

Aus der medizinischen Klinik I
-Hämatologie-Onkologie-
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. H. L. Fehm

**Präklinische und klinische Untersuchung zur
Kombinationstherapie des Pankreaskarzinoms mit
Hyperthermie und Carboplatin plus Gemcitabine**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Anne Sarah Stoltz
aus Marburg

Lübeck 2006

1. Berichtstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Stefan O. Peters

2. Berichtstatter/-in:

Priv.-Doz. Dr. med. Oliver Schwandner

Tag der mündlichen Prüfung:

18.04.2007

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

18.04.2007

**Gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -**

Inhalt	Seite
1 Einleitung	5
1.1 Das Pankreaskarzinom	5
1.1.1 Definition	5
1.1.2 Epidemiologie	6
1.1.3 Ätiologie	6
1.1.4 Lokalisation	6
1.1.5 Klinik und Diagnostik	7
1.1.6 Staging	7
1.1.7 Prognose	8
1.1.8 Therapie	8
1.1.9 Chirurgie	9
1.1.10 Radiatio	9
1.1.11 Chemotherapie mit Einzelsubstanzen (Monochemotherapie)	10
1.1.12 Kombinationstherapien Zytostatika	11
1.1.13 Alternative Behandlungsmöglichkeiten	13
1.2 Hyperthermie	13
1.2.1 Grundlagen und Wirkmechanismen der Hyperthermiebehandlung	13
1.2.2 Ganzkörperhyperthermie	15
1.3 Mit Hyperthermie kombinierte Chemotherapeutika	16
1.3.1 Carboplatin	16
1.3.2 Gemcitabine	17
1.3.3 Gemcitabine und Carboplatin	18
2 Fragestellung	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Zelllinien	20
3.2 Kulturbedingungen	20
3.3 Kristallviolett-Test	20
3.4 Erfassung des Linearitätsbereiches der verwendeten Zelllinie	22

3.5	Ermittlung der Zytostatikakonzentrationen	22
3.6	Hyperthermieerzeugung	24
3.7	Thermochemotherapie	24
3.8	Zeitlich versetzte Zytostatikabehandlung	25
3.9	Analyse des Zellzyklus	26
3.9.1	Prinzip der durchflusszytometrischen Zellzyklus- analyse	26
3.9.2	Versuchsablauf der Zellzyklusanalyse	28
3.9.3	New Acid Protokoll (Sasaki et al., 1988)	29
3.10	Biometrische und statistische Auswertung der Versuche	30
3.11	Klinische Pilotphase zur Wirkung von Carboplatin und Gemcitabine mit Ganzkörperhyperthermie bei metastasiertem Pankreaskarzinom	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Wachstumsverhalten der DAN-G Zelllinie, gemessen im Kristallviolett Assay	32
4.2	Bestimmung der IC_{50} für Carboplatin und Gemcitabine	34
4.3	Thermochemotherapie	36
4.3.1	Hyperthermie ohne Zugabe von Zytostatika	36
4.3.2	Hyperthermie unter Zugabe von Carboplatin	38
4.3.3	Hyperthermie unter Zugabe von Gemcitabine	39
4.3.4	Hyperthermie unter Zugabe von Carboplatin und Gemcitabine	40
4.3.5	Zusammenfassung der vier Proliferations- hemmungsversuche	41
4.4	Zeitlich versetzte Gabe der Zytostatika	42
4.5	Analyse des Zellzyklus	43
4.5.1	Zellzyklusstadien der Kontrolle	44
4.6	Auswertung einer Pilotphase mit Ganzkörper- hyperthermie in Kombination mit Chemotherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom	46

5	Diskussion	51
5.1	Wachstumseigenschaften der Zelllinie DAN-G	53
5.2	IC ₅₀ -Bestimmungen der Zytostatika	53
5.2.1	Carboplatin	53
5.2.2	Gemcitabine	54
5.2.3	Carboplatin und Gemcitabine	54
5.3	Thermochemotherapie in vitro	55
5.3.1	Hyperthermie	55
5.3.2	Hyperthermie und Carboplatin	56
5.3.3	Hyperthermie und Gemcitabine	57
5.3.4	Hyperthermie und die Kombination von Carboplatin und Gemcitabine	57
5.4	Gruppenvergleich	58
5.5	Zeitlich versetzte Gabe der beiden Zytostatika	59
5.6	Analyse des Zellzyklus	59
5.7	Auswertung einer Pilotphase mit Ganzkörper- hyperthermie in Kombination mit Chemotherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom	60
6	Zusammenfassung	64
7	Abkürzungen	66
8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	67
9	Publikation	73
10	Literaturverzeichnis	74
11	Danksagung	86
12	Lebenslauf	87

1 Einleitung

Das fortgeschrittene maligne Pankreaskarzinom hat eine infauste Prognose, bei der sich die Inzidenz und die Mortalität kaum unterscheiden. Bis heute ist der einzige kurative Weg der operative Eingriff für die selten in frühem lokalisiertem Stadium diagnostizierten Fälle. Bei dem Hauptteil der Patienten wird die Diagnose jedoch erst in einem sehr weit fortgeschrittenen Stadium gestellt. Hier steht die Chemotherapie mit Gemcitabine im Mittelpunkt der Therapieoptionen (Büchler und Schlag, 2004). Ihr Ziel ist es, die Überlebenszeit des Patienten zu verlängern und dabei die Lebensqualität zu verbessern. Eine Heilung im metastasierten Stadium kann nicht erzielt werden.

Alternative Behandlungskonzepte müssen somit ebenfalls palliativen Gesichtspunkten gerecht werden.

Das Prinzip der Ganzkörperhyperthermie geht davon aus, dass die Wirksamkeit der Zytostatika durch zeitgleiche Temperaturerhöhung im Körper gesteigert werden kann.

Bei chemotherapieresistenten Tumoren wie dem Pleuramesotheliom und Weichteilsarkomen konnte diesem Prinzip in Phase II Studien gute Wirksamkeit nachgewiesen werden.

Um die Wirksamkeit dieses Prinzips beim Pankreaskarzinom zu überprüfen, wurden individuelle Heilversuche der Ganzkörperhyperthermie mit Gemcitabine und Carboplatin bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom durchgeführt. Parallel wurden in vitro Versuche durchgeführt zur Untersuchung des Effektes der Temperaturerhöhung unter Verwendung von Carboplatin und Gemcitabine auf die Pankreaskarzinomzelllinie DAN-G.

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Definition

Das Pankreaskarzinom ist eine bösartige und hochgradig aggressive Neoplasie der Bauchspeicheldrüse. Es stellt die vierthäufigste Todesursache aller Malignome dar und ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters (World Wide Cancer Statistics der WHO, 2002).

1.1.2 Epidemiologie

Mit einer Inzidenz von ca. 7700 Frauen und ca. 5700 Männern pro Jahr in Deutschland sind 3,5% aller Malignome Pankreaskarzinome. Somit steht das Karzinom in Bezug auf die Häufigkeit des Auftretens lediglich auf Rang 11 (Löhr et al., 2003; Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Dass es trotzdem die vierthäufigste Todesursache darstellt, lässt sich dadurch erklären, dass die Inzidenz und die Mortalität nahezu identisch sind. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter exponentiell an. Frauen erkranken im Schnitt mit 75, Männer mit 68 Jahren (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

1.1.3 Ätiologie

Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist trotz intensiver Forschung letztendlich nicht geklärt. Allerdings können Risikofaktoren, die eine Entstehung des Pankreaskarzinoms begünstigen, benannt werden. Als ziemlich gesichert gilt der Zusammenhang zwischen Nikotinkonsum und dem Pankreaskarzinom (Zheng et al., 1993; Meyer, 2002; Chowdhury et al., 2002). Weitere begünstigende Faktoren sind die chronische und hereditäre Pankreatitis. Auch Diabetes mellitus gilt als Risikofaktor für diese Erkrankung. Eine Metaanalyse, die Diabetes mellitus als Risikofaktor des Pankreaskarzinoms untersuchte, kam zu dem Ergebnis, dass Patienten, bei denen der Diabetes neu diagnostiziert (< 4 Jahre) wurde, ein um etwa 50% größeres Risiko als die Normalbevölkerung haben, an einem Pankreaskarzinom zu erkranken (Huxley et al., 2005). Weiterhin werden Alkohol und eine fett- bzw. fleischreiche Ernährung als prädisponierende Faktoren angesehen, wobei es bei der Assoziation von Alkohol und dem Pankreaskarzinom widersprüchliche Ergebnisse gibt. Eine Metaanalyse von 1996 -2000 ergab keine Risikoerhöhung durch Alkoholkonsum (Bagnardi et al., 2001), während beispielsweise in einer Kohortenstudie von 1993 ein vermehrter Alkoholkonsum mit einem erhöhten Pankreaskarzinomrisiko korrelierte (Zheng et al., 1993).

1.1.4 Lokalisation

Die Neubildungen des Pankreas gehen überwiegend vom exokrinen Teil aus. Hauptsächlich handelt es sich um duktales Adenokarzinome (92%). Alle anderen Pankreastumore wie z.B. das muzinöse Zystadenokarzinom oder das Azinuszellkarzinom sind selten.

Der Sitz des Primärtumors ist in 70% der Pankreaskopf, danach folgen Korpus (20%) und Kauda (10%) (Kelly und Benjamin, 1995). Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 80-90% der Patienten Metastasen auf, wobei die bevorzugten Metastasierungsmuster die Leber (66%), die Lymphknoten (22%) und die Lunge (10%) sind (Löhr et al., 2003). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aussaat in direkt umliegende Gewebe wie das Peritoneum, das Mesenterium oder das Omentum (Remmele, 1997).

1.1.5 Klinik und Diagnostik

Das Pankreaskarzinom bleibt im Anfangsstadium, in der eine kurative Behandlung noch möglich ist, in der Regel symptomlos. So sind fast alle Symptome Spätzeichen und Kennzeichen eines sehr weit fortgeschrittenen Stadiums. Erschwerend kommt hinzu, dass mit Ausnahme des Auftretens eines Verschlussikterus bei periampullärer Tumorlokalisierung alle Frühsymptome unspezifisch sind und oft fehlgedeutet werden (Kächele et al., 2004). Zu diesen unspezifischen Symptomen gehören Schmerzen, Gewichtsverlust, Ikterus, Leistungsknick, Übelkeit, Stuhlveränderungen, Inappetenz und Erbrechen. Das prozentuale Vorkommen der klinischen Befunde im Patientenkollektiv ist von der Lokalisation des Primärtumors abhängig (Howard und Jordan, 1977). Weitere unspezifische diagnostische Kriterien können ein vorausgegangener neu diagnostizierter Diabetes mellitus oder rezidivierende Thrombosen sein.

Bei Verdacht auf ein Pankreaskarzinom stellt der transkutane Ultraschall den ersten diagnostischen Schritt dar. Trotz Störfaktoren wie Darmgasüberlagerungen oder Adipositas können auf diese Weise 70% der Karzinome diagnostiziert und zusätzlich Aussagen über Fernmetastasierung gemacht werden. Bei erkennbarem inoperablen Stadium bzw. bei dem Verdacht auf einen Tumor anderer histologischer Genese als das Adenokarzinom ist eine Feinnadelbiopsie vor Therapiebeginn indiziert (Fritscher-Ravens et al., 2000). Bei potentiell kurativem Stadium ist die Multidetektor-Computertomographie nach Ultraschalldiagnostik zusätzlich als Standard der Bildgebung anzuschließen. Präoperativ ist eine weitere Bildgebung durch den endoskopischen Ultraschall zu empfehlen (Kächele et al., 2004).

1.1.6 Staging

Für das Staging des Pankreaskarzinoms wie auch für die Diagnose ist die Computer- und Kernspintomographie Methode der Wahl (Prokesch, 2003). Mit diesen bildgebenden Verfahren erfolgt die Stadieneinteilung. Lange Zeit fehlte eine solche Einteilung für das Pankreaskarzinom, da man wegen der sehr schlechten Prognose die Einteilung in

Stadien nicht für sinnvoll hielt. Eine erste vorläufige Klassifikation versuchte Hemreck 1974, die die Basis aller weiteren Klassifikationen der Union Internationale Contre Cancer (UICC) wurde. Die zur Zeit gültige Fassung der UICC-Klassifikation von 1997 unterscheidet sechs Stadien, denen die entsprechenden TMN-Einteilungen zugeordnet sind.

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach UICC 1997 (Tumor Zentrum Berlin e.V., 2002)

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0
II	T3	N0	M0
III	T1-3	N1	M0
IVA	T4	Jedes N	M0
IVB	Jedes T	Jedes N	M1

1.1.7 Prognose

Die infauste Prognose des Pankreaskarzinoms wird hinreichend dadurch beschrieben, dass es nur etwa 3,5% der Tumorerkrankungen ausmacht und trotzdem die vierthäufigste Todesursache aller Tumorerkrankungen darstellt (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004).

Das mediane Überleben dieser Tumorerkrankung beträgt nach Diagnosestellung durchschnittlich 3-5 Monate. Die Fünfjahresüberlebensrate bewegt sich um lediglich 0,4-3% (Krempien et al., 2004).

1.1.8 Therapie

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung des Pankreaskarzinoms besteht nur noch für 10-15% der Patienten die Möglichkeit eines kurativen Ansatzes, den allein die radikale Resektion des Tumors darstellt. Für die anderen 85-90% der Patienten bleibt nur noch eine palliative Therapieoption. Das Primärziel des palliativen Ansatzes ist, die weitere Tumorprogression zu verhindern und eine Krankheitsstabilisierung zu erreichen. Glimelius et al. untersuchten als erstes zusätzlich zur Lebenszeitverlängerung die Lebensqualität als Zielparameter der Behandlung (Glimelius et al., 1996). In den letzten Jahren wurden die Therapieoptionen im palliativen Ansatz neben der Lebensverlängerung zunehmend auch unter dem Aspekt dieses Parameters der Lebensqualität („Quality of Life“ = QoL) bewertet (Cascinu et al., 2001). Diese auch als „clinical benefit response“ (CBR) bezeichnete Analyse beinhaltet Parameter wie Schmerzintensität, Analgetikaverbrauch, Anstieg des

Karnofsky-Index (Index zur Beurteilung der Aktivität von Patienten unter Berücksichtigung physischer und sozialer Faktoren) und Gewichtszunahme (Löhr et al., 2003). Der Erfolg der palliativen Therapie basiert demnach zum einen auf Krankheitsstabilisierung bis Remission und zum anderen auf Lebensqualitätsverbesserung.

1.1.9 Chirurgie

Wie eingangs bereits erwähnt sind das äußerst aggressive Wachstum des Pankreaskarzinoms und die späte Diagnosestellung Mitursache für die extrem schlechte Prognose dieses Tumors. Die einzige kurative Behandlung stellt das operative Vorgehen dar. Die Option des kurativen Ansatzes besteht nur für 10-15% der Patienten. Für die zu 60-70% im Pankreaskopf auftretenden Karzinome stellt die Pylorus-erhaltende Whipple-Operation (pp-Whipple) oder der klassische Kausch-Whipple (c-Whipple) die Standardoperation dar. Der klassische Whipple besteht aus der kompletten Entfernung des Pankreaskopfes, des Duodenums, der Gallenblase zusammen mit dem distalen Choledochus, der peripankreatischen Lymphknoten sowie der Lymphknoten im Bereich des hepatoduodenalen Ligaments und der distalen Hälfte des Magens (Künzli et al., 2004). Die Komplikationsrate und die Mortalität sind von der Anzahl der durchgeführten Eingriffe („case load“) des Zentrums abhängig. Große Zentren können den Eingriff mit einer postoperativen Mortalität von unter 5% durchführen (Birkmeyer et al., 2002).

Trotz der Radikalität der Operationen beträgt die Fünfjahresüberlebensrate auch hier nur 25%, da eine Mehrzahl der operierten Patienten Lokalrezidive und Fernmetastasen entwickeln (Yeo et al., 2002).

1.1.10 Radiatio

Zum Zeitpunkt der Diagnose des duktales Pankreaskarzinoms weisen bis zu 90% der Patienten ein sehr weit fortgeschrittenes Stadium auf, in dem die Krebserkrankung nicht mehr nur lokal auf die Bauchspeicheldrüse beschränkt ist (Jemal et al., 2003). Dies gestaltet eine alleinige Strahlentherapie durch die große benötigte Bestrahlungsfläche und die damit verbundene Bestrahlungsmenge als schwierig, zum einen, weil die Patienten durch ihr hohes Lebensalter und die Tumorerkrankung geschwächt sind, zum anderen, weil die Bestrahlungsgrenzen benachbarter Organe erheblich überschritten werden können. Deshalb ist die Bestrahlung zur Behandlung des Pankreaskarzinoms nur im Kontext der Multimodalitätstherapie mit palliativen, adjuvanten oder neoadjuvanten Ansätzen zu werten. Zusätzlich haben Erfahrungen gezeigt, dass die alleinige

Strahlentherapie keine lokale und systemische Kontrolle der Erkrankung bewirkt (Krempien et al., 2004).

1.1.11 Chemotherapie mit Einzelsubstanzen (Monochemotherapie)

Die Monochemotherapie ist Standard in der Behandlung des Pankreaskarzinoms, obwohl in der Klinik keines der bislang untersuchten Chemotherapeutika Responsraten über 10% erreichen konnte (Ryan, 2005).

Gemcitabine – Gemcitabine ist seit 1996 als Zytostatikum zugelassen und stellt für die Pankreaskarzinomtherapie mittlerweile als Monotherapie den Standard mit größter palliativer Wirksamkeit dar. Sie ist der 5-FU-Therapie mit einem medianen Überleben von 5,7 versus 4,4 Monaten überlegen. Obwohl die objektive Responstrate 10% auch nicht überschreitet, ist entscheidend, dass 23,8% der Patienten mit einem subjektiven klinischen Nutzen profitieren, während sich dieser Effekt nur bei 4,8% der Patienten, die mit 5-FU behandelt worden waren, nachweisen ließ (Burris et al., 1997). Ziel der aktuellen Forschung ist es, die Ergebnisse der Monotherapie mit Gemcitabine etwa durch Kombinationstherapien mit besseren Responsraten unter Erhaltung und Verbesserung der Lebensqualität zu übertreffen.

5-Fluorouracil - Lange Zeit war die Chemotherapie mit 5-FU die einzige Hoffnung für Patienten, die am Pankreaskarzinom erkrankten. Allerdings ist die Monotherapie mit 5-FU nie zu einem anerkannten Standard im Sinne der evidenzbasierten Medizin geworden, da Ergebnisse randomisierter Studien mit Responsraten von 0-67% stark schwanken (Carter et al., 1975). Seit etwa 1997 ist es von Gemcitabine (siehe oben) weitgehend abgelöst worden.

Capecitabine – Capecitabine ist ein Prodrug und wird über die Thymidinphosphorylase, die in höheren Konzentrationen im Tumorgewebe im Vergleich zum Normalgewebe vorhanden ist, in 5-FU umgewandelt. Dadurch wirkt dieses Medikament selektiv im Tumorgebiet und ist für den Patienten besser tolerierbar (Schuller et al., 2000). In der Monotherapie ist Capecitabine Gemcitabine nicht überlegen, hat aber durch die gute Verträglichkeit klinisches Potential in der Kombinationstherapie.

Von den in neuen Studien getesteten Chemotherapeutika wie Oxaliplatin, Docetaxel, Paclitaxel, Irinotecan und Raltitrexed hat sich keines gegenüber der Monotherapie mit Gemcitabine als überlegen bewährt (Löhr et al., 2003).

1.1.12 Kombinationstherapien Zytostatika

Da Monotherapien zu keiner deutlichen Verlängerung des Überlebens führen, gibt es Bestrebungen, neue Möglichkeiten in Form von Kombinationstherapien zu finden. Phase I und II Studien berichten häufig über verbesserte Responstraten durch Kombinationstherapien im Vergleich zu Monotherapien. Nie konnten aber klare Lebensverlängerungen erreicht werden und die Nebenwirkungsrate ist immer hoch (Ryan, 2005).

Der folgende Abschnitt gibt einen kurzen Überblick über die aktuelle Studienlage der Kombinationstherapien:

5-Fluorouracil-Kombinationen - Obwohl einige Studien größere objektive Responstraten in der Kombinationstherapie mit 5-FU zeigen konnten, fehlt in randomisierten Studien immer noch der Nachweis eines Vorteils der Lebenszeitverlängerung im Vergleich zur alleinigen 5-FU-Therapie.

Beispielsweise untersuchte die Arbeitsgruppe von Cullinan et al. in einer randomisierten Studie drei verschiedene Zytostatikabehandlungen an 385 Patienten. Die Monotherapie 5-FU wurde mit der Kombination 5-FU und Doxorubicin und mit 5-FU, Doxorubicin und Mitomycin verglichen. Es ergab sich in allen drei Ansätzen kein Vorteil einer Kombinationstherapie hinsichtlich der Responstrate oder in der gemessenen medianen Überlebenszeit (Cullinan et al., 1985).

Eine weitere Kombinationsstudie von Cullinan et al. bestätigte diese Ergebnisse und ergab keinen Vorteil einer Kombination im Vergleich zur alleinigen Gabe von 5-FU. Hier wurden als Kombinationspartner für das 5-FU die Zytostatika Doxorubicin, Cisplatin, Cyclophosphamid, Methotrexat, Vincristin und Mitomycin gewählt (Cullinan et al., 1990).

Immerhin sind 5-FU-Kombinationstherapien ähnlich wie die Gemcitabinmonobehandlung der „best supportive care therapy“ (alleinigen symptomatischen Therapie) in Bezug auf die Lebenszeitverlängerung weit überlegen. Eine Metaanalyse von 1974-2002, die 3458 Patienten einschloss, kam auf eine mediane Überlebenszeit von 6,4 Monaten für die auf 5-FU basierende Kombinationstherapie, während das mediane Überleben des „best supportive care“-Ansatzes im Schnitt nur 3,9 Monate betrug (Fung et al., 2003).

Gemcitabine-Kombinationen – Da Gemcitabine sich als Standardmedikament in der Monotherapie des Pankreaskarzinoms bewährt hat, liegt es nahe zu versuchen, seine Effektivität durch Kombinationen weiter zu verstärken.

Die Kombination von Gemcitabine mit 5-FU erschien zunächst sinnvoll aufgrund des präklinischen Nachweises eines synergistischen Wirkprinzips, aufgrund der guten Handhabbarkeit und wegen ihrem günstigen Nebenwirkungsprofils. Trotz dieser guten Voraussetzungen hat sich diese Kombination in randomisierten Studien der Monotherapie von Gemcitabine nicht als überlegen gezeigt (Löhr et al., 2003).

Das mit 5-FU verwandte Capecitabine ergab in Kombination in zwei Studien von 2003 hohe Responstraten und bei einzelnen Patienten sogar komplette Remissionen. Allerdings waren die Patientenkollektive mit jeweils 36 und 32 Patienten relativ klein. Derzeit werden Studien im Vergleich zur Gemcitabinmonotherapie durchgeführt, die diese Ergebnisse zukünftig bestätigen sollen.

Auch Studien einer Kombinationstherapie von Gemcitabine mit Cisplatin ergaben vielversprechende hohe Responstraten von 11,4-52,4% (Heinemann et al., 2000; Copur et al., 2001; Philip et al., 2001). Allerdings hat sich auch für diese Kombination eine signifikante Überlebensverlängerung nicht vergleichend nachweisen lassen. Angemerkt sei, dass diese erfolgsversprechende Kombination nicht mit einer Ganzkörperhyperthermie kombiniert werden kann, da Cisplatin in dieser Kombination eine starke Nephrotoxizität aufweist. Im Rahmen unserer Untersuchungen im Zusammenhang mit der Ganzkörperhyperthermie wählten wir daher das besser verträgliche Carboplatin.

Die Kombination, bei der die höchsten Ansprechraten gegen das metastasierte Pankreaskarzinom gezeigt wurden, war Gemcitabine, 5-FU, Cisplatin plus Epirubicin (PEFG Regime). Eine Studie von Reni et al. konnte Responstraten von 58%, einen klinischen Nutzen von 78% und eine Überlebenszeit von 11 Monaten an einem kleinen selektioniertem Patientenkollektiv verzeichnen (Reni et al., 2001). Diese Ergebnisse konnten in Folgestudien bislang nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bis jetzt die Monotherapie trotz Kombinationsstudien Standard der Behandlung des Pankreaskarzinoms ist. Einige Studien zeigen jedoch, dass etwa das PEFG-Regime oder die Kombination von Cisplatin mit Gemcitabine möglicherweise Alternativen mit größerem Therapieerfolg zum herkömmlichen Standard darstellen. Diese Kombinationen könnten auch nach Progress

der Erkrankung als second-line Behandlung zum Einsatz kommen. Es gilt, diese Kombination in weiteren Studien zu prüfen und ihren Effekt mit alternativen Behandlungsmöglichkeiten wie z.B. der Hyperthermie zu potenzieren.

1.1.13 Alternative Behandlungsmöglichkeiten

Alternative Behandlungsmöglichkeiten sind zum Beispiel die Gen- und die Hormontherapie. Trotz vielversprechender Ergebnisse in präklinischen Studien sind diese Therapieformen bislang noch weit davon entfernt, in der Klinik eine bedeutsame Rolle zu spielen. Ein experimenteller Erfolg in der Gentherapie lässt sich bis jetzt noch nicht in die Klinik und damit auf humane Pankreaszellen projizieren (Pearson et al., 1998). Hormontherapien mit Tamoxifen, Flutamid und Somatostatin-Analoga zeigen experimentell zwar Wirksamkeit. Doch auch sie haben bislang klinisch noch keine überzeugenden Resultate gezeigt und es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass diese Substanzen Bedeutsamkeit in der Behandlung des Pankreaskarzinoms erreichen werden.

