Lösungen:

Carboplatin	Tamoxifen	EMD 55900
5 µg/ml	5 µmolar	50 µg/ml
2,5 µg/ml	5 µmolar	50 µg/ml
1,66 µg/ml	5 µmolar	50 µg/ml
1,25 µg/ml	5 µmolar	50 µg/ml

2.2. Tiermodell

Für die in vivo Experimente wurde ein subkutanes Tumormodell in Nacktmäusen gewählt. Die hier untersuchten Tumorlinien NCE G-28 T, G-55 T, G-122 T, G-124 T sind etablierte Zelllinien der Neurochirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Eppendorf. Von dieser Suspension wurden ca. 1×10^6 Zellen weiblichen NuNuBalbC Nacktmäusen subkutan in die rechte und linke Flanke injiziert. Nach 1 bis 2 Wochen wuchsen an der Stelle der Injektion solide Tumorknoten. Diese Primärtumore wurden seit 1988 als Maustumorlinie etabliert.

Folgende Tumorlinien wurden untersucht:

Zelllinie	Geschl.	Alter d. Pat.	Histologie	Grading	Passagen im Tier
NCE G-28T	m	Alter 66 J	Glioblastom mit sarkomatösen Anteilen	WHO Grad 4	30 -42
NCE G-55T	m	Alter 65 J	Glioblastom	WHO Grad 4	75 -100
NCE G-122T	m	Alter 50 J	Glioblastom	WHO Grad 4	50 -70
NCE G-124T	m	Alter 58 J	Glioblastom	WHO Grad 4	60 -85

2.2.1. In vivo Tumorlinie

Die für die Experimente verwendeten, 4 - 6 Wochen alten, weiblichen NuNuBalbC und NMRI Nacktmäuse wurden von der Tierhaltung der Universität Hamburg in Eppendorf selber gezüchtet und stammen von Tieren der genannten Klassifizierung ab. Sie wurden in keimarmen Barriereräumen mit kontrollierter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und 12 h Tag/Nacht Rhythmus in Kunststoffkäfigen zu je drei Tieren gehalten. Wasser und Futter standen den Tieren nach Belieben zur Verfügung.

Zum Tumorlinienerhalt wurde ab einer Tumorgröße von 15 bis 20 mm das Tier getötet, der Tumor explantiert, in 1 bis 2 mm große Stücke zerteilt und auf neue Tiere transplantiert. Dazu wurden die Tiere mit Ketazol i.p. narkotisiert und durch einen medianen Rückenschnitt zwei subkutane Taschen in die Flanken der Tiere präpariert. In diese wurden dann die Tumorstücke gegeben und der Schnitt mit Histoacryl Gewebekleber (Braun) verschlossen.

Vor jedem Experiment wurden die Tiere randomisiert und markiert.

Die soliden Tumoren wurden mit einer Schublehre ohne den Tumor zu quetschen in Längs- und Querrichtung gemessen. Die mitgemessene Haut wurde nicht berücksichtigt. Das

Tumorvolumen wurde nach der Formel $X = \frac{1}{4} \times D1 \times D2 (D1+D2)$ (Aaron, 1994)

berechnete. Für die Tierexperimente lag eine Genehmigung des Veterinärarnamtes Hamburg unter der Nummer F I 24-94 und F II 24-95 vor.

2.2.1.1. In vivo Wachstumsexperiment ohne Behandlung

Die in der Maus kultivierten Tumorlinien wurden seit 1993 regelmäßig beobachtet. Zusätzlich wurden nach standardisierten Bedingungen alle Tumore gemessen. Parallel zu den Experimenten wurden Kontrollgruppen beobachtet, so daß sich ein großes, unbehandeltes Kontrollkollektiv ergab.

Zu Beginn eines Behandlungszyklus wurden die benötigten Tiere mit einem Tumor transplantiert. Nach 7 und 14 Tagen wurden alle für das Experiment vorgesehenen Tiere markiert und randomisiert und den Behandlungsgruppen zugeordnet.

2.2.1.2. In vivo Wachstumsexperiment mit Carboplatin

Carboplatin wurde den Mäusen intra peritoneal in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht an den Tagen 14, 19 und 24 nach der von Elliott etablierten Methode, (Elliot et al , 1994)

beziehungsweise 7, 10 und 13 (eigene Modifikation) nach Implantation appliziert. Zum Einsatz

kam, wie bereits im Zellkulturexperiment verwendet, Carboplat 450 (Bristol) Lösung. Die

Tiere wurden vor und während der Behandlung gewogen und die Tumore mit einer Schublehre in Längs- und Querrichtung zum Tier gemessen, ohne den Tumor zu quetschen. Dann wurde

Carboplatin mit einer 22x0,55 mm Nadel und einer

1 ml Insulinspritze injiziert. Unter diesem Behandlungsregime starb keines der Tiere an toxischen Effekten der Zytostatika.

2.2.1.3. In vivo Wachstumsexperiment mit Tamoxifen

Die Tamoxifen Behandlung wurde am 7. (eigene Modifikation) und 14. Tag (Haran, 1994) nach Implantation begonnen. Dazu wurde eine sterile Depot Tablette Tamoxifen durch einen medianen Rückenschnitt unter die Haut in die Schulterregion der Maus implantiert. Die Tiere wurden wie zur Transplantation mit Ketazolam i.p. narkotisiert. Der Schnitt wurde nach der Operation mit Histoacryl Gewebekleber (Braun) verschlossen. Die Tamoxifen Tablette wurde von Innovative Research, Toledo Ohio, bezogen. Sie enthielt 5 mg freie Base Tamoxifen pro Tablette mit einer Freisetzungszeit von 60 Tagen. Die mittlere Tagesdosis wird mit 80-85 µg/d, die Blutspiegel werden mit 3 - 4 ng/ml angegeben. Dies würde, bei einem gemessenen mittleren Körpergewicht der Maus von 28,8 g, einer Tagesdosis von 2,8 mg/kg KG entsprechen (Innovative Research, Toledo OH; Cat Nr.: SE-361) und liegt dabei in etwa (210 mg/75kg KG) bei den bereits untersuchten 200 mg/d beim Menschen (Couldwell, 1994).

2.2.1.4. In vivo Behandlung mit EMD 55900

Die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper EMD 55900 wurde an den Tagen 14, 19 und 24 beziehungsweise 7, 10, 13 mit je 30 mg/kg oder 50 mg/kg Körpergewicht der unverdünnten Lösung durchgeführt. Die Injektion erfolgte intra peritoneal mit einer 22x0,55 mm Nadel und einer 1 ml Insulin Spritze (Westphal, 1993; Aboud-Pirak, 1988).

2.2.1.5. In vivo Behandlung mit Carboplatin und Tamoxifen

Die Tamoxifen Behandlung wurde am 7. und 14. Tag nach Implantation begonnen. Dazu wurde eine sterile Depot Tablette Tamoxifen, wie oben beschrieben, in die Schulterregion der Maus implantiert. Danach wurde den Mäusen Carboplatin, in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht, an den Tagen 14, 19 und 24 beziehungsweise 7, 10 und 13 nach Implantation intra peritoneal mit einer 22x0,55 mm Nadel und einer 1 ml Insulinspritze injiziert.

2.2.1.6. In vivo Behandlung mit Carboplatin und EMD 55900

Carboplatin wurde den Mäusen, in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht, an den Tagen 14, 19 und 24 beziehungsweise 7, 10 und 13 nach Implantation intra peritoneal mit einer 22x0,55 mm Nadel und einer 1 ml Insulinspritze injiziert. Nach der Carboplatin Injektion wurde der Antikörper EMD 55900 mit einer neuen Nadel und neuen Spritze intra peritoneal injiziert. An den Tagen 14, 19 und 24 beziehungsweise 7, 10 und 13 wurden je 30 mg/kg oder 50 mg/kg Körpergewicht der unverdünnten Lösung appliziert.

2.2.1.7. In vivo Behandlung mit Tamoxifen und EMD 55900

Die Kombinationsbehandlung mit Tamoxifen und EMD 55900 wurde am 7. und 14. Tag nach Implantation begonnen. Dazu wurde eine sterile Depot Tablette Tamoxifen in beschriebener Weise implantiert. Die Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper EMD 55900 wurde im Anschluß an die Implantation mit je 30 mg/kg KG oder 50 mg/kg KG durchgeführt.

2.3. Histologie

Zur histologischen Untersuchung wurden die Tumore explantiert und in Tissue Tek (Tissuecoll) eingebettet und durch Abkühlung in 2 Butylisopropanol (Fluka) mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Davon wurden mit einem Kryostaten 4 - 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Kryostatschnitte wurden für die Immunfärbungen und HE Färbung verwandt. Alternativ wurden die Tumorproben in Formalin 4% fixiert und mittels eines Einbettautomaten in Paraffin in typischer Weise vorbereitet und mit einem Mikrotom in 4µm Dicke geschnitten. Die Paraffinschnitte wurden für die Gomori, Masson Goldner, HE und van Gieson Elastika Färbungen verwandt.

2.3.1. Standardfärbung

Zur Klassifizierung und Beurteilung der Tumorschnitte wurde eine, in der Histologie übliche Hämatoxylin-Eosin Färbung, nach Meyer durchgeführt.

Gomori Versilberung, Masson Goldner und van Gieson Elastika wurden nach den in der Histologie üblichen Methoden gefärbt.

Die histologischen Färbungen wurden freundlicherweise von der Neuropathologischen Abteilung des UKE durchgeführt, um ein einheitliches und vergleichbares Ergebnis zu erhalten.

2.3.2. Immunperoxidasefärbung (PAP)

Die Immunperoxidasefärbung wurde streng nach dem Protokoll von DAKO Diagnostika für den Strept AB Komplex (Dako Hamburg, Code Nr.: K 377) durchgeführt.

Zuerst wurde der Strept AB Komplex hergestellt. 5 ml 0,05 M Tris/HCl Puffers bei pH 7,6 wurden in die beiliegende Mischflasche pipettiert und je ein Tropfen Reagenz A und Reagenz B hinzugefügt. Die Reagenzien wurden gut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die frisch geschnittenen Tumore wurden bei Raumtemperatur für 10 min in Azeton fixiert und dann mit 0,6% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu unterdrücken. Die mit TBS gespülten Schnitte, wurden in TBS Lösung eingelegt. Alle

folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Dann wurden sie für 20 min mit 1:5 verdünntem normalem Schweineserum (DAKO) und mit 1:40 verdünntem normalem Human IgG (DAKO) inkubiert, um unspezifische Hintergrundfärbung zu blockieren. Das Serum wurde nun abgeklopft und 200 µl des in TBS verdünnten Primärantikörpers für 30 min inkubiert. Der TBS Puffer wurde abgeklopft und die Objektträger in frischem TBS Puffer gereinigt. Das biotinylierte Kaninchenantiserum gegen Mäuseimmunglobuline (DAKO) wurde in TBS 1:200 bis 1:600 verdünnt, auf die Objektträger aufgetropft und 30 min inkubiert. Die in TBS gereinigten Schnitte wurden nun für 30 min mit dem vorbereiteten Strept AB Komplex inkubiert. Nach erneutem Reinigen mit TBS wurde mit DAB und 3% Wasserstoffperoxid für 5 - 7 min gefärbt, unter fließendem Wasser abgespült, die Gegenfärbung mit Hämatoxillin nach Meyer für 3 s durchgeführt und anschließend die Präparate gewaschen, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und eingebettet.

2.3.2.1. Färbung mit EMD 55900

Die Tumore wurden auf ihre Bindung von EMD 55900 und Vorhandensein des EGF Rezeptors untersucht. Der monoklonale Antikörper EMD 55900 wurde auf eine Konzentration von 10 µg/ml in TBS verdünnt und nach dem DAKO Protokoll eingesetzt.

Um eine Bindung der behandelten Tumore in vivo zu untersuchen, wurden Tumore 24 Stunden nach der Behandlung mit EMD 55900 entnommen, tiefgefroren und die Tumore nach dem DAKO Protokoll aufgearbeitet, jedoch ohne mit dem Primärantikörper zu inkubieren.

2.3.2.2. Färbung mit Mib 1 gegen Ki 67

Der monoklonale Antikörper Mib 1 (Dianova Hamburg, Kat. Nr.: dia 505) weist das nukleäre, zellproliferationsassoziierte Antigen Ki 67 nach, welches in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird. Mib 1 wird in einer Konzentration von 0,2 mg/ml Maus IgG1 in PBS mit 2% BSA und 0,05% Natriumazid geliefert. Der Antikörper wurde in PBS-BSA auf 10 µg/ml verdünnt und nach dem DAKO Protokoll eingesetzt. Zur Auswertung wurden die gefärbten

Zellkerne bei einer Vergrößerung von 1:1000 mit einem Immersionsölobjektiv gezählt. Der Mib Index wurde nach der Formel: $K_{\text{pos}}/K_{\text{ges}} = \text{Mib Index in \%}$ errechnet, mit $K_{\text{pos}} = \text{Mib 1 positive Kerne}$ und $K_{\text{ges}} = \text{Gesamtzahl der Kerne pro Gesichtsfeld}$

2.3.2.3. Färbung mit Faktor VIII (v. Willebrand Faktor) Antikörper

Der von Willebrand Faktor ist ein etabliertes und sicheres Antigen zum Nachweis von Endothelien. Der hier verwandte Antikörper gegen Faktor VIII ist auch gegen das murine Antigene reaktiv (Boeringer Mannheim). Somit ist ein Nachweis von Kapillaren muriner Herkunft im Tumor in vivo möglich. Die Zahl der Kapillaren konnte direkt mit dem unbehandelten Kontrollmaterial verglichen werden und ein Effekt der Zytostatika auf die Kapillardichte der vitalen Tumorabschnitte untersucht werden. Verwendet wurde die von Weidner 1995 publizierte Methode der Kapillarzählung. Der Antikörper wurde ebenfalls nach dem Dako Protokoll für die PAP Färbung angewendet.

2.3.3. Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde nach dem Protokoll: "Färbemethoden für die indirekte und direkte Immunfluoreszenz" von DAKO Diagnostika (DAKO, 1994) Hamburg durchgeführt. Die Kryostatschnitte wurden in Azeton fixiert und für 5 min in TBS inkubiert. In einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur wurden nun 200 µl einer der zuvor beschriebenen Primärantikörper verdünnt aufgetropft und 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurde der FITC konjugierte Antimaus - Antikörper, in TBS auf 1 µg/ml verdünnt und 30 min inkubiert. Nach gründlichem Waschen in TBS und Abspülen mit Aqua Dest wurden die Schnitte im Einschlußmedium (DAKO Nr.: S 3023) bei pH 8,4 eingebettet. Die Schnitte wurden mit einem Zeiss Auflicht-Fluoreszenz- Mikroskop mit passendem Filter begutachtet. Als Filterkombination kamen ein Erregerfilter mit 470 nm, ein Farbteiler mit 510 nm und ein Sperrfilter mit 515 nm zum Einsatz.

2.3.4. Messung der Gefäßdichte

Die Messung der Neovaskularisation in den mausimplantierten Tumoren wurde nach der von Weidner (Weidner, 1995) publizierten Methode durchgeführt.

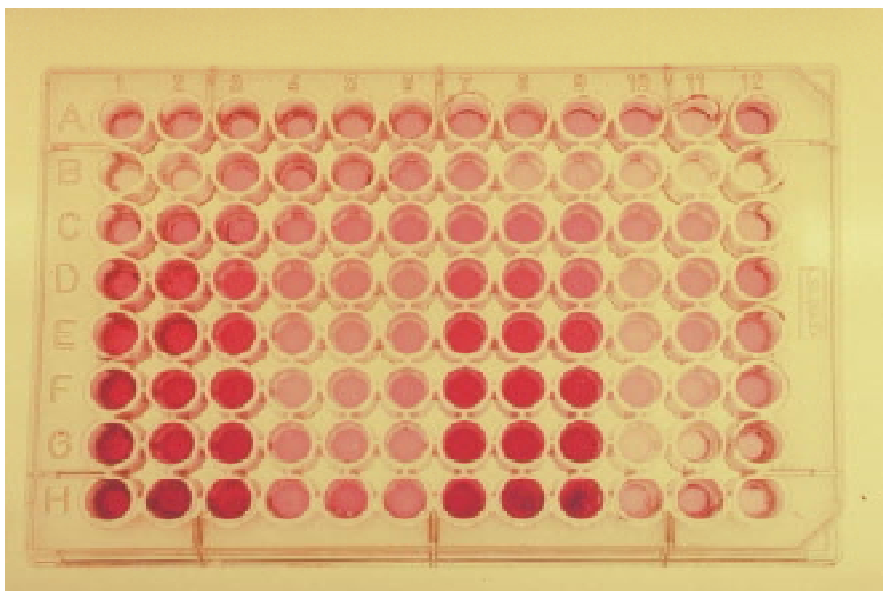
Zunächst wurde ein repräsentativer Querschnitt durch die Tumormitte in einer Stärke von 5 µm, mit dem Kryostaten angefertigt. Die murinen Endothelien wurden mit einem spezifischen von Willebrand Faktor Antikörper (Boeringer Nr.: 1284 924) und PAP Immunfärbung markiert. Mit der 100 fach Vergrößerung wurde nun der Bereich mit der makroskopisch höchsten Gefäßdichte ausgewählt. Nach Weidners Beobachtungen können diese „Neovascular Hot Spots“ in jedem Bereich des Tumors auftreten, sind aber häufig in der Randzone lokalisiert. Nachdem die Fläche mit der höchsten Gefäßdichte lokalisiert war, wurden die Kapillaren und Gefäße bei der 200x Vergrößerung gezählt. (20x Objektiv, 10x Okular, Zeiss Mikroskop, 0,74 mm² mit einem Messgitter Objektträger (Neubauer) ermittelt). Jede bräunlich gefärbte Struktur, die nicht zu einer Tumorzelle oder nekrotischen Tumorarealen zuzuordnen war, wurde als Gefäß gezählt. Auch solche Cluster, die möglicherweise von ein und dem selben Gefäß stammen, das sich durch den Tumor schlängelt, wurden als einzelne Gefäße gezählt. Gefäßlumen, Erythrozyten oder sichtbare Endothel Zellkerne wurden nicht als Kriterium für ein Gefäß berücksichtigt, da auch die Mikrogefäße mit kollabiertem Lumen erfaßt werden sollten.

Zusätzlich wurden alle, das Gesichtsfeld vollständig ausfüllende vitalen Tumorareale ausgezählt, um einen repräsentativen Mittelwert der Gefäßdichte für den Tumor zu erhalten. Der Höchstwert der Gefäßdichte (Hot Spot) und der Mittelwert wurden einer getrennten statistischen Auswertung zugeführt.

