

Aus der Klinik für Allgemein-,Viszeral-,Transplantationschirurgie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Werner

# **Individuelle Therapiewahl durch Patienten-spezifisches *in-vitro* Modelling beim primären kolorektalen Karzinom**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Laura Rava  
aus Faenza (Italien)

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Barbara Mayer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Frank Kolligs

apl. Prof. Dr. rer. hum. biol Manfred Gross

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

-----

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2022

## **Danksagung**

Ich möchte ein herzliches Dankeschön an alle aussprechen, die mich beim Schreiben dieser Promotionsarbeit unterstützt und begleitet haben:

An erster Linie an Frau PD Dr. Barbara Mayer, die mich so herzlich in ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen, in den letzten Jahren in jeder Situation geholfen und mit ihrer Expertise zur Seite stand. Durch Sie habe ich zum ersten Mal in meinem beruflichen Werdegang alle Aspekte der experimentellen Forschung kennengelernt und meine Begeisterung für die wissenschaftliche Seite dieses medizinischen Berufes entfacht. Durch ihren wertvollen Einsatz verdanke ich ihr die Möglichkeit, in der chirurgischen Forschung zu promovieren.

An Herrn Prof. Dr. Dr. med. Jauch und Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Werner für die Aufnahme in ihre Abteilung und die Ermöglichung der Promotion.

An Cornelia Ludwig für die sorgfältige Einarbeitung in alle unterschiedlichen Methoden.

An alle beteiligten Mitarbeiter für die Unterstützung in Bezug auf die Nachsorge und die Datenakquise zur Erstellung der Datenbank.

An Karin von Dehn-Rothfelser, die mir durch ihre Expertise und ihren Rat bei allen methodischen Schwierigkeiten und Problemlösungen zur Seite stand.

An Herrn Christian Ilmberger für die dauerhafte Unterstützung in alle Fragen bezüglich ATP-Assay, Graphikerstellungen und statistischen Auswertungen.

Ein großes Dankeschön geht ebenfalls an Frau Dr. Kathrin Halfter für die ausserordentlich kompetente Hilfe bei den Nachsorgedaten sowie jeglichen statistischen Problemen und Fragestellungen.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern der chirurgischen Forschung, sowie allen weiteren Doktoranden der AG-Metastasierung, die mich mit ihrem kollegialen Verhalten und ihrer humorvollen Zusammenarbeit durch alle guten und schlechten Zeiten gebracht haben. Ohne Sie wäre meine Laborzeit nur halb so schön und aufregend gewesen: Andreas Bogner, Thomas Singer, Melanie Zoller, Jakob Gülden, Karoline Weiler, Maximilian Beier.

## **Inhaltsverzeichnis**

Danksagung .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	4
1 Das kolorektale Karzinom .....	8
1.1 Allgemeines .....	8
1.2 Die Rolle des Immunsystems beim kolorektalen Karzinom .....	9
1.3 Die Therapie des kolorektalen Karzinoms .....	10
1.4 Die adjuvante Chemotherapie beim kolorektalen Karzinom .....	12
1.4.1 5-Fluorouracil (5-FU) .....	13
1.4.2 Oxaliplatin (OX) .....	14
1.4.3 Irinotecan (IR) .....	15
1.4.4 Cetuximab (C) .....	16
1.5 Die Rolle der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) .....	16
1.6 Das Therapieansprechen anhand der RECIST- Kriterien .....	17
1.7 Das 3D-Sphäroid-Modell .....	19
1.8 Zielsetzungen .....	20
2 Material und Methoden.....	21
2.1 Allgemeines .....	21
2.1.1 Das Sphäroidmodell .....	21
2.1.2 Das Tumorgewebe .....	22
2.2 Gewebeaufarbeitung .....	23
2.2.1 Material .....	24
2.2.2 Geräte .....	26
2.2.3 Lösungen .....	27
2.2.4 Durchführung .....	27
2.2.5 Sphäroidbildung .....	28
2.3 Isolation der autologen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) .....	28
2.3.1 Durchführung .....	28
2.4 Therapie der <i>in vitro</i> Kulturen .....	29
2.4.1 Therapieansatz und Pipettierschema .....	30
2.4.2 Schema für ATP Assay .....	30
2.4.3 Schema für FACS Analyse .....	30
2.5 Analyse mittels ATP Assay .....	31
2.5.1 Durchführung .....	31
2.6 Analyse mittels FACS nach Methode 1 .....	32
2.6.1 Antikörper .....	32
2.6.2 Durchführung .....	32
2.7 Analyse mittels FACS nach Methode 2 .....	33
2.7.1 Antikörper .....	33

2.7.2	Durchführung .....	33
2.8	Auswertungen .....	34
2.8.1	Auswertung des ATP Assays .....	35
2.8.2	Auswertung der FACS- Analyse Methode 1 .....	35
2.8.3	Auswertung der FACS- Analyse Methode 2 .....	36
2.9	Statistische Auswertung .....	37
2.9.1	Testung auf Normalverteilung .....	37
2.9.2	Univariate Analyse .....	38
2.9.3	Korrelationsanalyse .....	38
2.9.4	Kaplan-Meier-Kurven .....	38
2.9.5	Cox-Regressionsanalyse .....	38
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Patientenkollektivbeschreibung .....	39
3.2	Klinisch-pathologische Daten der Primärtumoren .....	42
3.2.1	Fotodokumentation der Tumorsphäroide .....	46
3.3	Adjuvante Therapie und therapie-assoziiertes Follow-Up .....	46
3.3.1	Adjuvante Chemotherapie .....	46
3.3.2	Unerwünschte Nebenwirkungen unter Chemotherapie .....	47
3.3.3	Klinische Follow-Up Daten .....	48
3.3.4	Log Rank (Mantel Cox) Test für Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben .....	48
3.3.5	Kaplan-Meier-Kurven .....	49
3.3.6	Das Cox-Regressionsmodell .....	51
3.3.7	Testung auf Normalverteilung der klinisch-pathologischen Parameter .....	52
3.4	Validierungsergebnisse ATP .....	52
3.4.1	Allgemeine Labordaten der ATP Patienten .....	52
3.4.2	Subgruppenergebnisse .....	54
3.4.2.1	Tumorsphäroide alleine (S-Only) .....	56
3.4.2.2	PBMC-Ansätze alleine (P-Only) .....	58
3.5	Validierungsergebnisse FACS .....	60
3.5.1	Allgemeine Labordaten der FACS Patienten .....	60
3.5.2	Subgruppenergebnisse .....	61
3.5.2.1	Sphäroidgruppe alleine (S-Only) .....	61
3.5.2.2	PBMC-Ansätze alleine (P-Only) .....	62
3.5.2.3	Tumorsphäroide mit PBMC-Ansätzen(S+P) .....	64
3.6	Therapieergebnisse ATP .....	65
3.6.1	Allgemeine Übersicht .....	65
3.6.2	Tumorsphäroide alleine (S-Only) .....	66
3.6.2.1	Vergleich der Mediumkontrolle TM/4 mit Chemotherapien .....	66
3.6.2.2	Vergleich der Therapien FO und FI .....	68

3.6.2.3	Vergleich der Therapien 5-FU und FO .....	71
3.6.2.4	Vergleich der Therapien 5-FU und FI .....	73
3.6.3	Das PBMC- Modell .....	76
3.6.3.1	Vergleich der Therapien FO und FI .....	76
3.6.3.2	Vergleich der Therapien 5-FU und FO .....	76
3.6.3.3	Vergleich der Therapien 5-FU und FI .....	76
3.7	Therapieergebnisse FACS .....	77
3.7.1	Sphäroidgruppe alleine (S-Only) .....	78
3.7.2	Tumorsphäroide und PBMCs (S+P) .....	81
3.8	Therapieergebnisse von ATP und FACS im Vergleich .....	83
3.9	Univariate Korrelationen für die ATP-Analyse .....	85
3.9.1	Korrelation der Mediumkontrolle mit den Labor- bzw. klinisch-pathologischen Daten .....	84
3.9.1.1	Das Sphäroidmodell (S-Only) .....	84
3.9.1.2	PBMC-Modell (P-Only) .....	85
3.9.2	Übersicht: <i>in vivo</i> Testung (Chemotherapie im Patientenkollektiv) und <i>in vitro</i> Testung (Chemotherapie im dazugehörigen 3D-Modell) Im Vergleich bezogen auf Hämatotoxizität und Therapieeinhaltung .....	85
4	Diskussion .....	88
4.1	Patientenkollektivbeschreibung .....	88
4.1.1	Alter, Geschlecht, Lokalisation .....	88
4.1.2	TNM- Einteilung .....	89
4.1.3	Grading .....	81
4.1.4	Adjuvante Chemotherapie .....	91
4.2	Methodik/ In-vitro Testung .....	96
4.2.1	Tumorproben .....	96
4.2.2	FACS: Vitalität der EpCAM+ und CD45+ Zellen .....	97
4.2.3	Therapieschema der Zytostatika .....	97
4.2.4	FACS und ATP Analyse als Messmethode .....	98
4.3	Ergebnisse der <i>in vitro</i> 3D-Testung im Sphäroidmodell (S-Only) .....	100
4.3.1	Intrinsische („intrinsic“) und erworbene („acquired“) Zytostatika-Resistenz .....	100
4.3.2	Gleiche Effektivität von 5-FU/ FI gegenüber FO - Was tun? .....	102
4.4	Ergebnisse der <i>in vitro</i> 3D-Testung im PBMC-Modell .....	104
4.4.1	Die Zusammensetzung der PBMCs .....	104
4.4.2	Einfluss der Zytostatika auf die PBMCs: P-Only als Prädiktor für die Hämatotoxizität? .....	105
4.5	Einfluss des E:T- Verhältnisses auf das Therapieansprechen: therapeutisches Add-On Effekt durch Zugabe von PBMCs im S+P Modell in der FACS-Analyse .....	106
5	Zusammenfassung.....	107
6	Anhang .....	110

