

Aus der Frauenklinik Ibbenbüren
Klinikum Ibbenbüren
- Chefarzt: Privatdozent Dr. med. habil. C.M. Schlotter -

Der Einfluss der Bisphosphonate Zoledronat und Bondronat auf die Chemosensitivität beim primären Mammakarzinom und Korrelation mit klassischen und neueren prognostischen und prädiktiven Faktoren

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Neßler, Andreas
aus Bad Laer

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. R.J. Lelle

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. habil. C.M. Schlotter

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10.2008

Aus der Frauenklinik Ibbenbüren
Klinikum Ibbenbüren
- Chefarzt: Privatdozent Dr. med. habil. C.M. Schlotter -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. R.J. Lelle
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. habil. C.M. Schlotter

Zusammenfassung

Der Einfluss der Bisphosphonate Zoledronat und Bondronat auf die Chemosensitivität beim primären Mammakarzinom und Korrelation mit klassischen und neueren prognostischen und prädiktiven Faktoren

Andreas Neßler

In einer in-vitro Studie an 20 primär-invasiven Mammakarzinomen wurde der inhibitorische Effekt der Standardregime Cyclophosphamid/Metotrexat/5-Fluorouracil (CMF), Epirubicin/Cyclophosphamid (EC), Epirubicin/Paclitaxel (ET), Epirubicin/Docetaxel (EDoc) allein und in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat auf das Brusttumorstadium mit prognostischen und prädiktiven Faktoren des Mammakarzinoms verglichen, um mögliche Korrelationen aufzudecken.

Die Bestimmung der Chemosensitivität von CMF, EC, ET und EDoc allein und in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat erfolgte durch in-vitro Messungen mittels ATP-CVA (ATP-cell viability assay).

Dabei zeigten beide Bisphosphonate (Zoledronat, Bondronat) zusammen mit beiden Taxanen (Taxol, Taxotere) die höchsten AUC-Werte (area under the curve), jedoch sind die Unterschiede bei CMF und EC zwischen alleiniger Chemotherapie und der Kombinationsbehandlung in den AUC-Werten am größten.

Auch im Niedrigdosisbereich der Chemotherapeutika (25-6,25%), bei gleicher Dosierung von Zoledronat und Bondronat, zeigt sich der verstärkende Effekt der Bisphosphonate deutlich. Ferner lässt sich der verstärkende inhibitorische Effekt der Bisphosphonate auch bei der Betrachtung der prognostischen und prädiktiven Faktoren häufig nachweisen.

Das in der Klinik beobachtete bessere Ansprechen der Chemotherapie bei G 3-Karzinomen, negativen Hormonrezeptoren (ER-, PR-) und HER2-Überexpression ließ sich bei den vorliegenden in-vitro Untersuchungen, unter Verwendung immunhistochemisch bestimmter Faktoren (ER-, PR-, HER2) nicht bestätigen.

Datum der mündlichen Prüfung: 27.10.2008

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Mammakarzinom	1
1.1.1.	Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren	1
1.1.2.	Morphologie und Klassifikation	2
1.1.3.	Etablierte und neue therapierrelevante Prognosefaktoren	4
1.1.4.	Therapie des Mammakarzinoms	7
1.2.	Zelluläre Aspekte beim Mammakarzinom	9
1.2.1.	Zellzyklus	9
1.2.2.	Zytostatika	9
1.3.	Chemosensitivitätstestung am Tumormaterial	10
1.3.1.	Klonogene und nicht klonogene Tests	10
1.3.2.	Chemosensitivitätstestung mit dem ATP-TCA	11
1.4.	Bisphosphonate	13
1.4.1.	Chemie, Wirkung und Pharmakokinetik	13
1.4.2.	Indikationen der Bisphosphonate in der Onkologie	18
1.4.3.	Einsatz der Bisphosphonate beim Mammakarzinom	19
1.4.4.	Problemstellung	20
2.	Material und Methoden	21
2.1.	Untersuchtes Tumormaterial	21
2.2.	Tumoreigenschaften und histomorphologische Befunde	21
2.3.	ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay	35
2.3.1.	Testmethode	35

2.3.2.	Durchführung der Messung	35
3.	Ergebnisse	38
3.1.	ATP-CVA Befunde	38
3.2.	Korrelation der Werte der Chemosensitivitätstestung mit den klassischen und neueren prognostischen und prädiktiven Faktoren des Mammakarzinoms	50
3.2.1.	Korrelation mit den klassischen Faktoren	50
3.2.1.1.	Korrelation des T-Stadiums	58
3.2.1.2.	Korrelation des N-Stadiums	59
3.2.1.3.	Korrelation des histologischen Grading	60
3.2.1.4.	Korrelation mit dem Östrogenrezeptor (Immunhistochemie)	61
3.2.1.5.	Korrelation mit dem Progesteronrezeptor (Immunhistochemie)	62
3.2.1.6.	Korrelation mit Her-2 (Immunhistochemie)	63
3.2.2.	Korrelation der Chemosensitivität mit neueren prognostischen und prädiktiven Faktoren	64
3.2.2.1.	Korrelation mit den Hormonrezeptoren (PCR)	87
3.2.2.2.	Korrelation mit den Onkogenen (PCR)	90
3.2.2.3.	Korrelation mit der Proliferation und dem DNA-Index (Flow Cytometry)	94
3.2.2.4.	Korrelation mit den proteolytischen Enzymen (PCR)	99
4.	Diskussion	102
4.1.	Bondronat versus Knochenmetastasen	103
4.2.	Zoledronat versus Knochenmetastasen	104
4.3.	Bondronat und Zoledronat versus tumortoxischer Wirkung	104
5.	Zusammenfassung	115

6.	Literaturverzeichnis	117
7.	Anhang	131
7.1.	Verzeichnis der Abbildungen	131
7.2	Verzeichnis der Tabellen	134
7.3	Verzeichnis der Abkürzungen	138
8.	Danksagung	140
9	Lebenslauf	141

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Risikofaktoren

Etwa ein Viertel aller Verstorbenen in Deutschland, sind 1998 an Krebs gestorben: 108.800 Männer und 103.900 Frauen (Wolf, 2002). Dabei sind Brust- und Dickdarmkrebs bei den Frauen, sowie Lungen- und Prostatakrebs bei den Männern am häufigsten. Daten aus den USA belegen, dass Rauchen und Fehlernährung mit Übergewicht für je ein Drittel der Krebsfälle verantwortlich sind. Dagegen sind Umweltbelastungen und Strahlenexposition jeweils nur zu 2 % am Krebsgeschehen beteiligt.

Das Mammakarzinom, als bösartiger Tumor der weiblichen Brustdrüse, stellt in den Industrienationen die häufigste Krebserkrankung der Frau dar. Das kumulative Risiko einer Frau Brustkrebs zu entwickeln, beträgt 12%. Die Incidenz ist in allen Industrienationen weiter steigend (Robra, 1991), wobei in Deutschland von einer jährlichen Incidenz von 60 Fällen/100000 Frauen ausgegangen wird (2004 starben, lt. Statistischem Bundesamt Wiesbaden, 17590 Frauen in Deutschland an Brustkrebs). Etwa 25% der malignen Tumoren manifestieren sich bei Frauen ab dem 50. Lebensjahr. Der klinische Verlauf des Mammakarzinoms ist durch die frühzeitige Ausbildung von Fernmetastasen gekennzeichnet. Diese finden sich zu 80 % im Skelettsystem und zu 40-60 % in der Leber oder Lunge. Die mittlere Überlebenszeit nach Erstdiagnose eines metastasierenden Mammakarzinoms beträgt etwa 2 Jahre. Die klinischen Fakten sprechen für das heute bevorzugte Modell der überwiegend hämatogenen Ausbreitung des Mammakarzinoms im Organismus (Batson, 1981).

Wie generell bei malignen Erkrankungen, ist auch das Mammakarzinom als Folge der Einwirkung unterschiedlicher endogener und exogener Faktoren (Karzinogene) anzusehen. (Nagel et al., 1983). Obwohl die Ätiologie des Mammakarzinoms noch weitgehend unbekannt ist, folgt man in den letzten Jahren dem Modell der Mehrschritt-Karzinogenese bei der Entstehung maligner Tumoren (Olupade und Pichert, 2001; Ponder, 2001). 70-80% aller Erkrankungen treten bei Patientinnen ohne Risikofaktoren auf. Ein relativ erhöhtes Karzinomrisiko (2-3-fach) lässt sich für Frauen bei Brustkrebserkrankungen in der weiblichen Verwandtschaft ersten Grades feststellen. Bei der Verwendung oraler Kontrazeptiva über mehr als 10 Jahre, wird ein- bis zu vier-fach erhöhtes relatives Risiko angenommen (Bender und Schnürch, 1991). Ebenso wird eine frühere Bestrahlungsexpo-

sition als erhöhtes Risiko angesehen. Im Hinblick auf Ernährungs- und Lebensgewohnheiten, wird neben dem Zusammenhang zwischen erhöhtem Fettkonsum und dem Entstehungsrisiko für Mammakarzinome, auch ein erhöhter bzw. regelmäßiger Alkoholkonsum als Risikofaktor diskutiert (Carroll, 1975; Bergen und Caporaso, 1999). Bei Raucherinnen hat Brustkrebs eine signifikant schlechtere Prognose (Murin und Inciardi, 2001). Als genetische Veränderung können sowohl der Verlust oder die Mutation von Tumorsuppressorgenen, wie BRCA 1, BRCA 2 oder p53, wie auch eine Hyperexpression der Onkogene ein erhöhtes Risiko bedingen (Poremba, Simon et al., 1999). Eine atypische lobuläre duktale Hyperplasie ist im Sinne einer präneoplastischen Veränderung ebenfalls als Risikofaktor anzusehen (Dhingra et al., 1995).

1.1.2 Morphologie und Klassifikation

Beim Mammakarzinom handelt es sich definitionsgemäß um einen bösartigen, epithelialen Tumor, der seinen Ausgang entweder von den Epithelien der Milchgänge (ca.80%) oder dem der lobulären Drüsenendstücke nimmt (Bastert, 1990). Morphologisch stellt sich in ca. 70% der Fälle das Mammakarzinom als harter, indolenter, unscharf begrenzter Knoten in der Brust dar. Etwa 50% der Primärtumoren sind im oberen äußeren Quadranten lokalisiert.

Histologisch handelt es sich in den meisten Fällen um duktale oder lobuläre Karzinome (Riede und Schäfer, 1993). Die histologische Klassifizierung des Mammakarzinoms erfolgt nach den international anerkannten Empfehlungen des AFIP (Rosen und Obermann, 1992).

Die Tumorausbreitung erfolgt per continuitatem, in die Lymphknoten der jeweiligen Abflussgebiete als lymphogene, sowie in Knochen, Leber, Lunge und Hirn als hämatogene Metastasierung. Auch wenn ein Mammakarzinom in einem relativ frühen Entwicklungsstadium entdeckt wird, sterben immer noch ca.30% der Frauen an dieser, als Systemerkrankung aufzufassenden, Neoplasie (Dhingra et al., 1995).

Die Tumorklassifikationen erlauben die Einteilung von Tumorerkrankungen entsprechend verschiedener Entwicklungsstadien. Die TNM-Klassifikation ist ein internationales standardisiertes System zur Stadieneinteilung und Verlaufsdocumentation solider Tumoren, welches auf der graduierten Wiedergabe von Tumorgröße (T), Lymphknotenbefall (N) und Fernmetastasierung (M) basiert (Hermanek, Hutter, Sobin et al., 1999)

Stadieneinteilung nach dem TNM-System (UICC) (WHO, 1996)

- T Primärtumor
- TX Primärtumor nicht beurteilbar
- T0 kein Anhalt für Primärtumor
- Tis In-situ-Karzinom: intraduktales oder lobuläres Karzinom, M. Paget ohne nachweisbaren Tumor
- T1 Tumor \leq 2cm
- a Tumor \leq 0,5cm
 - b Tumor $>$ 0,5-1cm
 - c Tumor $>$ 1-2cm
- T1mic Ausdehnung jenseits der Basalmembran in das angrenzende Gewebe
- T2 Tumor $>$ 2cm \leq 5cm
- T3 Tumor $>$ 5cm
- T4 Infiltration von Haut oder Brustwand (d.h.Rippen, interkostale Muskeln und M.seratus ant., nicht jedoch die Pectoralismuskulatur)
- a Infiltration der Brustwand.
 - b Ödem/Peau d'Orange/Ulzeration/Haut-, Satellitenmetastasen, beschränkt auf die befallene Brust
 - c Vorliegen der Kriterien von 4a und 4b
 - d inflammatorisches Wachstum
- N Lymphknotenbefall
- NX Lymphknotenbefall nicht beurteilbar
- N0 Lymphknoten tumorfrei
- N1 verschiebliche ipsilaterale axilläre Lymphknoten
- a Mikrometastasen (\leq 0,2cm größter Durchmesser)
 - b jede Lymphknotenmetastase $>$ 0,2cm
 - I 1-3 befallene Lymphknoten \leq 2cm
 - II 3 befallene Lymphknoten \leq 2cm

III Kapseldurchbruch eines Lymphknotens mit $\leq 2\text{cm}$

- N2 untereinander oder mit anderen Strukturen fixierte ipsilaterale axilläre Lymphknoten
- N3 ipsilateraler Lymphknotenbefall entlang Art.Mammaria interna
- M Metastasierung
- MX Fernmetastasen nicht beurteilbar
- M0 keine Fernmetastasen
- M1 Fernmetastasen (schließt befallene supraklavikuläre ipsilaterale Lymphknoten ein)

Nach aktueller Auflage der UICC aus dem Jahr 2002 gilt folgende Ergänzung der allgemeinen Tumorklassifikation:

- C Diagnosesicherheit
- C1 Diagnosesicherung durch Standardverfahren (Röntgen, Endoskopie)
- C2 Diagnosesicherung durch spezielle Verfahren (MRT, CT, Nuklearmedizin, Biopsie)
- C3 Diagnosesicherung durch chirurgische Exploration mit Biopsie
- C4 Diagnosesicherung durch definitive Chirurgie und pathologische Untersuchung
- C5 Diagnosesicherung durch Autopsie

Das histologische Grading beurteilt den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes gemäß einer Einteilung in gut-, mäßig-, gering- und undifferenzierte Karzinome. Zur besseren zellulären Differenzierung des invasiven Mammakarzinoms, werden das zelluläre Grading nach den Vorschlägen von Bloom und Richardson (Bloom, Richardson, 1957) bzw. die Gradungskriterien, modifiziert nach Bässler (Bässler, 1998), empfohlen.

1.1.3 Etablierte und neue therapierelevante Prognosefaktoren

Grundlage einer individuellen Therapieplanung ist die Bestimmung und Analyse verschiedener etablierter Prognoseparameter. Prognosefaktoren erlauben eine individuelle Vorhersage für den von einer Therapie unbeeinflussten Krankheitsverlauf, das heißt, ohne Therapie spiegelt die Korrelation zwischen Prognosefaktor und Krankheitsverlauf den direkten Einfluß des Faktors auf die Tumoraggressivität wieder. Die im individuellen Fall einge-

setzten Therapien können diese Korrelation verändern. Von besonderer Bedeutung sind dabei Menopausenstatus, Lymphknotenbefall (Anzahl, Lokalisation und histologische Beurteilung der axillären Lymphknoten) Tumorgröße, Grading, Fernmetastasierung und Steroid-Rezeptorstatus. Als sogenannte „high risk“ Indikatoren unter den etablierten Prognosefaktoren gelten Prämenopausenstatus, eine Tumorgröße $\geq 2\text{cm}$, mehr als 3 befallene Lymphknoten und ein negativer Steroid-Rezeptorstatus. Als prognostisch günstig gelten das Fehlen von Metastasen und Lymphknotenbefall, sowie eine Tumorgröße von weniger als 1cm (Mc Guire et al., 1990; Gasparini et al., 1993). Die Prognose für invasiv, duktales und schlecht differenzierte G3 Karzinome ist ungünstig (Bastert, 1990). Die Analyse des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus erlaubt die Einteilung in rezeptornegative und rezeptorpositive Gruppen. Sowohl positiver Östrogenrezeptor (ER) als auch positiver Progesteronrezeptor (PR) gelten als prognostisch günstig hinsichtlich des Gesamtüberlebens. Auch wird eine bessere Ansprechrate auf eine Hormontherapie mit dem Anti-östrogen Tamoxifen beschrieben (Harris et al., 1993). Neuere Daten deuten darauf hin, dass Patientinnen mit hormonrezeptornegativen Tumoren signifikant besser auf eine primäre Chemotherapie ansprechen, als Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren (Gianni et al., 2002; Untch, Konecny, et al., 2002).

Etablierte klinische und histomorphologische Parameter für die Bestimmung von Prognosegruppen.

Konsensuskonferenzen von Onkologen, Gynäkologen und Radiologen haben zur Definition von Empfehlungen für die Bewertung der einzelnen Prognoseparameter geführt (Goldhirsch et al., 2001; v.Minckwitz et al., 2002)

minimales/niedriges Risiko

mittleres/hohes Risiko

axillärer Lymphknotenstatus negativ

axillärer Lymphknotenstatus positiv

Tumorgröße $< 2\text{cm}$

Tumorgröße $> 2\text{cm}$

Grading G1

Grading G2-3

ER-positiv und/oder PR-positiv

ER-negativ und PR-negativ

Alter > 35 Jahre

Alter < 35 Jahre

Übereinstimmend werden in den Consensus-Statements der AGO (Gravenbruch, 2002), St.Gallen (National Institutes of Health Consensus Development Panel, 2001), American Association of Clinical Oncology (ASCO, 1996) und EORTC Receptor and Biomarker Group (1995) folgende Prognosefaktoren zur routinemäßigen Bestimmung empfohlen: Tumorgröße, Nodalstatus, histologischer Typ, Grading und Steroidhormonrezeptorstatus. In den letzten Jahren wurden weitere, neue Parameter definiert, die die individuelle Prognose der Mammakarzinompatientin wesentlich beeinflussen bzw. zusätzliche Informationen, ergänzend zu den etablierten histomorphologischen Vorhersagekriterien, bezüglich des Tumorverhaltens und der Progression liefern. Diese berücksichtigen morphologische, biochemische, zellkinetische und genetische Aspekte. Voraussetzung für die Anerkennung eines neuen Parameters ist, dass seine prognostische Relevanz statistisch einwandfrei und reproduzierbar in unabhängigen, prospektiven Studien belegt werden kann (Harbeck et al., 2003). Beispiele dafür sind die Bestimmung der proteolytischen Enzyme, wie Urokinase-Plasminogenaktivator (uPA) und Plasminogenaktivator-Inhibitor (PAI), der Proliferation (Bestimmung der G0/G1-Phase, der S-Phase und der G2/M-Phase), des Ploidie-Status sowie Veränderungen in der Expression der Onkogene. So deuten beispielsweise Aneuploidie, eine erhöhte S-Phase und Amplifikation der Onkogene auf eine ungünstige Prognose hin (Schlotter et al., 1996).

Beim primären Mammakarzinom deuten die klinischen Studiendaten darauf hin, dass Hochrisikopatientinnen mit erhöhtem uPA und uPA-1 im Primärtumor, von einer adjuvanten systemischen Therapie profitieren (Harbeck et al., 2002).

Auf der Konsensuskonferenz St. Gallen 1995 wurde der Lymphknotenstatus auch heute noch als der wichtigste Prognosefaktor beim Mammakarzinom angesehen.

Klassische und neuere Prognosefaktoren von klinischer Relevanz

<u>Klassische Prognosefaktoren</u>	<u>Neuere Prognosefaktoren</u>
TNM-Status	Proliferation und Ploidie
Tumorgröße	S-Phase, Ploidie
axillärer Lymphknotenbefall	Ki-67-Antigen, PCNA
Metastasierung	EGF-Rezeptor
Morphologie	Tu-Zellnachweis im Knochenmark
Grading (GI-GIII)	
histologischer Typ	
vaskuläre Invasion	Onkogene/Supressorgene
	HER-2/neu(erb-B2)-
	Onkoprotein
	p 53
Lymphangiosis	erb-B3, C-myc, TGF-
Steroidhormonrezeptor	alpha, TGF-beta
Östrogenrezeptoren	
Progesteronrezeptoren	
Menopausenalter	Invasion u. Metastasierung

1.1.4 Therapie des Mammakarzinoms

Auf Grund der Unterschiede bezüglich klinischen Verlauf, Therapieindikation und Prognose müssen prinzipiell in-situ Karzinome und invasive Tumore unterschieden werden. Die Therapieplanung bei in-situ Karzinomen ist abhängig vom histologischen Typ (duktales oder lobuläres Karzinom). Die optimale Therapie ist jedoch bis heute für keine der Patientengruppen endgültig definiert.

Grundlage für die Wahl der geeigneten Therapieverfahren bei invasiven Karzinomen, bildet die Risikoeinstufung mit Hilfe des axillären Lymphknotenstatus, der Tumorgröße, des Tumorgradings, der Hormonrezeptorstatus und des Alters der Patientin. Als Primärtherapie des Mammakarzinoms kommt die komplette chirurgische Entfernung des

Tumors durch Mastektomie zur Anwendung. Da jedoch das Mammakarzinom als systemische Erkrankung aufzufassen ist, kommt es damit nur selten zu einer Heilung der Tumorerkrankung. Je nach Tumorstadium und Alter der Patientin ist zwischen einer radikalen Operationsmethode und brusterhaltener Tumorextirpation, kombiniert mit eingeschränkter axillärer Lymphknotendissektion und nachfolgender Bestrahlung zu wählen (Fischer und Bauer, 1985).

Nahezu alle Patientinnen in den Tumorstadien I und II werden heute mit einer systemischen adjuvanten Chemo- oder Hormontherapie behandelt (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, 1992).

Hauptindikation für eine Chemotherapie sind nodalpositive, hormonrezeptornegative Mammakarzinome mit einer hohen Tumormasse, Organmetastasen und einer raschen Progredienz. Die Intensität der Chemotherapie richtet sich nach der Dynamik der Erkrankung.

Zu den am häufigsten angewandten Zytostatika gehören Cyclophosphamid/Metotrexat/5-Fluorouracil und Epirubicin, wobei sich die Kombination mehrerer Substanzen im Sinne einer Polychemotherapie als günstiger erwiesen hat (Schnürch, 1991).

Eine Hormontherapie ist weniger toxisch als eine Chemotherapie und wird deshalb in der Regel bei Patientinnen mit günstigen Prognosekriterien zuerst eingesetzt. Durch die Ausbildung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, ist das Mammakarzinom durch verschiedene hormonelle Manipulationen kontrollierbar. Als günstige Voraussetzung wird das Vorliegen eines positiven Hormonrezeptorstatus gefordert - rund 1/3 aller Patientinnen (etwa 2/3 der Patientinnen mit hormonrezeptorpositiven Tumoren) sprechen auf eine Hormontherapie an. Mit steigendem Rezeptorgehalt steigen auch die Ansprechraten auf eine hormonelle Therapie. Zur Verfügung stehen das Antiöstrogen Tamoxifen, Substanz erster Wahl bei postmenopausalen Patientinnen, Aromatasehemmer wie Anastrozol, Exemestan, Letrozol oder Formestan, GnRH-(Gonadotropin Releasing Hormone) Analoga (hauptsächlich bei prämenopausalen Patientinnen) und Gestagenpräparate wie Medroxyprogesteronacetat oder Megestrolacetat (Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group, 1992).

1.2 Zelluläre Aspekte beim Mammakarzinom

1.2.1 Zellzyklus

Jede Zelle hat die Eigenschaft sich zu teilen. Während die gesunde Zelle ihrem Gewebe zugeordnet bleibt, wächst der maligne Tumor unkontrolliert, sprengt die vorgegebenen Gewebegrenzen und dringt zerstörerisch in benachbartes Gewebe und Organe ein (Mutschler et al., 2001). Zudem ist beim Tumorwachstum das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und gesteuertem Zelltod (Apoptose) gestört, das heißt die Apoptose ist meistens vermindert. Bei der Zellteilung wird die genetische Information während der Interphase zwischen zwei Mitosen des Zellzyklus verdoppelt (Kunick, Lemcke, 2002). In der G1-Phase werden hauptsächlich Proteine und Ribonukleinsäuren synthetisiert. Am Ende der G1-Phase durchläuft der Zellzyklus den ersten Restriktionspunkt, das heißt es entscheidet sich, ob die Zelle sich teilt oder in eine Ruhephase (G0-Phase) übergeht. Aus der G0-Phase kann die Zelle – mitunter erst nach sehr langer Zeit – in die G1-Phase zurückkehren. Wird am Restriktionspunkt auf Zellteilung entschieden, schließt sich die S-Phase an, in der die Desoxyribonukleinsäure, als Voraussetzung der Chromosomenverdopplung, synthetisiert wird. Aus der G2-Phase, wo die Chromosomen bereits getrennt als Chromatiden vorliegen, tritt die Zelle nach Durchlaufen des zweiten Restriktionspunktes in die Mitose und teilt sich in zwei Tochterzellen, mit identischem Chromosomensatz.

Bei soliden Tumoren ruhen oft etwa 90 % der Zellen in der G0-Phase, in der Zytostatika nicht oder nur sehr schwach wirken. Ein Zellzyklus dauert im Mittel 48 Stunden. Es gibt jedoch Zellen, die sich schnell (in etwa 15 Stunden) und sehr langsam (120 Stunden) teilen, was für die Inkubationszeiten von in-vitro Tests wie dem ATP-CVA bedeutsam ist.

1.2.2. Zytostatika

Zytostatika lassen sich in vielen Fällen nicht eindeutig nur einer bestimmten Phase des Zellzyklus zuordnen. Beispielsweise hemmt 5-Fluorouracil als 5-Flour-2-desoxyuridinmonophosphat die Thymidinsynthese und zudem wird dieses Desoxyuridin-Derivat in die RNA als falscher Basenbaustein eingebaut. Schließlich induziert Fluorouracil durch Wechselwirkung mit dem FAS-Rezeptor die Apoptose (Mutschler et al., 2001).

Alkylantien wirken phasenunabhängig, durch elektrophile Reaktion mit Proteinen und der fertigen DNA-Kette, zum Beispiel mit der 4-Aminogruppe des Cytidins oder durch Strang-

verknüpfungen (cross linking) bevorzugt über N-7 der Guanosindiphosphat-Inkrementen zweier benachbarter DNA-Stränge (Roth, Fenner, 2000).

Wenn die DNA-Stränge nicht mehr getrennt werden können, können sie in der G2-Phase nicht als Chromatiden vorliegen. Da verknüpfte DNA-Stränge nicht translatiert werden können, kann die genetische Information nicht auf die Tochterzelle übertragen werden, die Zelle stirbt.

Ohne medikamentösen Eingriff hat die Krebszelle den Vorteil der Immortalität. Bei gesunden Zellen stehen an den Enden der Chromosomen lange Ketten aus sich wiederholenden TTAGGG-Nucleotiden, den Telomeren. Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere, ein Zeichen der Zellalterung. In den Tumorzellen verhindert das Enzym Telomerase den Abbau der Telomere.

Die individuell unterschiedliche Biologie von Tumoren eines histopathologischen Typs, wirft bei der Auswahl eines Zytostatikums oder einer Wirkstoffkombination oft Probleme auf. Innerhalb einer Entität gibt es Tumoren mit niedriger und hoher Proliferationsrate, schwach oder stark ausgeprägter Invasivität, sowie langsamer oder rascher Disseminierung. Es ist bekannt, dass immer nur ein bestimmter Teil der Patienten, trotz desselben Tumortyps, auf anerkannte Standardtherapien ansprechen. Derzeit basiert die Wahl einer Chemotherapie nicht auf individualisierten in-vitro-Sensitivitätstests, sondern auf Ansprechraten in klinischen Studien (Konecny et al., 2000). Angestrebt wird dagegen eine individualisierte Chemotherapie, die auf Untersuchungen des operativ entnommenen Tumorgewebes beruht und zu einer voraussagbaren, erfolgreichen Chemotherapie führen soll. Adlard et al. sprechen von „predictive-factor testing (which) could allow selection of regimes from which individual patients would benefit.“(Adlard et al., 2002).

1.3. Chemosensitivitätstestung am Tumormaterial

1.3.1. klonogene und nicht klonogene Tests

Die Tests zur Bestimmung der in-vitro Wirksamkeit folgen zwei verschiedenen Ansätzen. Zum einen der Forderung eine definierte Zellpopulation (Klone) zu gewinnen, die auf ihre Eigenschaften, bezüglich Sensitivität und Resistenz gegen Zytostatika, untersucht wird. Viele Methoden wurden seit den sechziger Jahren zur individualisierten Testung der Empfindlichkeit und Resistenz von Tumorzellen entwickelt. Der Clonogenic Assay wurde erstmals 1977 beschrieben (Hamburger, Salmon, 1977). Bei klonogenen Tests werden genetisch einheitliche Zellen, also Zellen einer für das Tumorgeschehen als wesentlich erachteten Zelllinie, prätherapeutisch auf ihre Sensitivität gegenüber Zytostatika und ihren

Kombinationen untersucht. Dazu werden die Zellen einzeln auf einen Nährboden aufgebracht. Die Nachkommen jeder Zelle bilden eine Zelllinie und müssen genetisch identisch sein (Klone). Ein zugesetztes Zytostatikum oder eine Kombination wirkt nur gegen diese eine Zelllinie. Werden nicht alle Zellen in ihrem Wachstum gehemmt, werden diese Zellen erneut untersucht, um die Ursache des Nichtansprechens zu finden. Klonogene Tests erfassen also nur Wachstum, das heißt sich teilende Zellen. Da Zellen sich oft und lange in der G₀-Phase befinden, in der sie nicht wachsen, bedeutet Nichtwachstum auch das Nichtabsterben der Zelle.

Clonogenic Assays wurden aus der Vorstellung heraus entwickelt, dass Tumoren monoklonalen oder oligoklonalen Ursprungs sind und das daher eine Unterbrechung des Klons am ehesten einen Schluß auf das Sensitivitäts-bzw. Resistenzverhalten erlaubt. Solche Verfahren leiden allerdings unter der Schwierigkeit, innerhalb angemessener Zeit Klone aus dem ursprünglichem Tumormaterial zu gewinnen (Kurbacher et al., 2000),

In den letzten Jahren wurden nicht-klonogene Assays entwickelt. Bei einem „Non clonogenic assay“, folgt man der Vorstellung, dass er das Verhalten des gesamten Tumors optimal wiedergibt. Nicht-klonogene Tests untersuchen nicht die DNA, sondern die Proteine (Cree, Kurbacher, 1997; Andreotti, 1995). Sie sind bei den meisten Tumoren einsetzbar und messen sowohl die Lebensfähigkeit als auch das Wachstum der Zelle. Technisches Problem ist dabei das Mitwachsen von Nichttumorzellen und die begrenzte Möglichkeit viele Zytostatika und/oder Kombinationen zu prüfen. Nicht klonogene Tests gewinnen an Bedeutung, weil nicht genetisch einheitliche Zelllinien, sondern die phänotypische Heterogenität des Tumors in seiner Gesamtheit untersucht wird. Es wird also nicht auf Zellteilung, sondern auf Viabilität der Zellen geprüft.

Zu den nicht-klonogenen Assays zählt unter anderem der ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay (ATP-TCA), der bei soliden Tumoren eingesetzt wird. Bei seiner Entwicklung wurde besonders die Problematik der einfachen, reproduzierbaren, im Routinelabor ausführbaren Methodik, der zuverlässigen Inhibition des Wachstums von Stromazellen, der geringen Intra-und Interassay-Variationen und einer hohen Korrelation zu klinischen Verläufen berücksichtigt (Andreotti et al., 1995).

1.3.2. Chemosensitivitätstestung mit dem ATP-TCA

Mit dem ATP-TCA steht ein System zur Verfügung, das auf der Messung des zellulären ATP's beruht und damit indirekt den Energieladezustand der Zelle bestimmt. Der ATP-

Gehalt der Zelle sinkt mit dem Erreichen des statischen Zustands dramatisch und fällt bei Zelltod auf Null (lysosomale Phase).

Für den ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay benötigt man eine 1 bis 2×10^6 Tumorzellen enthaltene Probe, die bei einer kurativen Operation oder einer Biopsie entnommen wird. Diese Probe wird durch ein Tumordissoziations-Enzymreagenz in Einzelzellen zerlegt. Nach Zentrifugieren wird der Überstand mit der Gesamtheit der Einzelzellen durch Trypanblaufärbung auf Vitalität geprüft (Eisenbrand, Metzler, 1994). Trypanblau ist ein zweifacher Azofarbstoff aus 3,3'-Dimethylbenzidin und zwei Molekülen 8-Amino-1-hydroxynaphtalin-3,6-disulfonsäure, jeweils als Natriumsalz, der zur Vitalitätsprüfung von Zellen gebraucht wird. Bei toten Zellen lässt sich das Zytoplasma sofort diffus anfärben, da die Membran durchlässig geworden ist, während lebende Zellen den Farbstoff nicht sofort aufnehmen.

Für einen aussagekräftigen Test sollen mindestens 60 Prozent der Zellen, besser 80 bis über 90 Prozent, lebendig sein. Diese Zellen werden, neben Leerproben und zwei Kontrollen mit maximaler Zellwachstumshemmung, in Dreifachproben mit Zytostatika (Einzelsubstanzen oder Kombinationen) 6 bis 7 Tage bei 5 Prozent CO_2 , 37°C , und über 95 Prozent Luftfeuchtigkeit inkubiert. Ein Selektivmedium lässt nur Tumorzellen wachsen, während nicht-neoplastische Zellen sterben (sie würden beim nachfolgenden luminometrischen Test durch ihre ATP-Produktion das Resultat verfälschen). Diese vergleichsweise lange Inkubationszeit bietet den Vorteil, dass sich die Zellen mit somatischen und parakrinen Einflüssen, wie im Organismus des Patienten, ins Gleichgewicht setzen und eventuell Resistenzen entwickeln können. Für den Patienten ist die lange Inkubation kein Nachteil, da im Allgemeinen erst die Wundheilung nach einer Operation abgeschlossen sein muß, bevor die Chemotherapie beginnt. Allerdings müssen Metabolisierung und Pharmakokinetik der Wirkstoffe bei der Berechnung der den Zellen zugesetzten Zytostatika-Konzentrationen berücksichtigt werden (Neale et al., 2001). Im Anschluss an die Inkubation wird beim ATP-TCA die Stoffwechselaktivität der Zellpopulation gemessen. Der Gehalt an Adenosintriphosphat ist ein quantitatives Maß für das Stoffwechselgeschehen der Zelle und wird luminometrisch erfasst. Der Leuchtstoff 4,5-Dihydro-(6-hydroxy-2-benzothiazolyl)thiazol-4-carbonsäure wird durch das Enzym Luciferase unter Verbrauch von ATP in das gemischte Anhydrid mit Adenosinmonophosphat (AMP) überführt (Römpp, 1995). An der jetzt aziden 2-Position können ein Proton und ein Elektron oxidativ abgespalten werden, das vom Sauerstoff aufgenommen wird. Dabei entsteht ein Superoxid-Radikalanion. Durch Addition der beiden radikalischen Spezies entsteht ein Hydroperoxid-

Anion. Intramolekulare Dioxetan-Bildung und Verlust von CO₂ und Adenosinmonophosphat führen zum Triplettzustand des 4,5-Dihydro-2-(6-hydroxy-2-benzothiazolyl)thiazol-4-carbons, das unter Energieabgabe als grün-gelbes Licht in den Grundzustand fällt und enolisiert (Beyer, Walter, 2000).

Von entscheidender Bedeutung ist die Tatsache, dass die „Lichtmenge“ direkt proportional zur ATP-Produktion des Zellgemisches und damit dessen Stoffwechselaktivität ist. Somit lässt sich durch eine einfache photometrische Messung feststellen, ob und in welchem Ausmaß die Tumorzellen durch das/die Zytostatika geschädigt wurden (Kurbacher et al., 2000). Die prätherapeutische Sensitivitätstestung mit dem ATP-TCA stellt ein attraktives therapeutisches Konzept dar (Cree, Kurbacher, 1999).

Je genauer heute molekulare, das heißt genetische und phänomenologische, Unterschiede zur Differenzialdiagnose herangezogen werden, um so dringlicher wird die Forderung, einen Tumor nicht nur spezifisch zu diagnostizieren, sondern auch spezifisch zu therapieren. Prädiktive Tests wie der ATP-TCA, die von Bedingungen ausgehen, die dem Tumor im Patienten mit den vielfältigen Zell-Zell-Wechselwirkungen weitgehend entsprechen, können dieser Forderung nahe kommen.

1.4. Bisphosphonate

1.4.1. Chemie, Wirkung und Pharmakokinetik

Bisphosphonate sind eine Gruppe osteotroper Medikamente, die in den letzten 25 Jahren für diagnostische und therapeutische Zwecke bei verschiedenen Knochen- und Kalziumstoffwechselkrankheiten entwickelt wurden. Elidronsäure, als erster Vertreter der Bisphosphonate, wurde mit Erfolg bei der Behandlung des Morbus Paget eingesetzt. Erst die Entwicklung neuerer, potenterer und vor allem intravenös applizierbarer Bisphosphonate, ermöglichte eine breitere Anwendung dieser Substanzgruppe auch in der Hämatologie und Onkologie, insbesondere bei malignen Erkrankungen die mit einer Skelettdestruktion einhergehen (Bartl, Frisch, 1993; Bijvoet, Fleisch, et al., 1995; Hofbauer et al., 1997; Fleisch, 2000). Als klinische Einsatzgebiete haben sich bei den Bisphosphonaten Malignom-bedingte Osteolysen, Hyperkalzämien, besonders bei Hyperparathyroidismus, der Morbus Paget und die Behandlung der Osteoporose bewährt (Hubner, Houston, 2005; Miller, 2005)

Chemisch handelt es sich um Analoga des Pyrophosphats, bei denen der Sauerstoff der P-O-P-Bindung durch Kohlenstoff ersetzt wird (P-C-P-Bindung) (Fleisch, 2000). Dies macht sie resistent gegenüber einer enzymatischen Hydrolyse (Fleisch, 2000; Lin, 1996). Durch Substitution der beiden Hydrogen-Atome auf dem C-Atom ist es möglich, verschiedene Bisphosphonate zu synthetisieren (Adami, Zamberlan, 1996) (Abb. 1).

