

Titel:	<b>Chemosensibilitätstestung von Tumoren nach einem neuen Verfahren zur bioluminometrischen Bestimmung des zellulären ATP</b>
--------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## **Einleitung**

Verfahren zur prädiktiven Chemosensibilität von Tumoren sind seit den siebziger Jahren im Einsatz. Ein grosses Problem dieser Tests ist die aufwendige Methodik, die lange Testdauer und ein hoher Bedarf an Tumorgewebe. Das hier beschriebene Verfahren verwendet einen neuartigen Test zur bioluminometrischen Bestimmung des zellulären ATP als Indikator für eine mehr oder minder starke zellschädigende Wirkung von Zytostatika bei in vitro-Zellkulturen von Tumoren. ATP (Adenosintriphosphat) ist als ubiquitäre zelluläre Energiequelle ein hochsensitiver Marker der Zellvitalität und -aktivität. Nach dem Zelltod ist ATP infolge Hydrolyse innerhalb kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar. Vorteile dieses Verfahrens sind geringer Bedarf an Tumorzellen (ca 10-20.000/Zytostatikum), Einsatz von unterschiedlichen Zytostatikakonzentrationen im Sinne einer Dosis-Wirkung-Beziehung und rel. einfache Durchführung. Das Wachstum normaler Zellen wird durch spezielle Inhibitoren unterdrückt, so daß reproduzierbare und zum Tumorwachstum korrelierende Ergebnisse zu erwarten sind.

## **Methodik**

Das Tumorgewebeprobe wird zunächst mechanisch, dann enzymatisch disaggregiert. Danach erfolgt eine Ficoll-Dichtegradienten-Auftrennung. Die so verfügbare Einzelzell-Fraktion des Tumors wird mittels Trypanblaufärbung auf Vitalität und Qualität und anschließend zytologisch charakterisiert. Nur Suspensionen ausreichender Güte (Vitalität > 70% und Tumorzellanteil >50%) werden zur Testung eingesetzt. Die Zellsuspension wird auf Zellzahlen von  $1-2 \times 10^4$  pro 0.1 ml eingestellt und in diesen Aliquots auf 96-Loch-Mikrtiterplatten ausgesät. Die zu testenden Zytostatika werden als Doppelbestimmung in sechs unterschiedlichen Konzentrationen (200%, 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% TDC) den jeweiligen Zellsuspension-Aliquots zugesetzt.

Die Zytostatika-Referenzkonzentration (100% TDC) entspricht in der Regel der Plasmaspitzenkonzentration nach intraveöser Applikation mit einer Standarddosis an Zytostatikum. Anschließend wird 4-7 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% relativer Luftfeuchte inkubiert. Danach werden die Tumorzellen lysiert und das zelläre ATP extrahiert und mittels Luziferin-Luziferase Lichtreaktion luminometrisch bestimmt. Die inhibitorische Wirkung für jede Substanz/Kombination wird durch

Vergleich der Messwerte in den Testansätzen mit denen der Kontrollen (ohne/mit Wachstumsinhibitor) bestimmt. Die Resultate werden dann für jede Substanz/Kombination in eine Dosis-Wirkungs-Kurve überführt. Diese werden in 5 Kategorien ,-starke, intermediäre, partielle, schwache Sensitivität und Resistenz-, abhängig von dem Grad der Zellwachstumsinhibition pro Zytostatikakonzentration eingeteilt. Gemäß dieser Klassifizierung erfolgt dann eine Beurteilung der voraussichtlichen klinischen Wirksamkeit der getesteten Substanzen.

Die Methode ist einsetzbar für solides Tumormaterial, Biopsien und für Aszites.

**Quelle: Dr.Zwirner**  
**Onkologisches**  
**Laboratorium**  
Calwer Str.7/6  
72076 Tübingen

# SOP

Version  
Jun 04

## Versand von Tumorgewebe für die Chemosensibilitätstestung

### 1. Allgemeines

Für die Testung wird vitales Gewebe benötigt. **Formalinfixiertes Gewebe ist nicht geeignet.**

Die Gewebeprobe soll unter sterilen Bedingungen in das Probengefäß überführt werden. Das Probengefäß enthält Kulturmedium, in welchem die Probe bis zu 36 Stunden gelagert werden kann. Innerhalb dieser Frist muss das Gewebe im Labor verfügbar sein.