6.1 Tabellen und Ergänzungen zu Einleitung sowie Material und Methoden.....	110
6.1.1 Tabellen zu Einleitung .....	110
6.1.2 Ergänzungen: klinisch-pathologische Parameter .....	112
6.1.3 Ergänzungen: Skalierung der statistischen Merkmale.....	113
6.1.4 Ergänzungen: Messung und Kompensation FACS Methode 1 .....	115
6.1.5 Ergänzungen: Messung und Kompensation FACS Methode 2 .....	115
6.2 Tabellen zu Patientenkollektivbeschreibung .....	116
6.2.1 Tabelle unerwünschte Nebenwirkungen der verschiedenen Chemotherapien .....	115
6.2.2 Tabelle therapiebezogene Todesfälle nach UICC Einteilung .....	115
6.3 Tabellen zu Laboraten ATP- Analyse .....	117
6.3.1 Tabelle Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test .....	117
6.4 Tabellen zu Validierungsergebnissen.....	118
6.4.1 Zelltypisierung FACS S-Only.....	116
6.4.2 Zelltypisierung FACS S+P-Only.....	118
6.5 Tabellen Tabellen zu Ergebnisdaten ATP-Analyse .....	120
6.5.1 Tabelle Übersicht Patientenproben n=106 in ATP Gesamtanalyse.....	120
6.5.2 Tabelle Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich: FO/FI .....	121
6.5.3 Tabelle Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich: 5-FU/FO.....	125
6.5.4 Tabelle Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich: 5-FU/ FI.....	127
6.6 Tabellen zu Labor-/Ergebnisdaten der FACS-Analyse .....	128
6.6.1 Tabelle Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk der Medium/Lösungsmittelkontrollen.....	128
6.6.2 Tabelle Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk der Therapieergebnisse.....	128
6.6.3 Tabellen Vitalität für EpCAM+ und CD45+ in S-Only.....	130
6.6.4 Tabellen Vitalität für EpCAM+ und CD45+ in S+P.....	132
6.6.5 P-Werte aus Mann-Whitney-U Test für S+P FACS Therapieergebnisse.....	134
6.6.6 P-Werte aus Kruskal-Wallis Test in S+P: Vergleich aller Therapien untereinander für EpCAM+ und CD45+.....	136
6.6.8 Tabellen Ergebnisse FACS/ ATP – Analysen von n= 9 Patientin und E: T Ratio.....	133
6.7 Tabellen der univariaten Analysen und Korrelationen .....	138
6.7.1 Tabelle für S-Only der univariaten Analyse/Korrelation der Mediumkontrolle.....	138
6.7.2 Tabelle für P-Only der univariate Analyse/ Korrelationen der Mediumkontrolle.....	139
6.8 Graphiken der Kaplan-Meier Kurven.....	140
6.8.1 Kaplan-Meier-Kurven für progressionsfreie Überleben (klinische Parameter).....	140
6.8.2 Kaplan-Meier-Kurven für Gesamtüberleben (klinische Parameter).....	143
Eidesstattliche Versicherung.....	147
Abkürzungsverzeichnis.....	148
Tabellenverzeichnis.....	150

Abbildungsverzeichnis.....	154
Literaturverzeichnis .....	156
Lebenslauf .....	164

## 1. Das Kolorektale Karzinom

### 1.1 Allgemeines

Das kolorektale Karzinom ist einer der häufigsten soliden Tumoren der westlichen Bevölkerung. Obwohl die Inzidenz und Mortalität in den letzten Jahrzehnten abgenommen hat, beträgt das Lebenszeitrisiko für das CRC ca. 5-6 % [1]. Die Langzeit-Prognose ist umso besser, je früher das CRC diagnostiziert und therapiert wird. Ein bereits lokal oder systemisch fortgeschrittenes Stadium korreliert mit einem deutlich erniedrigten Gesamtüberleben. So variiert die 5-Jahres Überlebens-Rate von 90% bei UICC Stadium I bis ca. 11% bei UICC Stadium IV. Folglich ist das Stadium der wichtigste Prognosefaktor [2].

Seit Jahrzehnten ist die TNM/UICC- Klassifikation als Hauptprognosefaktor für solide Tumoren etabliert [3]. Die Anzahl der chirurgisch entfernten Lymphknoten hat ebenfalls Einfluss auf das Gesamtüberleben [4]. Je mehr Lymphknoten entfernt werden, desto besser die Langzeitprognose [5]. Trotzdem kann das klinische Outcome innerhalb eines Tumorstadiums sehr variieren. 25% der Patientin mit UICC Stadium I/II entwickeln im Krankheitsverlauf ein Tumorrezidiv oder sogar Fernmetastasen [6]. Die Komplexität und Multifaktorialität dieser Erkrankung erschweren es, den Krankheitsverlauf sowie die Therapieantwort genauer vorherzusagen. Aufgrund der ungünstigen Prognose des fortgeschrittenen CRCs ist folglich eine adjuvante Erstlinientherapie ausschlaggebend und dringend erforderlich.

Neben verschiedenen molekularen Mechanismen, die zu einer abnormen Veränderung der Genexpression in CRC führen (z.B. Mikrosateliten-Instabilität), gibt es immer mehr Evidenz, dass tumorbiologische Faktoren eine zunehmende Rolle als unabhängige Prädiktionsmarker für das individuelle Outcome der Patienten spielen [7]. Die Tumor-Klassifikation scheint nicht mehr der einzige wichtige Faktor zur Bestimmung des progressionsfreien Überlebens bzw. des Tumoransprechens auf die adjuvante Therapie zu sein [8]. Seit einigen Jahren hat die Arbeitsgruppe um Jérôme Galon die These aufgestellt, dass der sogenannte Immunoscore eine immer wichtigere Rolle in der Klassifikation von soliden Tumoren spielen könnte. Dabei hat man beobachtet, dass die Entwicklung des Tumors auch von dem immunologischen Umfeld bzw. der lokalen immunologischen Antwort beeinflusst wird [9]. Eine histopathologische Begutachtung

der Tumore hat gezeigt, dass das Tumorgewebe in verschiedenem Ausmaß mit Lymphozyten sowie inflammatorischen Zellen infiltriert wird. Die immunologische Antwort dieser Infiltrate korreliert mit dem progressionsfreien Intervall. Ein hohes Leukozyteninfiltrat scheint das Risiko eines Wiederauftretens des Tumors bzw. eines Progresses zu reduzieren [10, 11]. Dieses neue Konzept könnte ebenfalls dabei helfen, die Therapieantwort vorauszusagen und damit eine wichtige Rolle in der Entscheidung zur individuellen Therapieauswahl spielen. Aus diesem Grund ist es von großer Wichtigkeit, den Immunoscore als prognostischer Faktor in die Tumorklassifikation zu implementieren [8]. In dieser Doktorarbeit wird im Tumorsphäroid-/ PBMC- Modell neben der Effektivität und Toxizität der Chemotherapeutika getestet, ob die Zugabe von Leukozyten einen Einfluss auf die Therapieantwort hat.

## 1.2 Die Rolle des Immunsystems beim kolorektalen Karzinom

Unabhängig von den tumor- infiltrierenden Leukozyten spielt das Immunsystem auch im klinischen Umfeld eine ausschlaggebende Rolle wenn es um die Durchführung bzw. Verträglichkeit der adjuvanten Chemotherapie beim CRC geht. Während einer Therapie mit Zytostatika kommt es in vielen Fällen zu einer Myelosuppression, die zu einem Mangel an Leukozyten, Erythrozyten sowie Thrombozyten führt. Diese Knochenmarksschädigung und die damit verbundenen laborchemischen Blutbildveränderungen sind neben gastrointestinaler und polyneuropathischer Symptomatik die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen [12]. Folglich sind diese dosislimitierenden Toxizitäten auch der häufigste Grund für den Abbruch einer Chemotherapie. Am Beispiel des kolorektalen Karzinoms sind es vor allem die Substanzen Oxaliplatin, Irinotecan und 5-Fluoruracil, die im adjuvanten Setting als Chemotherapeutika zum Einsatz kommen und in verschiedenem Ausmaß diese Nebenwirkungen hervorrufen [13]. Es ist schon seit über einem Jahrzehnt bekannt, dass das progressionsfreie Überleben sowie das Gesamtüberleben der Patienten mit CRC von der durchgeführten adjuvanten Chemotherapie abhängen [14, 15]. Eine adjuvante Behandlung in empfohlener Länge und Dosis wird jedoch nur eingehalten, wenn das Nebenwirkungsprofil der verabreichten Zytostatika dies ermöglicht und zu keinem Therapieabbruch führt. Laut neuerer Studien scheint allerdings eine chemotherapieinduzierte Neutropenie- ohne einen damit verbundenen Abbruch der leitliniengerechten Therapie- einen positiven Effekt auf das Outcome der Patienten mit soliden Tumoren zu haben. So scheint die chemotherapie-induzierte Neutropenie mit

einem besseren Ansprechen bzw. einem längeren Überleben zu korrelieren [16]. Dieses Phänomen wurde bereits 2014 von Soveri et al. für die Tumorentität des kolorektalen Karzinoms beschrieben [12]. Dennoch gilt dies vor allem für Patientin im UICC Stadium IV. Die prognostische Wertigkeit einer therapieinduzierten Neutropenie im UICC Stadium II/III ist noch unklar, da sie von anderen Faktoren abhängt [17]. Umso mehr ist es von großer Bedeutung, für den individuellen Patienten sowohl durch tumorspezifische als auch durch therapieassoziierte Parameter das optimale Therapieschema auszuarbeiten.