3. Ergebnisse

3.1.1. Carboplatin in vitro:

Zunächst wurde als Vorexperiment die Sensibilität der frühen Passagen der aus den Xenotransplantaten reetablierten Zelllinien auf Carboplatin, Tamoxifen und EMD 55900 untersucht. Eine Dosis Wirkungsbeziehung für die Zelllinien G-55, G-122 und die Medikamente ist bisher nicht untersucht worden. Über 4 Logstufen wurden die zytostatischen und toxischen Medikamentenspiegel für die einzelnen Zellen gesucht.



Horizontale Reihen
A-H:
Tage nach Aussaat.

Senkrechte Gruppen
1 bis 12:
Behandlungsgruppen

Abb.: 2 ; typisches Bild einer durchgefärbten Titerplatte

Aus den Untersuchungen geht hervor, daß 10 µg/ml Carboplatin, nach der eingangs genannten Vorschrift appliziert, für die Zelllinie NCE G-55 zytotoxisch ist ($p < 0,01$). In einer Konzentration von 5 µg/ml konnte eine signifikante Zytostase gemessen werden. Bis zum 5. Tag konnte kein signifikantes Wachstum, danach konnte ein signifikantes Wachstum beobachtet werden ($p < 0,01$). Konzentrationen kleiner 1 µg/ml bewirken keine signifikante Zytostase. Die Tumorzelllinie NCE G-122 erwies sich als sensibler gegenüber Carboplatin. Bereits 0,1 µg/ml Carboplatin bewirken einen sichtbaren Effekt auf das Zellwachstum. Im

Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ist dieser Effekt jedoch nicht signifikant. Eine Carboplatin Konzentration von 1 µg/ml ist signifikant wirksam gegen NCE G-122 ($p < 0,01$). Es besteht das typische Bild einer direkten Dosis-Wirkungs Beziehung von Carboplatin und dem gemessenen Zellwachstum.

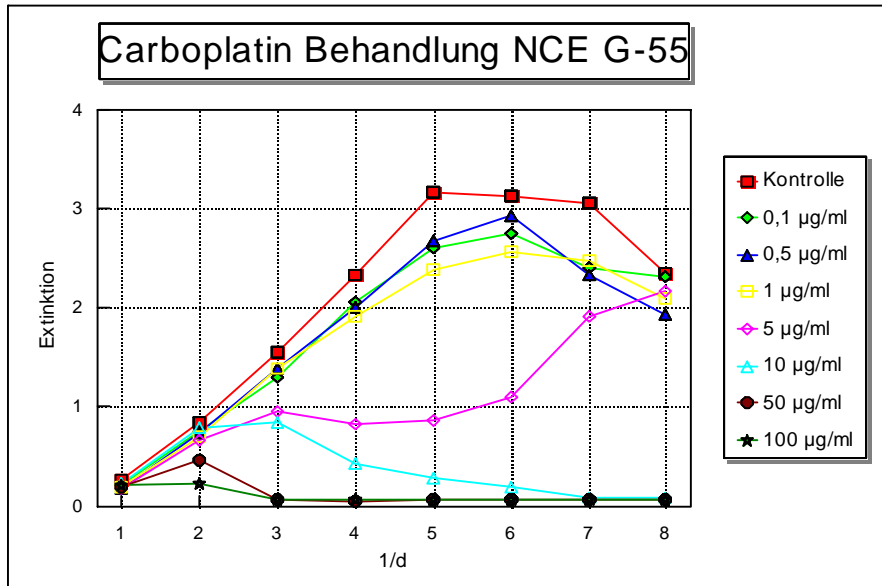


Abb. 3 ; NCE G-55 mit Carboplatin

(Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersicht halber verzichtet.)

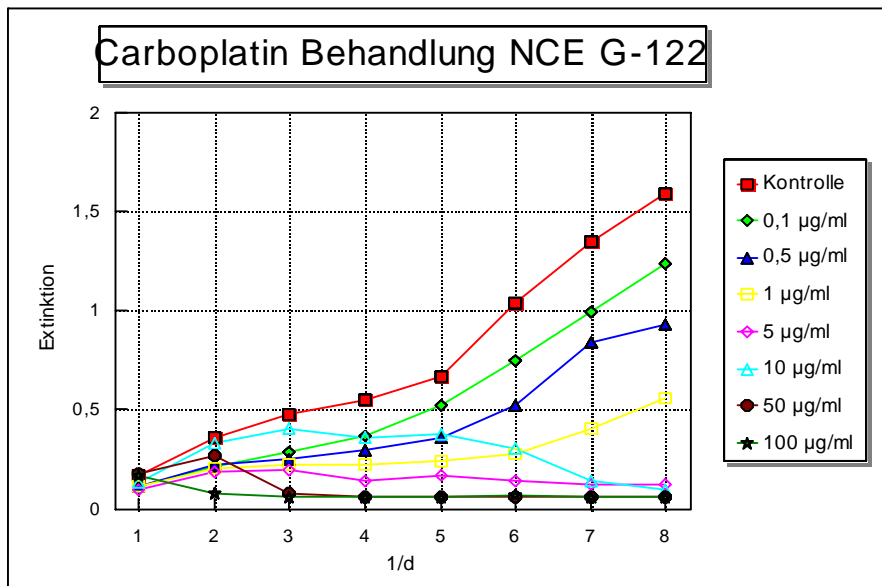


Abb.: 4 ; NCE G-122 mit Carboplatin

3.1.2. Tamoxifen in vitro

Aus verschiedenen Untersuchungen ist eine hormonunabhängige Wirkung von Tamoxifen auf das Zellwachstum maligner Tumore bekannt. Couldwell beschreibt eine Tamoxifen induzierte Apoptose der Tumorzellen (Couldwell, 1994).

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte eine direkte Dosis-Wirkungs- Beziehung auf das Zellwachstum der untersuchten Gliome beobachtet werden. Tamoxifen in einer Konzentration von 10 μmol bewirkt bei NCE G-55 und G-122 eine signifikante Zytostase ($p < 0,01$). Die überlebenden Zellen sind aber in der Lage sich zu regenerieren. Nach 7 Tagen ist eine Proliferation der untersuchten Zellen in vitro zu beobachten. Bei einer Konzentration von 20 μmol sind in den Titerplatte keine vitalen Zellen mehr nachweisbar.

Weiterhin wurde die Wirkung des Lösungsmittels DMSO auf die Zelllinien untersucht. Es konnte keine Beeinflussung des Zellwachstums durch DMSO in der verwendeten Konzentration beobachtet werden.

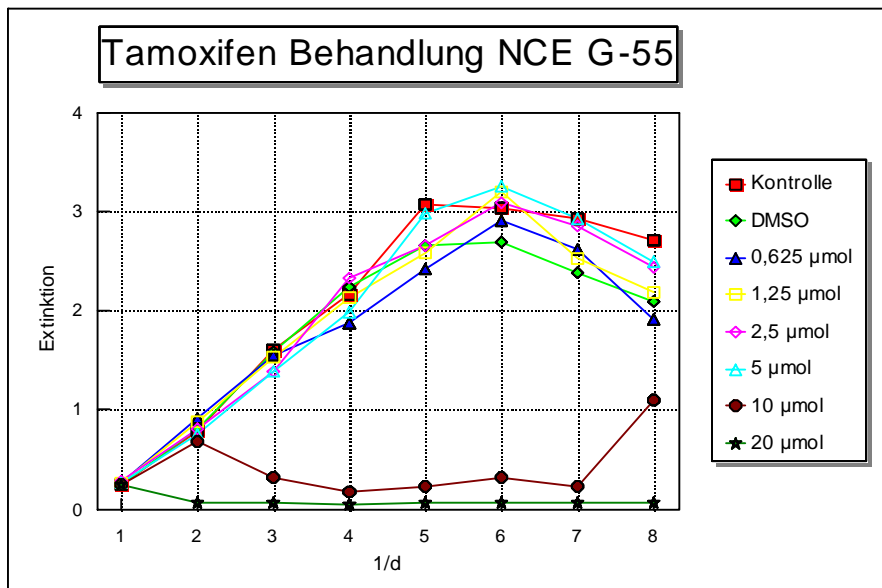


Abb.: 5 ; NCE G-55 mit Tamoxifen

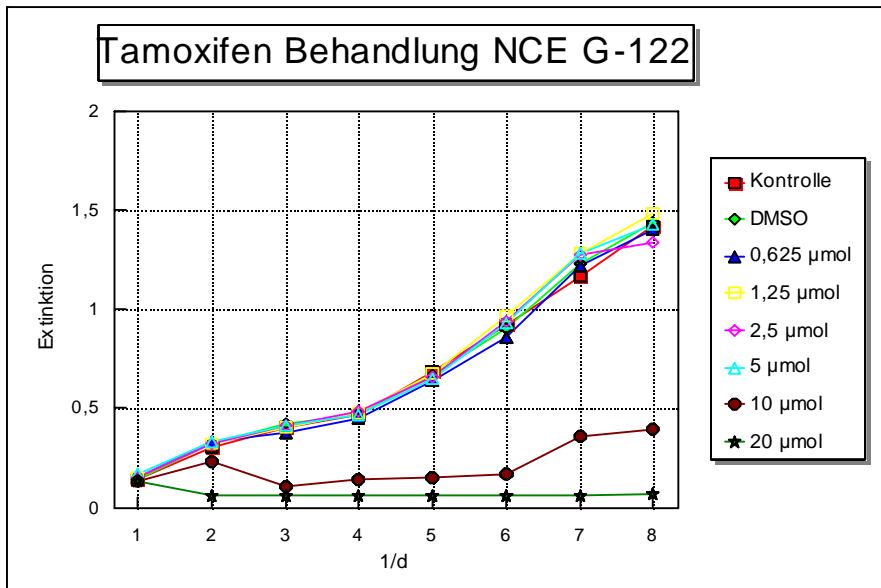


Abb.: 6 ; NCE G-122 mit Tamoxifen

Im Gegensatz zur Behandlung mit Carboplatin traten bei der Behandlung mit Tamoxifen keine Unterschiede in der Empfindlichkeit von NCE G-55 und NCE G-122 auf.

3.1.3. EMD 55900 in vitro

Die Tumorklinie NCE G-55 ab der 7. Passage und die Tumorklinie NCE G-122 zeigten keine in vitro Reaktion auf EMD 55900. Die Kontrollgruppen und die behandelten Zellen wuchsen gleich schnell. Um ein EGFR abhängiges Wachstum im Xenotransplantat auch unter in vitro Bedingungen zu erfassen, wurden nur frühe Zellkulturlinien bis zur 10. Passage verwendet. NCE G-55 zeigte in der 3. Passage ein unregelmäßiges Wachstum unter der Anti EGF Ak Behandlung, dieser Effekt kann aber auch auf einer möglichen Anpassung an die in vitro Kulturbedingungen beruhen.

NCE G-55 und NCE G-122 konnten in vitro nicht mit EMD 55900 in ihrem Wachstum gehemmt werden.

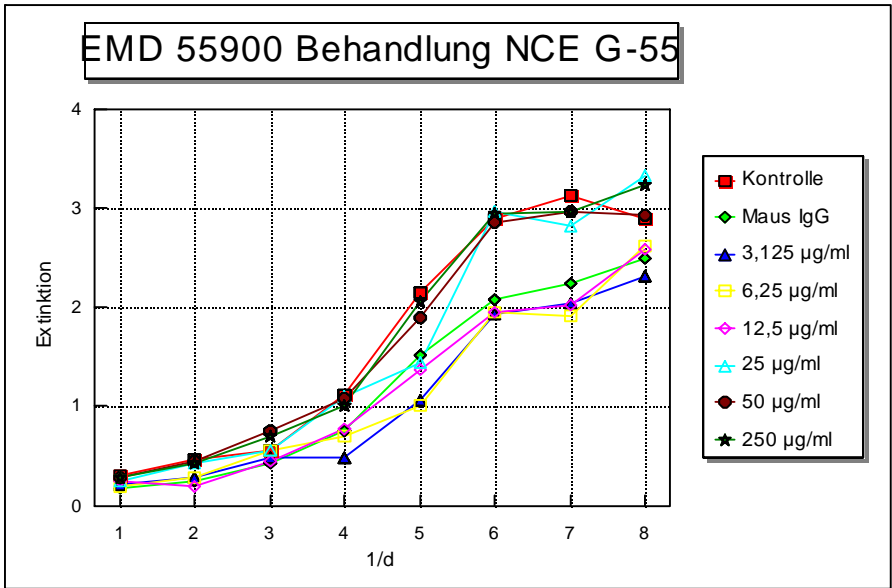


Abb.: 9 ; NCE G-55 mit EMD 55900; 7. Passage

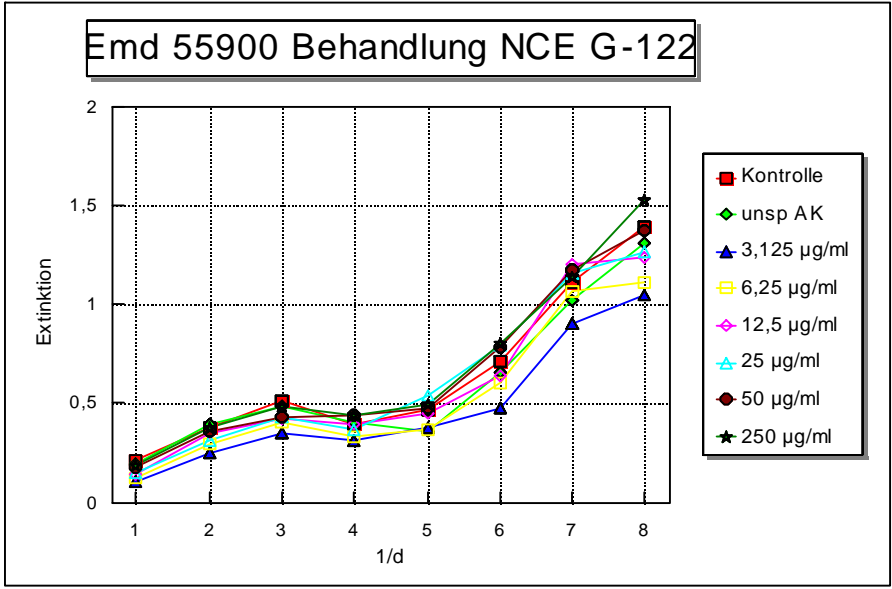


Abb.: 10 ; NCE G-122 mit EMD 55900; 3. Passage

3.1.4. Kombination von Carboplatin und Tamoxifen in vitro

Im folgenden Experiment wurde die Kombination von Carboplatin und Tamoxifen auf ihre Wirkung auf NCE G-55 und NCE G-122 untersucht.

Carboplatin in einer Konzentration von 1 µg/ml bewirkte bei NCE G-55 im Vorexperiment keine Zytostase. In der Versuchsanordnung mit 1 µg/ml und 5 µg/ml Carboplatin konnte kein synergistischer oder gegenseitig hemmender Effekt mit Tamoxifen in einer Dosierung zwischen 2,5 µmol und 5 µmol beobachtet werden. In einer Dosierung von 5 µg/ml wirkte Carboplatin allein zytotoxisch, 1 µg/ml Carboplatin konnte auch in Kombination mit Tamoxifen keine signifikante Zytostase bewirken.

Darauf hin wurde eine Zielbehandlung mit einer Carboplatin Konzentration von 1 µg/ml bis 5 µg/ml durchgeführt. Die Tamoxifen Konzentration wurde konstant bei 5 µmolar belassen. Jedoch auch hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit Carboplatin allein und der Kombination mit Tamoxifen beobachtet werden. Nach den vorliegenden Ergebnissen für NCE G-55 scheint in vitro alleine die Dosierung von Carboplatin ausschlaggebend zu sein.