1.2 Hyperthermie

1.2.1 Grundlagen und Wirkmechanismen der Hyperthermiebehandlung

Die Ursprünge der Hyperthermie gehen bis in die Antike zurück. Schon dort war sie als Behandlungsmethode von Tumorerkrankungen bekannt. Beispielsweise wird das „Kautern“ (Gewebszerstörung durch Hitze oder Chemikalien) eines Brusttumores im Edwin Smith Surgical Papyrus erwähnt. Zeitlich liegt dieses Ereignis circa 5000 Jahre zurück.

Im Volksmund war die Hyperthermie ein Synonym für die heilende Kraft des Fiebers. Das Wort selbst stammt aus dem Griechischen von „hyper“ (über) und „therme“ (die Wärme) (Adamietz und Wust, 2004). Als systematische Behandlungsmethode der Malignomtherapie steht die Hyperthermie erst wieder seit Mitte des letzten Jahrhunderts im Interesse der Wissenschaft, vor allem als Grundlage der multimodalen Therapie (Bisht und Uma, 1996; Falk und Issels, 2001; Hegewisch-Becker und Hossfeld, 2001; Wust et al., 2002,). Jede Tumorthherapie macht sich das unterschiedliche Ansprechen von Normgewebe und Tumorgewebe zu Nutze. Man geht davon aus, dass ein verändertes Umgebungsmilieu im Tumorbereich die erhöhte Thermosensitivität im Gegensatz zum Normalgewebe ausmacht (Overgaard, 1977; Hahn, 1982). Grund für die veränderten Umgebungsfaktoren ist ein schnelles Tumorwachstum mit ungenügender und

ungleichmäßiger Blutzirkulation, das zum Missverhältnis zwischen Stoffwechselbedarf und eigentlicher Versorgung führt. Daraus resultiert ein niedriger pH-Wert, bedingt durch einen geringen Sauerstoff- und Nährstoffgehalt im Tumorgewebe. Ein niedriger pH-Wert wiederum sensibilisiert die Tumorzellen für thermische Einwirkungen (Hahn 1982).

Die erfolgreiche Wirkung der Hyperthermie hängt vor allen Dingen von der erreichten Temperatur im Tumorareal ab. Ab Temperaturen von $>42^{\circ}\text{C}$ beginnt ein direkt zytotoxischer Effekt auf die Tumorzellen zu wirken (Horsman und Overgaard, 1997). Ursache für diesen Effekt ist die Störung der Synthese von DNA, RNA und Proteinen durch denaturierende Prozesse (Dewey und Holahan, 1984). Dieser direkt zytotoxische Effekt ist in der Tumorthherapie nur lokal einsetzbar und in der Ganzkörperhyperthermie wegen der hohen Nebenwirkungen für die Patienten nicht tolerierbar. Hier kann die milde Hyperthermie von Temperaturen um $41,8^{\circ}\text{C}$ eingesetzt werden. Zum einen sensibilisiert sie die Tumorzellen für die Effekte von Chemo- und Strahlentherapie durch Schädigung der DNA-Reparaturenzyme, zum anderen verbessert die milde Hyperthermie zu Beginn die Oxygenierung des Tumorareals, was zu einer erhöhten Strahlenwirksamkeit führt (Dietzel, 1983). Bei einer Kombinationstherapie mit einem Zytostatikum bewirkt die Hyperthermie zum einen durch bessere Durchblutung und Oxygenierung im Tumorareal einen erhöhten Medikamentenspiegel (Wiedemann et al., 1992; Wiedemann et al., 1992) und durch den erhöhten Zellstoffwechsel eine vermehrte Aufnahme des Zytostatikums in die Zelle. Zum anderen sensibilisiert die Hyperthermie die Zellen für Zytostatika und erhöht die medikamentenspezifische Wirkung. Dies gilt besonders für alkylierende Substanzen und solche, die mit der DNA in Wechselwirkung treten, wie zum Beispiel Platinderivate (Adamietz und Wust, 2004).

Einen weiteren Einfluss auf den Erfolg der Hyperthermiebehandlung hat die Zellzyklusphase, in der sich die Tumorzellen befinden. Es zeigte sich, dass Tumorzellen speziell in der M- und S-Phase des Zellzyklus thermosensibel sind, während dagegen Zellen der G0/G1-Phase hitzeresistente Eigenschaften besitzen (Mackey und Dewey, 1989; Dietzel, 1983).

Klinische Anwendung findet die Hyperthermie bei malignen Tumoren, die durch Operation, Bestrahlung oder konventionelle Chemotherapie nicht mehr kurativ behandelt werden können. Zu diesen Neoplasien zählt auch das Pankreaskarzinom. Appliziert werden kann die Hyperthermie lokal, regional oder als Ganzkörperhyperthermie (Robins et al., 1989). Technische angewandte Verfahren zur hyperthermen Applikation sind z.B. die interstitielle Hyperthermie, die hypertherme Perfusion, die Magnetfeldhyperthermie, die direkte Thermoablation und die Ganzkörpererwärmung (Robins et al., 1989; Adamietz und Wust, 2004). Die Ganzkörperhyperthermie ist für den Patienten im Allgemeinen recht gut verträglich und mit wenig Nebenwirkungen verbunden (Moroz et al., 2002). Die

meisten Nebenwirkungen der Hyperthermie, wie zum Beispiel Kreislaufüberlastungen oder lokale Überhitzungen bis kleinere Verbrennungen, treten unmittelbar während der Therapieapplikation auf, wobei die Ganzkörpertherapie als Anwendungsform vor allem eine Belastung für den Kreislauf darstellt und für den Patienten ein höheres Nebenwirkungsprofil aufweist als die lokalen Hyperthermieformen (Adamietz und Wust, 2004). Im folgenden Abschnitt ist die Ganzkörperhyperthermie speziell noch einmal beschrieben, da sie als technisches Verfahren in Kombination mit Zytostatikatherapie in der hier ausgewerteten Pilotphase im Rahmen individueller Heilversuche verwendet wurde.

1.2.2 Ganzkörperhyperthermie

Die Ganzkörperhyperthermie erwärmt den gesamten Körper und hat damit im Gegensatz zur lokalen und regionalen Hyperthermie als einzige Hyperthermieform die prinzipielle Möglichkeit auch metastasierte Tumore zu behandeln. Sie wird nur in Kombination z.B. mit Zytostatika eingesetzt (Adamietz und Wust, 2004).

Für die Ganzkörperhyperthermie werden Infrarotsysteme, infrarotähnliche Systeme (Aquatherm) sowie dialyseähnliche Systeme zum Aufheizen des Blutes verwendet. In der Regel findet die Behandlung in einer tiefen Analgo-Sedierung statt.

Bei der hier ausgewerteten Studie wurde ein infrarotähnliches System verwendet. Hier wird die Wärmestrahlung in einer Kammer durch heißes Wasser induziert, das durch Kupferröhren fließt. Um eine evaporative Wärmeabgabe zu vermeiden, ist die Luft in der Kammer wasserdampfgesättigt (Bakshandeh et al, 2000).

Speziell die Form der Ganzkörperhyperthermie führt durch die Anhebung der Körpertemperatur zu einer sehr starken Kreislaufbelastung des Organismus. Die Behandlungsform ist daher nur kreislaufstabilen Patienten zugänglich und findet unter intensivmedizinischer Betreuung statt.

Eine Chemotherapie mit einer Ganzkörperhyperthermie wurde in vielen Phase I und II Studien untersucht (Wiedemann et al., 1996, Wiedemann et al., 1997). Obwohl diese Studien gerade im Vergleich zur historischen Kontrolle häufig positive Ergebnisse widerspiegeln, blieb der Nachweis der Wirksamkeit durch Phase IIb und Phase III Studien aus.

Breiten Einsatz fand die Ganzkörperhyperthermie zur Verstärkung von Zytostatika bei Weichteilsarkomen und Pleuramesotheliomen (Wiedemann et al., 1996; Wiedemann et al., 1997; Bakshandeh et al, 2000).

Die Datenlage zur Kombination einer Chemotherapie mit der Ganzkörperhyperthermie zum metastasierten Pankreaskarzinom ist sehr spärlich. Demzufolge muss dieser Therapieansatz als experimentell angesehen werden.

Prinzipiell gilt für jede Tumorbehandlung, vor allen solcher mit potentiell invasivem Charakter, dass präklinische Daten die Wirksamkeit stützen sollten.

In der Etablierung der Thermochemotherapiebehandlung des Pankreaskarzinoms haben wir zum einem präklinische Daten des Thermochemotherapieeinflusses auf die Zelllinie DAN-G geschaffen. Zum anderen haben wir eine Pilotphase, die im Rahmen individueller Heilversuche die Wirksamkeit einer Ganzkörperhyperthermie in Kombination mit einer Zytostatikatherapie prüft, beobachtet und zusammenfassend ausgewertet.

1.3 Mit Hyperthermie kombinierte Chemotherapeutika

Wir wählten für unsere Untersuchung das derzeitige Standardmedikament Gemcitabine in Kombination mit einem Alkylanz. Hier fiel die Wahl auf Carboplatin und nicht auf das in vielen Studien unter normalen Temperaturbedingungen in Kombination mit Gemcitabine verwendete Cisplatin. Grund hierfür ist die Nephrotoxizität von Cisplatin, wenn es mit Hyperthermie kombiniert wird (Mella et al., 1987; Wondergem et al., 1988). Im folgenden sind die beiden in der Studie verwendeten Zytostatika kurz beschrieben:

1.3.1 Carboplatin

Carboplatin (cis-Diamin(1,1-Cyclobutan-dicarboxylato)platin (II)) gehört zu der Zytostatikagruppe der alkylierenden Substanzen (alkylieren = Einfügen einer Alkylgruppe) (Roche Lexikon Medizin, 1999). Der Hauptangriffspunkt dieses Zytostatikums ist bevorzugt die N-7-Position des Guanins und Adenins (Zeller, 1995). Hier kommt es zu einer kovalenten Bindung von Zytostatikum und DNA. Das Zytostatikum reagiert an zwei unterschiedlichen Lokalisationen der DNA. Es bildet innerhalb eines DNA-Stranges und zwischen den beiden DNA-Strängen Quervernetzungen (intrastrand/interstrand cross-links). Dieses führt zu einer Inhibition der Synthese und der Transkription der DNA. Die Wirkung von Carboplatin ist nicht zellzyklusphasenspezifisch (Karow und Roth, 2003).

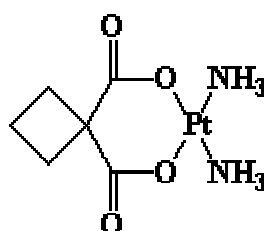


Abbildung 1: Strukturformel Carboplatin

Im Nebenwirkungsprofil des Zytostatikums ist die Myelosuppression der wesentliche dosislimitierende toxische Effekt (van der Vijgh, 1991). Ferner werden Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Ototoxizität und gastrointestinale Störungen wie Übelkeit und Erbrechen beobachtet (Karow und Roth, 2003).

Das in den meisten Studien zur Behandlung des Pankreaskarzinoms verwendete Cisplatin hat denselben Wirkmechanismus wie Carboplatin, unterscheidet sich von diesem aber durch ein anderes Nebenwirkungsprofil und seine höhere Instabilität (van der Vijgh, 1991).

1.3.2 Gemcitabine

Gemcitabine (2',2'-difluordeoxycytidin=dFdC) ist ein Pyrimidin-Analogon des Deoxycytidins der DNA. Als Prodrug wird das Zytostatikum durch Nukleosidkinasen phosphoryliert und aktiviert. Es entstehen Gemcitabinmono-, -di-, und -triphosphat (dFdCMP, dFdCDP, dFdCTP). Aktiv wirken jedoch nur dFdCDP und dFdCTP. Zum einen wird die Ribonukleotidreduktase durch dFdCDP gehemmt. Sie katalysiert die Synthesereaktion der Produktion von Desoxynukleotidtriphosphate (dCTP = Baustein der DNA). Der zweite aktive Metabolit dFdCTP konkurriert mit diesem Baustein dCTP um den Einbau in die DNA. Die sinkende Konzentration von dCTP verstärkt den Einbau von dFdCTP (Plunkett et al., 1995; Plunkett et al. 1995; Lilly, 2004). Hinter dem Pyrimidinanalogon lagert sich eine weitere nicht veränderte Base an (masked chain-termination). Dieses bewirkt eine Hemmung des Reparaturmechanismus (der Exonukleasen). Es kommt zur Hemmung der DNA-Synthese und zur Apoptose der Zellen (Plunkett et al., 1995; Plunkett et al. 1995).

Gemcitabine wirkt zellphasenspezifisch in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus (Lilly, 2004).

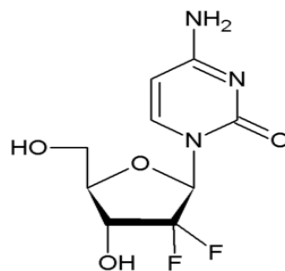


Abbildung 2: Strukturformel Gemcitabine

Gemcitabine ist ein für die Patienten relativ gut verträgliches Zytostatikum. Zu den am meisten berichteten Nebenwirkungen gehören Symptome wie Übelkeit, Erbrechen, Anstieg der Transaminasen oder der alkalischen Phosphatase, Hautexantheme oder Ödeme. Dosisbegrenzende Nebenwirkung dieses Zytostatikums ist die Myelosuppression (Lilly, 2004).

1.3.3 Gemcitabine und Carboplatin

Wegen der großen Unterschiede von Cisplatin und Gemcitabine in den Wirkmechanismen und den Nebenwirkungsprofilen haben sie in der Kombinationstherapie ein großes klinisches Potential (Peters et al., 1995). Ihre Wirkung ist synergistisch. Dieses synergistische Wirkprinzip beruht zum einen darauf, dass Gemcitabine ein Inhibitor des DNA-Reparaturmechanismus ist und die durch Cisplatin hervorgerufenen multiplen Veränderungen der DNA potenziert (van Moorsel et al., 1999; Yang et al., 2000). Zum anderen steigert Cisplatin den Einbau von Gemcitabintriphosphat in die DNA (van Moorsel et al., 1999). Auch in klinischen Studien konnte die Effektivität dieser Kombinationstherapie nachgewiesen werden (Heinemann et al., 2000; Philip et al., 2001; Colucci et al., 2002).

In der Literatur findet man zusätzlich Versuche, durch die zeitlich **versetzte** Gabe dieser beiden Zytostatika ihre synergistische Wirkung zu verstärken. Die Ergebnisse variierten in Abhängigkeit von den behandelten Tumorzellen. In einer Studie von van Moorsel et al. mit Lungentumorzellen im Tiermodell konnte eine Wirkverstärkung durch die vorangehende Behandlung mit Gemcitabine und eine nach vier Stunden folgende Gabe von Carboplatin belegt werden (van Moorsel et al., 1999). Braakhuis et al. dagegen fanden heraus, dass in Xenograftlinien von Kopf- und Halstumoren eine **simultane** Gabe der Kombinationstherapie oder vorangehende Gabe von Carboplatin von Vorteil ist (Braakhuis et al., 1995).

2 Fragestellung

Bei der Behandlung des fortgeschrittenen metastasierten Pankreaskarzinoms zeigt lediglich das Chemotherapeutikum Gemcitabine eine klassisch relevante Wirksamkeit mit 5% objektivem Ansprechen. Die Thermochemotherapie könnte die Wirksamkeit dieses Zytostatikums möglicherweise erhöhen.

Diese Dissertationsarbeit befasst sich mit präklinischen und klinischen Aspekten eines Therapiekonzeptes unter Verwendung von Carboplatin und Gemcitabine in Kombination mit einer Ganzkörperhyperthermiebehandlung.

Folgende Fragen sind durch diese Versuche zu beantworten:

1. Wie ist die Wirksamkeit der zytostatischen Substanzen allein oder in Kombination auf die humane Pankreaskarzinom-Zelllinie DAN-G einzuschätzen?
2. Verstärkt sich die Wirksamkeit der oben genannten Medikamente unter Hyperthermiebedingungen in vitro auf die DAN-G Zellen?
3. Beeinflusst die Thermochemotherapie den Zellzyklus bzw. wie viele Zellen befinden sich vor und nach der Thermochemotherapie in der kaum thermosensiblen G₀-Phase?
4. Ändert sich die Wirksamkeit der Medikamente Carboplatin und Gemcitabine in Kombination durch eine sequentielle zeitlich versetzte Gabe?

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Dissertationsarbeit ist die Auswertung des Therapiekonzeptes der Kombination von Carboplatin, Gemcitabine und Ganzkörperhyperthermie an Patienten mit inoperablem Pankreaskarzinom, die im Rahmen von individuellen Heilversuchen an der Universität zu Lübeck behandelt worden sind.

3 Material und Methoden

3.1 Zelllinien

Die in unseren in vitro Versuchen verwendete Zelllinie DAN-G entstammt der Tumorzellsammlung des dem Deutschen Krebsinstitut assoziierten Instituts „Cell Lines Service“ (Heidelberg BRD). Histologisch handelt es sich um einen Tumor epithelialer Herkunft. Die Zellen wurden dem Primärtumor eines 68-jährigen Patienten kaukasischer Abstammung extrahiert. Die Zelllinie hat eine Verdopplungszeit von 33 Stunden.

3.2 Kulturbedingungen

Die Tumorzellen der DAN-G-Zelllinie wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen aus Polystyrol (Nunc) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relative Feuchte als subkonfluente Monolayerkultur im Brutschrank kultiviert. Dem Medium RPMI 1640 (Cambrex) wurden 50 ml 10% fetales Kälberserum (Biochrom) und 1 ml Penicillin-Streptomycin (Roche) in einer Konzentration 50000 U/ml Penicillin und 50 mg/ml Streptomycin zugesetzt. Ein- bis zweimal pro Woche wurde in Abhängigkeit von der Zelldichte entweder das Medium gewechselt oder die Zellen passagiert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:10 verdünnt.

3.3 Kristallviolett-Test

Die Bestimmung der Zellmasse als Maß für die Proliferation nach Zytostatikaexposition und die Lebensfähigkeit der untersuchten Zellreihe erfolgte durch den Kristallviolett Assay. Im Gegensatz zum MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) Assay, der die metabolische Aktivität der Zellen misst, basiert der Kristallviolett Assay auf die totale Bindungskapazität der Zellen, die mit der Biomasse der Zellen korreliert (Bernhardt et al, 1992). Die Untersuchung der Zellreihen auf ihre Zytostatikasensibilität durch den Kristallviolett Assay basiert auf den standardisierten Kristallviolett Assay für monolayer Kulturen (Gillies et al., 1986; Kueng et al., 1989; Reile et al., 1990).

Der am Ende des Versuches durch Essigsäure aus den Zellen gelöste Farbstoff Kristallviolett (N-hexamethylpararosaniline) ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Er wird photometrisch bestimmt.

Nach Einstellen der benötigten Zellzahl ($3 \times 10^4/\text{ml}$ oder $1 \times 10^6/\text{ml}$ im Zellzyklusversuch) werden die Ansätze nach Ablauf des jeweiligen Versuchsprotokolls (Erfassung des Linearitätsbereichs, IC50 Findung, Thermochemotherapie etc.) in die Vertiefungen einer 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc) ausgesät und nach Inkubation durch den Kristallviolett Assay ausgewertet. Ein Versuchsansatz entspricht sechs Vertiefungen. Im folgenden ist das Versuchsprotokoll des Kristallviolett Assays beschrieben.

Kristallviolett-Testdurchführung:

1. Die zu untersuchenden Zellen werden in Mikrotiterplatten inkubiert und behandelt. Immer wird eine Kontrolle ohne Prüfsubstanz mitgeführt.
2. Nach der Inkubationszeit bzw. Behandlung mittels Zytostase werden 20 μl Glutaraldehyd-Lösung (11%) zur Fixation der Zellen hinzugegeben, 15 Minuten auf einem Plattenrüttler gemischt, anschließend mit Aqua dest. gewaschen und an der Luft getrocknet.
3. Im nächsten Schritt werden 100 μl des 0,1%-igen Farbstoffes Kristallviolett 20 Minuten auf die Zellen gegeben und ebenfalls auf dem Plattenrüttler gemischt.
4. Nach erneutem Waschen und Trocknen lysieren 100 μl einer 10% Essigsäurelösung die Zellen und setzen den Farbstoff frei.
5. Bei 590 nm werden die Mikrotiterplatten photometrisch gemessen und die Extinktionswerte in Excel ausgewertet.

Verwendete Reagenzien:

- Aqua dest.
- Essigsäure (Merck)
- Fetales Kälberserum (FKS) (Biochrom)
- Glutaraldehyd Grade II 25% Aqueous Solution (Sigma)
- Kristallviolett (Sigma)
- NaCl-Lösung 0,9%
- Penicillin Streptomycin (Roche)
- RPMI 1640 Medium (Cambrex)
- Trypsin EDTA (Boehringer)

3.4 Erfassung des Linearitätsbereichs der verwendeten Zelllinie

Um Standardbedingungen für die Zelllinie DAN-G und die Therapieversuche aufzustellen, wurde die Beziehung zwischen Zelldichte, Absorption und Inkubationszeit untersucht. Die Zellzahl und die Inkubationszeit für alle weiteren Versuche wurden anhand der Ergebnisse gewählt.

Aus einer exponentiell und adhärent wachsenden Stammkultur wurden die Zellen einer 75 cm² Kulturflasche trypsinisiert. Trypsin spaltet die Adhäsionsproteine der Zellen, die ein Anheften am Boden der Kulturflasche ermöglichen. In einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl $\times 10^6$ berechnet:

Rechnung:
$$\frac{n \times 2,5}{1000} = \text{Zellzahl} \times 10^6/\text{ml}$$

In sterilen Zellkulturröhrchen wurde eine Zellverdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen hergestellt:

Tabelle 2: Zellverdünnungsreihe zur Messung des Linearitätsbereiches der Zelllinie DAN-G

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4	Ansatz 5
1 x 10 ⁵ /ml	5 x 10 ⁴ /ml	2 x 10 ⁴ /ml	1 x 10 ⁴ /ml	5 x 10 ³ /ml

Je 100 µl einer Verdünnungsstufe wurden zu 100 µl Medium in ein Well der Mikrotiterplatte pipettiert. Ein Ansatz entsprach sechs gleichbefüllten Wells.

Pro Ansatz wurde ein Leerwert mitgeführt, der aus 200 µl Medium bestand. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Feuchte inkubiert. An den vier darauf folgenden Tagen, d.h. nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde jeweils eine Mikrotiterplatte dem Brutschrank entnommen und mittels des Kristallviolett Assays gemessen. Auf Grund dieser ermittelten Linearität des Wachstums und der Inkubationszeit war es möglich, den für die Versuche optimalen Messbereich zu ermitteln.

3.5 Ermittlung der Zytostatikakonzentrationen

Die Zellen wurden in unseren Untersuchungen mit den Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine behandelt. Carboplatin wird im Rahmen der klinischen Thermochemotherapie dem stärker zytotoxisch wirksamen Cisplatin vorgezogen, da Cisplatin in der Kombination mit Hyperthermie in vivo eine dosislimitierende

Nephrotoxizität hervorruft (Mella et al., 1987; Wondergem et al., 1988). Da es Ziel der Studie ist, bei erfolgreichen Ergebnissen im in vitro Modell die Therapieoption der Thermochemotherapie für das Pankreaskarzinom in ein in vivo Modell zu übertragen, wählten wir das besser verträgliche Carboplatin.

Es sollte für beide Medikamente die Inhibitionskonzentration von 50% bestimmt werden. Das heißt, dass für die Versuche die Konzentrationen der Medikamente benötigt wurden, die zur Reduktion der Zellzahl auf 50% führen. In diesem mittleren Überlebensbereich lassen sich sowohl große positive als auch negative Abweichungen erfassen.

Versuchsablauf:

1. Am ersten Tag wurden die Zellen in einer Konzentration von 3×10^4 /ml in Mikrotiterplatten eingesät und unter Standardbedingungen inkubiert (100 μ l Zellsuspension und 100 μ l Medium pro Well).
2. Am zweiten Tag wurden die Kulturüberstände entfernt und 200 μ l eines zytostatikahaltigen Mediums auf die Zellen gegeben. Zu diesem Zweck wurden Stammlösungen der beiden Medikamente in steriler PBS-Lösung angesetzt und weiter verdünnt.

Tabelle 3: Verwendete Endkonzentrationen von Carboplatin und Gemcitabine

Medikament	Endkonzentrationen
Carboplatin	20-200 μ g/ml
Gemcitabine	0,025-5000 μ g/ml

Wegen der kurzen Haltbarkeit der Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine wurden jeweils neue Stammlösungen pro Versuch angesetzt. Besonders Carboplatin ist bei Lösung in einem Cl-haltigen oder sauren Medium instabil und wird in Cisplatin umgewandelt (Curis et al., 2000; Schnurr und Gust, 2002). Nach Zytostatikazugabe wurden die Zellen erneut im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO² und 95% relativer Feuchte inkubiert.

3. Am vierten Tag wurde die zytotoxische Wirkung mittels des Kristallviolett Assays zur Feststellung der Zellüberlebensrate, wie unter 2.3 beschrieben, bestimmt. Die immer mitlaufende Kontrolle entspricht dem Wachstum von 100%.
4. Die Ergebnisse wurden in MS-Excel ausgewertet und die Inhibitionskonzentration 50% mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism 4 (Version 4.0) ausgerechnet.

Die in diesen Versuchen ermittelten IC₅₀-Konzentrationen der beiden Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine wurden in allen weiteren Versuchen verwendet.

3.6 Hyperthermieerzeugung

Um die Zellen für eine Stunde unter reproduzierbaren Bedingungen auf 39°C, 41,8°C und 43°C zu erwärmen, wurden sie in Safe-Lock Eppendorf Tubes (2 ml) in ein vorgeheiztes, temperaturkontrolliertes Wasserbad gestellt. Diese ist laut einer Arbeitsgruppe die am besten zu steuernde Erwärmung der Zellen (Wößmann, 1994). Nach einer Aufwärmphase von 15 Minuten erfolgte die einstündige Hyperthermiebehandlung der jeweiligen Versuchsansätze. Während der Therapie wurde die Temperatur des Wasserbads ständig über ein Thermometer kontrolliert.