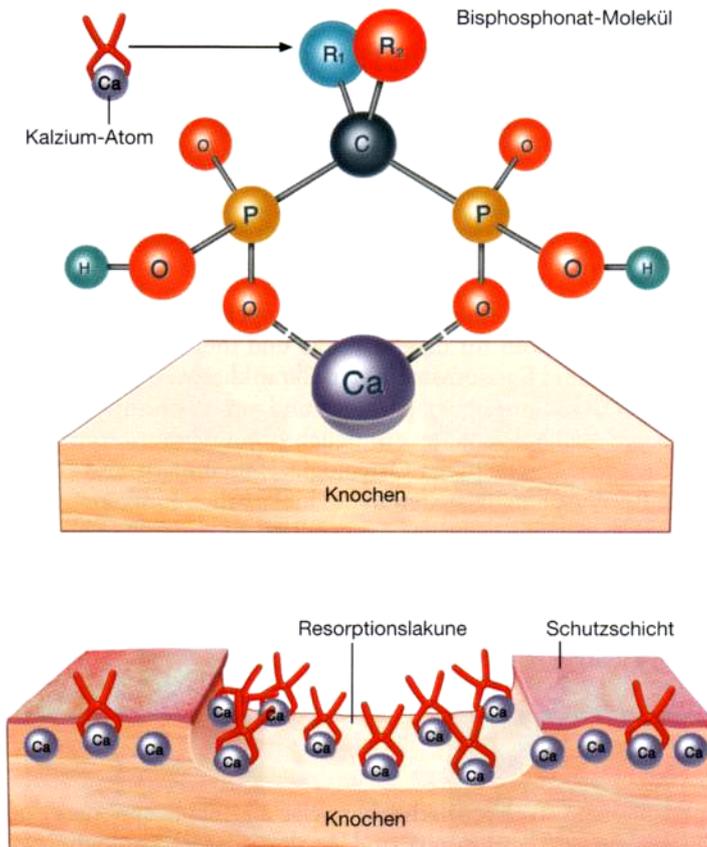


Abb. 1: Molekulare Struktur der Bisphosphonate (aus Bartel R., Frisch B.: Das Bisphosphonat-Manual, 2001)

Klinisch wirken Bisphosphonate fast ausschließlich am Knochen (Rogers et al., 2004). Die Ursache liegt in der hohen Affinität der Bisphosphonate zu Strukturen der Knochenoberfläche, vor allem im Bereich der Resorptionslakunen, zwischen den Osteoklasten und der erodierten Knochenoberfläche. Das führt zu einer wirksamen Hemmung der Osteoklasten mit Verminderung der Knochenresorption, zu einer Reaktivierung der supprimierten Osteoblasten und damit insgesamt zu einer positiven Bilanz der Knochenmasse (Rodan, Fleisch, 1996).

Auch wenn die Wirkungsmechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, so sind doch folgende experimentell nachgewiesen (Rodan, 1998):

- Verminderte Auflösbarkeit der Knochensubstanz und Veränderungen des Mineralisationsprozesses, durch Einbau der Bisphosphonate in die Hydroxyapatit-kristalle und Knochenmatrix,
- Verminderte Rekrutierung und Fusionierung der Osteoklastenvorläufer (Einwirkung auf das Monozyten-Makrophagen-System),
- Hemmung der Osteoklastenaktivität, insbesondere durch Hemmung der Protonen-ATPase (direkter toxischer Effekt),
- Hemmung der Enzyme des Mevalonsäure-Zyklus durch die Aminobisphosphonate (Luckmann et al., 1998)
- Verkürzung der osteoklasteren Lebensdauer, durch Induktion der Apoptose, wahrscheinlich verbunden, mit einer Verlängerung der osteoblasteren Lebensdauer,
- indirekte Wirkung über die Osteoblasten, die über Hemmfaktoren die osteoklastere Knochenresorption inhibieren (Interaktionen im „coupling“ des Osteoblasten-Osteoklasten-Systems),
- Steigerung der osteoblasteren Synthese von Kollagen Typ 1,
- Hemmung der Produktion von Prostaglandin E₂, von proteolytischen Enzymen, Interleukin-1, Interleukin-6 und anderer Zytokine (Savage, 1996),
- Hemmung der Adhäsion der Tumorzellen an der Knochenoberfläche (Boissier, Magnetto, et al., 1997; Busch et al., 1998; Pluijmet et al., 1996),
- Beeinflussung afferenter Nervenfasern im Knochen, mit Hemmung der Freisetzung von Neuropeptiden und Neuromodulatoren an den Nervenendigungen (Yoneda, Sasaki et al., 1997) (Abb.2).

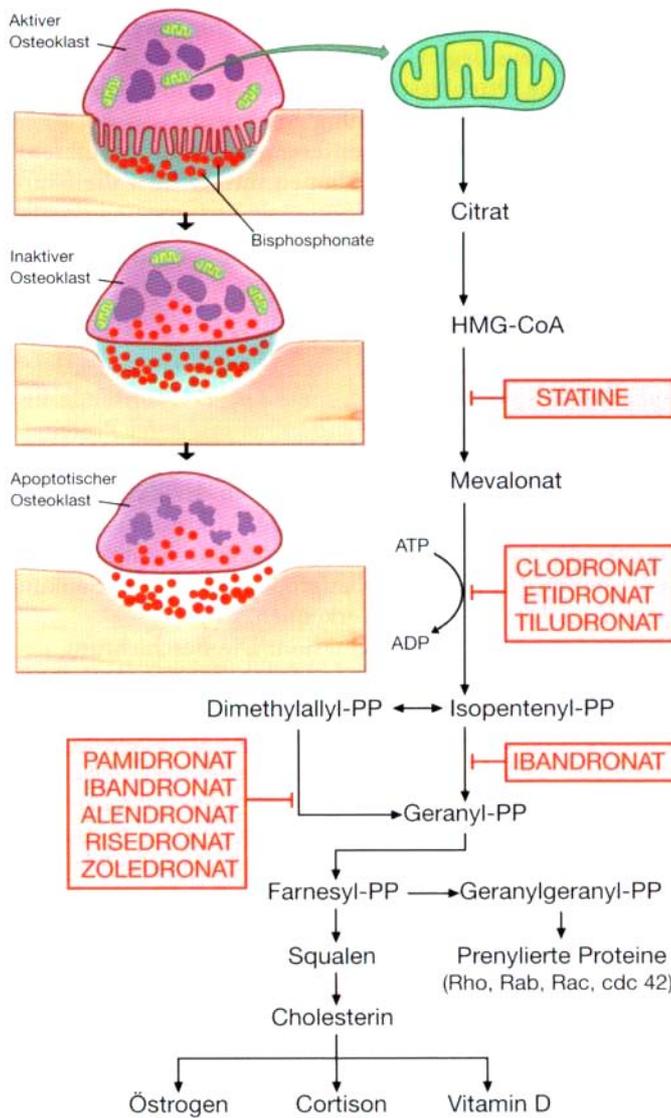


Abb.2: Zelluläre und biochemische Wirkungsmechanismen stickstoffhaltiger Bisphosphonate (aus Bartl R., Frisch B.: Das Bisphosphonat-Manual, 2001)

Laborchemisch führt die Osteoklastenhemmung zur verminderten Ausscheidung von Abbauprodukten des Kollagens im Urin und bei Vorliegen einer Hyperkalzämie zur Senkung des Serum-Kalziumspiegels. Über einen längeren Zeitraum bewirkt die Hemmung der Resorption eine positive Kalziumbilanz mit kontinuierlicher Erhöhung der Knochenmasse, hauptsächlich des trabekulären Knochen mit seiner großen Oberfläche (Rodan, 1998).

Die Interaktionen der Tumorzellen mit Gefäßsystem, Immunsystem, Knochenmark, Knochen und Stroma sind in Abbildung 3 zusammengefaßt. Neuere Untersuchungen belegen einen antiproliferativen Effekt der Bisphosphonate auf das Tumorwachstum. Die

Osteoklastenhemmung führt zu einer verminderten Produktion von IL-6 und zu einer verminderten Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus der Knochenmatrix. Bei Patienten mit Knochenmetastasen oder auch mit einem multiplen Myelom kommt es durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität zur fortlaufenden Knochendestruktion. Typische Folgeerscheinungen betroffener Patienten sind Schmerzen, pathologische Frakturen, Spinalkanalkompressionen und eine Hyperkalzämie (Hortobadyi et al., 1998). Die klassischen Symptome eines solchen Hyperkalzämie-Syndroms reichen von Benommenheit und Lethargie über Verstopfung, Übelkeit, Erbrechen bis hin zu Herzrhythmusstörungen und Nierenversagen (Wenzel et al., 2004)

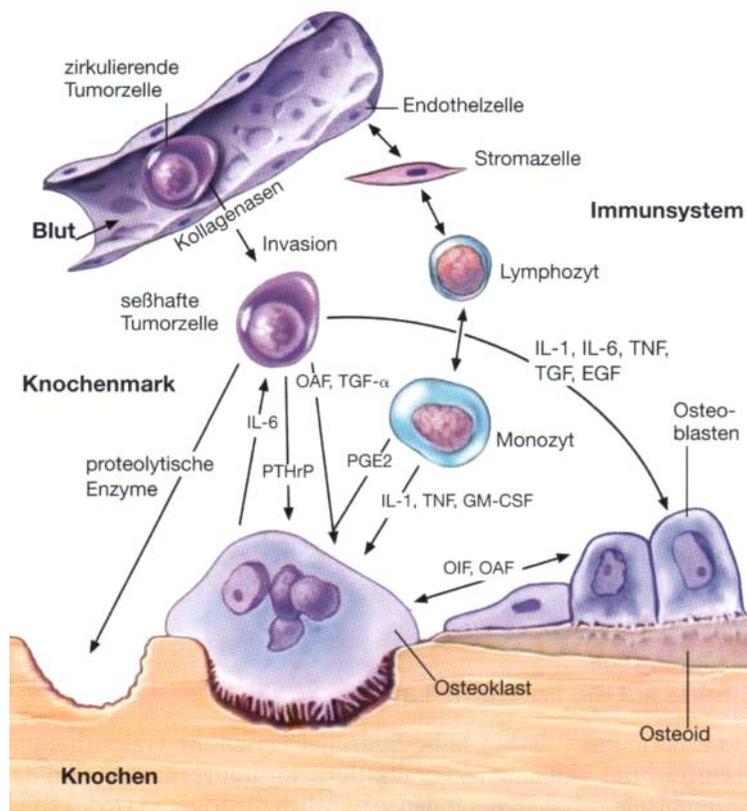


Abb.3: Interaktionen zwischen Tumor, Gefäßen, Knochenmark, Knochen, Stroma und Immunsystem (aus Bartel R., Frisch B.: Das Bisphosphonat-Manual, 2001)

Im Jahre 2003 wurde erstmalig über einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Bisphosphonattherapie und einer in der Folge auftretenden Osteonekrose, wobei ausschließlich der Kieferknochen befallen zu sein scheint, berichtet (Marx, 2003).

Pathogenetisch schrieben Marx und Migliorati (Marx, 2003; Marx, Stern, 2003; Migliorati, 2003) diese Osteonekrose einer Inhibition der endothelialen Zellen zu. Die Reduk-

tion der endothelialen Zellproliferation und die Stimulierung von Apoptosereaktionen durch Bisphosphonate, wurden in experimentellen Arbeiten nachgewiesen (Fournier et al., 2002; Wood et al., 2002)

Der Einfluss des Sistierens intravenöser oder auch oraler Bisphosphonatgaben auf die Therapieresultate bei manifester Osteonekrose wird als eher fraglich und ungewiss beschrieben (Migliorati et al., 2005).

1.4.2. Indikationen der Bisphosphonate in der Onkologie

Bei ungefähr 800.000 Frauen weltweit, wird jährlich Brustkrebs diagnostiziert (Parkin et al., 1999). Ungefähr 30 Prozent (70 Prozent bei Patientinnen mit Metastasen) von ihnen entwickeln Knochenmetastasen (Wilson, 1981). Bei ca. 60 Prozent dieser Patientinnen treten im Median von 11 Monaten nach Diagnosestellung pathologische Frakturen auf (Hortobagy, 1991).

Aus der lokalen und/oder generalisierten Skelettdestruktion ergeben sich die wichtigsten Indikationen für den Einsatz von Bisphosphonaten bei Tumorpatienten:

- Tumorbedingter Knochenschmerz
- Tumorbedingte Hyperkalzämie
- Therapie der Osteolysen und frakturgefährdeter Skelettareale infolge Osteoporose
- Prävention tumorbedingter Skelettdestruktion („Osteoprotektion“)
- Beeinflussung der Entstehung ossärer und viszeraler Metastasen
- Hemmung des Tumorwachstums im Knochen

Die Hyperkalzämie ist die häufigste Komplikation bei Knochenmetastasen und betrifft in etwa 20-40 Prozent Patientinnen mit fortgeschrittenem Krebs (Mundy, 1999; Coleman, 2002; Clezardin, 2002; Saad, Gleason, Murray, 2002).

Knochenschmerz ist das häufigste Symptom bei Patienten mit ossären Metastasen. Mehr als die Hälfte der betroffenen Patientinnen klagen bereits zum Zeitpunkt der Diagnose von Metastasen über Knochenschmerz, der im weiteren Verlauf ein konstantes und an Intensität zunehmendes Symptom bleibt. (Diener, 1996; Paterson, 1997; Strang, 1996).

Bisphosphonate normalisieren den Kalziumspiegel im Serum und reduzieren so das Auftreten skeletaler Metastasen. Somit sind sie zu einem integralen Bestandteil in der heutigen Therapie skeletaler Metastasen geworden (Major et al., 2001; Jagdev, Coleman, Shipman et al., 2001; Rosen et al., 2001; Saad et al., 2002).

1.4.3. Einsatz der Bisphosphonate beim Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist der häufigste Tumor der Frau und befällt jede zehnte Frau, bei einer Letalität von 30 Prozent und einer ossären Metastasierung im fortgeschrittenen Stadium von 85 Prozent. Haupttodesursache sind Fernmetastasen, wobei das Skelett (> 80 Prozent), die Leber (60 Prozent) und die Lunge (60 Prozent) am häufigsten eine Metastasierung aufweisen. Die durchschnittliche Überlebenszeit nach Auftreten von ossären Metastasen beträgt etwa 2-3 Jahre (Parkin, Pisani, Ferlay, 1999). Es wird geschätzt, dass jährlich etwa 22.000 Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom in Deutschland wegen Knochenmetastasen behandelt werden müssen.

Zytologische Untersuchungen des Blutes und des Knochenmarkes haben gezeigt, dass bei etwa jeder zweiten Frau mit Mammakarzinom bereits vor der Primäroperation eine Streuung der Tumorzellen stattgefunden hat. Mit diesem Tumorzellnachweis liegt eine primär-systemische Erkrankung mit Potenz zur Metastasenentwicklung vor. Man nimmt an, dass zumindest jedes aggressive Mammakarzinom (histologisch Grading G3 und G4) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits gestreut hat (Bartl und Frisch, 2001).

Zahlreiche Tierversuche und klinische Studien bei Patientinnen mit Mammakarzinom zeigen den präventiven Effekt der Bisphosphonate im Hinblick auf eine spätere Knochenmarkmetastasierung. In einer von Powles et al durchgeführten Phase-III-Studie (n = 1079) wurden Patientinnen nach adjuvanter Standardtherapie zu einer 2-jährigen Therapie mit Clodronat oder einem Placebo randomisiert. Unter der 2-jährigen Clodronattherapie konnte eine signifikante Reduktion ossärer Metastasen nachgewiesen werden. Nach der medianen Gesamtbeobachtungszeit von 5 Jahren, bestand allerdings kein Unterschied mehr im Auftreten ossärer Metastasen zwischen Patientinnen mit Therapie oder Placebo. Das Gesamtüberleben war jedoch bei den mit Clodronat behandelten Patientinnen nach 5 Jahren besser (Powles, Paterson, Kanis et al., 2002).

In einer Studie von Diel et al (n = 302) wurden Patientinnen mit positiver Knochenmarkzytologie, zusätzlich zu den geltenden Standardtherapien, zu einer 2-jährigen Clodronatbehandlung oder einem Placebo randomisiert. In einer ersten Analyse zeigten sich im Clodronatarm signifikant weniger ossäre, wie auch viszerale Metastasen und das Überleben war nach Clodronattherapie verbessert (Diel, Solomayer, Gollan et al., 1998). In einer Auswertung dieser Daten aus dem Jahr 2000, war der Einfluss auf die extraossäre Metastasierung allerdings deutlich geringer und statistisch nicht mehr signifikant (Diel, Solomayer, Gollan, 2000; Coleman, 2003).

Die Ergebnisse von Saarto et al. (n = 299) zeigen einen völlig gegensätzlichen Einfluss von Clodronat. Es traten unter Therapie mehr ossäre, sowie signifikant mehr viszerale Metastasen auf. Das Gesamtüberleben dieser Patienten war schlechter als im Plazeboarm (Saarto, Blomqvist, Virkkunen et al., 2001).

Andere in vitro Versuche ergaben, dass die Kombinationen von Zoledronsäure und Standardtherapie in einen synergistischen Apoptose-Effekt münden, der grösser ist, als die jeweilige Therapie alleine (Jagdev, Croucher, Coleman, 2000; Tassone et al., 2000). In vivo Versuche an Mäusen mit Brusttumoren zeigten, dass die kombinierte Behandlung mit Zoledronsäure und oraler UFT-Gabe (Tegafur und Urazil) nicht nur die Knochenresorption und viszerale Metastasen verhinderten, sondern auch die Überlebenszeit verlängerten (Hiraga et al., 1999).

1.4.4. Problemstellung

Die etablierten, klassischen prognostischen und prädiktiven Faktoren des Mammakarzinoms dienen der Einteilung der Patientinnen in unterschiedliche Gruppen und fungieren als Planungshilfe für eine adäquate Therapie, mit dem Ziel den Krankheitsverlauf für die individuelle Patientin prospektiv abzuschätzen. Allerdings stellen herkömmliche Faktoren, wie zum Beispiel das histomorphologische Grading, subjektive Parameter dar, die stark von der Erfahrung des Untersuchers abhängen und einen Mangel an Reproduzierbarkeit und Konsistenz aufweisen.

Aus diesem Grunde wurde in den letzten Jahren nach neuen, objektiven Parametern gesucht, die eine differenziertere Klassifikation der Mammakarzinome ermöglichen und eine Charakterisierung nach tumorbiologischen Gesichtspunkten erlauben. Diese neuen Faktoren berücksichtigen morphologische, biochemische, zellkinetische und genetische Aspekte und sollen in Kombination mit den klassischen prognostischen und prädiktiven Faktoren die Einteilung der Karzinome und die Entscheidung der adäquaten Therapie erleichtern.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Chemotherapeutika in Kombination mit Bisphosphonaten auf das Zellwachstum von Mammakarzinomen aufzuzeigen und Zusammenhänge zwischen prognostischen und prädiktiven Faktoren und der Inhibition des Tumorzellwachstums durch eine Kombinationsbehandlung darzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchtes Tumormaterial

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in einer Erhebung die Daten von 20 Patientinnen ausgewertet, die sich im Zeitraum von September 2001 bis November 2002 in der Abteilung für Frauenheilkunde am Klinikum Ibbenbüren (Chefarzt: Privatdozent Dr.med. habil. C.M. Schlotter) einer operativen Therapie eines primär invasiven Mammakarzinoms unterzogen hatten. Das Alter der Patientinnen bei Diagnosestellung lag zwischen 42 und 83 Jahren, bei einem Mittelwert von 65,9 Jahren.

Alle 20 Mammakarzinompräparate wurden routinemäßig makroskopisch, histologisch und zytometrisch durch den Pathologen Dr. med. U. Bosse (Praxis für Pathologie, Osnabrück) untersucht. Die Hormonrezeptoren (ER, PR) und HER2 wurden immunhistochemisch untersucht. Von allen Karzinomen wurden am Institut für Molekulare Medizin, Ibbenbüren (European Laboratory Association, Leiter: Dr. rer. nat. U. Vogt) Hormonrezeptoren, Onkogene, Proliferation/DNA-Index und proteolytische Enzyme untersucht. Hormonrezeptoren, Onkogene (c-erbB1, c-erbB2, c-erbB4) pS2, proteolytische Enzyme (uPA, PAI-1) und Topoisomerase-II-alpha wurden durch Polymerase-Chain-Reaction (PCR) bestimmt. Zusätzlich wurde im Institut für Molekulare Medizin für alle Tumore ein modifizierter ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay (modifizierte Methode nach Andreotti) durchgeführt.

Im Rahmen der Erhebung wurden allgemeine Patientinnendaten, klassische Prognoseparameter (wie pTNM-Stadium, histologisches Grading), immunhistochemische Parameter und im Besonderen die in-vitro-Messwerte von antineoplastischen Medikamenten in Kombination mit Bisphosphonaten mittels ATP-CVA erfasst.

Sämtliche in-vitro- Messwerte der antineoplastischen Medikamente allein und in Kombination mit den Bisphosphonaten wurden mit den herkömmlichen und neueren prognostischen und prädiktiven Faktoren des Mammakarzinoms verglichen, um mögliche Zusammenhänge aufzuzeigen.

2.2. Tumoreigenschaften und histomorphologische Befunde

Bei Betrachtung der Tumorlokalisation fanden sich 8 Karzinome (40%) in der rechten und 12 Karzinome (60%) in der linken Mamma.

Hinsichtlich der histologischen Typisierung handelte es sich um 14 duktale (70%) und 3 mucinöse (15%) Karzinome. Zusätzlich befanden sich ein duktal-tubuläres (5%), ein lobuläres (5%) und ein medullares (5%) Karzinom im Untersuchungsgut.

Die Tumoren die zur Beurteilung gelangten, wurden nach der TNN-Klassifikation für Brustkrebs beurteilt. Unter Anwendung des pTNN-Stadiums ließen sich von den 20 Fällen 4 Fälle dem Stadium T1 (20%), 10 Fälle dem Stadium T2 (50%) und 6 Fälle dem Stadium T4 (30%) zuordnen.

Bei der Analyse des Lymphknotenstatus zeigten 7 Fälle N0 (35%), 12 ein N1 (60%) und in einem Fall ein NX (5%) Stadium.

Bei nur einer Patientin (5%) wurden zum Erhebungszeitpunkt Fernmetastasen sicher nachgewiesen.

Das histologische Grading ordnete einen Tumor dem Grading 1 (5%), 9 Tumoren dem Grading 2 (45%) und 10 Tumoren dem Grading 3 (50%) zu (Tab.1).

Die Östrogen- und Progesteronrezeptoren, HER-2 und Ki-67 Status wurden immunhistologisch bestimmt. Bei der biochemischen Östrogen- und Progesteronrezeptor-Bestimmung wurden alle Messwerte < 20 fmol/mg als negativ und alle Werte ≥ 20 fmol/mg als positiv erachtet. Danach zeigten sich 7 Patientinnen (35%) als Östrogenrezeptor (ER)-negativ und 13 Patientinnen (65%) als ER-positiv. Bei 8 Frauen (40%) fanden sich Progesteronrezeptor (PR)-negative und bei 12 Frauen (60%) PR-positive Werte. Bildet man kombinierte Gruppen für den Steroidrezeptorstatus, entfallen auf die Gruppe „ER+/PR+“ 10 (50%) und auf die Gruppe „ER+/PR-“ 3 Fälle (15%). In den Bereich „ER-/PR+“ fielen 2 (10%) und in „ER-/PR-“ noch 5 Fälle (25%).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung hinsichtlich der Proliferationsaktivität Ki-67 zeigte sich bei 8 Tumoren (40%) eine niedrige ($0 < 20$), bei 9 Tumoren (45%) eine mittelhohe ($20 < 50$) und in 3 Fällen (> 50) eine hohe Proliferationsaktivität (Tab. 2).

Im Hinblick auf die Untersuchungsergebnisse der Onkoproteinexpression HER-2 fanden sich in 12 Fällen (60%) keine Markierungen, entsprechend DAKO-Score 0, und in nur 3 Fällen (15%) eine komplette membranbetonte Markierung der Tumorzellen, entsprechend DAKO-Score 3 (Tab.2). Zur Übersicht zeigt Tabelle 3 sämtliche Parameter der Hormonrezeptoren, Tabelle 4 a und b der Onkogene, Tabelle 5 a und b der Proliferation / des DNA-Index und Tabelle 6 der proteolytischen Enzyme der 20 Mammakarzinompatientinnen.

Tab. 1 Alter bei Diagnose und Tumoreigenschaften

Patient	Alter	Histologie	pT	pN	pM	Grading
1	66	Duktal	T4	+	+	3
2	66	Duktal	T2	-	-	3
3	66	Mucinös	T2	-	-	3
4	67	Duktal	T2	+	-	2
5	59	Duktal	T2	-	-	3
6	66	Duktal	T4	+	-	3
7	79	Duktal	T2	-	-	1
8	63	Duktal	T2	+	-	2
9	42	Medullar	T1	+	-	3
10	55	Duktal	T4	+	-	2
11	71	Duktal	T1	+	-	3
12	82	Lobulär	T4	-	-	2
13	65	Duktal	T2	-	-	3
14	83	Duktal	T1	+	-	1
15	79	Mucinös	T2	+	-	2
16	62	Mucinös	T2	-	-	2
17	64	Duktal	T4	+	-	3
18	43	Duktal	T4	+	-	3
19	75	Duk.-tubulär	T1	+	-	2
20	65	Duktal	T2	+	-	2

Tab. 2 Immunhistochemischer Status

Patient	ER	PR	HER-2 (DAKO)
1	+	-	2
2	-	-	1
3	+	+	0
4	+	+	0
5	-	-	2
6	+	+	0
7	+	+	0
8	+	+	0
9	-	-	1
10	-	-	3
11	+	-	3
12	-	+	1
13	+	-	0
14	+	+	0
15	+	+	0
16	+	+	0
17	-	-	0
18	-	+	0
19	+	+	2
20	+	+	0

Tab. 3 Hormonrezeptoren

Pat.	PR-Expression		pS2-Expression		ER-Expression	
	M.wert	Beurteil.	M.wert	Beurteil.	M.wert	Beurteil.
1	0,89	positiv	0,46	positiv	2,18	positiv
2	1,14	positiv	5,78	positiv	1,31	positiv
3	0,00	negativ	1,64	positiv	0,00	negativ
4	1,59	positiv	11,86	positiv	4,46	positiv
5	0,28	positiv	1,35	positiv	0,35	positiv
6	1,20	positiv	1,23	positiv	0,89	positiv
7	0,32	positiv	1,43	positiv	1,18	positiv
8	0,00	negativ	0,00	negativ	0,00	negativ
9	0,33	positiv	0,92	positiv	0,57	positiv
10	1,19	positiv	3,06	positiv	3,16	positiv
11	0,31	positiv	2,04	positiv	1,99	positiv
12	0,26	positiv	0,86	positiv	0,00	negativ
13	0,00	negativ	0,00	negativ	0,51	positiv
14	0,67	positiv	0,34	positiv	0,44	negativ
15	0,85	positiv	0,55	positiv	1,20	positiv
16	0,55	positiv	2,42	positiv	1,47	positiv
17	0,00	negativ	1,10	positiv	0,84	positiv
18	0,00	negativ	0,00	negativ	0,00	negativ
19	0,00	negativ	0,00	negativ	0,00	negativ
20	0,00	negativ	0,49	positiv	0,14	negativ
Normwert:		> 0,03		> 0,1		> 0,5
Einheit:		AGCN		AECN		AGCN

PR/ER-Expression = Progesteronrezeptor/Östrogenrezeptor Expression

Tab. 4a Onkogene

Patient	erb B-1		erb B-2		erb B-4	
	Messwert	Beurteilung	Messwert	Beurteilung	Messwert	Beurteilung
1	0,06	del./ampl.	0,96		1,20	
2	0,00	del./ampl.	0,95		0,96	
3	0,00	del./ampl.	1,33		1,00	
4	0,20	del./ampl.	0,05		2,09	ampl.
5	0,10	del./ampl.	0,26		1,35	
6	0,00	del./ampl.	0,78		1,13	
7	0,78		0,86		1,13	
8	0,49		2,29	ampl.	1,22	
9	0,17	del./ampl.	1,20		0,92	
10	0,27	del./ampl.	1,20		0,51	
11	0,27	del./ampl.	1,78		0,85	
12	0,19	del./ampl.	1,90		1,13	
13	0,25	del./ampl.	0,69		1,09	
14	0,32	del./ampl.	0,78		1,25	
15	0,09	del./ampl.	0,77		1,41	
16	0,29	del./ampl.	0,79		0,75	
17	0,53		2,26	ampl.	1,32	
18	0,60		2,01	ampl.	1,57	
19	0,18	del./ampl.	0,72		1,13	
20	0,11	del./ampl.	0,77		1,02	
Normwert:	>=4 <=1,6		<2		<= 2	
Einheit:	AGCN		AGCN		AGCN	

Tab. 4b Onkogene

Pat.	erb B1/erb B2		Her-2/Neu Expression		c-myc	
	M.wert	Beurteilung	M.wert	Beurteilung	M.wert	Beurteilung
1	0,06	nicht normw.	0,77		0,94	
2	0,00	nicht normw.	0,72		1,22	
3	0,00	nicht normw.	0,31		1,52	
4	0,25		1,41		3,56	ampl.
5	0,38		3,50	Überexpr.	0,27	
6	0,00	nicht normw.	1,04		0,77	
7	0,91		5,42	Überexpr.	0,52	
8	0,21		6,72	Überexpr.	0,55	
9	0,14	nicht normw.	0,31		1,81	
10	0,22		1,11		1,09	
11	0,15	nicht normw.	0,86		0,69	
12	0,10	nicht normw.	3,73	Überexpr.	0,00	
13	0,36		0,71		0,80	
14	0,41		0,41		1,15	
15	0,11	nicht normw.	0,96		0,49	
16	0,37		1,67	Überexpr.	0,82	
17	0,23		0,69		3,60	ampl.
18	0,30		3,43	Überexpr.	2,40	ampl.
19	0,24		0,73		0,76	
20	0,15	nicht normw.	1,39		0,96	
Normwert:		> 0,15		< 1,5		< 2,1
Einheit:				AECN		AGCN

Anm.: ampl/del-amplifiziert/deletiert, ampl.-amplifiziert, Überexpr.-Überexpression, nicht normw.-nicht normwertig

Tab. 5a Proliferation / DNA-Index

Patient	DNA-Index (flow)		S-Phase (flow)	
	Messwert	Beurteilung	Messwert	Beurteilung
1	1,69	aneuploid	9,57	erhöht
2	1,00	diploid	1,81	
3	1,00	diploid	8,17	erhöht
4	1,00	diploid	5,06	
5	1,00	diploid	6,11	
6	1,78	aneuploid	5,06	
7	1,00	diploid	6,19	
8	1,83	aneuploid	14,24	erhöht
9	1,00	diploid	8,92	erhöht
10	1,84	aneuploid	16,26	erhöht
11	1,00	diploid	6,87	
12	1,00	diploid	7,65	erhöht
13	1,00	diploid	1,60	
14	1,62	aneuploid	12,23	erhöht
15	1,90	aneuploid	1,62	
16				
17	1,97	aneuploid	11,88	erhöht
18	1,77	aneuploid	9,84	erhöht
19	1,69	aneuploid	25,25	erhöht
20	1,00	diploid	2,80	
Normwert:	>0,95 < 1,1		< 7	
Einheit:	Prozent			

Tab. 5b Proliferation

Patient	G0/G1 (flow)		G2/M-Phase (flow)	
	Messwert	Beurteilung	Messwert	Beurteilung
1	85,19		5,24	
2	94,15		3,62	
3	67,00	nicht normw.	24,50	nicht normw.
4	91,19		3,73	
5	82,11		11,78	
6	87,69		7,25	
7	89,02		4,79	
8	78,42	nicht normw.	7,33	
9	78,40	nicht normw.	12,67	
10	76,00	nicht normw.	7,74	
11	88,81		4,32	
12	89,20		3,15	
13	94,54		3,86	
14	62,75	nicht normw.	25,02	nicht normw.
15	92,82		5,56	
16				
17	81,14		6,99	
18	69,04	nicht normw.	21,12	nicht normw.
19	65,50	nicht normw.	9,25	
20	94,09		3,11	
Normwert:		> 80		>= 1 <= 14
Einheit:			Prozent	

Anm.: nicht normwert.-nicht normwertig

Tab. 6 Proteolytische Enzyme

Patient	Topoisomerase- II-alpha		uPA Expression		PAI Expression	
	M.wert	Beurteilung	M.wert	Beurteilung	M.wert	Beurteilung
1	0,92		0,66		1,06	
2	0,06		0,03		0,06	
3	0,48		0,00		0,54	
4	1,43		1,59	Überexpression	0,83	
5	1,26		1,18		1,25	
6	1,11		0,52		0,62	
7	3,00	Überexpression	0,96		2,16	Überexpression
8	1,02		0,90		7,58	Überexpression
9	1,13		0,31		0,96	
10	0,96		0,00		1,07	
11	0,76		0,59		0,89	
12	0,86		0,76		0,59	
13	0,31		0,28		0,24	
14	1,00		0,36		0,81	
15	0,00		0,00		0,80	
16	1,43		2,30	Überexpression	0,95	
17	0,35		0,00		0,32	
18	1,77	Überexpression	1,44		1,05	
19	8,66	Überexpression	0,49		2,06	Überexpression
20	0,74		1,02		1,13	
Normwert:		< 1,5		< 1,5		< 1,5
Einheit:				AECN		

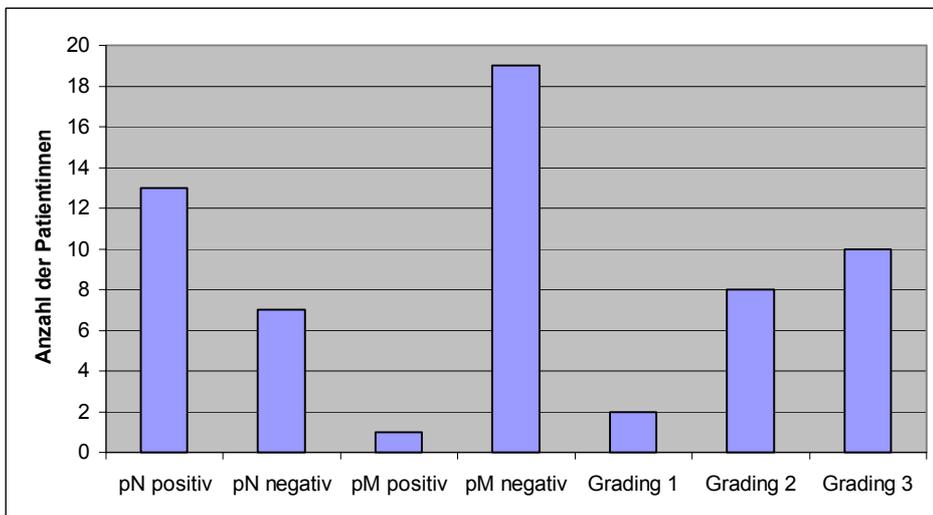
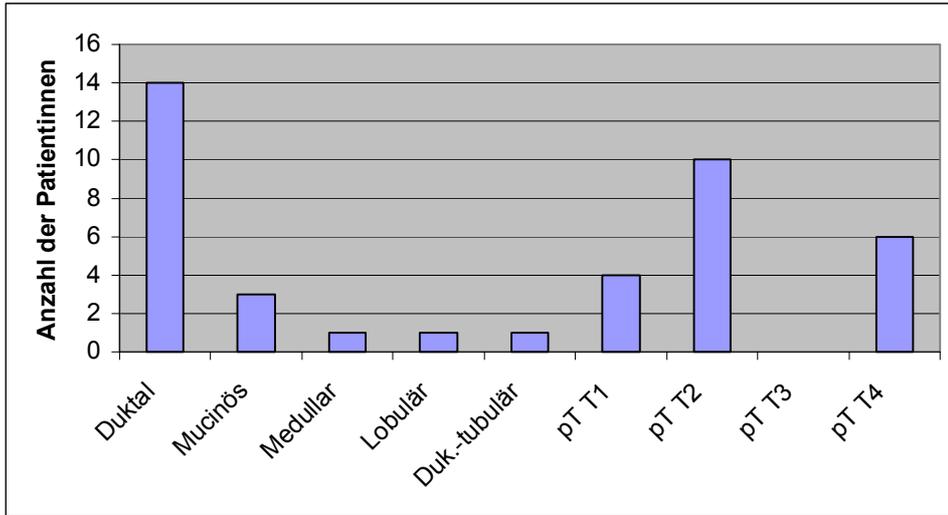