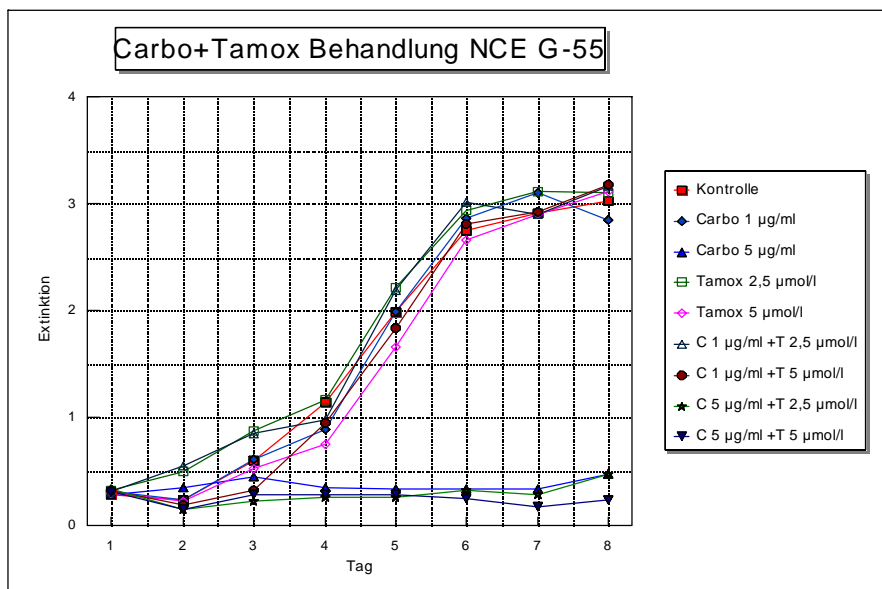


Abb.: 11 ; NCE G-55 mit Kombination von Carboplatin und Tamoxifen

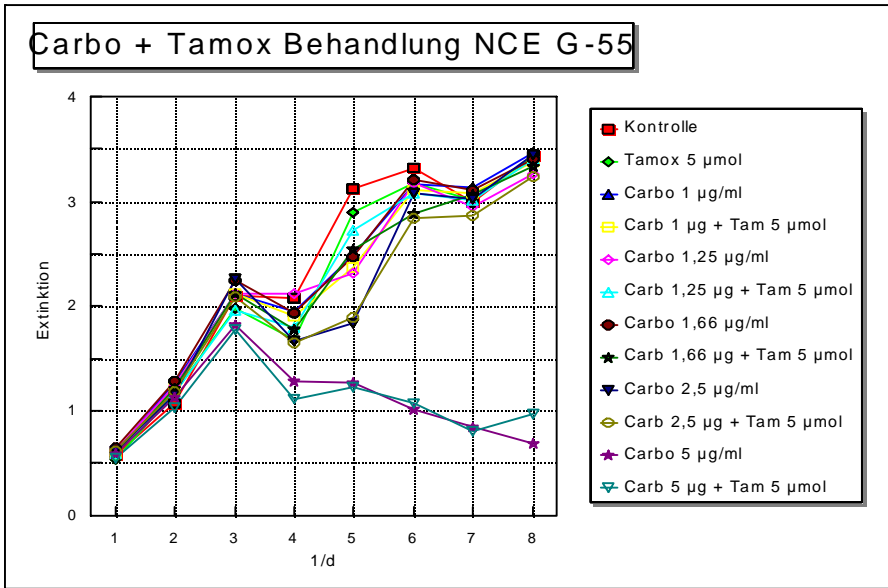


Abb.: 12; NCE G-55, Zielbehandlung von Carboplatin und Tamoxifen

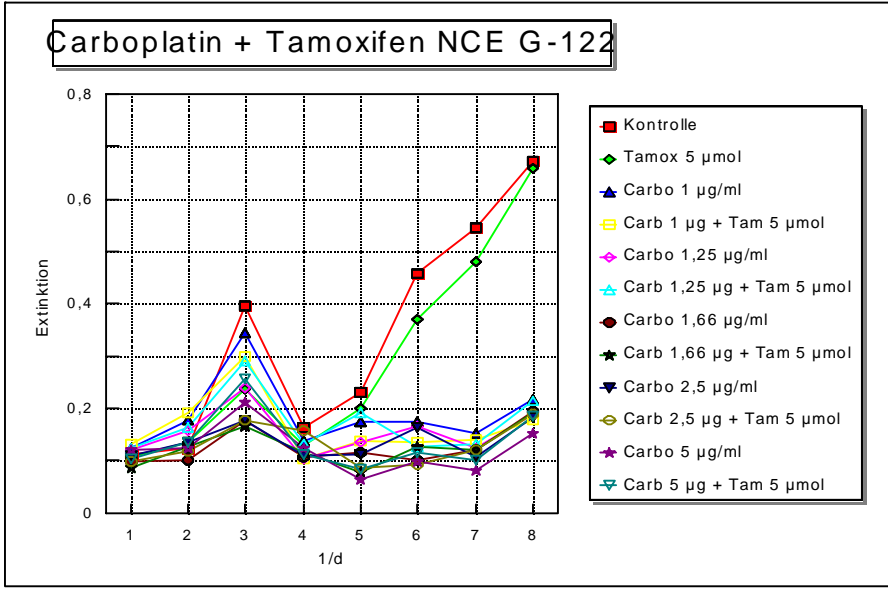


Abb.:13 ; NCE G-122, Zielbehandlung von Carboplatin und Tamoxifen

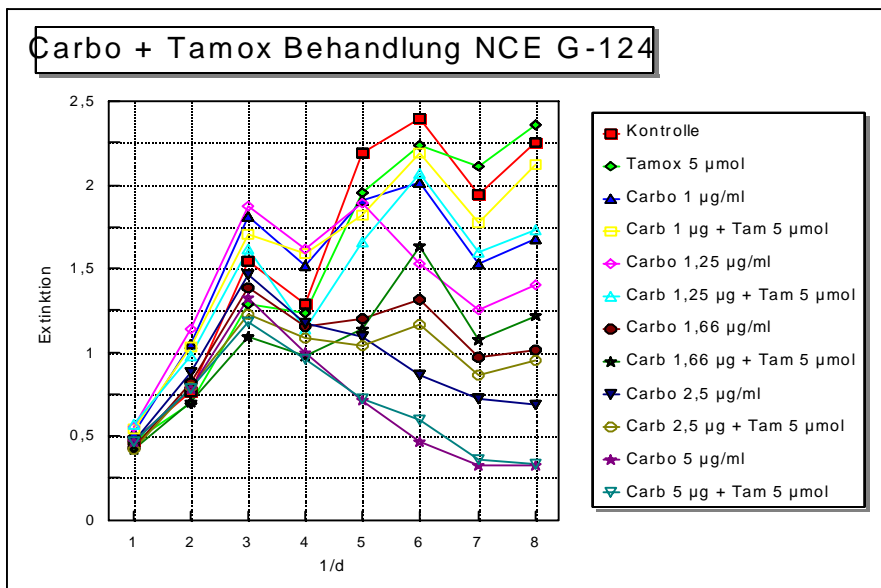


Abb.: 14 ; NCE G-124, Zielbehandlung mit Carboplatin und Tamoxifen

NCE G-122 ist insgesamt sensibler gegen die Behandlung mit Carboplatin. Im untersuchten Dosisintervall konnte aber auch hier keine verstärkende oder aufhebende Wirkung der Medikamente beobachtet werden.

Die zusätzlich untersuchte Zelllinie NCE G-124 zeigte eine mittlere Sensibilität gegenüber Carboplatin und Tamoxifen. Hier ist die Wirkung von Carboplatin allein minimal stärker als die der Kombinationsbehandlung. Die Unterschiede sind aber nicht signifikant ($p = 0,26$).

Zusammenfassend bleibt, daß die Kombination von Carboplatin mit Tamoxifen in vitro keinen statistisch signifikanten Vorteil in der Behandlung der untersuchten Zellen bringt.

3.1.5. Carboplatin, Tamoxifen und EMD 55900 in vitro

Die Dreifachkombination von Carboplatin, Tamoxifen und EMD 55900 brachte nach den vorliegenden Ergebnissen ebenfalls keinen stärkeren zytostatischen Effekt auf das Zellwachstum von NCE G-55, NCE G-122 und NCE G-124. Carboplatin in einer Konzentration von 5 µg/ml erwies sich wieder als zytotoxisch. Die Kombination mit Tamoxifen oder EMD 55900 steigern die Wirkung von Carboplatin nicht. Carboplatin in einer Konzentration von 1 µg/ml war nicht mehr zytostatisch, aber auch eine Kombination mit 2,5 und 5 µmolar Tamoxifen und 50 µg/ml EMD 55900 konnte die Wirkung von Carboplatin

nicht steigern. Die Dreifachkombination von Tamoxifen, EMD 55900 und Carboplatin ist sogar weniger effektiv, als die Zweierkombinationen miteinander. Möglicherweise ist das auf eine ineffektive Wirkung des Carboplatins zurückzuführen, da die anderen Medikamente das Zellwachstum teilweise inhibieren und die DNA Schäden des Carboplatins so besser repariert werden können.

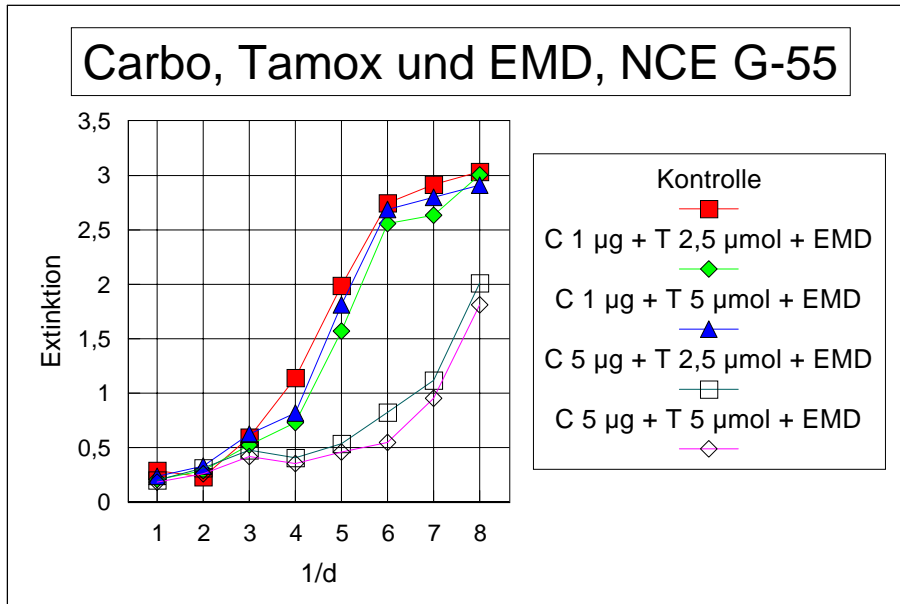


Abb.: 15; NCE G-55, Dreifachkombination Carboplatin, Tamoxifen und EMD 55900

3.2. Tierexperiment

3.2.1. in vivo Wachstum mit Carboplatin, Tamoxifen und EMD 55900

Es wurden zwei in vivo Versuche durchgeführt. Zuerst in der von Elliot publizierten Versuchsanordnung mit 50 mg/kg KG Carboplatin an den Tagen 14, 19 und 24 (Elliot, 1994), in Kombination mit Tamoxifen (Haran et al, 1994) und EMD 55900 (Westphal et al, 1991). Die Behandlung von NCE G-55 mit diesen Kombinationen in dieser Dosierung erwies sich als nicht erfolgreich. Eine signifikante Zytostase im Vergleich zur Kontrollgruppe war nicht nachzuweisen. Die Behandlungskombinationen mit Tamoxifen und EMD 55900 und Carboplatin und EMD 55900 proliferierten im Tumorzellenwachstum sogar stärker als die der Kontrollgruppe. Die histologische Untersuchung zeigte zwar ausgedehnte Nekroseherde, aber auch massiv proliferierende Tumorzellen.

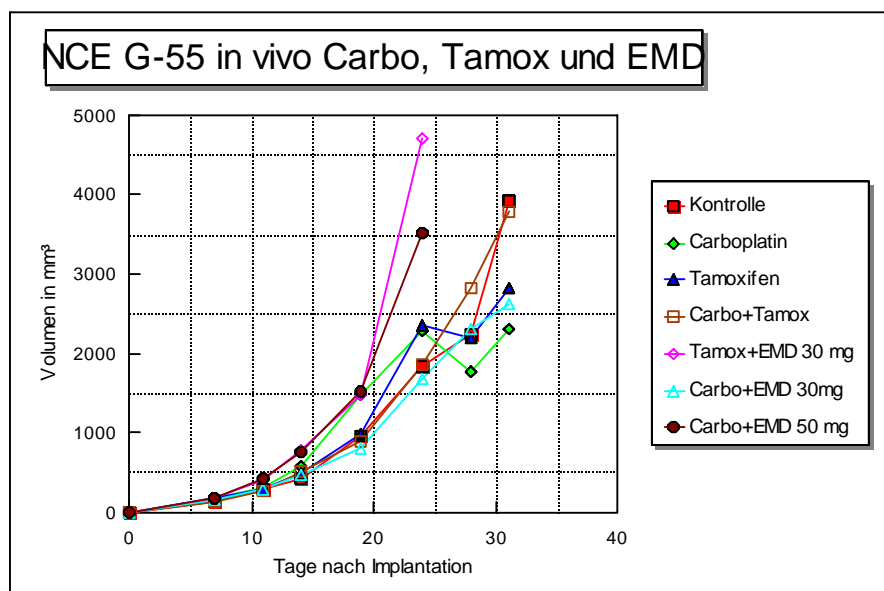


Abb.: 16 ; NCE G-55 in vivo Behandlung

(Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde der Übersicht halber verzichtet.)

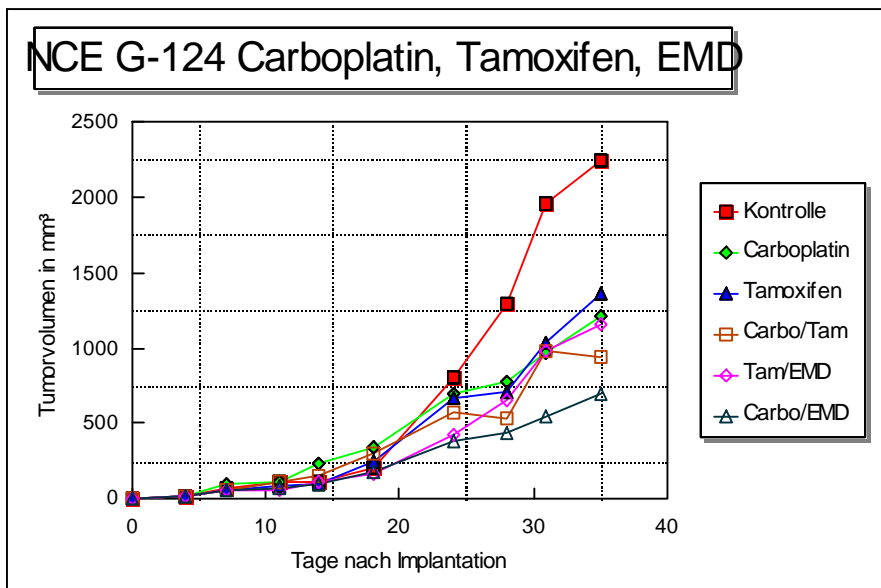


Abb.: 17 ; NCE G-124 in vivo Behandlung

Die vorhandene Tumormasse pro Maus war wahrscheinlich zu groß. Die zu Beginn der ersten Behandlung vorhandene Tumormasse von 500 mm³ im Mittel reichte aus, um unter dem Behandlungsregime ausreichend vitale Tumorzellen überleben zu lassen. Möglicherweise konnten nicht proliferierende Zellen in der Peripherie von Gefäßen von den Zytostatika nicht in toxischer Dosis erreicht werden.

Die Reaktion der mit EMD 55900 und Tamoxifen behandelten Tumore zeigte außerdem, daß in bestimmten Konzentrationen der Rezeptorantagonist einen proliferativen Effekt auf die Tumorklinie NCE G-55 hatte.

Bei der Behandlung der Tumorklinie NCE G-124 war die Kombinationsbehandlung der Einzelbehandlung mit Carboplatin überlegen. Unter der Behandlung mit Carboplatin und Tamoxifen, beziehungsweise unter der Behandlung mit Carboplatin und EMD 55900 konnte eine signifikante Wachstumshemmung beobachtet werden. Diese Zytostase war statistisch signifikant ($p < 0,01$) zur Kontrollgruppe (siehe tabellarischer Anhang). Tamoxifen konnte keine signifikante Zytostase induzieren. Die Unterschiede der Kombinationsbehandlungen zu Carboplatin waren jedoch nicht signifikant.

3.2.3. in vivo Wachstum mit Carboplatin und Tamoxifen

Nach Auswertung der Ergebnisse aus Versuch 3.2.2. wurden Carboplatin und Tamoxifen noch einmal untersucht. Carboplatin wurde in einer Konzentration von 50 mg/kg KG an den Tagen 7, 10 und 13 injiziert und Tamoxifen wieder als Tablette implantiert. Die gesteigerte Dosis mit Carboplatin in Kombination mit Tamoxifen war bei NCE G-55 erfolgreich. Das Tumorwachstum war nachhaltig gebremst. Die Heilung eines Tieres konnte jedoch bei dem Tumor NCE G-55 nicht erzielt werden. In der Behandlung von NCE G-55 ist Carboplatin allein nicht signifikant wirksam. Tamoxifen allein ist ebenfalls nicht signifikant wirksam zur Vergleichsgruppe. Das Wachstum des mit Carboplatin und Tamoxifen behandelten Tumors ist signifikant langsamer als das der Kontrollgruppe ($p < 0,01$).

Die Kombination von Carboplatin und Tamoxifen ist im Gegensatz zum in vitro Experiment erfolgreicher als die Einzelbehandlung mit Carboplatin. Möglicherweise beruht der Effekt auf der Wirkung der Zytostatikakombination auf die tumorversorgenden Gefäße wie bei der Tumorlinie NCE G-124. Die Kapillardichte wurde unter 3.3.2.2. mit Hilfe von v. Willebrand Faktor Antikörperfärbungen untersucht. Jedoch war der Tumor NCE -55 nicht auswertbar. (siehe auch 3.3.2.2. Kapillardichte, S. 45)

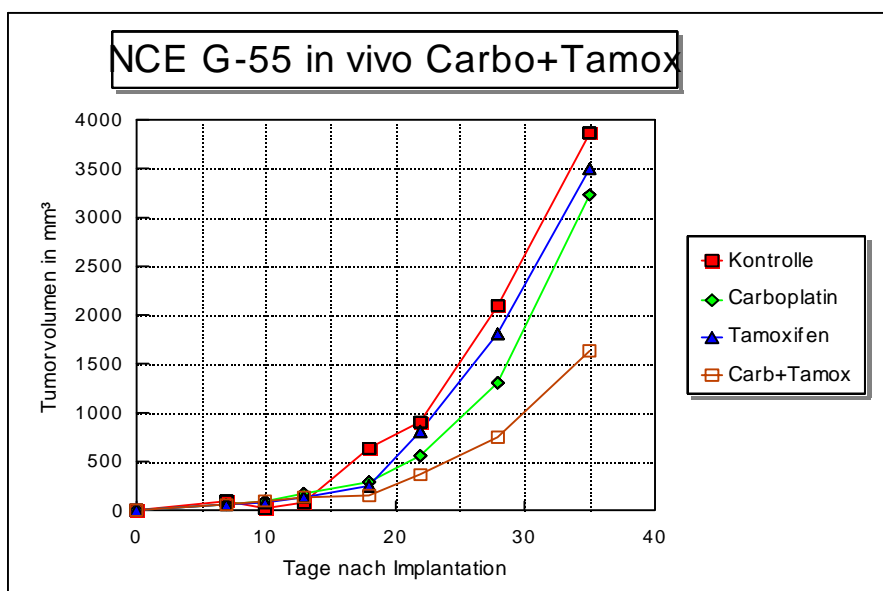


Abb.: 18 ; NCE G-55 in vivo Behandlung mit Carboplatin und Tamoxifen

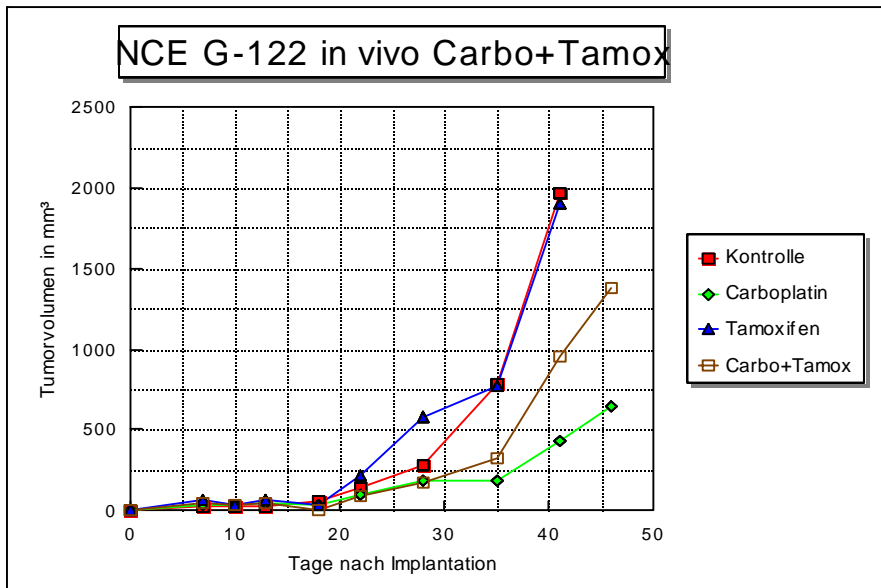


Abb.: 19 ; NCE G-122 in vivo Behandlung mit Carboplatin und Tamoxifen

Bei der dritten in vivo untersuchten Zelllinie NCE G-122 wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt. NCE G-122 wächst etwas langsamer als NCE G-55. Korrelierend zu den in vitro Ergebnissen erwies sich die ausschließliche Behandlung mit Carboplatin als wirksamer gegenüber der Kombination mit Tamoxifen. Nach gleicher Wachstumshemmung in den ersten 30 Tagen nach Implantation konnten sich die Zellen unter der Behandlung von Carboplatin und Tamoxifen schneller erholen als unter der Einzelbehandlung mit Carboplatin. Beide Gruppen, Carboplatin allein und die Kombination mit Tamoxifen, sind signifikant wirksam gegenüber der Kontrolle ($p < 0,01$) (siehe tabellarischer Anhang).