### 1.3 Die Therapie des kolorektalen Karzinoms

Bei Patientin mit CRC ist neben der operativen Resektion des Tumors die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-FU und Oxaliplatin (FOLFOX; XELOX) und/oder Irinotecan (FOLFIRI) der wichtigste Faktor für die 5-Jahres-Überlebens-Rate ab einem UICC Stadium III [18, 19]. Derzeit wird ebenfalls eine adjuvante Chemotherapie ab einem UICC Stadium IIB, das heisst mit gewissen Risikofaktoren, empfohlen. Dabei fließen Tumorinfiltration (T4), schlechte Differenzierung (G3/4), unzureichende Lymphknotenexstirpation (< 12 Lymphknoten) sowie eine lymphogene (L1), vaskuläre (V1) und Perineuralscheideninfiltration (Pn1) in diese Stadieneinteilung mit ein [20]. Bei lymphogener (UICC III) sowie distanter (UICC IV) Metastasierung ist eine adjuvante Chemotherapie obligatorisch. Auch mit einer leitliniengerechten Therapie kann das Rezidivrisiko nur um ca. 30% reduziert werden [21]. Die Identifikation der Patientin im UICC Stadium II mit einem erhöhten Rezidivrisiko (IIB und IIC) und einer damit verbundenen schlechteren Prognose ist eine enorme Herausforderung im klinischen Alltag. Dabei unterscheiden sich die Stadien IIB und IIC lediglich in der Tumorausdehnung voneinander (bei IIC infiltriert der Tumor in angrenzende Organe oder Strukturen). Darüber hinaus spielt die Einhaltung des Therapieplans in Bezug auf Beginn, Dauer, Dosis und Applikationsschema eine wichtige Rolle für die Wirksamkeit der Behandlung und somit auch für das progressionsfreie Überleben der Patienten [22] [23]. Die Einhaltung der Therapie hängt wie bereits beschrieben vom Nebenwirkungsprofil der applizierten Chemotherapeutika ab.

In Übereinstimmung mit den nationalen sowie internationalen Richtlinien des CRC werden verschiedene standardisierte Chemotherapie Schemata angewandt, welche aus einer Kombination von 5-Fluoruracil/Leucovorin mit Oxaliplatin (FOLFOX) oder Irinotecan (FOLFIRI) sowie mit oder ohne Cetuximab bzw. Bevacizumab bestehen [24,

25]. Dank verschiedener randomisierter klinischer Studien (MOSAIC, NSABP C-07, XELOXA, AVANT) hat sich bereits seit mehreren Jahren die Kombinationstherapie mit Oxaliplatin und 5-FU (FOLFOX) für Patienten im Stadium III und IV des CRC als Standardschema implementiert, da es die effektivste Therapie darstellt [21]. Es konnte gezeigt werden, dass das Rezidivrisiko um bis zu 23% reduziert und das progressionsfreie Intervall signifikant verbessert wird [20]. In der metastasierten Situation (UICC Stadium IV) hat sich seit mehreren Jahren auch die Erstlinientherapie mit FOLFIRI als genauso effektiv bezüglich des progressionsfreien Überlebens, Gesamtüberleben und Therapieansprechen herausgestellt wie FOLFOX. Allerdings wurde auch hier schon bestätigt, dass sich das Nebenwirkungsprofil der beiden Regimes unterscheiden [26]. Auch eine neuere Studie von 2019 konnte zeigen, dass FOLFOX zwar häufiger als Erstlinientherapie verabreicht wird, es jedoch keinen Überlebensvorteil gegenüber einer Erstlinientherapie mit FOLFIRI im UICC Stadium IV aufweist [27]. Diese Erkenntnisse lassen sich jedoch nicht automatisch auf die adjuvante Therapie des CRC in UICC Stadium III übertragen. So zeigte eine Studie von Saltz et al. in der Vergangenheit, dass eine 5-FU Monotherapie einer Irinotecan-basierten Therapie gleichgestellt ist, da kein signifikanter Vorteil bezüglich des progressionsfreien Intervalls und Gesamtüberleben bei Zugabe von Irinotecan bewiesen werden konnte [28]. Vor allem bei älteren und multimorbiden Patienten wird eine Monotherapie mit 5-FU vorgezogen. Des Weiteren wird postuliert, dass Irinotecan schwerwiegendere gastrointestinale und hämatotoxische Nebenwirkungen verursachen kann als eine alleinige Gabe von 5-FU [29].

Bezüglich der Therapiedauer konnte die MOSAIC Studie beweisen, dass eine sechs monatige adjuvante Chemotherapie mit FOLFOX das Gesamtüberleben der Stadium III Patienten im Vergleich zu 5-FU alleine signifikant erhöht. Die hohe Effektivität der Therapie ist allerdings mit einer ebenfalls erhöhten Rate an Nebenwirkungen verbunden, sodass viele Patienten die Behandlung abbrechen müssen. Diese Perzentuale kann bei bis zu 30% liegen [30]. Ob die Diskontinuität der Therapie einen negativen Einfluss auf die Prognose hat, wird in verschiedenen randomisierten Studien kontrovers beschrieben. Eine Studie über Behandlungcompliance Ahn et al. beschreibt eine Erhöhung der Tumorrezidivrate von 7% auf 36% bei Patienten, die weniger als die Hälfte der empfohlenen Therapiezyklen durchführten und suggeriert eine Korrelation zwischen Überleben und Kumulativdosis von 5-FU basierter Therapie

[31]. Eine weitere Studie zeigte ein signifikant erhöhtes Risiko für krebsbedingte Mortalität bei Patienten, die eine adjuvante Behandlung abbrechen mussten [32].

Allerdings muss berücksichtigt werden, dass sich die Ergebnisse dieser Studien vor allem auf Patienten fokussieren, die eine 5-FU Monotherapie erhalten haben, welche vor allem bei älteren Patientenkollektiven als Standardtherapie für das CRC verwendet wird. Im Gegenzug hat eine neuere Studie von Kumar et al. von 2015 diese These widerlegt. Es gab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der 3-Jahres-Überlebensrate zwischen Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie abschliessen konnten und denjenigen, die einen Therapieabbruch hinnehmen mussten. In dieser Studie wurden jedoch auch Stadium II high risk Patienten eingeschlossen, sodass eine Interpretation der Ergebnisse schwieriger erscheint und das Outcome nicht direkt verglichen werden kann [30].

#### 1.4 Die adjuvante Chemotherapie beim kolorektalen Karzinom

Dieses Kapitel fasst die pharmakologischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der Zytostatika zusammen, die in der adjuvanten Therapie des kolorektalen Karzinoms überwiegend zum Einsatz kommen.

Diese Zytostatika werden intravenös und zum Teil als Bolus appliziert. Bei Kontraindikationen für eine Kombinationstherapie (z.B. Alter der Patienten, Komorbiditäten und/oder Ausmaß der Nebenwirkungen) kann auch eine Monotherapie -oral oder intravenös- in Erwägung gezogen werden.

Zur Dosisbestimmung der Therapeutika wird standardgemäß die Körperoberfläche ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ) berechnet. Die Dosisanpassung erfolgt unter Berücksichtigung der Organfunktionen (Nieren, Leber, Knochenmark), dem Allgemeinzustand der Patienten sowie der zu erwartenden Toxizitäten. Wie im vorherigen Kapitel bereits erläutert ist die Knochenmarkstoxizität zumeist die dosislimitierende Nebenwirkung [33].

Für die Beschreibung und Erfassung unerwünschter Ereignisse während der Chemotherapie gibt es die sogenannten „allgemeine Terminologie und Merkmale unerwünschter Nebenwirkungen“, englisch auch CTCAE (Common terminology criteria for adverse events version v4.03 Juni 2010) genannt [34]. Dabei werden alle Systemorganklassen identifiziert und innerhalb jeder Organklasse die jeweiligen unerwünschten Ereignisse mit Schweregrad gelistet. Die Graduierung erfolgt von Grad 1 (gering, asymptomatisch) über Grad 2 (mäßig) und Grad 3 (schwer, medizinisch signifikant) bis zu Grad 4 (lebensbedrohlich). Grad 5 bezeichnet bereits den Tod im

Zusammenhang mit dem unerwünschten Ereignis[35]. Die Dosislimitierende Toxizitäten, die in dieser Arbeit beschrieben werden, basieren auf diesen Leitlinien. Je nach Schweregrad erfolgt dann eine entsprechende Dosisanpassung für den nächsten Zyklus der Chemotherapie. Für das Immunsystem gelten untenstehende Dosisanpassungen.