Abb.4: Übersicht Tumoreigenschaften aus Tab.1

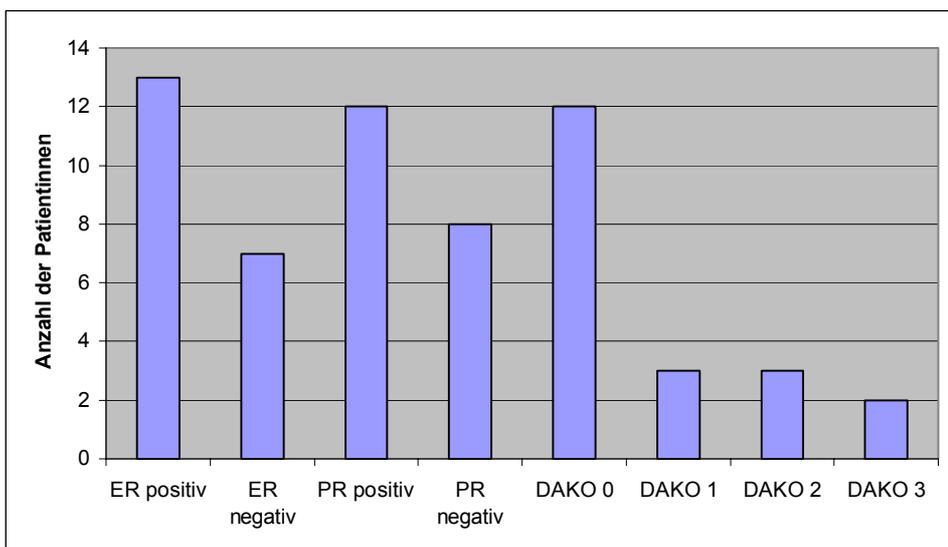


Abb.5: Übersicht immunohistochemischer Status aus Tab.2

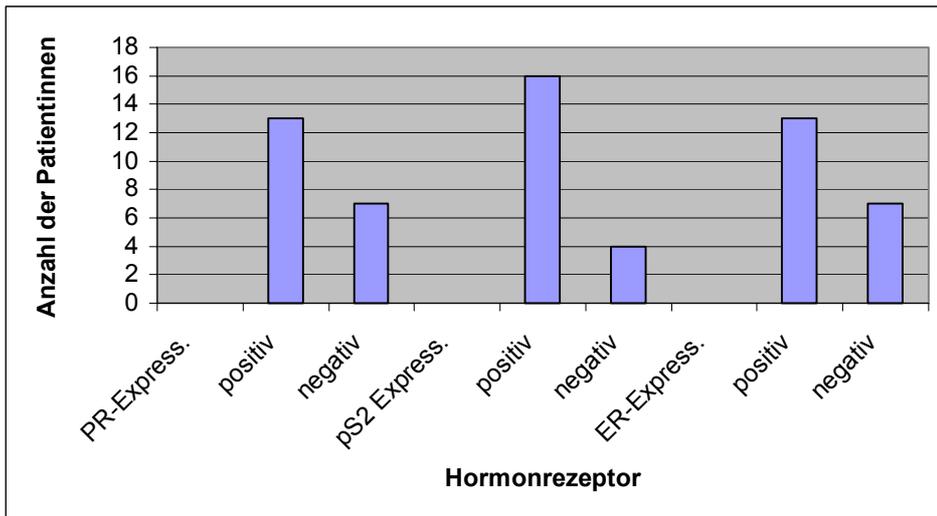


Abb.6: Übersicht der Hormonrezeptoren aus Tab.3

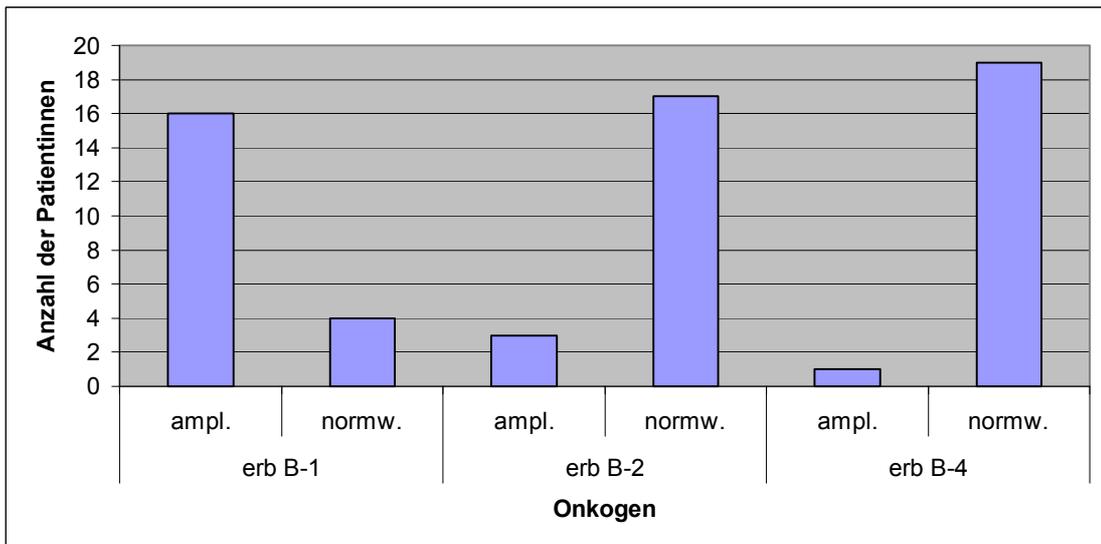


Abb.7: Übersicht der Onkogene aus Tab.4a

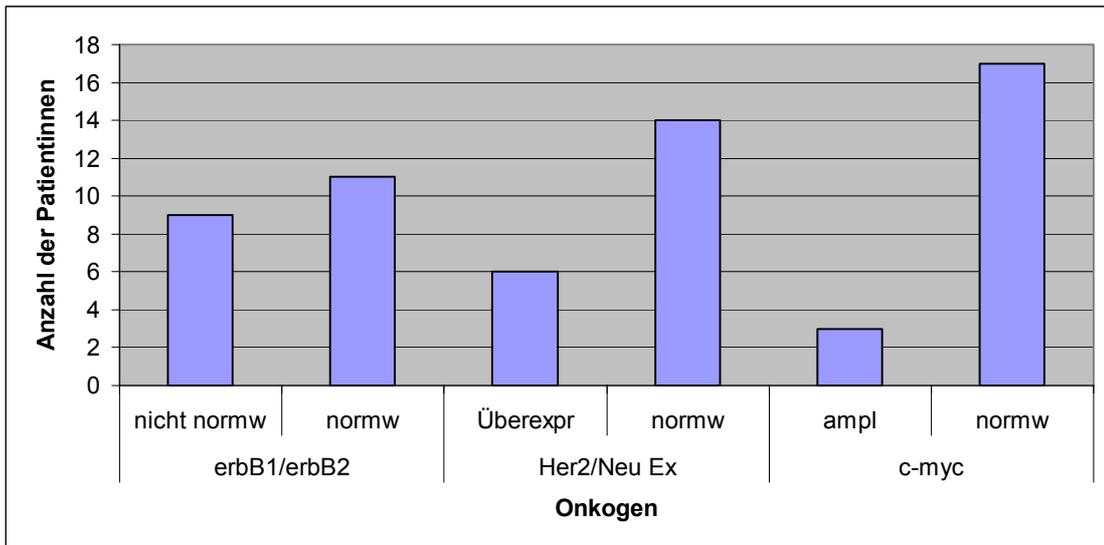


Abb.8: Übersicht über Onkogene aus Tab.4b

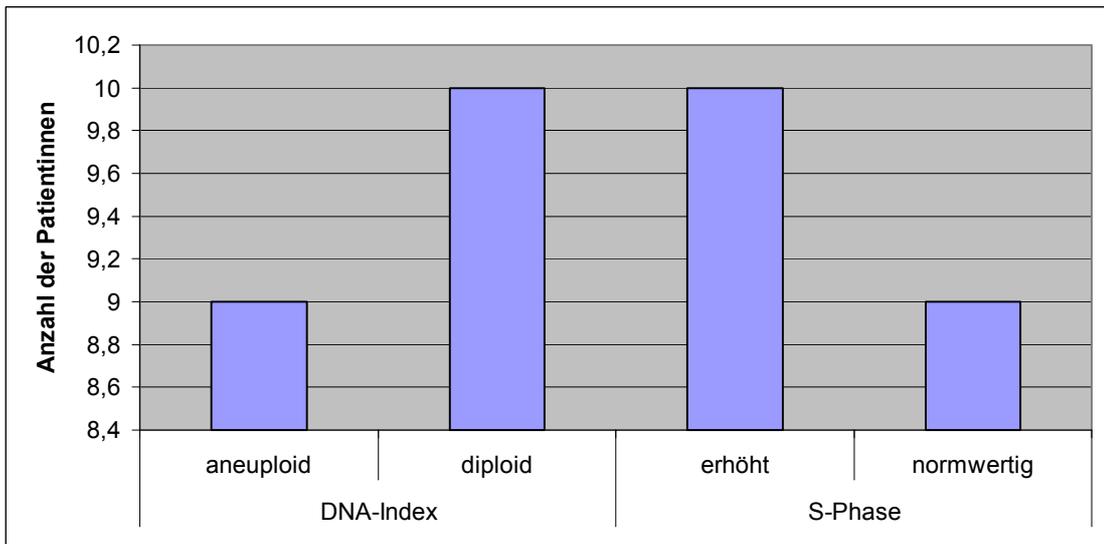
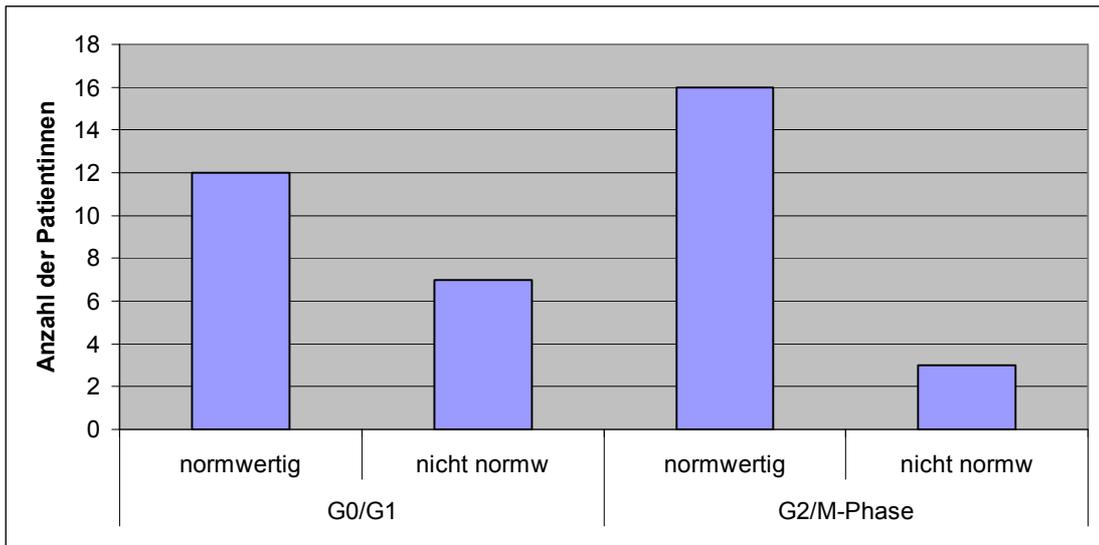


Abb.9: Übersicht von Proliferation/DNA-Index aus Tab.5a



Abb

.10: Übersicht von Proliferation/DNA-Index aus Tab.5b

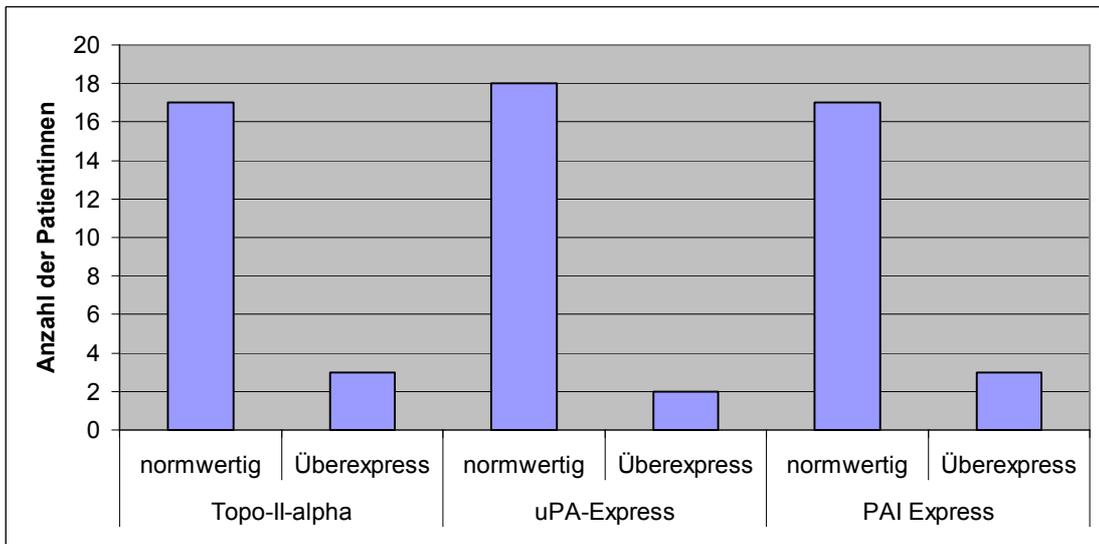


Abb.11: Übersicht der proteolytischen Enzyme aus Tab.6

2.3. ATP – Tumorchemosensitivitäts - Assay

2.3.1. Testmethode

Der ATP-CVA und seine Modifikationen dienen zur Bestimmung der Wirksamkeit von chemotherapeutischen Medikamenten und werden zur Vorhersage der Ansprechrate auf Chemotherapie bei verschiedenen Krebsarten benutzt (Köchli et al., 1994; Kurbacher, Cree, Bruckner et al., 1998; Vogt et al., 1999; Neale et al., 2000; Konecny et al., 2000). Die ATP-CVA hat eine hochgradige Evaluationsrate (Köchli et al., 1994; Andreotti et al., 1995; Vogt et al., 2000), wobei das Vorhandensein nicht kanzerogener Zellen im Untersuchungsgut keinen Einfluß auf das Ergebnis hat (Köchli, Sevin, Perras et al., 1994). Die Sensitivität des Testes scheint bei mehr als 85 Prozent und seine Spezifität bei nicht weniger als 80 Prozent zu liegen, mit einem positiven Vorhersagewert von mehr als 92 Prozent (Köchli, Sevin, Averette, Haller, 1994; De Vita, 1997; Cree, Kurbacher, 1997)

Das Testsystem wurde für solides Tumormaterial entwickelt, das durch enzymatische Verdauung in eine Einzelzellsuspension überführt wird (Falkiewicz et al., 2000).

Zur Bestimmung der Sensitivität oder Resistenz werden Tumorzellen enthaltende Proben für 6-7 Tage *in vitro* in Gegenwart verschiedener Konzentrationen einzelner Zytostatika oder Kombinationen kultiviert. Zur Testdurchführung wird ein für Tumorzellen selektives Medium mit einer bestimmten Mikrotiterplatte verwendet. Die Wachstumshemmung wird mittels eines Lumineszenzmessgerätes quantifiziert. Es misst das Licht, das bei der Biolumineszenzreaktion in Gegenwart von Luziferin und Luziferase proportional zum Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) emittiert wird (Köchli, Sevin, Haller, 1994; Andreotti et al., 1995).

2.3.2. Durchführung der Messung

Ein ATP-cell viability assay, eine modifizierte Methode von Andreotti, gelangte zum Einsatz (Andreotti et al., 1995). Die Aufbereitung der Tumorgewebeproben und die Tumortestung erfolgten im Labor. Das zu untersuchende Brustkrebsgewebe wurde nach der von Vogt beschriebenen Methode behandelt (Vogt, Striehn et al., 1999). Frisches Brustkrebsgewebe wurde mechanisch unter sterilen Bedingungen in 0,5–2,0 mm³ grosse Fragmente zerteilt. Durch die Inkubation in 10ml TDR (Tumor Dissociation Enzyme Reagent) über 12 Stunden bei 37°C wurden die Fragmente in einzelne Zellen oder kleine Zellverbände aufgelöst. Nach der Inkubation wurde ein Ficoll-Hypaque (Amersham Biotech, USA) Gradient benutzt, um die Verunreinigung mit Erythrozyten zu reduzieren.

Anschließend wurden die Zellen erneut für die Messung ($1,5 \times 10^5$ Zellen/ml) in Suspension in DMEM (Invitrogen, Deutschland) gebracht. Therapeutische Medikamentenpräparate von kommerziellen Anbietern wurden vor Ablauf des Verfallsdatums zur Anwendung gebracht. CMF, EC, ET und EDoc wurden in sechs verschiedenen Verdünnungen von 200, 100, 50, 25, 12,5 und 6,25 % der standardisierten test drug concentration (TDC) getestet. Einhundert Prozent TDC entsprechen dabei folgender Zusammensetzung: Cyclophosphamid $3,0\mu\text{g/ml}$, Metotrxat $2,8\mu\text{g/ml}$, 5-Flourouracil $22,5\mu\text{g/ml}$, Epirubicin $0,5\mu\text{g/ml}$, Paclitaxel $13,6\mu\text{g/ml}$, Docetaxel $11,3\mu\text{g/ml}$. Ibandronat und Zoledronat wurden in einer Konzentration von $30\mu\text{M}$ verwendet. An Stelle von Cyclophosphamid wurde frisches oder gefrorenes (nicht älter als einen Monat) 4-Hydroxycyclophosphamid (Asta Medica, Germany) als aktiver Metabolit benutzt (Vogt, Bielawski et al., 2004). Kulturen mit ca. 15000-20000 Zellen/Well wurden in 96 Well Mikroplatten (Costar, USA) getestet, welche jeweils 12 maximal inhibierende Kontrollzellen und 12 nicht inhibierende Kontrollzellen enthielten. Anschliessend wurden die Kulturen für 6-8 Tage bei 37°C , mehr als 98 %, Luftfeuchtigkeit, 95 % Luft und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurde das zelluläre Adenosintriphosphat extrahiert und mit Cell lysing reagent (Sigma, USA) für jeden Well stabilisiert. Der Gehalt an ATP wurde mit dem Lumineszenzmessgerät BMG LUMIstar (BMG, Germany) gemessen. Für die Messung wurden $50\mu\text{l}$ Zell Lysat und $50\mu\text{l}$ Luciferin-Luciferase (Sigma, USA) als Zählreagents benutzt. Gemessen wurde über 5 Sekunden, wobei eine Sekunde Verzögerung integriert war. Jede Messung wurde drei Mal durchgeführt.

Nach einer Inkubationszeit der Kulturen von 6 Tagen mit CMF, EC, ET, EDoc allein und in Kombination mit Bondronat und Zoledronat wurde die prozentuale Inhibition des Brusttumorwachstums (BTGI %-breast tumor growth inhibition %) berechnet und mit den Kontrollkulturen verglichen. Die totale Wachstumsinhibition (TGI-total growth inhibition) wurde prozentual nach folgender Formel berechnet: $1-(\text{TDC-MI})/(\text{MO-MI}) \times 100 = \% \text{TGI}$, wobei TDC für test drug cultures, MI für maximum inhibition der Kontrollkulturen und MI für no inhibition der Kontrollkulturen definiert wurde. Die AUC-Werte (area under chemoresponse curve) wurden nach der Trapezoidal Regel errechnet, wobei sich die Chemosensitivität nach der Klassifikation von Untch als $\text{AUC} > 18000$ versteht.

Östrogen- und Progesteronrezeptoren wurden, wie der HER-2, immunhistochemisch nach Herstellerangaben bestimmt. Die statistischen Auswertungen erfolgten mit dem Programm SAS Version 8,2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) und Statistica für Windows Version 6,0 (Statsoft Co., OK,USA). In diesem Zusammenhang wurde eine Analyse der

verschiedenen Varianten (ANOVA) der Basistherapie und der Zusatztherapie durchgeführt. Eine Schätzung der Basis- und Zusatztherapie, sowie deren Kombination werden als last square means (LS-means) dargestellt. Für gruppenweise Vergleiche wurde die LS means Differenz zusammen mit den entsprechenden zweiseitigen 95 % confidence Intervall und dem p-Wert ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert.

3. Ergebnisse

3.1. ATP-CVA Befunde

Bei Betrachtung der inhibitorischen Wirkung von Bondronat und Zoledronat allein, zeigt sich ein BTGI- (breast tumor growth inhibition) Effekt von 22 respektive 25 Prozent (Tab.7). Inhibitorische Effekte wurden bei allen vier Medikamentenkombinationen von Chemotherapeutika zusammen mit den beiden Bisphosphonaten deutlich sichtbar. In allen Fällen war die Differenz zwischen den gemessenen TGI-Werten für die Medikamentenkombinationen allein versus in Kombination mit Bondronat oder Zoledronsäure signifikant ($p < 0,05$).

Beim Vergleich der AUC-Werte der vier Medikamentenkombinationen CMF, EC, TE und Edoc in Verbindung mit den Bisphosphonaten Ibandronat und Zoledronat, ergaben sich höhere AUC-Werte für alle Kombinationen von Taxanen mit Bondronat und Zoledronat (Tab.8, 9, 10). Aus der Behandlung der Zellkulturen mit Taxanen in Verbindung mit Zoledronsäure resultieren die höchsten durchschnittlichen AUC-Werte (Abb.12).

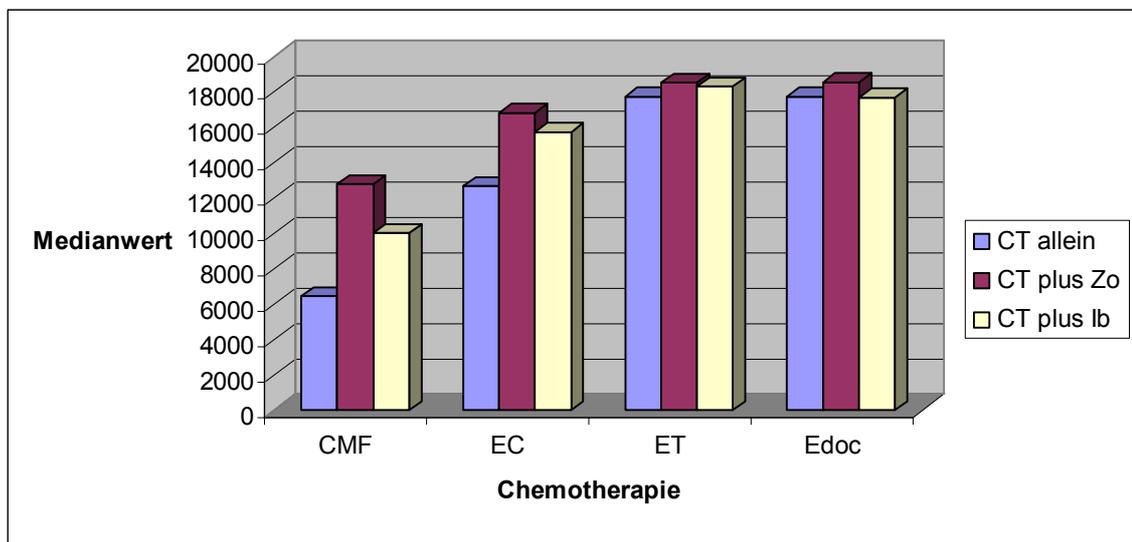


Abb.12: Medianwerte AUC bei unterschiedlicher Chemotherapie (CT)

Tab. 7 Der Effekt von Bondronat und Zoledronat auf Brusttumorzellen

Patient	BC- Zellen allein (RLU)	BC-Zellen plus Zol(RLU)	BC-Zellen plus Ib. (RLU)	Zol./allein ratio	Ib./allein ratio
1	75583,30	60024,20	45238,30	0,79	0,60
2	1500,00	1180,80	1505,00	0,79	1,00
3	4737,50	4360,00	2621,67	0,92	0,55
4	36614,20	26770,80	22796,70	0,73	0,62
5	10085,00	10379,20	10379,20	1,03	1,03
6	3357,00	3397,00	2740,00	1,01	0,82
7	7417,00	2125,00	4376,00	0,29	0,59
8	1360,00	2635,00	1945,00	1,94	1,43
9	4840,00	2162,00	11040,00	0,45	2,28
10	9732,00	11019,00	11040,00	1,13	1,13
11	12791,00	12791,00	19151,00	1,00	1,50
12	7886,00	3373,00	8945,00	0,43	1,13
13	58,94,00	2355,00	3699,00	0,40	0,63
14	11213,00	3705,00	7287,00	0,33	0,65
15	11218,00	8673,00	7287,00	0,77	0,65
16	4076,00	3571,00	5977,00	0,88	1,47
17	15311,00	4915,00	11369,00	0,32	0,74
18	50059,00	2471,00	30376,00	0,05	0,61
19	3504,00	2471,00	3169,00	0,71	0,90
20	1205,00	251,00	497,00	0,21	0,41
			median	0,75	0,78

BC, breast cancer; Ib, ibandronat; RLU, relative light unit; Zo, zoledronic acid

Tab. 8 AUC-Werte bei Basistherapie mit CMF, EC, ET und EDoc

Patient	CMF	EC	ET	EDoc
1	11830	12433	18558	17402
2	11389	16113	18275	17402
3	-14492	9035	8106	-17066
4	12349	16169	19017	19017
5	10470	16377	17481	18369
6	9909	17251	18137	18409
7	-7759	12070	15102	14986
8	3012	12935	17642	17775
9	-174	15288	17815	18081
10	2224	7169	16203	17518
11	1871	8417	11024	11903
12	1261	8816	17664	17942
13	17405	17341	19229	19429
14	10231	17314	18694	19102
15	2372	6139	17414	15779
16	-1348	1939	17853	17151
17	10040	5415	4467	8971
18	12365	17438	18701	17728
19	12568	17847	17196	19369
20	-7144	12143	17886	18947
Median:	6460,5	12684,0	17739,5	17751,5

Tab. 9 AUC-Werte bei Chemotherapie in Kombination mit Bondronat

Patient	CMF/Ib.	EC/Ib.	ET/Ib.	EDoc/Ib.
1	11915	13920	18675	17690
2	12018	16600	18420	17648
3	-4911	11000	16613	6456
4	12782	16115	18439	18235
5	7786	16506	18200	15371
6	14397	17190	18623	17724
7	-2074	15339	17558	16892
8	10872	17488	18425	18719
9	9579	17576	18832	18849
10	10479	14971	18055	18061
11	4631	10836	12788	13399
12	6408	14082	18130	18360
13	17968	18586	18734	19786
14	12314	18221	18918	19012
15	7186	8901	15784	16284
16	2081	6896	18438	17556
17	7772	7771	7117	8120
18	15975	17925	18600	17584
19	13420	18058	17971	19365
20	-3995	13174	17567	19060
Median:	10029	15727	18310	17707

Ib.-Bondronat

Tab.10 AUC-Werte bei Chemotherapie in Kombination mit Zoledronat

Patient	CMF/Zo	EC/Zo	ET/Zo	Edoc/Zo
1	9750	12177	18594	17993
2	14044	16312	18671	17769
3	13410	16877	17226	11534
4	14191	16788	18765	18688
5	7721	17156	18093	17052
6	15067	18093	18699	18032
7	11326	16923	18927	18875
8	14213	18606	19088	19593
9	12253	18480	19147	19173
10	10103	15399	17929	18445
11	8026	13740	15846	17037
12	11521	16172	18066	18670
13	17601	18408	18759	19074
14	15546	18646	18876	19232
15	13346	13811	17224	17884
16	3615	9499	18438	17932
17	9783	5432	7101	9750
18	17843	18782	18826	18773
19	13479	18232	18227	19363
20	3166	16696	18484	19115
Median:	12799,5	16832,5	18539,0	18557,5

Zo-Zoledronat

Im Bereich der niedrig dosierten Medikamentenkombinationen (25-6,26%) konnte der positive Effekt von Zoledronsäure und Bondronat auf den TGI deutlich sichtbar gemacht werden (Tab.11, 12, 13).

Zusammenfassend zeigt sich eine 40,6-prozentige Steigerung des TGI, bedingt durch den synergistischen Effekt der Kombination mit Zoledronat, im Vergleich zu einer 16,4-prozentigen Steigerung des TGI in Kombination mit Bondronat (Abb.13).

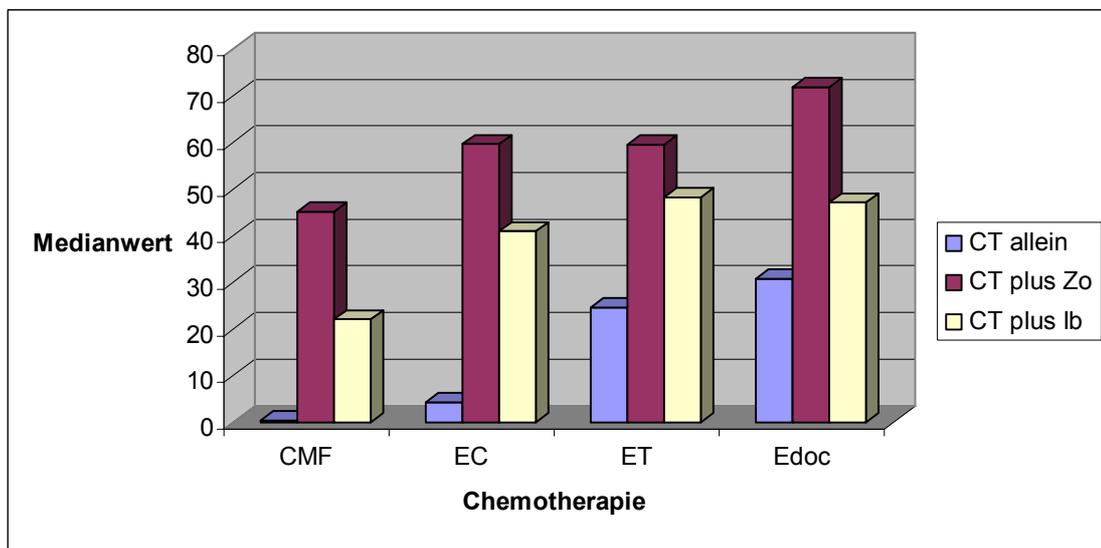


Abb.13: TGI-Werte bei niedriger Konzentration (25 – 6,25 %)

Tab.11 TGI-Werte der Chemotherapeutika in den Konzentrationen 200-50 und 25-6,25 in %

Patient	CMF		EC		ET		EDoc	
	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25
1	61,98	39,43	67,35	39,43	98,46	68,07	98,40	25,80
2	60,27	48,16	87,69	44,62	98,33	57,37	94,71	25,47
3	-44,48	-255,28	76,04	-89,08	83,28	-231,42	-9,89	-701,72
4	68,84	23,45	90,35	35,18	99,70	52,09	99,74	77,39
5	58,74	15,19	93,03	22,88	99,81	17,90	99,96	43,72
6	52,49	29,63	92,00	61,13	99,70	45,53	99,95	49,00
7	-32,39	-121,28	77,93	-31,70	99,40	-52,36	100,20	-98,52
8	20,54	-28,62	79,43	-21,35	103,93	-14,20	104,27	-10,33
9	-1,76	-2,58	89,34	10,44	99,49	24,76	99,71	34,19
10	15,87	-19,70	39,79	4,41	95,07	5,77	98,94	28,40
11	8,79	1,00	51,84	-6,95	90,17	-149,64	85,03	-138,65
12	7,30	0,16	56,68	-10,53	98,83	35,28	99,81	48,35
13	92,28	73,13	100,00	1,44	100,00	64,75	100,00	56,01
14	63,75	-8,27	95,95	35,82	99,95	62,07	100,00	79,19
15	14,70	0,46	35,89	-9,89	82,67	11,31	90,35	-0,11
16	-0,60	-16,53	48,06	-18,24	99,73	33,18	94,46	32,99
17	55,02	29,72	29,85	4,03	22,21	20,62	49,52	9,21
18	74,78	-5,99	97,49	35,32	99,25	54,22	98,65	8,02
19	70,77	5,93	99,93	34,54	99,98	21,59	100,00	98,58
20	-34,88	-61,90	77,26	-51,29	100,00	24,41	100,00	68,29
Median:	36,515	0,31	78,68	4,22	99,445	24,585	99,725	30,695

Tab.12 TGI-Werte der Chemotherapeutika in Kombination mit Bondronat in den Konzentrationen 200-50 und 25-6,26 in %

Patient	CMF/Ib.		EC/Ib.		ET/Ib.		EDoc/Ib.	
	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25
1	63,28	41,40	75,01	51,44	98,11	78,74	97,74	44,35
2	60,44	69,44	88,99	65,68	98,12	69,17	95,66	56,56
3	-13,78	-97,66	73,94	-32,18	96,87	-8,28	68,67	-224,53
4	70,24	34,43	88,20	48,80	98,08	65,24	98,15	57,60
5	44,82	-2,51	94,46	20,89	99,32	48,22	93,54	-27,36
6	77,85	51,10	92,01	49,04	98,57	71,02	95,51	48,54
7	-5,02	-55,36	85,39	36,10	99,37	32,58	100,02	11,87
8	58,07	35,06	98,04	43,54	102,48	31,56	102,60	40,59
9	49,34	42,07	95,32	57,77	99,62	69,59	99,64	70,66
10	59,01	22,21	83,30	38,34	98,87	46,19	99,27	55,83
11	23,81	16,61	67,05	-18,56	91,55	-98,27	96,15	-123,63
12	37,71	0,04	79,67	12,85	100,00	48,13	100,00	61,09
13	95,79	62,62	99,38	74,95	100,00	64,54	100,00	94,71
14	73,14	12,13	97,99	61,91	100,00	69,38	100,00	75,88
15	36,89	38,34	47,93	32,47	90,59	13,55	94,34	17,78
16	11,10	16,63	37,49	23,80	99,67	57,77	95,36	45,61
17	43,04	17,41	41,63	26,69	39,23	27,13	41,19	30,97
18	88,34	45,07	97,28	59,13	99,37	61,85	96,96	19,90
19	75,08	21,87	98,26	53,93	99,98	42,64	100,00	98,72
20	-16,58	-56,66	79,29	-16,46	100,00	20,46	100,00	76,51
Median:	53,705	22,040	86,795	40,940	99,345	48,175	97,970	47,075

Ib.-Bondronat

Tab.13 TGI-Werte der Chemotherapeutika in Kombination mit Zoledronat in den Konzentrationen 200-50 und 25-6,25 in %

Patient	CMF/Zo		EC/Zo		ET/Zo		EDoc/Zo	
	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25	200-50	25-6,25
1	48,00	45,80	64,13	48,36	98,03	75,65	98,67	42,06
2	71,90	78,13	84,98	79,56	98,42	79,94	94,37	71,46
3	80,68	-15,34	91,38	43,10	95,60	27,56	80,99	-57,46
4	75,08	59,57	90,00	64,02	98,17	83,45	98,07	81,00
5	45,19	-6,18	95,83	39,08	99,05	42,35	95,14	25,10
6	79,30	64,69	96,23	75,98	98,67	79,98	95,41	71,11
7	59,06	44,49	86,79	83,28	98,63	87,71	99,23	85,44
8	73,46	65,22	97,76	79,13	102,87	67,08	103,88	79,91
9	63,50	57,54	96,72	85,16	99,60	90,51	99,66	90,97
10	54,92	33,71	84,26	47,74	97,30	49,83	99,17	54,36
11	45,34	24,92	73,74	42,49	98,35	-14,05	96,51	23,88
12	62,74	41,91	89,22	49,18	99,12	49,53	100,00	73,61
13	93,75	71,84	97,82	60,11	100,00	51,80	100,00	61,90
14	82,64	63,02	97,73	81,29	100,00	83,50	100,00	89,58
15	69,44	68,26	71,53	65,79	94,02	58,44	96,48	68,09
16	16,32	28,41	51,08	24,19	99,75	58,96	95,34	57,53
17	57,59	39,88	26,40	41,38	34,85	42,71	50,94	31,38
18	93,69	79,90	96,82	95,73	97,65	91,85	97,43	90,11
19	75,43	27,91	98,65	59,15	99,81	58,40	100,00	98,39
20	18,05	0,20	92,69	42,79	100,00	60,13	100,00	84,79
Median:	66,470	45,145	90,690	59,630	98,650	59,545	98,370	71,85

Zo -Zoledronat

Der inhibitorische Effekt der Bisphosphonate in der niedrigsten Konzentration (6,25%) wird in Abbildung und Tabelle 14 dargestellt.

In der Varianz der antineoplastischen Medikamentenkonzentrationen ist der verstärkende Effekt von Zoledronat und Bondronat auf den TGI für alle Kombinationen deutlich dargestellt ($p < 0,05$). Die vorliegenden Daten zeigen auch, dass bei Zugabe von Zoledronat in allen vier Versuchsreihen eine höhere chemotoxische Aktivität gegenüber dem Bondronat nachgewiesen werden konnte (Abb.14).