Tamoxifen erreicht auch hier keine signifikante Zytostase zur Kontrolle.

3.3. Histologie und Zytologie

3.3.1. In vitro Wachstumsmuster

Jede der drei untersuchten Zelllinien, NCE G-55, NCE G-122 und NCE G-124 zeigten in vitro ein spezifisches Wachstumsmuster.

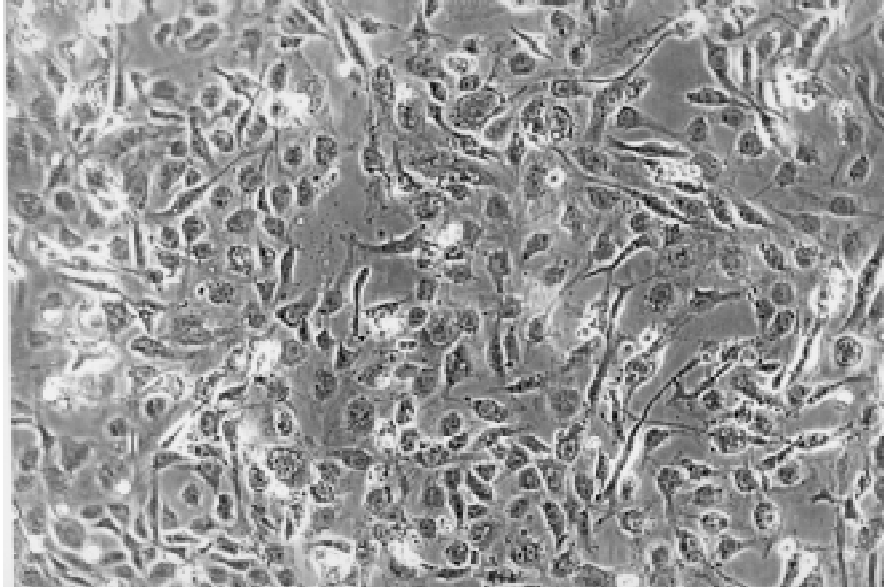


Abb.: 20 ; NCE G-55 in vitro 3. Passage, zahlreiche Mitosen

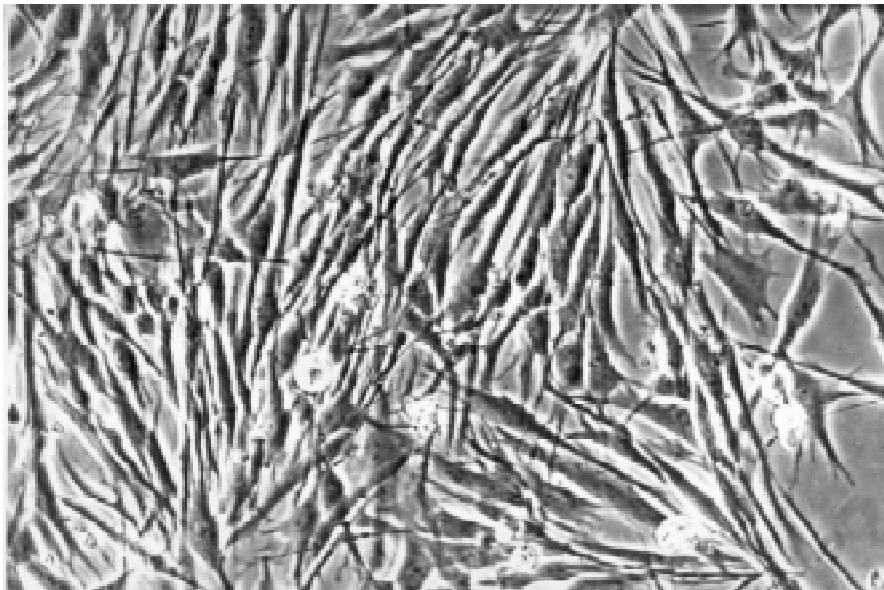


Abb.: 21 ; NCE G-122; in vitro, typisches Zellnest mit z.T. überlagernden Zellausläufern. NCE G-122 zeigt ein spindelförmiges Wachstum in vitro.

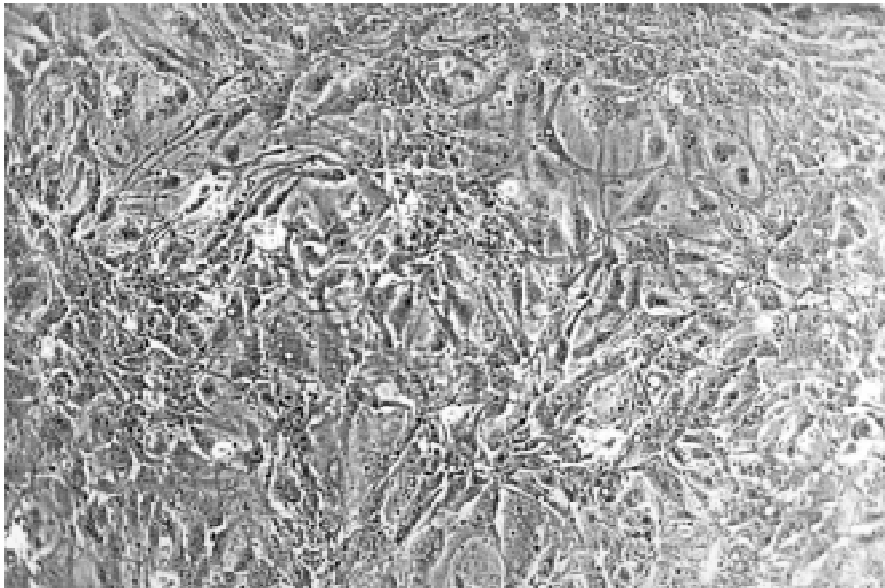


Abb.: 22 ; NCE G-124, in vitro. NCE G- 124 zeigte in vitro frühzeitig Kernvakuolen und abgestorbene und abgeschwommene Zellen.

Zunächst bildeten sich Zellnester, von den ein kontinuierliches Wachstum bis zu einem konfluenten Zellrasen ausging. Die Zellen wuchsen auch teilweise übereinander. Zellen die in das Medium abgeschwommen waren wurden beim Passagieren verworfen.

3.3.2.1. In vivo Wachstumsmuster

In vivo zeigten die untersuchten Tumore ein morphologisch eher ähnliches Wachstumsmuster. Die histologischen Schnitte durch den Tumor zeigten alle Kriterien eines hochmalignen Tumors. Eine verschobene Kern/Plasmarelation, Kernpolymorphie und -chromasie und Mitosen. In den Randgebieten der Tumore konnten Infiltrationen in das umgebende Fettgewebe und das Peritoneum der Maus beobachtet werden. Fernmetastasen waren nicht zu beobachten. Die Infiltration setzte auch erst sehr spät ein. Junge Transplantate bis ca 14 Tage wiesen eine bindegewebige Kapsel auf, die den Tumor umgab. Nach 14 Tagen konnten einzelne Infiltrationen, nach 21 Tagen konnten regelhaft Infiltrationen besonders in das Peritoneum beobachtet werden.

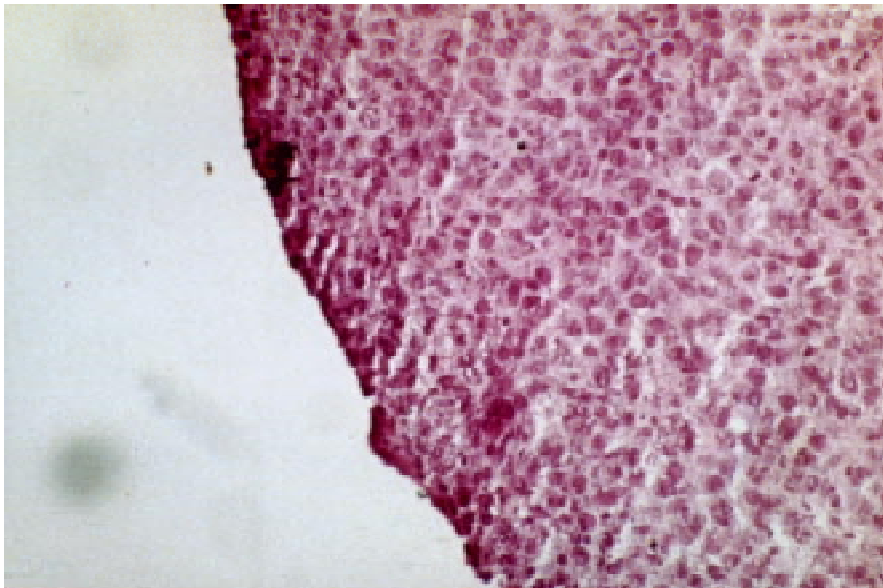


Abb.: 23 ; NCE G-55, ohne Behandlung, Randsaum, HE x200 Vergr.

Nekrosen konnten im ganzen Tumor mit Bevorzugung der Tumormitte beobachtet werden. Der Randsaum enthielt ein dichtes Gefäßnetz, vitale Tumorzellen und einen hohen Mib Index als Ausdruck eines schnellen Tumorwachstums. Diese Beobachtungen decken sich mit denen von Weidner, der die Vaskularisierung von malignen Tumoren untersuchte (Weidner, 1995).

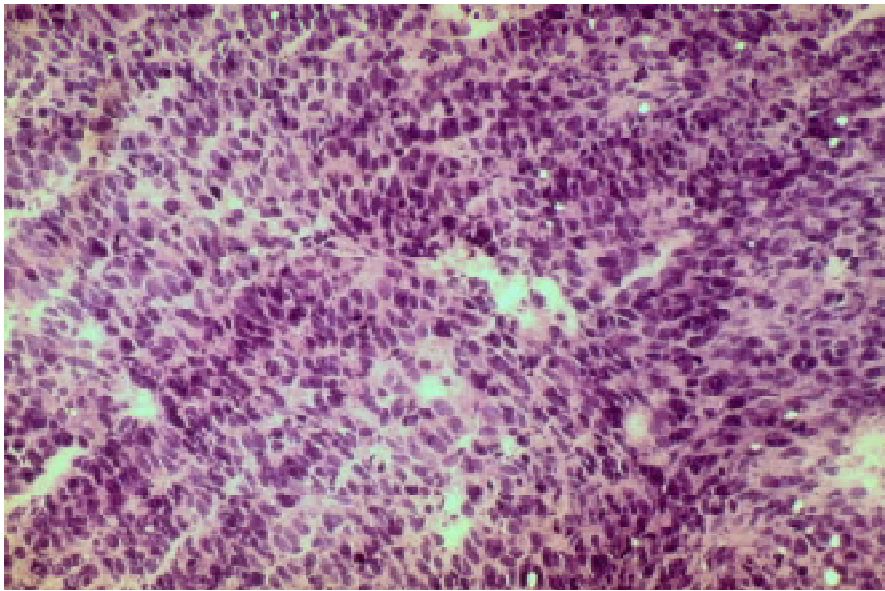


Abb.: 24 ; NCE G-122, ohne Behandlung, HE, x200 Vergr.

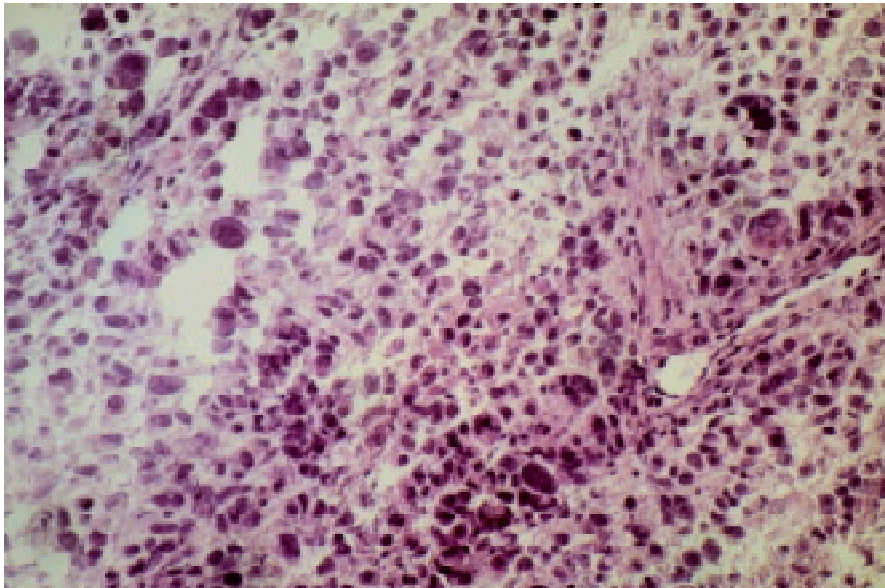


Abb.: 25 ; NCE G-124, ohne Behandlung, HE x200 Vergr.

3.3.2.2. Kapillardichte

Die Kapillardichte wurde nach der von Weidner etablierten Methode bestimmt (Weidner, 1994). Dabei ergab sich bei der untersuchten Tumorklinie NCE G-55 T, daß sie aufgrund eines kreuzreagierenden Antigens nicht ausgewertet werden konnte.

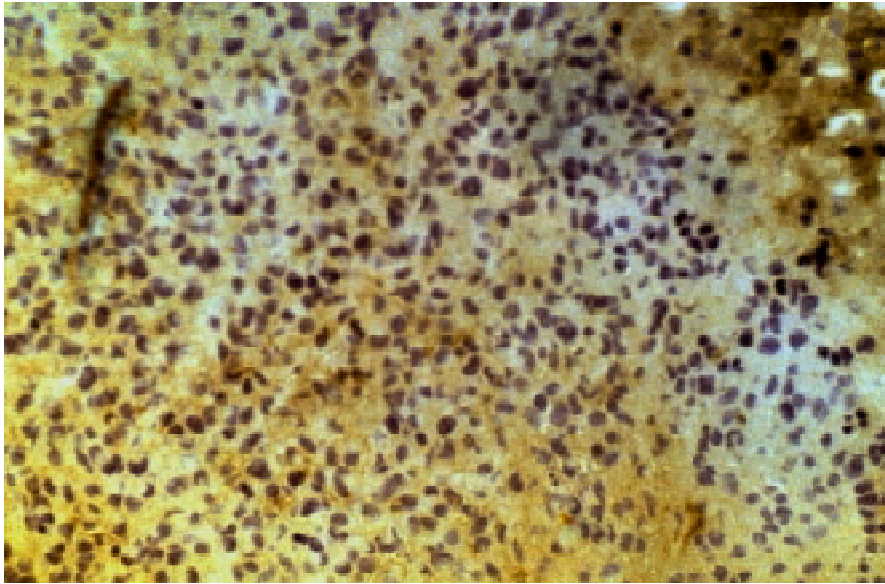


Abb.: 26 , NCE G-55-12 Carbo+Tamox, vWF Antikörper PAP Färbung, x200

Die Tumorklinie NCE G-122 T konnte nicht nach Weidners Methode ausgewertet werden, da durch die Behandlung viele Nekrosen induziert worden waren. Mit dem von Weidner vorgeschriebenen Messfeld von 0,74 mm² wurden auch immer nekrotische Areale erfasst. Nach Weidners Beobachtungen nimmt der Fehler in der Bestimmung der Kapillardichte überproportional zu, wenn von einem 0,74 mm² Zählfeld abgewichen wird (Weidner, 1995). Abweichend wurde der Tumor mit einem 0,185 mm² Zählfeld ausgewertet. Die Zahl der auswertbaren Tumore war jedoch zu klein, um statistisch sichere Ergebnisse zu erreichen. Die Behandlung mit Carboplatin induzierte die höchste Kapillardichte mit 14,6 K/Blf (Range 12-17). Die Kapillardichte unter der Behandlung mit Tamoxifen lag bei 8,1 K/Blf (Range 7-13), in der Kombination von Carboplatin und Tamoxifen bei 11,6 K/Blf (Range 8-18). Keines der Ergebnisse erreichte jedoch statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe mit 5,1 K/Blf (Range 4-9).

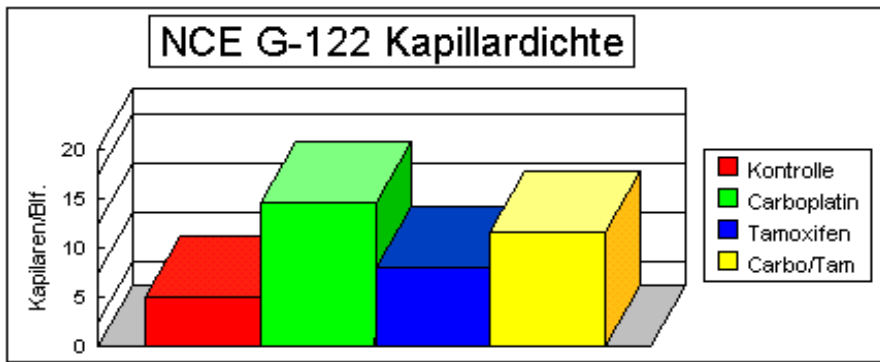


Abb.: 27 , NCE G-122 Kapillardichte mit einem 0,185 mm² Zählfeld

Die Ergebnisse für NCE G-124 T eraben eine höhere Kapillardichte bei den behandelten Tumoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ausgenommen war die Kombination von Carboplatin und Tamoxifen. Sie induzierte keine höhere Kapillardichte im Tumor als die Kontrolle (Kontrolle 46 K/Blf., Range 44-48; Carbo+Tamox 44,8 K/Blf, Range 25-62). Die alleinige Behandlung mit Tamoxifen induzierte die höchste Kapillardichte mit 100,7 K/Blf, (Range 81-128, p<0,01). Dieses Ergebnis ist signifikant höher als die Kapillardichte der Kontrollgruppe.

Unter der Behandlung mit Carboplatin allein wurde eine höhere Kapillardichte, mit 67,75 K/Blf, gezählt (Range 67-78, p=0,10). Die Behandlung mit Tamoxifen und EMD 55900 (65,8 K/Blf., Range 32-120, p=0,4) und die Behandlung mit Carboplatin und EMD 55900 (70,8 K/Blf, Range 29-122, p=0,36) zeigte auch höhere Kapillardichten. Die Ergebnisse erreichten aber nicht eine statistische Signifikanz.