<b>Leukozyten (in /<math>\mu</math>l)</b>	<b>Thrombozyten (in /<math>\mu</math>l)</b>	<b>Dosis (in %)</b>
> 3500	> 100.000	100
3000-3500	75-100.000	75
2500- 3000	50.000-75.000	50
<2000	< 50.000	0

Tab.1: Dosisanpassung der Zytostatika nach Leukozyten-/Thrombozytenzahl

Im folgenden Kapitel werden die einzelnen Substanzen mit ihrem Nebenwirkungsprofil vorgestellt.

#### 1.4.1 5-Fluorouracil (5-FU)

5-FU ist seit über 50 Jahren der Hauptbestandteil in der adjuvanten als auch palliativen Therapie des CRC [36]. Es ist ein Antimetabolit und gehört in die Gruppe der Pyrimidinanaloga. Die strukturelle Ähnlichkeit mit der Base Uracil ermöglicht den Einbau in die RNA und über komplexe Mechanismen führt es zu Transkriptionsstörungen mit konsekutivem Zelltod. Zusätzlich hemmt 5-FU ein Schlüsselenzym der Pyrimidinbiosynthese, was zu einer Hemmung des Wachstums bei Zellen mit hoher Replikationsrate führt.

In den verschiedenen Chemotherapie Schemata des kolorektalen Karzinoms wird 5-FU mit Leucovorin (LV), dem aktiven Metaboliten der Folsäure, kombiniert. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der zytotoxischen Aktivität von 5-FU.

Zu den häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen bei der Anwendung von 5-FU als i.v Zytostatikum gehören Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen sowie (febrile) Neutropenie und Thrombozytopenie, wobei Diarrhoen als häufigste dosislimitierende Toxizität genannt wird [37].

Capecitabin ist der sogenannte Pro-Drug von 5-FU, welches oral eingenommen wird. Erst im Tumorgewebe wird es durch das Enzym Thymidinphosphorylase umgewandelt

und entfaltet dort seine Wirkung. Diese zielgerichtete Anwendung ermöglicht eine gute Bioverfügbarkeit bei gleichzeitig besserer Verträglichkeit für den Patienten.

Capecitabin weist ein ähnliches Nebenwirkungsprofil auf, wobei das Auftreten des Hand-Fuß- Syndroms deutlich erhöht ist und ebenfalls zu den häufigsten Gründen für einen Therapieabbruch zählt [37].

Die Ausprägung der Nebenwirkungen ist individuell sehr unterschiedlich und variiert stark aufgrund des Genexpressionsmuster und somit des Pyrimidinstoffwechsels, wofür das Enzym Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPD) verantwortlich ist. Diese spaltet 5-FU in seine inaktiven Metabolite und trägt zum schnellen Abbau bei [38].

Patienten mit einem DPD Enzymdefekt können 5-FU deutlich langsamer abbauen, wodurch der Blutplasmalevel ansteigt und zu verstärkten Toxizitäten in Form von Knochenmarksdepression, gastrointestinale Beschwerden sowie Neuropathien führt [39]. Durch die relativ geringe Halbwertszeit von 5-FU (10-15 min) und seine erhöhte Toxizität bei längerer Therapiedauer ist eine kontinuierliche Infusion +/- Bolus ein Standard im Therapieregimen geworden [40]. Für die Anwendung von 5-FU als Monotherapie haben sich in den letzten Jahrzehnten mehrere Therapieprotokolle bewährt. Diese sind in der Tabelle A1 (Anhang Seite 122) aufgeführt. Einige dieser Schemata werden jedoch bevorzugt in Kombination mit Oxaliplatin und/ oder Irinotecan angewandt. Bezüglich der Therapieprotokolle wird auf die nächststehenden Kapitel verwiesen. Unter den Kombinationstherapien kann eine Dosisanpassung bzw. eine Veränderung der Behandlungsintervalle je nach Befinden des Patienten, der Ansprechrate sowie den dosilimitierenden Nebenwirkungen notwendig werden. Die LV-Dosis bleibt in den allermeisten Fällen gleich.

#### 1.4.2 Oxaliplatin (OX)

Oxaliplatin ist eine antineoplastische Substanz und gehört zu der Gruppe der platinhaltigen Alkylantien. Im Rahmen der Biotransformation von Oxaliplatin entstehen Derivate, die mit der DNA interagieren und intra- bzw. interstrang-Quervernetzungen bilden und somit einen Abbruch der DNA-Synthese bewirken. Dies führt zu Zytotoxizität und antitumoraler Wirkung. Im letzten Jahrzehnt haben viele klinische Studien gezeigt, dass Oxaliplatin in Kombination mit 5-FU eine signifikant höhere Ansprechrate und ein verlängertes progressionsfreies Überleben verglichen mit der alleinigen Gabe von 5-FU/LV haben. Daher werden diese beiden Substanzen bevorzugt synergistisch zur

adjuvanten Therapie des CRC Stadium III (nach operativer Resektion des Tumors) oder in der metastasierten Situation angewendet [41].

Die übliche Dosis von OX beträgt 85mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Es wird alle 2 Wochen verabreicht und leitliniengemäß für 12 Zyklen (6 Monate) in der adjuvanten Situation angewandt. Bei metastasierten CRC Patienten variiert die Behandlungsdauer. (S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Version 1.0 Juni 2013)

In Kombination mit 5-FU und LV wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere Therapieprotokolle erstellt, die in Tabelle A2 (Anhang Seite 123) dargestellt werden.

Eine randomisierte Phase III Studie von Grothey et al. [42] vergleicht das Nebenwirkungsprofil der häufigsten Therapieschemata (FOLFOX versus XELOX) und konnte zeigen, dass XELOX trotz geringerer Toxizität im Vergleich zu FOLFOX4 gleichwertig in Bezug auf Gesamtüberleben sowie PFS ist und somit als Alternative angewandt werden kann. Toxizitäts-induzierte Therapieabbrüche waren in beiden Therapiearmen gleich hoch bei ca. 26-30%.

Für das fortgeschrittene Kolonkarzinom (UICC Stadium III oder IV) kommt gemäß den S3-Leitlinien Version 1.0 2013 das (m)FOLFOX6 Regime am häufigsten zum Einsatz. Je nach BRAF/RAS Status sowie Tumorlokalisation (linksseitig vs. rechtsseitig) wird die Zugabe von Bevacizumab (anti-VEGF Antikörper) oder Cetuximab/Panitumumab (anti-EGFR-Antikörper) empfohlen [43, 44].

#### 1.4.3 Irinotecan (IR)

IR ist ein halbsynthetisches Zytostatikum, welches spezifisch die DNA-Topoisomerase I hemmt. Die Hemmung der Topoisomerase führt zu Einzelstrangbrüchen der DNA und damit zur Blockade in der Replikation. Der aktive Metabolit SN-38 kann noch wirksamer und zytotoxischer wirken als Irinotecan selbst. Neben der antineoplastischen Wirkung wird durch IR das Enzym Acetylcholinesterase gehemmt und kann zu erheblichen Nebenwirkungen bei der gleichzeitigen Einnahme muskelrelaxierender Medikamente führen.

IR wird in Kombination mit 5-FU, LV sowie Bevacizumab als Erstlinientherapie beim metastasierten Kolonkarzinom oder als secondline Therapie eingesetzt, wenn eine vorherige Therapie mit 5-FU/LV/OX nicht oder unzureichend angesprochen hat oder je nach RAS Status [45, 46] . Bei Patienten mit EGFR exprimierenden Kolonkarzinomen kann ebenso der Einsatz von Cetuximab erfolgen [47]. Die Anwendungsdosis von IR beträgt gemäß der Fachinformation 180mg/m<sup>2</sup>. Dies gilt auch bei der Anwendung als

Kombinationstherapie. Die Applikation wird im 2 Wochen Zyklus angesetzt [48]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen bei der intravenösen Anwendung von IR zählt die verzögert (> 24h nach Applikation) auftretende Diarrhoe Grad 3/4, die je nach Applikation (als Kombinationstherapie bzw. Monotherapie) in 13,1-20% der Fälle auftritt und als dosislimitierende Toxizität gilt [48]. Eine schwere Neutropenie (<500 Zellen/mm<sup>3</sup>) tritt in 9,8% der Fälle in der Kombinationstherapie sowie in bis zu 22,6% der Patienten in der Monotherapie auf. Ein schweres akutes cholinerges Syndrom (< 24h nach Applikation) mit u.a Symptomen wie Schwitzen, Vasodilatation, Hypotonie, Miosis, Schwindel, Abdominalschmerzen und Sehstörungen wurde ebenfalls in 1,4% (Kombinationstherapie) bzw. 9% (Monotherapie) der Patienten beschrieben. Dosislimitierende Thrombozytopenie und Anämie gehören ebenfalls zum Nebenwirkungsprofil von IR [49].

#### 1.4.4 Cetuximab (C)

Cetuximab ist ein IgG1 monoklonaler Antikörper, der kompetitiv die Bindung an den epidermalen Wachstumsfaktor- Rezeptor (EGFR) hemmt und dadurch zu einer Inhibition von Zellwachstum sowie Apoptose führt. Er wird bei Patientin mit fortgeschrittenem CRC zusätzlich zur Kombinationstherapie mit FOLFOX oder FOLFIRI eingesetzt[50]. Nur bei Patientin mit nachgewiesenem BRAF und (K)Ras-Wildtyp hat Cetuximab eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens bzw. Gesamtüberleben zur Folge [51]. Bei Unverträglichkeit von IR oder bei nicht Ansprechen einer Therapie mit OX und IR kann Cetuximab auch als Monotherapie angewendet werden.