### 2. Versandgefäße

Die Probengefäße enthalten Kulturmedium, in welchem das Gewebe über 36 Stunden gelagert (versandt) werden kann.

Gefäße nach Befüllen mit Gewebe wieder fest verschliessen.

Keine Gefäße mit abgelaufenem Verfalldatum verwenden.

### 3. Befüllen und Versand

Gewebeprobe unter sterilen Bedingungen in das Versandgefäß überführen.

Am besten sollte die Probe direkt im OP verpackt werden.

Versand entweder mit/ ohne Kühlaggregat ( kein Trockeneis)

in der Styroporbox an die o.a. Adresse.

### 4. Begleitpapiere

Als Begleitpaieren die entsprechende Vordrucke verwenden.

Benötigt werden die vollständigen Adresse ,

der Primärtumor, die Gewebeart( Primärtumor, Metastase , LK, Aszites)

Anschrift des Arztes, an welchen der Befund versandt werden soll.

Falls bereits festgelegt, bitte die gewünschten Zytostatika oder Schemata auf dem Formular markieren, welche als Therapie möglicherweise in Frage kommen.

Falls bekannt, bitte auch vorausgegangene Therapien vermerken

**Begleitpapiere bitte am Tag vor Gewebeversand per Fax vorab übermitteln.**

**Bitte Kostenübernahme vermerken.**

Dr.

M.Zwirner

14.11.04

UFK Calwer Str. 7/6 72076 Tübingen  
 Onkologisches Laboratorium Dr.Zwirner  
 Tel0171-435-2491 Fax: 07071-295352  
 Begleitschein für Chemosensibilitätstestung

Name, Vorname:			
Geb-Dat, Anschrift			
Probendatum		Kosten-träger	
Einsender/Station			
Diagnose			
Probenmaterial			

Nr	Zytostatikum	Handelsnamen	Abk	Testung	Kombinationen
	INN			<b>Monos.</b>	
1	4-OH-Cyclophosphamid	Maphosphamid	4H-CYT		
2	Bleomycin	Bleomycin	BLEO		
3	Carboplatin	Carboplatin	CBDCA		
4	Carmustin	Carmubris	BCNU		
5	Cisplatin	Platinex	CDDP		
6	Cyclophosphamid 1)	Endoxan	C		
7	Cytarabin/ARA-C	Alexan, Cytosar	Ara-C		
8	Dacarbazin	Detimedac	DTIC		
9	Daunorubicin	Daunoblastin			
10	Doxorubicin	Adriablastin	ADM		
11	Epirubicin	Farmorubicin	EPI		
12	Etoposid/VP16	Vepesid	VP16		
13	Fluoruracil	5-Fluoruracil	5-FU		
14	Gemcitabine		GEM		
15	Idarubicin	Zavedos			
16	Ifosphamid	Holoxan	IFO		
17	Interferon-a2b	Interferon	IFN		
18	Medroxyprog.acetat	Farlutal	MPA		
19	Melphalan	Alkeran			
20	Methotrexat	Methotrexat	MTX		
21	Mitomycin C		MMC		
22	Mitoxantron	Novantron	MITX		
23	Navelbine				
24	Tamoxifen	Tamoxifen	TAM		
25	Taxol	Taxol	TX		
26	Thiotepa	Thiotepa			
27	Topotecan	Topotecan	TPT		
28	Treosulfan	Ovostat	TREO		
29	Vinblastin	Velbe	VLB		
30	Vincristin	Oncovin	VCR		
31	Vindesin	Eldisine	VDS		
34	Oxaliplatin				

Bitte die gewünschten Zytostatika, auf die getestet werden soll, in Spalte Testung -Monosubstanz markieren, ggf weitere vermerken!.

Bei den Kombinationen die Nummernkombination .

z.B. 11,7 entspr. EC in Spalte Kombinationen eintragen.

1) Wird nicht getestet, stattdessen der aktive Metabolit 4-OH-Cyclophosphamid

Datum, Unterschrift/Einsender