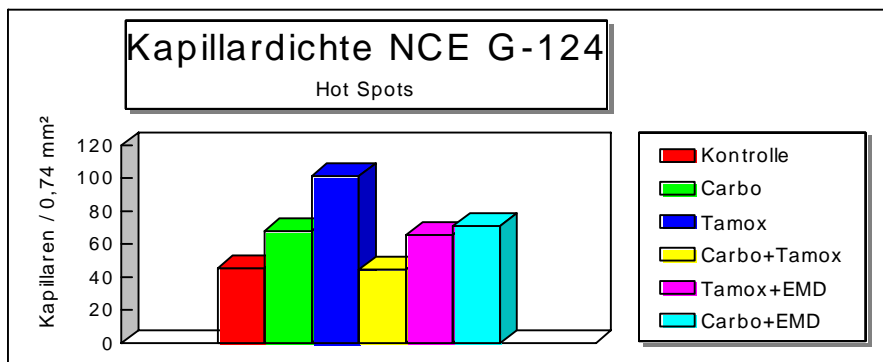


Abb.: 28 , NCE G-124 Kapillardichte, Hot Spots

Auch die Untersuchung der Gesamtgefäßdichte korrelierte zur Behandlungsart. Die Behandlung induzierte also nicht nur Areale mit besonders hoher Gefäßdichte, sondern auch die gesamt Gefäßdichte im untersuchten Tumor nahm zu.

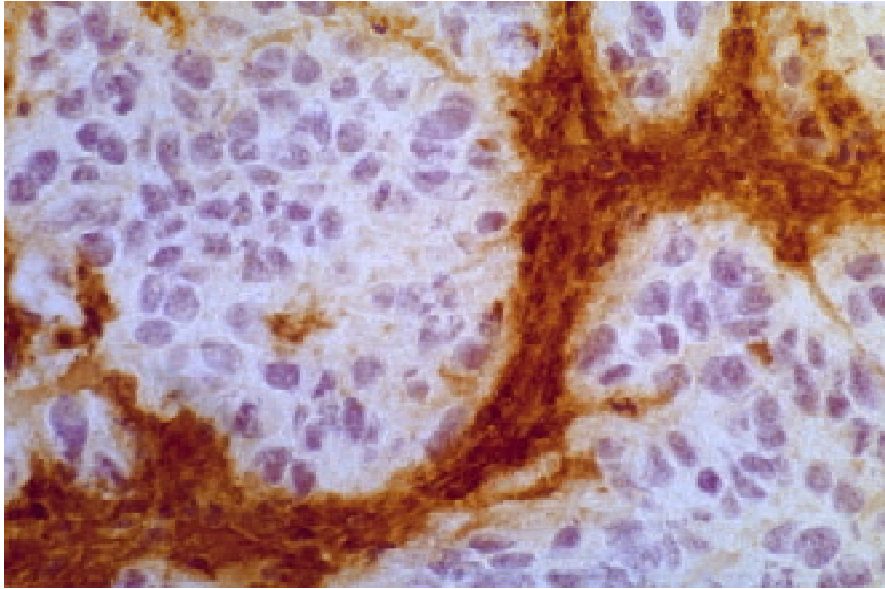


Abb.: 29 ,NCE G-124-9 Tamox, vWF Antikörper PAP Färbung, x400 Öl
Arteriole mit angeschnittenen Kapillaren

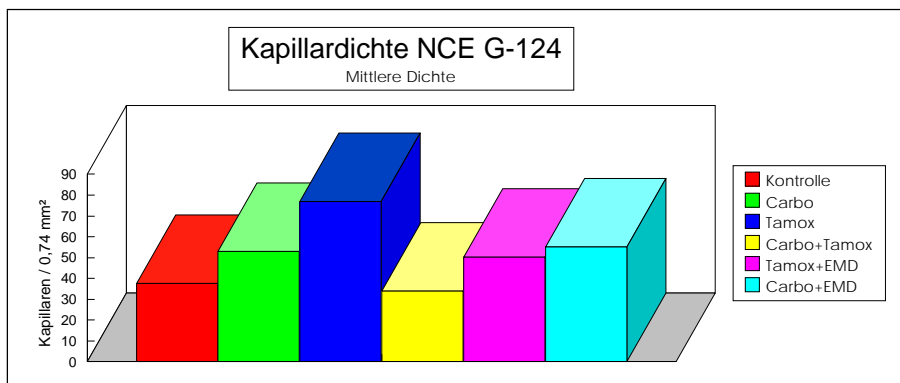


Abb.: 30, NCE G-124 Kapillardichte, mittlere Dichte

3.3.2.3. Mib Index (Ki 67 Proliferationsantigen)

Gängiges Verfahren in der Histopathologischen Beurteilung eines malignen Tumors ist der Mib Index. Auch hier konnte das Kernantigen Ki 67 in vivo nachgewiesen werden.

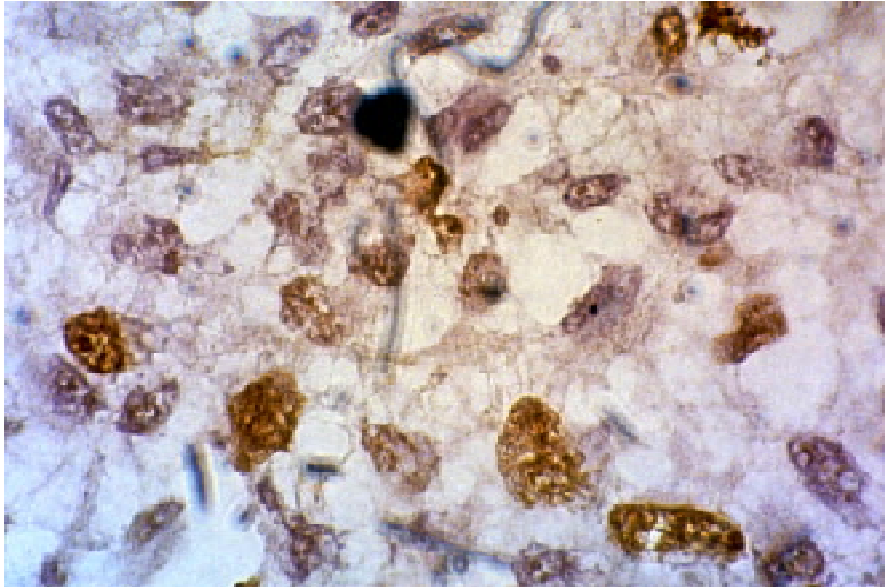


Abb.: 31 ; NCE G-55 Kontrollgruppe; Ki 67 Antikörper, PAP Färbung, x1000 Vergr.

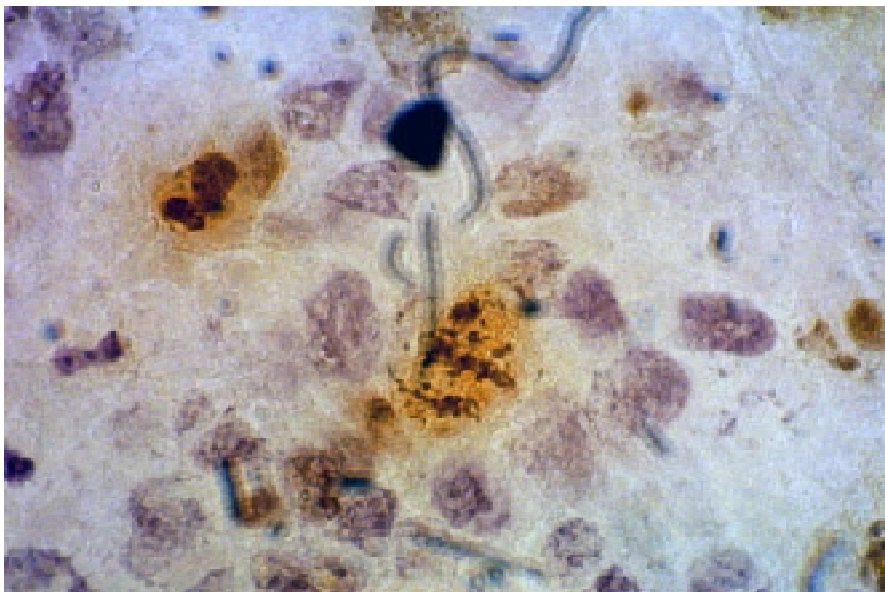


Abb.: 32 ; NCE G-122-1 Kontrollgruppe, Ki 67 Antikörper, PAP Färbung, x1000 Vergr.

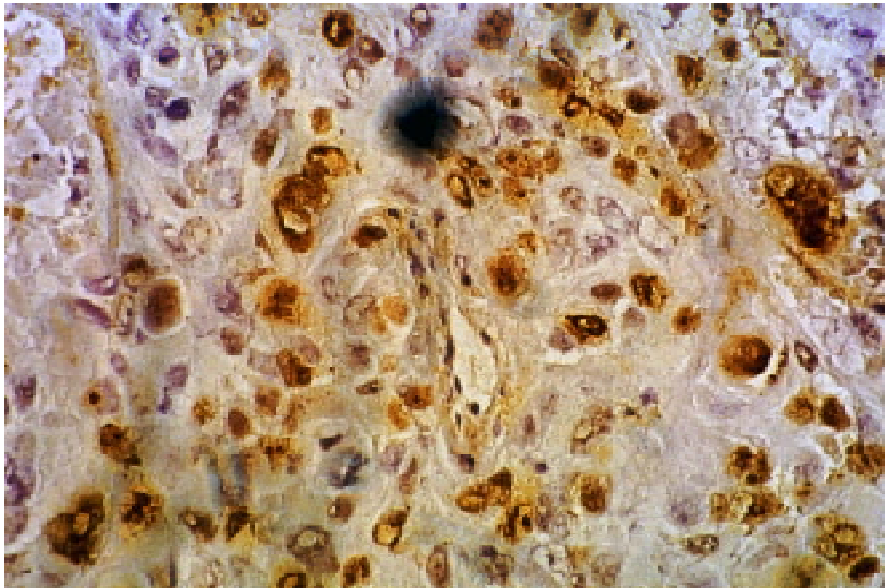


Abb.: 33 ,NCE G-124-12, Carbo+Tamox, Ki 67 Antikörper, PAP Färbung, x400 Vergr.
Umgebung eines Gefäßes mit hoher Dichte proliferierender Zellen.

Mib Index:

Tumor Nummer:	Mib Index:
NCE G-55 Kontrolle	48%
NCE G-55 Carboplatin	42%
NCE G-55 Tamoxifen	54%
NCE G-55 Carb+Tamox	45%
NCE G-55 Carbo+EMD	nicht auswertbar
NCE G-122 Kontrolle	42%
NCE G-122 Carboplatin	41%
NCE G-122 Tamoxifen	41%
NCE G-122 Carb+Tamox	42%
NCE G-124 Kontrolle	46%
NCE G-124 Carboplatin	49%
NCE G-124 Tamoxifen	54%
NCE G-124 Carb+Tamox	45%
NCE G-124 Carb+EMD	(49%) fraglich

In der Auswertung des Mib Indexes konnte besonders in der Umgebung der Gefäße, beziehungsweise der „neovascular hot spots“ eine besonders hohe Dichte an proliferierender Zellen beobachtet werden. Leider war diese Abhängigkeit der Proliferation von der Gefäßdichte nur beim untersuchten Tumor NCE G-124 auswertbar. Bei den Tumoren NCE G-55 und NCE G-122 konnte die Gefäßdichte nicht sicher bestimmt werden.

Die Tumore, die mit EMD 55900 behandelt waren, konnten nur erschwert und nicht sicher ausgewertet werden, da der verwendete Mib Antikörper murinen Ursprungs war und so die noch auf der Tumoroberfläche befindlichen Anti EGF Antikörper mit gefärbt wurden. Dieser Effekt war bei NCE G-55 am deutlichsten. Diese Tumorzelllinie exprimiert den EGF Rezeptor auch am stärksten (Hamel, 1994) im Vergleich zu NCE G-122 und NCE G-124. Die Unterschiede in den Mib Indices waren in keiner der untersuchten Zelllinien statistisch signifikant, so daß diese Beobachtung nur als Tendenz gewertet werden kann.

EGFR Rezeptordichte (nach Hamel, 1994) FACS Analyse:

NCE G-55: EGFR 25

NCE G-122: EGFR 5,2

NCE G-124: EGFR 4,1

Quotient aus der mittleren Fluoreszenz mit anti-EGFR mAb 5G3 und anti-HIV gp120 mAb 5B6, einem irrelevante Kontrollantikörper.

Die Bindung von EMD 55900 wurde qualitativ nachgewiesen (eigene Ergebnisse):

NCE G-55: +++

NCE G-122: +

NCE G-124: +

4. Diskussion

In der Behandlung der malignen hirneignen Tumoren ist als Standardtherapie die Operation und die nachfolgende Bestrahlung etabliert (Hildebrand, 1997).

Darüber hinaus wird eine Vielzahl von unterschiedlichen Therapieformen angewendet, so die Chemotherapie, Immuntherapie oder Genterapie, wobei die Therapieformen zum großen Teil noch experimentell sind und sich keine echten Standards etabliert haben, auch nicht in der Chemotherapie. Eine Ausnahme bildet die Chemotherapie des anaplastischen Oligodendroglioms (Cairncross, 1994). In dem Bereich der experimentellen adjuvanten Therapieformen gibt es auf allen Bereichen eine Vielzahl neuer Studien, so auch im Bereich der Chemotherapie. Zum Teil bestehen diese darin, neue Dosierungsschemen und Applikationsschemen auszuprobieren, zum Teil werden echt neue Substanzen ausgetestet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche Substanzen einzeln und in Kombination untersucht, deren Wirkungsmechanismen völlig unterschiedlich sind, und für deren Kombination es zumindest in der Literatur rechtfertigende Hinweise gibt (McClay, 1992; Mohammed, 1995). Das Carboplatin, als klassisches Chemotherapeutikum in der Behandlung vieler maligner Tumore etabliert, bindet an die DNA und verursacht Quervernetzungen der Doppelstränge (Williams, 1995). In dieser Wirkungsweise ist das Carboplatin den BCNU und ACNU ähnlich, wird aber in der Hirntumorthherapie insgesamt wesentlich weniger eingesetzt (Kunze, 1992).

Das ebenfalls untersuchte Tamoxifen ist eigentlich ein aus der Behandlung des Mammakarzinoms bekanntes Antiöstrogen, hat aber zugleich in höherer Dosierung eine inhibierende Wirkung auf die Proteinkinase C. Diese ist in vielen Gliomen stark erhöht, so daß bereits größere klinische Studien zur Wirksamkeit von Proteinkinase C Inhibitoren, insbesondere Tamoxifen, an Patienten mit Glioblastomrezidiven aber auch Primärtumoren (Mastronardi, 1996) und anderen Malignomen, zum Beispiel Melanomen, unternommen worden sind (McClay, 1993, 1996; Couldwell, 1994; Chen 1994; Battaini, 1994; Haran, 1994). Auch konnte ein Effekt von Tamoxifen auf das Wachstum, die Migration und die Invasion maligner Tumore beobachtet werden (Hoelting, 1995).

Monoklare Antikörper als alternative Moleküle finden in der Tumorthherapie relativ selten Verwendung. Normalerweise werden diese Moleküle benutzt, um in Form eines radioaktiven Isotops eine therapeutische Strahlendosis lokal zu applizieren. Durch die Antikörperbindung wird eine länger dauernde lokale Anreicherung des Strahlers erreicht, was insbesondere für

kurzstreckige Strahler ein sinnvolles Konzept zu sein scheint. Die Antikörpermoleküle selber können ansonsten durch die Unterbrechung eines autokrinen Stimulationszyklus wirken, wenn es sich um antagonistische Antikörper an einem Wachstumsrezeptor handelt (Westphal, 1993; Miyaji, 1994; Aboud-Pirak, 1988) oder sie wirken durch Ingangsetzung einer Antikörper vermittelten Immunreaktion (Sutter, 1991; Modjtahedi, 1994).

Als Kombination gibt es Berichte über eine Synergie zwischen Carboplatin und Tamoxifen bei der Behandlung maligner Gliome (McClay, 1993) und eine Synergie in der Kombinationstherapie von Carboplatin und Anti HER2 Antikörpern beim Ovarialkarzinom. (Pietras, 1995) Untersuchungen zur Kombinationstherapie mit einem Anti EGF Rezeptorantikörper liegen noch nicht vor. Hier gibt es lediglich auch menschliche in vivo Daten, ohne daß hier über einen Wirkmechanismus der entweder in einer T-Zellabhängigen Zytolyse bestehen könnte oder aber in einer Veränderung der Rezeptoraktivierung in vivo irgendwelche Daten vorlägen (Weidner, 1994; Kirchner, 1996).

Die Untersuchung der Einzelsubstanzen im Rahmen dieser Arbeit in vitro zeigen einen erwarteten Effekt von Carboplatin und Tamoxifen allerdings in hohen Dosierungen und bei optimaler Pharmakokinetik, das heißt Erreichbarkeit der Zellen für die therapeutischen Substanzen. Im Gegensatz dazu konnte mit dem Antikörper gegen den EGF Rezeptor, der auch klinisch eingesetzt worden ist (EMD 55900), in vitro auch in hohen Dosierungen kein Effekt gesehen werden. Dies spricht dafür, daß bei den Zellen keine konstitutionelle autokrine Aktivierung vorliegt, die die Zellproliferation unterhält. Bei den Kombinationstherapien mit Carboplatin und Tamoxifen stellt es sich heraus, daß das Carboplatin die deutlich effektivere Substanz war und jede proliferationsinhibierende Wirkung dabei allein auf das Carboplatin zurück geführt werden konnte ohne, daß es durch Tamoxifenzugabe zu einer stärkenden Wirkung kam. Ebenso wenig konnte das Carboplatin auf das Tamoxifen synergistisch wirken. Diese Resultate schließen eine mögliche Wirkungsverstärkung in vivo nicht aus, da in vivo die Tumorangio-genese noch als weiterer Angriffspunkt hinzukommt (Weidner, 1994), zumal nach den vorliegenden Ergebnissen in vivo Abweichungen in der Kapillardichte der behandelten Tumore gemessen werden konnten. Die schließlich untersuchte Dreierkombination, in der der Antikörper gegen den EGF Rezeptor hinzugenommen wurde, zeigte ebenfalls keine Wirkungssteigerung auf die Proliferationshemmung im Vergleich zur Testung der Einzelsubstanzen. Man kann daraus nur schließen, daß EMD 55900, ohne selber eine Proliferationshemmung zu bewirken, die Aktivität intrazellulärer Proteinkinasen verändern

kann, wobei eine solche Modulation nicht ausreicht, um an der Wirkung von Carboplatin oder Tamoxifen in positiver oder negativer Richtung etwas zu verändern.