Die Initialdosis beträgt 400 mg/m<sup>2</sup> Körperfläche, danach wird der Antikörper einmal wöchentlich in einer Dosis von 250mg/m<sup>2</sup> intravenös verabreicht. Die Behandlung sollte bis zur Progression der Erkrankung fortgeführt werden.

Cetuximab kann nach erstmaliger Anwendung zu einer anaphylaktischen Reaktion mit kardiopulmonalem Organversagen führen und erfordert einen dauerhaften Abbruch der Therapie. Die häufigsten Nebenwirkungen sind jedoch akneforme Hautreaktionen, Nagelveränderungen sowie eine Neutropenie.

#### 1.5 Die Rolle der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Als PBMCs werden diejenigen Zellen des Immunsystems bezeichnet, die einen runden Zellkern besitzen. Sie enthalten ein dutzend verschiedener Zellsubgruppen, die aus einer einzigen hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks entstammen. Hauptsächlich

gehören Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen dazu. Diese Zellen werden häufig verwendet, um die zelluläre Immunantwort am Beispiel verschiedener Erkrankungen zu evaluieren [52]. Zellen des immunologischen Systems werden in vielen wissenschaftlichen Fragestellungen beim CRC als erfolgsversprechende Marker getestet, zum Beispiel auf Genexpressionsebene [53] oder als prädiktiver Detektionsmarker mittels FTIR -(Fourier-transform-infrared ) Spektroskopie [54] sowie bei der Entwicklung von Immuntherapeutika [55].

Ein wichtiger Aspekt ist die Rolle der PBMCs in Bezug auf die Hämatotoxizität der Zytostatika, die in der Therapie des CRC eingesetzt werden. Die Knochenmarkdepression ist eine der häufigsten und wichtigsten dosislimitierenden Nebenwirkungen, die negative Konsequenzen für die Therapietreue mit sich zieht [56]. Im klinischen Alltag spielen die Zahl der Erythrozyten (und somit der Hämoglobinwert), die Zahl der Thrombozyten sowie der Leukozyten dabei die entscheidende Rolle, ob und wie eine Chemotherapie leitliniengerecht fortgeführt werden kann. Gegenwärtig wird anhand einer regelmäßigen Laborentnahme, bestehend aus einem Differentialblutbild sowie Leber-/Nierenwerte (z.B. GOT, GPT, gamma-GT, Kreatinin, GFR) und Elektrolyte (z.B. Natrium, Kalium, Calcium), das Ausmaß der Knochenmarkdepression quantitativ erfasst und über die Fortführung der Therapie entschieden. Andere Testverfahren zur Bestimmung der Hämatotoxizitäten werden in der Klinik derzeit nicht angewandt.

Aufgrund dessen wäre es von großer Bedeutung ein *in vitro*- Testverfahren zu entwickeln, der quantitativ und qualitativ die immunologischen Zellen erfasst und gleichzeitig als Prädiktionsmarker für die Hämatotoxizität der Zytostatika eingesetzt werden kann.

In unserem PBMC-Testmodell gehen wir jedoch nur auf den Einfluss der Zytostatika auf die Leukozyten ein. Der Effekt der Chemotherapie auf Erythrozyten und Thrombozyten kann aufgrund der verschiedenartigen Aufarbeitungs- und Analyseverfahren nicht berücksichtigt werden.

#### 1. 6 Das Therapieansprechen anhand der RECIST Kriterien

Da das Therapieansprechen stark mit dem Gesamtüberleben der Patienten mit soliden Tumoren korreliert muss eine sorgfältige Bewertung der Tumorlastveränderung bei den Patienten erfolgen, die sich einer Chemotherapie unterziehen müssen. In den 1970-Jahren wurden die Definitionen für das Therapieansprechen von der World Health Organization (WHO) in einem Handbuch erstellt und weltweit am häufigsten verwendet

(WHO handbook for reporting results of cancer treatment: World Health Organization Offset Publication No. 48; 1979).

Die neuesten Entwicklungen im Bereich der Antitumorsubstanzen sowie neue bildgebende Technologien erforderten jedoch eine neue Methode um das klinische Therapieansprechen zu messen [57]. Deshalb gibt es für solide Tumore seit fast 2 Jahrzehnten die Möglichkeit, anhand radiologisch messbarer Kriterien, den sogenannten RECIST Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) das Therapieansprechen in klinischen Studien zu objektivieren und quantifizieren [58].

Dabei werden messbare Läsionen von soliden Tumoren oder deren Metastasen zu Beginn einer Therapie identifiziert (sogenannte Target- Läsionen) und metrisch aufgezeichnet. Hierfür wird der längste Durchmesser (LD) aller Target- Läsionen (additiv) verwendet und dient als Referenzwert zur Verlaufsbeurteilung. Alle anderen Läsionen werden als Non-Target-Läsionen identifiziert und als solche dokumentiert. Therasse Als Bildgebende Verfahren werden Röntgen, Computertomographie sowie Magnetresonanztomographie bevorzugt eingesetzt [59]. Für die Beurteilung des Ansprechens wird die unten beigefügte Tabelle verwendet.

Komplette Remission (CR)	alle Target Läsionen sind nicht mehr identifizierbar
Partielle Remission (PR)	Senkung des LD um > 30%
Stabile Erkrankung (SD)	Weder PR noch PD
Progression (PD)	Erhöhung des LD um > 20%

Tab 2a: Beurteilung des Therapieansprechens unter Chemotherapie

Für die Beurteilung des Gesamtansprechens geht auch die Veränderung der Non-Target-Läsionen in die Messung mit ein.

Komplette Remission (CR)	keine Non-Target Läsionen mehr nachweisbar/ Tumormarker im Normbereich
Stabile Erkrankung (SD)	>1 Non-Target Läsion vorhanden, Tumormarker erhöht
Progression (PD)	neu aufgetretene oder Zunahme der bestehenden Non-Target Läsionen

Tab 2b: Beurteilung des Gesamtansprechens unter Chemotherapie

In dieser Doktorarbeit wurde für die Bewertung des progressionsfreien Intervalls mittels der bereitgestellten Follow-Up Daten ebenfalls anhand dieser RECIST-Kriterien der Verlauf der Tumorerkrankung beschrieben. Die Beurteilung bzw. Einteilung in CR, PR, SD und PD wurde aus den radiologischen Befundergebnissen der jeweiligen Patientendaten entnommen.

### 1.7 Das 3D-Sphäroid-Modell

Im Bereich der präklinischen *in-vitro* Testung werden am häufigsten Monolayer-Zellkulturen oder Einzellzellsuspension verwendet, da diese deutlich einfacher herzustellen und besser reproduzierbar sind. Allerdings kann man ihnen bezüglich der klinischen Wirksamkeit keine hohe Aussagekraft zusprechen, da sie den Nachteil haben, die tatsächliche Situation im Tumor nicht darstellen zu können. [60]. Zellen aus zweidimensionalen Kulturen zeigen häufig eine veränderte Morphologie, und untypische Zelldifferenzierungen. Im 3D-Zellkulturmodell hingegen konnte Ende der 90er Jahre bereits bewiesen werden, dass die zelluläre Zusammensetzung, sowie Genexpressionsmuster über längere Zeit stabil blieben und mit den *in-vivo* Ergebnissen übereinstimmten [61]. Die Zellen konnten über Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Interaktionen positiven Einfluss auf Zellproliferation, Invasion und Differenzierung ausüben [62]. Im Laufe der Jahre hat sich gezeigt, dass diese 3D-Zellkultur-Systeme als erfolgsversprechende Methode zur Therapietestung und somit zur Verbesserung der klinischen Prädikitivität bezüglich der Effektivität neuerer Krebstherapien führen können [63, 64]. Daher wurden im Laufe der Zeit verschiedene 3D-Zellkultur-Modelle ausgearbeitet wie zum Beispiel MCTS (Multicellular Tumour Spheroids) bzw. Tumorsphäroide, die mittels verschiedener Techniken hergestellt werden können. Eines der beliebtesten Technologien ist die Herstellung von 3D-Sphäroiden in sogenannten Spinner-Flaschen. Hierbei formen sich sphärische Aggregate im Laufe der Zeit durch Rotation. Diese Bewegung verhindert die Zelladhäsion an die Flaschen und hält eine dauerhafte Zellsuspension aufrecht. Spinner-Flaschen ermöglichen eine optimale Ernährung der Zellen und gleichzeitig kann eine hohe Anzahl an Sphäroiden produziert werden. Des Weiteren ist es möglich, Tumorsphäroide mittels Monolayer-Kulturen über spezielle Rotationsgefäße („Gyratory Rotation System“) zu erzeugen [65]. Hierfür muss allerdings eine sehr präzise Menge an Wachstums-Medium pro Zellzahl hinzugefügt werden, damit es zu einer passenden Sphäroidbildung innerhalb von 1-2 Tagen kommt. Mit der sogenannten „Hanging drop“ Methode können ebenfalls

homogene multizelluläre Sphäroide verschiedenster Zelllinien hergestellt werden. Dabei werden „Zelltropfen“ auf Deckel von Zellkultur Petrischalen mit PBS platziert und inkubiert, bis sich Sphäroide bilden. Dieses barrierefreie System erlaubt eine 3D-Zellformation basierend auf die alleinige Kraft der Schwerkraft [66] [67]. Eine weitere erfolgreiche Methode ist die von 2CureX etablierte. Die Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgt nach der von Kondo et al. beschriebenen Technik [68]. Infolge werden mittels IndiTreat® Test tausende 3D-Mikrotumore aus kolorektalen Karzinomzellen gebildet und mit einzelnen Zytostatika oder Kombinationstherapien behandelt. Für jedes behandelte Well wird durch Bestimmung der Größen- oder abnahme der Sphäroide das Therapieansprechen berechnet [69].