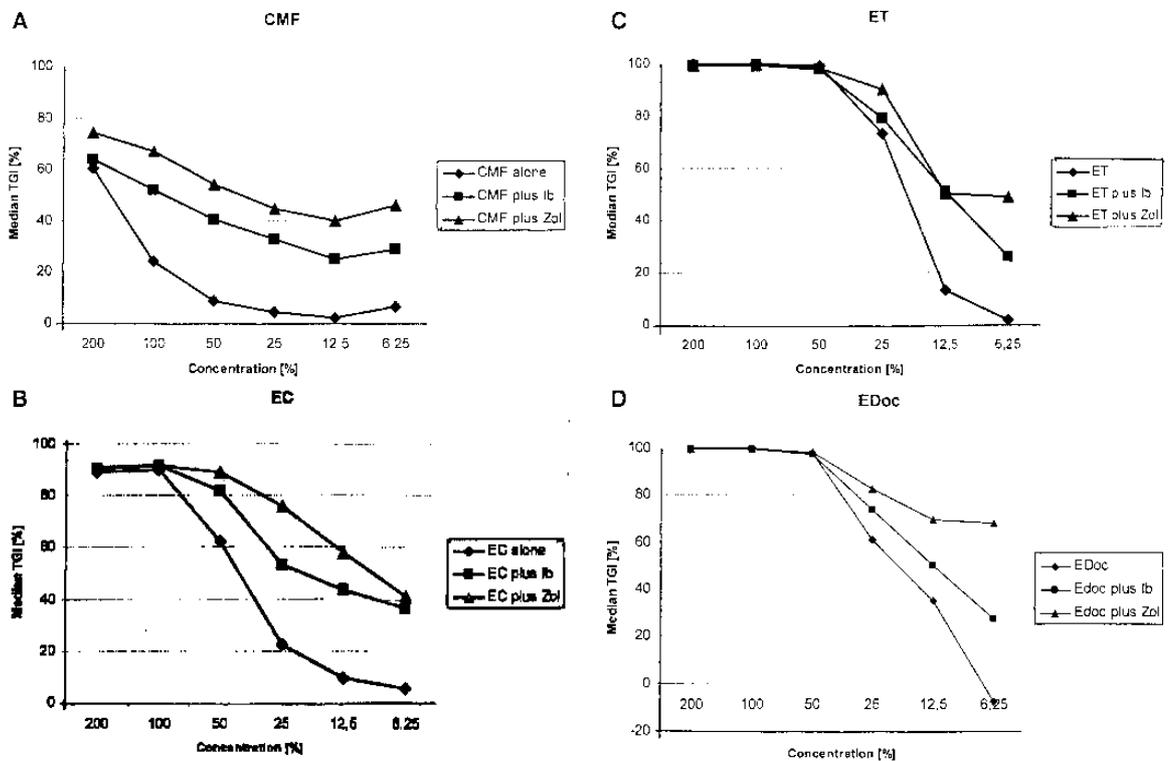


Abb.14: Der inhibitorische Effekt von (A) CMF, (B) EC, (C) ET und (D) EDoc allein und in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Ibandronat auf das Brusttumorstadium

Tab.14 Inhibitorischer Einfluß von Bondronat und Zoledronat in der niedrigsten Konzentration (6,25 %) auf das Brusttumorwachstum in der Chemotherapie

a. Basis- und Zusatztherapie errechnet als LS-means

	LS Mean			
	CMF	EC	ET	EDoc
<u>Basistherapie</u>	-4,73	1,39	-20,34	-24,07
<u>Zusatztherapie mit</u>				
Bondronat	18,96	31,86	17,27	9,79
Zoledronat	40,84	48,97	45,03	43,43

b. paarweise Vergleiche der LS-mean Differenz

Substanz	LS means		LS means Differenz	p-value (tow-sided)
CMF+Ib.vs.CMF	18,96	-4,73	23,69	0,0010
CMF + Ib. vs.CMF + Zol.	18,96	40,84	-21,89	0,0024
CMF + Zol. vs.CMF	40,84	-4,73	45,58	< 0,0001
EC + Ib. vs. EC	31,36	1,39	30,47	< 0,0001
EC + Ib. vs.EC+Zol.	31,86	48,97	-17,11	0,0171
EC + Zol. vs. EC	48,97	1,39	47,59	< 0,0001
ET +Ib. vs. ET	17,27	-20,34	36,61	< 0,0001
ET + Ib. vs.ET+Zol.	17,27	45,03	-27,77	< 0,0001
ET+Zol. vs.ET	45,03	-20,34	65,38	< 0,0001
EDoc + Ib. vs.EDoc	9,79	-24,07	67,51	< 0,0001
EDoc + Ib. vs.EDoc + Zol.	9,79	43,43	-33,64	< 0,0001
Edoc +Zol. vs.Edoc	43,43	-24,07	67,51	< 0,0001

3.2. Korrelation der Werte der Chemosensitivitätstestung mit den klassischen und neueren prognostischen und prädiktiven Faktoren des Mammakarzinoms

Um mögliche Häufungen aufzudecken, wurden sämtliche Faktoren des Mammakarzinoms mit den Werten des ATP-TCA, Zytostatika allein und in Kombination mit den Bisphosphonaten, verglichen. Hierfür wurden die AUC-Werte (Interpretation nach Andreotti) der Chemosensitivitätstestung aller 20 Fälle auf ihre Sensitivität, beziehungsweise Resistenz, auf die vier Substanzkombinationen Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil, Epirubicin/Cyclophosphamid, Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel allein und in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat untersucht.

3.2.1. Korrelation mit den klassischen Faktoren

Alle 20 Fälle zeigten bei der Auswertung der Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexat/5-Fluorouracil (CMF), Epirubicin/Cyclophosphamid (EC) allein und bei der Kombination von Cyclophosphamid/Metotrxat/5-Fluorouracil (CMF) mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat AUC-Werte < 18000 , die auf eine partielle Sensitivität oder Resistenz hinwiesen (Tab.8-10). Bei der weiteren Betrachtung wurden diese Werte nicht mehr berücksichtigt.

Tabelle 15 vergleicht die konventionellen prognostischen und prädiktiven Faktoren mit den Werten der Chemosensitivitätstestung mit Epirubicin/Paclitaxel (ET) und Epirubicin/Docetaxel (Edoc) allein, Tabelle 16 und 17 in Kombination mit Zoledronat und Bondronat und Tabelle 18 die AUC-Werte von Epirubicin/Cyclophosphamid (EC) hinsichtlich Anzahl und prozentualer Verteilung der sensitiven und nicht sensitiven Proben.

Tab.15 Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate

Prognoseparameter		Anzahl	%	ET	sensitiv			nicht sensitiv			
					%	Edoc	%	ET	%	Edoc	%
T-Stadium	T1	4	20	1	25	3	75	3	75	1	25
	T2	10	50	4	40	4	40	6	60	6	60
	T3/4	6	30	3	50	1	17	3	50	5	83
pN-Klassifikation											
	positiv	13	65	5	38	6	46	8	62	7	54
	negativ	7	35	3	43	2	29	4	57	5	71
histolog. Grading											
	G1	2	10	2	100	1	50	0	0	1	50
	G2	8	40	1	13	3	37	7	87	5	63
	G3	10	50	5	50	4	40	5	50	6	60
östrogenrezeptor											
	positiv	13	65	6	46	6	46	7	54	7	54
	negativ	7	35	2	29	2	29	5	71	5	71
Progesteronrezeptor											
	positiv	12	60	5	42	5	42	7	58	7	58
	negativ	8	40	3	37	3	37	5	63	5	63
HER-2 (DAKO)											
	positiv	2	10	0	0	0	0	2	100	2	100
	negativ	18	90	7	39	3	17	11	61	15	83

Tab.16 Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Zoledronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			ET/Z	%	EdocZ	%	ET/Z	%	EdocZ	%	
T-Stadium	T1	4	20	3	75	3	75	1	25	1	25
	T2	10	50	8	80	5	50	2	20	5	50
	T3/4	6	30	4	67	4	67	2	33	2	33
pN-Klassifikation											
	positiv	13	65	9	69	9	69	4	31	4	31
	negativ	7	35	4	57	3	43	3	43	4	57
histolog. Grading											
	G1	2	10	2	100	2	100	0	0	0	0
	G2	8	40	6	75	6	75	2	25	2	25
	G3	10	50	7	70	4	40	3	30	6	60
östrogenrezeptor											
	positiv	13	65	10	77	8	62	3	23	5	38
	negativ	7	35	5	71	4	57	2	29	3	43
Progesteronrezeptor											
	positiv	12	60	10	83	9	75	2	17	3	25
	negativ	8	40	5	63	3	37	3	37	5	63
HER-2 (DAKO)											
	positiv	2	10	0	0	1	50	2	100	1	50
	negativ	18	90	15	83	11	61	3	17	7	39

Tab.17 Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			ET/B	%	Edoc/B	%	ET/B	%	Edoc/B	%	
T-Stadium	T1	4	20	2	50	2	50	2	50	2	50
	T2	10	50	6	60	4	40	4	40	6	60
	T3/4	6	30	5	83	3	50	1	17	3	50
pN-Klassifikation											
	positiv	13	65	8	62	7	54	5	38	6	46
	negativ	7	35	5	71	2	29	2	29	5	71
histolog. Grading											
	G1	2	10	1	50	1	50	1	50	1	50
	G2	8	40	5	63	6	75	3	37	2	25
	G3	10	50	7	70	2	20	3	30	8	80
östrogenrezeptor											
	positiv	13	65	7	54	6	46	6	46	7	54
	negativ	7	35	6	86	3	43	1	14	4	57
Progesteronrezeptor											
	positiv	12	60	7	58	6	50	5	42	6	50
	negativ	8	40	6	75	3	37	2	25	5	63
HER-2 (DAKO)											
	positiv	2	10	1	50	1	50	1	50	1	50
	negativ	18	90	12	67	8	44	6	33	10	56

Tab.18 Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			EC/Z	%	EC/B	%	EC/Z	%	EC/B	%	
T-Stadium	T1	4	20	3	75	2	50	1	25	2	50
	T2	10	50	2	20	1	10	8	80	9	90
	T3/4	6	30	2	33	0	0	4	67	6	100
pN-Klassifikation											
	positiv	13	65	6	46	2	15	7	54	11	85
	negativ	7	35	1	14	1	14	6	86	6	86
histolog. Grading											
	G1	2	10	1	50	1	50	1	50	1	50
	G2	8	40	2	25	1	13	6	75	7	87
	G3	10	50	4	40	1	10	6	60	9	90
östrogenrezeptor											
	positiv	13	65	5	38	3	23	8	62	10	77
	negativ	7	35	2	29	0	0	5	71	7	100
Progesteronrezeptor											
	positiv	12	60	5	42	2	17	7	58	10	83
	negativ	8	40	2	25	1	13	6	75	7	87
HER-2 (DAKO)											
	positiv	2	10	0	0	0	0	2	100	2	100
	negativ	18	90	7	39	3	17	11	61	15	83

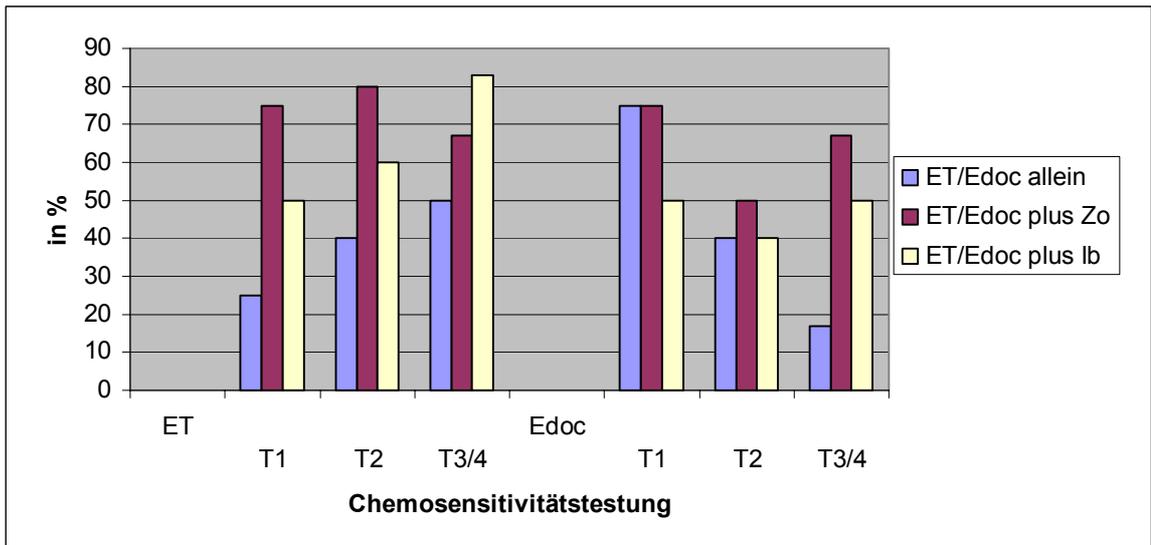


Abb.15: Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf das T-Stadium

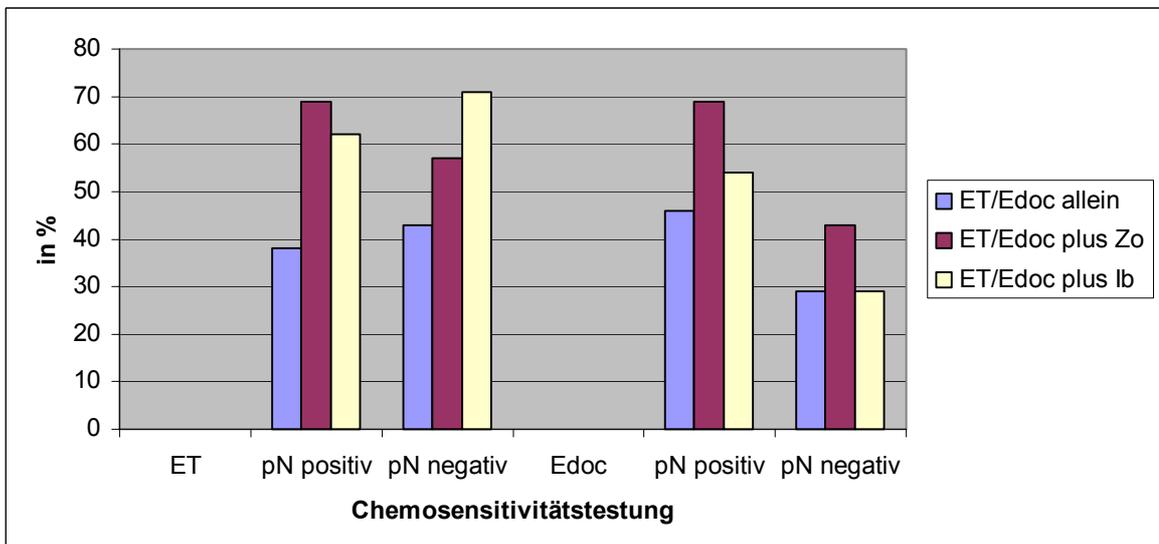


Abb.16: Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf den Nodalstatus

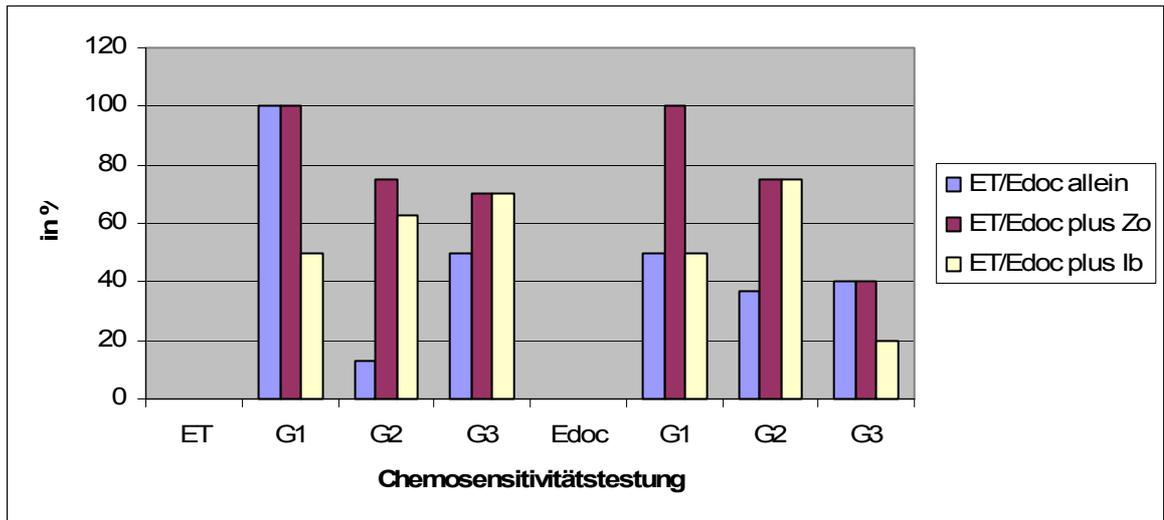


Abb.17: Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf das histologische Grading

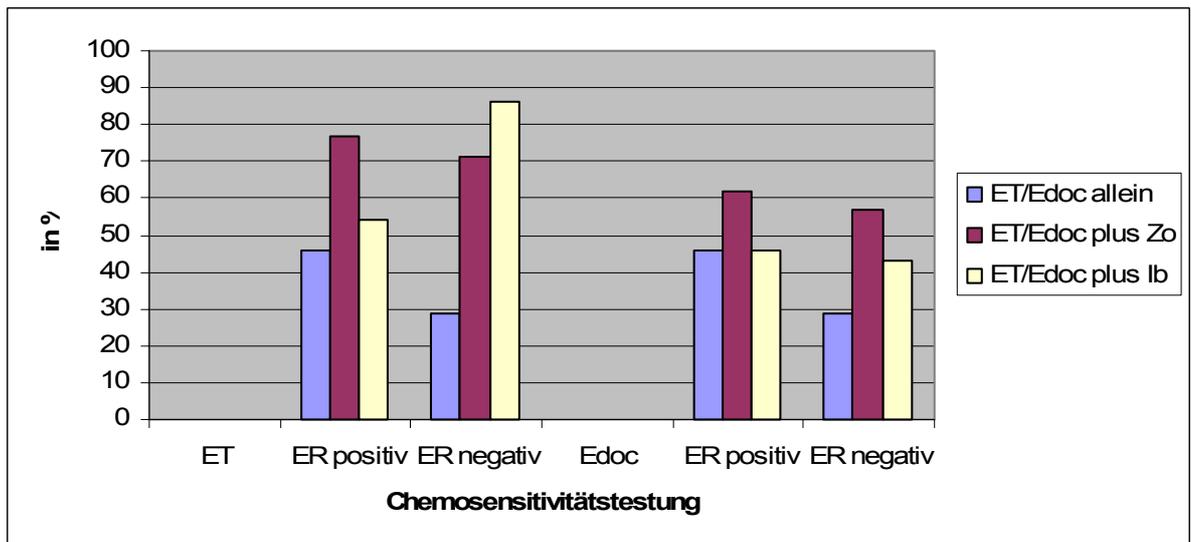


Abb.18: Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf den Östrogenrezeptor (ER)

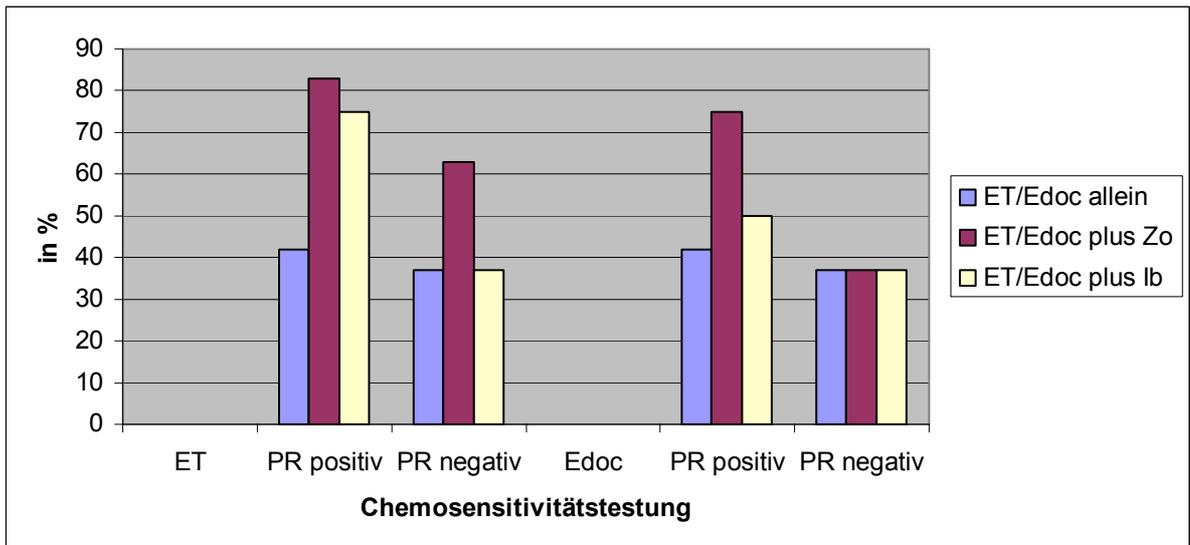


Abb.19: Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf den Progesteronrezeptor (PR)

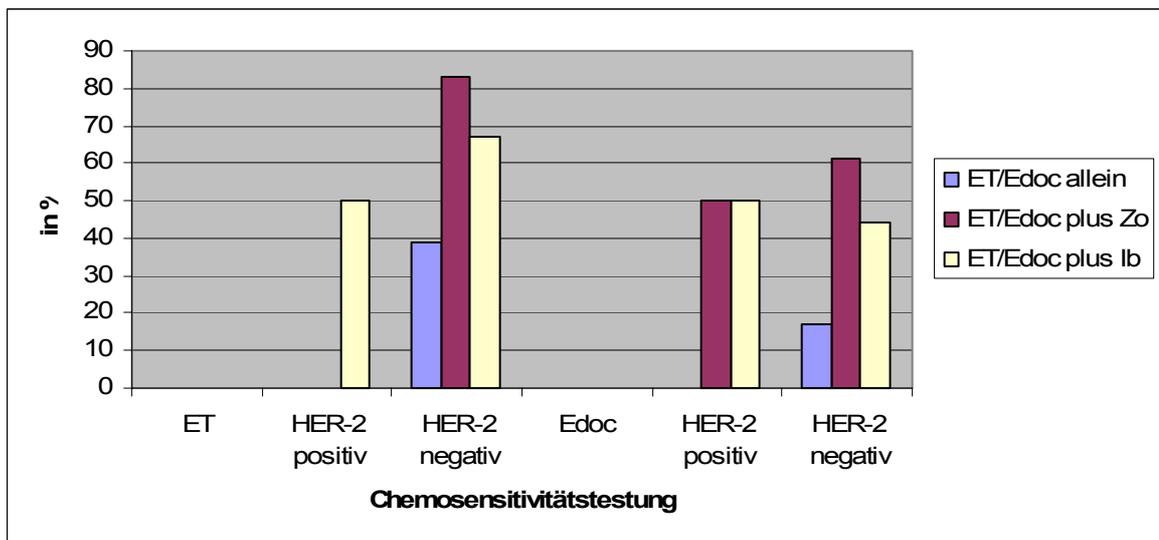


Abb.20: Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf Her-2 (DAKO)

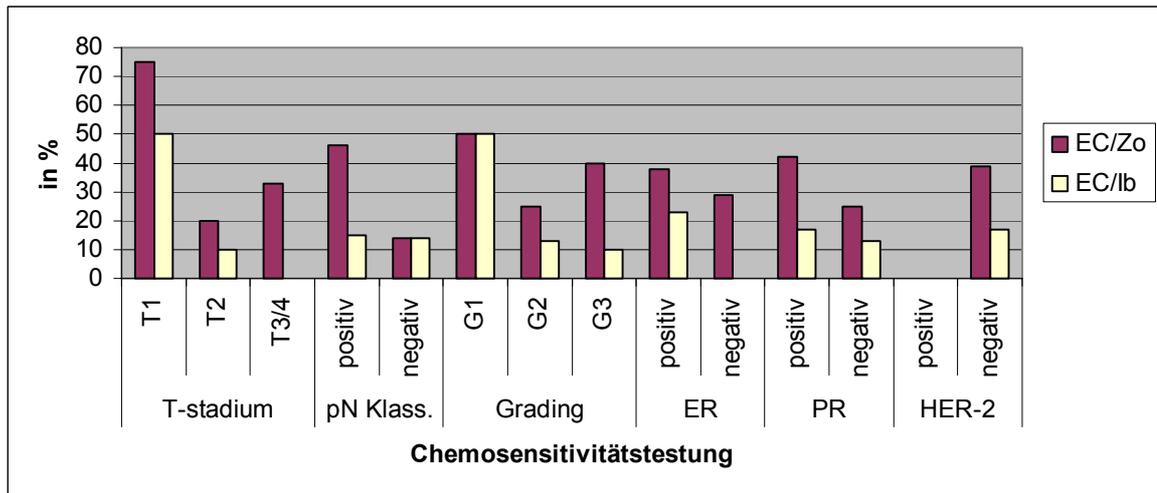


Abb.21: Chemosensitive Proben (%) bei EC in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat

3.2.1.1. Korrelation des T-Stadiums

Dem Stadium T1 konnten 20 %, dem Stadium T2 50% und dem Stadium T3/4 30 % der vorliegenden Proben zugeordnet werden (Abb.4).

Bei der Austestung der Chemosensitivität mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil zeigte keine der untersuchten Proben im ATP-CVA eine hohe Chemosensitivität an. Die Austestung von Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil in Kombination mit Zoledronat und Bondronat ergab zwar eine Erhöhung der Werte der Chemosensitivität bei Zoledronat in 85 % und bei Bondronat in 90 % der Fälle, aber nach der zu Grunde gelegten Klassifikation waren die gemessenen Werte nicht als hoch sensitiv einzuordnen ($AUC < 18000$), (Tab.8, 9, 10, Abb.12).

Die Kombinationsbehandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat zeigte eine Erhöhung der Sensitivität bei 35 % der Proben, gegenüber einer reinen Zytostatikabehandlung. Bei der Kombination mit Bondronat erhöht sich die Anzahl um 20 %, wobei die Präparate mit Stadium T1 zu 75 % bei Zoledronat und 50 % bei Bondronat am meisten profitierten (Tab.18, Abb.21). Eine reine Zytostatikabehandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid zeigte, wie auch beim Abgleich mit allen anderen Prognoseparametern, in keinem Fall eine hohe Sensitivität an (Tab.8).

Bei der Chemosensitivitätstestung mit Epirubicin/Paclitaxel, wie auch mit Epirubicin/Docetaxel, zeigten sich 40 % der Proben als chemosensitiv, wobei davon jeweils 50 % dem Stadium T2 zugehörten (Tab.15).

Werden beide Zytostatika mit Zoledronat kombiniert, zeigen sich 75 % der Epirubicin/Paclitaxel- und 60 % der Epirubicin/Docetaxel-Präparate mit einer hohen Sensitivität, wobei in den Stadien T2 mit 80 % bei Epirubicin/Paclitaxel und T1 mit 75 % bei Epirubicin/Docetaxel die prozentuale Anzahl der sensitiven Proben am größten war (Tab.16, Abb.15).

Bei der Kombination der Zytostatika Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat, zeigte sich gegenüber einer Austestung mit Epirubicin/Paclitaxel allein eine 62 %-ige und gegenüber Epirubicin/Docetaxel allein eine 12 %-ige Erhöhung der Anzahl der chemosensitiven Präparate. Bei 83 % der T 3/4 Präparate wurde eine hohe Chemosensitivität bei der Austestung der Kombination Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat gemessen (Tab.17, Abb. 15).

3.2.1.2. Korrelation des N-Stadiums

Der Lymphknotenstatus ist im analysierten Patientinnenkollektiv bei 65 % positiv (Abb.4).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab.8, 9, 10).

Die Testergebnisse des ATP-CVA zeigen bei Epirubicin/Cyclophosphamid in keinem der vorliegenden Präparate eine hohe Chemosensitivität an. Wird Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat kombiniert, wurde bei 46 % der nodalpositiven Proben eine hohe Chemosensitivität nachgewiesen. Bei einer Kombination mit Bondronat waren es mit 15 % in gleicher Patientengruppe wesentlich weniger (Tab.18, Abb.21).

Bei der Austestung mit Epirubicin/Paclitaxel zeigten 38 % der nodalpositiven Patientinnenproben im ATP-CVA eine hohe Chemosensitivität und bei Testung mit Epirubicin/Docetaxel sind es 46 % (Tab.15).

Wird Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat kombiniert, zeigen 69 % der nodalpositiven Präparate eine hohe Chemosensitivität. Das gleiche Resultat wird bei der Kombination Epirubicin/Docetaxel erreicht (Tab.16).

Bei einer Kombination Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat konnten bei 62 % und 54 % der untersuchten Proben erhöhte Werte, gegenüber einer reinen Zytostatikatherapie, bei der Chemosensitivitätstestung festgestellt werden (Tab.17).

In den 35 % nodalnegativen Proben konnte bei 71 % der mit Epirubicin/Paclitaxel in Kombination mit Bondronat und bei 57 % der mit Epirubicin/Docetaxel in Kombination

mit Zoledronat behandelten Präparate eine hohe Sensitivität und, gegenüber einer reinen Zytostatikatherapie, ein besseres Ansprechverhalten nachgewiesen werden (Abb.16).

3.2.1.3. Korrelation des histologischen Grading

Bei der histopathologischen Differenzierung zeigten 50 % der Patientinnenpräparate eine schlechte Differenzierung (G3), 40 % wiesen eine mäßige (G2) und 10 % eine gute Differenzierung (G1) der Karzinome auf. Wegen der geringen Fallzahlen wurde die Gruppe der gut bis mäßig differenzierten Karzinome zusammen betrachtet (Abb.4).

Die Auswertung der Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil ergab in keiner der vorliegenden Proben hoch sensitive Messwerte (Tab.8).

In Kombination mit Zoledronat und Bondronat konnten ebenfalls keine hoch sensitiven Werte nachgewiesen werden (Tab.9,10, Abb.12).

Die Messwerte einer Kombination Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat zeigen in 35 % und mit Bondronat in 15 % aller Proben eine hohe Sensitivität an (Tab.18, Abb.21).

Bei der Chemosensitivitätstestung mit Epirubicin/Paclitaxel wurde bei 50 % der G3-Präparate und bei 30 % der G1/G2-Präparate eine hohe Sensitivität gemessen, wobei 100 % der G1-Proben und 13 % der G2-Proben eine hohe Sensitivität aufwiesen (Tab.15).

Werden die Proben mit einer Kombination Epirubicin/Paclitaxel und Zoledronat behandelt, konnte bei 70 % der G3-Karzinome und bei 80 % der G1/G2-Karzinome eine hohe Chemosensitivität nachgewiesen werden, wobei **G1 100 % und G2 75 %** (Tab.16).

Die Messergebnisse bei der Testung mit Epirubicin/Docetaxel wiesen in der G1/G2 Gruppe, ebenso wie in der G3 Gruppe, in 40 % eine hohe Chemosensitivität auf (Tab.15).

Bei der Kombinationstherapie von Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat weisen die gut bis mäßig differenzierten (G1/G2) Karzinompräparate in 80 % eine hohe Sensitivität auf, wobei **G1 100 % und G2 75 %**. Bei den G3 Karzinomen zeigten die Messwerte für 40 % der mit Epirubicin/Docetaxel und Zoledronat behandelten Proben eine hohe Chemosensitivität an (Tab.16).

Betrachtet man alle Proben, G1-G3, zusammen, konnten bei jeweils 40 % der Patientinnen mit einer alleinigen Zytostatikatherapie hohe Chemosensitivitätswerte gemessen werden.

Wird Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat kombiniert, sprechen 75 % und bei Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat 60 % des Patientinnenkollektives mit einer hohen Sensitivität auf die jeweilige Therapie an (Tab.16).

Bei der Chemosensitivitätstestung mit Bondronat zeigen die gut bis mäßig differenzierten Karzinome (G1 und G2) in Kombination mit Epirubicin/Paclitaxel in 60 % und bei Kombination mit Epirubicin/Docetaxel in 70 % der Fälle eine hohe Sensitivität. Bei den schlecht differenzierten Karzinomen (G3) weisen die Messergebnisse in 70 % der mit einer Kombination Epirubicin/Paclitaxel und Bondronat und in 20 % der Kombination Epirubicin/Docetaxel und Bondronat ausgetesteten Proben eine hohe Sensitivität auf (Tab.17, Abb.17).

3.2.1.4. Korrelation mit dem Östrogenrezeptor (Immunhistochemie)

Die Einteilung des Östrogenrezeptorstatus erfolgt in eine rezeptorpositive und eine rezeptornegative Gruppe. In vorliegendem Krankengut waren 65 % der Proben rezeptorpositiv und 35 % rezeptornegativ (Abb.5).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Wurden die Karzinome mit Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat bzw. Bondronat behandelt, zeigt der ATP-CVA eine hohe Sensitivität bei 38 % bzw. 23 % der rezeptorpositiven Präparate an (Tab. 18, Abb. 21).

Bei der Behandlung der rezeptorpositiven Präparate mit Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel wiesen die Messwerte jeweils in 46 % eine hohe Chemosensitivität auf (Tab.15). Wird Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat kombiniert, zeigen diese Präparate im ATP-CVA in 77 % der Fälle eine hohe Sensitivität an. Bei der Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat zeigen 62 % der Proben diesen Effekt (Tab.16). Bei einer Medikamentenkombination Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat wurde in 54 % und bei Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat in 46 % der rezeptorpositiven Fälle eine hohe Chemosensitivität nachgewiesen (Tab.17, Abb.18).

Betrachtet man die Östrogenrezeptornegative Gruppe, zeigen sich bei einer Zytostatikatherapie mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel jeweils 29 % der Proben hochsensitiv (Tab.15). Wird Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat kombiniert, erhöht sich die Anzahl der Präparate mit hoher Chemosensitivität auf 71 % und bei der Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat auf 57 % (Tab.16).

Auch die Kombination mit Bondronat weist für Epirubicin/Paclitaxel mit 85 % eine wesentlich erhöhte Anzahl von Präparaten mit einer hohen Sensitivität auf. Die Kombination Epirubicin/Docetaxel zeigte diesen Effekt bei 43 % (Tab.17, Abb.18).

3.2.1.5. Korrelation mit dem Progesteronrezeptor (Immunhistochemie)

Wie beim Östrogenrezeptor, überwiegt auch beim Progesteronrezeptor, mit 60 %, der Anteil der rezeptorpositiven Patientinnenpräparate (Abb.5).

Die Auswertung der Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil ergab in keiner der vorliegenden Proben hoch sensitive Messwerte (Tab.8).

In Kombination mit Zoledronat und Bondronat konnten ebenfalls keine hoch sensitiven Werte nachgewiesen werden (Tab.9, 10, Abb.12).

Bei einer Zytostatikabehandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid konnte in keiner Probe eine hohe Sensitivität nachgewiesen werden (Tab.8).

Der Abgleich der Medikamentenkombination Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat zeigte in 42 % der rezeptorpositiven und in 25 % der rezeptornegativen Fälle eine hohe Chemosensitivität. In Kombination mit Bondronat wurde eine hohe Sensitivität bei 17 % der rezeptorpositiven und bei 13 % der rezeptornegativen Fälle nachgewiesen (Tab.18, Abb.21)

Bei der Testung mit Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel zeigten im ATP-CVA jeweils 42 % der Proben dieser Patientinnen eine hohe Sensitivität auf (Tab.15).

Kombiniert man Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat weisen die Messwerte bei 83 % der rezeptorpositiven Karzinome eine hohe Chemosensitivität auf. Mit 75 % weisen diese Präparate bei einer Kombinationsbehandlung von Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat eine ähnlich hohe Chemosensitivitätsrate auf (Tab. 16, Abb.19).

Wird Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat kombiniert, erhöht sich die Anzahl der rezeptorpositiven Präparate mit einer hohen Sensitivität um 16 %, auf entsprechend 58 % aller rezeptorpositiven Tumore, und bei der Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat um 8 %, entsprechend 50 % aller rezeptorpositiven Tumore, gegenüber der reinen Zytostatikatherapie (Tab.17, Abb.19).

Die Gruppe mit negativem Progesteronrezeptor umfasste 40 % des vorliegenden Patientenmaterials. Sowohl eine Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel, als auch mit Epirubicin/Docetaxel zeigte bei Auswertung des ATP-CVA in 37 % dieser Fälle eine hohe

Chemosensitivität (Tab. 15). Den gleichen Effekt zeigte die Austestung der Proben, welche mit einer Kombination Epirubicin/Docetaxel und Zoledronat behandelt wurden. Verwendete man Epirubicin/Paclitaxel in Kombination mit Zoledronat, erhöht sich der Anteil der hoch sensitiven Proben auf 63 % (Tab.16, Abb.19).

Eine ähnliche Reaktion zeigten die rezeptornegativen Karzinome bei einer Kombinationsbehandlung mit Bondronat. Die Auswertung des ATP-CVA zeigte bei 37 % der mit Epirubicin/Docetaxel und Bondronat behandelten Proben den gleichen Wert wie die Kombination mit Zoledronat. Bei Kombination der Medikamente Epirubicin/Paclitaxel und Bondronat reagieren 75 % der progesteronrezeptornegativen Patientinnen mit einer hohen Chemosensitivität (Tab.17, Abb.19).

3.2.1.6. Korrelation mit HER-2 (Immunhistochemie)

Der DAKO-Score wird in Werten zwischen 0 und 3 angegeben (Tab.2). Das Ergebnis 3 ist ein eindeutig positives Ergebnis (mehr als 10 % der Tumorzellen waren stark angefärbt) und betraf 10 % der vorliegenden Karzinompräparate. Alle Patientinnen mit einem Testergebnis 0 bis 2 im DAKO Hercep Test, wurden in der Gruppe mit einer negativen DAKO-Score zusammengefasst, was entsprechend 90% der Proben betraf (Abb.5).

Die Auswertung bezieht sich im folgendem auf die Patienten mit negativer DAKO-Score.

Die Auswertung der Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil ergab in keiner der vorliegenden Proben, auch in Kombination mit Zoledronat oder Bondronat, hoch sensitive Messwerte (Tab.8, 9, 10, Abb.12).

Eine Behandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid lässt, wie bereits erwähnt, in keiner Probe eine hohe Sensitivität erkennen. In Kombination mit Zoledronat zeigen 39 % und mit Bondronat 17 % der Tumore im ATP-CVA eine hohe Chemosensitivität (Tab.18, Abb.21)

Der Abgleich mit den Werten der Chemosensitivitätstestung zeigte bei einer Chemotherapie mit Epirubicin/Paclitaxel, dass 39 % der Proben mit negativer DAKO-Score hoch sensitiv reagieren. Wurden diese Präparate mit Epirubicin/Docetaxel behandelt, ist eine hohe Sensitivität bei 17 % dieser Proben nachzuweisen (Tab.15, Abb.20).

Kombiniert man Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat, zeigen 83 % der Karzinompräparate eine hohe Chemosensitivität an. Bei 61 % der Patienten dieser Gruppe ist eine hohe Sensitivität nach einer Behandlung mit Epirubicin/Docetaxel in Verbindung mit Zoledronat nachzuweisen (Tab.16, Abb.20).

Wurden vorliegende Tumore nach einer Kombinationstherapie mit Epirubicin/Paclitaxel und Bondronat ausgetestet, zeigen 67 % und bei der Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat 44 % der Präparate eine hohe Chemosensitivität (Tab.17, Abb.20).