Die Interpretation der in vivo Untersuchungen gestaltet sich schwieriger, da die Tumormodelle sich deutlich unterschiedlich verhalten. Die Hinzunahme des Anti EGF Rezeptorantikörpers zu Tamoxifen und Carboplatin in jeweils nur ausgetesteten Zweierkombinationen hat in NCE G-55 und NCE G-124 deutlich unterschiedliche Wirkungen, wobei in der NCE G-55 der Antikörper eine eher Wachstums stimulierende Wirkung zeigt und in der NCE G-124 eine deutliche Wirkungsverstärkung des Carboplatins durch Kombination mit dem Antikörper erreicht werden kann. Da man im subkutanen Nacktmausmodell davon ausgehen kann, daß keine T-Zell abhängige Zytolyse stattfindet und zugleich auch experimentell in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, daß der EMD 55900 sich immunhistochemisch als an die Tumorzellen gebunden nachweisen läßt, sind ausschließlich immunsystem unabhängige Wirkungen austestbar, ohne daß sich aus den zuvor durchgeführten in vitro Experimenten der Untersuchung der Tumervaskulation oder der Rezeptoranalytik eine Erklärung ableiten läßt. Für diese Wirkung, die zum einen zwischen den Tumormodellen zum anderen zwischen der in vitro Situation und in vivo Situation unterschiedlich ist, scheinen sich hier die selben Phänomene wiederzuspiegeln wie auch in der klinischen Situation, wo für die unterschiedlichsten Therapien immer eine Gruppe Responder und eine Gruppe Nonresponder entstehen ohne, daß dafür bereits Prädiktorensysteme definiert wären (Westphal, 1994). Die mit Dosissteigerung für Carboplatin und Tamoxifen wiederholten Versuche, bei denen aber der EGF Rezeptor-Antikörper fortgelassen wurde, zeigen wieder diesen Unterschied zwischen den Tumormodellen, wobei in der NCE G-55 der gewünschte, Wirksamkeitsverstärkende Effekt zwischen Carboplatin und Tamoxifen auftritt, der aber in der NCE G-122 durch die Kombination von Carboplatin und Tamoxifen eher aufgehoben wird. Dieser Effekt ist nicht erklärbar durch die Effekte auf die Tumervaskularisation und wird nicht in dem ebenfalls mitbestimmten MIB Index reflektiert. Er entspricht aber den auch in vivo in einer klinischen Studie mit Carboplatin und Tamoxifen gemachten Beobachtungen, wo unter dieser Therapie bei einigen Patienten zu einem raschen Tumorwachstum gekommen ist (Puchner et al, unveröffentlichte Ergebnisse).

Im Rahmen dieser Arbeit ist versucht worden drei therapeutische Ansätze, die, jeder für sich, klinisch bereits in die Therapie der malignen Gliome Eingang gefunden haben, auf ihre Kombinationsfähigkeit zu testen. Auf Grund klinischer Studien in anderen Tumorintitäten zum

Teil aber auch in Gliomen ist hinreichend Anlaß gegeben, gerade diese Kombinationen zu überprüfen. Das Ergebnis ist insofern enttäuschend, als daß sich kein einheitliches Reaktionsmuster für die Substanzen sowohl im Vergleich in vitro an unterschiedlichen Tumorzelllinien als auch im Vergleich der in vitro Situation mit in vivo Modellen finden läßt. Die unterschiedlichen Reaktionsweisen der Tumoren lassen die Vermutung zu, daß auch Patienten auf derartige Kombinationen durchaus unterschiedlich reagieren würden und daß insofern begleitende Untersuchungen zu klinischen Studien wünschenswert erscheinen. Es ist kein Zweifel daran, daß Carboplatin sicherlich allein die wirksamste Substanz ist, wobei aber durch in vivo Toxizität natürliche Grenzen gesetzt sind. Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde sprechen nicht dafür, daß die Kombination mit einem EGF Rezeptorantikörper, wie ja schon klinisch getestet wurde, sinnvoll erscheinen zumindest nicht unabhängig von einer immunologischen Therapiekomponente. Die unter optimalen pharmakokinetischen Bedingungen erhobenen Befunde, daß heißt in vitro und in einem subkutanen Xenotransplantat sind nicht so vielversprechend, daß ein intrakranielles Modell entwickelt werden müßte, um diese Befunde noch zu überprüfen, da in einem solchen Modell die Pharmakokinetik auf alle Fälle deutlich weniger optimal sein würde und auch dann immer noch nicht die sehr komplizierte Tumorphysiologie eines menschlichen Glioblastoms widerspiegeln kann.

5. Literaturnachweis

E. About-Pirak, E. Hurwitz, M. Pirak, F. Bellot, J. Schlessinger, M. Sela
Efficacy of Antibodies to Epidermal Growth Factor Receptor Against KB Carcinoma In Vitro
and In Nude Mice

J. of the National Cancer Institute, Vol. 80 No. 20, 1988, 1605-1611

R. Aron, G. Elion, O. Colvin, M. Graham, S. Keir, D. Bigner, H. Friedmann

Busulfan therapy of central nervous system xenografts in atymic mice

Cancer Chemotherapy and Pharmacology (1994) 35; 127-131

S. Bacus, A. Gudkov, C. Zelnick, D. Chin, R. Stern, I. Stancovski, E. Peles, N. Ben-Baruch,

H. Farbstein, R. Lupu, D. Wen, M. Sela, Y. Yarden

Neu Differentiation Factor (Heregulin) Induces Expression of Intracellular Adhesion

Molecule 1: Implications for Mammary Tumors

Cancer Research 53, 5251-5261, 1993

G. Baltuch, G. Shenouda, A. Langleben et al

High dose tamoxifen in the treatment of recurrent high grade glioma

Can. J. Neurol. Sci. 20 (1993) 186-170

F. Battaini, A. Pascale, L. Lucchi, M. Racchi, S. Bergamaschi, M. Parenti, W. Wetsel, S.

Govoni, M. Trabucchi; Expression and Regulation of Calcium independent Protein Kinase C in

NG 108-15 cell differentiation

Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 203, No. 3, 1994, 1423-1431

D. Bigner, M. Brown, R. Coleman, et al

Phase I studies of treatment of malignant gliomas and neoplastic meningitis with 131

radiolabeled monoclonal antibodies

J. Neurooncol. 24 (1995) 109-122

G. Cairncross, D. Macdonald, S. Ludwig, D. Lee, T. Cascino, J. Bruckner, D. Fulton, E. Dropcho, D. Stewart, C. Schold et al
Chemotherapy for anaplastic oligodendroglioma. National Cancer Institute of Canada Clinical Trial Group
Journal of Clinical Oncology, 1994 Oct; 12(19): 2013-21

Ching-Chow Chen
Effects of Ca^{2+} on the activation of conventional and new PKC isozymes and on TPA and endothelin-1 induced translocations of these isozymes in intact cells
FEBS Letters 348 (1994) 21-26

W. Couldwell, D. Hinton, S. He, T. Chen, I. Sebat, M. Weiss, R. Law
Protein kinase C inhibitors induce apoptosis in human malignant glioma cell lines
FEBS Letters 345 (1994) 43-46

C.-J. Estler
Zytostatika
Pharmakologie und Toxikologie, S. 539 ff, 1992

W. Elliot, B. Roberts, C. Howard, W. Leopold
Chemotherapy with Carboplatin in Combination with Standard Agents against Murine Tumors in Vivo
Cancer Research 54, 4412-4418, 1994

Z. Friedman
The antitumor agent Tamoxifen inhibits breakdown of polyphosphoinositides in GH4C1 cells
J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Vol. 271, No. 1, 1994, 238-245

E. Haran, A. Maretzek, I. Goldberg, A. Horowitz, H. Degani
Tamoxifen Enhances Cell Death in Implanted MCF7 Breast Cancer by Inhibiting Endothelium Growth
Cancer Research 54, 5511-5514, 1994

J. Hildebrand, O. Dewitte, P.Y. Dietrich, N. de Tribolet

Management of Malignant Brain Tumors

European Neurology, 1997;38:238-253

T. Hoelting, A. Siperstein, Q. Duh, O. Clark

Tamoxifen inhibits growth, migration and invasion of human follicular and papillary thyroid cancer cells in vitro and in vivo

J. of Clinical Endocrinology and Metabolism, Vol. 80, No. 1, 1995, 308-313

H. Kirchner, J. Atzpodien, H. Poliwoda

Chemo/Immuntherapie beim fortgeschrittenen malignen Melanom

Medizinische Klinik 91 (1996), 44-49

P. Mallmann, D. Koenig

Einführung in die Immunologie

Heilberufe 46, Heft Nr. 2, 1994

L. Mastronardi, J. Farah, F. Puzzilli, R. Qasho, P. Lunardi

Clinical and radiographic stabilization of intracranial glioblastoma

J of Neurosurgical Sciences June 1996, 40(2), 129-133

E. McClay, K. Albright, J. Jones, R. Christen, S. Howell

Modulation of cisplatin resistance in human malignant melanoma cells

Cancer Research 53: 6790-6796, 1992

E. McClay, K. Albright, J. Jones, R. Christen, S. Howell

Tamoxifen Modulation of Cisplatin Cytotoxicity in Human Malignancies

Int. J. Cancer: 55, 1018-1022 (1993)

E. McClay, J. Jones, P. Winski, K. Albright, R. Christen, S. Howell
Determinants of Tamoxifen Sensitivity Control the Nature of Synergistic Interaction between
Tamoxifen and Cisplatin
Cancer Research 56, 3993-3997 (1996)

K. Miyaji, E. Tani, H. Shindo, A. Nakano, T. Tokunaga
Effect of tyrphostin on cell growth and tyrosin kinase activity of epidermal growth factor
receptor in human gliomas
Journal of Neurosurgery 81: 411-419, 1994

H. Modjtahedi, S. Eccles, J. Sandle, G. Box, J. Titley, C. Dean
Differentiation or Immune Destruction: Two Pathways for Therapy of Squamous Cell
Carcinomas with Antibodies to the Epidermal Growth Factor Receptor
Cancer Research 54, 1695-1701, 1994

M. Mohammed, A. Photiou, P. Shah, S. Retsas
Activity of platinum drugs against melanoma cell lines
Anticancer Research 15: 1319-1326, 1995

R. Pietras, J. Arboleda, D. Reese, N. Wongvipat, M. Pegram, L. Ramos, C. Gorman, M.
Sliwkowski, D. Slamon
Her-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent
growth in human breast cancer cells
Oncogene 1995 Jun 15; 10 (12): 2435-46

R. Pietras, B. Fendly, V. Chazin, Pegram, S. Howell, D. Slamon
Antibody to Her2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian
cancer cells
Oncogene 1994 Jul 9;(7); 1829-38

Y. Saikawa, T. Kubota, T. Kuo, H. Tanino, S. Kase, T. Furukawa, M. Watanabe, K. Ishibiki, M. Ktajima, R. Hoffman; Combined effects of 5-Fu and Carboplatin against human gastric cancer cell lines in vitro and in vivo
Anticancer Research 13: 461-464 (1993)

S. Sharp, P. Mistry, M. Valenti, A. Bryant, L. Kelland
Selective potentiation of platinum drug cytotoxicity in cisplatin sensitive and resistant human ovarian carcinoma cell lines by amphotericin B
Cancer Chemotherapy and Pharmacology (1994) 35; 137-143

M. Shepard, G. Lewis, J. Sarup, B. Fendly, D. Maneval, J. Mosdenti, I. Figari, C. Kotts, M. Palladino, A. Ullrich, D. Slamon
Monoclonal Antibody Therapy of Human Cancer
J. of Clinical Immunology, Vol. 11, No. 3, 1991

M. Sliwkowski, G. Schaefer, R. Akita, J. Lofgren, D. Fitzpatrick, A. Nuijens, B. Fendly, R. Cerione, R. Vandlen, K. Carraway
Coexpression of erbB2 and erbB3 Proteins Reconstitutes a High Affinity Receptor for Heregulin
The Journal of Biological Chemistry, 1994

M. Treskes, E. Boven, A. van de Loosdrecht, J. Wijfels, J. Cloos, G. Peters, H. Pinedo, W. van der Vijgh
Effect of the Modulating Agent WR2721 on Myelotoxicity and Antitumour Activity in Carboplatin treated Mice
European J. of Cancer, Vol. 30A, No. 2, 183-187, 1994

A. Ullrich, J. Schlessinger
Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity
Cell 61: 203-212, 1990

N. Weidner

Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessels density within breast carcinoma and other solid tumors

Breast Cancer Research and Treatment 36: 169-180, 1995

N. Weidner, G. Gasparini

Determination of epidermal growth factor receptor provides additional prognostic information to measuring tumor angiogenesis in breast carcinoma patients

Breast Cancer research and Treatment 29: 97-107, 1994

M. Westphal, H. D. Herrmann, Hirntumore

Lehrbuch der Neurologie, Prof. Dr. K. Kunze (Hrsg.) ; Thieme Verlag, 1992

M. Westphal, W. Hamel, D. Zirkel, H. D. Herrmann, T. Bilzer, G. Reifenberger, R. Schober, W. Wechsler, F. K. Albert, J. Behnke, G. Fries, D. Keller, M. Messing, P. Stasiecki

Epidermal Growth Faktor Receptor Expression in Human Malignant Glioma

Recent Results Cancer Res. 135 (1994): 171-84

M. Westphal, M. Hänsel, W. Hamel, R. Kunzmann, F. Hölzel

Karyotype Analyses of 20 Human Glioma Cell Lines

Acta Neurochirurgica, (1994) 126: 17-26

P. Williams, W. Henner, S. Roman-Goldstein, A. Dahlborg, R. Brummett, M. Tableman,

B. Dana, E. Neuwelt

Toxicity and Efficacy of Carboplatin and Etoposide in Conjunction with the Disruption of the Blood-Brain Tumor Barrier in the Treatment of Intracranial Neoplasms

Neurosurgery, Vol. 37, No. 1, 1995

W. Yue, D. Zhou, S. Chen, A. Brodie

A New nude Mouse Model for Postmenopausal Breast Cancer Using MCF-7 Cells Transfected with the Human Aromatase Gene

Cancer Research 54, 5092-5095, 1994

6. Verwendete Abkürzungen

Abb.:	Abbildung Nummer:
Abk.	Abkürzung
AK	Antikörper
bzw.	beziehungsweise
Ca.	Cirka
Cat.Nr.:	Katalog Nummer
Carbo	Carboplatin
CCT	Craniale Computer Tomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epithelic Growth Factor
EGFR	Epithelic Growth Factor Receptor
EMD	EMD 55900 (Merck)
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxillin Eosin Färbung
HER2	Heregulin Rezeptor 2
HER3	Heregulin Rezeptor 3
IGF	Insulin like Growth Factor
IgG2a	Immunglobulin Klasse G2a
IL-2	Interleukin 2
K/Blf	Kapillaren pro Bildfeld
Ki 67 / Mib	Kernproliferation assoziiertes Antigen
KOF	Körperoberfläche
LAK-Zellen	Lymphokin aktivierte Killerzellen
m.	männlich
MEM	Earle´s minimal essential Serum
MgCl	Magnesiumchlorid
MHC	Haupt Histokompatibilitäts Komplex
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NCE	Neurochirurgie Eppendorf
NaCl	Natrium Chlorid
PAP	Peroxidase Anti Peroxidase Färbung

PTK	Protein Thyrosin Kinase
PKS	Protein Kinase
PKC	Protein Kinase C
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polimerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
Tamox	Tamoxifen
TBS	Tris buffered Saline
UV	Ultraviolettlicht
vWF	von Willebrand Faktor
v.	von
w.	weiblich
WHO	Welt Gesundheits Organisation
z.T.	zum Teil
z.Zt.	zur Zeit
($p < 0,01$)	Student T-Test mit dem Ergebnis kleiner 0,01

Danksagungen

Ich danke Herrn Professor Dr. H.-D. Herrmann und Herrn PD Dr. med. M. Westphal für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. Den Mitarbeitern des Labors für Hirntumorbiologie, besonders den MTA´s für die praktischen Anleitungen bei den Experimenten und die Unterstützung im Bereich der Zellkulturen. Den Mitarbeitern der Tierhaltung Eppendorf für die Assistenz bei Eingriffen und die Pflege der Tiere. Herrn Dr. A. Giese und Frau Dr. K. Lamszus für die praktischen Tips und der Abteilung für Neuropathologie für viele Gespräche und die freundliche Unterstützung in der histologische Auswertung der Ergebnisse.

Besonders möchte ich aber meiner Frau danken für die viele Geduld.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Markus Grebe
Geburtsdatum	8. Februar 1970
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
Kinder	zwei

Ausbildungsdaten

Schule	
1976 - 1980	Grundschule Ernst-Bergeest-Weg
1980 - 1989	Gymnasium Heisenberg
	Allgemeine Hochschulreife Note: 2,8
Hochschulstudium	
4/1991 -3/1997	Universität Hamburg
	Studium der Medizin
25.4.1997	Abschluß des Studiums Note: gut

Werdegang

20.5.1997-	Tätigkeit als Arzt im Praktikum
	Martin Luther Krankenhaus Zeven
	Abt. für Gynäkologie und Geburtshilfe
	L.A. Dr. med. E. Wiegers

1.) Kontrolle

	Platte 1.1	1.2	1.3	Platte 2.1	2.2	2.3	Mittelwert	Standardabw
A	0,278	0,281	0,284	0,282	0,323	0,284	0,289	0,0154883
B	0,107	0,131	0,325	0,475	0,126		0,233	0,1447458
C	0,355	0,549	0,612	0,781	0,643	0,638	0,596	0,1282857
D	0,875	1,127	0,950	1,324	1,244	1,331	1,142	0,1768365
E	1,102	1,836	1,851	2,407	2,390	2,354	1,990	0,4651104
F	2,494	2,712	2,679	2,584	3,167	2,835	2,745	0,2162371
G	2,815	2,746	2,888	2,958	2,974	3,121	2,917	0,1204381
H	2,985	3,097	2,967	3,058	3,146	2,952	3,034	0,0715342

2.) Carboplatin 5 µg/ml

	1.4	1.5	1.6	Mittelwert	Standardabw
A	0,268	0,282	0,296	0,282	0,011431
B	0,337	0,344	0,353	0,345	0,006549
C	0,426	0,439	0,468	0,444	0,0175563
D	0,375	0,357	0,311	0,348	0,0269485
E	0,328	0,340	0,358	0,342	0,0123288
F	0,257	0,327	0,416	0,333	0,0650658
G	0,344	0,333	0,318	0,332	0,0106562
H	0,442	0,549	0,419	0,470	0,0566451

3.) Carboplatin 1 µg/ml

	2.4	2.5	2.6	Mittelwert	Standardabw
A	0,291	0,298	0,325	0,305	0,0146591
B	0,105	0,169	0,441	0,238	0,1456693
C	0,347	0,667	0,825	0,613	0,1988433
D	0,848	0,872	0,955	0,892	0,0458427
E	2,034	2,021	1,909	1,988	0,056113
F	2,982	2,818	2,804	2,868	0,0808125
G	3,119	2,990	3,192	3,100	0,0835158
H	3,170	2,341	3,057	2,856	0,3670704