3.7 Thermochemotherapie

Die Zellen einer Passage wurden trypsiniert und in einem 50 ml-Röhrchen bei 1500 U/min in der Megafuge drei Minuten lang zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Für die Versuche wurde die Zellzahl auf 3×10^4 /ml eingestellt.

Parallel dazu wurden die Inhibitionskonzentrationen 50% von Carboplatin und Gemcitabine hergestellt. Jedes Eppendorf-Röhrchen enthielt 1 ml Zellen und 1 ml des jeweiligen Zytostatikums. Der Kontrollansatz beinhaltete statt des zytostasehaltigen Mediums reine PBS-Lösung.

Folgende Ansätze wurden hergestellt:

Tabelle 4: Die einzelnen Ansätze der Thermochemotherapieversuche

Temperatur	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
37°C	Kontrolle	Carboplatin	Gemcitabine	Carboplatin und Gemcitabine
39°C	Kontrolle	Carboplatin	Gemcitabine	Carboplatin und Gemcitabine
41,8°C	Kontrolle	Carboplatin	Gemcitabine	Carboplatin und Gemcitabine
43°C	Kontrolle	Carboplatin	Gemcitabine	Carboplatin und Gemcitabine

Die Eppendorf Tubes wurden mit dem jeweiligen Ansatz in die vorgeheizten und temperaturkontrollierten Wasserbäder gestellt. Der 37°C Ansatz wurde im Brutschrank bei 5% CO₂ und 95% relativer Feuchte inkubiert. Das entsprach den Bedingungen der Vorversuche. Da es sich bei den Eppendorf Tubes allerdings um geschlossene Systeme handelt, kann man annehmen, dass es durch die unterschiedlichen Atmosphären nicht zu unterschiedlichen Versuchsbedingungen kam. Es folgte die einstündige Hyperthermiebehandlung, in deren Verlauf die Temperatur ständig kontrolliert wurde. Nach Ablauf der Therapie wurden die Zellen in der Eppendorf Zentrifuge (5417R) bei 1500 U/min drei Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 1 ml frischem und sterilem Medium resuspendiert. Die behandelten Zellen wurden in Mikrotiterplatten eingesät (100 µl Zellen und 100 µl Nährmedium). Jeder einzelne Ansatz bestand aus sechs Mikrotiterwells. Die Versuche wurden für jeden Sechsfach-Ansatz mindestens sechsmal durchgeführt.

Anschließend wurden die Zellen unter den Standardkulturbedingungen für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur Auswertung des Versuches wurden die Extinktionen der Ansätze mittels des oben beschriebenen Kristallviolett Assays bestimmt.

3.8 Zeitlich versetzte Zytostatikabehandlung

Die Zellzahl wurde auf 3×10^4 /ml eingestellt. Parallel wurden die Stammlösungen von Carboplatin und Gemcitabine hergestellt und auf ihre jeweiligen IC₅₀-Konzentrationen verdünnt.

Tabelle 5: Ansätze der zeitlich versetzten Gabe der Zytostatika

Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3
Carboplatin und Gemcitabine zeitgleich	Erst Carboplatin und nach ½ h Gemcitabine	Erst Gemcitabine und nach ½ h Carboplatin

Je 1 ml Zellen und 1 ml des jeweiligen Zytostatikums wurden in ein Eppendorf Tubes gegeben und bei 37°C unter Standardbedingungen im Brutschrank inkubiert. Nach einer halben Stunde wurde das jeweilige noch fehlende Zytostatikum in Ansatz 2 und 3 dazugegeben. Nach Zentrifugation und Resuspension in 1 ml Nährmedium wurden die Zellen in Mikrotiterplatten eingesät und für 72 Stunden im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Die Ansätze wurden im Kristallviolett Assay gemessen und ausgewertet.

3.9 Analyse des Zellzyklus

3.9.1 Prinzip der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse

Somatische Zellen unterliegen einem Zellzyklus, der sich in Stadien einteilen lässt. Unterschieden werden können sie zum Beispiel durch den unterschiedlichen DNA-Gehalt. Nach der mitotischen Zellteilung, die aus Pro-, Meta-, Ana- und Telophase besteht, treten die Zellen in die G₀- oder G₁-Phase ein. Sowohl in der G₁-Phase, die der Wachstumsphase entspricht, als auch in der G₀-Phase, der Ruhephase, weisen eukaryote Zellen einen diploiden Chromosomensatz (2n) auf. In der darauf folgenden S-Phase, der Synthesephase, variiert der DNA-Gehalt zwischen 2n und 4n, bis in der G₂-Phase ein doppelter diploider Chromosomensatz vorliegt. In der folgenden Mitose verteilt sich der Chromosomensatz auf zwei Tochterzellen.

Diesen variierenden DNA-Gehalt im Zellzyklusverlauf macht man sich bei der FACS-Analyse zu Nutzen. Die Zellen werden vorbereitend denaturiert, in diesem Fall durch Salzsäure (HCl). So ist es möglich, sie mit Bromodesoxyuridin (BrdUrd) zu markieren (BrdUrd Staining). Erst durch die Denaturierung der DNA und die Markierung mit BrdUrd lässt sich die DNA mit einem Antikörper färben (Dolbeare et al., 1983). Verwendet wurde der fluoreszierende Antikörper 7-AAD (Fa. Sigma, Deisenhofen). Der Gehalt dieser fluoreszierenden Antikörper ist proportional zum DNA-Gehalt der Zellen und lässt Rückschlüsse auf die jeweilige Zellzyklusphase zu (Siehe Abbildung 3).

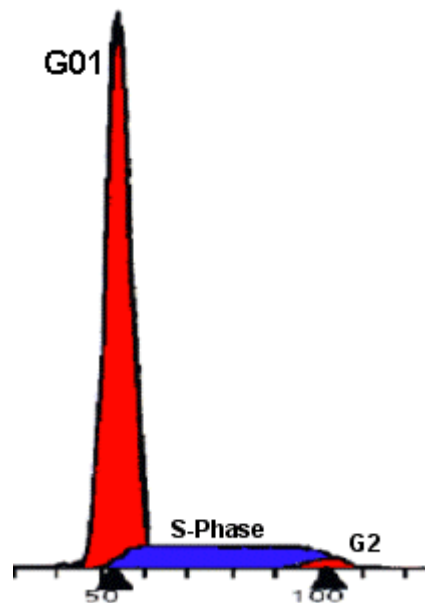


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer Zellzyklusanalyse durch FACS-Scan (Auf der Abszisse ist die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen, die proportional zum DNA-Gehalt ist. Die Ordinate entspricht der Anzahl der Zellen).

Gemessen werden die Zellen in einem Durchflusszytometer, dem FACS-Gerät. Die Abkürzung FACS steht für Fluoreszenz-Activated-Cell-Sorter. Grundlage dieser Messung ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion mit den fluoreszierenden Antikörpern. Das die fluoreszierenden Antikörper anregende Licht stammt in der analytischen Durchflusszytometrie meist von einem Argonlaser. Er erzeugt monochromatisches Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm. Der verwendete Antikörper muss sein Absorptionsspektrum im Bereich dieser Wellenlänge haben, denn je weiter es vom Absorptionsmaximum von 488 nm entfernt ist, desto geringer ist die Intensität der Fluoreszenz (Volk, 1991). Der Strahl des Argonlasers wird durch ein Linsensystem gebündelt und in eine elliptische Form gebracht.

Damit die Zellen gleichmäßig und vollständig durch den Laserstrahl beleuchtet werden, müssen sie einzeln und mittig durch das Glasröhrchen fließen. Um das zu gewährleisten, ist die Zellsuspension von einer Mantelflüssigkeit (sheath fluid) umgeben, die einen höheren Druck als die Probe aufweist. Die Zellsuspension wird durch eine Düse (\varnothing 70 μ m) gepresst, wodurch die Beschleunigung des Zellflusses eine Aufreihung der einzelnen Zellen bewirkt. Sie kreuzen den Laserstrahl im rechten Winkel. Durch die Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden sie auf ein höheres Energieniveau gehoben. Während des folgenden Rückfalls auf ihr Ursprungsniveau wird Energie in Form von Photonen frei. Über eine spezielle Photodiode wird die Photonenkonzentration registriert. Jede Zelle kann durch den Gehalt an Fluoreszenz und durch entstehende Lichtbeugung und Lichtstreuung analysiert werden.

Man erhält Informationen über die Größe, die Granulation und die Fluoreszenzeigenschaften der Zelle. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellzyklusstadien untersucht und damit die Quantität der gemessenen Fluoreszenz.

An das FACS-Scan war ein Apple Macintosh angeschlossen, an dem die gemessenen Daten ausgewertet wurden.

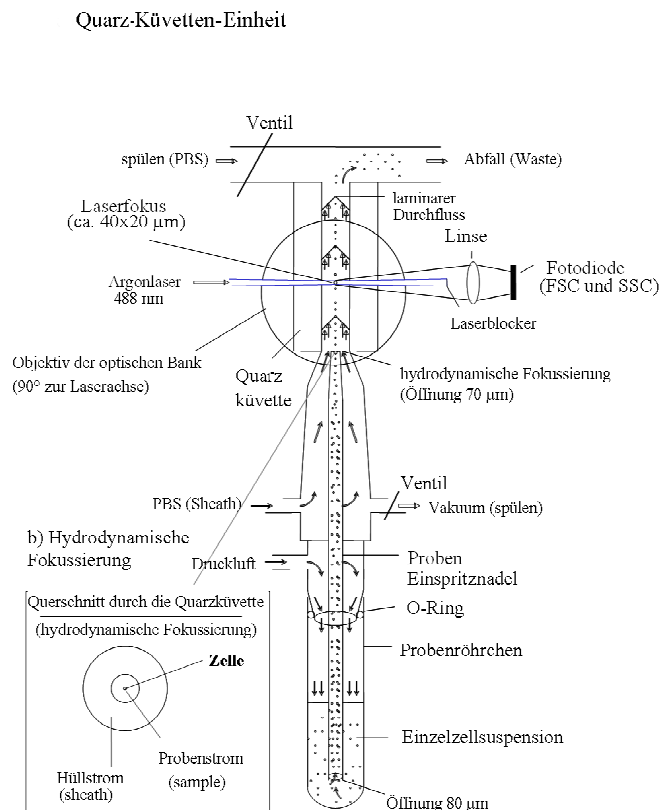


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Durchflusszytometrie (aus: Internet; <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)

3.9.2 Versuchsablauf der Zellzyklusanalyse

Um die Phase des Zellzyklus zu bestimmen, in der sich die Zellen nach der Behandlung durch Thermochemotherapie befanden, wurden sie wie unter 2.7 beschrieben erneut behandelt. Einziger Unterschied war, dass die Zellzahl nicht $3 \times 10^4/\text{ml}$ betrug, sondern auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt wurde. Grund hierfür war die für die Messung am FACS-Scan-Gerät mindestens benötigte Zellzahl. Durch die Reduktion der Zellzahl nach der Thermochemotherapiebehandlung entsprach die Zellzahl $1 \times 10^6/\text{ml}$ dem mindestens benötigten Zellvolumen. Nach Einstellen dieser Zellzahl wurde auch in diesem Versuch aus der Stammlösung von Carboplatin und Gemcitabine die jeweilige IC_{50} -Konzentration hergestellt. Im Anschluss erfolgte die Behandlung der Zellen bei 37°C im Brutschrank unter den o.g. Standardbedingungen. Die Ansätze mit 39°C und $41,8^\circ\text{C}$ wurden wiederum im Wasserbad für eine Stunde inkubiert. Der Thermochemotherapieansatz der Zellen bei 43°C entfiel, weil in diesem Temperaturbereich nach der Behandlung nicht mehr genügend Zellen zur Zellzyklusmessung vorhanden waren. Im Anschluss an die Thermochemotherapie wurden die Zellen nach dem New Acid Protokoll (Sasaki et al., 1988) lysiert und die DNA mit dem 7-AAD (Fa. Sigma, Deisenhofen) Antikörper markiert.

Es folgte die FACS-Analyse. Im folgenden Abschnitt ist das New Acid Protokoll dargestellt.

3.9.3 New Acid Protokoll (Sasaki et al., 1988)

1. Ablösung der Zellen
 - Zugabe von 1 ml Trypsin und 10 ml NaCl auf die Zellen
 - nach Ablösung der adhärennten Zellen vom Boden Zugabe von 4 ml Medium
 - Zentrifugation im Falconröhrchen 3 min. bei 1500 rpm
 - Resuspendierung in 200 µl PBS

2. Fixation der Zellen
 - Zugabe von 1 ml DMS-Fixierlösung
 - 5 min. Fixation bei -20°C
 - Zentrifugation 3 min. 1500 rpm
 - 1x Waschen
 - Resuspendierung in 100 µl PBS

3. Säureanreicherung (New Acid Treatment)
 - Zugabe von 1 ml HCl (2N)
 - 30 min. bei Raumtemperatur einwirken lassen
 - Zentrifugation 3 min. 1500 rpm
 - Zugabe von 1 ml 0,1M Borax (pH 9,0)
 - 20 min. bei Raumtemperatur einwirken lassen
 - Zentrifugation 3 min. 1500 rpm
 - 1x Waschen mit 1 ml PBS

4. Färbung (BrdU-Staining)
 - Resuspendierung in 1 ml PBS
 - In ein FACS-Röhrchen überführen
 - 20 µl 7-AAD hinzufügen
 - 30 min Einwirkzeit (im Dunkeln)

Tabelle 6: Ansätze der verschiedenen Reagenzien für das New Acid Protokoll

Borax	1,9 g + 50 ml Aqua. Dest.
Antikörper (7AAD)	1 mg 7AAD + 2 ml PBS
DMS-Stock	100 mg DMS + 1 ml Methylformamid
DMS-Puffer	600 mg Tris-Puffer + 1000 mg NaSo ₄ + 100 ml Aqua.dest.
Fixierlösung	1 ml DMS-Puffer + 100 µl DMS-Stock

3.10 Biometrische und statistische Auswertung der Versuche

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm MS-Excel durchgeführt. Aus den durch den Kristallviolett Assay ermittelten Absorptionswerten wurde die relative Absorption (Zellüberlebensrate) folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\text{Mittelwert der optischen Dichte des jeweiligen Versuchsansatzes (OD)}}{\text{Mittelwert der Kontrolle (Zellen bei 37°C ohne Zusatz) (OD)}}$$

Zusätzlich wurden die Standardabweichungen in MS-Excel errechnet.

Die als IC₅₀ definierte Konzentration ist die Konzentration eines Zytostatikums, bei der noch 50% der behandelten Zellen überleben. Diese ließen sich aus den ermittelten Graphen bestimmen. Es ergaben sich Graphen nicht-linearer Funktion. Deshalb wurden die sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven erstellt und die IC₅₀-Konzentration mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism 4 (Version 4.0) berechnet.¹

Zur Bestimmung der Zellzyklusstadien der Versuchsansätze wurden die gewonnenen Daten mit dem Softwareprogramm Cylchred (Cell Cycle Analysis of DNA histograms by Cylchred) analysiert. Durch das Programm Cylchred werden die entstandenen Flächeninhalte (AUC = area under the curve), die die verschiedenen Zellzyklusphasenanteile repräsentieren, abgeschätzt (Ormerod et al., 1987; Watson et al., 1987). Zuvor mussten die Histogramme mit dem Programm WinMDI 2.8 (**Windows multiple Document Interface for Flow Cytometry**) aus den Daten des an das FACS-Scan-Gerät angeschlossenen Computers (Mac Apple) erstellt werden.

¹ H.J. Motulski and A. Christopoulos, Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. 2003, GraphPad Software Inc., San Diego CA, www.graphpad.com (S. 258/259)

3.11 Klinische Pilotphase zur Wirkung von Carboplatin und Gemcitabine mit Ganzkörperhyperthermie bei metastasiertem Pankreaskarzinom

Nach vorliegenden Daten ist, wie mehrfach schon erwähnt, die Effektivität der Therapie des Pankreaskarzinoms immer noch sehr gering und nicht zufriedenstellend. Es sollte nach alternativen Behandlungsoptionen mit Hilfe von Kombinationstherapien gesucht werden. Im Rahmen individueller Heilversuche wurden Patienten mit Ganzkörperhyperthermie, Carboplatin und Gemcitabine an der Universität zu Lübeck behandelt. Behandelt wurden Patienten im Alter von 18-65 Jahren vorwiegend mit einem neu diagnostizierten Pankreaskarzinom, das vor der Studie noch nicht mit anderweitigen Zytostatika (ausgenommen Patienten mit Krankheitsstabilisierung unter einer palliativen Chemotherapie mit Gemcitabine) behandelt worden war.

Vor Therapiebeginn wurden eingehende Staginguntersuchungen durchgeführt. Bei Therapiebeginn durften diese Untersuchungen nicht länger als 21 Tage zurückliegen, um eine optimale Beurteilung des Therapierfolges zu gewährleisten.

Die Ganzkörperhyperthermie wurde mit einem Wärmestrahler („Radiant-Heat-Device“ Aquatherm, Cancer Research Institute NY, NY USA, 37) durchgeführt.

Das Behandlungsprotokoll schrieb am ersten Tag eine Infusion von Gemcitabine (800 mg/m²) über 20 Minuten intravenös unter Raumtemperaturbedingungen vor.

Die Hyperthermiebehandlung fand am zweiten Tag des Zyklus statt. Die Körpertemperatur des Patienten wurde im Wärmestrahler auf 41,8°C angehoben. Wenn die Zieltemperatur von 41,8°C erreicht war, wurde der Patient aus der Wärmekammer geholt und mit einer Isolierdecke zugedeckt, um einen Wärmeverlust zu verhindern und die Temperatur über 90 Minuten zu halten. Während dieser sogenannten Plateauphase wurde Carboplatin (AUC 5) über 20 Minuten infundiert. Die Temperatur wurde mittels Thermometer im Ösophagus und im Rektum während der Therapie ständig kontrolliert.

Anschließend wurde der Patient abgedeckt und kühlte dadurch langsam ab.

Am 8. und 15. Tag wurde abermals Gemcitabine ohne Hyperthermie gegeben. Das vollständige Behandlungskonzept sah jeweils maximal vier Zyklen pro Patient vor. Zunächst wurden zwei Zyklen Carboplatin und Gemcitabine plus Ganzkörperhyperthermie durchgeführt. Wurde bei einem erneutem Restaging eine komplette Remission (CR), partielle Remission (PR) oder Erkrankungsstabilität (NC) erreicht, wurden maximal zwei weitere Zyklen angeschlossen. Nach dem vierten Zyklus wurde erneut eine Erfolgsbeurteilung der Therapie angeschlossen.

Ausgewertet wurden die Überlebenszeit, die progressionsfreie Zeit, die Ergebnisse der gesamten Therapie und die Toxizität unter WHO-Kriterien.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumsverhalten der DAN-G Zelllinie, gemessen im Kristallviolett Assay

Das Wachstumsverhalten der Pankreaskarzinomzelllinie DAN-G wurde ermittelt, um Aussagen über die Art des Wachstums (z.B. exponentiell oder linear) und die nötige Präinkubationszeit machen zu können. Die Eingangszellzahl und die Präinkubationszeit wurden so abgestimmt, dass die resultierenden Zellzahlen nach der Behandlung mit den Zytostatika im Messbereich des Kristallviolett Assays liegen. Die ermittelten Kurven ermöglichen die Festlegung der Zahl einzusäender Zellen, um Ergebnisse im Messbereich zu erhalten, die zum einen reproduzierbar sind und zum anderen größtmögliche Veränderungen der Proliferation und der Proliferationshemmung erkennen lassen.

Das Wachstumsverhalten der DAN-G Zelllinie in Abhängigkeit von der eingesäten Zellzahl ist in Abbildung 5 und Abbildung 6 dargestellt.

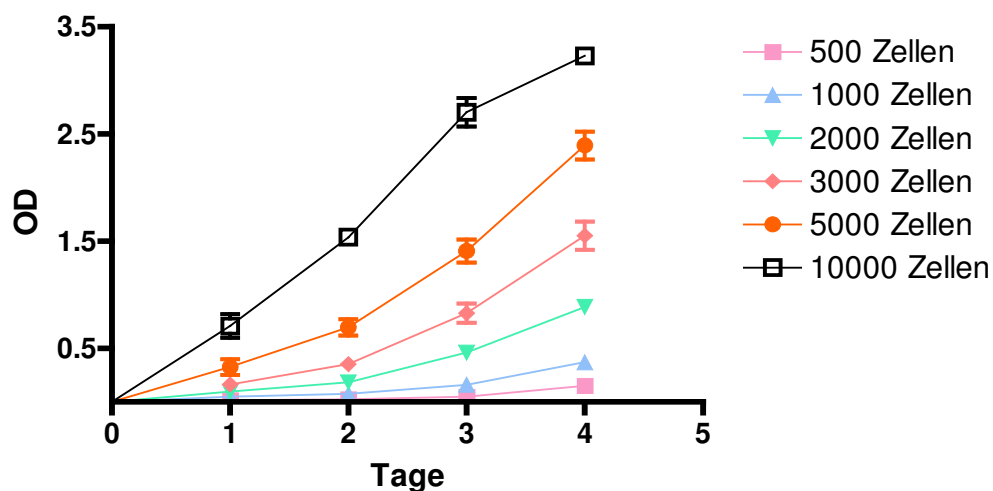


Abbildung 5: Wachstumskurve der DAN-G Zelllinie: Photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) in Abhängigkeit von der eingesäten Zellzahl gemessen im Kristallviolett Assay nach 1, 2, 3, 4 Tagen.

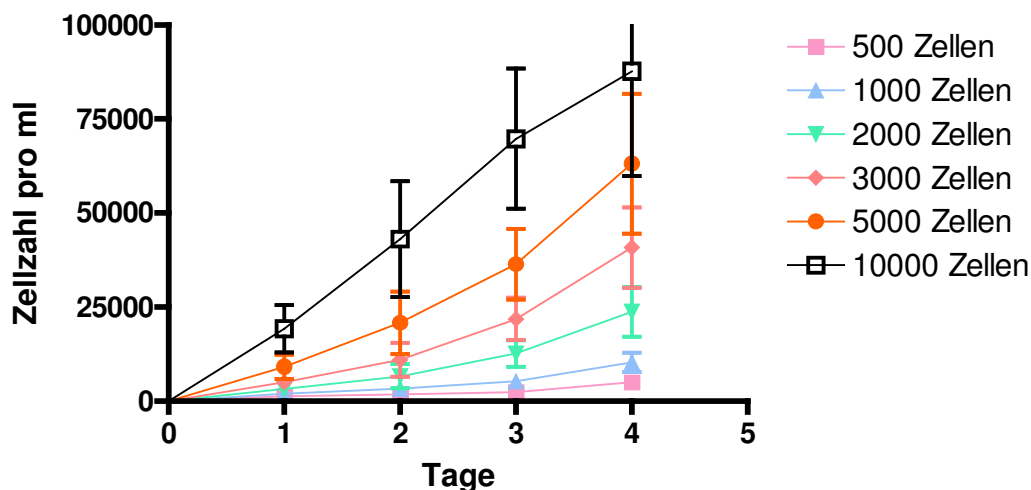


Abbildung 6: Wachstumskurve der DAN-G Zelllinie: Bestimmung der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit zur eingesäten Zellzahl gemessen im Kristallviolett Assay nach 1,2,3,4 Tagen.

Die Abhängigkeit der gemessenen Extinktion im Photometer, die in den Graphiken der optischen Dichte (OD) bzw. dem Zellzahlanstieg auf der y-Achse entspricht, ist im Verhältnis zu den Tagen der Inkubationszeit im Brutschrank auf der x-Achse dargestellt. Die optische Dichte ist proportional zur Zellzahl. Sie sollte allgemein nicht größer als 3,0 sein, da bei 3,5 der gerade noch messbare Bereich des Photometers erreicht ist. Nach unten hin sollten die Werte nicht kleiner als der Leerwert sein, der bei jeder Messung mitgeführt wird.

Aus den sechs entstandenen Graphen lassen sich die optimalen Versuchsbedingungen in Bezug auf die Inkubationszeit und die eingesäte Zellzahl wählen. Jeder Graph entspricht einer definierten eingesäten Zellzahl (500, 1000, 2000, 3000, 5000 und 10000 eingesäte Zellen pro Mikrotiterplattenvertiefung).

Für die DAN-G Zelllinie besteht in Abhängigkeit von der eingesäten Zellzahl von 500 bis 10000 Zellen jeweils eine fast lineare Beziehung zwischen den Tagen in Kultur und der Zellzahl bzw. OD (Abbildung 1 und Abbildung 2). Mit zunehmenden Inkubationszeiten, die den Tagen 1 bis 4 entspricht, steigt die Zellzahl in den Mikrotiterplattenvertiefungen und damit die gemessene Extinktion an. Die Absorption bei 590 nm liegt zwischen 0,0 und 3,4 (OD). Bis zu dreitägiger Inkubation nimmt die Absorption proportional zu. Lediglich bei dem Ansatz mit 10000 eingesäten Zellen nimmt die Steigung ab dem dritten Tag ab. Dies deutet auf eine Wachstumsinhibition hin, die bei weiterer Inkubation deutlich sichtbar wird und durch mangelnde Nährstoffe und große Dichte der Zellen bedingt ist (stationäre Wachstumsphase).

Für die DAN-G-Zellreihe des Pankreaskarzinomes ermittelten wir für die Thermochemotherapie eine optimale einzusäende Zellzahl von 3000 Zellen pro Mikrotiterplattenvertiefung und eine Präinkubationszeit von drei Tagen. Das entspricht

Absorptionswerten um 0,75 (OD). Die Zellen befinden sich hier in einer exponentiellen Wachstumsphase.

4.2 Bestimmung der IC_{50} für Carboplatin und Gemcitabine

Die Zellen wurden in die Mikrotiterplatten eingesät und nach 24 h mit den jeweiligen Zytostatikakonzentrationen behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Am Tag vier wurde die prozentuale Proliferation anhand der mittels des Kristallviolett-Assays gemessenen Werte bestimmt.