In der vorgeleiteten Arbeit wurde eine modifizierte Liquid-Overlay- Technik zur Herstellung der Tumorsphäroide verwendet, von der die prospektive Prädiktivität erstmalig gezeigt werden konnte [70, 71]. Anhand dieser Methodik wird in den nächststehenden Kapiteln die Testung des 3D-Sphäroidmodells für das individuelle Therapieansprechen der Tumorzellen sowie die Hämatotoxizität auf die PBMCs vorgestellt.

### 1. 8 Zielsetzungen

Die standardisierte FOLFOX Therapie zeigt im Vergleich zu einer alleinigen Gabe von 5-FU erheblich höhere hämatotoxische Nebenwirkungen auf. Ein damit assoziierter häufigerer Therapieabbruch ist die Folge, der ebenfalls mit einer Verschlechterung der Prognose durch erhöhte Rezidivgefahr verbunden ist. Ein weiteres Problem in der Behandlung des CRC ist, dass Irinotecan als Kombinationstherapie mit 5-FU nur in der metastasierten Situation derzeit als Erstlinientherapie zugelassen ist. Die CALGB 89803 Studie von Saltz et al 2007 konnte nicht beweisen, dass 5-FU mit Irinotecan einer alleinigen Therapie mit 5-FU in der adjuvanten Situation überlegen ist und zeigte eine erhöhte hämatologische Toxizitätsrate im 5-FU/Irinotecan Arm [28].

Folglich zeigt sich, dass das FOLFOX- Schema signifikant einer Therapie mit FOLFIRI oder 5-FU Mono überlegen ist, jedoch ebenfalls mit einer höheren Rate an hämatotoxischen Nebenwirkungen verbunden ist.

Wenn man all diese Kontroversen berücksichtigt sowie die Tatsache, dass die Wahl der Erstlinientherapie für das Langzeitüberleben der Patienten eine essentielle Rolle spielt, ist es eine schwierige Aufgabe, die individuell beste Therapie für CRC Patienten zu finden und damit gleichzeitig die Langzeitprognose möglichst zu verbessern.

Daher ergeben sich mehrere wichtige experimentelle und klinische Fragestellungen in Bezug auf das aktuelle standardisierte Therapiekonzept des kolorektalen Karzinoms:

- Kann eine FOLFIRI Therapie bzw. eine Monotherapie mit 5-FU eine adäquate Alternative darstellen, wenn die festgelegte Erstlinientherapie mit FOLFOX aufgrund von starken Nebenwirkungen in vielen Fällen nicht beendet werden kann?
- Kann diese individuelle therapeutische „non-adherence“ der Patienten anhand eines Prädiktivitätstest erkannt werden?
- Kann ein Prädiktivitätstest die individuelle Therapieeffektivität quantitativ erfassen und gleichzeitig eine Aussage über mögliche hämatotoxische Nebenwirkungen treffen?
- Gibt es die Möglichkeit, durch einen *in-vitro* Prädiktivitätsmodell die adäquate individuelle Erstlinientherapie für Patienten mit kolorektalem Karzinom herauszufiltern?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Allgemeines

#### 2.1.1 Das Sphäroidmodell

Um eine zuverlässige Methode für das individuelle klinische Ansprechen der Therapie zu etablieren, haben wir in unserem *in-vitro*-3D Sphäroid Modell die Effektivität von 5-FU, OX und IR mit Hilfe eines Zellviabilitäts-Assay (ATP Assay) an 125 Patienten mit kolorektalem Karzinom getestet. Dieser Assay eignet sich, um die (Rest-)Aktivität der Tumorzellen vor und nach Therapie mit den ausgewählten Chemotherapeutika zu quantifizieren und verlässliche Aussagen zur Therapieerfolg zu treffen [72, 73] .

Mit dem korrespondierenden PBMC- Modell haben wir versucht, parallel zu den Tumorgewebsproben Blutproben von den jeweiligen Patienten aufzuarbeiten und ihre Vitalität nach Zytostatikazugabe zu analysieren, um die hämatologischen Toxizitäten zu erfassen. Eine Quantifizierung der Tumor-infiltrierenden Leukozyten sowie der Tumorzellen wurde anhand der sogenannten FACS (fluorescence-activated cell sorting) – Analyse durchgeführt. Mit der FACS- Analyse wurde ebenfalls der Zelltod der Tumorproben nach Zytostatikagabe (analog zum ATP-Assay) gemessen und die restliche Vitalität der Tumorzellen berechnet.

Die FACS Analyse wird vor allem im Bereich der Hämatologie und Immunologie verwendet, da es die Analyse von Subpopulationen verschiedener Immun- und Blutzellen ermöglicht. Sie kann aber auch verlässlich für quantitative und qualitative Fragestellungen bei verschiedenen Tumorentitäten benutzt werden [74, 75]. Für die Zelltypisierung der aufgearbeiteten Tumorproben wurden zwei Oberflächenproteine ausgewählt. Als Zelladhäsionsmolekül, welches auf der Oberfläche von Zellen verschiedenartiger Organepithelien und den daraus entstehenden Karzinomen zu finden ist, wurde EpCAM gewählt [76, 77]. Als zweites Protein wurde CD45 ausgewählt, ebenfalls ein Oberflächenmolekül, das für die Immunphänotypisierung von verschiedenen Zellen eine wichtige Rolle spielt und auch als Leukocyte Common Antigen (LCA) bezeichnet wird. CD45 wird von allen hämatopoetischen Zellen- mit Ausnahme von zirkulierenden Erythrozyten, Plasmazellen, neutrophile Granulozyten und Thrombozyten- exprimiert und kann somit als Pan-Leukozytenmarker verwendet werden [78, 79].

#### 2.1.2 Das Tumorgewebe

Die 125 Tumorgewebeproben wurden im Rahmen der SpheroPCT- Studie (Ethiknummer: 252/04) in dem Zeitraum zwischen Juli 2011 und Juli 2014 gesammelt, aufgearbeitet und zusätzlich für spätere immunhistochemische Färbung kryokonserviert. Eine schriftliche Einverständniserklärung (informed consent) lag von allen Patienten vor. Für die ATP-Analyse wurden 106 dieser Proben verwendet, für die FACS- Analyse konnten 37 von den 125 Proben aufgearbeitet werden. Bei 18 der 125 Patienten wurden simultan sowohl ATP als auch FACS Daten analysiert. Um genügend Gewebeproben für statistisch aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, wurden neben dem Universitätsklinikum Großhadern weitere Kliniken bzw. Darmzentren für die Rekrutierung der Proben hinzugezogen: 48 Proben stammten direkt aus der chirurgischen Klinik des Uniklinikum Großhadern München, 30 aus dem Klinikum Kaufbeuren, 29 aus dem Klinikum Landshut, sieben aus dem Klinikum Neuperlach, vier aus dem Universitätsklinikum Rechts der Isar, vier aus dem Klinikum 3. Orden sowie drei aus dem Klinikum Lübeck. Falls Blutproben mitversandt wurden, wurden diese in den meisten Fällen bei Raumtemperatur gelagert und erst am Tag der Therapie der Sphäroide aufgearbeitet.

Es wurden Gewebeproben als geeignet erachtet, die im gesamten Kolon und Rektum bis 10 cm ab ano lokalisiert waren. Rektumkarzinome unter 10 cm ab ano wurden nicht in

die Analysen miteinbezogen sowie Patientenproben, die entweder mit Chemotherapie oder Radiotherapie vorbehandelt worden waren bzw. innerhalb der letzten fünf Jahre an einem Zweitkarzinom erkrankt waren. Eine Gesamtvitalität des Tumorgewebes nach Aufarbeitung von unter 70% (Trypanblaufärbung) wurde ebenfalls als Ausschlusskriterium erachtet. Die Patientendaten wurden aus von den Zentren zur Verfügung gestellten Arztbriefen, OP-Berichten, Pathologieberichten und radiologischen Befunden in einem standardisierten Erhebungsbogen (Papier-CRF) und in einer kommerziell verfügbaren Datenbank (Filemaker Pro 12.0v3) pseudonymisiert dokumentiert. Die klinisch-pathologischen Daten wurden gemäß der aktuellen gültigen UICC-Klassifikation vom pathologischen Institut erhoben und die adjuvante Chemotherapie wurde gemäß der aktuellen S3-Leitlinie (Version 1.0 Juni 2013 021/007OL) durchgeführt [80]. Zusätzlich wurden die Nachsorgedaten in regelmäßigen Abständen durch Akteneinsicht in den jeweiligen Zentren gewonnen. Von einem zweiten Mitarbeiter wurden diese erhobenen Daten auf ihre Richtigkeit geprüft. Zur Übersichtlichkeit wurde die untenstehende Graphik erstellt. Diese zeigt einen chronologischen Ablauf der Gewebeverarbeitung und Blutaufarbeitung bis hin zur Analyse der therapierten Tumorsphäroide und Blutkulturen.