4.) Tamoxifen 5 µmol

	1.7	1.8	1.9	Mittelwert	Standardabw
A	0,312	0,286	0,295	0,298	0,0107806
B	0,302	0,154	0,196	0,217	0,0622754
C	0,527	0,568	0,480	0,525	0,0359537
D	0,802	0,852	0,610	0,755	0,1043115
E	1,692	1,730	1,568	1,663	0,0691729
F	2,645	2,589	2,762	2,665	0,0720756
G	3,022	2,827	2,875	2,908	0,0829578
H	3,077	3,078	3,194	3,116	0,0549201

Student t-test:

4,31E-010	Kontrolle gegen Carboplatin 5 µg/ml
1,02E-010	Kontrolle gegen Carboplatin 5 µg/ml + Tamoxifen 2,5 µmol/l

5.) Tamoxifen 2,5 µmol

	2.7	2.8	2.9	Mittelwert	Standardabw
A	0,324	0,315	0,319	0,319	0,0036818
B	0,497	0,487	0,506	0,497	0,0077603
C	0,884	0,855	0,894	0,878	0,0165395
D	0,971	1,147	1,387	1,168	0,1704999
E	2,136	2,179	2,348	2,221	0,0915023
F	2,867	2,992	2,959	2,939	0,0528919
G	3,043	3,078	3,217	3,113	0,0751458
H	3,078	3,100	3,146	3,108	0,0283314

6.) Carboplatin 5 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,295	0,309	0,333	0,312	0,0156915
B	0,172	0,111		0,142	0,0305
C	0,337	0,307	0,208	0,284	0,0551181
D	0,197	0,311	0,352	0,287	0,0655761
E	0,208	0,303	0,329	0,280	0,0520064
F	0,209	0,201	0,325	0,245	0,0566627
G		0,123	0,216	0,170	0,0465
H	0,223	0,285	0,204	0,237	0,0345864

7.) Carboplatin 5 µg/ml + Tamoxifen 2,5 µmol

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,368	0,341	0,311	0,340	0,0232809
B	0,231	0,064	0,164	0,153	0,0686197
C	0,097	0,122	0,455	0,225	0,1631897
D	0,072	0,309	0,388	0,256	0,1342742
E	0,108	0,315	0,370	0,264	0,1128017
F	0,246	0,352	0,381	0,326	0,0580249
G	0,330	0,283	0,261	0,291	0,0287789
H	0,509	0,395	0,516	0,473	0,0554637

8.) Carboplatin 1 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,313	0,294	0,357	0,321	0,026386
B	0,346	0,101	0,093	0,180	0,1174252
C	0,613	0,182	0,188	0,328	0,201776
D	0,904	1,005	0,953	0,954	0,0412391
E	1,883	1,694	1,947	1,841	0,1174068
F	2,752	2,975	2,726	2,818	0,1117567
G	2,866	2,903	3,020	2,930	0,065637
H	3,136	3,302	3,092	3,177	0,0904262

4,63E-011	Kontrolle gegen Carboplatin 5 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l
0,3970033	Kontrolle gegen Carboplatin 1 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l

1-3 Kontrolle

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,591	0,572	0,541	0,568	0,0206074
B	1,058	1,043	1,094	1,065	0,0214009
C	2,040	2,096	2,169	2,102	0,0528162
D	2,040	2,052	2,115	2,069	0,0328938
E	3,108	3,234	3,013	3,118	0,0905183
F	3,310	3,357	3,312	3,326	0,0217
G	3,071	2,944	2,959	2,991	0,0566647
H	3,316	3,352	3,651	3,440	0,1501562

4-6 Tamoxifen 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,561	0,522	0,533	0,539	0,0164181
B	1,318	1,113	1,073	1,168	0,1073157
C	1,969	2,001	1,959	1,976	0,0179134
D	1,247	1,889	1,886	1,674	0,3019371
E	2,877	2,878	2,919	2,891	0,0195675
F	3,034	3,231	3,270	3,178	0,1032935
G	2,989	3,020	3,018	3,009	0,0141657
H	3,351	3,284	3,665	3,433	0,166081

7-9 Carboplatin 5 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,598	0,580	0,607	0,595	0,011225
B	1,075	1,110	1,207	1,131	0,0558351
C	1,821	1,817	1,812	1,817	0,0036818
D	1,631	0,910	1,301	1,281	0,294698
E	1,235	1,440	1,140	1,272	0,1251887
F	0,942	1,000	1,087	1,010	0,0595893
G	0,635	0,855	1,060	0,850	0,1735415
H	0,836	0,557	0,690	0,694	0,1139425

10-12 Carboplatin 5 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,538	0,552	0,557	0,549	0,0080416
B	1,073	0,987	1,033	1,031	0,0351378
C	1,809	1,759	1,770	1,779	0,0214528
D	1,277	1,081	0,967	1,108	0,1280243
E	1,159	1,278	1,236	1,224	0,049277
F	1,124	0,942	1,143	1,070	0,0906066
G	0,985	0,788	0,630	0,801	0,1452194
H	0,881	0,791	1,226	0,966	0,1874833

1-3 Carboplatin 1,25 µg/ml

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,568	0,614	0,686	0,623	0,0485615
B	1,211	1,232	1,258	1,234	0,0192238
C	2,158	2,077	2,123	2,119	0,0331696
D	2,365	1,932	2,058	2,118	0,1818467
E	1,957	2,316	2,690	2,321	0,2992669
F	2,990	3,146	3,387	3,174	0,1633082
G	2,826	3,067	2,968	2,954	0,0989085
H		3,264	3,262	3,263	0,001

4-6 Carboplatin 1,25 µg/ml + T 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,600	0,595	0,570	0,588	0,0131233
B	1,192	1,154	1,176	1,174	0,0155778
C	1,940	2,034	1,913	1,962	0,0518609
D	1,734	1,986	1,641	1,787	0,1457464
E	2,577	3,065	2,531	2,724	0,2416186
F	3,036	3,250	2,967	3,084	0,1204833
G	3,033	2,885	3,087	3,002	0,0853906
H	3,329	3,368	3,507	3,401	0,0763952

7-9 Carboplatin 1 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,584	0,642	0,578	0,601	0,0288598
B	1,311	1,251	1,253	1,272	0,0278248
C	2,100	2,083	2,155	2,113	0,0307282
D	1,937	1,824	2,091	1,951	0,1094298
E	2,355	2,533	2,581	2,490	0,0972191
F	3,249	3,061	3,178	3,163	0,0775127
G	3,129	3,066	3,199	3,131	0,0543221
H	3,454	3,409	3,507	3,457	0,0400527

10-12 Carboplatin 1 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,567	0,583	0,602	0,584	0,0143062
B	1,183	1,233	1,312	1,243	0,0531058
C	2,036	2,114	2,210	2,120	0,0711618
D	2,172	1,976	1,555	1,901	0,2574115
E	2,371			2,371	0
F	3,248	3,145	2,930	3,108	0,1324798
G	3,087	2,912	3,224	3,074	0,127688
H	3,049	3,505	3,564	3,373	0,2301309

1-3 Carboplatin 2,5 µg/ml

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,608	0,556	0,677	0,614	0,0495603
B	1,246	1,127	1,099	1,157	0,0637303
C	2,374	2,093	2,325	2,264	0,1225588
D	1,623	1,667	1,694	1,661	0,0292613
E	1,856	1,882	1,750	1,829	0,0570925
F	3,595	2,682	2,974	3,084	0,3807119
G	3,054	3,055	2,959	3,023	0,045021
H	3,461	3,510	3,372	3,448	0,0571217

4-6 Carboplatin 2,5 µg/ml + T 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,669	0,583	0,579	0,610	0,0415157
B	1,284	1,219	1,067	1,190	0,0909322
C	2,267	2,045	1,941	2,084	0,135964
D	1,847	1,461	1,643	1,650	0,1576691
E	1,710	1,998	1,972	1,893	0,1300701
F	2,792	2,914	2,804	2,837	0,0549019
G	3,002	2,903	2,695	2,867	0,1279384
H	3,335	3,137	3,237	3,236	0,0808345

7-9 Carboplatin 1,66 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,622	0,598	0,729	0,650	0,0569464
B	1,248	1,377	1,205	1,277	0,0730859
C	2,075	2,338	2,302	2,238	0,1164255
D	1,830	1,916	2,052	1,933	0,0913941
E	2,459	2,531	2,426	2,472	0,0438406
F	3,255	3,256	3,119	3,210	0,064348
G	3,072	3,112	3,134	3,106	0,0256645
H	3,210	3,301	3,714	3,408	0,2193085

10-12 Carboplatin 1,66 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,646	0,548	0,572	0,589	0,041708
B	1,170	1,332	1,129	1,210	0,0876445
C	2,121	2,117	2,110	2,116	0,0045461
D	1,759	1,750	1,811	1,773	0,0268866
E	2,222	2,561	2,863	2,549	0,2618324
F	3,254	3,342	2,032	2,876	0,5978785
G	3,074	3,072	3,054	3,067	0,0089938
H	3,511	3,144	3,336	3,330	0,1498807

Student t-test:

0,0000025	Kontrolle gegen Carboplatin 5 µg/ml
0,000002	Kontrolle gegen Carboplatin 5 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l
0,1497041	Kontrolle gegen Carboplatin 2,5 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l

1-3 Kontrolle

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,105	0,116	0,113	0,111	0,0046428
B	0,160	0,122	0,086	0,123	0,0302141
C	0,298	0,646	0,243	0,396	0,1784308
D	0,148	0,159	0,184	0,164	0,0150628
E	0,295	0,220	0,174	0,230	0,0498687
F	0,575	0,456	0,341	0,457	0,0955348
G	0,480	0,614	0,545	0,546	0,0547134
H	0,807	0,741	0,467	0,672	0,1472081

4-6 Tamoxifen 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,100	0,103	0,113	0,105	0,0055578
B	0,120	0,142	0,142	0,135	0,0103709
C	0,231	0,234	0,249	0,238	0,007874
D	0,165	0,125	0,101	0,130	0,0263987
E	0,185	0,224	0,194	0,201	0,0166733
F	0,352	0,415	0,345	0,371	0,0314784
G	0,555	0,457	0,428	0,480	0,0543384
H	0,538		0,781	0,660	0,1215

7-9 Carboplatin 5 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,115	0,109	0,137	0,120	0,012037
B	0,113	0,126	0,134	0,124	0,0086538
C	0,194	0,216	0,221	0,210	0,0117284
D	0,109	0,118	0,145	0,124	0,0152971
E	0,068	0,065	0,063	0,065	0,0020548
F	0,098	0,116	0,079	0,098	0,015107
G	0,082	0,079	0,084	0,082	0,0020548
H	0,164	0,123	0,168	0,152	0,0203361

10-12 Carboplatin 5 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,105	0,098	0,108	0,104	0,0041899
B	0,130	0,127	0,144	0,134	0,0074087
C	0,244	0,277	0,252	0,258	0,0140554
D	0,124	0,114	0,102	0,113	0,0089938
E	0,067	0,070	0,117	0,085	0,0228959
F	0,115	0,106	0,124	0,115	0,0073485
G	0,096	0,118	0,090	0,101	0,012037
H	0,154	0,200	0,207	0,187	0,0235089

1-3 Carboplatin 1,25 µg/ml

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,111	0,122	0,127	0,120	0,0066833
B	0,152	0,161	0,156	0,156	0,0036818
C	0,202	0,251	0,262	0,238	0,0260811
D	0,109	0,105	0,098	0,104	0,0045461
E	0,119	0,129	0,159	0,136	0,0169967
F	0,174	0,168	0,154	0,165	0,0083799
G	0,121	0,110	0,141	0,124	0,0128323
H	0,204	0,169	0,194	0,189	0,0147196

4-6 Carboplatin 1,25 µg/ml + T 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,117	0,119	0,132	0,123	0,00665
B	0,152	0,200	0,133	0,162	0,0281938
C	0,300	0,272	0,295	0,289	0,0121929
D	0,139	0,113	0,142	0,131	0,0130213
E	0,177	0,224	0,169	0,190	0,0242625
F	0,117	0,117	0,146	0,127	0,0136707
G	0,129	0,136	0,133	0,133	0,0028674
H	0,229	0,205	0,210	0,215	0,0103387

7-9 Carboplatin 1 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,122	0,132	0,120	0,125	0,0052493
B	0,158	0,171	0,201	0,177	0,0180062
C	0,316	0,372	0,348	0,345	0,0229395
D	0,118	0,156	0,142	0,139	0,0156915
E	0,161	0,214	0,151	0,175	0,0276446
F	0,124	0,152	0,248	0,175	0,0530995
G	0,137	0,198	0,123	0,153	0,0325611
H	0,199	0,195	0,255	0,216	0,0273902

10-12 Carboplatin 1 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,134	0,122	0,141	0,132	0,0078457
B	0,167	0,184	0,222	0,191	0,0229928
C	0,328	0,281	0,284	0,298	0,0214838
D	0,118	0,097	0,092	0,102	0,0112645
E	0,098	0,158	0,159	0,138	0,0285229
F	0,116	0,124	0,168	0,136	0,0228619
G	0,133	0,115	0,170	0,139	0,0228959
H	0,140	0,185	0,206	0,177	0,0275318

1-3 Carboplatin 2,5 µg/ml

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,110	0,118	0,096	0,108	0,0090921
B	0,140	0,130	0,131	0,134	0,0044969
C	0,167	0,173	0,191	0,177	0,010198
D	0,106	0,097	0,127	0,110	0,0125698
E	0,103	0,114	0,117	0,111	0,0060185
F	0,152	0,167	0,168	0,162	0,0073182
G	0,110	0,103	0,109	0,107	0,0030912
H	0,165	0,185	0,201	0,184	0,0147271

4-6 Carboplatin 2,5 mg/ml + T 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,098	0,100	0,100	0,099	0,0009428
B	0,126	0,113	0,114	0,118	0,0059067
C	0,188	0,165	0,177	0,177	0,0093927
D	0,084	0,273	0,113	0,157	0,0831077
E	0,089	0,086	0,084	0,086	0,0020548
F	0,085	0,091	0,104	0,093	0,0079303
G	0,109	0,119	0,135	0,121	0,0107083
H	0,185	0,203	0,179	0,189	0,010198

7-9 Carboplatin 1,66 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,097	0,104	0,091	0,097	0,0053125
B	0,112	0,087	0,105	0,101	0,0105304
C	0,183	0,173	0,178	0,178	0,0040825
D	0,106	0,101	0,112	0,106	0,0044969
E	0,136	0,114	0,099	0,116	0,015195
F	0,097	0,112	0,093	0,101	0,0081786
G	0,130	0,110	0,120	0,120	0,008165
H	0,244	0,171	0,166	0,194	0,0356495

10-12 Carboplatin 1,66 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,089	0,089	0,082	0,087	0,0032998
B	0,118	0,136	0,123	0,126	0,0075865
C	0,183	0,160	0,151	0,165	0,0134743
D	0,099	0,148	0,102	0,116	0,0224252
E	0,097	0,081	0,054	0,077	0,0177451
F	0,111	0,158	0,111	0,127	0,022156
G	0,100	0,135	0,131	0,122	0,0156418
H	0,151	0,096	0,326	0,191	0,0980646

Student t-test:

0,1448402	Kontrolle gegen Tamoxifen 5 µmol/l
0,0021055	Kontrolle gegen Carboplatin 1 µg/ml
0,0005482	Kontrolle gegen Carboplatin 1 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l

1-3 Kontrolle

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,499	0,499	0,427	0,475	0,0339411
B	0,803	0,793	0,706	0,767	0,0435609
C	1,509	1,525	1,599	1,544	0,0392032
D	1,213	1,015	1,647	1,292	0,2639411
E	2,286	2,234	2,059	2,193	0,0971013
F	2,454	2,342	2,392	2,396	0,0458112
G	1,944	1,882	2,013	1,946	0,053506
H	2,276	2,300	2,173	2,250	0,0550898

4-6 Tamoxifen 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,523	0,451	0,421	0,465	0,0428019
B	0,734	0,669	0,671	0,691	0,0301809
C	1,328	1,301	1,223	1,284	0,0445197
D	1,327	1,264	1,102	1,231	0,0947734
E	1,799	2,030	2,015	1,948	0,1055367
F	2,263	2,367	2,082	2,237	0,1177578
G	2,253	2,090	1,999	2,114	0,1050746
H	2,536	2,182	2,344	2,354	0,1446928

7-9 Carboptatin 5 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,427	0,444	0,525	0,465	0,0427577
B	0,748	0,781	0,833	0,787	0,0349889
C	1,255	1,357	1,361	1,324	0,0490533
D	0,980	1,025	0,990	0,998	0,0192931
E	0,692	0,708	0,738	0,713	0,0190671
F	0,437	0,537	0,430	0,468	0,048874
G	0,344	0,304	0,318	0,322	0,0165731
H	0,382	0,344	0,249	0,325	0,0559345

10-12 Carboptatin 5 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,465	0,451	0,469	0,462	0,0077172
B	0,763	0,777	0,806	0,782	0,0179072
C	1,155	1,191	1,206	1,184	0,0214009
D	1,020	0,938	0,934	0,964	0,0396316
E	0,679	0,661	0,822	0,721	0,0720293
F	0,575	0,564	0,666	0,602	0,0457117
G	0,355	0,342	0,385	0,361	0,0180062
H	0,279	0,299	0,430	0,336	0,0669677

1-3 Carboptatin 1,25 µg/ml

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,571	0,550	0,545	0,555	0,0112645
B	1,116	1,120	1,165	1,134	0,0222161
C	1,838	1,824	1,951	1,871	0,0568565
D	1,780	1,689	1,363	1,611	0,1790239
E	1,899	1,906	1,871	1,892	0,0151217
F	1,494	1,562	1,531	1,529	0,0277969
G	1,191	1,325	1,231	1,249	0,0561664
H	0,959	1,540	1,700	1,400	0,3183712

4-6 Carboptatin 1,25 µg/ml + T 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,659	0,502	0,559	0,573	0,0648914
B	1,046	0,955	0,928	0,976	0,0504799
C	1,755	1,547	1,542	1,615	0,0992516
D	1,140	1,195	1,072	1,136	0,0503079
E	1,529	1,652	1,792	1,658	0,107444
F	2,179	2,060	1,948	2,062	0,0943198
G	1,771	1,557	1,454	1,594	0,1320328
H	1,668	1,777	1,739	1,728	0,0451737

7-9 Carboptatin 1 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,565	0,509	0,480	0,518	0,0352798
B	0,962	1,038	1,136	1,045	0,0712242
C	1,710	1,836	1,871	1,806	0,0691392
D	1,448	1,454	1,642	1,515	0,0900716
E	1,864	2,072	1,781	1,906	0,1223992
F	1,853	1,942	2,232	2,009	0,1618168
G	1,388	1,557	1,628	1,524	0,1006656
H	1,588	1,661	1,791	1,680	0,0839563

10-12 Carboptatin 1 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,575	0,557	0,491	0,541	0,0361109
B	1,021	1,054	1,026	1,034	0,014522
C	1,696	1,711	1,690	1,699	0,0088318
D	1,677	1,615	1,478	1,590	0,0831424
E	2,086	1,982	1,394	1,821	0,3046718
F	2,168	2,140	2,269	2,192	0,0554036
G	1,687	1,825	1,808	1,773	0,0614401
H	1,817	2,274	2,259	2,117	0,2119848