Den mit Carboplatin behandelten Zellen wurde das Zytostatikum in steigender Konzentration zwischen 20-200 µg/ml zugegeben. Für Gemcitabine wurden Konzentrationen zwischen 0,025-5000 µg/ml gewählt.

Die prozentualen Angaben beziehen sich auf den Wert 100%, der einer parallel mitlaufenden Zellpopulation entspricht, die unter Standardbedingungen bei 37°C im Brutschank kultiviert wurde.

Die Proliferationskurven der Pankreaszelllinie DAN-G unter Zytostatikabehandlung sind für Carboplatin in Abbildung 7 und für Gemcitabine in Abbildung 8 dargestellt.

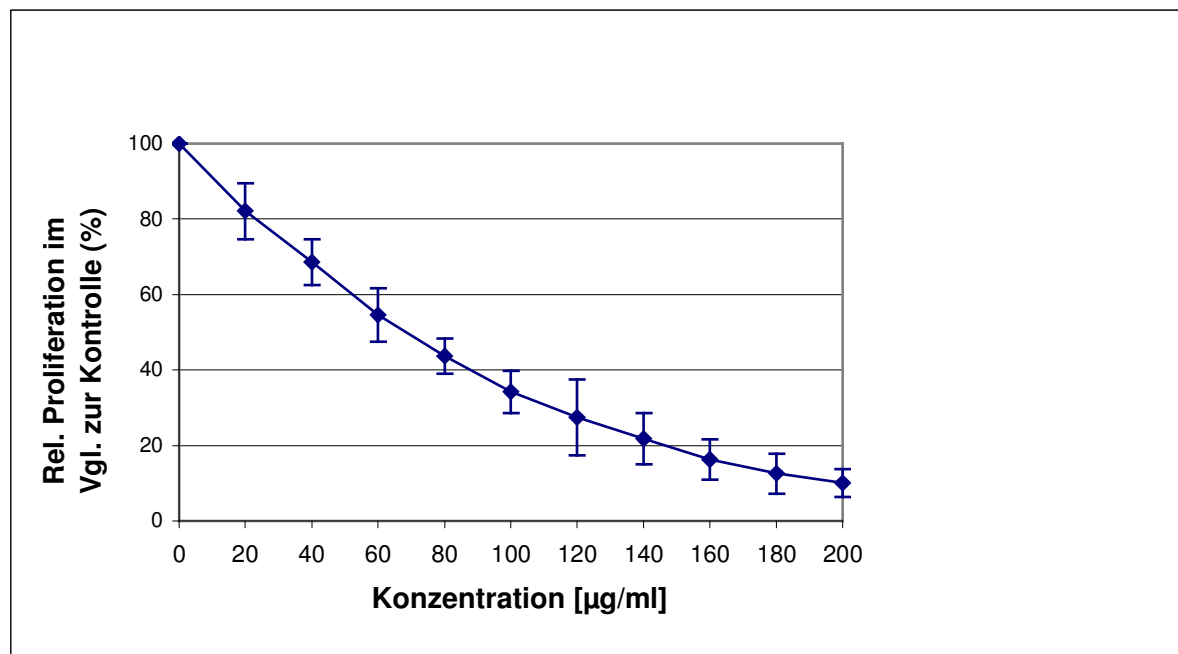


Abbildung 7: Inhibitionskonzentrationsfindung 50% (s. Erläuterung S.30) von Carboplatin: Dargestellt ist die Proliferation der DAN-G Zellen in Abhängigkeit von der zugegebenen aufsteigenden Konzentration an Carboplatin verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen in Prozent.

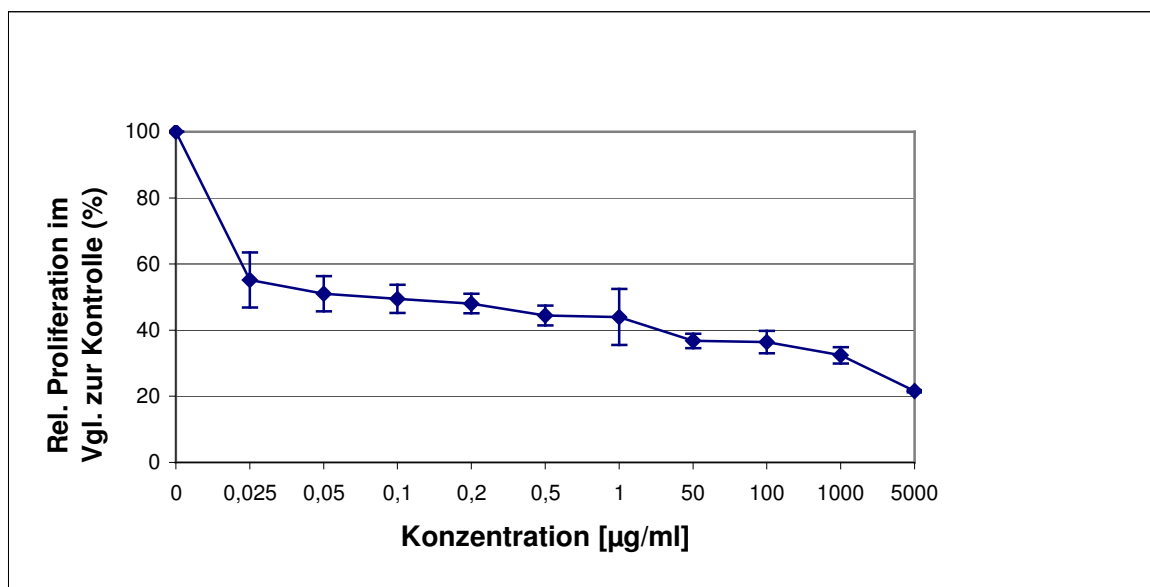


Abbildung 8: Inhibitionskonzentrationsfindung 50% (s. Erläuterung S. 30) von Gemcitabine: Dargestellt ist hier die Proliferationshemmung von DAN-G Zellen in Abhängigkeit von der zugegebenen Konzentration von Gemcitabine verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen in Prozent.

Die Kurve von Carboplatin zeigt einen für Zytostatika typischen Verlauf der Proliferationshemmung im Verhältnis zur Zytostatikakonzentration. Je größer die Konzentration des Medikamentes ist, desto niedriger ist die Proliferationsrate der Zellen. Die Kurve des Zytostatikums Gemcitabine dagegen zeigt einen eher ungewöhnlichen Verlauf einer Zytostatikainhibitionskurve, in dem selbst bei einer erheblichen Steigerung des Medikamentes die Proliferationsrate bei 50% bleibt, ehe sie bei 1000 µg/ml langsam absinkt.

Anhand dieser Kurven wurden die Zytostatika-Dosierungen für die weiteren Versuche festgelegt. Dabei wurde die IC_{50} -Konzentration gewählt, denn diese ist für die weiteren Versuche insofern von Vorteil, dass sie die größten Veränderungen der Zellzahl hinsichtlich der Proliferation und der Proliferationshemmung erkennen lässt.

Die Tabelle zeigt die Inhibitionskonzentration 50% (IC_{50}).

Tabelle 7: IC_{50} -Konzentrationen der Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine in vitro nach Behandlung von DAN-G Zellen bei 37 °C

	Inhibitionskonzentration 50%
Carboplatin	69,2 µg/ml
Gemcitabine	0,1 µg/ml

Die in Tabelle 7 dargestellten Werte wurden aus den Kurven der Abbildungen 7 und 8 für Carboplatin und Gemcitabine berechnet. Da es sich jeweils um den Graphen einer nicht-linearen Funktion handelt, wurden die IC_{50} -Konzentrationen der Zytostatika mit Hilfe des Programms GraphPad Prism in der Version 4.00 errechnet.

4.3 Thermochemotherapie

Der Einfluss der unterschiedlichen Temperaturen von 37°C, 39°C, 41,8°C und 43°C auf die Zellzahl der DAN-G Zellen wurde mittels des Kristallviolett Assays untersucht (zu den Temperaturen siehe Tabelle 8). Wie oben sind die Angaben in Prozent in Relation zur Zellzahl unbehandelter Zellen nach 72 h Inkubationszeit bei 37°C unter Standardbedingungen dargestellt. Damit ist das Ergebnis der Zellproliferation als Verhältniswert anzusehen, der nicht zwischen dem Absterben der Zellen und einer Wachstumshemmung unterscheiden kann. Interpretiert werden kann er also als positiver oder negativer Effekt. Ein Absinken der Zellzahl entspräche einem positivem Effekt im Sinne einer Proliferationshemmung.

Tabelle 8: Verschiedene Temperaturen und ihre Bezeichnungen/Verwendungen

Temperatur in °C	Bezeichnung und Verwendung
37,0°C	Normothermie, entspricht den Kulturbedingungen
39,0°C	Moderate Hyperthermie
41,8°C	Ganzkörpertherapeutisch einsetzbare Hyperthermie z.B. durch Infrarotbestrahlung
Ab 42,5°C	Starke Hyperthermie mit direkt zytotoxischen Effekten (Denaturierungen)

4.3.1 Hyperthermie ohne Zugabe von Zytostatika

In diesem Versuchsansatz wurden die Zellen in Falconröhrchen bei 37°C im Brutschrank und bei 39°C, 41,8°C und 43°C im temperaturkontrollierten Wasserbad inkubiert. Den Zellen wurden keinerlei Zytostatika hinzugegeben.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

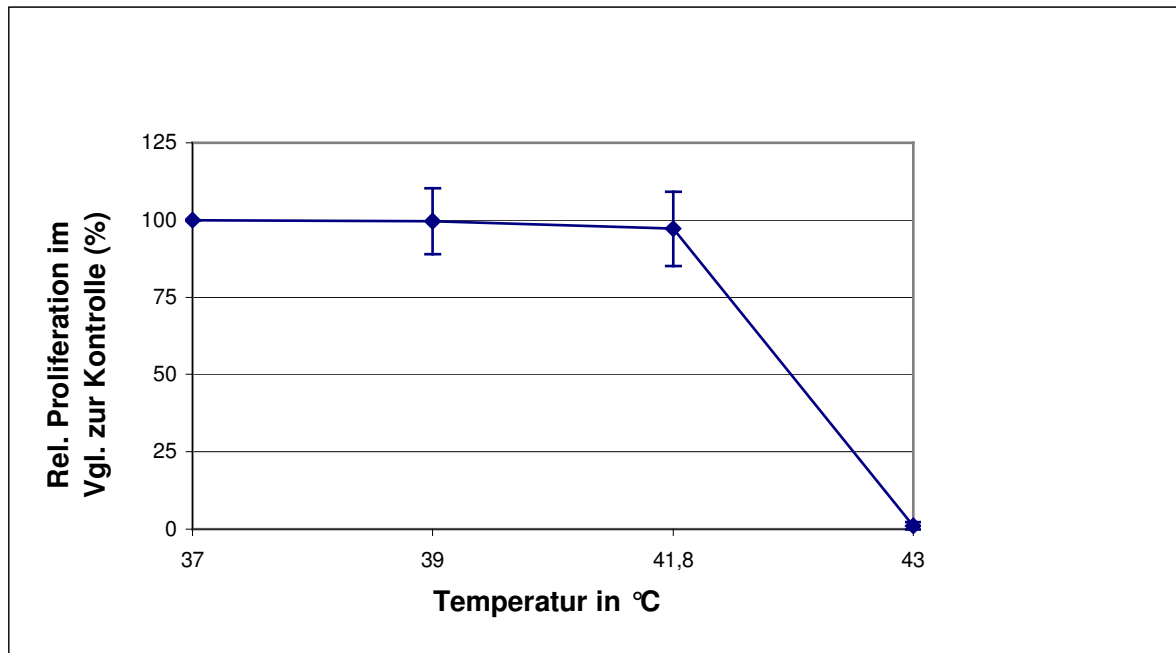


Abbildung 9: Resultierende Zellzahl nach Kultur von DAN-G Zellen die ohne Zytostatikazusätze bei 39, 41,8 und 43°C in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur kultiviert worden sind. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 7 Versuchsansätzen.

Auf der Ordinate ist die Proliferation der Zellen im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die Kontrolle entspricht, wie oben schon erwähnt, einem Wachstum der Zellen bei 37°C unter Standardbedingungen. Auf der Abszisse ist die Temperatur des jeweiligen Ansatzes in °C zu erkennen. Jeder Punkt der Graphik entspricht dem arithmetischem Mittelwert aus den jeweiligen Ansätzen ($n = 7$). Ebenfalls dargestellt sind die Standard-abweichungen des jeweiligen Mittelwertes.

Die Proliferation und damit die Zellzahl des ersten Ansatzes bei 37°C (Normothermie) entspricht den Bedingungen der Kontrolle und damit einer Proliferation von 100%. Wenn man diese Zellzahl als normal zugrunde legt und mit der moderaten Hyperthermie (39°C) vergleicht, kann man erkennen, dass es zu kaum einer Veränderung der Proliferationsrate kommt. Sie entspricht 99,62%. Auch bei 41,8°C, der therapeutisch einsetzbaren Hyperthermie, verändert sich die Proliferation nur um 2,81% auf 97,19%. Diese Werte unterliegen großen Standardabweichungen und sind statistisch keineswegs relevant. Demnach kommt es bei der isolierten Hyperthermie mit 39°C und 41,8°C zu keiner relevanten Änderung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Erst eine starke Erhitzung auf 43°C führt zu einer Abnahme der Proliferation auf 0,99% im Vergleich zum 37°C-Ansatz.

4.3.2 Hyperthermie unter Zugabe von Carboplatin

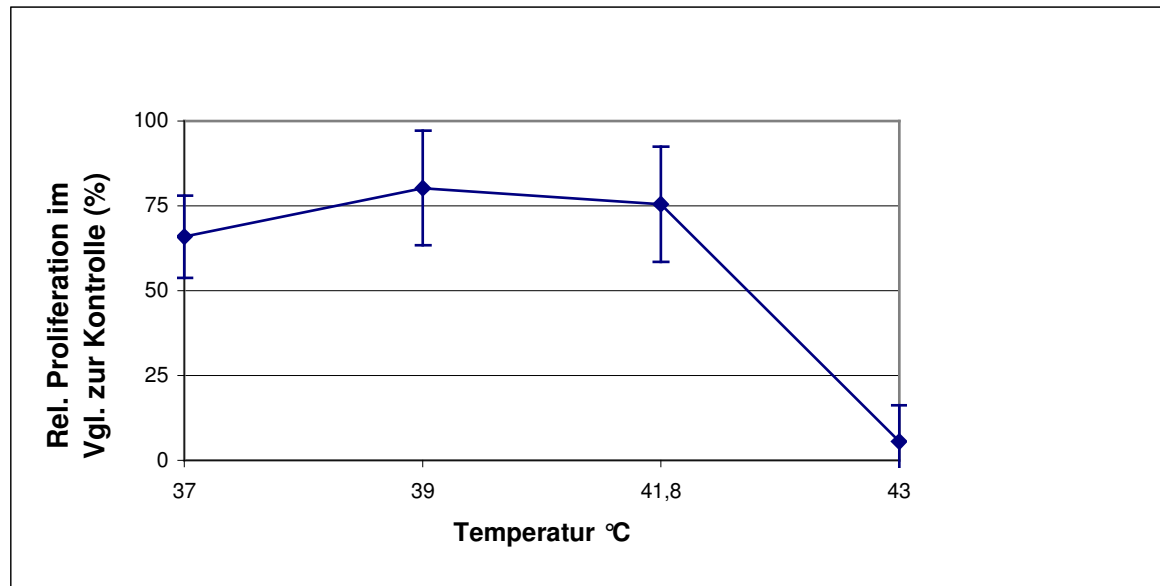


Abbildung 10: Resultierende Zellzahl von DAN-G Zellen, die nach Zugabe der IC_{50} -Konzentration von Carboplatin bei 37, 39, 41,8 und 43°C kultiviert worden sind in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 6 Versuchsansätzen.

In Abbildung 10 ist analog zu Abbildung 9 die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle auf der y-Achse und die Temperatur der einzelnen Ansätze auf der x-Achse dargestellt. Unter Verwendung der im Abschnitt 4.2 bei 37°C ermittelten IC_{50} -Konzentration von Carboplatin finden wir hier eine Reduktion der Zellzahl auf 65,90%. Der Unterschied zur Proliferationshemmung im Vergleich zur ermittelten IC_{50} -Konzentration in Abbildung 7 erklärt sich aus dem separaten Experiment. Dieser Unterschied ist auf Grund der internen Kontrollen und der Messbereiche im Kristallviolett Assay innerhalb des Experiments irrelevant. In diesem Rahmen wurde die IC_{50} -Konzentration beider Medikamente erneut durch Wiederholung der Vorversuche getestet und bestätigt.

Bei moderater Hyperthermie von 39°C kommt es bemerkenswerterweise zu einer geringeren Hemmung der Zellproliferation auf 80,22% im Vergleich zur Normothermie, wo sie bei 65,90% liegt. Nach einer Hyperthermiebehandlung der Zellen mit 41,8°C liegt die Populationsgröße bei 75,51%. Die Temperatursteigerungen von 37°C auf 39°C und 41,8°C zeigen keine medikamentverstärkende Wirkung auf die Zellpopulationsgröße. Die Hemmung nimmt sogar im Verhältnis zu 37°C ab. Erst bei einer Steigerung der Temperatur auf 43°C kommt es zu einer starken Abnahme der Zellzahl auf 5,53%. Diese Abnahme der Zellzahl bei Behandlung mit 43°C ist analog bei der Hyperthermiebehandlung ohne Zytostatikagabe zu beobachten.

4.3.3 Hyperthermie unter Zugabe von Gemcitabine

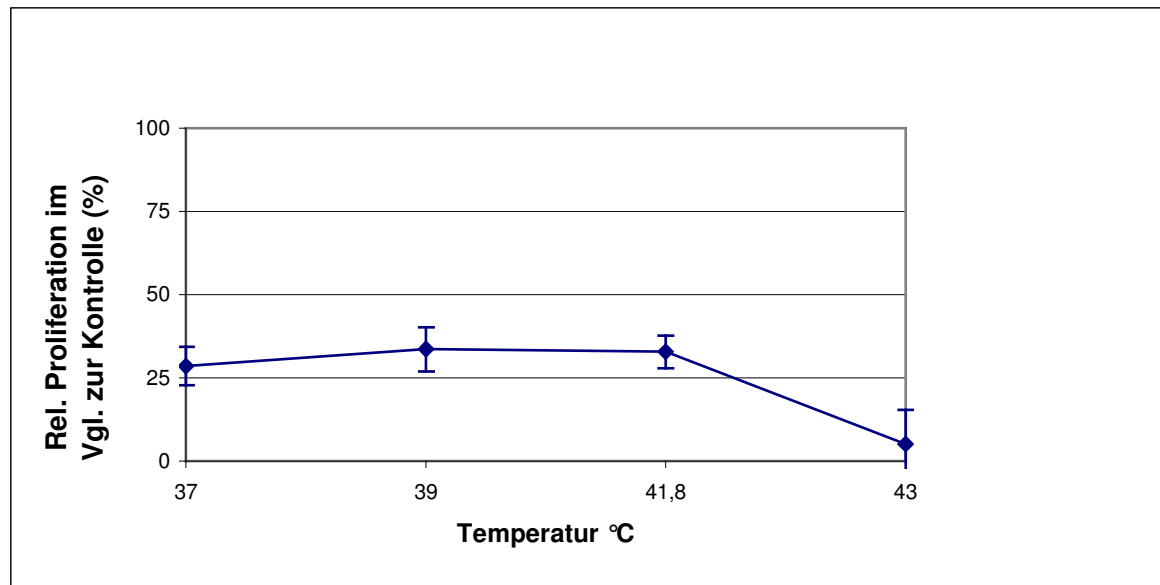


Abbildung 11: Resultierende Zellzahl der DAN-G Zellen, die nach Zugabe der IC₅₀-Konzentration von Gemcitabine bei 37, 39, 41,8 und 43 °C in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur kultiviert worden sind. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 6 Versuchsansätzen.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen bei dem Zytostatikum Carboplatin sinkt die Zellzahl nach Behandlung unter Normothermie (37 °C) unter der ermittelten IC₅₀-Konzentration von Gemcitabine im Verhältnis zur Kontrolle auf 28,49%. Auch das entspricht nicht der erwarteten Proliferation der Zellen von 50% unter der Behandlung mit 0,1 µg/ml des Zytostatikums Gemcitabine. Aber auch hier gilt, dass die interne Kontrolle und die sauberen Messbereiche im Kristallviolett Assay die Gültigkeit dieses Experimentes nicht in Frage stellen. Eine Erhöhung der Temperatur auf 39 °C bewirkt eine Reduktion der Zellpopulation auf 33,61%. Auch durch die Kombination von Gemcitabine und einer Hyperthermie von 41,8 °C kommt es mit einer Populationsgröße von 32,84% zu keiner wesentlichen Änderung im Verhältnis zu 39 °C. Analog zur Kontrolle und der Behandlung mit Carboplatin zeigt auch hier erst die starke Hyperthermie von 43 °C einen positiven Therapieeffekt. Die Zellzahl reduziert sich auf 5,19%.

4.3.4 Hyperthermie unter Zugabe von Carboplatin und Gemcitabine

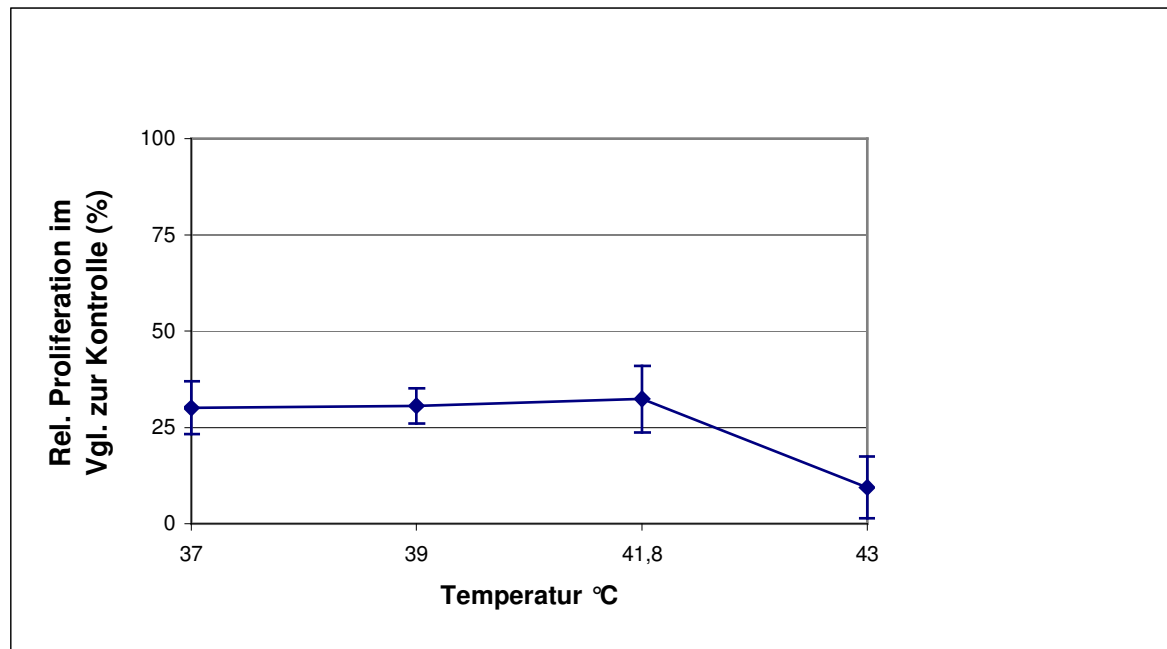


Abbildung 12: Resultierende Zellzahl der DAN-G Zellen, die nach Zugabe der IC_{50} -Konzentrationen von Carboplatin und Gemcitabine bei 37, 39, 41,8 und 43 °C in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur kultiviert worden sind. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 6 Versuchsansätzen.

Dieser Versuchsaufbau beinhaltet die kombinierte Gabe der IC_{50} -Konzentrationen von Carboplatin und Gemcitabine und die Behandlung der Zellen mit den Temperaturen 37 °C, 39 °C, 41,8 °C, 43 °C. Bei Normothermie reduziert sich die Zellzahl von 100% auf 30,12%. Durch die Kombination mit Hyperthermie bei 39 °C und 41,8 °C kommt es mit 30,55% und 32,36% ebenfalls zu keiner nennenswerten Veränderung in der Proliferationshemmung. Der therapeutische Effekt der Medikamentenkombination, der dem Ansatz von 37 °C (Standardbedingungen) entspricht, wird weder durch moderate Hyperthermie bei 39 °C noch durch die Hyperthermie von 41,8 °C positiv oder negativ beeinflusst. Wie auch bei allen drei anderen o.g. Kombinationen reduziert erst die starke Hyperthermie mit 43 °C die Zellzahl deutlich. Es kommt zu einer Reduktion der Zellpopulationsgröße auf 9,37%.