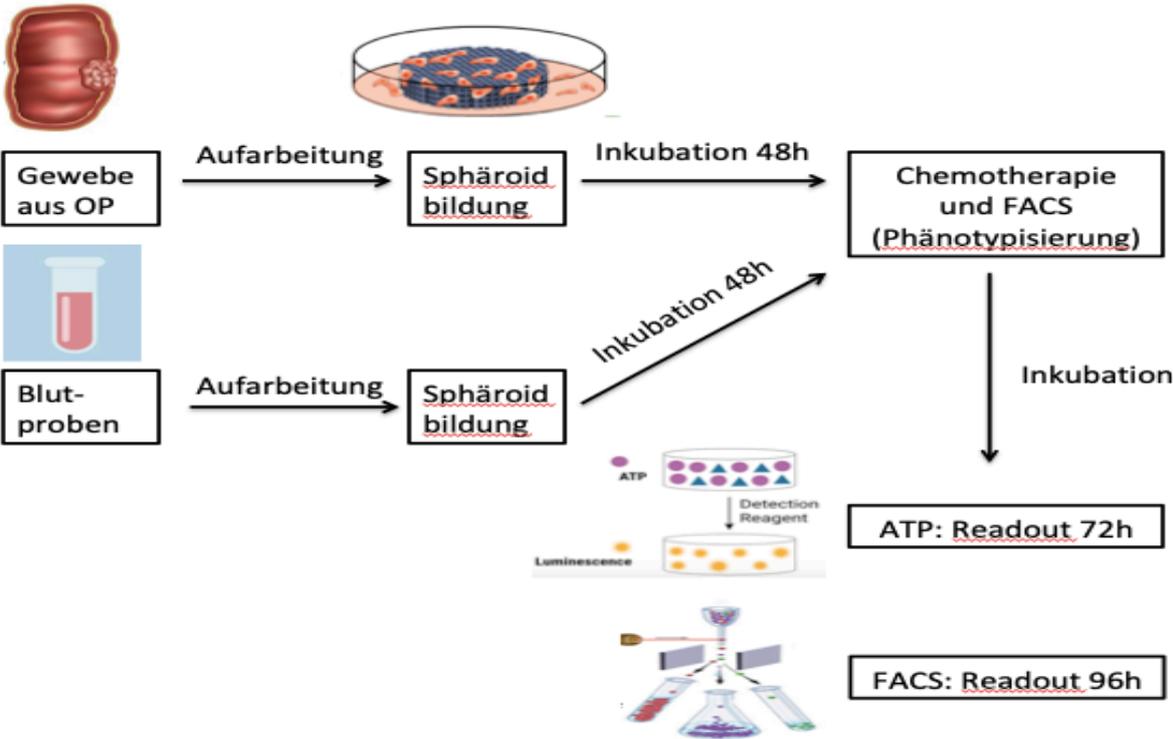


Abb. 1: Zeitliches Schema für die Aufarbeitung der Proben (Tumor und/oder Blut)

2.2 Gewebeaufarbeitung

Jede Gewebeaufarbeitung wurde gemäß einer Standard Operating Procedure (SOP) Anleitung durchgeführt. Es wurde innerhalb der ersten 24 Stunden nach Ankunft der Probe mit der Aufarbeitung begonnen, um die Vitalität der Zellen nicht zu gefährden und Zelldegeneration zu verhindern. Aus Übersichtsgründen werden alle Materialien und Geräte für die nächsten Schritte (Gewebearbeitung, Isolation von PBMCs, ATP-Analyse und FACS-Analyse) unter 2.2.1 und 2.2.2 zusammengelistet.

### 2.2.1 Material

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Produktnummer</b>
50ml Röhrchen, blau, steril	Falcon	3500159
Serologische Pipette, steril	Costar	
5ml		4487
10ml		4488
25ml		4489
Zellsieb 40µm, Nylon, steril	Becton Dickinson Biosciences	352340
Spritze 5ml, steril, unterteilt in 0,2ml, steril	Becton Dickinson	210419
Zellkulturflasche T 75cm <sup>2</sup> steril, Filterdeckel	Falcon	353136
Zellkulturflasche Easy Flask, T 25 cm <sup>2</sup> steril, Filterdeckel	Falcon	353134
Gestopfte Pasteurpipetten (230mm)	NeoLab	2-9809
Petrischale 60x15mm	Becton Dickinson	35 3004
Zellsieb 70µm, Nylon, steril	Becton Dickinson	352350
96- U bottom Wellplatte	Greiner Cellstar	650185
T.I.P.S. Reloads 0,5µl	Eppendorf	5409452
T.I.P.S Reloads 2-200µl	Eppendorf	5409453
T.I.P.S Reloads 50-1000µl	Eppendorf	5409455
Petrischale 35x10mm	Becton Dickinson	353001
Petrischale 100x15mm	Becton Dickinson	351029
Handschuhe	Hartmann	2100398

50 ml Reagent Reservoir steril	Corning	4870
Skalpell steril Nr. 22	Feather	210086
Armstulpen, unsteril		
Sterile Pinzette, mind. 200 cm, autoklaviert	VWR	2322116
Liberase TM Research Grade	Roche Diagnostics	05401127 001
FKS = FCS (Fetales Kälberserum), 100x,	Invitrogen	10270-106
70% Isopropanol	Apotheke	402771
Gigasept	Schülke u. Mayer	107411
Ficoll	GE Healthcare	17-1440-02
Trypanblau	Sigma	T8154
Zellsieb 100 µm	BD Falcon	352360
Neubauerzählkammer	Labor Optik	--
Lithium-Heparin Spritzen	Sarstedt	01.1604
96-well PP Platte weiß, U-Boden	Corning	3355
96-Well-Spitzbodenplatte	Costar	3894
15 ml Zentrifugenröhrchen	TPP	91015
50 ml Zentrifugenröhrchen	BD Falcon	352070
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf	003012086
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson	8091159
Handschuhe unsteril puderfrei	Hartmann	--
Handschuhe Nitril unsteril	Cardinal Health	--
IgG1-APC (Klon MOPC-21)	BD	555751
EpCAM-APC (Klon EBA-1)	BD	347200
IgG1-FITC (Klon MOPC-21)	BD	555748
CD45 -FITC (Klon 2D1)	BD	345808
IgG1- PE (Klon MOPC-21)	BD	559320
EpCAM-PE (Klon EBA-1)	BD	347198
AB-Serum	Biotest AG	805135
PI-Lösung	Fluka	70335-5ML-F
D-PBS, 1x, pH 7,4	Pan Biotech	P04-36500
Natriumazid	Merck	1.06688.0100

Erylysepuffer	Milteny	
Parafilm	Pechiney	--
Trucount Beads	BD	340334

Tab. 3: Verwendete Materialien für Gewebeaufarbeitung, Isolation von PBMCs, ATP-Analyse und FACS-Analyse

### 2.2.2 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller	Geräte-Nr.
Zentrifuge	Rotixa	Hettich	
Wasserbad+Horizontalschüttler	-	Köttermann	
Brutschrank	-	Heraeus	
Phasenkontrastmikroskop	IX40	Olympus	
Sterilbank	BSB 6A	Gelaire Flow Laboratories	
Feinwaage	FX- 40	AND Electronic Sartorius	
Neubauer Zählkammer			
Multi Kanalpipette	50-200µl	Socorex	
Feuchte Kammer (Sphäroid Box)		Laborwerkstätte	
Eismaschine	KBS	Ziegra	L-437794
Zentrifuge	Rotina 420 R	Hettich	L-106922
Durchflusszytometer	FACS-Calibur	BD	L-711542
ELISA- Reader	Tecan Ultra 384	Tecan	
Software für Elisa-Reader	Magellan	Tecan	
Vortexer	Cortex-Genie	Bender &Hobein	L-108600
Mehrkanalpipette 30-300µl	Research plus	Eppendorf	
Pipettierhilfe	Accu-Jet	Brand	L-719190
Kühlschrank	Sikafrost Kabinett	Siemens	G-236447

Tab. 4: Verwendete Geräte für Gewebeaufarbeitung, Isolation von PBMCs, ATP-Analyse und FACS-Analyse

### 2.2.3 Lösungen

Als Grundbaustein aller Lösungen, die für die Gewebeaufarbeitung notwendig waren, wurde das Zellkulturmedium (ZKM) DMEM/F12(4,5g/l Glucose) verwendet. In einer 500ml DMEM Mediumflasche wurden noch zusätzlich 50 ml Fetales Kälber Serum (FCS, 10% Anteil), 12 ml Non essential amino acids (NEAA, 2,1% Anteil) und 12 ml Vitamine (2,1% Anteil) hinzugefügt. Um das geeignete Transportmedium (TM) herzustellen, wurden zusätzlich verschiedene Antibiotika und Antimykotika zur breiten Abdeckung von möglichen Kontaminationen zum Zellkulturmedium hinzugefügt.

Zur Berechnung der Volumina der zuzusetzenden Antibiotika/Antimykotika wurden die Konzentrationen aus der standardisierten Labor- SOP für die TM- Lösung verwendet.