3.2.2. Korrelation der Chemosensitivität mit neueren prognostischen und prädiktiven Faktoren

Erlangt ein neuer Prognosefaktor eine von anderen Kriterien unabhängige Voraussagekraft, kann er zusätzlich zu den etablierten klinischen und histomorphologischen Parametern wichtige Informationen liefern. Hier liegt das Hauptindikationsgebiet der modernen Prognosefaktoren. Mit ihrer Hilfe sollen die Patientinnen herausgefiltert werden (vor allem Nodalnegative), die ein erhöhtes Rezidivrisiko aufweisen und somit von einer adjuvanten Chemotherapie profitieren würden.

In vorliegender Studie wurden die Messwerte der Hormonrezeptoren, der Onkogene, der Proliferations/DNS-Indices und der proteolytischen Enzyme mit den AUC-Werten der ATP-TCA abgeglichen, um eventuelle Tendenzen für ein Therapieregime herauszufiltern. Wie bei den klassischen Faktoren, wurden nur die relevanten Werte berücksichtigt.

Tab.19 Ansprechen vs. Nichtansprechen der Hormonrezeptoren bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			ET	%	Edoc	%	ET	%	Edoc	%
Progesteronrezeptor Expression										
positiv	13	65	5	38	5	38	8	62	8	62
negativ	7	35	3	43	3	43	4	57	4	57
Estrogenrezeptor Expression										
positiv	13	65	5	38	5	38	8	62	8	62
negativ	7	35	3	43	3	43	4	57	4	57
pS2 Expression										
positiv	16	80	6	37	6	37	10	63	10	63
negativ	4	20	2	50	2	50	2	50	2	50

Tab.20 Ansprechen vs. Nichtansprechen der Onkogene bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			ET	%	Edoc	%	ET	%	Edoc	%	
erb B-1 del./ampl.	16	80	7	44	8	50	9	56	8	50	
normwertig	4	20	1	25	0	0	3	75	4	100	
erb B-2 amplifiziert	3	15	1	33	0	0	2	67	3	100	
normwertig	17	85	7	41	8	47	10	59	9	53	
erb B-4 amplifiziert	1	5	1	100	1	100	0	0	0	0	
normwertig	19	95	7	37	7	37	12	63	12	63	
erb B1/erb B2											
nicht normwertig	9	45	4	44	3	33	5	56	6	67	
normwertig	11	55	4	36	5	45	7	64	6	55	
Her-2/Neu Expression											
Überexpression	6	30	1	17	1	17	5	83	5	83	
normwertig	14	70	7	50	7	50	7	50	7	50	
c-myc amplifiziert	3	15	2	67	1	33	1	33	2	67	
normwertig	17	85	6	35	7	41	11	65	10	59	

Tab.21 Ansprechen vs. Nichtansprechen der Proliferation/DNA-Indices bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			ET	%	Edoc	%	ET	%	Edoc	%
DNA-Index (flow)										
aneuploid	9	47	4	44	3	33	5	56	6	67
diploid	10	53	4	40	5	50	6	60	5	50
S-Phase (flow)										
erhöht	10	53	4	40	3	30	6	60	7	70
normwertig	9	47	4	44	5	56	5	56	4	44
G0/G1 (flow)										
nicht normwertig	7	37	3	43	3	43	4	57	4	57
normwertig	12	63	5	42	5	42	7	58	7	58
G2/M-Phase										
nicht normwertig	3	16	3	100	1	33	0	0	2	67
normwertig	16	84	5	31	7	44	11	69	9	56

Tab.22 Ansprechen vs. Nichtansprechen der proteolytischen Enzyme bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			ET	%	Edoc	%	ET	%	Edoc	%
Topoisomerase-II-alpha										
Überexpression	3	15	1	33	1	33	2	67	2	67
normwertig	17	85	7	41	7	41	10	59	10	59
uPA-Expression										
Überexpression	2	10	1	50	1	50	1	50	1	50
normwertig	18	90	7	39	7	39	11	61	11	61
PAI-Expression										
Überexpression	3	15	0	0	1	33	3	100	2	67
normwertig	17	85	8	47	7	41	9	53	10	59

Tab.23 Ansprechen vs. Nichtansprechen der Hormonrezeptoren bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat

Tab.23a Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			ET/Z	%	EDoc/Z	%	ET/Z	%	EDoc/Z	%	
Progesteronrezeptor Expression											
positiv	13	65	10	77	7	54	3	23	6	46	
negativ	7	35	5	71	5	71	2	29	2	29	
Estrogenrezeptor Expression											
positiv	13	65	9	69	6	46	4	31	7	54	
negativ	7	35	6	86	6	86	1	14	1	14	
pS2 Expression											
positiv	16	80	11	69	8	50	5	31	8	50	
negativ	4	20	4	100	4	100	0	0	0	0	

Tab.23b Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv			nicht sensitiv			%	
			ET/B	%	EDoc/B	ET/B	%	EDoc/B		
Progesteronrezeptor Expression										
positiv	13	65	10	77	5	38	3	23	8	62
negativ	7	35	3	43	4	57	4	57	3	43
Estrogenrezeptor Expression										
positiv	13	65	9	69	4	31	4	31	9	69
negativ	7	35	4	57	5	71	3	43	2	29
pS2 Expression										
positiv	16	80	10	63	6	37	6	37	10	63
negativ	4	20	3	75	3	75	1	25	1	25

Tab.23c Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			EC/Z	%	EC/B	%	EC/Z	%	EC/B	%
Progesteronrezeptor Expression										
positiv	13	65	3	23	1	8	10	77	12	92
negativ	7	35	4	57	2	29	3	43	5	71
Estrogenrezeptor Expression										
positiv	13	65	9	69	4	31	4	31	9	69
negativ	7	35	4	57	5	71	3	43	2	29
pS2 Expression										
positiv	16	80	10	63	6	37	6	37	10	63
negativ	4	20	3	75	3	75	1	25	1	25

Tab.24 Ansprechen vs. Nichtansprechen der Onkogene bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat

Tab.24a Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat

Prognoseparameter	Anz.	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			ET/Z	%	Edoc /Zol	%	ET/Z	%	Edoc /Zol	%	
erb B-1 del./ampl.	16	80	12	75	9	56	4	25	7	44	
normwertig	4	20	3	75	3	75	1	25	1	25	
erb B-2 amplifiziert	3	15	2	67	2	67	1	33	1	33	
normwertig	17	85	10	59	10	59	7	41	7	41	
erb B-4 amplifiziert	1	5	1	100	1	100	0	0	0	0	
normwertig	19	95	7	37	7	37	12	63	12	63	
erb B1/erb B2											
nicht normwertig	9	45	4	44	3	33	5	56	6	67	
normwertig	11	55	4	36	5	45	7	64	6	55	
Her-2/Neu Expression											
Überexpress	6	30	1	17	1	17	5	83	5	83	
normwertig	14	70	7	50	7	50	7	50	7	50	
c-myc amplifiziert	3	15	2	67	1	33	1	33	2	67	
normwertig	17	85	6	35	7	41	11	65	10	59	

Tab.24b Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat

Prognoseparameter		sensitiv						nicht sensitiv			
		Anzahl	%	ET/B	%	Edoc /Bo	%	ET/B	%	Edoc /Bo	%
erb B-1	del./ampl.	16	80	11	69	8	50	5	31	8	50
	normwertig	4	20	2	50	1	25	2	50	3	75
erb B-2	amplifiziert	3	15	2	67	1	33	1	33	2	67
	normwertig	17	85	11	65	8	47	6	35	9	53
erb B-4	amplifiziert	1	5	1	100	1	100	0	0	0	0
	normwertig	19	95	12	63	8	42	7	37	11	58
erb B1/erb B2											
	nicht normwertig	9	45	5	56	3	33	4	44	6	67
	normwertig	11	55	8	73	6	55	3	27	5	45
Her-2 / Neu Expression											
	Überexpress.	6	30	5	83	2	33	1	17	4	67
	normwertig	14	70	8	57	7	50	6	43	7	55
c-myc	amplifiziert	3	15	2	67	1	33	1	33	2	67
	normwertig	17	85	11	65	8	47	6	35	9	53

Tab.24c Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat

Prognoseparameter		sensitiv				nicht sensitiv					
		Anzahl	%	EC/Z	%	EC/B	%	EC/Z	%	EC/B	%
erb B-1	del./ampl.	16	80	5	31	3	19	11	69	13	81
	normwertig	4	20	2	50	0	0	2	50	4	100
erb B-2	amplifiziert	3	15	2	67	0	0	1	33	3	100
	normwertig	17	85	5	29	3	18	12	71	14	82
erb B-4	amplifiziert	1	5	0	0	0	0	1	100	1	100
	normwertig	19	95	7	37	3	16	12	63	16	84
erb B1/erb B2											
	nicht normwertig	9	45	2	22	0	0	7	78	9	100
	normwertig	11	55	5	45	3	27	6	55	8	73
Her-2 / Neu Expression											
	Überexpression	6	30	2	33	0	0	4	67	6	100
	normwertig	14	70	5	36	3	21	9	64	11	69
c-myc	amplifiziert	3	15	1	33	0	0	2	67	3	100
	normwertig	17	85	6	35	3	18	11	65	14	82

Tab.25 Ansprechen vs. Nichtansprechen der Proliferation bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat

Tab.25a Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			ET/Z	%	EdocZ	%	ET/Z	%	Edoc/Z	%
DNA-Index (flow)										
aneuploid	9	47	6	67	6	67	3	33	3	33
diploid	10	53	8	80	6	60	2	20	4	40
S-Phase (flow)										
erhöht	10	53	7	70	7	70	3	30	3	30
normwertig	9	47	7	78	5	56	2	22	4	44
G0/G1 (flow)										
nicht normwertig	7	37	5	71	6	86	2	29	1	14
normwertig	12	63	9	75	6	50	3	25	6	50
G2/M-Phase										
nicht normwertig	3	16	2	67	2	67	1	33	1	33
normwertig	16	84	12	75	10	63	4	25	6	47

Tab.25b Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			ET/B	%	Edoc/B	%	ET/B	%	Edoc/B	%
DNA-Index (flow)										
aneuploid	9	47	6	67	4	44	3	33	5	56
diploid	10	53	6	60	5	50	4	40	5	50
S-Phase (flow)										
erhöht	10	53	7	70	6	60	3	30	4	40
normwertig	9	47	5	56	3	33	4	44	6	67
G0/G1 (flow)										
nicht normwertig	7	37	5	71	5	71	2	29	2	29
normwertig	12	63	7	58	4	33	5	42	8	67
G2/M-Phase										
nicht normwertig	3	16	2	67	1	33	1	33	2	67
normwertig	16	84	10	63	8	50	6	37	8	50

Tab.25c Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			EC/Z	%	EC/B	%	EC/Z	%	EC/B	%	
DNA-Index (flow)											
aneuploid	9	47	5	56	2	22	4	44	7	78	
diploid	10	53	2	20	1	10	8	80	9	90	
S-Phase (flow)											
erhöht	10	53	5	50	2	20	5	50	8	80	
normwertig	9	47	2	22	1	11	7	78	8	89	
G0/G1 (flow)											
nicht normwertig	7	37	5	71	2	29	2	29	5	71	
normwertig	12	63	2	17	1	8	10	83	11	92	
G2/M-Phase											
nicht normwertig	3	16	2	67	1	33	1	33	2	67	
normwertig	16	84	5	31	2	13	11	69	14	87	

Tab.26 Ansprechen vs. Nichtansprechen der proteolytischen Enzyme bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat

Tab.26a Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv				
			ET/Z	%	Edoc/Z	%	ET/Z	%	Edoc/Z	%	
Topoisomerase-II-alpha											
Überexpression	3	15	3	100	3	100	0	0	0	0	0
normwertig	17	85	12	71	9	53	5	29	8	47	47
uPA-Expression											
Überexpression	2	10	2	100	1	50	0	0	1	50	50
normwertig	18	90	13	72	11	61	5	28	7	39	39
PAI-Expression											
Überexpression	3	15	3	100	3	100	0	0	0	0	0
normwertig	17	85	12	71	9	53	5	29	8	47	47

Tab.26b Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			ET/B	%	Edoc/B	%	ET/B	%	Edoc/B	%
Topoisomerase-II-alpha										
Überexpression	3	15	1	33	1	33	2	67	2	67
normwertig	17	85	12	71	8	47	5	29	9	53
uPA-Expression										
Überexpression	2	10	2	100	1	50	0	0	1	50
normwertig	18	90	11	61	8	44	7	39	10	56
PAI-Expression										
Überexpression	3	15	1	33	2	67	2	67	1	33
normwertig	17	85	12	71	7	41	5	29	10	59

Tab.26c Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat

Prognoseparameter	Anzahl	%	sensitiv				nicht sensitiv			
			EC/Z	%	EC/B	%	EC/Z	%	EC/B	%
Topoisomerase-II-alpha										
Überexpression	3	15	2	67	1	33	1	33	2	67
normwertig	17	85	5	29	2	12	12	71	15	88
uPA-Expression										
Überexpression	2	10	0	0	0	0	2	100	2	100
normwertig	18	90	7	39	3	17	11	61	15	83
PAI-Expression										
Überexpression	3	15	2	67	1	33	1	33	2	67
normwertig	17	85	5	29	2	12	12	71	15	88

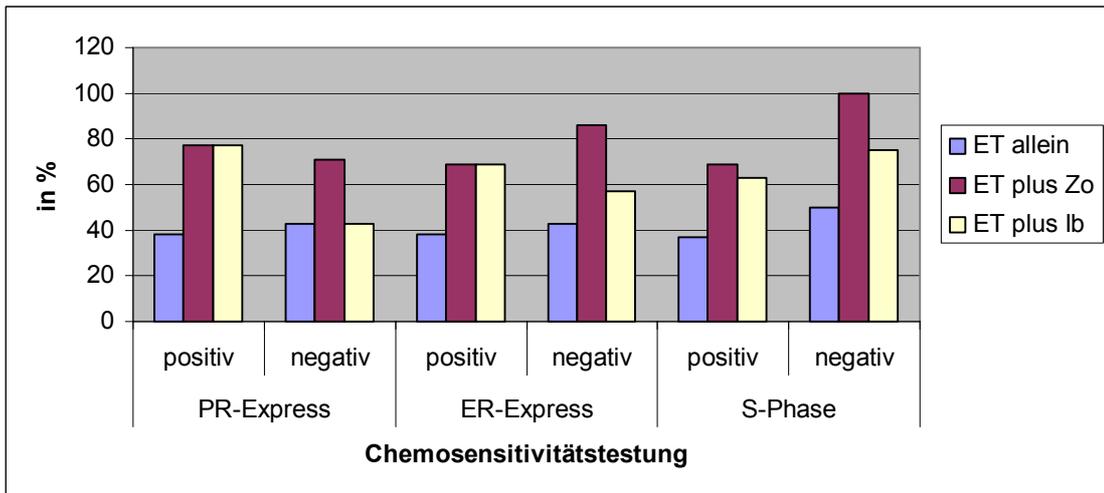


Abb.22: Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Hormonrezeptoren (PR Express = Progesteronrezeptor Expression; ER Express = Östrogenrezeptor Expression)

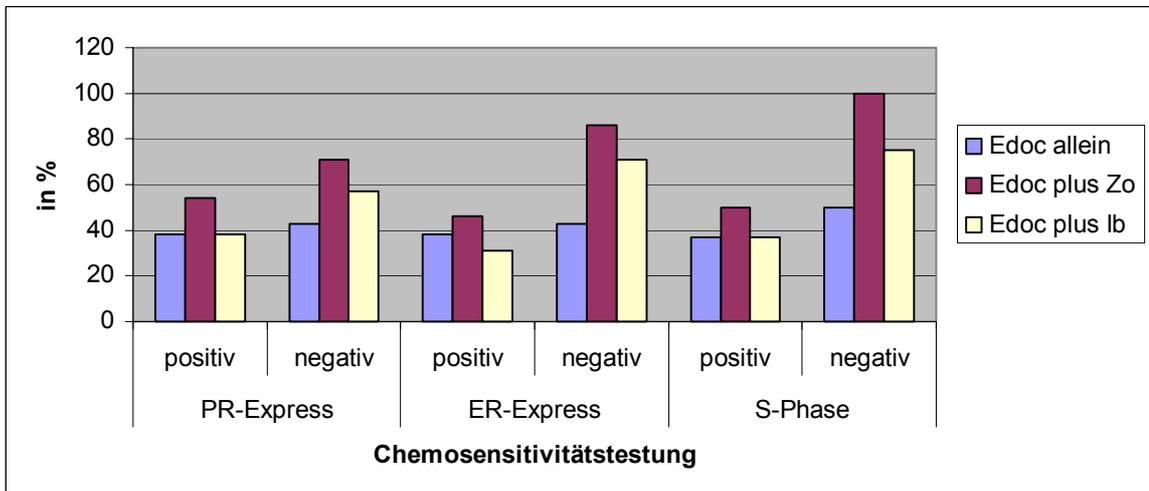


Abb.23: Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Hormonrezeptoren (PR Express = Progesteronrezeptor Expression; ER Express = Östrogenrezeptor Expression)

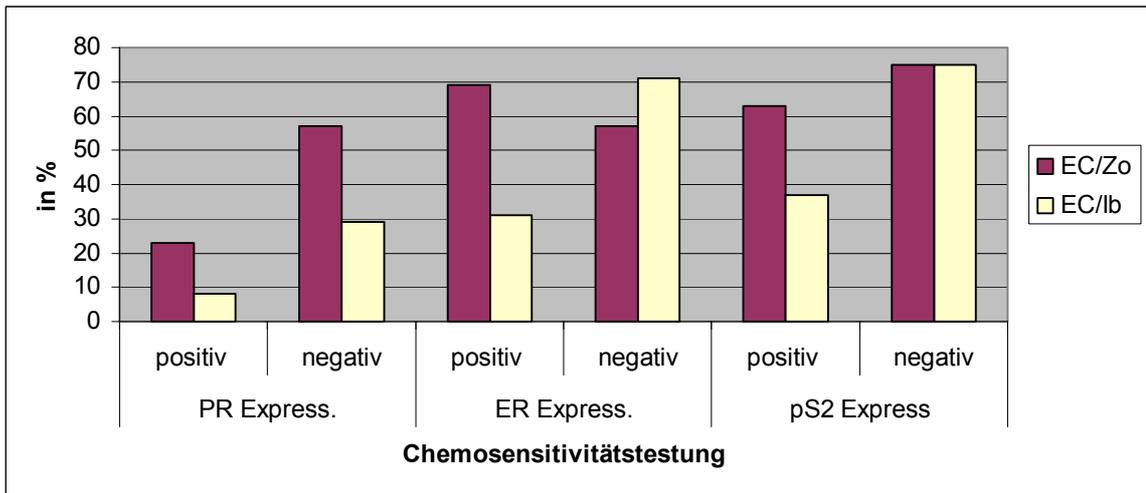


Abb.24: Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei den Hormonrezeptoren

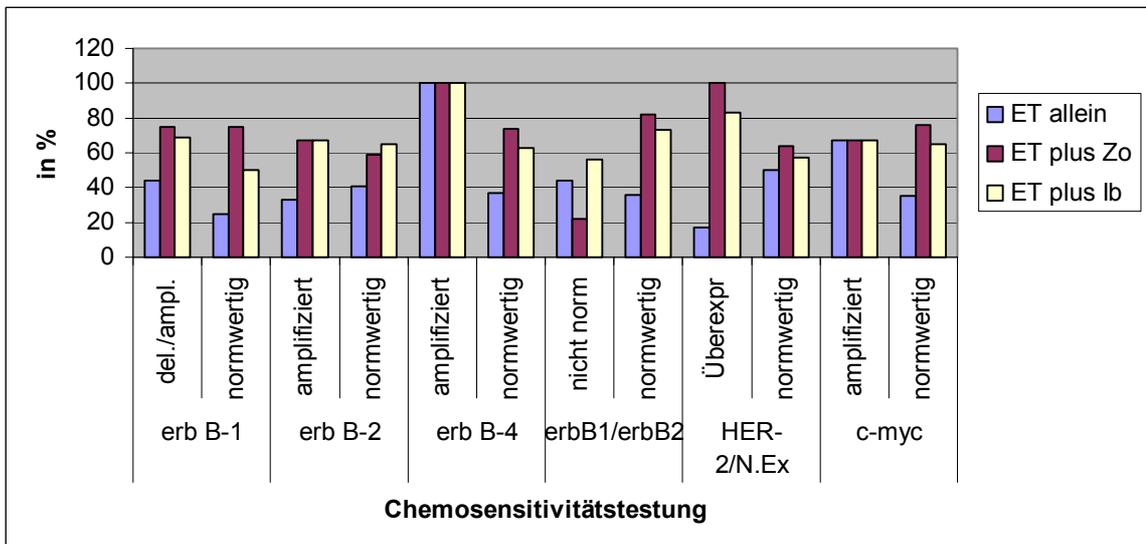


Abb.25: Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Onkogene

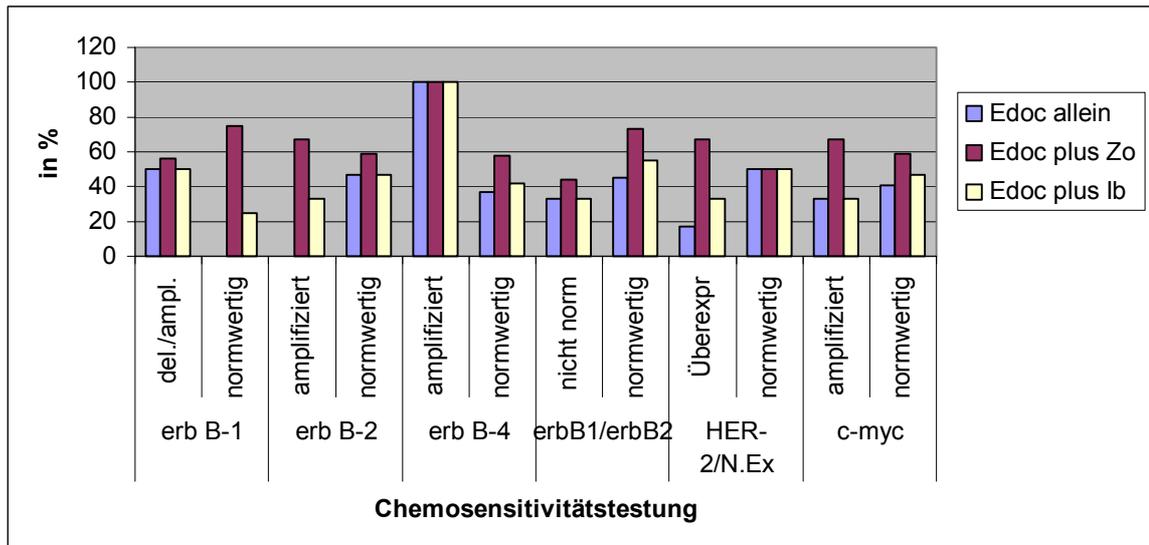


Abb.26: Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Onkogene

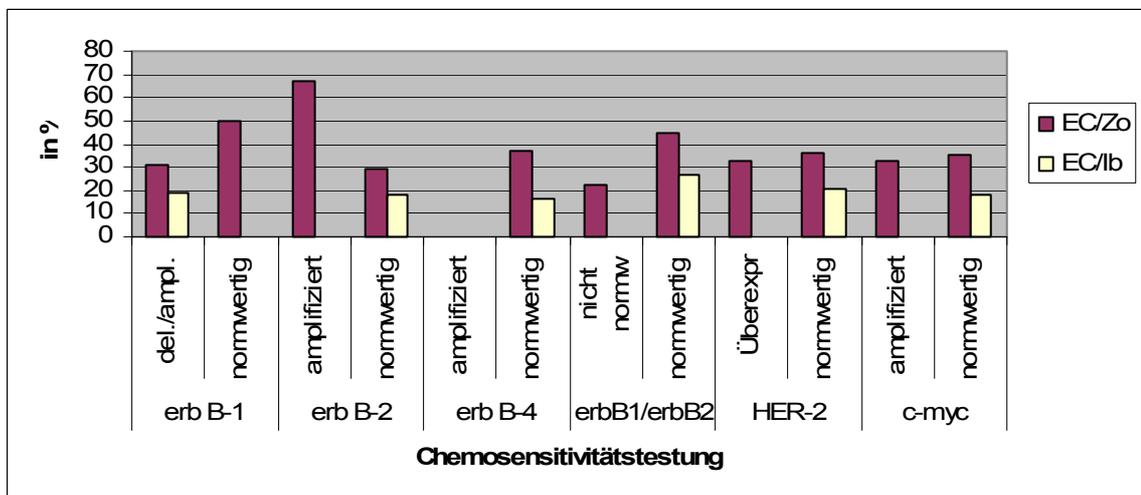


Abb.27: Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei den Onkogenen

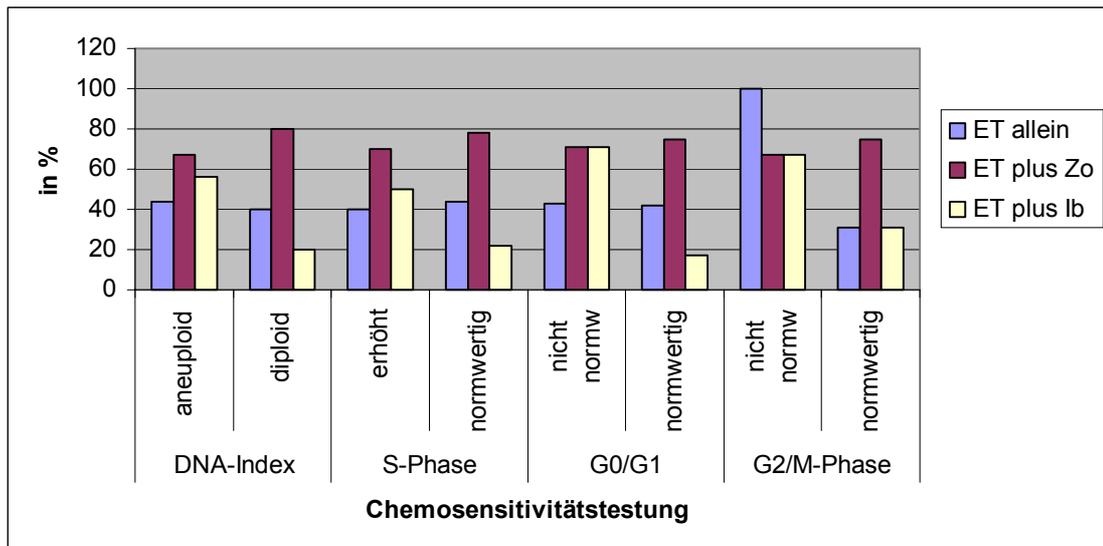


Abb.28: Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Proliferation

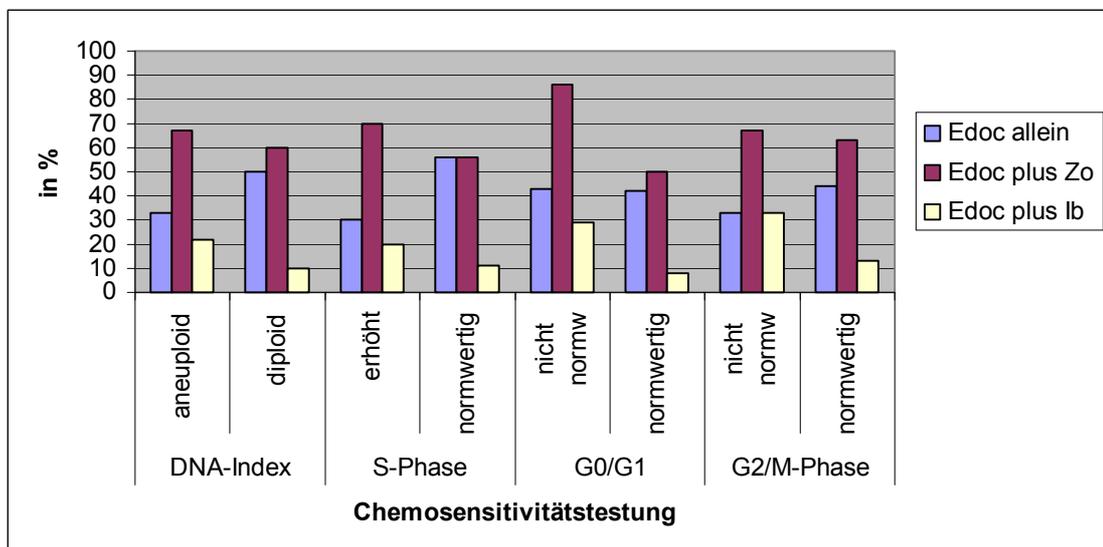


Abb.29: Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Proliferation

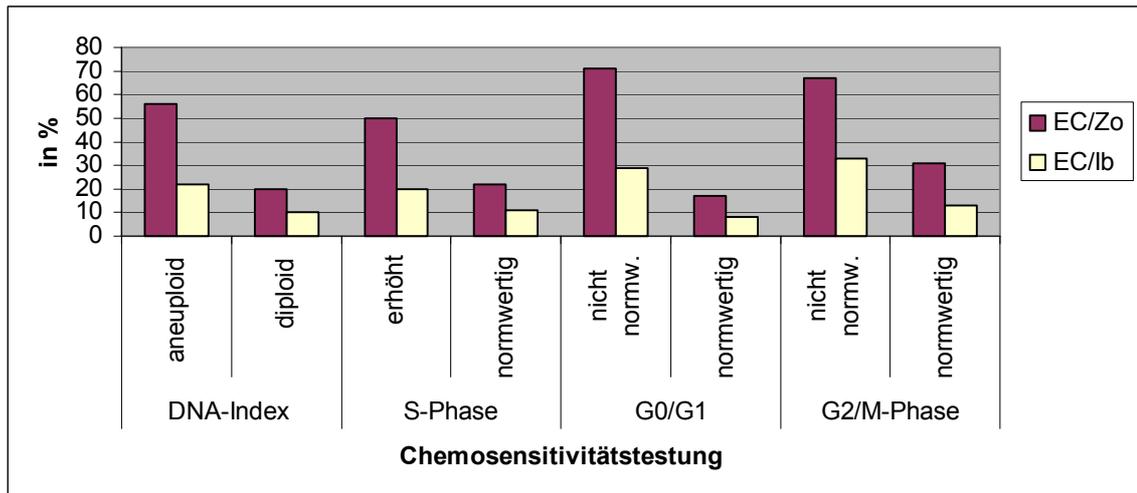


Abb.30: Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei der Proliferation

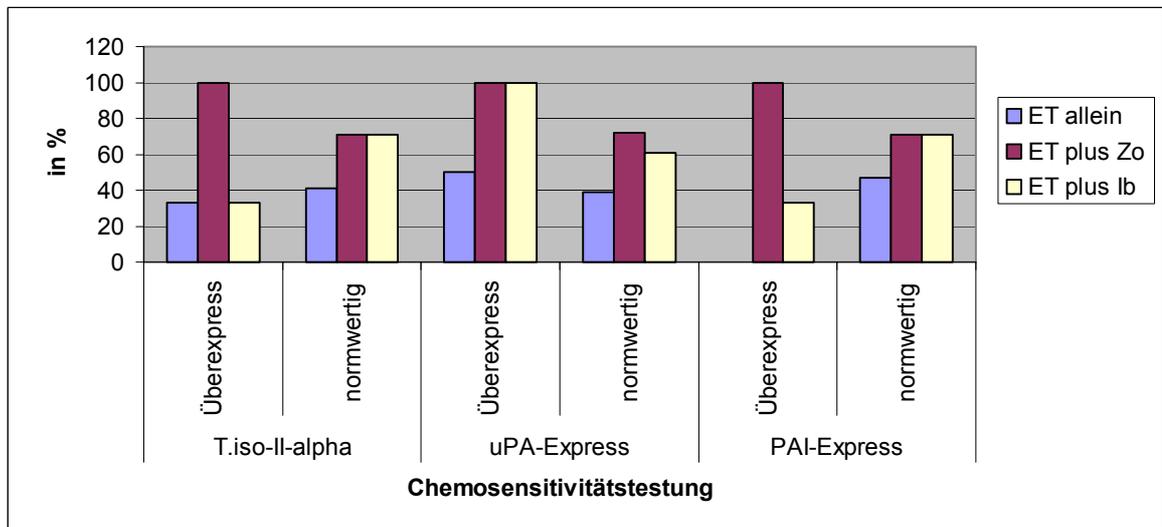


Abb.31: Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die proteolytischen Enzyme

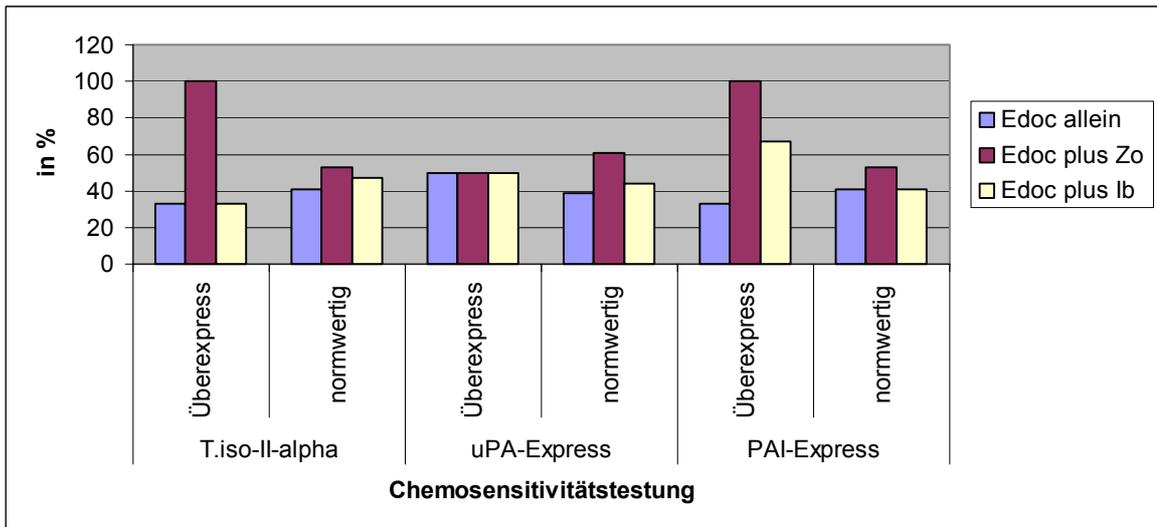


Abb.32: Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die proteolytischen Enzyme

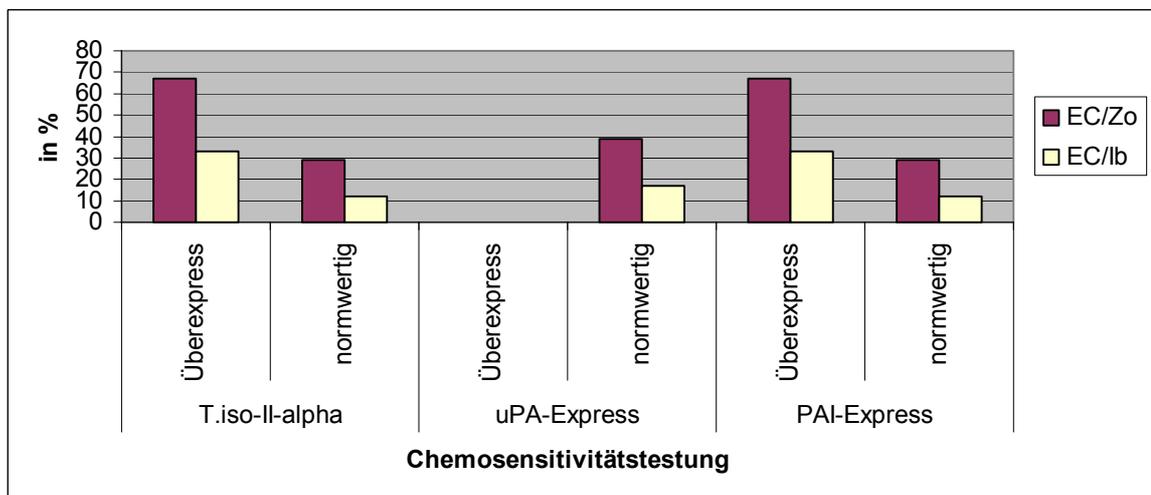


Abb.33: Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei den proteolytischen Enzymen

3.2.2.1. Korrelation mit den Hormonrezeptoren (PCR)

Für die Auswertung wurden die Messwerte der Progesteronrezeptor-, Östrogenrezeptor- und pS2- Expression ermittelt, so dass darauf basierend das Patientinnenkollektiv in eine Gruppe mit positiver und eine mit negativer Expression unterteilt werden konnte (Tab.3). Anschliessend wurden diese Werte, den Daten der Chemosensitivitätstestung gegenübergestellt.

Die Karzinome zeigten bei 65 % der Patientinnen eine positive Expression des Progesteronrezeptors (Tab.3, Abb.6).

Bei der Austestung der Chemosensitivität mit Cyclophosphamid/Metotrexat/5-fluorouracil zeigte keine der untersuchten Proben im ATP-CVA eine hohe Chemosensitivität an. Die Austestung von Cyclophosphamid/Metotrexat/5-fluorouracil in Kombination mit Zoledronat und Bondronat ergab zwar eine Erhöhung der Werte der Chemosensitivität bei Zoledronat in 85 % und bei Bondronat in 90 % der Fälle, aber nach der zu Grunde gelegten Klassifikation waren die gemessenen Werte nicht als hoch sensitiv einzuordnen ($AUC < 18000$), (Tab.8, 9, 10, Abb.12).