4.3.5 Zusammenfassung der vier Proliferationshemmungsversuche

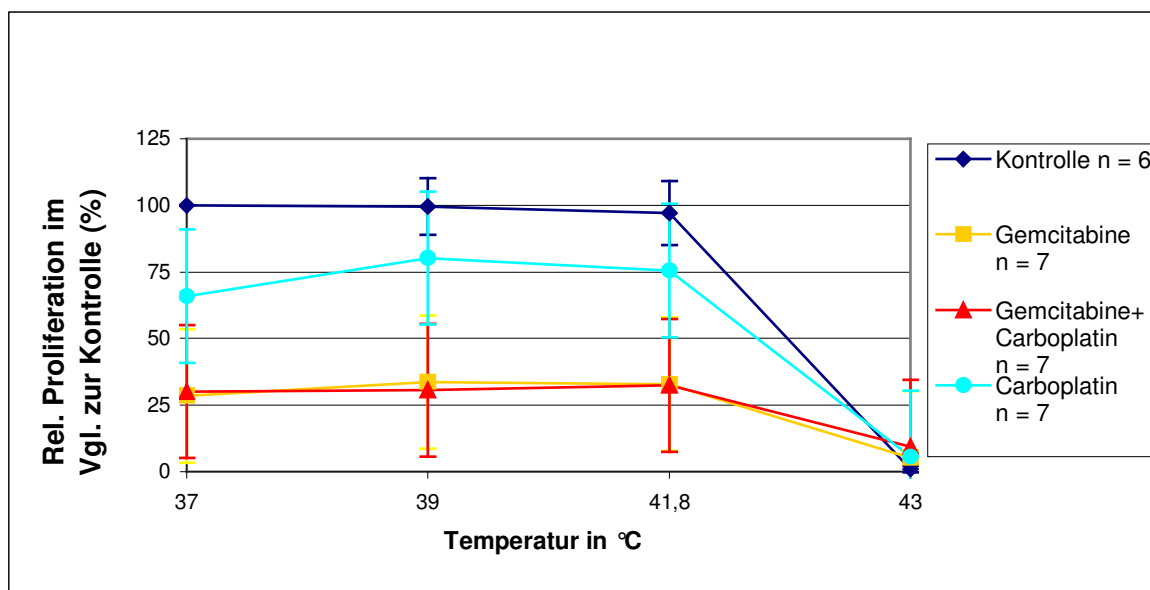


Abbildung 13: Zusammenfassende Darstellung der Thermochemotherapieversuche

In Abbildung 13 sind alle in den vorangegangenen Abschnitten aufgeführten Ansätze der Thermochemotherapie in einem Diagramm vergleichend dargestellt. Wie schon erwähnt ergeben sich für die Medikamentenwirkungen von Carboplatin und Gemcitabine IC_{50} -Konzentrationen, die nicht identisch mit den in den Dosisfindungsversuchen ermittelten Werten sind. Dies erklärt sich aus dem separaten Versuchsaufbau. Durch interne Kontrollen und die sauberen Messbereiche behalten die Experimente ihre volle Aussagekraft.

Vergleicht man nun die einzelnen Ansätze untereinander, so stellt man fest, dass die Kombination von Carboplatin und Gemcitabine bei 37 °C mit einer Proliferation von 30,12% einen ähnlichen Therapieeffekt wie die Einzelgabe von Gemcitabine erreicht. Die Kombination zeigt somit keinen additiven oder synergistischen Effekt. Durch den Zusatz von Hyperthermie bei 39 °C und 41,8 °C kann die Wirksamkeit nicht verstärkt werden. Dies trifft für alle drei Kombinationen einschließlich der Kontrolle zu. Auch bei 39 °C und 41,8 °C erzielen die beiden Ansätze Gemcitabine und die Kombination Carboplatin und Gemcitabine ähnliche Therapieeffekte. Interessanterweise führt die starke Hyperthermie (43 °C) in allen vier Ansätzen zu einer Reduktion der Zellpopulationsgröße auf unter 10%. Die deutlichste Reduktion auf 0,99% ist beim Kontrollansatz zu verzeichnen.

4.4 Zeitlich versetzte Gabe der Zytostatika

Der Einfluss der zeitlich versetzten Gabe der Medikamente Carboplatin und Gemcitabine auf die DAN-G Zellen wurde im Vergleich zur Kontrolle durch den Kristallviolett Assay unter Standardbedingungen bei 37°C bestimmt. Die prozentualen Ergebnisse der Zellproliferation beziehen sich auch hier auf einen Kontrollwert unter Standardbedingungen, der einem Zellwachstum von 100% entspricht. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung dargestellt:

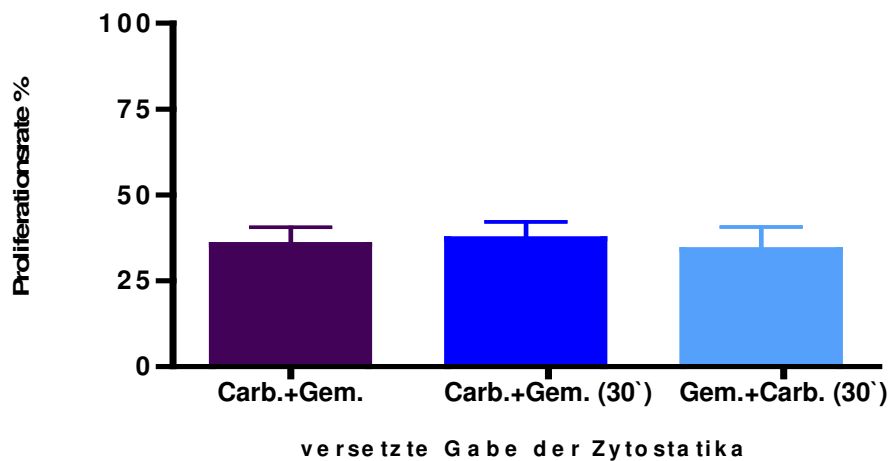


Abbildung 14: Dargestellt ist die Proliferationshemmung auf DAN-G Zellen nach zeitlich versetzter Gabe der Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine unter normothermen Bedingungen. Die Zellen wurden bei 37°C jeweils für eine Stunde mit beiden Zytostatika inkubiert, wobei im ersten Ansatz (links: Carb.+Gem.) die Zytostatika gleichzeitig zu Zeitpunkt 0 gegeben wurden. Im zweiten Ansatz (mittig: Carb.+Gem. (30')) wurde Carboplatin zum Zeitpunkt 0 und Gemcitabine nach 30 Minuten gegeben. Im dritten Ansatz (rechts: Gem.+Carb.(30')) wurde Gemcitabine zuerst zu den Zellen gegeben. Die Proliferation der Zellen wurde im Kristallviolett Assay gemessen.

In der Abbildung 14 ist auf der Ordinate die Proliferationsrate in % dargestellt. Dagegen sind auf der Abszisse die drei Ansätze der zeitlich versetzten Gabe des Zytostatikums aufgetragen. Jede Säule repräsentiert den arithmetischen Mittelwert. Zusätzlich dargestellt sind die Standardabweichungen der Mittelwerte. In Ansatz 1 wurden die beiden Zytostatika gleichzeitig zu Versuchsbeginn auf die Zellen gegeben. In Ansatz 2 wurde Carboplatin bei Versuchsbeginn zu den Zellen pipettiert und Gemcitabine eine

halbe Stunde später zugegeben. Im Ansatz 3 wurde zunächst Gemcitabine auf die Zellen gegeben. Es folgte nach 30 Minuten die Zugabe von Carboplatin. Hier wurde der Zellpopulation zuerst das Zytostatikum Gemcitabine zugesetzt, nach einer halben Stunde folgte die Zugabe von Carboplatin. Die Graphiken zeigen, dass sich die Proliferationshemmung der drei Ansätze kaum voneinander unterscheiden. In Ansatz 1, bei gleichzeitiger Gabe der Zytostatika, kommt es zu einer Zellzahlreduktion auf 35,50%. In Ansatz 2, bei Gabe von Carboplatin zu Versuchsbeginn, beträgt die Populationsgröße nach Behandlung 37,31%. Bei der Gabe von Gemcitabine zu Versuchsbeginn und der Zugabe von Carboplatin nach einer halben Stunde in Ansatz 3 überleben 34,14% der Zellen. Damit ist der Therapieeffekt der drei Versuchsansätze als gleichwertig zu beurteilen.

4.5 Analyse des Zellzyklus

Nach der Exposition der Pankreaszelllinie DAN-G mit den beiden Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine und einer Hyperthermiebehandlung (39°C und 41,8°C) wurde der Anteil der Zellen in der jeweiligen Phase des Zellzyklus im Vergleich zu den Standardbedingungen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Material und Methoden). Auf der Ordinate der Darstellungen ist die jeweilige Anzahl der Zellen in der Zellzyklusphase in Prozent abgetragen, auf der Abszisse die Temperatur des jeweiligen Ansatzes in Kombination mit der jeweiligen Zellzyklusphase. Jede Säule repräsentiert den arithmetischen Mittelwert aus sechs separaten Probeansätzen und die Standardabweichung der Messwerte.

4.5.1 Zellzyklusstadien der Kontrolle

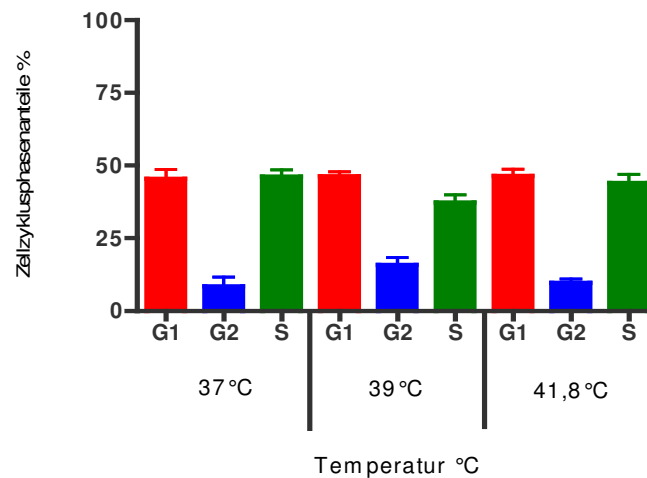


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen ohne Zugabe von Zytostatika. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Der Zellzyklus der Pankreaszelllinie zeigt im Kontrollansatz mit Ausgangswerten von 40-50% für die G1/G0-Phase, 8-16% für die G2-Phase und 40-50% für die S-Phase keine Temperaturabhängigkeit für 37, 39 und 41,8°C. Das heißt, dass es bei einer Temperaturerhöhung zu keiner Veränderung des Zellzyklusverhaltens kommt.

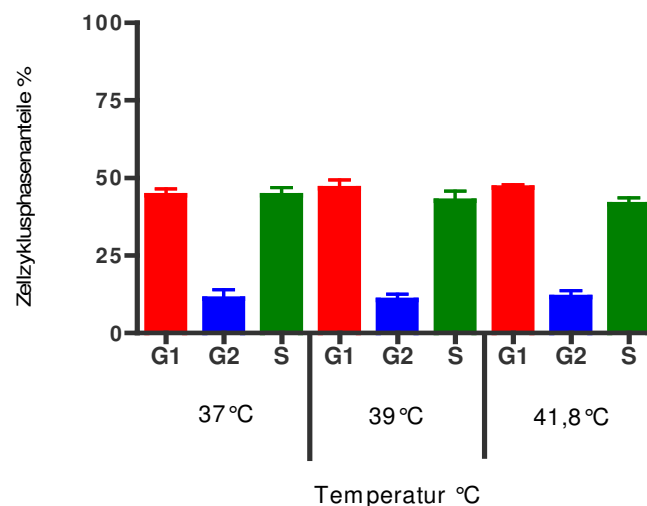


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugabe von Carboplatin. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

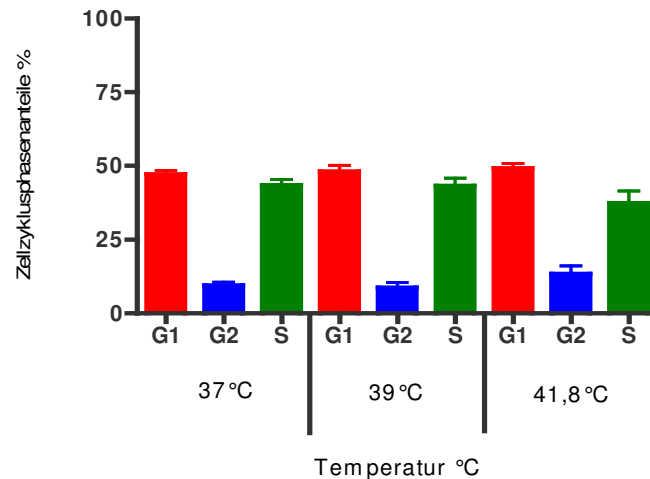


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugabe von Gemcitabine. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

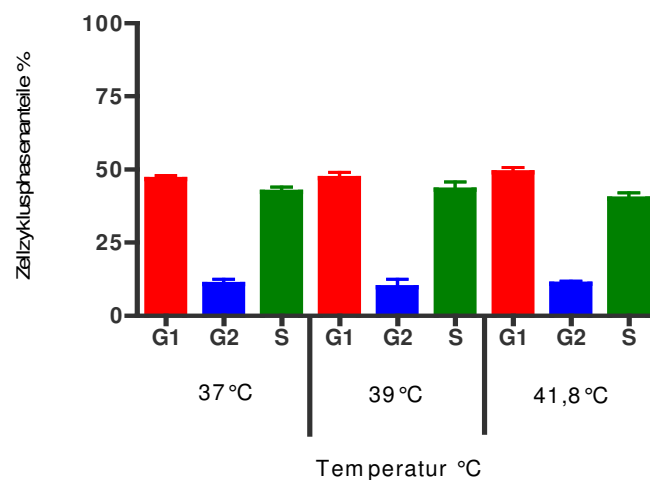


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugabe der Kombination von Carboplatin und Gemcitabine. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Bei der Exposition der Zelllinie DAN-G mit Carboplatin und Gemcitabine und deren Kombination zeigen die relativen Zellzyklusanteile erneut keine bedeutende Veränderung. Der prozentuale Anteil aller Ansätze variiert in den jeweiligen Zellzyklusphasen einschließlich der Kontrolle um nicht mehr als 10%.

Eine Temperatur- und Zytostatikaabhängigkeit der Pankreaskarzinomzelllinie DAN-G ist damit nicht festzustellen.

Da die G0/G1-Phase (Wachstums- und Ruhephase) für die Interpretation der Zytostatikawirkung insofern von besonderer Bedeutung ist, dass Zellen in dieser Phase resistenter gegen thermische Einflüsse sind, werden in der folgenden Graphik alle Ansätze im Vergleich dargestellt. Hier wird erneut deutlich, dass die Zellzyklusphasenanteile nicht durch Temperatur und Zytostatikagabe beeinflusst werden.

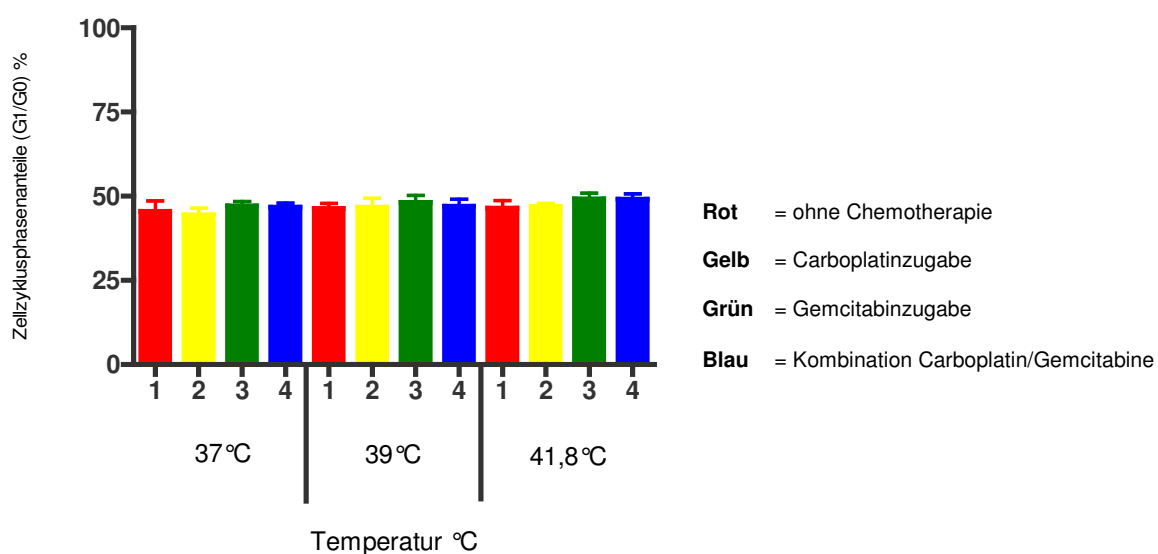


Abbildung 19: Graphische Darstellung der G1-Phase aller Ansätze im Vergleich bei den Temperaturen 37, 39 und 41,8°C. Diese Phase ist von besonderer Bedeutung, da die G1-Phase, die die G0-Phasenanteile enthält, am thermostabilsten ist und damit mögliche Ursache einer Thermoresistenz von Zellen sein kann.

4.6 Auswertung einer Pilotphase mit Ganzkörperhyperthermie in Kombination mit Chemotherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom

Im Rahmen individueller Heilversuche wurden 13 Patienten mit metastasiertem Pankreaskarzinom im Stadium IVB an der Universität zu Lübeck behandelt. Sie erhielten eine standardisierte Ganzkörperhyperthermie von 41,8°C über 60 Minuten in Kombination mit den Chemotherapeutika Carboplatin und Gemcitabine.

In der Auswertung der Pilotphase soll untersucht werden, ob es Anhaltspunkte dafür gibt, dass die Patienten von einer Kombinationstherapie mit Hyperthermie und Zytostatika in Form einer partiellen oder kompletten Remission oder einer Verlängerung der

Gesamtüberlebenszeit profitieren. In der folgenden Tabelle sind die Charakteristika der in der Studie behandelten Patienten dargestellt.

Tabelle 9: Darstellung der Charakteristika der in der Studie eingeschlossenen Patienten. Die Charakteristik beinhaltet das Geschlecht und das Alter der Patienten. Zusätzlich sind das Stadium, die Histologie und die Metastasen mit Infiltration des Pankreas bei dem jeweiligen Patienten beschrieben.

Patient	Geschlecht	Alter	Stadium (T)	Histologie	Metastasen (M)	Infiltration
1	männlich	54	IVB	Adenokarzinom	Leber	Duodenum
2	männlich	60	IVB	Adenokarzinom	Leber / Nabel	Magen
3	weiblich	58	IVB	Adenokarzinom	Leber / Thoraxwand	Duodenum
4	männlich	65	IVB	Adenokarzinom	Leber	Duodenum
5	weiblich	60	IVB	Adenokarzinom	Leber	Duodenum / Magen
6	weiblich	54	IVB	Adenokarzinom	Leber	
7	männlich	45	IVB	Adenokarzinom	Leber	
8	weiblich	57	IVB	Adenokarzinom	Leber	
9	männlich	59	IVB	Adenokarzinom	Leber	
10	männlich	60	IVB	Adenokarzinom	Leber	
11	männlich	57	IVB	Adenokarzinom	Leber	
12	weiblich	56	IVB	Adenokarzinom	Leber	
13	männlich	57	IVB	Adenokarzinom	Leber	
Durchschnittsalter		57				

Die klinischen Stammdaten der in der Pilotphase behandelten 13 Patienten sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektiv betrug 57 Jahre. Damit liegt das behandelte Patientenkollektiv unter dem durchschnittlichen Erkrankungsalters (Frauen: 75 Jahre, Männer: 68 Jahre) des Pankreaskarzinoms. Alle Patienten waren an einem Adenokarzinom des Pankreas im Stadium IVB erkrankt. Zudem hatten alle Patienten Metastasen in der Leber. Bei vier Patienten lag zusätzlich eine Infiltration des Magens oder des Duodenums vor.

Diese Patienten wurden mit einer Thermochemotherapie behandelt und der Erfolg der Therapie mittels der Überlebenszeit, der progressionsfreien Zeit und dem Ergebnis der Gesamttherapie (PD, NC, PR, CR) bewertet. Ein besonderes Augenmerk wurde auch auf

das Auftreten von Nebenwirkungen gelegt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 10: Darstellung der Patientendaten: Erstdiagnose, Beginn der Ganzkörperhyperthermie und Datum des Versterbens. Zusätzlich sind die errechnete Überlebenszeit, die progressionsfreie Zeit und das Ergebnis der gesamten Therapie anhand des Tumorprogresses tabellarisch erfasst.

Patient	Erstdiagnose	Datenlage	Beginn Ganzkörperhyperthermie	Verstorben	Überlebenszeit (d)	Progressionsfreie Zeit (d)	Ergebnis gesamt
1	08.08.2000	vollständig	12.10.2000	03.03.2002	565	299	PR
2	13.03.2001	vollständig	29.04.2001	03.06.2001	80	44	PD
3	19.09.2000	vollständig	06.11.2000	26.02.2001	157	83	NC
4	11.03.2002	vollständig	11.04.2002	03.09.2002	172	87	PR
5	15.03.2001	vollständig	30.04.2001	06.06.2002	441	365	NC
6	15.03.2002	zensiert	15.04.2002	22.06.2002	97	52	PD
7	15.12.2001	zensiert	15.01.2002	12.07.2002	207	62	PD
8	15.10.2002	vollständig	20.11.2002	02.05.2003	197	41	PD
9	15.10.2001	vollständig	28.11.2001	07.09.2003	682	288	PR
10	15.03.2003	vollständig	16.04.2003	26.03.2004	371	91	NC
11	01.02.2003	zensiert	10.02.2003	lebt	1020 +	212	NC
12	01.09.2003	vollständig	24.09.2003	28.05.2004	267	76	PD
13	19.10.2003	vollständig	29.10.2003	01.05.2004	192	121	NC
Durchschnittszeit (d)					342	140	

Legende:

PD = Progressiv Disease

NC = No Change

PR = Partial Remission

In Tabelle 10 sind die Daten der Erstdiagnose, der Beginn der Ganzkörperhyperthermie und das Datum des Ablebens des Patienten dargestellt. Dadurch kann man zum einen den individuellen Krankheitsverlauf nachvollziehen, die Überlebenszeit errechnen und Aussagen zum mittleren Überleben des Patientenkollektivs machen. Zusätzlich ist als Studienpunkt das Gesamtergebnis in Form des Therapieansprechens dargestellt (PD, NC, PR).

Von den 13 Patienten, die die studienkonforme Chemotherapie in Kombination mit einer Ganzkörperhyperthermie von 41,8°C erhielten, wurde bei drei Patienten (23%) eine partielle Remission (PR) dokumentiert, bei fünf Patienten (38%) war der Krankheitsverlauf stabil (NC). Bei den restlichen fünf Patienten (38%) wurde trotz der therapeutischen Maßnahmen ein Fortschreiten der Erkrankung festgestellt. Die mediane progressionsfreie Zeit aller Patienten betrug 4,7 Monate. Die Patienten mit einer Teilremission erreichten isoliert betrachtet eine mediane progressionsfreie Zeit von 7,5 Monaten. Die mediane Überlebenszeit aller Patienten zusammengefasst betrug 11,4 Monate. Die Patienten mit einer Teilremission wiederum erreichten ein medianes Überleben von 15,8 Monaten. Nach einem Jahr lebten von diesen 13 Patienten noch 5. Damit ergibt sich eine Einjahresüberlebensrate von 38%.

Graphisch lässt sich die Überlebenszeit als Kaplan-Meier-Überlebenskurve darstellen, aus der sich ablesen lässt, nach welcher Zeit noch welcher Teil der beobachteten Patienten am Leben war. Sie ist in der folgenden Graphik dargestellt.

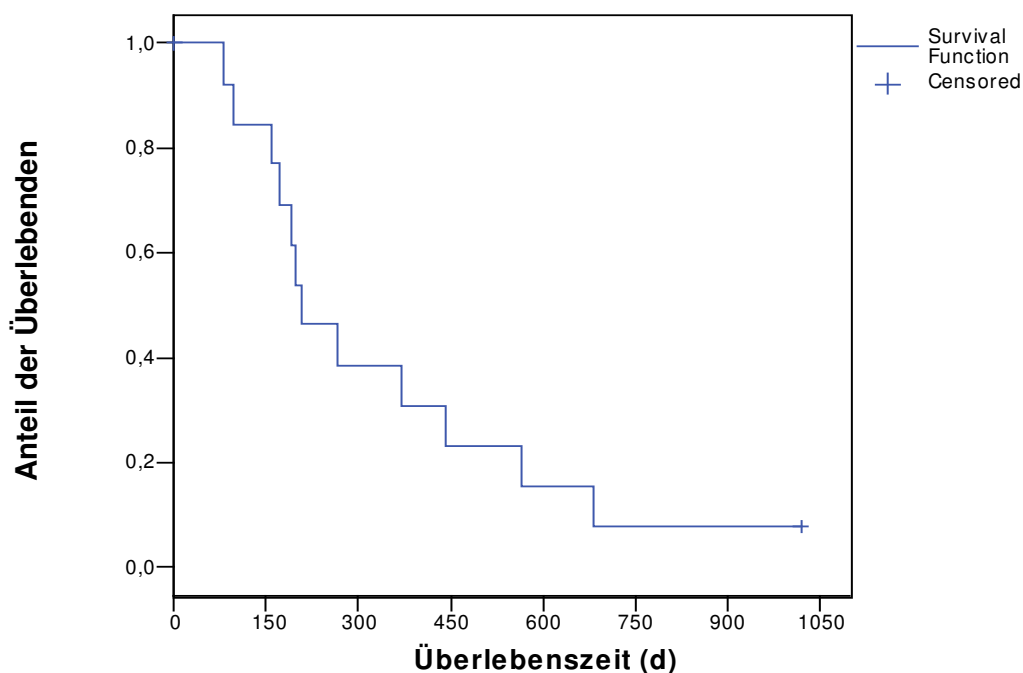


Abbildung 20: Graphische Darstellung der nach der Kaplan-Meier-Methode berechneten Überlebenskurve für die Ganzkörperhyperthermie in Kombination mit Chemotherapie. Es wurde der Zeitpunkt der Erstdiagnose als Ursprung gewählt. Die Kaplan-Meier-Methode berücksichtigt die Information aller Patienten so lange, wie diese beobachtet worden sind.

Um das Nebenwirkungsprofil der Ganzkörperkombinationstherapie einschätzen und bewerten zu können, wurde während der Zyklen die Toxizität nach WHO dargestellt. Sie

fragt prinzipiell Nebenwirkungsbereiche wie zum Beispiel die Hämatologie, die Gastroenterologie, die Nephrologie, die Pulmonologie oder auch Parameter wie Übelkeit und Schmerzen ab. Die Einteilung des jeweiligen Parameters erfolgt nach Schweregrad 0-IV (leicht bis schwer).