1-3 Carboptatin 2,5 µg/ml

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,488	0,425	0,474	0,462	0,0270103
B	0,868	0,883	0,898	0,883	0,0122474
C	1,410	1,433	1,540	1,461	0,0566451
D	1,301	1,053	1,176	1,177	0,1012467
E	1,075	1,315	0,899	1,096	0,1704999
F	0,889	0,937	0,769	0,865	0,0706541
G	0,930	0,463	0,766	0,720	0,1934465
H	0,715	0,727	0,619	0,687	0,0483322

4-6 Carboptatin 2,5 µg/ml + T 5 µmol

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,471	0,385	0,419	0,425	0,0353648
B	0,864	0,778	0,726	0,789	0,0569054
C	1,393	1,184	1,114	1,230	0,1185196
D	1,236	1,153	0,878	1,089	0,1529989
E	1,206	0,999	0,914	1,040	0,1226277
F	1,212	1,032	1,250	1,165	0,0950836
G	0,882	0,815	0,887	0,861	0,0328261
H	0,870	1,071	0,917	0,953	0,0858461

7-9 Carboptatin 1,66 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,460	0,394	0,441	0,432	0,0277409
B	0,824	0,812	0,814	0,817	0,0052493
C	1,461	1,402	1,296	1,386	0,0682658
D	1,342	1,038	1,076	1,152	0,135243
E	1,319	1,035	1,243	1,199	0,1200444
F	1,180	1,430	1,326	1,312	0,102541
G	1,013	0,909	0,983	0,968	0,0437061
H	1,048	1,208	0,779	1,012	0,1770129

10-12 Carboptatin 1,66 µg/ml + T 5 µmol

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,448	0,407	0,408	0,421	0,0190962
B	0,703	0,678	0,740	0,707	0,0254689
C	1,064	1,097	1,114	1,092	0,0207579
D	0,946	0,957	1,030	0,978	0,0372767
E	0,997	1,166	1,240	1,134	0,1017
F	1,688	1,667	1,551	1,635	0,0602458
G	1,154	1,146	0,923	1,074	0,1070587
H	1,357	1,025	1,269	1,217	0,1404374

Student t-test:

0,3695279	Kontrolle gegen Tamoxifen 5 µmol/l
0,2681296	Kontrolle gegen Carboptatin 1 µg/ml
0,4734271	Kontrolle gegen Carboptatin 1 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l
0,1162666	Kontrolle gegen Carboptatin 1,25 µg/ml
0,1359152	Kontrolle gegen Carboptatin 1,25 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l
0,0004043	Kontrolle gegen Carboptatin 1,66 µg/ml
0,0004562	Kontrolle gegen Carboptatin 1,66 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l
0,0000512	Kontrolle gegen Carboptatin 2,5 µg/ml
0,0000667	Kontrolle gegen Carboptatin 2,5 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l
0,0000006	Kontrolle gegen Carboptatin 5 µg/ml
0,0000005	Kontrolle gegen Carboptatin 5 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l

1-3 Carbo 5 µg/ml + Tamox 5 µmol + EMD 50 µg/ml

	1	2	3	Mittelwert	Standardabw
A	0,193	0,170	0,194	0,186	0,0110855
B	0,258	0,254	0,279	0,264	0,0109646
C	0,443	0,408	0,411	0,421	0,0158395
D	0,356	0,399	0,305	0,353	0,0384216
E	0,523	0,446	0,413	0,461	0,0460893
F	0,647	0,562	0,437	0,549	0,086249
G	1,287	0,839	0,744	0,957	0,2367788
H	1,837	1,974	1,631	1,814	0,1409704

4-6 Carbo 1 µg/ml + Tamox 2,5 µmol + EMD 50 µg/ml

	4	5	6	Mittelwert	Standardabw
A	0,203	0,201	0,218	0,207	0,0075865
B	0,295	0,288	0,284	0,289	0,0045461
C	0,479	0,507	0,583	0,523	0,0439394
D	0,656	0,733	0,797	0,729	0,0576445
E	1,543	1,520	1,647	1,570	0,0552509
F	2,449	2,585	2,639	2,558	0,0799389
G	2,668	2,644	2,593	2,635	0,031273
H	2,962	3,011	3,046	3,006	0,0344513

7-9 Carbo 5 µg/ml + Tamox 2,5 µmol + EMD 50 µg/ml

	7	8	9	Mittelwert	Standardabw
A	0,174	0,213	0,224	0,204	0,0214528
B	0,294	0,321	0,321	0,312	0,0127279
C	0,450	0,462	0,529	0,480	0,0347595
D	0,362	0,429	0,435	0,409	0,0330891
E	0,538	0,540	0,532	0,537	0,0033993
F	0,713	0,763	1,007	0,828	0,1284402
G	0,952	0,92	1,478	1,117	0,255835
H	1,074	2,342	2,619	2,012	0,6726051

10-12 Carbo 1 µg/ml + Tamox 5 µmol + EMD 50 µg/ml

	10	11	12	Mittelwert	Standardabw
A	0,231	0,239	0,243	0,238	0,0049889
B	0,321	0,322	0,358	0,334	0,0172111
C	0,594	0,612	0,679	0,628	0,0365726
D	0,767	0,832	0,853	0,817	0,036609
E	1,845	1,888	1,695	1,809	0,0827298
F	2,680	2,733	2,639	2,684	0,0384794
G	2,822	2,73	2,842	2,798	0,0487716
H	3,104	2,621	3,010	2,912	0,2090842

1.) Kontrolle

	Platte 1.1	1.2	1.3	Platte 2.1	2.2	2.3	Mittelwert	Standardabw
A	0,278	0,281	0,284	0,282	0,323	0,284	0,289	0,0154883
B	0,107	0,131	0,325	0,475	0,126		0,233	0,1447458
C	0,355	0,549	0,612	0,781	0,643	0,638	0,596	0,1282857
D	0,875	1,127	0,95	1,324	1,244	1,331	1,142	0,1768365
E	1,102	1,836	1,851	2,407	2,39	2,354	1,99	0,4651104
F	2,494	2,712	2,679	2,584	3,167	2,835	2,745	0,2162371
G	2,815	2,746	2,888	2,958	2,974	3,121	2,917	0,1204381
H	2,985	3,097	2,967	3,058	3,146	2,952	3,034	0,0715342

Student t-test:

0,231082	Kontrolle gegen Carboplatin 1 µg/ml + Tamoxifen 2,5 µmol/l + EMD 55900
0,3354722	Kontrolle gegen Carboplatin 1 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l + EMD 55900
0,000025	Kontrolle gegen Carboplatin 5 µg/ml + Tamoxifen 2,5 µmol/l + EMD 55900
0,0000012	Kontrolle gegen Carboplatin 5 µg/ml + Tamoxifen 5 µmol/l + EMD 55900

Kontrolle							Mitt. Vol.	Stdabw
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	0
7	136,50	62,50	62,50	108,00	171,50	168,00	122,25	44,655782
11	306,00	256,00	190,31	364,50	278,44	278,44	278,44	52,335997
14	660,00	334,69	427,50	538,13	364,50	395,44	411,47	112,46348
19	1929,38	500,00	975,00	975,00	618,13	962,50	968,75	458,61312
24	3128,81	801,94	3163,50	2422,50	1026,38	1265,00	1843,75	976,71597
28	5670,00	2227,50	1508,00	2227,50			2227,50	1621,3269
31	10075,69	3977,50	3038,63	3851,25			3914,38	2817,4628

Carboplatin							Mitt. Vol.	Stdabw
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	0
7	136,50	151,88	171,50	171,50	210,00	171,50	171,50	22,542755
11	306,00	252,00	210,00	395,44	364,50	306,00	306,00	62,653289
14	664,13	708,75	500,00	708,75	393,13	455,81	582,06	126,86449
19	1604,06	1844,50	747,50	1860,00	1344,00	962,50	1474,03	422,47025
24	2422,50	3551,63	2140,94	3537,19	975,00	1215,00	2281,72	1005,8212
28	1687,50	1860,00					1773,75	86,25
31	2048,00	2553,00					2300,50	252,5

t-test= 0,1334315 gegen Kontrolle

Tamoxifen							Mitt Vol	Stdabw
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	0
7	82,50	105,00	171,50	168,00	202,50	252,00	169,75	56,892748
11	121,88	210,00	210,00	360,00	665,50	577,50	285,00	200,95683
14	171,50	495,00	171,50	495,00	1016,81	665,50	495,00	291,63928
19	256,00	810,75	759,00	1230,19	1998,75	1159,38	985,06	534,74038
24	858,00	1772,81	1508,00	3561,25	5796,00	2916,00	2344,41	1635,0144
28	1092,00	3295,31					2193,66	1101,6563
31	1508,00	4120,88					2814,44	1306,4375

t-test= 0,368525 gegen Kontrolle

Carboplatin und Tamoxifen							Mitt Vol	Stdabw
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	0
7	108,00	136,50	108,00	136,50	62,50	210,00	122,25	44,631283
11	188,50	210,00	62,50	557,81	438,75	306,00	258,00	164,556
14	256,00	427,50	108,00	1278,75	759,00	577,50	502,50	380,88073
19	660,00	909,56	210,00	2448,00	1365,00	864,00	886,78	702,56226
24	1344,00	2540,06	810,75	3011,25	2016,00	1680,00	1848,00	730,52646
28	4945,00	3196,88	1854,19	2454,38			2825,63	1159,9196
31	3846,31	6912,00	2880,00	3707,44			3776,88	1532,204

t-test= 0,8383276 gegen Kontrolle

Tamoxifen und EMD 55900							Mitt Vol	Stdabw
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	0
7	82,50	210,00	108,00	252,00	171,50	171,50	171,50	57,342114
11	136,50	455,81	306,00	660,00	334,69	577,50	395,25	175,08421
14	137,31	975,00	577,50	975,00	577,50	1365,00	776,25	389,96883
19	306,00	1861,94	1092,00	2456,50	1072,50	2679,69	1476,97	834,24699
24	1159,38	4797,19	4627,88	7579,69	3024,94	6083,50	4712,53	2058,3093

t-test= 0,0169557 gegen Kontrolle

Carboplatin und EMD 55900 30 mg/kg KG							Mitt Vol	Stdabw
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	0
7	130,00	82,50	171,50	171,50	136,50	210,00	154,00	40,129651
11	500,00	232,50	256,00	428,69	153,56	306,00	281,00	118,00488
14	975,00	427,50	665,50	256,00	427,50	495,00	461,25	228,38626
19	1522,50	747,50	136,50	864,00	360,00	864,00	805,75	438,03191
24	2660,00	1680,00	171,50	1687,50	1524,31	1687,50	1683,75	728,66179
28	171,50	3011,25	1680,00	2916,00			2298,00	1150,5713
31	334,69	4450,88	1953,00	3295,31			2624,16	1535,0843

t-test= 0,4088281 gegen Kontrolle

Carboplatin und EMD 55900 50 mg/kg KG							Mitt Vol	Stdabw
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	0
7	256,00	171,50	171,50	136,50	171,50	108,00	171,50	45,396096
11	500,00	274,31	230,56	427,50	427,50	703,13	427,50	154,63695
14	810,75	334,69	364,50	759,00	760,44	1372,00	759,72	344,05379
19	1372,00	418,00	754,69	1687,50	1761,38	2916,00	1529,75	801,01651
24	3038,63	1772,81	2132,81	3977,50	4781,25	5852,44	3508,06	1438,5987

t-test= 0,0209197 gegen Kontrolle

Kontrolle								Mitt. Vol.	Stdabw.
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	2,22E-016
4	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	0
7	136,5	82,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	72,5	26,172505
11	93,44	108	82,5	108	108	105	106,5	106,5	9,6800166
14	136,5	171,5	82,5	82,5	108	105	106,5	106,5	31,393559
18	188,5	268,13	210,94	170,63	210	210	210	210	29,976901
24	1860	759	498,75	862,5	1356,25	427,5	810,75	810,75	502,19957
28	2422,5	1372	858	1223,44	2016	915,69	1297,72	1297,72	571,18972
31	2859,75	2048	1435,69	1854,19	3145	1446,38	1951,095	1951,095	657,64027
35	1604,06	3821,63	2040	1495,31	2456,5	3821,63	2248,25	2248,25	958,25222

Carboplatin								Mitt. Vol.	Stdabw.
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	2,22E-016
4	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	0
7	108	82,5	94,88	108	72,19	171,5	101,44	31,929818	
11	108	107,25	108	256	83,19	82,5	107,625	60,005724	
14	256	210	108	108	255	428,69	232,5	108,71414	
18	427,5	232,5	62,5	256	500	660	341,75	195,64326	
24	760,44	557,81	644	255	810,75	1522,5	702,22	385,86024	
28	1032,75	810	210	364,5	747,5	1761,38	778,75	502,7241	
31	1687,5	766,69	334,69	578,81	1159,38	1941,19	963,035	580,49178	
35	1446,38	1040	578,81	711,56	1372	2769	1206	720,67537	

t-test= 0,0665295 gegen Kontrolle

Tamoxifen								Mitt. Vol.	Stdabw.
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	2,22E-016
4	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	0
7	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	62,5	7,4535599
11	72,19	62,5	94,88	83,19	94,88	108	89,035	15,234552	
14	62,5	82,5	210	94,88	334,69	94,88	94,88	96,547865	
18	108	280,5	395,44	210,94	500	108	245,72	144,14846	
24	1299,38	577,5	1370,25	578,81	760,44	108	669,625	438,09558	
28	364,5	1223,44	1670,63	711,56	711,56	108	711,56	519,84739	
31	708,75	1425	3165,81	1142,81	918,75	137,31	1030,78	944,56334	
35	1228,5	1769	3145	1479	1098,5	256	1353,75	871,89272	

t-test= 0,0930244 gegen Kontrolle

Carboplatin und Tamoxifen								Mitt. Vol.	Stdabw.
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	2,22E-016
4	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	0
7	62,5	53,44	72,19	45,56	32	94,88	57,97	20,028952	
11	108	94,88	108	136,5	108	108	108	12,549637	
14	153,56	62,5	171,5	108	153,56	153,56	153,56	37,287152	
18	363,38	393,13	232,5	577,5	190,31	252	307,69	129,94934	
24	495	364,5	1026,38	307,06	660	754,69	577,5	245,49891	
28	754,69	578,81	427,5	1142,81	427,5	488,75	533,78	252,59939	
31	858	577	1600,38	578,81	1096,88	1096,88	977,44	353,45307	
35	1098,5	862,5	360	1365	760,44	1016,81	939,655	311,2042	

t-test= 0,0076796 gegen Kontrolle

Tamoxifen und EMD 55900								Mitt. Vol.	Stdabw.
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	2,22E-016
4	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	0
7	32	94,88	62,5	53,44	72,19	62,5	62,5	62,5	18,94573
11	83,19	62,5	32	62,5	108	32	62,5	26,939243	
14	108	62,5	168	82	136,5	108	108	34,424636	
18	190,31	364,5	62,5	137,31	108	230,56	163,81	97,883088	
24	388,5	660	448,5	108	975	393,13	420,815	268,10271	
28	643,5	1098,5	190,31	669,38	643,5	1228,5	656,44	339,7882	
31	850,5	1861,94	1113	170,63	2040	826,5	981,75	639,48054	
35	937,5	2244	256	1371,56	951,56	1680	1161,56	627,41319	

t-test= 0,0193951 gegen Kontrolle

Carboplatin und EMD 55900								Mitt. Vol.	Stdabw.
0	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69	2,22E-016
4	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	0
7	45,56	62,5	62,5	62,5	45,56	82,5	62,5	12,528754	
11	136,5	32	83,19	62,5	72,19	62,5	67,345	31,671525	
14	108	82,5	82,5	136,5	62,5	232,5	95,25	56,496627	
18	618,13	32	500	153,56	137,31	210,94	182,25	210,24647	
24	463,13	190,31	307,06	864	13,5	1098,5	385,095	378,85828	
28	1370,25	7,81	918,75	210	364,5	500	432,25	457,24161	
31	665,5	428,69	395,44	1228,5	7,81	1860	547,095	611,93279	
35	2244	13,5	1767	538,13	364,5	864	701,065	789,24186	

t-test= 0,0041252 gegen Kontrolle

Tumor	Messwerte					Max	Median	Mittelwert	t-test Max.	t-test Ges.	MW Max	MW Ges	Stdabw Maximalw.	Stdabw Gesamt
	36	44	33	25	37									
1 Kontrolle	36	44	33	25	37	44	36	35						
3 Kontrolle	38	48	42	34	27	48	38	37,8						
3 b Kontroll	41	34	46	41	38	46	41	40			46	37,6	1,6329932	6,2375209
4 Carbo	56	42	28	33	27	56	33	37,2						
5 Carbo	51	44	67	49	38	67	49	49,8						
5b Carbo	45	48	69	44	70	70	48	55,2						
6 Carbo	61	78	78	70	60	78	70	69,4	0,1134152	0,0002751	67,75	52,9	7,8859051	15,361966
8 Tamox	93	74	64	42	85	93	74	71,6						
8b Tamox	81	57	62	37	66	81	62	60,6						
9 Tamox	110	91	85	77	128	128	91	98,2	0,0252827	0,0000004	100,66667	76,8	19,938795	23,14361
10 CT	62	30	14	40	34	62	34	36						
10b CT	35	47	30	46	33	47	35	38,2						
11 CT	36	19	36	27	25	36	27	28,6						
11b CT	40	50	38	54	37	54	40	43,8						
12 CT	25	21	22	25	19	25	22	22,4	0,4851838	0,0982844	44,8	33,8	13,075167	11,568924
13 TE	87	91	61	120	89	120	89	89,6						
14 TE	48	42	30	52	39	52	42	42,2						
14b TE	88	53	62	54	51	88	54	61,6						
15 TE	32	29	21	23	21	32	23	25,2						
15b TE	37	22	31	34	36	37	34	32	0,4510433	0,0158056	65,8	50,12	33,44488	25,877125
16 CE	28	36	25	16	38	38	28	28,6						
16b CE	95	109	92	52	83	109	92	86,2						
17 CE	23	21	15	29	17	29	21	21						
17b CE	38	56	26	42	37	56	38	39,8						
18 CE	89	75	120	95	122	122	95	100,2	0,4416164	0,0112657	70,8	55,16	37,743344	34,566666

Legende: t-test Max: Student t-test der Maximalwerte, Kontrolle gegen Behandlung
t-test Ges.: Student t-test der Gesamtwerte, Kontrolle gegen Behandlung
MW Max: Mittelwerte der Hot Spots
MW Ges.: Mittelwerte aller Messwerte pro Tumorgruppe
Stdabw Maximalw.: Standardabweichung der Hot Spots (Maximalwerte)
Stdabw Gesamt: Standardabweichung der Gesamtwerte