Die Auswertung der reinen Chemotherapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid, zeigte in keiner der untersuchten Tumorproben hohe Chemosensitivitätswerte an. Betrachtet man die Messergebnisse einer Epirubicin/Cyclophosphamid Therapie in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat oder Bondronat, profitieren Patientinnen mit negativer Progesteronrezeptor-, positiver Östrogenrezeptor- und negativer pS2-Expression am meisten davon. Bei der Kombinationsbehandlung Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat zeigen 57 % der Patienten mit negativer Progesteronrezeptor Expression, 69 % mit positiver Östrogenrezeptor Expression und 75 % mit negativer pS2- Expression hohe Chemosensitivitätswerte. Verwendete man Bondronat als Bisphosphonat, so wiesen 29 % der Patientinnen mit negativer Progesteronrezeptor Expression, 71 % mit negativer Östrogenrezeptor Expression und 75 % der Patientinnen mit negativer pS2- Expression hohe Chemosensitivitätswerte auf. Im Vergleich dazu zeigten die Messwerte der Karzinome mit positiver Progesteronrezeptor Expression bei einer Epirubicin/Cyclophosphamid Therapie in Kombination mit Zoledronat in 23 % und in Kombination mit Bondronat in 8 % der Fälle eine hohe Sensitivität an. In 63 % der Fälle zeigte sich nach einer Behandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat und in 37 % nach einer Epirubicin/Cyclophosphamid und Bondronat Gabe bei Karzinomen mit positiver pS2- Expression, eine hohe Chemosensitivität (Tab.23c, Abb.24).

Bei einer alleinigen Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel wurde in jeweils 38 % dieser Proben eine hohe Sensitivität gemessen (Tab.19). Wird Epirubicin/Paclitaxel mit dem Bisphosphonat Zoledronat kombiniert zur Behandlung gebracht, lässt sich eine hohe Chemosensitivität bei 77 % vorliegender Proben nachweisen. Denselben Effekt zeigt der Test, wenn Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat kombiniert wurde (Tab.23a, Abb.22). Bei der Verwendung von Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Zoledronat gelingt dieser Nachweis bei 54 % der Proben. Die Austestung der Chemosensitivität in der Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat, zeigte bei 38 % der Patientinnen hohe Sensitivitätswerte (Tab. 23b, Abb.23).

Bei 35 % der Karzinome zeigen die Messwerte eine negative Progesteronrezeptor-Expression an. In dieser Gruppe führt eine alleinige Chemotherapie sowohl mit Epirubicin/Paclitaxel wie auch mit Epirubicin/Docetaxel bei 43 % der Proben zu einer hohen Sensitivität (Tab.19). Kombiniert man Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat, lässt sich im ATP-CVA bei jeweils 71 % der Präparate eine hohe Chemosensitivität nachweisen (Tab.23a/b). In Verbindung mit Bondronat weisen 43 % der mit Epirubicin/Paclitaxel und 57 % der mit Epirubicin/Docetaxel behandelten Karzinome hohe Chemosensitivitätswerte auf (Tab.23a/b, Abb.22, 23).

Wie beim Progesteronrezeptor zeigen auch beim Östrogenrezeptor 65 % der Karzinome eine positive und entsprechend 35 % eine negative Expression (Tab.3, Abb.6).

Auch hier weisen 38 % der Proben mit positiver Expression bei einer Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel eine hohe Sensitivität auf (Tab.19). Wurde in dieser Patientinnengruppe Epirubicin/Paclitaxel in Verbindung mit Zoledronat angewendet, so ergab der ATP-CVA bei 69 % der Karzinome eine hohe Sensitivität. Den gleichen Wert ergab die Austestung der Chemosensitivität bei der Kombination Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat (Tab.23a, Abb.22).

Wurden die vorliegenden Präparate mit Epirubicin/Docetaxel und Zoledronat behandelt, konnte eine hohe Chemosensitivität in 46 % der Fälle nachgewiesen werden. Bei 31 % der Fälle dieser Patientinnengruppe konnte eine hohe Sensitivität aufgezeigt werden, wenn Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat angewendet wurde (Tab.23b, Abb.23).

In der Gruppe der Patientinnen mit negativer Östrogenrezeptor-Expression, zeigt die alleinige Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel ebenso wie mit Epirubicin/Docetaxel bei 43 % der Proben hohe Sensitivitätswerte an (Tab.19). Die AUC-Werte der Chemosensitivitätstestung nach der Kombinationsbehandlung von Epirubicin/Paclitaxel mit Zole-

dronat zeigten, wie bei der Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat, bei 86 % der Patientinnen eine hohe Sensitivität (Tab.23a). Wurden die Zytostatika in Kombination mit Bondronat angewendet, konnte bei 57 % der mit Epirubicin/Paclitaxel und Bondronat und bei 71 % der mit Epirubicin/Docetaxel und Bondronat behandelten Präparate eine hohe Chemosensitivität nachgewiesen werden (Tab.22/23, Abb.23, 24).

Im untersuchten Patientenkollektiv wiesen 80 % der Tumoren eine positive pS2-Expression auf (Tab.3, Abb.6).

Eine hohe Sensitivität nach der Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel konnte bei jeweils 37 % dieser Karzinome ermittelt werden (Tab.19).

Wurde Epirubicin/Paclitaxel in Kombination mit dem Bisphosphonat Zoledronat angewendet, konnten bei 69 % der Fälle hohe Sensitivitätswerte festgestellt werden (Tab.23a). Bei der Verwendung von Bondronat, anstelle von Zoledronat, ergab der ATP-CVA bei 63 % vorliegender Proben hohe Sensitivitätswerte (Tab.23b, Abb.22).

Die Auswertung der Chemosensitivitätstestung nach einer Therapie mit Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Zoledronat, zeigte bei 50 % der Patientinnen mit positiver pS2-Expression hohe Sensitivitäten an. Bei 37 % dieser Patientinnen brachte die Kombinationstherapie von Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat hohe Chemosensitivitätswerte (Tab.23b, Abb.23).

Eine negative pS2-Expression lag bei 20 % der untersuchten Karzinome vor (Tab.3).

.Bei der alleinigen Zytostatikatherapie mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel, zeigten jeweils 50 % dieser Proben im ATP-CVA hohe Chemosensitivitätswerte an (Tab.19).

Die Messung der Chemosensitivität nach der Behandlung der Karzinompräparate mit beiden Zytostatikaverbindungen in jeweiliger Kombination mit Zoledronat, ergab in allen Fällen hohe Sensitivitätswerte (Tab.23a/b, Abb.22, 23).

Die Chemosensitivitätstestung in Kombination mit Bondronat, zeigte bei jeweils 75 % der Zytostatika hohe Sensitivitätswerte (Tab.23a/b, Abb.22, 23).

3.2.2.2. Korrelation mit den Onkogenen (PCR)

Bei den Karzinomen wurden die Messwerte für die Onkogene erb B-1, erb B-2, erb B-4, erb B1/ B2, die Her-2 / Neu Expression und c-myc bestimmt (Tab.4).

Die erb B-1 Werte sind zu 80 % in der untersuchten Patientinnengruppe deletiert/amplifiziert und dementsprechend bei 20 % der Fälle im Normbereich (Tab.4a, Abb.7)

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Eine hohe Chemosensitivität konnte in der Patientinnengruppe mit deletierten/amplifizierten Messwerten bei 31 % der mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat bzw. bei 18 % der mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Bondronat behandelten Karzinome aufgezeigt werden (Tab.24c, Abb.27)

Beim Abgleich der Messwerte nach der Testung mit Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat, konnte bei 50 % der normwertigen erb B-1 Karzinome eine hohe Chemosensitivität aufgezeigt werden (Tab.24c, Abb.27).

Die Auswertung der Karzinome mit deletierten/amplifizierten erb B-1 Werten ergab nach dem ATP-CVA, dass eine alleinige Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel bei 44 % und mit Epirubicin/Docetaxel bei 50 % der Proben ebenfalls hohe Chemosensitivitätswerte aufwiesen (Tab.20).

Wird Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat kombiniert, so können bei 75 % der Karzinome mit deletierten/amplifizierten erb B-1 Werten, hohe Sensitivitäten nachgewiesen werden (Tab.24a).Das gleiche Zytostatikum kombiniert mit Bondronat, lässt in 69 % der Proben hohe Chemosensitivitätswerte zu (Tab.24b, Abb.25).

Wurden die Karzinome dieser Patientengruppe mit einer Kombination aus Epirubicin/Docetaxel und Zoledronat behandelt, zeigte die Auswertung, dass 56 % der Proben eine hohe Sensitivität aufwiesen, während bei einer Kombinationstherapie mit Bondronat 50 % der Proben diese Reaktion zeigte (Tab.24a/b, Abb.26).

Die Karzinome mit normwertigen erb B-1 Onkogen, zeigten bei reiner Zytostatikabehandlung mit Epirubicin/Paclitaxel in 25 % der Fälle und mit Epirubicin/Docetaxel in keinem Fall, nach Auswertung der AUC-Werte, eine hohe Sensitivität (Tab.20). Wurden Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat zur Anwendung gebracht, zeigten sich nach der Austestung, bei jeweils 75 % der Fälle hohe Chemosensitivitätsmesswerte (Tab.24a). Bei einer Kombinationstherapie mit Bondronat, traf dieses Ergebnis für 50 % der mit Epirubicin/Paclitaxel und 25 % der mit Epirubicin/Docetaxel behandelten Proben zu (Tab.24b, Abb.25, 26)

Bei der Auswertung der erb B-2 Werte zeigten sich 15 % der Karzinome amplifiziert und 85 % der Karzinome im Normbereich (Tab.3).

Die Auswertung der Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil ergab in keiner der vorliegenden Proben, weder mit amplifizierten noch mit normwertigen erbB-2 Werten, hoch sensitive Messwerte (Tab.8).

In Kombination mit Zoledronat und Bondronat konnten ebenfalls keine hoch sensitiven Werte nachgewiesen werden (Tab.9, 10, Abb.12).

Wurde der Test nach einer Kombinationsbehandlung von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat durchgeführt, zeigten 29 % und mit Bondronat 18 % der Fälle hoch sensitive Messergebnisse (Tab.24c, Abb.27).

Wurden die Karzinompräparate mit normwertigen erb B-2 Werten allein mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel behandelt, so zeigten sich die AUC-Werte nach dem ATP-CVA bei 41 %, der mit Epirubicin/Paclitaxel und bei 47 % der mit Epirubicin/Docetaxel getesteten Proben hoch sensitiv (Tab.20).

Im Vergleich dazu, zeigten diese Karzinome nach einer Kombinationsbehandlung von sowohl Epirubicin/Paclitaxel als auch Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat zu 59 % eine hohe Chemosensitivität (Tab.24a). Nach der Auswertung des ATP-CVA bei einer Kombinationsbehandlung mit Bondronat, wiesen die AUC-Werte bei 65 % der mit Epirubicin/Paclitaxel und bei 47 % der mit Epirubicin/Docetaxel behandelten Proben eine hohe Sensitivität auf (Tab.24b, Abb.25, 26).

Bei einer Behandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid zeigten die Karzinome mit amplifizierten erbB-2 Werten, welche in Kombination mit Zoledronat behandelt wurden, hoch sensitive AUC-Werte und das in 67 % der Fälle (Tab. 24c, Abb.27).

Bei den Patientinnen mit amplifizierten erb B-2 Werten, führte eine alleinige Epirubicin/Paclitaxel Behandlung in unseren Untersuchungen in 33 % zu hohen Sensitivitätswerten, wogegen sich nach der Austestung mit Epirubicin/Docetaxel dieses Ergebnis in keinem Fall nachweisen ließ (Tab 20).

In Kombination mit Zoledronat wurde für beide Zytostatikaverbindungen bei 67 % der Proben eine hohe Chemosensitivität gefunden. Bei Betrachtung der AUC-Werte nach einer Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel und Bondronat wurde bei 67 % und nach Behandlung mit Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Bondronat bei 33 % der Präparate eine hohe Chemosensitivität nachgewiesen (Tab.24a/b, Abb.25, 26).

Da nur 5 % der Patientinnen amplifizierte erb B-4 Werte aufwiesen, beschränkt sich die weitere Betrachtung auf die dementsprechend 95 % der Karzinome, welche sich im Normbereich der erb B-4 Werte bewegten (Tab.4a, Abb.7).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Bei der Kombinationstherapie Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat, können bei 37 % und bei Verwendung von Bondronat, statt Zoledronat, bei 16 % der Patientinnen mit normwertigen erb B-4 Werten, hohe Chemosensitivitätswerte nachgewiesen werden (Tab.24c, Abb.27).

Bei einer alleinigen Zytostatikatherapie mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel, zeigen die Messwerte der Chemosensitivitätstestung bei jeweils 37 % der Karzinome eine hohe Sensitivität an (Tab.20).

Wurden die Karzinome mit einer Kombination Epirubicin/Paclitaxel und Zoledronat behandelt, zeigten 74 % aller AUC-Werte dieser Gruppe eine hohe Chemosensitivität an (Tab.24a, Abb.25). Wird statt Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat verwendet, weisen 58 % der untersuchten Proben eine hohe Sensitivität auf (Tab.24a, Abb.26).

Die Chemosensitivitätswerte bei der Kombinationsbehandlung von Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat zeigen in 63 % und bei Epirubicin/Docetaxel in 42 % der Fälle eine hohe Sensitivität (Tab.24b, Abb.25,26).

Die Auswertung der erb B1/erb B2 Onkogene zeigt bei 45 % der Patientinnen nicht normwertige und bei 55 % normwertige Messdaten. Auch hier wurden die AUC-Werte einer alleinigen Zytostatikatherapie und einer mit Bisphosphonaten kombinierten Zytostatikatherapie ermittelt und den Patientendaten zugeordnet (Tab.4b, Abb.8).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Wurden die zur Verfügung stehenden Präparate, nach einer Kombinationstherapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat ausgewertet, so zeigten sich in der Gruppe der Patientinnen mit nicht normwertigen erb B1/erb B2 Onkogen 18 % und bei normwertigen erb B1/erb B2 Onkogen 45 % der Karzinome hoch sensitiv. Wurde als

Bisphosphonat Bondronat gegeben, so zeigten die Karzinome mit normwertigen erb B1/erb B2 Werten in 27 % der Fälle hohe Chemosensitivitätswerte (Tab.24c, Abb.27).

Eine alleinige Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel zeigte bei 44 % und mit Epirubicin/Docetaxel bei 33 % der Patientinnen mit nicht normwertigen erb B1/erb B2 Werten eine hohe Sensitivität (Tab.20). Bei einer Kombinationstherapie mit Zoledronat zeigten diese Reaktion 22 % der mit Epirubicin/Paclitaxel (Tab.24a, Abb.25) und 44 % der mit Epirubicin/Docetaxel behandelten Patientinnen (Tab.24b, Abb.26).

Wird Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat kombiniert zur Anwendung gebracht, zeigen 56 % und bei Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat 33 % der Proben hohe Chemosensitivitätswerte (Tab.24b, Abb.25, 26).

Die gleiche Testreihe wurde bei den Patientinnenproben mit normwertigen erb B1/erb B2 Befunden durchgeführt und ausgewertet. Hier zeigte der ATP-CVA bei einer alleinigen Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel bei 36 % und mit Epirubicin/Docetaxel bei 45 % der Proben eine hohe Chemosensitivität an (Tab.20).

Wurde die Zytostatikatherapie mit Epirubicin/Paclitaxel mit einer Zoledronatgabe kombiniert, zeigt das Ergebnis, dass insgesamt 82 % der Karzinome dieser Patientinnengruppe hoch sensitiv reagierte (Abb.25). Für die Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat traf dieses Ergebnis bei 73 % der Karzinome zu (Tab.24a, Abb.26).

Bei der Chemosensitivitätstestung der Proben mit Epirubicin/Paclitaxel, in Kombination mit Bondronat, wurden in 73 % und bei Epirubicin / Docetaxel mit Bondronat in 55 % der Fälle hohe Sensitivitätswerte nachgewiesen (Tab.24b, Abb.25, 26).

Die Parameter der Her-2/Neu Expression ergaben für die untersuchte Patientinnengruppe, dass die Messwerte zu 70 % im Normbereich lagen und in 30 % eine Überexpression aufwiesen (Tab.3, Abb.8). Auch hier erfolgte zunächst die Auswertung einer alleinigen Zytostatikabehandlung.

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil und Epirubicin/Cyclophosphamid allein zeigte, weder bei den normwertigen noch bei den Proben mit Überexpression, hoch sensitiven Messwerte (Tab.8).

Eine Kombinationsbehandlung von Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil mit Zoledronat oder Bondronat, zeigte das gleiche Ergebnis (Tab.8, 9).

Die Auswertung des ATP-CVA nach der Behandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat, ergab für die Karzinome mit normwertiger Her-2/Neu Expression in 36 %

und für die Karzinome mit Überexpression in 33 % der Fälle AUC-Werte, die als hoch sensitiv eingestuft werden konnten (Tab.24c, Abb.27).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Patienten mit normwertiger Her-2/Neu Expression, bei einer Therapie mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel in 50 % der Fälle hohe Chemosensitivitätswerte aufwiesen. In der Patientengruppe mit nicht normwertigen Her-2/Neu Expression Parametern, war das bei jeweils 17 % der Fall (Tab.20, Abb.8).

Wenn die Epirubicin/Paclitaxel Therapie mit einer Zoledronatgabe gekoppelt wurde, zeigten sich 64 % der normwertigen Karzinome und 100 % der Karzinome mit einer Überexpression hoch sensitiv (Tab.24a). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich, wenn statt mit Zoledronat, Epirubicin/Paclitaxel mit Bondronat kombiniert angewendet wurde. Hier zeigten 57 % der Patientinnen mit normwertigen Her-2/Neu Expressions Befunden und 83 % der Patientinnen mit einer Überexpression der Her-2/Neu Expression eine hohe Chemosensitivität (Tab.24b, Abb.25).

Wird eine Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat als Therapie angewandt, so wies die Patientinnengruppe mit normwertiger Her-2/Neu Expression bei 50 % und die Patientinnengruppe mit einer Überexpression bei 67 % der Proben eine hohe Chemosensitivität auf (Tab.24a).

Die Austestung der Chemosensitivität für die Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat ergab, dass die Karzinome mit normwertiger Her-2/Neu Expression in 50 % und die Karzinome mit einer Überexpression in 33 % der Fälle hohe Sensitivitätswerte aufwiesen (Tab.24b, Abb.26).

Die c-myc Werte im untersuchten Patientinnenkollektiv, waren in 85 % normwertig.

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Im Vergleich zu einer alleinigen Behandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid, ergibt die Kombinationstherapie von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat einen Anstieg um 35 % und bei der Kombination mit Bondronat um 18 % der Fälle, in denen hohe Chemosensitivitätswerte nachgewiesen wurden (Tab.24c, Abb.27).

Die Auswertung der AUC-Werte zeigte, dass eine reine Epirubicin/Paclitaxel Therapie bei 35 % (Tab.20), mit zusätzlicher Gabe von Zoledronat bei 76 % (Tab.24a) und mit zusätzlicher Gabe von Bondronat bei 65 % (Tab.24b) der Karzinome hoch sensitiv wirkt

(Abb.25). Für das Therapieschema mit Epirubicin/Docetaxel zeigt die Auswertung, dass eine alleinige Zytostatikabehandlung bei 41 % (Tab.20), in Kombination mit Zoledronat bei 59 % (Tab.24a) und in Kombination mit Bondronat bei 47 % (Tab.24b) der Karzinome eine hoch sensitive Wirkung hat (Abb.26).

3.2.2.3. Korrelation mit der Proliferation und dem DNA-Index (Flow-Cytometrie)

Bei der Auswertung der Messergebnisse für den DNA-Index, zeigten sich 47 % der untersuchten Karzinome als aneuploid und 53 % als diploid (Tab.5a, Abb.9).

Bei der Austestung der Chemosensitivität mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil zeigte keine der untersuchten Proben im ATP-CVA eine hohe Chemosensitivität an. Die Austestung von Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil in Kombination mit Zoledronat und Bondronat ergab zwar eine Erhöhung der Werte der Chemosensitivität bei Zoledronat in 85 % und bei Bondronat in 90 % der Fälle, aber nach der zu Grunde gelegten Klassifikation waren die gemessenen Werte nicht als hoch sensitiv einzuordnen (AUC<18000), (Tab.8, 9, 10, Abb.12).

Die Chemosensitivitätstestung nach einer Kombinationstherapie Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat, ergab in der Gruppe der aneuploiden Karzinome, eine Erhöhung um 56 % der Fälle mit hoch sensitiven AUC-Werten, gegenüber einer alleinigen Therapie mit Epirubicin/Cyclophosphamid. Bei der Kombination mit Bondronat, wurde diese Wirkung gegenüber einer reinen Epirubicin/Cyclophosphamid Gabe, bei 22 % der Proben nachgewiesen. In der Gruppe der diploiden Karzinome, zeigte eine Kombinationstherapie von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat bei 20 % und von Epirubicin/Cyclophosphamid bei 10 % der Fälle eine hohe Chemosensitivität (Tab.25c, Abb. 30).

Bei der Chemosensitivitätstestung wurde ermittelt, dass 44 % der aneuploiden Präparate hoch sensitive AUC-Werte nach einer alleinigen Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel aufwiesen(Tab.21)

Kombinierte man dieses Therapieschema mit einer Zoledronatgabe, zeigten sich bei 67 % der Patientinnen dieser Gruppe hohe Chemosensitivitätswerte. Die Austestung einer Kombinationsbehandlung mit Bondronat, ergab bei ebenfalls 67 % der untersuchten Proben hohe AUC-Werte (Tab.25a/b, Abb.28). Wurde die Chemosensitivität bei einer alleinigen Anwendung von Epirubicin/Docetaxel gemessen, zeigten 33 % der aneuploiden Karzinome hoch sensitive AUC-Werte (Tab.21). Ergänzte man dieses Therapieschema mit einer Zoledronatgabe, ließ sich bei 67 % der Präparate eine hohe Chemosensitivität

nachweisen. Wurde Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat kombiniert, zeigte sich dieser Effekt bei 44 % der untersuchten Proben (Tab.25a/b, Abb.29).

Bei den Karzinomen mit diploidem DNA-Index erbrachte die Auswertung des ATP-CVA, nach alleiniger Zytostatikabehandlung, dass 40 % der Proben auf Epirubicin/Paclitaxel und 50 % der Proben auf Epirubicin/Docetaxel hoch sensitiv reagierten (Tab.21). Behandelte man die diploiden Karzinome mit Epirubicin/Paclitaxel in Kombination mit Zoledronat, wiesen 80 % der Fälle hoch sensitive AUC-Werte auf (Tab.25a). Ersetzte man Zoledronat durch Bondronat, ließ sich dieser Nachweis bei 60 % der Proben erbringen (Tab.25a, Abb.28).

Verwendete man in der Therapie die Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat, zeigten in der Auswertung 60 % der Karzinome hoch sensitive AUC-Werte (Tab.25a). Bei der Auswertung der Chemosensitivität von Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Bondronat, wurden bei 50 % der diploiden Karzinome hohe Sensitivitätswerte nachgewiesen (Tab.25b, Abb.29).

Die Werte der S-Phase waren bei 47 % der untersuchten Karzinome normwertig und entsprechend bei 53 % erhöht (Tab.25).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Die Behandlung der Präparate mit Epirubicin/Cyclophosphamid und Zoledronat zeigte bei Karzinomen mit normwertiger S-Phase in 22 % und bei Karzinomen mit erhöhter S-Phase in 56 % der Fälle eine hoch sensitive Reaktion. Eine Kombination mit Bondronat brachte bei Karzinomen mit normwertiger S-Phase in 11 % und mit erhöhter S-Phase in 22 % der Fälle eine hohe Chemosensitivität (Tab.25c, Abb.30).

Die Chemosensitivitätstestung bei den Karzinomen mit normwertiger S-Phase ergab, dass eine alleinige Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel bei 44 % der Proben hoch sensitiv wirkte (Tab.21). Verwendete man Epirubicin/Paclitaxel in Kombination mit Zoledronat, zeigten 78 % dieser Karzinome eine hohe Chemosensitivität und in Kombination mit Bondronat ließ sich dieses Ergebnis bei 56 % nachweisen (Tab.25a/b, Abb.28).

Die AUC-Werte nach einer alleinigen Gabe von Epirubicin/Docetaxel zeigten in der Gruppe der Karzinome mit normwertiger S-Phase, bei 56 % eine hohe Sensitivität an (Tab.21). Ergänzte man dieses Therapieschema mit Zoledronat, konnte ebenfalls bei 56 % der Karzinome diese Wirkung nachgewiesen werden (Tab.25a). Bei einer Kombination der

Zytostatikatherapie mit Bondronat, ließ sich bei 33 % der Proben dieses Resultat nachweisen (Tab.25b, Abb.29).

War die S-Phase in den untersuchten Karzinomen erhöht, zeigte sich, dass eine Therapie mit Epirubicin/Paclitaxel bei 40 % und mit Epirubicin / Docetaxel bei 30 % hoch sensitiv wirkte (Tab.21). Auch hier erfolgte eine Zugabe von Zoledronat. Der anschließende Chemosensitivitätstest zeigte, dass sowohl Epirubicin/Paclitaxel als auch Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Zoledronat bei 70 % der Karzinome hoch chemosensitiv wirkte (Tab.25a). Die Austestung mit Bondronat ergab für die Kombination mit Epirubicin /Paclitaxel eine hohe Chemosensitivität bei ebenfalls 70 % und für Epirubicin/Docetaxel bei 60 % der Karzinome (Tab.25b, Abb.28, 29).

Die Messdaten der G0/G1 Phase zeigten in vorliegenden Karzinomen bei 63 % normwertige Befunde (Tab.5b, Abb.10).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Die Auswertung des ATP-CVA für die Kombinationen Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat, zeigten eine hohe Sensitivität bei 17 % bzw. 8 % der Proben mit normwertigen G0/G1 Befund. Bei den Karzinomen mit nicht normwertiger G0/G1 Phase zeigte eine Kombinationstherapie von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat in 71 % der Fälle eine hoch sensitive Wirkung. Bei der Kombination mit Bondronat, konnte diese Wirkung bei 29 % der Fälle nachgewiesen werden (Tab.25c, Abb.30).

Die Therapie dieser Karzinome mit den Zytostatikakombinationen Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel, zeigte bei 42 % der Proben eine hoch sensitive Wirkung (Tab.21). Durch die Zugabe von Zoledronat bei der Epirubicin/Paclitaxel Therapie, konnte dieser Effekt bei 75 % der Karzinome mit normwertiger G0/G1 Phase nachgewiesen werden (Tab.25a). Nach der Gabe von Bondronat zu einer Epirubicin/ Paclitaxel Therapie, wurde dieser Nachweis bei 58 % der Proben erbracht (Tab.25b, Abb.28).

Bei der Kombination von Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat, sprachen 50 % der Karzinome dieser Gruppe mit einer hohen Sensitivität an. Dieser Effekt zeigt sich nach einer Kombinationstherapie mit Bondronat bei 33 % der vorliegenden Präparate (Tab.25a/b, Abb.29).

Wurden die Karzinome mit nicht normwertiger G0/G1 Phase mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel behandelt, zeigten jeweils 43 % der untersuchten Proben hoch

sensitive AUC-Werte (Tab.21). Die vergleichende Chemosensitivitätstestung nach einer Kombinationstherapie von Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat, zeigte für 71 % und von Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat für 86 % der Karzinome eine hohe Chemosensitivität an (Tab.25a). Bei der Kombinationstherapie mit Bondronat, wurden für beide Zytostatikaverbindungen hoch sensitive AUC-Werte bei 71 % der Proben festgestellt (Tab.25b, Abb.28, 29).

.In der G2/M-Phase zeigen die Parameter bei 84 % der untersuchten Karzinome normwertige Befunde (Tab.5b, Abb.10). Es erfolgte auch hier als erstes die Auswertung der Chemosensitivitätstestung nach einer alleinigen Zytostatikabehandlung.

Bei der Austestung der Chemosensitivität mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil zeigte keine der untersuchten Proben im ATP-CVA eine hohe Chemosensitivität an (Tab.8).

Die Auswertung der Chemosensitivitätstestung nach einer Behandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid ergab ebenfalls keine als hoch sensitiv einzustufenden Messwerte (Tab.8).

Es zeigten sich die AUC-Werte nach einer Epirubicin/Paclitaxel Behandlung in 31 % und nach einer Epirubicin/Docetaxel Behandlung in 44 % der Fälle hoch sensitiv (Tab.21).

Eine Kombinationsbehandlung von Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil mit Zoledronat oder Bondronat, zeigte in vorliegenden Befunden keinen Messwert mit hoher Chemosensitivität (Tab.8, 9).

Die Auswertung der Chemosensitivitätstestung nach einer Behandlung mit Epirubicin/Cyclophosphamid ergab, dass in Kombination mit Zoledronat 31 % und in Kombination mit Bondronat 13 % der Karzinome mit normwertiger G2/M-Phase hoch sensitiv reagierten (Tab.25c, Abb.30).

Bei der Anwendung von Epirubicin/Paclitaxel in Kombination mit Zoledronat, konnte bei 75 % der Karzinome mit normwertiger G2/M-Phase eine hohe Chemosensitivität nachgewiesen werden (Tab.25a, Abb.28). Verwendete man Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Zoledronat, konnte dieser Nachweis bei 63 % der Karzinome dieser Gruppe geführt werden (Tab.25a, Abb.29). Eine Kombinationstherapie mit Bondronat zeigte, in Verbindung mit Epirubicin/Paclitaxel, eine hohe Chemosensitivität bei ebenfalls 63 % und in Verbindung mit Epirubicin/ Docetaxel bei 50 % der normwertigen Fälle (Tab.25b, Abb.28, 29).

3.2.2.4. Korrelation mit den proteolytischen Enzymen (PCR)

Die Auswertung der Messdaten für die Proteolysefaktoren Topoisomerase-II-alpha, den Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp uPA und seinen Inhibitor PAI zeigten in grosser Mehrheit normwertige Befunde.

Die Topoisomerase-II-alpha Werte waren bei 85 % der Patientinnen normwertig (Tab.6, Abb.11).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil und Epirubicin/Cyclophosphamid allein zeigte, weder bei den normwertigen noch bei den Proben mit Überexpression, keine hoch sensitiven Messwerte (Tab.8).

Die Kombinationsbehandlung von Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil mit Zoledronat oder Bondronat, zeigte das gleiche Ergebnis (Tab.8, 9).

Die Therapie der Karzinome mit normwertigen Topoisomerase-II-alpha Werten mit Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat, ergab eine hohe Chemosensitivität in 29 % und in Kombination mit Bondronat in 12 % der untersuchten Fälle (Tab.26c, Abb.33).

Der bei diesen Karzinomen durchgeführte ATP-CVA zeigte, dass eine Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel bei 41 % der Proben hoch sensitiv wirkte (Tab. 22).

Kombinierte man in der Behandlung Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat, wiesen 71 % der Tumore im Ergebnis hoch sensitive AUC-Werte auf (Tab.26a, Abb.31). Ergänzte man die Epirubicin/Paclitaxel Therapie mit einer Bondronatgabe, zeigte sich das gleiche Ergebnis (Tab.26b, Abb.31). Die Behandlung der Präparate mit Epirubicin/Docetaxel und Zoledronat in Kombination, ergab eine hohe chemosensitive Reaktion bei 53 % der Karzinome (Tab.26a). Im ATP-CVA nach einer Kombinationsbehandlung von Epirubicin/Docetaxel und Bondronat, war dies bei 47 % der Proben der Fall (Tab.26b, Abb.32).

Die uPA-Expression wies bei 90 % der vorliegenden Karzinompräparate normwertige Befunde auf (Tab.6, Abb.11).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil allein, wie auch in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 8, 9, 10, Abb.12).

Die Behandlung der Tumore mit Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat, zeigte eine Erhöhung der hoch sensitiven AUC-Werte bei 39 % und in Kombination mit Bondronat bei 17 % der untersuchten Präparate (Tab.26c, Abb.33).

Eine Therapie mit den Zytostatikaverbindungen Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel, zeigte in dieser Patientinnengruppe eine hohe Chemosensitivität bei 39 % der Proben (Tab.22).

Wurden die Tumore kombiniert mit Epirubicin/Paclitaxel und Zoledronat behandelt, ließ sich eine hohe Chemosensitivität bei 72 % der Präparate nachweisen (Tab.26a, Abb.31). Bei einer Kombination von Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat, war diese Reaktion bei 61 % der Fälle nachweisbar (Tab.26a, Abb.32).

Wurde Epirubicin/Paclitaxel kombiniert mit Bondronat angewandt, ließ sich eine hohe Chemosensitivität bei ebenfalls 61 % der Karzinome nachweisen (Tab.26b, Abb.31). In der Kombination Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat, trat dieser Effekt bei 44 % der Proben auf (Tab.26b, Abb.32).

Die Befunde für die PAI-Expression wiesen bei 85 % der Tumore normwertige Messdaten auf. Auch hier erfolgte zunächst die Auswertung der AUC-Werte nach einer reinen Chemotherapie.

Bei der Austestung der Chemosensitivität mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil und Epirubicin/Cyclophosphamid zeigte keine der untersuchten Proben im ATP-CVA eine hohe Chemosensitivität an (Tab.8).

Bei der Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel wurden bei 47 % der Präparate hoch sensitive AUC-Werte ermittelt. Die Austestung mit Epirubicin/Docetaxel zeigte dieses Resultat bei 41 % der untersuchten Proben (Tab.22).

Die Chemosensitivitätstestung mit Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Bondronat ergab in keinem der Fälle hohe Sensitivitätswerte (Tab. 9, 10, Abb.12).

Die Behandlung der Präparate mit Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat, zeigte bei 29 % und mit Bondronat bei 12 % der Karzinome einen hoch sensitiven Effekt (Tab.26b, Abb.33).

Die anschließende Auswertung des ATP-CVA nach einer Kombinationsbehandlung mit Epirubicin/Paclitaxel und Zoledronat zeigte, dass 71 % der Karzinome mit hoch sensitiv

auf diese Therapie ansprechen (Tab.26a). Das gleiche Resultat erbrachte die Kombination Epirubicin/ Paclitaxel mit Bondronat (Tab.26b, Abb.31).

Die Chemosensitivitätstestung der Kombinationsbehandlung von Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat, zeigte bei 53 % der Tumore eine hohe Sensitivität an (Tab.26a). Bei der Kombination mit Bondronat, wurde dieser Nachweis bei 41 % der Fälle erbracht (Tab.26b, Abb.32).

4. Diskussion

In engem Zusammenhang mit Prognosefaktoren, wie Tumorgröße oder axillärem Lymphknotenbefall, kommt es trotz Operation und Strahlentherapie bei mehr als einem Drittel aller Patientinnen mit Brustkrebs zu einem Erkrankungsrückfall. Exakte Daten über Spontanverläufe (ohne adjuvante systemische Therapie) sind nur noch aus historischen Studien zu erhalten, die neben einer Hormon-bzw. Chemotherapiegruppe noch eine unbehandelte Kontrollgruppe umfassten. Diese Daten sind dementsprechend von erheblicher Bedeutung, da sie helfen, die Effektivität neuer Chemotherapieschemata realistisch einzuschätzen.

Zum Einsatz kommen gegenwärtig vor allem antihormonelle und zytostatische Therapien. Viele Studien verfolgen das Ziel, zukünftig das Medikamentenspektrum durch zusätzliche Therapieverfahren, wie die Gabe von Bisphosphonaten, von Antikörpern, die gegen die Tumorzellen, Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder Onkogenprodukte gerichtet sind-oder von Medikamenten die die Tumorangiogenese unterdrücken, zu erweitern (Loprinzi et al. 2001).

Etwa 75 % aller Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom haben Knochenmetastasen. Die Prognose von Patientinnen mit ausschließlich ossärer Metastasierung ist deutlich besser, als bei Patientinnen mit zusätzlichen extraossären Metastasen. Das mediane Überleben beträgt etwa 2-4 Jahre, gegenüber weniger als 2 Jahren bei Patientinnen mit viszeraler Metastasierung (Lipton, 2003). Dennoch liegt die Inzidenz pathologischer Frakturen mit 53 % bei Patientinnen mit ausschließlich ossärer Metastasierung um ca. 30 % höher, als bei Patientinnen mit Knochen- und Lebermetastasen. Die Häufigkeit von Hyperkalzämien ist in beiden Gruppen, mit 26 % versus 23 %, vergleichbar hoch (Plunkett, Rubens, 2003).

In einer randomisierten Doppelblindstudie von Paterson et al. mit oralem Clodronat versus Plazebo, bei Patientinnen mit ossär metastasiertem Mammakarzinom, konnte eine signifikante Minderung der Inzidenz von Wirbelkörperfrakturen, Hyperkalzämien und der Rate der gesamten ossären Komplikationen nachgewiesen werden (Paterson et al., 1993).

In zwei großen, multizentrischen Phase-III-Studien, in denen Pamidronat mit Plazebo bei Patientinnen mit ossär metastasiertem Mammakarzinom verglichen wurde, zeigte sich ein signifikant geringerer Anteil an Patientinnen mit ossären Komplikationen. Kam es zu ossären Ereignissen, traten diese unter Bisphosphonattherapie zu einem späteren Zeitpunkt auf (Hortobagyi et al., 1998; Theriault et al., 1999; Lipton et al., 2000). Entscheidender

klinischer Vorteil der Pamidronattherapie ist daher, die signifikant verminderte Inzidenz nichtvertebragener, pathologischer Frakturen. Weitere Vorteile sind die geringere Inzidenz von Hyperkalzämien oder notwendiger zusätzlicher Interventionen wie Strahlen- oder chirurgische Therapie. Auch zeigte sich ein verminderter Bedarf an Schmerzmedikation unter Bisphosphonattherapie.

In einer weiteren randomisierten, multizentrischen Studie wurden die beiden hochpotenten Bisphosphonate Pamidronat und Zoledronat bei Patienten mit Plasmozytom (Stadium III nach Durie) und ossär metastasiertem Mammakarzinom untersucht. Bei der Auswertung des 25-monatigen Follow-up's der Mammakarzinompatientinnen zeigte sich, ein unter Zoledronat gegenüber Pamidronat um etwa 20 % signifikant niedrigeres Risiko Skelettbezogener Ereignisse (Colemann, 2002). Signifikant geringer war unter Zoledronat auch der Anteil an Mammakarzinompatientinnen, die eine palliative Strahlentherapie benötigten. Für die Progression ossärer und extraossärer Metastasen, sowie für das Gesamtüberleben, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Rosen et al., 2001).