Die Toxizität für unsere Studie ist in folgender Graphik für jeden der vier möglichen Zyklen dargestellt. Die bewertete Patientenzahl nimmt von Zyklus eins zu Zyklus vier ab. Diese Nicht-Durchführbarkeit des nächsten Zyklus ergibt sich aus mangelnder Ansprechrate des Tumors, inakzeptable Nebenwirkungen oder das frühzeitige Versterben des Patienten.

Tabelle 11: Darstellung der Toxizität (Grad I-IV) nach Behandlung der Patienten mit Ganzkörperhyperthermie, Carboplatin und Gemcitabine. Keine Nebenwirkungen (Grad 0) ist in der Tabelle nicht dargestellt. Im Laufe der Zyklen nahm die Anzahl der behandelten Patienten (n) durch ein fehlendes Ansprechen des Tumors, nicht tolerierbare Nebenwirkungen oder frühzeitiges Versterben immer weiter ab.

Nebenwirkungsbereiche:	Zyklus 1 (n = 13)				Zyklus 2 (n = 13)				Zyklus 3 (n = 4)				Zyklus 4 (n = 4)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Leukozyten	23%	15%			23%	23%			25%	25%			25%	50%	25%	
Thrombozyten	8%	15%			31%	15%				50%				25%		25%
Hämoglobin	23%				46%				50%				50%	25%		
Hämatologie gesamt		38%			23%	31%			50%				75%			25%
Schmerzen		31%			23%	15%										
Infektion						15%										
Gastrologie	8%				15%											
Übelkeit	38%	8%			46%											
Erbrechen	31%				38%											
Gastro gesamt	38%	8%			46%											
Haut	8%															
Neurologie																
Hepatologie					8%											
Nephrologie	8%															
Pulmonologie																
Andere gesamt	8%				8%											

5 Diskussion

Das fortgeschrittene Pankreaskarzinom ist mit einer Fünfjahresüberlebensrate von unter 3% eine in den meisten Fällen tödlich verlaufende Tumorerkrankung. Zahlreiche Medikamente sind klinisch isoliert oder in Kombination mit anderen Therapiemodalitäten auf ihre Wirksamkeit bezüglich Überlebenszeit und Symptomlinderung untersucht worden (Kelly und Benjamin, 1995; Böhmig und Rosewicz, 2004; Oettle et al., 2004). Die Gemcitabinemonotherapie hat sich seit 1996 als wirksamste Therapie durchgesetzt. Seither hat keine andere Modalität Gemcitabine als Erstlinienchemotherapie abgelöst. Wie eingangs bereits erwähnt sind nur lokalisierte Frühstadien chirurgisch behandelbar. Aufgrund der spät auftretenden Symptomatik macht das nur einen geringen Anteil der Patienten aus, bei denen ein Pankreaskarzinom neu diagnostiziert wird. Neuere Therapien wie die Gen- und die Immuntherapie sind noch im Stadium der klinischen Erprobung. Die Aussichten, den an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten zu heilen, sind damit sehr gering.

Eine präklinische Testung an relevanten Tumormodellen vor der klinischen Anwendung eines neuen Therapiekonzeptes ist prinzipiell unverzichtbar. Im vorliegenden Fall wurden einzelne Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom aufgrund des erheblichen Leidensdruckes und bei fehlender schulmedizinischer Alternative mit dem bei anderen Erkrankungen etablierten Verfahren der Ganzkörperhyperthermie auf der Basis individueller Heilversuche behandelt. Die präklinischen Versuche speziell zum Pankreaskarzinom wurden in diesem Fall parallel zu den individuellen Heilversuchen durchgeführt.

Die in vitro Untersuchungen sollen klären, ob die Kombination von Chemotherapeutika mit Hyperthermie eine sinnvolle Behandlungsoption für die klinische Anwendung des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms darstellt.

Die Kombination von Hyperthermie mit Chemo- und/oder Strahlentherapie hat sich sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien zur Behandlung von unterschiedlichen Malignomen als wirksam erwiesen (Robins et al., 1989; Wiedemann et al., 1992; van Bree et al., 1999; Falk und Issels, 2001; Vertrees et al., 2005). Auch speziell beim Pankreaskarzinom konnten in klinischen Studien Erfolge durch diese Kombinationsbehandlung erzielt werden (Yamada et al., 1992). Präklinisch zeigten Shchepotin et al. für die Pankreaskarzinomzelllinie ASPC-1, dass eine Hyperthermiebehandlung die Wirkung von 5-FU und Verapamil synergistisch verstärkt (Shchepotin et al., 1994).

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die beiden für das Pankreaskarzinom wirksamen Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine gewählt. Diese haben zum einen

einen synergistischen Mechanismus und potenzieren sich in ihrer Wirkung (Bergman et al., 1996). Außerdem zeigen klinische Studien Therapieerfolge dieser Kombinationstherapie, die im Vergleich der Gemcitabinmonotherapie in der Behandlung des Pankreaskarzinoms gleiche oder überlegene Wirksamkeit belegen (Heinemann et al., 2000; Philip et al., 2001). Klinisch bedeutsam ist zudem, dass ihre Nebenwirkungsprofile unterschiedlich sind und sie damit wegen ihrer relativ guten Verträglichkeit für den Patienten in der Klinik gut anwendbar sind.

Grundsätzlich geht man davon aus, dass durch die Kombination mit Hyperthermie die medikamentenspezifische Wirkung der Zytostatika, besonders von Alkylanzien wie Carboplatin, verstärkt wird (Adamietz und Wust, 2004). Da Cisplatin in Kombination mit Hyperthermie eine hohe Nephrotoxizität aufweist, muss hier Carboplatin, wie schon im Methodenteil erwähnt, verwendet werden (Mella et al., 1987; Wondergem et al., 1988). Carboplatin ist wegen seiner größeren Stabilität etwas geringer zytostatisch wirksam und muss daher höher dosiert werden, um ähnliche Effekte wie Cisplatin zu erreichen (Van der Vijgh, 1991).

Verwendet wurde die Zelllinie DAN-G. Sie entstammt einem humanen Karzinom des Pankreas und hat die Charakteristika epithelialer Zellen. Diese Zelllinie gilt als eine Standardzelllinie, die für Untersuchungen über Pankreaskarzinome häufig verwendet wird (Ziske et al., 2004; Ocker et al., 2005; Neureiter et al., 2005). Aussagen, die durch Experimente an diesen Zellen erworben werden kann man allgemeine Gültigkeit zuschreiben, zumindestens im Sinne präklinischer Studien.

In einem ersten Schritt wurde die Wachstumskurve für die verwendete Zelllinie erstellt. Daraufhin konnte die Toxizität von Carboplatin, Gemcitabine und hyperthermen Einflüssen mit Hilfe des Kristallviolett Assay geprüft und dabei die IC_{50} -Konzentration für die beiden Medikamente bestimmt werden. Dabei wurde primär untersucht, ob die beiden Zytostatika und die Hyperthermie überhaupt eine toxische Wirkung auf diese Zelllinie haben und ob sich diese Wirkungen untereinander potenzieren.

Im Verlauf zeigte sich, dass die Zelllinie in dieser Arbeit keine starke Thermosensibilität besitzt, daher wurden weitere Experimente zur Zellzyklusanalyse angeschlossen. Die Zellzyklusanalyse sollte klären, ob sich ein hoher Anteil an Zellen in der G₀/G₁-Phase befindet und für die Resistenz der Zellen verantwortlich ist, da die Zellen in dieser Phase des Zellzyklus weniger thermosensibel sind als in der S-Phase (Mackey und Dewey, 1989; Dietzel, 1983). Zusätzlich wurde untersucht, ob die zeitlich versetzte Gabe oder die Simultangabe bei der Behandlung der Zelllinie DAN-G von Vorteil ist.

Trotz noch fehlender präklinischer Beweise wurden Patienten, die an einem inoperablen Pankreaskarzinom erkrankt sind, in ihrer verzweifelten Lage an Hyperthermiezentren im Rahmen von individuellen Heilversuchen mit der Ganzkörperhyperthermie mit

Gemcitabine und Carboplatin behandelt. Für diese Patienten wurde von den behandelnden Klinikern ein Therapiekonzept erstellt, und sie wurden nach diesem standardisierten Hyperthermieschema behandelt. In Rahmen dieser Dissertation wurde diese Pilotphase beobachtet und ausgewertet. Obwohl kleine Studien und Beobachtungsanwendungen erfahrungsgemäß eine limitierte Aussagekraft haben, könnten sich hier Hinweise ergeben, dass die Chemotherapie mit Ganzkörperhyperthermie einen neuen Weg für die Behandlung des metastasierten Pankreaskarzinoms darstellt. Nachfolgend werden die Ergebnisse im einzelnen diskutiert:

5.1 Wachstumseigenschaften der Zelllinie DAN-G

Der Wachstumsverlauf von Tumorzelllinien unter Kontrollbedingungen ist generell exponentiell (Kato et al., 1999). Dies konnten wir für die in unseren Untersuchungen verwendete Zelllinie DAN-G bestätigen. Die Ergebnisse bildeten die Grundlage für die weiteren Experimente. Außerdem wurde im Rahmen dieser Experimente die spezifische Korrelation von optischer Dichte und vorhandener Zahl der DAN-G Zellen ermittelt.

5.2 IC₅₀-Bestimmungen der Zytostatika

5.2.1 Carboplatin

Carboplatin wurde als Zytostatikum gewählt, da es als alkylierende Substanz Wirksamkeit verspricht und im Gegensatz zum Cisplatin in Kombination mit Hyperthermie weniger dosislimitierend nephrotoxisch ist. Ohno et al. verglichen in ihrer in vitro Studie Carboplatin und Cisplatin in der Kombination mit Hyperthermie. Die Arbeitsgruppe kam zu dem Ergebnis, dass das weniger nephrotoxische Carboplatin in Kombination mit Hyperthermie für die Klinik das größere Potential hat (Ohno et al., 1991).

Auch im Rahmen dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass Carboplatin bei alleiniger Gabe auf unsere Zellreihe des Pankreaskarzinoms wirksam ist. Im Kristallviolett Assay ergab sich eine typische Dosiswirkungskurve: Je mehr Zytostatika auf die Zellen gegeben wurden, desto mehr nahm die Zellproliferation ab. Die Konzentration, bei der noch 50% der Zellen überlebt haben (IC₅₀), betrug für Carboplatin 69,2 µg/ml. Die IC₅₀-Konzentration der in vitro Versuche liegt unter dem klinisch verwendeten AUC-Wert von 500-700 µg/ml (Hexal, Holzkirchen). Damit ist unser Assay hinsichtlich der Zytostatikasensibilität relevant. Die von uns maximal verwendete Konzentration des Zytostatikums Carboplatin von 200 µg/ml erreichte eine Reduzierung der Zellproliferation

auf ca. 10%. Diese Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Gabe von Carboplatin wirksam ist.

5.2.2 Gemcitabine

Gemcitabine wurde als zweites Zytostatikum in die Untersuchung eingeschlossen, da seine Wirksamkeit auf das Pankreaskarzinom auf der Basis von klinischen Untersuchungen belegt wurde. Überdies gilt Gemcitabine in der Therapie des Pankreaskarzinoms als Zytostatikum der Wahl und ist als Kombinationspartner Gegenstand erfolgsversprechender Studien (Heinemann, 2002).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde zunächst die Toxizität von Gemcitabine auf die verwendete Pankreaskarzinomzelllinie überprüft und die IC_{50} -Konzentration des Zytostatikums ermittelt. Gemcitabine erweist sich auf die Zelllinie DAN-G wie erwartet als wirksam. Es ergab sich eine Inhibitionskonzentration (IC_{50}) von 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Laut der Fachinformation des Herstellers Lilly entsprechen unsere Angaben den Plasmatalspiegel-Konzentrationen (0,07-1,12 $\mu\text{g/ml}$) nach einmaliger Infusionsgabe pro Woche (Lilly, 2004). Damit liegen die in vitro verwendeten Konzentrationen im Bereich der klinisch relevanten Plasmakonzentrationen. Bei der Interpretation gilt es zu beachten, dass diese IC_{50} -Konzentrationen weit unter den Plasmakonzentrationen liegen, die in der Klinik zu therapeutischen Zwecken verwendet werden. Die Plasmaspitzenkonzentrationen laut Angaben des Herstellers bewegen sich in der Klinik nach 30-minütiger Infusion bei 28-52 $\mu\text{g/ml}$ (Lilly, 2004). Dies entspricht in unseren Untersuchungen einer Proliferationshemmung von ca. 65% (s. S.39).

5.2.3 Carboplatin und Gemcitabine

In dem in vitro Modell des Pankreaskarzinoms wurde auch die Kombination der beiden Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine getestet. Eine synergistische Wirkverstärkung einer Kombination eines Platinderivats mit Gemcitabine ist zuvor schon sowohl in präklinischen wie auch in klinischen Studien bestätigt worden (Peters GJ, 1995; Van Moorsel et al., 1999; Philip et al., 2001; Colucci et al., 2001). Im Unterschied zu unserer Studie wurde anstelle von Carboplatin regelmäßig das nephrotoxische Zytostatikum Cisplatin als Kombinationspartner verwendet. Beides sind Alkylanzien mit einem ähnlichem Wirkmechanismus, doch nur das Carboplatin ist mit der Ganzkörperhyperthermie verwendbar.

Hier wurden die Zellen mit den jeweiligen IC_{50} -Konzentrationen der Zytostatika behandelt. Wie man am deutlichsten in Abbildung 13 des Ergebnisteils (s. S. 41) erkennen kann,

bewirkt die Kombinationsbehandlung keine weitere Wirkverstärkung im Gegensatz zur alleinigen Gemcitabinbehandlung. In der aktuellen Literatur dagegen findet man Untersuchungen einer Arbeitsgruppe an Tumorzellen der Lunge und des Ovars, die der Kombination von Gemcitabine und Cisplatin eine höhere Effektivität in der Tumorbehandlung nachsagen als der alleinigen Therapie mit Gemcitabine (Van Moorsel et al., 1999). Eine andere Arbeitsgruppe bestätigte die Vorteile der Kombinationstherapie von Gemcitabine und Cisplatin für das Tumormodell des Endometriumkarzinoms (Smith et al., 2004).

Für unser Tumormodell des Pankreaskarzinoms können wir ein synergistisches Wirkprinzip und eine daraus resultierende Wirkverstärkung nicht bestätigen. Aufgrund des ähnlichen molekularen Aufbaus und der im wesentlichen geringfügigen unterschiedlichen Stabilität ist es unwahrscheinlich, dass das Carboplatin als Kombinationspartner für das Gemcitabine weniger geeignet wäre als das Cisplatin, zumal die Dosierung entsprechend angepasst wurde. Andere Autoren zeigen zudem eine synergistische Wirksamkeit für Gemcitabine und Carboplatin auf Mammakarzinomzellen (Nasr et al., 2004). In einer weiteren Studie vergleichen Zatloukal und Petruelska synergistische Wirkungen von Gemcitabine in der jeweiligen Kombination mit Carboplatin oder Cisplatin (Zatloukal und Petruzelka, 2002). Hier zeigen beide Kombinationen Wirksamkeit; die sich hier darstellende Überlegenheit mit Cisplatin liegt am ehesten an einer Unterdosierung von Carboplatin. Für die sich im Rahmen unserer Dissertation zeigenden Resistenz ist also am ehesten eine dem Pankreaskarzinom inhärente Chemoresistenz verantwortlich. Überdies unterscheiden sich die verschiedenen Tumorarten und die verschiedenen Zellreihen in ihrer Sensitivität gegenüber den Therapiemodalitäten.

5.3 Thermochemotherapie in vitro

5.3.1 Hyperthermie

In dem im Rahmen der Dissertation verwendeten in vitro Modell wurde die Zytotoxizität der alleinigen Hyperthermiebehandlung auf die DAN-G Zelllinie mittels des Kristallviolett Assays bestimmt. Es zeigt sich, dass die Zelllinie weder bei 39°C noch bei 41,8°C durch eine Veränderung des Zellwachstums in Form einer Proliferation oder Proliferationshemmung reagiert. Bis 41,8°C ist durch die Hyperthermiebehandlung weder eine partielle noch eine komplette Remission zu beobachten. Das Zellwachstum bleibt im Verhältnis zur Kontrolle nahezu unverändert. Hingegen bewirkt eine alleinige Hyperthermiebehandlung der Zellen bei 43°C eine sehr starke Reduktion der Zellzahl auf

0,99%. Die Ergebnisse zeigen keine Thermosensitivität der untersuchten Zelllinie DAN-G im Bereich der klinisch anwendbaren Temperaturen von 39°C und 41,8°C.

Dieses Phänomen, dass die Zellen bis 43°C thermoresistente Eigenschaften besitzen, wurde auch durch andere Autoren beobachtet. Andere Studien zeigen, dass die isolierte Hyperthermiebehandlung erst ab 43°C eine direkt zytotoxische Wirkung besitzt (Overgaard et al., 1977; Falk und Issels, 2001).

Unsere Ergebnisse unterstreichen die Ergebnisse anderer Studien, die zeigen, dass eine Tumorzelllinie nicht generell sensitiv auf Hyperthermiebehandlungen mit z.B. 39°C und 41,8°C ist. Fast alle Tumore erweisen sich als völlig oder partiell resistent auf eine Behandlung in diesem Temperaturbereich (Hahn et al., 1989; Rofstad et al., 1990).

5.3.2 Hyperthermie und Carboplatin

In der Literatur ist eine Wirkverstärkung von Carboplatin durch Hyperthermie sowohl in präklinischen (Klostergaard et al., 1995; Murray et al., 1997; Choi et al., 2003) wie auch in klinischen Studien (Robins et al., 1993; Wiedemann et al., 1996; Wiedemann et al., 1997; Westermann et al., 2001) an verschiedenen Tumorarten belegt worden.

In unserem in vitro Modell kann eine solche Wirkverstärkung nicht bestätigt werden. Das genaue Gegenteil ist der Fall, es kommt bei einer Behandlung der Zellen bei 39°C zu einem Wirkverlust von Carboplatin von etwa 15% im Vergleich zur Wirkung bei 37°C. Auch bei einer Kombination von Carboplatin mit 41,8°C kommt es zu einem Tumorzellwachstum, das etwa 10% über dem der Normothermiekontrolle liegt. Bei 43°C sinkt die Zellpopulation auf an die 5%. Eine solche drastische Reduktion wird auch bei der alleinigen Hyperthermie beobachtet und ist damit als direkt zytotoxischer Effekt zu werten. Somit führt eine Kombinationstherapie von Carboplatin mit Hyperthermie bei dieser Tumorzelllinie nicht zu einem positiven therapeutischen Effekt im Sinne einer Zellreduktion, denn es kommt statt zu einer Wirkverstärkung des Zytostatikums zu einer Zellproliferation der Tumorzellen im Verhältnis zur Kontrolle.

Auffällig und zu diskutieren ist außerdem, dass unter den Versuchsbedingungen der Thermochemotherapie die IC_{50} -Konzentration von Carboplatin nicht mehr einer Zellproliferation von 50% entspricht, sondern mit 65,9% darüber liegt. Nachdem die IC_{50} -Konzentration erneut durch Proliferationsversuche bestätigt wurde, kann man davon ausgehen, dass die veränderten Versuchsbedingungen ursächlich sind. Da die Ergebnisse der Thermochemotherapie ein prozentuales Verhältnis darstellen, lassen sie Wertungen der Kombinationen zu.

5.3.3 Hyperthermie und Gemcitabine

Auch für die Kombination von Gemcitabine und Hyperthermie finden sich aktuelle Studien, die in in vitro Modellen die synergistische Interaktion dieser Kombination belegen. Vertrees et al. berichten von einer potenzierenden Wirkung dieser Kombination im Lungentumormodell (Vertrees et al., 2005). Eine andere präklinische Studie von van der Heijden et al. konnte eine synergistische Interaktion von Gemcitabine und Hyperthermie an Zelllinien des Blasenkarzinoms belegen (Van der Heijden et al., 2005).

In unseren in vitro Untersuchungen der Pankreaszelllinie DAN-G kommt es durch die Hyperthermie mit 39°C und 41,8°C zu einer leichten Proliferation der Zellen anstatt zu einer erwarteten Wirkverstärkung des Zytostatikums. Das Zellwachstum nimmt im Vergleich zu einer Behandlung der Zellen mit Gemcitabine bei 37°C in beiden Ansätzen um ca. 5% zu. Damit kommt es zu einem Wirkverlust des Medikamentes. Bei 43°C überlebt eine Zellfraktion von ca. 5%. Die Ergebnisse von 43°C decken sich mit denen der Versuchsansätze der alleinigen Hyperthermie und der Kombinationsbehandlung von Carboplatin und Hyperthermie. Es liegt nahe anzunehmen, dass die Zellproliferationshemmung bei 43°C ein Effekt der Hyperthermiebehandlung ist und nicht der Kombinationstherapie von Hyperthermie und Gemcitabine zugrunde liegt. Damit kann aus dem in vitro Modell des Pankreaskarzinoms keine therapeutische Wirksamkeit aus einer Kombination von Hyperthermie und Gemcitabine abgeleitet werden.

Auch bei Gemcitabine ist analog zum Carboplatin eine Wirkveränderung der IC₅₀-Konzentration zu verzeichnen. Es kommt unter diesen Versuchsbedingungen bei einer Gabe von 0,1 µg/ml zu einem Zellwachstum von 28,49% anstatt der erwarteten 50%. Auch hier wurde die IC₅₀-Konzentration erneut durch den Proliferationsversuch kontrolliert und bestätigt. Es liegt nahe, dass es sich, wie oben schon erwähnt, um ein nicht konstantes System handelt.

5.3.4 Hyperthermie und die Kombination von Carboplatin und Gemcitabine

Da zum einen die Kombination von Carboplatin und Gemcitabine in präklinischen Studien einen synergistischen Effekt hat (Bergman et al., 1996; van Moorsel et al., 1999; Yang et al., 2000) und zum anderen ihre Kombination in klinischen Studien eine Wirksamkeit auf das Pankreaskarzinom zeigt (Heinemann et al., 2000; Colucci et al., 2002), stellt sich die Frage, ob durch die Kombination mit Hyperthermie eine weitere Wirkpotenzierung erreicht werden kann.

Unsere Ergebnisse können eine Wirkpotenzierung nicht bestätigen. Die Zellproliferation ändert sich kaum (um 2%) bei Temperaturen von 39°C und 41,8°C im Verhältnis zur

alleinigen Zytostatikagabe. Erst bei 43°C kam es wie auch schon in den vorher beschriebenen Ansätzen zu einer Abnahme der Zellproliferation auf 9,37%, die am ehesten den direkt zytotoxischen Effekt der Hyperthermiebehandlung darstellt.

Das Ergebnis zeigt, dass sich aus den in vitro Daten die Hyperthermie in Kombination mit Carboplatin und Gemcitabine für die von uns untersuchte Pankreaskarzinomzelllinie in vitro nicht als günstige Therapieoption ableiten lässt.

5.4 Gruppenvergleich

In den in vitro Untersuchungen an der Tumorzelllinie DAN-G des Pankreas erweisen sich beide verwendeten Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine als wirksam. Gemcitabine ist auch bei sehr niedrigeren Dosierungen von 0,1 µg/ml sehr wirksam. Diese Dosierung entspricht niedrigen Serumspiegeln, die noch Tage nach der Applikation bei Patienten in vivo gefunden werden. Das Zytostatikum Carboplatin mit einer Dosierung von 69,2 µg/ml zeigt entsprechende Wirksamkeit bei eher hohen in vivo Dosierungen. Die Kombination von Carboplatin und Gemcitabine bringt keinen weiteren Therapievorteil im Verhältnis zur alleinigen Behandlung der Zellen mit Gemcitabine.

Primäres Ziel der Untersuchung war jedoch nicht allein, die Wirksamkeit der beiden Zytostatika und ihre Kombination auf unsere Zelllinie zu testen. Vielmehr sollte herausgefunden werden, ob die Kombination dieser Zytostatika mit Hyperthermie an der Tumorzelllinie DAN-G des Pankreaskarzinoms Potential für eine Übertragung in die Klinik aufweist. Im Gruppenvergleich rufen im Thermochemotherapieversuch bei 39°C und 41,8°C Gemcitabine und Gemcitabine mit Carboplatin den stärksten therapeutischen Effekt hervor. In der zusammenfassenden Graphik (Abbildung 13, Ergebnisteil) erkennt man, dass die beiden eben genannten Ansätze in der Wirkung auf unsere Tumorzelllinie ebenbürtig sind. Verglichen mit der alleinigen Zytostatikagabe von Gemcitabine sind diese beiden Ansätze in Kombination mit Hyperthermie jedoch nicht von Vorteil und führen zu keiner weiteren Wirkverstärkung, sondern sogar eher zu einer leichten Zellproliferation. Die Hyperthermie (39°C und 41,8°C) in Kombination mit Carboplatin führt zu einem Wirkverlust des Medikamentes um ca. 10-15%. Kombiniert man allerdings alle Ansätze mit 43°C, dann kommt es analog zur alleinigen Hyperthermiebehandlung zu einer starken Abnahme der Zellzahl bis unter 10%. Anzunehmen ist, dass der Effekt auf die direkt zytotoxische Wirkung der Hyperthermiebehandlung zurückzuführen ist, zumal dieser Effekt mit einer verbleibenden Zellzahl von 0,99% wesentlich stärker ausgeprägt ist als in den Kombinationsansätzen.

5.5 Zeitlich versetzte Gabe der beiden Zytostatika

In der aktuellen Literatur findet man, wie in der Einleitung schon erwähnt, Studien, die zeigen, dass das Zeitintervall der Zytostatikagabe ein wichtiger Faktor für die Intensität der antitumoralen Wirkung ist. Die Arbeitsgruppe Braakhuis et al. zeigte im Tiermodell an Tumoren des Kopfes und Halses, dass die Simultangabe von Gemcitabine und Cisplatin oder eine vorangehende Gabe von Cisplatin den im Vergleich besten therapeutischen Effekt erzielt. Eine andere Arbeitsgruppe von van Moorsel et al. zeigte auch einen von der zeitlichen Gabe der Zytostatika Gemcitabine und Cisplatin abhängigen Effekt. Allerdings war hier im Lungentumormodell die vorangehende Gabe von Gemcitabine von Vorteil.

Es stellte sich die Frage, ob durch eine zeitliche versetzte Gabe von Carboplatin und Gemcitabine eine Wirkveränderung festgestellt werden kann und evtl. die Wirkung der Kombinationstherapie sogar verstärkt werden kann. Dazu wurde die Zelllinie mit den IC_{50} -Konzentrationen von Carboplatin und Gemcitabine behandelt, wobei die Zytostatika einmal simultan gegeben wurden. In den anderen beiden Ansätzen ging die Gabe des jeweiligen Zytostatikums dem anderen um eine halbe Stunde voraus.

Für diese in vitro Versuche ergaben alle drei Ansätze denselben therapeutischen Effekt. Man kann keinen Vorteil aus der zeitlich versetzten Gabe von Carboplatin und Gemcitabine in diesem Pankreaskarzinommodell erkennen.

5.6 Analyse des Zellzyklus

Auf Grund der scheinbar geringen Thermoempfindlichkeit unserer Zelllinie DAN-G des Pankreaskarzinoms wurde den Thermochemotherapieversuchen eine Zellzyklusanalyse angeschlossen. Dies ist sinnvoll, da die Ursache der geringen Thermoempfindlichkeit unter anderem eine Umverteilung der Zellzyklusphasenanteile sein könnte, denn eine in vitro Studie von Mackey und Dewey weist darauf hin, dass Zellen in der S-Phase thermoempfindlicher sind als Zellen in anderen Phasen des Zellzyklus (Mackey und Dewey, 1989). Vor ihnen hatte Dietzel in den grundlegenden Prinzipien der Hyperthermie in der Tumorthherapie Ähnliches beschrieben. Er konstatierte, dass die Zellen bevorzugt in der M- und S-Phase des Zellzyklus thermoempfindlich sind und dass die Hyperthermie einen synchronisierenden Effekt auf die Zellproliferation hat (Dietzel, 1983). Auch in vivo ist die Anzahl der Zellen in der S-Phase ein mitentscheidender, prognostischer Faktor für den Erfolg einer Therapie. In einer Studie an humanen Mammakarzinomzellen haben Bergers et al. gezeigt, dass der prozentuale Anteil der S-Phase-Zellen mit dem Gesamtüberleben der Patienten korreliert (Bergers et al., 1997).

Es stellte sich demnach auf der einen Seite die Frage, ob sich ein hoher Anteil der Zellen in der G₀/G₁-Phase und ein wesentlich geringerer Anteil der Zellen in der S-Phase befindet. Auf der anderen Seite galt es zu klären, ob sich die Zellzyklusphasenanteile im Verhältnis zueinander durch die Thermochemotherapie ändern oder durch die Hyperthermie möglicherweise synchronisiert werden.

Wir untersuchten die Zellzyklusphasen nach der Thermochemotherapiebehandlung mittels der Fluoreszenzfärbemethode nach Dolbeare et al..

Wir beobachteten, dass

1. alle Ansätze der Thermochemotherapie ähnliche relative Zellzyklusphasenanteile zeigen.
2. sich die Anteile innerhalb eines Ansatzes während der Therapie mit 39 und 41,8°C nicht verändern.
3. der Anteil der Zellen in der G₀-Phase mit 40-50% zwar größer ist als der der S-Phase mit 30-40%, aber nicht soviel größer, als dass sich die Thermoresistenz der Zellen damit erklären ließe.

Daraus resultiert, dass unsere Zelllinie DAN-G extrahiert aus einem Tumor des Pankreas bis 41,8°C thermo- und zellzyklusphasenstabil ist. Möglicherweise wirkt die Hyperthermie auf Zelllinien des Pankreas erst ab 43°C auf die Zellphasenverteilung, da hier in unseren Untersuchungen ein deutlicher Abfall der Zellzahl zu beobachten war. Diese Ergebnisse bestätigen die Studie von Nakata et al., die einen starken Effekt der Hyperthermie auf Tumorzellen des Pankreas ab 44°C beobachteten (Nakata et al., 1992).

5.7 Auswertung einer Pilotphase mit Ganzkörperhyperthermie in Kombination mit Chemotherapie bei metastasiertem Pankreaskarzinom

Obgleich die präklinischen in vitro Daten der Thermochemotherapie keine Wirkungsverstärkung im Gegensatz zur Monotherapie mit Gemcitabine belegen konnten, schließt das einen klinischen Erfolg dieser Kombinationstherapie für das Pankreaskarzinom nicht grundsätzlich aus. In der klinischen Situation spielen in vitro nicht simulierbare Faktoren wie z.B. die Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen und die antitumorale Immunantwort eine Rolle. Unsere Zytotoxizitätsergebnisse könnten nur auf die untersuchte Pankreaszelllinie DAN-G begrenzt gültig sein.

Im Rahmen von individuellen Heilversuchen wurden an der Universität zu Lübeck Patienten mit inoperablem, metastasiertem Pankreaskarzinom im Stadium IVB behandelt. Sie erhielten eine standardisierte Chemotherapie mit Gemcitabine und Carboplatin in Kombination mit einer Ganzkörperhyperthermie.

Bei 23% der Patienten konnte eine Teilremission erreicht werden und bei 38% ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden. Bei wiederum 38% schritt die Erkrankung weiter fort. Die mediane Überlebenszeit aller Patienten betrug beachtliche 11,4 Monate. Das liegt über dem Durchschnitt der in der Literatur beschriebenen medianen Überlebenszeit und konnte auch in Studien, wie zum Beispiel der von Burris et al. mit einer Monotherapie mit Gemcitabine bei medianer Überlebenszeit von 5,7 Monaten nicht erreicht werden (Burris et al., 1997).

Das Nebenwirkungsprofil der Ganzkörperhyperthermiebehandlung war weitgehend akzeptabel. Die Patienten mussten alle für durchschnittlich vier Tage stationär aufgenommen werden. Übelkeit und Erbrechen konnten mit entsprechender antiemetischer Behandlung beherrscht werden. Alle Patienten mussten aufgrund einer zumeist milden Dehydrierung im Rahmen der Hyperthermie rehydriert werden. Zu einer relevanten Grad III und IV Hämatotoxizität kam es erst nach einem dritten Therapiezyklus. Dennoch war auffällig, dass sich bei nur vier Patienten mehr als zwei Zyklen durchführen ließen, da die anderen Patienten die gesamte Prozedur entweder zu belastend empfanden, bzw. der Tumor resistent oder doch früh progredient waren. Wichtig bei der Bewertung der Überlebensdaten ist, dass man das Phänomen der Patientenselektion nicht unterschätzt, das bei stark belastenden und mit vielen Nebenwirkungen behafteten Behandlungen eine große Rolle spielt. Die Chemotherapie mit Carboplatin und Gemcitabine ist schon als alleinige Intervention sehr intensiv und belastet den Organismus extrem. Gleiches gilt für die Ganzkörperhyperthermiebehandlung. Grundsätzlich erhalten nur Patienten in einem guten Allgemeinzustand eine Ganzkörperhyperthermie. Schon geringe kardiale und pulmonale Funktionseinschränkungen, wie man sie bei Pankreaskarzinompatienten häufig antrifft, führen zum Ausschluss. Auch werden Patienten, die älter als 65 Jahre sind, nicht mit der Ganzkörperhyperthermie behandelt. Ältere Patienten machen jedoch bei den meisten Behandlungsstudien der Monosubstanzen den Großteil der Patienten aus. Bei der vergleichenden Betrachtung der Gesamtüberlebensdaten muss auch beachtet werden, dass die Patienten, die unsere Beobachtungsanwendung erlebten, spätestens im Progress eine Standardtherapie mit Gemcitabine als Monosubstanz erhalten haben dürften. Auf jeden Fall ist das Patientenkollektiv der Beobachtungsanwendung mit 13 Patienten ziemlich klein. Sie entspricht einer für Pilotphasen üblichen Patientenstärke und besitzt somit die entsprechende allenfalls richtungsweisende Wertigkeit. Da jedoch weder

randomisiert noch eine Kontrollgruppe mitbehandelt wurde, kann dieser Pilotphase kein Gewicht innerhalb der Evidence-Basierten Medizin zugeschrieben werden. Diese Pilotphase kann als Hinweis darauf aufgefasst werden, dass die Ganzkörperhyperthermie ein neuer Weg zur Behandlung von Patienten mit weit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom sein könnte. Zur weiteren Beurteilung müssten die Ergebnisse von Phase IIB und Phase III Studien abgewartet werden.

Immerhin beherbergen die meisten klinisch aktiven Onkologen eine erhebliche Skepsis hinsichtlich der Ganzkörperhyperthermie beim Pankreaskarzinom. Es handelt sich um ein aufwendiges und potentiell nebenwirkungsträchtiges Verfahren, das aufgrund der stationären Behandlungsbedingungen und der Therapiedurchführung auch noch teuer ist. Mit der Gemcitabinmonotherapie steht seit einigen Jahren erstmalig ein Medikament zur Verfügung, das neben einer gewissen objektivierbarer Wirksamkeit auch palliativ wirksam ist, da es Symptome lindert und die Lebensqualität der Patienten verbessert. Die Bereitschaft der meisten Onkologen, statt dessen eine aggressive Therapieform ohne nachgewiesene Wirksamkeit einzusetzen, ist gering. Die im Rahmen dieser Dissertation ermittelte Therapieresistenz auf klinisch anwendbare Hyperthermie der für andere Pankreaskarzinome beispielhaften Zelllinie wird zu weiterer Zurückhaltung inspirieren.

Zum Verfahren der Ganzkörperhyperthermie muss auch generell kritisch angemerkt werden, dass es in 20 Jahren enthusiastischer Forschung nicht gelungen ist, die Wirksamkeit dieses Verfahrens durch Phase IIB und Phase III Studien bei den intensiv untersuchten Weichteilsarkomen und den Pleuramesotheliomen zu etablieren.

Wo liegt nun die Zukunft des Verfahrens der Ganzkörperhyperthermie?

Begleitend zu den klinischen Erfahrungen wurden im Verlauf der Jahre unterschiedliche Argumente gebracht, die ihr Vorteile gegenüber dem normothermen Einsatz von Chemotherapie zuschreiben. Ein Argument ist die bessere Blutversorgung des Tumors unter Hyperthermiebedingungen. Da die Blutgefäße im Tumor aufgrund fehlender glatter Muskulatur nicht auf thermisch oder nervale Einflüsse reagieren können, spielt dieses Argument allenfalls im Bereich der Extremitäten eine Rolle. Auch wurden unterschiedliche molekulare Phänomene unter zunehmenden Temperaturen beobachtet. So kommt es zur erhöhten Expression des heat shock proteins HSP70 bei der Hyperthermie (Adamietz und Wust, 2004). Die wahre Bedeutung dieses Befundes für die Tumorbologie und Tumorbehandlung ist unklar. Beschrieben ist zwar, dass heat shock Proteine bei der Erwärmung von Zellen in letztlich tödlichen Bereichen vermehrt auftreten, unklar ist aber, ob sie dann eine pro- oder eine antiapoptotische Funktion ausüben. Ob eine passagere Überexpression eines dieser Gene während der kurzen Hyperthermiephase eine

antitumorale Rolle spielt, bleibt jedenfalls unklar. Auch die antitumorale Immunantwort im Zusammenhang mit hyperthermen Einflüssen wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert. Während Koga et al. im Tiermodell eine durch Hyperthermie induzierte Suppression der Zytotoxizität von NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) nachweisen konnten, beobachteten Pritchard et al., dass der antitumorale Effekt von IL-12 im Tierversuch durch milde Hyperthermie verstärkt wurde (Koga et al., 2005, Pritchard et al., 2005). Eine mäßige Erhöhung der Körpertemperatur auf Temperaturen um 39 bis 40°C scheint die antibakterielle und antivirale Immunantwort etwas zu stärken, während die Wachstumsbedingungen der häufigsten Keime verschlechtert werden. Eine Hyperthermie über längere Zeit verschlechtert die meisten Immunprozesse. Für frühe Phasen der Oncogenese gilt allgemein, dass transformierte Zellen zunächst dem körpereigenen Immunsystem entgehen müssen, bevor es zum Tumorwachstum kommt. Das Pankreaskarzinom gilt als wenig immunogen. Es ist zwar wahrscheinlich, dass eine Immuntoleranzentwicklung beim frühen Pankreaskarzinom eine Rolle spielt, in fortgeschrittenen Stadien werden jedoch unter normothermen Bedingungen weder histologisch noch klinische relevante Immunprozesse beobachtet. Es ist aus theoretischen Erwägungen somit eher unwahrscheinlich, dass eine Hyperthermie im Körper eine klinisch relevante Verbesserung der Immunantwort erbringt.

Trotz intensiver Bemühungen gerade hier in Deutschland ist es nicht gelungen, die Zulassung der Hyperthermie mit Chemotherapie für auch nur eine Tumorentität zu gewinnen. Es ist mehr als unwahrscheinlich, dass unter den bestehenden finanziellen und gesetzlichen Bedingungen die fehlenden klinischen Phase III Studien in naher oder ferner Zukunft durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Die Prognose des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms ist wegen der sehr späten Diagnosestellung, der aggressiven Tumorbilogie und der weitgehenden Therapieresistenz immer noch infaust. In der palliativen Therapie steht die Monochemotherapie mit Gemcitabine im Mittelpunkt der Therapieoptionen. Wenngleich eine Vielzahl von weiteren Chemotherapeutika untersucht wurde, konnte keinem eine Überlegenheit gegenüber Gemcitabine belegt werden. Die Suche nach wirksamen multimodalen Therapiekonzepten geht von der Erfahrung aus, dass weder die alleinige Strahlen- noch Chemotherapie eine lokale und systemische Kontrolle der Erkrankung bewirkt. Es gilt, zum Beispiel eine evtl. Wirkungssteigerung bekannter Zytostatika durch physikalische Maßnahmen wie Bestrahlung, hyperbare Sauerstofftherapie oder Überwärmung zu überprüfen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit einer einstündigen Hyperthermie in Kombination mit den zytotoxischen Substanzen Carboplatin und Gemcitabine auf die Zellreihe DAN-G des Pankreaskarzinoms mittels des Kristallviolett-Assay getestet. Im zweiten Teil wurden die Ergebnisse einer klinischen Pilotphase mit Ganzkörperhyperthermie in Kombination mit den o.g. Zytostatika ausgewertet.

Im ersten Teil, den in vitro Untersuchungen, konnte keine der Kombinationen mit Hyperthermie bei 39 und 41,8°C im Vergleich zur alleinigen Gemcitabingabe bei 37°C einen Therapievorteil erzielen. Erst eine in der Klinik im Rahmen der Ganzkörperhyperthermie nicht einsetzbare Temperaturerhöhung auf 43°C bewirkte aufgrund direkter Schädigung eine starke Reduktion der Zellzahl auf unter 10%. Auch in der Kombination mit Carboplatin und Gemcitabine rief die Hyperthermie weder simultan noch in der zeitlich versetzten Gabe eine Verstärkung des Therapieeffektes hervor. Die Zellzyklusanalyse zeigt, dass die Hyperthermie keine Verschiebung der Dauer und des Anteils der Zellen in den Zellzyklusfraktionen bewirkt und dass keine großen G0/G1-Fraktionen induziert werden, die für eine Thermosensitivierung verantwortlich gemacht werden könnten.

Im zweiten Teil, der ausgewerteten Pilotphase, in der die Patienten mit Chemotherapie und Ganzkörperhyperthermie behandelt worden waren, ergab sich eine mediane Überlebenszeit von 11,4 Monaten. Dies ist ein Hinweis dafür, dass diese Therapieoption bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom Wirksamkeit zeigt.

Während die in vitro Untersuchungen also keinen Hinweis auf eine Therapieverbesserung durch den Hyperthermieeffekt ergeben, zeigen die klinischen Beobachtungen durchaus gute Ergebnisse. In der Diskussion wird auf die Bedeutung dieser Daten innerhalb des Therapiekonzeptes eingegangen. Es wird gezeigt, dass diese guten Therapieeffekte bei

einem hoch selektionierten Patientengut erzielt wurden und die Therapie aufgrund des hohen Therapieaufwandes und der Nebenwirkungen noch mit Skepsis betrachtet werden muss. Der fehlende Effekt in vitro spricht zusätzlich gegen die Wirksamkeit der Hyperthermie auf Pankreaskarzinomzellen.

Es bleibt letztlich offen, ob die getesteten Kombinationen auf andere Zelllinien des Pankreaskarzinoms wirksam sein können und ob sich der Therapieerfolg der Ganzkörperhyperthermie mit Chemotherapie in Phase II und III Studien bestätigen ließe. Der aktuelle Therapiestandard für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom bleibt die Gemcitabinemonotherapie.

7 Abkürzungen

AUC	area under the curve
Borax	Sodiumtetraborat
BrdU	5-Brmo-2`-desoxyuridin
°C	Temperatureinheit Celsius
DAN-G	Kurzbezeichnung der verwendeten Zelllinie des Pankreaskarzinoms
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	Fluoreszenz-Activated-Cell-Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
5-FU	5-Fluorouracil
G0/G1	Wachstumsphase und Ruhephase des Zellzyklus
HCl	Salzsäure
HSP	Heat-Shock-Protein
IC ₅₀	Inhibitionskonzentration von 50%
NC	keine Veränderung (no change)
PBS	Phosphat buffer saline
PD	fortschreitende Erkrankung (progressive disease)
PEFG-Regime	Zytostatikakombination von Gemcitabine, 5-FU, Cisplatin und Epirubicin
PO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PR	partielle Remission eines Tumors (partial remission)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
NaCl	Natriumchlorid
CT	Computertomographie
MTT	Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid
RPMI 1640	Initialname des im Rosewell Park Memorial Institut entwickelten Kulturmediums
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
UICC	Union Internationale Contre Cancer

8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1:

Stadieneinteilung nach UICC 1997 (Tumor Zentrum Berlin e.V., 2002) Seite 8

Tabelle 2:

Zellverdünnungsreihe zur Messung des Linearitätsbereiches der Zelllinie DAN-G Seite 22

Tabelle 3:

Verwendete Endkonzentrationen von Carboplatin und Gemcitabine Seite 23

Tabelle 4:

Die einzelnen Ansätze der Thermochemotherapieversuche Seite 24

Tabelle 5:

Ansätze der zeitlich versetzten Gabe der Zytostatika Seite 25

Tabelle 6:

Ansätze der verschiedenen Reagenzien für das New Acid Protokoll Seite 30

Tabelle 7:

IC₅₀-Konzentrationen der Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine in vitro nach Behandlung von DAN-G Zellen bei 37°C Seite 35

Tabelle 8:

Verschiedene Temperaturen und ihre Bezeichnungen/Verwendungen Seite 36

Tabelle 9:

Darstellung der Charakteristika der in der Studie eingeschlossenen Patienten. Die Charakteristik beinhaltet das Geschlecht und das Alter der Patienten. Zusätzlich sind das Stadium, die Histologie und die Metastasen mit Infiltration des Pankreas bei dem jeweiligen Patienten beschrieben. Seite 47

Tabelle 10:

Darstellung der Patientendaten: Erstdiagnose, Beginn der Ganzkörperhyperthermie und Datum des Versterbens. Zusätzlich sind die errechnete Überlebenszeit, die progressionsfreie Zeit und das Ergebnis der gesamten Therapie anhand des Tumorprogresses tabellarisch erfasst.

Seite 48

Tabelle 11:

Darstellung der Toxizität (Grad I-IV) nach Behandlung der Patienten mit Ganzkörperhyperthermie, Carboplatin und Gemcitabine. Keine Nebenwirkungen (Grad 0) ist in der Tabelle nicht dargestellt. Im Laufe der Zyklen nahm die Anzahl der behandelten Patienten (n) durch ein fehlendes Ansprechen des Tumors, nicht tolerierbare Nebenwirkungen oder frühzeitiges Versterben immer weiter ab.

Seite 50

Abbildungen**Abbildung 1:**

Strukturformel Carboplatin

Seite 16

Abbildung 2:

Strukturformel Gemcitabine

Seite 17

Abbildung 3:

Schematische Darstellung einer Zellzyklusanalyse durch FACS-Scan (Auf der Abszisse ist die Intensität der Fluoreszenz aufgetragen, die proportional zum DNA-Gehalt ist. Die Ordinate entspricht der Anzahl der Zellen).

Seite 26

Abbildung 4:

Schematische Darstellung des Prinzips der Durchflusszytometrie (aus: Internet; <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>)

Seite 28

Abbildung 5:

Wachstumskurve der DAN-G Zelllinie: Photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) in Abhängigkeit von der eingesäten Zellzahl gemessen im Kristallviolett Assay nach 1, 2, 3, 4 Tagen.

Seite 32

Abbildung 6:

Wachstumskurve der DAN-G Zelllinie: Bestimmung der Gesamtzellzahl in Abhängigkeit von der eingesäten Zellzahl gemessen im Kristallviolett Assay nach 1, 2, 3, 4 Tagen.

Seite 33

Abbildung 7:

Inhibitionskonzentrationsfindung 50% (s. Erläuterung S. 30) von Carboplatin: Dargestellt ist die Proliferation der DAN-G Zellen in Abhängigkeit von der zugegebenen aufsteigenden Konzentration an Carboplatin verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen in Prozent.

Seite 34

Abbildung 8:

Inhibitionskonzentrationsfindung 50% (s. Erläuterung S. 30) von Gemcitabine: Dargestellt ist hier die Proliferationshemmung von DAN-G Zellen in Abhängigkeit von der zugegebenen Konzentration von Gemcitabine verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen in Prozent.

Seite 35

Abbildung 9:

Resultierende Zellzahl nach Kultur von DAN-G Zellen die ohne Zytostatikazusätze bei 39, 41,8 und 43°C in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur kultiviert worden sind. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 7 Versuchsansätzen.

Seite 37

Abbildung 10:

Resultierende Zellzahl von DAN-G Zellen, die nach Zugabe der IC₅₀-Konzentration von Carboplatin bei 37, 39, 41,8 und 43°C in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur kultiviert worden sind. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 6 Versuchsansätzen.

Seite 38

Abbildung 11:

Resultierende Zellzahl der DAN-G Zellen, die nach Zugabe der IC₅₀-Konzentration von Gemcitabine bei 37, 39, 41,8 und 43°C in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur kultiviert worden sind. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 6 Versuchsansätzen.

Seite 39

Abbildung 12:

Resultierende Zellzahl der DAN-G Zellen, die nach Zugabe der IC₅₀-Konzentrationen von Carboplatin und Gemcitabine bei 37, 39, 41,8 und 43°C in Relation zu Kontrollzellen nach normothermer Kultur kultiviert worden sind. Jeder Zeitpunkt entspricht dem Mittelwert aus 6 Versuchsansätzen.

Seite 40

Abbildung 13:

Zusammenfassende Darstellung der Thermochemotherapieversuche

Seite 41

Abbildung 14:

Dargestellt ist die Proliferationshemmung auf DAN-G Zellen nach zeitlich versetzter Gabe der Zytostatika Carboplatin und Gemcitabine unter normothermen Bedingungen. Die Zellen wurden bei 37°C jeweils für eine Stunde mit beiden Zytostatika inkubiert, wobei im ersten Ansatz (links: Carb.+Gem.) die Zytostatika gleichzeitig zu Zeitpunkt 0 gegeben wurden. Im zweiten Ansatz (mittig: Carb.+Gem. (30`)) wurde Carboplatin zum Zeitpunkt 0 und Gemcitabine nach 30 Minuten gegeben. Im dritten Ansatz (rechts: Gem.+Carb. (30`)) wurde Gemcitabine zuerst zu den Zellen gegeben. Die Proliferation der Zellen wurde im Kristallviolett Assay gemessen.

Seite 42

Abbildung 15:

Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen ohne Zugabe von Zytostatika. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Seite 44

Abbildung 16:

Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugabe von Carboplatin. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Seite 44

Abbildung 17:

Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugabe von Gemcitabine. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Seite 45

Abbildung 18:

Durchflusszytometrische Analyse der Zellzyklusphasen von DAN-G Zellen nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen unter Zugabe der Kombination von Carboplatin und Gemcitabine. Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen in Prozent dargestellt. Auf der x-Achse sind zum einen die Zellzyklusphasen (G1/G2/S) und zum anderen die Temperaturen aufgezeigt, mit denen die Zellen behandelt wurden.

Seite 45

Abbildung 19:

Graphische Darstellung der G1-Phase aller Ansätze im Vergleich bei den Temperaturen 37, 39 und 41,8°C. Diese Phase ist von besonderer Bedeutung, da die G1-Phase, die die G0-Phasenanteile enthält, am thermostabilsten ist und damit mögliche Ursache einer Thermoresistenz von Zellen sein kann.

Seite 46

Abbildung 20:

Graphische Darstellung der nach der Kaplan-Meier-Methode berechneten Überlebenskurve für die Ganzkörperhyperthermie in Kombination mit Chemotherapie. Es wurde der Zeitpunkt der Erstdiagnose als Ursprung gewählt. Die Kaplan-Meier-Methode berücksichtigt die Information aller Patienten so lange, wie diese beobachtet worden sind.