4.1. Bondronat versus Knochenmetastasen

Bondronat ist ein hochpotentes Bisphosphonat der dritten Generation, das in intravenöser Form seit November 2003 zur Behandlung von Knochenmetastasen beim Mammakarzinom zugelassen ist. In oraler Form ist es seit April 2004 zur Therapie von Osteolysen verfügbar. Die Studien zur parenteralen Anwendung wurden mit 2 und 6 mg i.v., versus Plazebo, bei 462 Patientinnen mit ossär metastasiertem Mammakarzinom über 2 Jahre durchgeführt. Während 6mg Ibandronat gegenüber Plazebo signifikant skelettale Komplikationen reduzierte, konnte das für 2mg nicht gezeigt werden. Desweiteren führten 6mg zu einer signifikanten Verlängerung des Zeitraums bis zum Auftreten der ersten skelettalen Komplikation, zu einer dauerhaften Reduktion des Knochenschmerzes über 24 Monate und zu einer besseren Effektivität in der Vermeidung von Strahlentherapien (Body et al., 2003). Herausragende Ergebnisse zeigte die Studie für die Verbesserung der Lebensqualität der betroffenen Patientinnen in allen gemessenen Bereichen und für die Reduktion des Gebrauchs von Schmerzmitteln (Diel et al., 2004).

Drei große Vergleichsstudien wurden für die Zulassung von Ibandronat oral durchgeführt. In allen drei Studien wurden jeweils 50mg versus 20mg versus Plazebo getestet. Insgesamt wurden 999 Patientinnen mit ossär metastasiertem Mammakarzinom eingeschlossen. Die Ergebnisse der Studien waren in etwa vergleichbar (Body et al., 2004; Tripathy et al.,

2004). Mit der Dosis von 50mg konnte eine signifikante Reduktion des Knochenschmerzes und aller skelettalen Ereignisse erreicht werden.

4.2. Zoledronat versus Knochenmetastasen

Zoledronat ist eines der potentesten Bisphosphonate in der Onkologie und wurde, aus ethischen Gründen, in allen Phase-III-Studien nicht mehr gegen Plazebo, sondern gegen 90mg Pamidronat i.v. getestet. Bei der Therapie der Hyperkalzämie konnte gezeigt werden, dass Zoledronat eine um 10 % höhere Ansprechrate zeigte und die Zeit bis zum Wiederauftreten der Hyperkalzämie verlängert werden konnte (Major et al., 2001). Zoledronat wurde in einer Äquivalenzstudie (n = 1130) gegen 90mg Pamidronat in einer Dosierung von 4mg und 8mg bei Patientinnen mit ossären Metastasen über 12 Monate getestet (Rosen et al., 2001). Die Ergebnisse der Vergleichsstudie, zeigten in der Kurzzeitanalyse keine Effektivitätsunterschiede zwischen Pamidronat und Zoledronat. Beide Substanzen zeigten eine gute Schmerzreduktion. In einer Langzeitanalyse der Zulassungsstudie über 25 Monate bei Patientinnen mit Mammakarzinom, konnte eine Reduktion der skelettalen Komplikationen mit 4mg Zoledronat gegenüber 90mg Pamidronat in einer Größenordnung von 20 % nachgewiesen werden (Rosen et al., 2003). Wie bei anderen Bisphosphonaten, konnte dieser Effekt hauptsächlich durch die Reduktion notwendiger Strahlentherapien erreicht werden. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Zoledronat die potentere Substanz im Vergleich zu Pamidronat und bei akuten Ereignissen, wie Knochenschmerz oder Hyperkalzämie, wirksamer ist. In einer weiteren Analyse, in der nur die Subgruppe eingeschlossen war, die ausschließlich von osteolytischen Metastasen betroffen war, konnte eine weitere Risikoreduktion für skelettale Komplikationen nachgewiesen werden (Rosen et al., 2004).

4.3. Bondronat und Zoledronat versus tumortoxischer Wirkung

In keiner der Phase-III-Studien für die aufgeführten Bisphosphonate, konnte eine Überlebenszeitverlängerung nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine retrospektive Analyse sowohl für Pamidronat als auch für Bondronat eine Subgruppe definieren, die einen signifikanten Überlebensvorteil hatte. Bei Pamidronat waren es prämenopausale Patientinnen, bei Bondronat Patientinnen mit ossären und viszeralen Metastasen (Diel, Lichinitser et al., 1999). Da ähnliche Beobachtungen auch beim multiplen Myelom

gemacht wurden, stellt sich die Frage, ob Bisphosphonate eine direkte tumortoxische Wirkung haben.

Es gibt zahlreiche Studien an Zellkulturen, die den Apoptose induzierenden Effekt auf maligne Zellen nachweisen können (Fromigue et al., 2000; Diel et al., 2001). In-vitro Studien zeigten, dass die höherpotenten, stickstoffhaltigen Bisphosphonate nicht nur auf Osteoklasten, sondern über verschiedene Mechanismen auch auf Tumorzellen wirken können (Green et al., 2003). Die ersten Ergebnisse von Shipman et al. weisen, ebenso wie die Daten von Jagdev et al., auf eine dosis- und zeitabhängige proapoptotische Wirkung durch Hemmung des Mevalonsäure-Stoffwechsels bei Mammakarzinomlinien (MDA-MB-231, MCF-7) hin (Shipman et al., 1997; Shipman et al., 1998; Jagdev et al., 2001). Außerdem konnten in vitro synergistische Effekte bei Kombination Zoledronat mit Paclitaxel und Dexamethason nachgewiesen werden (Jagdev et al., 2000; Tassone et al., 2000).

Bei Plasmozytomzellen zeigte sich im in vitro Versuch durch Bisphosphonate, ein zytostatischer Effekt durch eine Hemmung der IL-6-Sekretion der Knochenmarkstromazellen (Derenne et al., 1999). Entsprechend konnte in einer Untersuchung von Terpos et al. bei Patienten unter Bisphosphonattherapie ein verminderter Serumspiegel des IL-6 beobachtet werden (Terpos et al., 2003). Über die verminderte Knochenresorption und die damit geringere Freisetzung ossärer Wachstumsfaktoren, wie TGF-beta oder IGF, könnten Bisphosphonate auch eine indirekt hemmende Wirkung auf die Tumorproliferation haben. Ebenso wird über einen Einfluß der Bisphosphonate auf die Adhäsion von Tumorzellen diskutiert. So zeigte sich in in vitro Untersuchungen eine verminderte Bindung von Mammakarzinom- und Prostatakarzinomzellen an die Knochenmatrix, wobei der stärkste Effekt bei Ibandronat und Zoledronat liegen soll (Boissier et al., 2000). Weiterhin wird auch ein Einfluß von Bisphosphonaten auf die Tumorzellinvasion über eine verminderte Aktivität verschiedener Matrixmetalloproteinasen diskutiert.

Neue Studien konnten eine Wirkung von Zoledronat auf die Angiogenese zeigen (Wood et al., 2002). Auch in-vivo-Daten aus Tiermodellen beschreiben eine direkte Antitumorwirkung der Bisphosphonate. So weisen Hiraga et al. eine gesteigerte Apoptose von Tumorzellen in Osteolyse unter Pamidronat, Ibandronat und Zoledronat, Green et al. den hemmenden Einfluß von Zoledronat auf Osteolysen beim Mammakarzinom und Radl et al. eine zytotoxische Wirkung von Pamidronat auf Myelomzellen nach (Hiraga et al., 2001; Green et al., 2000; Radl et al., 1985). Wenngleich diese in vitro Beobachtungen viel-

versprechend sind, muß berücksichtigt werden, dass im klinischen Einsatz der Bisphosphonate bisher keine direkte Antitumorwirkung nachgewiesen werden konnte.

In der vorliegenden Studie gelangten die Werte der Chemosensitivitätstestung mittels ATP-CVA-Assay von 20 Patientinnen mit primärem Mammakarzinom zur Auswertung. In der Korrelation mit therapielevanten prognostischen und prädiktiven Faktoren wurde untersucht, ob eine Relevanz hinsichtlich des Tumorwachstums und demzufolge auf das Therapiekonzept durch eine Kombinationsbehandlung mit den Bisphosphonaten Bondronat und Zoledronat vermutet werden kann.

Es wurde gezeigt, dass Bisphosphonate das Wachstum von Brusttumorzellen in-vitro hemmen. Senerate et al zeigten, das Zoledronsäure das potenteste Bisphosphonat bei ihren in-vitro Experimenten war (Senerate et al., 2000). Die von Fromiguet et al präsentierten Daten bestätigen übereinstimmend, dass die Applikation vier strukturell unterschiedlicher Bisphosphonate als potentielle Medikamente gegen Brustkrebs geeignet sind (Fromiguet et al., 2000).

Allein beim Betrachten der TGI-Werte der Chemosensitivitätstestung, fällt der signifikant inhibitorische Effekt auf die Tumorzellen auf. Der verstärkende Effekt von Bondronat und Zoledronat auf den TGI für alle Kombinationen antineoplastischer Medikamente, konnte, basierend auf den vorliegenden Daten, dargestellt werden.

Beim Vergleich der AUC-Werte der Chemosensitivitätstestung von Cyclophosphamid/Metotrexat/5-Fluorouracil (CMF), Epirubicin/Cyclophosphamid (EC), Epirubicin/Paclitaxel (ET) und Epirubicin/Docetaxel (Edoc) in Verbindung mit Bondronat und Zoledronat ergaben sich ebenfalls statistisch signifikant höhere AUC-Werte ($p < 0,01$), für alle Kombinationen von Taxanen mit Bondronat und Zoledronat, wobei in Verbindung mit Zoledronat die durchschnittlichen AUC-Werte am höchsten waren.

Das Ziel der Korrelation vorliegender Messwerte mit etablierten und neuen Prognosefaktoren ist, Tendenzen zu erkennen, die es ermöglichen abzuschätzen, wie hoch die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens einer bestimmten Therapie für eine individuelle Patientin ist. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist der axilläre Lymphknotenstatus der stärkste prognostische Faktor für Rezidiv und Überleben. Die Anzahl der befallenen Lymphknoten korreliert direkt mit dem Rezidiv- und Sterberisiko (Harbeck et al. 2002).

Bei Betrachtung der Anzahl der nodalpositiven Patientinnen mit den Werten der Chemosensitivitätstestung mit Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel, zeigen 38- bzw. 46 % ein sensibles Ansprechverhalten, während in Kombination mit Zoledronat 69

% der Karzinome sensitiv reagierten. Zwischen der Größe des Primärtumors und dem Axillabefall besteht eine positive Korrelation. Bei bestehendem Lymphknotenbefall ist die Tumorgroße, in der multivariaten Analyse, demgegenüber nicht oder nur gering prognostisch bedeutsam, für nodalnegative Karzinome ist die Größe des Tumors jedoch ein wichtiger prognostischer Faktor (Harbeck et al., 2002).

In der untersuchten Patientinnengruppe wiesen 35 % der Patientinnen einen nodalnegativen Status auf. Beim ATP-CVA zeigten die Präparate der nodalnegativen Patientinnen, welche mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel getestet wurden, in 43 bzw. 29 % eine positive Sensitivität auf. In der Kombination Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat beträgt diese Ansprechrate **57 %** und mit Bondronat **71 %**. Für die Kombinationen Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat wurden 43% und mit Bondronat 29% als sensitiv ermittelt. Tendenziell zeigen die Werte der Chemosensitivitätstestung bei der Kombinationsbehandlung mit Bisphosphonaten, gegenüber einer Behandlung mit Epirubicin/Paclitaxel oder Epirubicin/Docetaxel allein, ein sensitiveres Ansprechverhalten auf eine Therapie.

Grosse prognostische Bedeutung hat das Vorhandensein von Hormonrezeptoren am Tumorgewebe; Bei Patientinnen mit negativen Axillastatus scheint der positive Östrogenrezeptorstatus, bei Patientinnen mit befallenen Lymphknoten in der Axilla der Progesteronrezeptorstatus die größere Rolle zu spielen (Harbeck et al., 2002).

In untersuchter Patientinnengruppe war in 65 % der Östrogenrezeptor und in 60 % der Progesteronrezeptor positiv. Die Werte der Chemosensitivitätstestung in den Kombinationen ET und EDoc mit Zoledronat wiesen in **77%** respektive **62 %**, gegenüber ET und EDoc allein mit 46 %, eine höhere Sensitivität auf. Keine Unterschiede in der Sensitivität zeigte der Vergleich aller Kombinationen ET und EDoc mit Bondronat.

Ebenfalls prognostische Bedeutung haben morphologische Eigenschaften des Tumors, wobei bestimmte Sonderformen, wie tubuläre, papilläre und muzinöse Karzinome, eine deutlich bessere Prognose als die wesentlich häufigeren duktaalen Karzinome haben (Abb.4, S.24).

Das histologische Grading korreliert mit der Rezidivfreiheit. Sehr gut differenzierte Karzinome (G1) haben eine signifikant bessere Prognose, als schlecht differenzierte Karzinome (G3) (Harbeck et al., 2002). **Die vorliegenden Werte der Chemosensitivitätstestung bestätigen nicht die klinische Erfahrung, dass G-3 Karzinome ein besseres Ansprechen auf Chemotherapie aufweisen. Ähnliches gilt für beide**

immunhistochemisch bestimmten Hormonrezeptoren (ER, PR), HER-2 negative Karzinome scheinen besser als HER-2 positive Karzinome auf eine Therapie mit Epirubicin/Taxol und Zometa anzusprechen (Abb.17, 18, 19, 20; S.56, 57).

Neben den klassischen Faktoren wurden sämtliche vorliegende molekular-biologische Parameter mit den Werten der Chemosensitivitätstestung verglichen.

Bezüglich der Onkogene waren handelte es sich um erbB-1 (PCR), erbB-2 (PCR), erbB-4, erbB1/B2 (PCR), HER-2 (immunhistochemisch) und c-myc (PCR).. Gemessen wird dabei entweder das Genprodukt (Protein) oder die mittlere Kopienzahl des jeweiligen Onkogens (PCR). Mit Hilfe der Amplifikation (vermehrte Kopienzahl) oder der Deletion (geringere Kopienzahl) von Onkogenen können Informationen über das Risiko eines Patienten gewonnen (Rezidivwahrscheinlichkeit, metastasenfreies Überleben, Gesamtüberleben) und eine Therapieempfehlung gegeben werden (Hormon-, Chemotherapie).

Der „ Human Epidermal Growth Factor Receptor vom Typ 2“, abgekürzt HER 2, ist ein Protein, das auf den Zellen vieler menschlicher Organe vorkommt. Normalerweise befinden sich zwei dieser Rezeptoren auf der Zellmembran einer Brustzelle. Bei etwa 20-30 % aller Frauen mit Brustkrebs ist der HER 2-Rezeptor überexprimiert, das heißt auf der Zelloberfläche befinden sich etwa 10-100-mal so viele dieser Rezeptoren. Der DAKO Hercep Test misst, durch Einfärbung von bei der Operation entferntem Tumorgewebe, direkt die Stärke der Überexprimierung des HER 2-Rezeptors. Das Testergebnis, der DAKO-Score, wird in Werten zwischen 0 und 3+ angegeben, wobei nur 3+ ein eindeutig positives Ergebnis ist und bedeutet, dass mehr als 10 % der Tumorzellen komplett und stark angefärbt wurden.

Die prognostische Relevanz einer HER-2/Neu Amplifikation/Überexpression, besonders in nodalpositiven Patientinnenkollektiven, wurde bereits von vielen Autoren bestätigt. Das HER-2/Neu Onkogen kodiert für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor aus der Familie der Typ 1 Tyrosinkinase und spielt durch die Bildung von heterodimeren Rezeptorkomplexen mit den anderen Gruppenmitgliedern eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Mitogenese. Eine Überexpression von HER-2/Neu wurde in etwa 30 % aller Mammakarzinome entdeckt und dient als als wichtiger prognostischer Marker in zahlreichen Studien (Henkel et al. 2005).

Die Kombinationen ET und Edoc mit Zoledronat zeigten sich im AUC-CVA in-vitro als wirksamste Substanzen. Bei den HER-2 Tumoren (immunhistochemisch) mit Überexpression, reagierten 100 % der mit ET/Zoledronat und bei den Normwertigen 64 %

der mit dieser Kombination behandelten Präparate sensitiv. Bei Edoc/Zoledronat reagierten 67 % der Karzinome mit Überexpressionswerten sensitiv und 50 % der normwertigen Befunde. Bei der Austestung nur mit ET oder Edoc ergaben sich wesentlich weniger Sensitive (ET und Edoc bei Überexpression von HER-2/Neu Expression 17 %, ET und Edoc bei normwertigen HER-2/Neu Expressionsbefunden jeweils 50 % hoch sensitiv). Nicht signifikant, aber tendenziell sichtbar, ist, dass bei einer Überexpression von HER-2/Neu eine Kombinationsbehandlung mit dem Bisphosphonat Zoledronat die Wirksamkeit von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel verstärkt.

C-myc scheint ebenso ein prognostischer Marker hinsichtlich krankheitsfreien Intervalls oder Gesamtüberleben zu sein. In umfangreichen Studien wurde eine positive Korrelation zwischen der c-myc Amplifikation und der Progredienz der Erkrankung und der Überlebenszeit belegt. C-myc Verstärkung bei nodalnegativen Mammakarzinompatientinnen ohne adjuvante Therapie ist assoziiert mit kürzeren, krankheitsfreien Intervallen, als auch mit einer kürzeren Überlebenszeit (Schlotter et al. 2003). Bei den vorliegenden Werten der Chemosensitivitätstestung sind 85 % der c-myc Werte normwertig. Die potenteste Medikamentenkombination ergibt die Austestung mit Epirubicin/Paclitaxel und Zoledronat, wobei 76 % der Proben sensitiv reagierten, bei ET allein waren 35 % sensitiv. Weniger stark fiel dieser Effekt bei Edoc in Kombination mit Zoledronat und bei allen Kombinationen mit Bon-dronat aus, aber tendenziell zeigten die Werte der Chemosensitivitätstestung eine erhöhte Sensitivität bei einer Kombinationsbehandlung mit Bisphosphonaten.

Die erbB Onkogene bilden eine Familie strukturhomologer Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, die Bestandteil eines zellulären Signalsystems sind. Alle normwertigen erbB-4 Befunde (95 %) zeigten in der Kombinationsbehandlung mit Bisphosphonaten eine zum Teil wesentlich höhere Sensitivität als ET und Edoc (jeweils 37 % sensitiv)allein. Dabei waren die Kombinationen ET mit Zoledronat bei **74 %** und mit Bondronat bei **63 %** in der Austestung der Proben am wirksamsten.

Die erbB-1 Werte sind bei 80 % der vorliegenden Daten deletiert/amplifiziert. Als wirksamste Kombination zeigte sich ET/Zoledronat, wo **75 %** der Proben sensitiv auf diese Behandlung reagierten. Die normwertigen erbB-1 Proben zeigten sich in der Kombinationsbehandlung Zytostatika mit Zoledronat zu jeweils 75 % sensitiv, wobei das nur 20 % der Gesamtproben waren (Tab.24a, S.75).

Abhängig vom verwendeten Antikörper, zeigen immunhistochemisch 25–30 % aller Mammakarzinome eine Überexpression des Onkogens erbB-2. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die Amplifikation oder Überexpression von erbB-2 mit einem ungünstigerem Krankheitsverlauf korreliert (Wülfing et al. 2005). In vorliegender Studie waren 15 % der Gesamtproben amplifiziert und ließen hinsichtlich eines Therapieschemas keine eindeutige Aussage zu.

Bei Betrachtung der erbB1/erbB2-Werte ist ersichtlich, dass eine Kombinationstherapie Epirubicin/Paclitaxel mit Zoledronat (82 %) und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat (73 %) bei normwertigen erbB1/erbB2-Werten die bessere Therapie gegenüber einer alleinigen Zytostatikatherapie zu sein scheint (bei ET waren 36 % und bei Edoc 45 % der normwertigen Proben sensitiv). Die amplifizierten erbB1/erbB2-Werte zeigen hinsichtlich der Sensitivität keine Unterschiede im Ansprechverhalten auf Zytostatika- oder Kombinationstherapie in vorliegender Auswertung.

Maligne Tumoren weisen sehr häufig chromosomale Anomalien auf, die sich in der Regel in einem erhöhten DNA-Gehalt der Zellen bemerkbar machen und allgemein, ohne eine nähere Spezifikation der chromosomalen Anomalie, als Aneuploidie bezeichnet werden. Die chromosomale Aneuploidie gilt als Anzeichen für Neoplasie und aggressives Tumorverhalten (Böcking, 1993; Mellin, 1990). Die meisten Studien veranschlagen für die diploiden Mammakarzinome, sowohl bezüglich des rezidivfreien Intervalls, als auch bezüglich der Gesamtüberlebenszeit, eine bessere Prognose gegenüber den aneuploiden Tumoren (Coulsen et al., 1984; Fallenius et al., 1988). Im Gegensatz dazu, sahen andere Autoren keine signifikante Korrelation zwischen Tumorploidie und Überlebenszeit (Toikkanen et al., 1990; Noguchi et al., 1993). Teilweise wurde über eine Neigung der aneuploiden Tumore schneller zu rezidivieren berichtet, obwohl sie auf das Überleben nach Rezidiv keinen signifikanten Einfluß zeigten (Owainati et al., 1987).

In vorliegender Studie waren 47 % der Proben aneuploid und 53 % diploid. Eine Austestung der Proben mit ET zeigte in 44 % der aneuploiden und 40 % der diploiden Fälle eine sensitive Reaktion. Die Testung mit Edoc ergab diese Reaktion bei 33 % der aneuploiden und 50 % der diploiden Fälle. Kombiniert man ET mit Zoledronat, zeigen **67 %** der aneuploiden und **80 %** der diploiden Karzinome eine positive Chemosensitivität. Kombiniert man Edoc mit Zoledronat ist das bei **67 %** der aneuploiden und **60 %** der diploiden Tumorproben der Fall. Tendenziell scheint eine Kombinationstherapie mit Bisphosphonaten, sowohl bei aneuploiden als auch bei diploiden Tumoren, wirksamer als eine alleinige Zytostatikabehandlung zu sein.

Der Anteil der Tumorzellen in der S-Phase stellt ein Maß für die Proliferationsaktivität des Tumors dar. Eine hohe Proliferationsaktivität beschreibt Patientinnen, die auf eine Chemotherapie mit höheren Remissionsraten ansprechen (Bonetti et al., 1996). In 53 % der untersuchten Tumorproben waren die Werte der S-Phase erhöht. Vergleicht man die Werte der Chemosensitivitätstestung der Zytostatika ET und Edoc allein und in Kombination mit Zoledronat und Bondronat, zeigt der Trend eine höhere Wirksamkeit der Kombinationstherapie. ET zeigt in 40 % und Edoc in 30 % der Proben mit erhöhter S-Phase beim ATP-CVA eine hohe Sensitivität auf, während bei einer Kombinationstherapie mit Zoledronat, die ET- und Edoc-Werte in **70 %** der Tumorpräparate eine hohe Sensitivität aufweisen. Ebenso weist die Kombinationstherapie mit Bondronat, sowohl bei den ET-Werten mit 70 % als auch bei den Edoc-Werten mit 60 %, eine höhere Wirksamkeit auf.

Bei der Betrachtung der Zellzyklusphasen in der G0/G1 und G2/M-Phase fallen keine Unterschiede in den Werten der Chemosensitivitätstestung bei TE und Edoc allein und in Kombination mit Zoledronat oder Bondronat, bei den nicht normwertigen Befunden auf. Allerdings waren nur 37 % der G0/G1-Werte und 16 % der G2/M-Phase-Werte aller Proben nicht normwertig. Normwertige Befunde der G0/G1 Phase lagen in 63 % der Gesamtproben vor. Die Werte der Chemosensitivitätstestung bei den Zytostatika allein zeigten für ET und Edoc in 42 % der Proben eine hohe Sensitivität. Demgegenüber lagen die Werte für die Kombination ET/Zoledronat mit 75 %, ET/Bondronat mit 58, % und Edoc/Zoledronat mit 50 %, in der Anzahl der hochsensitiven Proben, über denen der alleinigen Zytostatikatherapie.

Die G2/M-Phase war in 84 % aller Proben im Normbereich. Der Trend bei der Auswertung der Werte der Chemosensitivitätstestung zeigt, dass eine kombinierte Behandlung mit einem Zytostatikum und einem Bisphosphonat eine höhere Wirkung hat, als eine alleinige Zytostatikatherapie. Während die Medikamentenkombinationen ET/ Zoledronat in **75 %**, Edoc/Zoledronat und ET/Bondronat in **63 %** und Edoc/Bondronat in **50 %** der Proben eine hohe Sensitivität aufwiesen, sind dies bei ET allein 31 % und bei Edoc allein 44 % der Tumore mit normwertigen Befunden.

Tumorassoziierte Proteolysefaktoren wie uPA (Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp) und PAI (Inhibitor) sind Faktoren, die die wichtigsten Kriterien für den klinischen Einsatz erfüllen. Bei uPA und PAI-1 handelt es sich um Schlüsselfaktoren der proteolytischen Kaskade, die an den Prozessen der Tumordinvasion, mit Durchbrechen der Basalmembran und Intravasation beteiligt sind (Bell 1996; Duffy 1996; Harbeck et al. 2001). Hohe Konzentrationen von uPA und/oder PAI-1 im Tumor sind mit erhöhtem Metastasierungs-

risiko und kürzerem Überleben assoziiert (Look et al. 2002). 1988 stellten Duffy et al. erstmals einen Zusammenhang zwischen erhöhter enzymatischer Aktivität von uPA im Tumorgewebe von Mammakarzinomen und einer signifikant ungünstigeren Prognose mit einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit her (Duffy et al. 1988). Vor allem wurde deutlich, dass uPA als prognostischer Marker bei Patientinnen ohne axilläre Lymphknotenbeteiligung angewandt werden kann (Jänicke et al. 1993; Ferno et al. 1996). Für die Protease PAI-1 als prognostischen Marker, konnten Jänicke et al. 1993 erstmals einen Zusammenhang mit einer aggressiven Erkrankung, bei sowohl nodalpositiven, als auch nodalnegativen Patientinnen feststellen (Jänicke et al. 1993). Nodalnegative Patientinnen mit niedrigem uPA und PAI-1 im Primärtumor, haben eine sehr gute Prognose, so dass eine adjuvante Chemotherapie bei diesen Patientinnen nicht indiziert zu sein scheint (Jänicke et al. 2001). Obwohl die bedeutende Rolle von uPA und PAI in malignen Geschehen durch zahlreiche Studien als bewiesen betrachtet werden kann, so ist die präzise zelluläre Lokalisation der Proteasen und deren mRNA weiterhin spekulativ (Umeda et al. 1997).

Topoisomerase-II-alpha spielt eine wichtige Rolle während des Zellzyklus. Eine veränderte Regulation der Topoisomerase-II-alpha konnte in vielen verschiedenen Neoplasien gezeigt werden. Die Sensitivität oder Resistenz maligner Zellen gegenüber Anthrazyklinbasierender Therapien wurde als abhängig von deren Gehalt an Topoisomerase-II-alpha beschrieben (Coon et al. 2002).

Mit 10 bzw. 15 % lag die Anzahl der Proben in vorliegender Studie mit überexpressiven Werten, sowohl für die uPA- und PAI-Expression, als auch für die Topoisomerase-II-alpha-Werte, in einem Bereich mit geringer Aussagekraft. Tendenziell erkennbar ist, dass eine Kombinationsbehandlung mit Bisphosphonaten sensitiver anspricht, als eine alleinige Zytostatikagabe. Insbesondere bei der Kombination mit Zoledronat, zeigten die Werte der Chemosensitivitätstestung beim ATP-CVA für alle überexpressiven Proben von Topoisomerase-II-alpha und PAI-1 eine hohe Sensitivität (AUC >18000) an. Die Austestung mit ET und Edoc allein zeigt bei Topoisomerase-II-alpha-Überexpression in 33 % und bei PAI-Überexpression in keinem Fall eine hohe sensitive Wirkung. Bei den Werten der uPA-Überexpression zeigen ET und Edoc in 50 % eine hohe Sensitivität an. In Kombination mit Zoledronat konnte in allen Proben eine hohe Chemosensitivität nachgewiesen werden. Der gleiche Trend ist bei den normwertigen Befunden der proteolytischen Enzyme zu erkennen. Die wirksamsten Therapien scheinen die Kombinationen ET/Zoledronat und Edoc/ Zoledronat zu sein.

Die Östrogen- und Progesteronrezeptoren spielen in mehrfacher Hinsicht eine wichtige Rolle bei der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms. Hormonelle Interbalancen, insbesondere ein endogener Östrogenüberschuss, sind ein Risikofaktor für die Entwicklung eines Mammakarzinoms. In der histologischen Diagnostik repräsentiert die Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren einen wichtigen Baustein bei der Klärung der Histogenese von Metastasen eines unbekanntes Tumors. Die Steroidhormonrezeptoren sind intrazelluläre nukleäre Rezeptoren, also im Kern der Zielgewebe lokalisiert (unter anderem in der Mamma). Diese Hormonrezeptoren haben besondere Charakteristika: die Bindung des Hormons an den Rezeptor ist spezifisch. Diese Bindung des Hormons an den Rezeptor löst eine biologische Reaktion aus (Nyholm et al. 1992). Das Steroidhormon diffundiert durch die Zellmembran und das Zytoplasma in den Zellkern. Nach der Bindung des Östrogens oder Progesterons an den jeweiligen Rezeptor, bindet dieser Ligand-Rezeptor-Komplex an bestimmte Stellen auf der DNA und ermöglicht dabei die Transkription bestimmter Gene, die verstärkt exprimiert werden. Steroidhormone verändern primär das Muster der Genexpression (Streyer 1996). In Tumoren werden mehrere Wachstumsfaktoren östrogenabhängig produziert. Mit diesen Wachstumsfaktoren können sich die Tumorzellen selbst stimulieren (autokrine Regulation) und erreichen so eine höhere Wachstumsrate und Aggressivität. Durch die Blockade des Östrogenrezeptors und die damit verbundene Reduktion der Bildung verschiedener Wachstumsfaktoren, kann man so gleichzeitig mehrere autokrine Regulationsschleifen in östrogenabhängigen Tumoren unterbinden. Für die Therapie mit antiöstrogenen Medikamenten ist die Kenntnis des Hormonrezeptorstatus absolut wichtig.

In der Mammakarzinomtherapie kommen Aromataseinhibitoren, welche die Aromatase - die aus Testosteron bzw. Androstendion im letzten Syntheseschritt die physiologisch wirksamen Östrogene Estradiol und Estron bildet - inhibiert, zum Einsatz. Lokal am Tumor verdrängen Östrogenantagonisten endogene Östrogene kompetitiv von den Östrogenrezeptoren, wodurch die Bindung von Östrogen an eben diese Rezeptoren blockiert wird. Im Tumor kann die proliferationsfördernde Eigenschaft von Östrogen somit nicht wirksam werden (Jordan 1988; Jaiyesimi et al. 1995). Die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im primären Mammakarzinom gilt als Marker einer erhaltenen funktionellen Differenzierung und als günstiges Prognosekriterium (Ahr et al. 1995). Die Expression des Progesteronrezeptors dient als Kontrolle für ein funktionell intaktes Östrogenrezeptorsystem.

Nach Definition der AGO besteht eine antihormonelle Behandlungsindikation, wenn mehr als 10 % der Tumorzellen den Östrogen-und/oder Progesteronrezeptor exprimieren. Nach St. Gallen 2005 gelten Tumoren mit 1-10 % positiven Tumorzellen als fraglich positiv.

In vorliegender Studie wiesen 65 % der Proben sowohl eine positive Östrogen- wie auch Progesteronrezeptor Expression (PCR) auf. Bei der Austestung der Präparate mit positiver Progesteronrezeptor Expression, zeigten jeweils 38 % der Proben, mit ET oder Edoc allein behandelt, eine hohe Sensitivität. Kombiniert man ET mit Zoledronat ergibt die Austestung eine Verdoppelung dieser Proben mit einer hohen Sensitivität, ca. 77 %. Das gleiche Ergebnis ergibt die Kombinationsbehandlung mit Bondronat. Bei der Auswertung der Proben mit positiver Östrogenrezeptor Expression zeigt der Trend in die gleiche Richtung. Während 38 % der Proben auf eine alleinige ET-Testung mit hoher Sensitivität ansprachen, ergab die Kombination mit Zoledronat und Bondronat eine hohe Sensitivität bei 69 % der untersuchten Präparate. Beim Abgleich der Werte der Chemosensitivitätstestung von Edoc in Kombination mit Zoledronat zeigen die Ergebnisse tendenziell in die gleiche Richtung wie bei Epirubicin/Paclitaxel, allerdings mit 54 % bei positiver Östrogenrezeptor Expression und 46 % bei positiver Progesteronrezeptor Expression deutlich geringer.

Die Expression von pS2 wurde in Mammakarzinomen, aber auch in normalem oder mastopathisch verändertem Brustdrüsengewebe gefunden (Rio, Chambon 1990). Die biologische Funktion des pS2-Proteins ist noch relativ unbekannt (Ahr et al. 1995). Die Synthese des pS2-Proteins wird durch die Östrogen-abhängige Transkription des pS2-Gens induziert und gilt somit als Ausdruck eines funktionell aktiven Östrogenrezeptors (Roberts et al. 1988).

5. Zusammenfassung

Bei der Planung der Therapie des Mammakarzinoms müssen viele unterschiedliche Parameter berücksichtigt werden. Maßgeblich sind heute die Prognose- und Prädikтивfaktoren, die anhand der Anamnese und der Untersuchung des Tumormaterials ermittelt werden. Der Begriff Prognosefaktoren umfasst Parameter, die eine Aussage über das Überleben oder die Rezidivrate von Mammakarzinompatientinnen ermöglichen. Dazu zählen unter anderem das Alter der Patientinnen, die TumorgroÙe, der Nodal- und Hormonrezeptorstatus, histologisches Grading und histologischer Tumortyp, der Onkogenstatus, der Proliferation/DNA-Index und die proteolytischen Enzyme. Hoch interessant sind jedoch auch die Parameter, die das Ansprechen von Tumorzellen auf eine Behandlung vorhersagen, vor allem im Hinblick auf die Vermeidung unnötiger Therapien, was beispielsweise eine Verbesserung der Lebensqualität nach sich ziehen kann. Solche Parameter werden als Prädikтивfaktoren bezeichnet.

Bei keinem Karzinom sind derart viele Prognose- und Prädikтивfaktoren bekannt, wie beim Mammakarzinom. Schätzungsweise wurden bis heute mehr als 100 einzelne und mittels Genchipdiagnostik mehr als 5000 Parameter am Tumormaterial untersucht und mit dem Krankheitsverlauf, sowie anderen Prognosefaktoren korreliert (van de Vijver et al., 2002; van't Veer et al., 2002). Ihre klinische Bedeutung ist heute jedoch immer noch gering oder fraglich. Vergleichbar der Prinzipien der „evidence-based-medicine“ werden für die Aussagekraft dieser Faktoren verschiedene Evidenzlevel definiert und untersucht, um zu klären, ob ihr klinischer Einsatz sinnvoll ist (Hayes et al., 1996). Zudem kann die Unterteilung in prognostische und prädiktive Faktoren nicht ganz streng erfolgen. Denn positive Hormonrezeptoren, ein prädiktiver Faktor beispielsweise, lassen, neben der hohen Wahrscheinlichkeit des Ansprechens auf eine Hormontherapie, auch eine gute Differenzierung der Tumorzellen und damit eine gute Prognose erkennen. Andererseits werden bei schnell wachsenden Tumoren hohe Proliferationsraten zu finden sein, die aber auch mit einem hohen Ansprechen auf eine Chemotherapie einhergehen.

Bei der Vielzahl der zur Verfügung stehenden prognostischen und prädiktiven Faktoren stellt sich die Frage, inwieweit sich daraus ein Rückschluss auf die geeignetste Therapie ziehen lässt. Neben der Operation und der Strahlentherapie ist die medikamentöse Therapie zentraler Bestandteil der Therapie des Mammakarzinoms. Sie wird ständig durch neue Therapiestudien überprüft und weiterentwickelt. In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Parameter definiert, die die Prognose bei der einzelnen Patientin wesentlich

beeinflussen sollen, bzw. die primäre oder sekundäre Resistenz begründen. Die Tests zur Bestimmung der in-vitro Wirksamkeit von Medikamenten oder deren Kombinationen, folgen im wesentlichen zwei verschiedenen Ansätzen, den clonogenic Assays und den non clonogenic Assays. Non clonogenic Assays sind bei den meisten Tumoren einsetzbar und messen sowohl die Leistungsfähigkeit als auch das Wachstum der Zellen.

Mit dem ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay steht ein System zur Verfügung, das auf der Messung des zellulären ATP's beruht und damit indirekt den Energieladungszustand der Zelle bestimmt. Mit dem ATP-Chemosensitivitätstest kann man die Empfindlichkeit oder Resistenz eines Tumors gegen die auf Grund klinischer Erfahrung eingesetzten Chemotherapie-Regime prüfen. Durch in-vitro Messungen wurde gezeigt, dass Bisphosphonate das Zellwachstum beim Mammakarzinom reduzieren. Seneratne et al. (2000) zeigten, dass Zoledronat das potenteste Bisphosphonat zu sein scheint. Die Daten von Fromigue et al. (2000) bestätigen, dass die Verabreichung von vier strukturell unterschiedlichen Bisphosphonaten als potenzielle Medikamente gegen Brustkrebs geeignet sind.