Seite 49

9 Publikation

S. O. Peters, A. S. Stoltz, A. Bakshandeh, M. Vollmert, T. Wagner,
Analysis of preclinical and clinical data on the role of hyperthermia with gemcitabine and
carboplatin on pancreatic adenocarcinoma

In Vorbereitung

10 Literaturverzeichnis

1. Adamietz A, Wust P. Hyperthermie in der nicht-konventionellen Therapie. *Onkologe*. 10: 276-283, 2004
2. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends 4. erweiterte, aktualisierte Aufl. Saarbrücken. 32-35, 2004
3. Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer*. 85: 1700-1705, 2001
4. Bakhshandeh A, Bruns I, Eberhardt K, Wiedemann GJ. Chemotherapie in Kombination mit Ganzkörperhyperthermie bei fortgeschrittenem malignem Pleuramesotheliom. *Dtsch. Med. Wschr*. 125, 2000
5. Bergers E, Baak JP, van Diest PJ, van Gorp LH, Kwee WS, Bellot SM, Los J, Peterse HL, Ruitenbergh HM, Schapers RF, Somsen JG, van Beek MW, Fijnheer J. Prognostic implications of different cell cycle analysis models of flow cytometric DNA histograms of 1,301 breast cancer patients: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project (MMMCP). *Int J Cancer*. 74: 260-269, 1997
6. Bergman AM, Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Kuiper CM, Peters GJ. Synergistic interaction between cisplatin and gemcitabine in vitro. *Clin Cancer Res*. 2: 521-530, 1996
7. Bernhardt G, Reile H, Birnböck H, Spruß T, Schönenberger H. Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity. *J Cancer Res Clin Oncol*. 118: 35-43, 1992
8. Birkmeyer JD, Siewers AE, Finlayson EV, Stukel TA, Lucas FL, Batista I et al. Hospital volume and surgical mortality in the United States. *N Engl J Med*. 346: 1128-1137, 2002
9. Bisht KS, Uma DP. Hyperthermia in cancer research: current status. *Indian J Exp Biol*. 34: 1183-1189, 1996

10. Böhmg M, Rosewicz S. Pancreatic Carcinoma. *Z Gastroenterol.* 42: 261-268, 2004
11. Büchler MW, Schlag PM. Pankreaskarzinom – Zwischen Bangen und Hoffen. *Onkologe.* 10: 1275, 2004
12. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: A randomized trial. *J Clin Oncol.* Vol 15 No 6: 2403-2413, 1997
13. Braakhuis BJ, Ruiz van Haperen VW, Welters MJ, Peters GJ. Schedule-dependent therapeutic efficacy of the combination of gemcitabine and cisplatin in head and neck cancer. *Eur J Cancer.* 31A(13-14): 2335-2340, 1995
14. Caldas C, Kern SE. K-ras mutations and pancreatic adenocarcinoma. *Int J Pancreatol.* 18: 1-6, 1995
15. Cancer Source. Physician`s Cancer drug manual. Drug Database. 2004
16. Carter SK, Comis RL. The integration of chemotherapy into a combined modality approach for cancer treatment. VI. Pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Treat Rev.* 2: 193, 1975
17. Cascinu S, Labianca R, Daniele B, Beretta G, Salvagni S. Survival and quality of life in gastrointestinal tumors: Two different endpoints? *Ann Oncol.* 12(suppl.3): 31-36, 2001
18. Choi EK, Park SR, Lee JH, Chung HS, Ahn HE, Rhee YH, Lim BU, Park HJ. Induction of apoptosis by carboplatin and hyperthermia alone or combined in WERI human retinoblastoma cells. *Int J Hyperthermia.* 19(4): 431-443, 2003
19. Chowdhury P, MacLeod S, Kodetthor B, Rayford PL. Pathophysiological effects of nicotine on the pancreas: an update. *Exp Biol Med Vol.* 227(7): 445-454, 2002
20. Clavel F, Benhamou E, Auquier A, Tarayre M, Flamant R. Coffee, alcohol, smoking and cancer of the pancreas: A case-control study. *Int J Cancer.* 43: 17-21, 1989

21. Colucci G, Giuliani F, Gebbia V, Biglietto M, Rabitti P, Uomo G, Cigolari S, Testa A, Maiello E, Lopez M. Gemcitabine alone or with Cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: A prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale. *Cancer*. Volume 94 Number 4: 902-910, 2002
22. Copur MS, Ledakis P, Bolton M, Lynch J, Termuhlen P, Brand R, Norvell M, Muhvic J, Swantek S, Frost V, Vanpelt E, Mleczo KL, Frankforter S. Weekly cisplatin (P) and gemcitabine (G) in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 20: A619, 2001
23. Cullinan SA, Moertel CG, Fleming TR et al. A comparison of three chemotherapeutic regimes in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin and mitomycin. *JAMA*. 253: 2061-2067, 1985
24. Cullinan SA, Moertel CG, Wieand HS et al. A phase III trial on the therapy of advanced pancreatic carcinoma. Evaluations of the Mallinson regimen and combined 5-fluorouracil, doxorubicin and cisplatin. *Cancer*. 65: 2207-2012, 1990
25. Curis E, Provost K, Nicolis I, Bouvet D, Bènazeth S, Crauste-Manciet S, Brion F, Brossard D. Carboplatin decomposition in aqueous solution with chloride ions monitored by X-ray absorption spectroscopy. *New J Chem*. 24: 1003-1008, 2000
26. Datenbank: World Wide Cancer Statistics der WHO, 2002
27. Dewey WC, Holahan EV. Hyperthermia-basic biology. *Prog Exp Tumor Res*. 28: 198-219, 1984
28. Dietzel F. Basic principles in hyperthermic tumor therapy. *Recent Results Cancer Res*. 86: 177-190, 1983
29. Dolbeare F, Gratzner H, Pallavicini MG, Gray JW. Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 5573-5577, 1983
30. Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia*. 17: 1-18, 2001

31. Fritscher-Ravens A, Izbicki JR, Sriram PV, Krause C, Knoefel WT, Topalidis T et al. Endosonography-guided fine needle aspiration cytology extending the indication for organ-preserving pancreatic surgery. *Am J Gastroenterol.* 95: 2255-2260, 2000
32. Fung MC, Takayama S, Ishiguro H, Sakata T, Adachi S, Morizane T. [Chemotherapy for advanced or metastatic pancreatic cancer: analysis of 43 randomized trials in 3 decades (1974-2002)]. *Gan To Kagaku Ryoho.* 30: 1101, 2003
33. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem.* 15;159(1): 109-113, 1986
34. Glimelius B, Hoffman K, Sjöden PO, Jacobsson G, Sellström H, Enander LK, Linne T, Svensson C. Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer. *Ann Oncol.* 7: 593-600, 1996
35. Haddock G, Carter DC. Aetiology of pancreatic cancer. *Br J Surgery.* 77: 1159-1166, 1990
36. Hahn GM. Hyperthermia and cancer. Plenum Press. 1982
37. Hahn GM, Ning SC, Elizaga M, Kapp DS, Anderson RL. A comparison of thermal responses of human and rodent cells. *Int J Radiat Biol.* 56: 817-825, 1989
38. Hegewisch-Becker S, Hossfeld DK. [Addition of hyperthermia. Heat potentiates cancer therapy] *MMW Fortschr Med.* 21;143(25): 28-32, 2001
39. Heinemann V. Gemcitabine-based combination treatment of pancreatic cancer. *Sem Oncol.* Vol.29 No 1 Suppl 3: 22-35, 2002
40. Heinemann V, Wilke H, Mergenthaler HG, Clemens M, König H, Illinger HJ, Arning M, Schalhorn A, Possinger K, Fink U. Gemcitabine and cisplatin in the treatment of advanced or metastatic pancreatic cancer. *Ann Oncol.* 11: 1399-1403, 2000
41. Hiraoka H, Hahn GM. Comparison between tumor pH and cell sensitivity to heat in RIF-1 tumors. *Cancer Res.* 49: 3734-3736, 1989

42. Horsman MR, Overgaard J. Can mild hyperthermia improve tumor oxygenation? *Int J Hyperthermia*. 13: 141-147, 1997
43. Howard JM, Jordan GL. Cancer of the pancreas. *Curr Probl Cancer* 2(3): 5-52, 1977
44. Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de Gonzalez A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*. 92(11): 2076-2083, 2005
45. Jemal A, Murray T, Samuels A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 53: 5-26, 2003
46. Kächele V, Seufferlein T, Adler G, Brambs HJ, Juchems MS, Pauls S. Diagnostik beim Pankreaskarzinom. *Onkologe*. 10: 1276-1284, 2004
47. Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie Vorlesungsorientierte Darstellung. 2003
48. Kato M, Shimada Y, Tanaka H, Hosotani R, Ohshio G, Ishizaki K, Imamura M. Characterization of six cell lines established from human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer*. 15;85(4): 832-840, 1999
49. Kelly DM, Benjamin IS. Pancreatic carcinoma. *Ann Oncol*. 6(1): 19-28, 1995
50. Klostergaard J, Leroux ME, Tomasovic SP. Clonogenic survival studies of human colon tumor cell lines in vitro: combined hyperthermia, 5-fluorouracil/leucovorin, carboplatin and tumor necrosis factor. *Radiat Res*. 141(1): 44-48, 1995
51. Koga T, Harada H, Shi TS, Okada S, Suico MA, Shuto T, Kai H. Hyperthermia suppresses the cytotoxicity of NK cells via down-regulation of perforin/granzyme B expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 337(4): 1319-1323, 2005
52. Krempien R, Heinemann V, Mütter M, Harms W, Debus J. Multimodale kurative/neoadjuvante Therapie beim Pankreaskarzinom. *Onkologe*. 10: 1301-1309, 2004
53. Kueng W, Silber E, Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*. 182(1): 16-19, 1989

-
54. Künzli BM, Friess H, Kleeff J, Yekebas E, Mann O, Izbicki JR, Büchler MW. Kurativ-operative Therapie des Pankreaskarzinoms. *Onkologe*. 10: 1285-1300, 2004
 55. Lilly. Deutschland GmbH Zusammenfassung der Produktmerkmale und Fachinformation Gemzar. 2004
 56. Löhr JM, Heinemann V, Friess H. Pankreaskarzinom Aktuelle Diagnostik und Therapie. UNI-MED, 1. Auflage Bremen, 2003
 57. Mackey MA, Dewey WC. Cell cycle progression during chronic hyperthermia in S phase CHO cells. *Int J Hyperthermia*. 5(3): 405-415, 1989
 58. Mella O, Eriksen R, Dahl O, Laerum OD. Acute systemic toxicity of combined cis-diamminedichloroplatinum and hyperthermia in the rat. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 23(4): 365-373, 1987
 59. Meyer R. Pankreaskarzinom: Kombination von Diagnoseverfahren verbessert das Staging. *Deutsches Ärzteblatt* 99 Ausgabe 3. A-88/B-72/C-71, 2002
 60. Moroz P, Jones SK, Gray BN. Magnetically mediated hyperthermia: current status and future directions. *Int J Hyperthermia*. 18: 267-284, 2002
 61. Murray TG, Cicciarelli N, McCabe CM, Ksander B, Feuer W, Schiffman J, Mieler WF, O'Brien JM. In vitro efficacy of carboplatin and hyperthermia in a murine retinoblastoma cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 38(12): 2516-2522, 1997
 62. Nakata B, Chung YS, Sawada T, Yokomatsu H, Tanaka H, Satake K, Sowa M. The effect of hyperthermia against pancreatic cancer cell various examinations including flow cytometric bromodeoxyuridine/DNA analysis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 93(10): 1324-1329, 1992
 63. Nasr FL, Chahine GY, Kattan JG, Farhat FS, Mokaddem WT, Tueni EA, Dagher JE, Ghosn MG. Gemcitabine plus carboplatin combination therapy as second-line treatment in patients with relapsed breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 5(2): 117-122, 2004

64. Neureiter D, Zopf S, Dimmler A, Stintzing S, Hahn EG, Kirchner T, Herold C, Ocker M. Different capabilities of morphological pattern formation and its association with the expression of the differentiation markers in a xenograft model of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreatology*. 5(4-5): 387-397, 2005
65. Ocker M, Neureiter D, Lueders M, Zopf S, Ganslmayer M, Hahn EG, Herold C, Schuppan D. Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer. *Gut*. 54(9): 1215-1216, 2005
66. Oettle H, Moser L, Hilbig A, Budach V. Multimodale palliative Behandlung des Pankreaskarzinoms. *Onkologe*. 10: 1310-1319, 2004
67. Ohno S, Siddik ZH, Baba H, Stephens LC, Strebel LC, Wondergem J, Khokhar AR, Bull JM. Effect of carboplatin combined with whole body hyperthermia on normal tissue and tumor in rats. *Cancer Res*. 51(11): 2994-3000, 1991
68. Ormerod MG, Payne AW, Watson JV. Improved program for the analysis of DNA histograms. *Cytometry*. 8(6): 637-641, 1987
69. Overgaard J. Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo. A review and a hypothesis. *Cancer*. 39: 2637-2646, 1977
70. Pearson AS, Bouvet M, Evans DB, Roth JA. Gene therapy and pancreatic cancer. *Front Bioscience*. 3:e230-e237, 1998
71. Peters GJ, Bergman AM, Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Kuiper CM, Braakhuis BJ. Interaction between cisplatin and gemcitabine in vitro and in vivo. *Semin Oncol*. (4 Suppl 11): 72-79, 1995
72. Philip PA, Zalupski MM, Vaitkevicius VK, Arlauskas P, Chaplen R, Heilbrun LK, Adsay V, Weaver D, Shields AF. Phase II study of gemcitabine and cisplatin in the treatment of patients with advanced pancreatic carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*. 20: A2275, 2001
73. Picozzi VJ, Kozarek RA, Traverso LW. Interferon-based adjuvant chemoradiation therapy after pancreaticoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg*. 185: 476-480, 2003

-
74. Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Preclinical characteristics of gemcitabine. *Anticancer Drugs*. 6 Suppl 6: 7-13, 1995
 75. Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. Gemcitabine: metabolism, mechanism of action, and self-potential. *Semin Oncol*. 22 (4 Suppl 11): 3-10, 1995
 76. Pritchard MT, Wolf SF, Kraybill WF, Repasky EA. The anti-tumor effect of interleukin-12 is enhanced by mild (fever range) thermal therapy. *Immunol Invest*. 34(3): 361-380, 2005
 77. Projektgruppe Gastrointestinale Tumoren, Schlag P et al. Interdisziplinäre Leitlinie Pankreaskarzinom, Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie. 1. Auflage, 2002
 78. Prokesch R. Exaktes präoperatives Staging beim Pankreaskarzinom. *Ärzte Woche*, 17Jg. Nr.24, 2003
 79. Reile H, Birnbock H, Bernhardt G, Spruss T, Schonenberger H. Computerized determination of growth kinetic curves and doubling times from cells in microculture. *Anal Biochem*. 187(2): 262-267, 1990
 80. Remmele W. *Pathologie*, Springer, 2. Auflage Berlin, 1997
 81. Reni M, Passoni P, Panucci MG et al. Definitive results of a phase II trial of cisplatin, epirubicin, continuous-infusion fluorouracil, and gemcitabine in stage IV pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 19:2679, 2001
 82. Robins HI, Cohen JD; Schmitt CL, Tutsch KD, Feierabend C, Arzooonian RZ, Alberti D, d'Oleire F, Longo W, Heiss C. Phase I clinical trial of carboplatin and 41,8 degrees C whole-body hyperthermia in cancer patients. *J Clin Oncol*. 11: 1787-1794, 1993
 83. Robins HI, Hugander A, Cohen JD. Whole body hyperthermia in the treatment of neoplastic disease. *Radiol Clin North Am*. 27: 603-610, 1989
 84. Roche Lexikon Medizin, Urban und Fischer Verlag. 4. Auflage, 1999

-
85. Rofstad EK. Heat sensitivity and thermotolerance in vitro of human breast carcinoma, malignant melanoma and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer*. 61: 22-28, 1990
 86. Ryan DP. Chemotherapy for advanced pancreatic cancer. *UpToDate*, 2005
 87. Sasaki K, Adachi S, Yamamoto T, Murakami T, Tanaka K, Takahashi M. Effects of denaturation with HCl on the immunological staining of bromodeoxyuridine incorporated into DNA. *Cytometry*. 9(1): 93-96, 1988
 88. Schnurr B, Gust R. Investigation on the decomposition of carboplatin in infusion solutions. *Microchim Acta*. 140: 69-76, 2002
 89. Schuller J, Cassidy J, Dumont E et al. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol*. 45: 291, 2000
 90. Shchepotin IB, Buras RR, Nauta RJ, Shabahang M, Soldatenkov VA, Evans SR. In vitro effect of 5-fluorouracil, verapamil and hyperthermia on the human pancreatic adenocarcinoma cell line ASPC-1. *Chemotherapy*. 40(5): 348-356, 1994
 91. Smith JA, Brown J, Martin MC, Ramondetta LM, Wolf JK. An in vitro study of the inhibitory activity of gemcitabine and platinum agents in human endometrial carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol*. 92(1): 314-319, 2004
 92. Van Bree C, Beumer C, Rodermond HM, Haveman J, Bakker PJM. Effectiveness of 2',2'-difluorodeoxycytidine (Gemcitabine) combined with hyperthermia in rat R-1 rhabdomyosarcoma in vitro und in vivo. *Int J Hyperthermia*. Vol.15 No.6, 549-556, 1999
 93. Van der Heijden AG, Verhaegh G, Jansen CF, Schalken JA, Witjes JA. Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 4 chemotherapeutic agents currently used for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder: an in vitro study. *J Urol*. 173(4): 1375-1380, 2005
 94. Van der Vijgh WJ. Clinical pharmacokinetics of carboplatin. *Clin Pharmacokinet*. 21(4): 242-261, 1991

95. Van Moorsel CJ, Pinedo HM, Veerman G et al. Mechanism of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 80: 981, 1999
96. Van Moorsel CJ, Pinedo HM, Veerman G, Vermorken JB, Postmus PE, Peters GJ. Scheduling of gemcitabine and cisplatin in Lewis lung tumor bearing mice. *Eur J Cancer*. 35(5): 808-814, 1999
97. Vertrees RA, Das GC, Popov VL, Coscio AM, Goodwin TJ, Logrono R, Zwischenberger JB, Boor PJ. Synergistic interaction of hyperthermia and gemcitabine in lung cancer. *Cancer Biol Ther*. 1;4(10), 2005
98. Volk HD. Multiparameteranalysen von mononukleären Zellen mittels Durchflusszytometrie. *Immunologische Arbeitsmethoden*, Friemel H. (ed.), 4.überarbeitete Auflage. 324-338, 1991
99. Watson JV, Chambers SH, Smith PJ. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry*. 8(1): 1-8, 1987
100. Westermann AM, Grosen EA, Katschinski DM, Jager D, Rietbroek R, Schink JC, Tiggelaar CL, Jager E, Zum V, Neuman A, Knuth A, Van Dijk JD, Wiedemann GJ, Robins HI. A pilot study of whole body hyperthermia and carboplatin in platinum-resistant ovarian cancer. *Eur J Cancer* 37: 1111-1117, 2001
101. Wiedemann GJ, Mella O, Roszinski S, Weiss C, Wagner T. Hyperthermia enhances mitoxantrone cytotoxicity on human breast carcinoma and sarcoma xenografts in nude mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 24: 669-673, 1992
102. Wiedemann GJ, Robins HI, Gutsche S, Mentzel M, Deeken M, Katschinski DM, Eleftheriadis S, Crahe R, Weiss C, Storer B, Wagner T. Ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) combined with 41,8 degrees C whole body hyperthermia in patients with refractory sarcoma. *Eur J Cancer* 32A: 888-892, 1996
103. Wiedemann GJ, Robins HI, Katschinski DM, Mentzel M, d'Oleire F, Kutz M, Wagner T. Systemic hyperthermia and ICE chemotherapy for sarcoma patients: rational and clinical status. *Anticancer Res*. 17: 2899-2902, 1997

-
104. Wiedemann GJ, Roszinski S, Biersack A, Mentzel M, Weiss C, Wagner T. Treatment efficacy, intratumoral pO₂ and pH during thermochemotherapy in xenotransplanted human tumors growing in nude mice. *Contrib Oncol.* 42: 556-565, 1992
 105. Wondergem J, Bulger RE, Strebel FR, Newman RA, Travis EL, Stephens LC, Bull JM. Effect of cis-diamminedichloroplatinum(II) combined with whole body hyperthermia on renal injury. *Cancer Res.* 48(2): 440-446, 1988
 106. World Wide Cancer Statistics der WHO, 2002
 107. Wößmann W. (1994) Untersuchung der Kombinationseffekte von Hyperthermie und Chemotherapie an menschlichen Tumorzelllinien unter Simulation von in vivo Bedingungen, Med. Dissertation, Universität zu Lübeck
 108. Wust P, Hildebrandt B, Sreenivasa G, Rau B, Gellermann J, Riess H, Felix R, Schlag PM. Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* 3:487-497, 2002
 109. Yamada S, Takai Y, Nemoto K et al. Intraoperative radiation therapy combined with hyperthermia against pancreatic carcinoma. *Tohoku J Exp Med.* 166(3): 395-401, 1992
 110. Yang LY, Li L, Jiang H et al. Expression of ERCC1 antisense RNA abrogates gemcitabine-mediated cytotoxic synergism with cisplatin in human colon tumor cells defective in mismatch repair but proficient in nucleotide excision repair. *Clin Cancer Res.* 6:773, 2000
 111. Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sohn TA, Campbell KA, Hruban RH. Pancreaticoduodenectomy with or without distal gastrectomy and extended retroperitoneal lymphadenectomy for periampullary adenocarcinoma, part 2: randomized controlled trial evaluating survival, morbidity and mortality. *Ann Surg* 236: 355-366, 2002
 112. Zatloukal P, Petruzella L. Gemcitabine/carboplatin in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2: 33-36, 2002

113. Zeller WJ. Grundlagen – Diagnostik –Therapie-Entwicklungen. Ecomed. 1995
114. Zheng W, McLaughlin JK, Gridley G, Bjelke E, Schuman LM, Silverman DT, Wacholder S, Co-Chien HT, Blot WJ, Fraumeni JF Jr. A cohort study of smoking, alcohol consumption and dietary factors for pancreatic cancer (United States). *Cancer Causes Control*. 4(5): 477-482, 1993
115. Ziske C, Nagaraj S, Marten A, Gorschluter M, Strehl J, Sauerbruch T, Abraham NG, Schmidt-Wolf IG. Retroviral IFN-alpha gene transfer combined with gemcitabine acts synergistically via cell cycle alteration in human pancreatic carcinoma cells implanted orthotopically in nude mice. *J Interferon Cytokine Res*. 24(8): 490-496, 2004

11 Danksagung

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von PD. Dr. S. O. Peters. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas und seinen freundliche Unterstützung. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. T. Wagner für seinen fachlichen Rat. Zusätzlich betreut wurde ich von Dr. A. Bakhshandeh. Ganz besonders danke ich ihr dafür, dass ich, egal mit welchen Fragen, immer eine Ansprechpartnerin hatte. Zudem danke ich ebenfalls Frau M. Vollmert; sie führte mich in die Laborarbeiten ein und betreute mich während der ganzen Zeit. Ebenfalls möchte ich mich bei der Apotheke der Universität zu Lübeck und dort besonders bei Herrn Riedel bei der Hilfe in allen Fragen der Zytostatikatherapie bedanken. Nicht vergessen werden soll auch Thorsten Klink. Er half mir bei den Versuchen der Zellzyklusanalyse und bei allen ihnen folgenden computertechnischen Fragen.

Dann ist da noch eine Reihe von Menschen, die mir in kleinen Dingen immer wieder zur Seite gestanden haben. Zu nennen ist da Regina Böhme, deren konstruktive Kritik und viele kleinen Ratschläge beim Schreiben der Arbeit Gold wert waren. Auch Gardis Krimpenfort soll nicht vergessen werden, die Rechtschreibkorrektur hat durch die vielen kleinen Anmerkungen richtig Spaß gemacht. Als letztes und mit am Wichtigsten ist es mir, meinem Freund Stefan Kühm und meinen Eltern Danke zu sagen: *„Danke, Stefan für deine Geduld und deinen unendlichen Einsatz, wenn ich mal wieder verzweifelt am Computer saß und er nicht das machte, was ich wollte. Aber vor allen dafür, dass du mir immer Mut und Durchhaltevermögen zugesprochen hast, so mal wieder ein Versuch im Labor nicht klappte.“* Meinen Eltern danke ich, dafür, dass sie mir dieses alles ermöglichen und immer an mich glauben. *„Lieber Papa, jetzt habe ich nicht mehr geredet, und hier liegt das fertige Werk!“*

12 Lebenslauf

1. Persönliche Daten

Name: Stoltz
 Vorname: Anne Sarah
 Geb. am: 20.10.1980
 Geburtsort: Marburg

2. Schulbildung

1987 - 1991 Besuch der Grundschule in Höxter
 1991 - 2000 Besuch des König-Wilhelm-Gymnasiums in Höxter
 2000 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife

3. Studium

Oktober 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin
 an der Universität zu Lübeck
 September 2002 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
 August 2003 Erste Ärztliche Prüfung
 März 2006 Zweite Ärztliche Prüfung

4. Famulaturen

24.02. - 16.03.03 Innere, Kreiskrankenhaus Altdorf (Nürnberg)
 01.03. - 28.03.04 Onkologie, Universität zu Lübeck
 19.07. - 15.08.04 Kinder- und Jugendpsychiatrie Vorwerk, Lübeck
 23.08. - 13.09.04 Allgemeinmedizin, Grenzschutzschule Lübeck
 27.09. - 17.10.04 Allgemeinmedizin, Osnabrück
 25.07. - 07.08.04 Kinder- und Jugendpsychiatrie, Holzminden

5. Zeitlicher Rahmen der Dissertation

November 2003 Themenvergabe und Planung der Versuche
 Dezember-August 2003/04 Vorversuche
 August-November 2004 Hauptversuche
 November-September 2004/06 Schriftliche Auswertung und Abgabe

Anlage

Die Studie

Multizentrische, prospektive, klinische Phase II Studie zur Wirkung von Carboplatin und Gemcitabine mit Ganzkörperhyperthermie bei erwachsenen Patienten mit fortgeschrittenem, inoperablem Pankreaskarzinom (Universitätsklinikum Lübeck)

wurde am 26.07.2001 von Seiten der Ethikkommission der Kreiskliniken Traunstein-Trostberg GmbH genehmigt (siehe Seite 89).