Soweit bekannt, ist dies die erste Studie, die durch in-vitro Messungen mittels ATP-CVA verschiedene Chemotherapieregime in Kombination mit Bisphosphonaten bei Brustkrebsproben aus klinischen Studien untersucht. Die Messergebnisse der in-vitro Untersuchungen zeigten einen überzeugenden, verstärkenden Effekt auf die Inhibition des Tumorstwachstums beim Mammakarzinom, bei der Kombination antineoplastischer Medikamente mit Bisphosphonaten. In der Gruppe der 20 klinischen Brustkrebsproben war häufig Zoledronat das potenteste Bisphosphonat. Bisphosphonate in Kombination mit Epirubicin und Taxanen scheinen ein vielversprechendes Therapieregime zu sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adami S, Zamberlan N (1996) Nebenwirkung von Biphosphonaten. *Drug Safety* 14: 158-170
2. Adlard JW et al. (2002) Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncology (Reviews)* 3: 75
3. AGO Gravenbruch (2002) Leitlinien für die Behandlung des primären und des metastasierenden Mammakarzinoms: [www. ago – online](http://www.ago-online).
4. Ahr A, Scharl A, Göhring U-J, Crombach G, Stoffl M (1995) Immunhistochemischer Nachweis des pS2-Proteins an Paraffinschnitten von Mammakarzinomgeweben. *Pathologe* 16: 278-284
5. Andreotti PE et al. (1995) Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 55: 5276-5282
6. Baak JPA, Dop H van, Kurver PHJ, Hermans J (1985) The value of Morphometry to classic prognosticators in breast cancer. *Cancer* 56: 374-382
7. Bartl R, Frisch B (1993) *Biopsy of bone in internal medicine*. Kluwer, Dordrecht
8. Bartl R, Frisch B (2001) *Das Bisphosphonat-Manual*. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien: 158-164
9. Bastert G (1990) Malignome der Mamma. In: Schmidt-Matthiesen H (Hrsg) *Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe*. Urban & Schwarzenberg, München Wien Baltimore, Bd 12, 3. Aufl.
10. Bell WR (1996) The fibrinolysis system in neoplasia. *Semin Thromb Hemost* 22 (6): 459-478
11. Bender HG, Schnürch HG (1991) Diagnostik und Therapie von malignen Tumoren und deren Vorstadien an der Mamma. In: Bender HG (Hrsg) *Gynäkologische Onkologie*. Thieme, Stuttgart New York, S 347-375
12. Bergen AW, Caporaso N (1990) Cigarette smoking. *J Natl Cancer Inst* 91: 1365-1375
13. Beyer H, Walter W (1998) *Lehrbuch der organischen Chemie*. Hirzel Verlag, Stuttgart, 23. Aufl.

14. Bijvoet OLM, Fleisch HA, Canfield RE, Russell RGG (1995) Bisphosphonate on bones, Elsevier, Amsterdam
15. Bloom HJG, Richardson WW (1957) Histologic grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases which 359 have been followed for 15 years. *Brit J Cancer* 11: 359
16. Body JJ, Diel IJ, Lichinitser MR et al. (2003) Intravenous Ibandronate reduces the incidence of skeletal complications in patient with breast cancer and bone metastases. *Ann Oncol* 14: 1399-1405
17. Body JJ, Diel IJ, Lichinitser MR et al. (2004) Oral ibandronate reduces the risk of skeletal complications in breast cancer patients with metastatic bone disease: results from two randomized, placebo-controlled phase III studies. *Br J Cancer* 90: 1133-1137
18. Boissier S, Mignetto S, Frapart L et al (1997) Bisphosphonates inhibit prostate and breast cancer carcinoma cell adhesion to unmineralized bone extra-cellular matrices. *Cancer Res* 57: 3890-3894
19. Bonetti A, Zaninelli M, Rodella S, Molino A et al. (1996) Tumor proliferative activity and response to first-line chemotherapy in advanced breast carcinoma. *Breast Cancer Research and Treatment* 38: 289-297
20. Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) Pathologie, Urban & Fischer, München Jena
21. Böcking A (1993) Zytogenetische Grundlagen der diagnostischen DNA-Zytometrie, 29. Symposium der International Academy of Pathology, Bonn
22. Busch M, Rave-Fränk M, Hille A, Dühmke E (1998) Influence of clodronate in breast cancer cells in vitro. *Eur J Med Res* 3: 1-5
23. Bässler R (1998) Histopathologie und aktuelle Klassifikation des Mammakarzinoms. Springer, *Der Onkologe* 10: 878
24. Carroll KK (1975) Experimental evidence of dietary factors and hormone-dependent cancers. *Cancer Res* 35: 3374
25. Clezardin P (2002) The antitumor potential of bisphosphonates. *Semin Oncol* 6: 33-42
26. Coleman RE (2002) Bisphosphonates for the prevention of bone metastases. *Semin Oncol* 6: 43-49

27. Coleman RE (2002) Efficacy of zoledronic acid and pamidronate in breast cancer patients: a comparative analysis of randomized phase III trials. *Am. J Clin Oncol* 25: 25-31
28. Coleman RE (2003) Current and future status of adjuvant therapy for breast cancer. *Cancer* 97 (suppl 3): 880-888
29. Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronda G, Preisler HD (2002) Amplification and overexpression of topoisomerase-II-alpha: Predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 8 (4): 1061-1067
30. Coulsen PB, Thornthwaite Jt, Wooley TW, Sugarbaker EV, Seckinger D (1984) Prognostic indicators including histogram type, receptor content, and staging related to human breast cancer patient survival. *Cancer Res* 44: 4187-4196
31. Cree IA, Kurbacher CM (1997) Individualizing chemotherapy of solid tumors-is there any alternative? *Anti Cancer Drugs* 8: 541-548
32. Cree IA, Kurbacher CM (1999) ATP-based tumor chemosensitivity testing: assisting new agent development. *Anti Cancer Drugs* 10: 431
33. De Vita VT Jr (1997) Principles of cancer management: chemotherapy. In: De Vita VT Jr, Helman S, Rosenberg S (eds) *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, S 333-347
34. Diel IJ, Body JJ, Lichinitser MR et al. (2004) Improved quality of life for long-term treatment with the bisphosphonate ibandronate in patients with metastatic bone disease due to breast cancer. *Eur J Cancer* 40: 1704-1712
35. Diel IJ, Solomeyer EF, Gollan C et al. (2000) Bisphosphonates in the reduction of metastases in breast cancer cells – results of the extended follow-up of the first study population. *Am Soc Clin Oncol* 82a: 314 (abstract)
36. Diel IJ, Solomeyer EF, Gollan C et al. (1998) Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N Engl J Med* 339: 357-363
37. Diener KM (1996) Bisphosphonates for controlling pain from metastatic bone disease. *Am J Health-Syst Pharm* 53: 1917-1927
38. Dhingra K, Hittelman WN, Hortobagyi GN (1995) Genetic changes in breast cancer – consequences for therapy? *Gene* 159: 59-63

39. Duffy MJ, O'Grady P, Devaney D, Osiorain L, Fennelly JJ, Lijnen HJ (1988) Urokinase-plasminogen activator, a marker for aggressive breast carcinomas. *Cancer* 62: 531-533
40. Duffy MJ (1996) Proteases as prognostic markers in cancer, Minireview. *Clin Cancer Res* 2: 613-618
41. Early breast cancer trialists' collaborative group (1992) Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. *Lancet* 339: 1-15, 71-85
42. Eisenbrand G, Metzler M (1994) *Toxikologie für Chemiker*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York
43. Eskelinen M, Lipponen P, Papinaho S, Aaltomaa S, Kosma VM, Klemi P, Syrjänen K (1992) DNA flow cytometry, nuclear morphometry, mitotic indices and steroid receptors as independent prognostic factors in female breast cancer. *Int J cancer* 51: 555-561
44. Fallenius G, Auer G, Carstensen JM (1988) Prognostic significance of DNA measurements in 409 consecutive breast cancer patients. *Cancer* 62: 331-341
45. Falkiewicz B, Schlotter CM, Bosse U, Bielawski K, Vogt U (2000) c-Myc oncogene gene dosage, serum CEA and CA-15.3 antigene levels, and cellular DNA values in relation to ex vivo chemosensitivity of primary human breast cancer. *Acta Biochim Pol* 47: 149-156
46. Ferno M, Bendahl PO, Borg A, Brundell J, Hirschberg L, Olsson H, Killander D, (1996) Urokinase plasminogen activator, a strong independent prognostic factor in breast cancer, analysed in steroid receptor cytosols with a luminometric immunassay. *Eur J Cancer* 32a (5): 793-801
47. Fleisch H (2000) *Bisphosphonates in bone disease*. 4.ed, New York
48. Fisher B, Bauer M (1985) Five year results of a randomized clinical trial comparing total mastectomy and segmental mastectomy with or without radiation in the treatment of breast cancer. *New Engl J Med* 312: 665
49. Foekens JA, Rio MC, Seguin P, van Putten WLJ, Fauque J, Nap M, Klijn JGM, Chambon P (1990) Prediction of relapse and survival in breast cancer patients by pS2 protein status. *Cancer Res* 50: 3832-3837

50. Fournier P, Boissier S, Filleur S, Guglielmi J, Cobon F, Colombel M, Clezardin P (2000) Bisphosphonates inhibit angiogenesis in vitro and testosterone-stimulated vascular regrowth in the ventral prostate in castrated rats. *Cancer Res* 62: 6538-6544
51. Fromiguet O, Lagneaux L, Body JJ (2000) Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro. *J Bone Miner Res* 15: 2211-2221
52. Gianni L, Baselga J, Eiermann W, Guillem Porta V, Semiglazov V, Garcia-Conde J, Zambetti M, Valagussa P, Bonadonna G (2002) First report of the European Cooperative Trial in operable breast cancer (ECTO): effects of primary systemic therapy (PST) on local/regional disease. *Proc ASCO* 21: 34a, abstract#133
53. Goldhirsch A, John H, Richard D Gelber, Alan C Coates, Senn HJ (2001) Meeting Highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Clin Oncology* 19: 3817-3827
54. Green J, Gschaidmeier H, Yoneda T et al. (2003) Antitumor effects of bisphosphonates. *Cancer* 97 (suppl. 3): 840-847
55. Hamburger AW, Salmon SE (1979) Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461
56. Harbeck N, Alt U, Berger U, Krüger A, Thomssen C, Jänicke F, Höfler H, Kates RE, Schmitt M (2001) Prognostic impact of proteolytic factors (uPA, PAI-1, Cathepsin B, D, L) in primary breast cancer reflects of adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* 7: 2757-2764
57. Harbeck N, Aigner M, Kuschel B, Kiechle M (2002) Mammakarzinom-Prognostische und prädiktive Faktoren. *Onkologie* 8: 808-816
58. Harbeck N, Kates RE, Look MP, Meijer-van Gelder ME, Klijn JG, Krüger A, Kiechle M, Jänicke F, Schmitt M, Foekens JA (2002) Enhanced benefit from adjuvant chemotherapy in breast cancer patients classified high-risk according to urokinase-type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor type 1 (n = 3424). *Cancer Res* 62: 4617-4622
59. Harbeck N, Eiermann W, Engel J, Funke I, Janni W, Permanetter W, Raab G, Untch M, Zemzoum I (2003) Prognostische und prädiktive Faktoren beim primären Mammakarzinom. *Manual Mammakarzinome* by Tumorzentrum München, Zuckschwerdt Verlag, München

60. Harris JR, Morrow M, Bonadonna G (1993) Cancer of the breast. In: De Vita VT, Hellmann S, Rosenberg SA (Hrsg) Cancer: Principles and practice of oncology. Lippincott, Philadelphia, 4. Aufl. S 1264-1332
61. Hayes DF, Bast R, Desch CE, Fritsche JrH, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ (1996) A tumor marker utility grading system (TMUGS): a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst* 88: 1456-1466
62. Henkel V, Benöhr P, Speer R, Vogel U, Sotlar K, Reiser A, Neubauer H, Fehm T, Tabiti T, Wallwiener D, Solomayer E (2005) Die Expression von Her-2/neu beim Mammakarzinom – eine Zusammenfassung verschiedener diagnostischer Methoden. *Senologie – Zeitschrift für Mammadiagnostik und –therapie* 2: DOI: 10.1055/s
63. Henry JA, Piggott NH, Mallick UC, Nicholson S, Farndon JR, Westley BR, May FEB, (1991) pNR-2/pS2 immunohistochemical staining in breast cancer: correlation with prognostic factors and endocrine response. *Br J Cancer* 63: 615-622
64. Hermanek P, Hutter RV, Sobin LH et al. (1999) *TNM-Atlas*, Springer, Heidelberg
65. Hiraga T, Hatta K, Nishimura R (1999) Combined treatment with bisphosphonates and oral UFT inhibits bone and soft organ metastases and prolongs survival. *J Bone Miner Res* 14 (suppl 1): 188
66. Hortobagyi GN (1991) Bone metastasis in breast cancer patients. *Semin Oncol* 18 (suppl 5): 11-15
67. Hortobagyi GN, Theriault RL, Lipton A, Porter I, Blayney D, Sinoff C, Wheeler H, Simeone JF, Seaman JJ, Knight RD, Heffernan M, Mellars K, Reitsma DJ (1998) Long-term prevention of skeletal complications of metastatic breast cancer with pamidronate. *J Clin Oncol* 16: 2038-2044
68. Hubner RA, Houston SJ (2005) Bisphosphonates use in metastatic bone disease. *Hosp Med* 66: 414-419
69. Jagdev SP, Croucher PI, Coleman RE (2000) Zoledronic acid induces apoptosis of breast cancer cells in vitro – evidence for additive and synergistic effects with taxol and tamoxifen. *Proc Am Soc Clin Oncol* 19: 664
70. Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami HA, Croucher PI (2001) The bisphosphonates, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer* 84: 1126-1134

71. Jaiyesimi IA, Buzdar AU, Decker DA, Hortobagyi GN (1995) Use of tamoxifen for breast cancer twentyeight years later. *J Clin Oncol* 13 (2):513-529
72. Jänicke F, Schmitt M, Hafter R, Hollrieder A, Babic R, Ulm K, Gössner W, Graeff H, (1990) Urokinase-type plasminogen activator (uPA) antigen is a predictor of early relapse in breast cancer. *Fibrinolysis* 4: 69-78
73. Jänicke F, Schmitt M, Pache L, Ulm K, Harbeck N, Hofler H, Graeff H (1993) Urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 are strong and independent prognostic factors in node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 24 (3): 195-208
74. Jänicke F, Prechtel A, Thomssen C, Harbeck N, Meisner C, Untch M, Sweep CG, Selbmann HK, Graeff H, Schmitt M, Foekens JA (2001) Risk-adapted adjuvant chemotherapy in node-negative breast cancer based on tumor biological factors uPA and PAI-1: First interim analysis of a randomized multicenter trial. *J Natl Cancer Inst* 93: 913-920
75. Jordan VC (1988) The development of tamoxifen for breast cancer therapy: A tribute to the late Arthur L. Walpole. *Breast Cancer Res Treat* 11: 197-209
76. Konecny G et al. (2000) Correlation of the drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO Stage III ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 77:2258-2263
77. Kunick C, Lemcke T (2002) Paullone als selektive Kinase-Inhibitoren. *Pharm Ztg* 147: 2428
78. Kurbacher CM, Cree IA, Bruckner HW, Brenne U, Kurbacher JA, Mueller K, Ackermann T, Glister TJ, Wilhelm LM, Engel H, Mallmann PK, Andreotti PE (1998) Use of an ex vivo ATP luminescence assay to direkt chemotherapy for reccurent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 9: 51-57
79. Kurbacher CM et al. (2000) Chemosensitivitätstestung beim Mammakarzinom. In: Untch M et al.(Hrsg) Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms-state of the art-2000. Zuckschwerdt Verlag, München Bern Wien New York, S 388
80. Köchli OR, Sevin BU, Haller U (1994) Overview of currently used chemosensitivity test system in gynecologic malignancies and breast cancer. *Contrib Gynecol Obstet* 19: 12-23
81. Köchli OR, Sevin BU, Haller U (1994) Chemosensitivity testing in gynecologic malignancies and breast cancer. *Contrib Gynecol Obstet* 19: 108-121

82. Köchli OR, Sevin BU, Perras JP, Angioli R, Steren A, Rodriguez M, Ganjei P, Averette HE (1994) Growth characteristics of nonmalignant cells in the ATP-cell viability assay. *Oncology* 51: 35-41
83. Lin JH (1996) Bisphosphonates. A review of their pharmacokinetic properties. *Bone* 2: 75-85
84. Lipton A (2003) Bisphosphonates and metastatic breast carcinoma. *Cancer* 97 (suppl 3): 848-853
85. Lipton A, Theriault RL, Hortobagyi GN et al. (2000) Pamidronate prevents skeletal complications and is effective palliative treatment in women with breast cancer and osteolytic metastases: long-term follow up of two randomized, placebo-controlled trials. *J Clin Oncol* 88: 1082-1090
86. Look MP, van Putten WLJ, Duffy MJ, Harbeck N, Brünner N, Kates R, Fernö M, Eppenberger S, Spyrtos F, Thomssen C, Sweep CGJ, Peyrat JP, Martin PM, Blankenstein MA, Magdelenat H, Quillien-Pouvreau V, Daver R, Ricolleau G, Daxenbichler G, Cufer T, Bendahl PO, Lisboa B, Ulm K, Christensen IJ, Meijer van Gelder ME, Fiets E, Manders P, Broet P, Romain S, Windbichler G, Borstnar S, Beex LVRM, Jännicke F, Klijn JGM, Eppenberger U, Schmitt F, Foekens JA (2000) Pooled analysis of prognostic impact of uPA and PAI-1 in 8.377 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 94: 116-128
87. Loprinzi CL, Thome SD (2001) Understanding the utility of adjuvant systemic therapy for primary breast cancer. *J Clin Oncol* 19: 972-979
88. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP et al. (1998) Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res* 13: 581-589
89. Major P, Lortholary A, Hon J, Abdi E, Mills G, Menssen HD, Yunus F, Bell R, Body J, Quebe-Fehling E, Seaman J (2001) Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: a pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials. *J Clin Oncol* 19: 558-567
90. Marx RE (2003) Pamidronate (Aredia) and Zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg* 61: 1115-1118
91. Marx RE, Stern D (2003) Oral and Maxillofacial pathology. A rationale for diagnosis and treatment. Quintessence Publishing Co, Chicago

92. McGuire WL, Tandon AK, Allred C, Chamness GC, Clark GM (1990) How to use prognostic factors in axillary node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 82: 1006-1015
93. Mellin W (1990) Cytophotometry in tumor pathology. A critical review of methods and applications. And some results of DNA analysis. *Path Res Pract* 186: 37-62
94. Migliorati CA (2005) Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol* 21: 4253-4254
95. Migliorati CA, Casiglia J, Epstein J, Jacobsen PL, Siegel MA, Woo SB (2005) Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis. An American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc* 136: 1658-1668
96. Miller PD (2005) Optimizing the management of postmenopausal osteoporoses with bisphosphonates: the emerging role of intermittent therapy. *Clin Therapeutics* 27: 361-376
97. Mundy GR (1999) Bisphosphonates as anticancer drugs. *Exp Opin Invest Drugs* 8: 2009-2015
98. Murin S, Inciardi J (2001) Cigarette smoking and the risk of pulmonary metastasis from breast cancer. *Chest* 119: 1635
99. Mutschler E et al. (2001) *Arzneimittelwirkungen*, Wiss. Verlagsges.mbH, Stuttgart, 8. Aufl.
100. Nagel GA, Holtkamp W, Wander HE (1983) Biologische und klinische Prognosefaktoren metastasierender Mammakarzinome. In: Nagel GA, Sauer R, Schreiber HW (Hrsg) *Aktuelle Onkologie*, Zuckschwerdt, München, Bd. 8, S 91-105
101. National Institutes of Health Consensus Development Panel (2001) National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3. *J Natl Cancer Inst Monogr* (30): 5-15
102. Neale MH et al. (2001) Comparison of the ex vivo chemosensitivity of uveal cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 11: 601
103. Neale MH, Lamont A, Hindley A, Kurbacher CM, Cree IA (2000) The ex vivo effect of high concentrations of doxorubicin on recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs* 11: 865-871

104. Noguchi M, Koyasaki N, Ohta N, Kitagawa H, Earashi M, Thomas M, Miyazaki I, Mizukami Y (1993) Internal mammary nodal status is a more reliable prognostic factor than DNA ploidy and c-erbB-2 expression in patients with breast cancer. *Arch Surg* 128: 242-246
105. Nyholm HCJ, Nielsen AI, Lyndrup J, Norup P, Thorpe SM (1992) Biochemical and immunohistochemical estrogen and progesterone receptors in adenomatous hyperplasia and endometrial carcinoma: Correlations with stage and other clinicopathologic features. *Am J Obstet Gynecol* 167: 1334-1342
106. Olopade OI, Pichert G (2001) Cancer genetics in oncology practice. *Ann Oncol* 12: 895-908
107. Owainati AAR, Robins RA, Hinton C, Ellis IO, Dowle CS, Ferry B, Elston CW, Blamey RW, Baldwin RW (1987) Tumor aneuploidy, prognostic parameters and survival in primary breast cancer. *Br J Cancer* 55: 449-454
108. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 49: 33-64
109. Paterson AHG (1997) Should bisphosphonates be standard therapy for bone pain? *Support Care Cancer* 5: 200-204
110. Paterson AHG, Powles TJ, Kanis TA et al. (1993) Double-blind controlled trial of oral clodronate in patients with bone metastases from breast cancer. *J Clin Onc* 11: 59-65
111. Pluijm G, Vloedgraven H, van Beek E, van der Weels-Paals L, Löwick C, Papapolous S (1996) Bisphosphonates inhibit the adhesion of breast cancer cells to bone matrix. *J Clin Invest* 98: 689-705
112. Ponder BAJ (2001) Cancer genetics. *Nature* 411: 336-341
113. Poremba C, Simon R, Boecker W et al. (1999) Molekulare Ursachen der Tumorentstehung. *Onkologie* 5: 847-857
114. Powles T, Paterson S, Kanis TA et al. (2002) Randomized, placebo-controlled trial of clodronate in patients with primary operable breast cancer. *J Clin Oncol* 20: 3219-3224
115. Riede UN, Schäfer HE (1993) Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme, Stuttgart, New York, 3. Aufl.

116. Rio MC, Chambon P (1990) the pS2 gene, mRNA and protein: a potential marker for human breast cancer. *Cancer Cells* 2: 269-274
117. Roberts M, Wallace J, Jeltsch JM, Berry M (1988) The 5' flanking region of the human pS2 gene mediates its transcriptional activation by estrogen in MCF-7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 151: 306-313
118. Robra BP (1991) Häufigkeit und Mortalität gynäkologischer Krebse in der Bundesrepublik Deutschland. In: Bender HG (Hrsg): *Gynäkologische Onkologie*. Thieme, Stuttgart, New York, S 33-45
119. Rodan GA, Fleisch HA (1996) Bisphosphonates: mechanisms of action. *J Clin Invest* 97: 2692-2696
120. Rodan GA (1998) Mechanisms of action of bisphosphonates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38: 375-388
121. Rogers MJ, Watts DJ, Russell RGG (2004) Overview of bisphosphonates. *Cancer* 80: 1652-1660
122. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M, Howell A, Belch A, Mackey J, Apffelstaedt J, Hussein M, Coleman RE, Reitsma DJ, Seaman JJ, Chen BL, Ambros Y (2001) Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma. A phase III, double blind, comparative trial. *Cancer J* 7: 377-387
123. Rosen LS, Gordon D, Kaminski M et al. (2003) Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast cancer. *Cancer* 98: 1735-1744
124. Rosen DS, Gordon D, Dugan W et al. (2004) Zoledronic acid is superior to pamidronate for the treatment of bone metastases in breast carcinoma patients with at least one osteolytic lesion. *Cancer* 100: 36-43
125. Roth HJ, Fenner H (2000) *Arzneistoffe*. Thieme, Stuttgart, New York, 3. Aufl.
126. Römpf (1995) *Chemielexikon, Luciferasen*. Thieme, Stuttgart, New York, 9. Aufl.
127. Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Chen B (2002) A randomized, placebo-controlled trial of

- zoledronic acid in patients with hormon-refractory metastatic prostata carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 94: 1458-1468
128. Saarto T, Blomquist C, Virkkunen P et al. (2001) Adjuvant clodronate treatment does not reduce the frequency of skeletal metastasis in node-positive breast cancer patients: 5 year results of randomised controlled trial. *J Clin Oncol* 19: 10-17
 129. Savage AD (1996) Pamidronate reduces IL-6 production by bone marrow stroma from multiple myeloma patients. *Blood* 85: 105
 130. Schlotter CM, Bosse U, Vogt U, Bosse, A (1996) DNA Image Zytometrie (ICM), Onkogene und Prognosefaktoren beim primären Mammakarzinom. *Arch Gynecol Obstet* 258: 94
 131. Schlotter CM, Vogt U, Bosse U, Mersch B, Waßmann K (2003) C-myc, not HER-2/neu, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res* 5 (2):30-36
 132. Senaratne SG, Pirianov G, Mansi JL, Arnett TR, Colston KW (2000) Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 82:1459-1468
 133. Shipman CM, Croucher PI, Russel RG et al. (1998) The bisphosphonate incadronate (YM 175) causes apoptosis of human myeloma cells in vitro by inhibiting the mevalonate pathway. *Cancer Res* 58: 5294-5297
 134. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF et al. (1997) Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumor activity. *Br J Haematol* 98: 665-672
 135. Strang P (1996) Analgetic effect of bisphosphonates on bone pain in breast cancer patients. *Acta Oncol* 35 (suppl 5): 50-54
 136. Stryer L (1996) *Biochemie*. Elsevier, Heidelberg, Berlin, 4.Aufl.
 137. Tassone P, Forciniti S, Galea E, Morrone G, Turco MC, Martinelli V, Tagliaferri P, Venuta S (2000) Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia* 14: 841-844
 138. Theriault RL, Lipton A, hortobagyi GN et al. (1999) Pamidronate reduces skeletal morbidity in women with advanced breast cancer and lytic bone lesions: a randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 17. 846-895

139. Toikkanen S, Joensuu H, Klemi P (1990) Nuclear DNA content as a prognostic factor in T1-2 N0 breast cancer. *Am J Clin Path* 93: 471-479
140. Tripathy D, Lichinitser M, Lazarev A et al. (2004) Oral ibandronate for the treatment of metastatic bone disease in breast cancer: efficacy and safety results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Oncol* 15: 743-750
141. Umeda T, Eguchi Y, Okino K, Kodama M, Hattori T (1997) Cellular localization of urokinase-type plasminogen activator, its inhibitors and their mRNAs in breast cancer tissues. *J Pathologie* 183 (4):388-397
142. Untch M, Konecny G, Ditsch N, Sorokina Y, Moebus V, Muck B, Kuhn W, Bastert G, Werner C, Thomssen C, Wallwiener D, Albert U, Bothmann G, Kreienberg R, Lück HJ (2002) Dose-dense sequential epirubicin-paclitaxel as preoperative treatment of breast cancer: results of a randomised AGO study. *Proc ASCO* 21: 34a, abstract # 133
143. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ et al. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347: 1999-2009
144. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415: 530-536
145. Vogt U, Bielawski K, Bosse U, Schlotter CM (2004) Breast tumor growth inhibition in vitro through the combination of cyclophosphamide/metotrexate/5-fluorouracil, epirubicin/cyclophosphamide, epirubicin/paclitaxel and epirubicin/docetaxel with the bisphosphonates ibandronate and zoledronic acid. *Oncology Reports* 12: 1109-1114
146. Vogt U, Falkiewicz B, Bielawski K, Bosse U, Schlotter CM (2000) Relationship of c-myc and erbB oncogene family gene aberrations and other selected factors to ex vivo chemosensitivity of ovarian cancer in the modified ATP-chemosensitivity assay. *Acta Biochim Pol* 47: 157-164
147. Vogt U, Striehn E, Bosse U, Klinke F, Falkiewicz B (1999) Lack of squamous cell lung carcinoma in vitro chemosensitivity to various drug regimens in the adenosine triphosphate cell viability chemosensitivity assay. *Acta Biochim Pol* 46: 299-302
148. von Minckwitz H et al. (2002) Evidenz-basierte Empfehlungen zur Primärbehandlung von Mammakarzinomen. *Zentralbl Gynäkol* 124: 293-303

149. Wenzel C, Bartsch R, Hussian D, Plusching U, Locker GJ, Sevelda U, Zielinski CC, Steger GG (2004) Zoledronate in a patient with pamidronate refractory hypercalcemia syndrome. *Support Care Cancer* 12: 678-681
150. WHO (1996) *International Classification of Disease Genf*, 10th edition
151. Wilson MA, Calhoun FW (1981) The distribution of skeletal metastasis in breast and pulmonary cancer: Concise communication. *J Nucl Med* 22: 594-597
152. Wolf E (2002) Lebensretter Früherkennung. *Pharm Ztg* 147. 2690
153. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, Bellahcene A, Devy L, Foidart JM, Castronovo V, Green JR (2002) Novel antiangiogenic effects of bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp ther* 302. 1055-1061
154. Wülfing P, Borchard J, Heidl S, Zänker KS, Kiesel L, Brandt B (2005) Nachweis c-erbB2-positiver Zell-Cluster im Blut als negativer Prognosemarker beim Mammakarzinom. *Zentralbl Gynäkol* 127: DOI: 10.1055/s-2005-870773
155. Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C et al. (1997) Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer cells by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-2. *J Clin Invest* 99: 2509-2517

7. Anhang

7.1. Verzeichnis der Abbildungen

Abb.1:	Molekulare Struktur der Bisphosphonate (aus Bartel R., Frisch B.: Das Bisphosphonat-Manual, 2001)	14
Abb.2:	Zelluläre und biochemische Wirkungsmechanismen stickstoffhaltiger Bisphosphonate (aus Bartel R., Frisch B.: Das Bisphosphonat-Manual, 2001)	16
Abb.3:	Interaktionen zwischen Tumor, Gefäßen, Knochenmark, Knochen ,Stroma und Immunsystem (aus Bartel R., Frisch B.: Das Bisphosphonat-Manual, 2001)	17
Abb.4:	Übersicht Tumoreigenschaften aus Tab.1	31
Abb.5:	Übersicht immunhistochemischer Status aus Tab.2	31
Abb.6:	Übersicht der Hormonrezeptoren aus Tab.3	32
Abb.7:	Übersicht der Onkogene aus Tab.4a	32
Abb.8:	Übersicht über Onkogene aus Tab.4b	33
Abb.9:	Übersicht von Proliferation/DNA-Index aus Tab.5a	33
Abb.10:	Übersicht von Proliferation/DNA-Index aus Tab.5b	34
Abb.11:	Übersicht der proteolytischen Enzyme aus Tab.6	34
Abb.12:	Medianwerte bei differenzierter Chemotherapie	38
Abb.13:	TGI-Werte bei niedriger Konzentration (25 – 6,25 %)	43
Abb.14:	Der inhibitorische Effekt von (A) CMF, (B) EC, (C) ET und (D) Edoc allein und in Kombination mit den Bisphosphonaten Zoledronat und Ibandronat auf das Brusttumorwachstum	47
Abb.15:	Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf das T-Stadium	55

Abb.16:	Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf den Nodalstatus	55
Abb.17:	Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf das histologische Grading	56
Abb.18:	Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf den Östrogenrezeptor (ER)	56
Abb.19:	Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf den Progesteronrezeptor (PR)	57
Abb.20:	Chemosensitive Proben (%) bei ET und Edoc ohne vs. in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf Her-2 (DAKO)	57
Abb.21:	Chemosensitive Proben (%) bei EC in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat	58
Abb.22:	Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Hormonrezeptoren (PR Express = Progesteronrezeptor Expression; ER Express = Östrogenrezeptor Expression)	81
Abb.23:	Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Hormonrezeptoren (PR Express = Progesteronrezeptor Expression; ER Express = Östrogenrezeptor Expression)	81

Abb.24:	Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei den Hormonrezeptoren	82
Abb.25:	Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Onkogene	82
Abb.26:	Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Onkogene	83
Abb.27:	Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei den Onkogenen	83
Abb.28:	Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Proliferation	84
Abb.29:	Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die Proliferation	84
Abb.30:	Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei der Proliferation	85
Abb.31:	Chemosensitive Proben (%) bei ET ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die proteolytischen Enzyme	85
Abb.32:	Chemosensitive Proben (%) bei Edoc ohne und in Kombination mit Zoledronat und Ibandronat in Bezug auf die proteolytischen Enzyme	86
Abb.33:	Chemosensitive Proben (%) im Therapieregime mit EC/Zo und EC/Ib bei den proteolytischen Enzymen	86

7.2. Verzeichnis der Tabellen

Tab.1:	Alter bei Diagnose und Tumoreigenschaften	23
Tab.2:	Immunhistochemischer Status	24
Tab.3:	Hormonrezeptoren	25
Tab.4a:	Onkogene	26
Tab.4b:	Onkogene	27
Tab.5a:	Proliferation/DNA-Index	28
Tab.5b:	Proliferation	29
Tab.6:	Proteolytische Enzyme	30
Tab.7:	Der Effekt von Bondronat und Zoledronat auf Brusttumorzellen	39
Tab.8:	AUC-Werte bei Basistherapie mit CMF, EC, ET und EDoc	40
Tab.9:	AUC-Werte bei Chemotherapie in Kombination mit Bondronat	41
Tab.10:	AUC-Werte bei Chemotherapie in Kombination mit Zoledronat	42
Tab.11:	TGI-Werte der Chemotherapeutika in den Konzentrationen 200-50 und 25-6,25 in %	44
Tab.12:	TGI-Werte der Chemotherapeutika in Kombination mit Bondronat in den Konzentrationen 200-50 und 25-6,26 in %	45
Tab.13:	TGI-Werte der Chemotherapeutika in Kombination mit Zoledronat in den Konzentrationen 200-50 und 25-6,25 in %	46
Tab.14:	Inhibitorischer Einfluß von Bondronat und Zoledronat in der niedrigsten Konzentration (6,25 %) auf das Brusttumorwachstum in der Chemotherapie	48
Tab.15:	Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate	51
Tab.16:	Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Zoledronat	52

Tab.17:	Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel in Kombination mit Bondronat	53
Tab.18:	Ansprechen vs. Nichtansprechen bei Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat	54
Tab.19:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der Hormonrezeptoren bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate	65
Tab.20:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der Onkogene bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate	66
Tab.21:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der Proliferation/DNA-Indices bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate	67
Tab.22:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der proteolytischen Enzyme bei Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel ohne Bisphosphonate	68
Tab.23:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der Hormonrezeptoren bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat	69
Tab.23a:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat	69
Tab.23b:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat	70
Tab.23c:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat	71

Tab.24:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der Onkogene bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat	72
Tab.24a:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat	72
Tab.24b:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat	73
Tab.24c:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat	74
Tab.25:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der Proliferation bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat	75
Tab.25a:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat	75
Tab.25b:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat	76
Tab.25c:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat	77
Tab.26:	Ansprechen vs. Nichtansprechen der proteolytischen Enzyme bei Epirubicin/Paclitaxel, Epirubicin/Docetaxel und Epirubicin/Cyclophosphamid in Kombination mit Zoledronat und Bondronat	78
Tab.26a:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Zoledronat	78

Tab.26b:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Paclitaxel und Epirubicin/Docetaxel mit Bondronat	79
Tab.26c:	Ansprechen vs. Nichtansprechen von Epirubicin/Cyclophosphamid mit Zoledronat und Bondronat	80

7.3. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AMP	Adenosinmonophosphat
ampl.	amplifiziert
ampl/del	amplifiziert/deletiert
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-CVA	Adenosintriphosphat-cellviability assay
ATP-TCA	ATP-Tumorchemosensitivitäts-Assay
AUC	area under chemoresponse curve
BC	breast cancer
BTGI	breast tumor growth inhibition
CMF	Cyclophosphamid/Metotrexate/5-fluorouracil
EC	Epirubicin/Cyclophosphamid
Edoc	Epirubicin/Docetexal
ER	Östrogenrezeptor
ER-Express.	Östrogenrezeptor-Expression
ET	Epirubicin/Paclitaxel
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
histolog. Grading	histologisches Grading
Ib	Ibandronat
LS-means	last square means
n	Anzahl
nicht normw.	nicht normwertig
normw.	normwertig
PR	Progesteronrezeptor
PR-Express.	Progesteronrezeptor-Expression
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor

PAI-Express.	Plasminogenaktivator-Inhibitor-Expression
RLU	relative light unit
RNA	Ribonukleinsäure
TDC	test drug concentration
TDR	Tumor Dissociation Enzyme Reagent
TGI	totale growth inhibition
T.iso-II-alpha	Topoisomerase-II-alpha
uPA	Urokinase-Plasminogenaktivator
Überexpr.	Überexpression
Zo	Zoledronat

8. Danksagung

Allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, danke ich.

Mein Dank gilt vor allem Herrn Privatdozent Dr. med. habil. Claus M. Schlotter, Chefarzt der Frauenklinik des Klinikum Ibbenbüren, für die freundliche Überlassung des Themas und die ausführliche Unterstützung und Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Ulf Vogt, Institut für Molekulare Medizin Ibbenbüren, danke ich herzlich für die zahlreichen Hilfestellungen und Beratungen, insbesondere bei der Erfassung und Auswertung der Daten, die zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. med. Ulrich Bosse, niedergelassener Pathologe in Osnabrück und Leiter des Schnellschnittlabors am Klinikum Ibbenbüren, danke ich für seine bereitwillige Zusammenarbeit und Mithilfe.

9. Lebenslauf

Name: Andreas Neßler

Geburtsdatum: 06. September 1959

Geburtsort: Spremberg

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schulbildung: 1966 – 1974 Geschwister-Scholl-Grundschule Spremberg
 1974 – 1978 Neruda-Gymnasium Spremberg
 1978 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst: 1978 – 1979 Grundwehrdienst, OHS Löbau
 1979 – 1981 OK, LSK/LV, Staußberg

Studium: 1981 – 1986 KMU, Leipzig, Fachrichtung Zahnmedizin
 1986 Approbation

Beruf: 1986 – 1990 Zahnarzt, Poliklinik Spremberg
 Seit 1990 tätig in eigener Praxis in Osnabrück

Bad Laer, den 08.01.2008