Die AB/AM Mischung wurde stets gut gemischt und steril in 50ml Falcon Röhrchen aliquotiert, um eventuelle Kontaminationen zu verhindern. Für die Herstellung von TM/2 und TM/4 wurde das TM mit ZKM jeweils mit 1:2 bzw. 1:4 verdünnt.

Das Verdaumedium (VM) wurde für den enzymatischen Verdau des Tumorgewebes verwendet und vor Gebrauch mit der geeigneten Menge an Verdauenzym (Liberase) vermischt. Für die Herstellung des VM wurde ein ZKM ohne FCS verwendet, um eine Neutralisierung der Liberase zu vermeiden. Die Mediumauswahl, Zusammensetzung der ZKM/VM sowie die Zusatzstoffe und Konzentrationen der AB/AM wurden anhand bestehender etablierter Laborprotokolle ausgewählt.

#### 2.2.4 Durchführung

Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte durch die Verwendung einer Sicherheitswerkbank stets unter sterilen Bedingungen. Das Gewebestück wurde in eine sterile Petrischale überführt und mithilfe von zwei sterilen Skalpellens von eventuellen Fett-/Nekroseanteilen und Blut befreit. Nach mehreren Waschschrinen wird das Gewicht des Gewebestückes mit der Feinanalysenwaage ermittelt. Anschließend wird der Verdau des Gewebes zuerst mechanisch, dann enzyatisch durchgeführt. Hierfür wird gewichtsabhängig Liberase zum Verdaumedium (VM)dazugegeben.

<b>Gewicht in mg</b>	<b>Liberase Menge in µl</b>	<b>Gesamtvolumen in VM in ml</b>
bis 250	50	5
bis 500	75	7,5
bis 1000	100	10
bis 2000	200	20

Tab. 5: Tabelle zur Bestimmung der Liberasemenge (in µl) in Abhängigkeit des Gewebegewichts

Der Verdau wurde bei 37°C im Wasserbad durchgeführt und in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Dauer des enzymatischen Verdau hängt von den biologischen Eigenschaften der Gewebeprobe ab. Nach dem Verdau wurden routinemäßig 50µl Zellsuspensio für die Vitalitätsbestimmung in der Neubauer Zählkammer vor Filtration und Waschen entnommen. Als weiterer Schritt erfolgte nun die Filtration des Gewebes durch einen 70µl und darauffolgend einen 40µl Zellsieb, um eventuellen Zelldetritus, Glassplitter oder sonstige ungeeignete Bestandteile der Suspension zu verwerfen. Nach Filtration wurde die Suspension zweimal gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt.

### 2.2.5 Sphäroidbildung

Aus der Zellsuspension wurden  $5 \times 10^4$  Zell- Sphäroide in einem Volumen von 100µl für die FACS Analyse und 50µl für das ATP Assay hergestellt. und in eine 96-Well-U-Platte pipettiert. Darauffolgend wurden die Platten im Brutschrank bei 37° und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt für 20 min inkubiert, bevor sie nochmals bei 900rpm 5 min lang abzentrifugiert wurden. Die nun folgende Sphäroidinkubation bis zur weiteren Verwendung erfolgt 48h in einer feuchten Kammer.

### 2.3 Isolation der autologen peripheren mononuklearen Blutzellen (PBMC)

Bei 30 von 37 Patientengeweben (81,08%), die für die FACS Analyse verwendet wurden, konnte autologes Patientenblut am Tag der Operation gewonnen werden. Analog waren es 100% (106 von 106 Gewebeproben) bei den Patienten, dessen Gewebeproben für den ATP Assay verwendet wurden. Es wurden Sarstedt-S- Monovetten mit Lithium Heparin Kugeln als Koagulations-Inhibitor bei der Blutentnahme ausgewählt.

#### 2.3.1 Durchführung

Die Isolation der PBMCs wurde unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Zunächst wurde das Blut aus den Monovetten über einen 100µl Zellsieb in ein Falcon Röhrchen gekippt und mit Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS, pH 7,4) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Daraufhin wurden jeweils 15 ml dieser Blutlösung auf zwei zuvor mit 15 ml Ficoll vorbereitete Falcon Röhrchen sehr vorsichtig pipettiert, um eine Überschichtung des Ficolls zu erzielen. Nach der Zentrifugation bei 21° mit 1250 rpm für 30 min wurde die entstandene Interphase sehr vorsichtig abpipettiert, in

ein neues Falcon Röhrchen überführt und in D-PBS gewaschen. Im Falle eines zu hohen Anteils an Erythrozyten wurde gemäß Herstellerinformationen eine Lyse der Erythrozyten durchgeführt und anschließend die PBMCs in der Neubauer Zählkammer gezählt. Eine bestimmte Anzahl an Sphäroiden wurden so belassen, sodass zwei Gruppen verglichen wurden: Sphäroide (S-Only) und PBMCs alleine (P-Only). Bei den Gewebeproben für den ATP Assay wurden diese zwei Gruppen therapiert. Bei 23 der 37 Tumorproben für die FACS-Analyse wurden die isolierten PBMCs in unterschiedlicher Menge zu den 48h alten Sphäroiden in den Well Platten hinzugegeben, sodass hier eine dritte Subgruppe, die S+P Gruppe, analysiert wurde. Für die FACS-Analyse wurden die alleinigen PBMC- Ansätze nicht therapiert und nur für die qualitative / quantitative Analyse der Blutzellen verwendet.

#### 2.4 Therapie der *in vitro* Kulturen

Die inkubierten Sphäroide wurden gemäß den aktuellsten Leitlinien für das kolorektale Karzinom (S3-Leitlinie Version 1.0; AWMF-Registernummer 021/0070L) mit den Standard-Chemotherapeutika (first line treatment) therapiert, bestehend aus 5-Fluoruracil in Kombination mit Oxaliplatin (FO), Irinotecan (FI) und Cetuximab (FOC/FIC), dem monoklonalen Antikörper gegen EGF- Rezeptor. Da es zum Zeitpunkt der Probenaufarbeitung/ Zytostatikabehandlung kein UICC-Stadium bekannt war und es keine RAS-Bestimmung gab, wurden alle Proben zusätzlich mit Cetuximab therapiert. Die Bestimmung des RAS- Status war auch nach Erhalt des Tumorstadiums in keinen der Proben möglich. Nach mehreren Therapieversuchen mit unterschiedlichen Konzentrationen in der Etablierungsphase gemäß verschiedener Fachinformationen wurde als geeignete Konzentration die 1xPPC (peak plasma concentration) gewählt. Die untenstehende Tabelle zeigt die verschiedenen Chemotherapeutika mit ihren individuellen Fachangaben:

<b>Name</b>	<b>Stock Konz. (mg/ml)</b>	<b>1xPPC Konz. (µg/ml)</b>	<b>Molekular gewicht (g/mol)</b>	<b>1xPPC µM (entspricht µmol/l)</b>	<b>Lösungsmittel</b>
5-FU	50,00	100,00	130,08	768,77	LML
Irinotecan	20,00	7,70	586,68	13,125	LML
Oxaliplatin	5,00	3,20	395,28	8,096	LML

Cetuximab	5,00	158,10	145781,6	1,084	LMH
-----------	------	--------	----------	-------	-----

Tab. 6: Konzentrationsangaben sowie PPC- Angaben zur Herstellung der Chemotherapie-Ansätze

Alle Chemotherapeutika wurden am Tag der Therapie frisch gelöst und von der Apotheke zur Verfügung gestellt. Therapieansätze mit Cetuximab (FOC und FIC) wurden durch ihren hohen Anteil an Wasser mit LMH, die anderen (FO und FI) entsprechend ihrem geringen Wasseranteil mit LML verglichen. Falls nicht genügend Zellen vorhanden waren, wurde jeweils nur die LMK mit hohem Wasseranteil angesetzt und als Kontrolle verwendet.

#### 2.4.1 Therapieansatz und Pipettierschema

Die für jedes Patientengewebe und je nach Zellzahl individuelle Therapieansätze wurden ebenfalls gemäß Standardarbeitsanweisung (SOP) durchgeführt, um valide und vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Es wurde stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet und es wurden die notwendigen Schutzvorschriften beim Arbeiten mit toxischen Zytostatika eingehalten. Die Ansätze und Pipettierschemata für den ATP Assay und die FACS Analyse unterscheiden sich und werden deshalb separat in den nächsten Abschnitten erklärt.

#### 2.4.2 Schema für ATP Assay

Der standardisierte Therapieansatz für den ATP Assay beinhaltete die Therapieoptionen FO, FI, FOC und FIC sowie eine Medium- und Lösungsmittelkontrolle für beide Gruppen, Sphäroide alleine (S-Only) und PBMCs alleine (P-Only). Je nach verfügbarer Zellzahl wurden Triplikate bis sechs-fach Replikate pro Therapie durchgeführt. Es musste ebenfalls eine Platte mit TM/4 ohne Zellen pro Well angelegt werden, die als Negativ Kontrolle im ATP Assay (Blank Kontrolle) genutzt wurde. Die Therapiedauer wurde auf 72 Stunden angesetzt.

#### 2.4.3 Schema für FACS Analyse

Bei der FACS Analyse wurde in den meisten Fällen eine Doppelbestimmung durchgeführt. Jeder Ansatz wurde aus mindestens sechs Sphäroiden pro Therapie und 6-12 Sphäroide pro Kontrolle zusammengesetzt und bestand bei Vorhandensein von autologen PBMCs aus S+P Platten (n= 23). Zusätzlich wurden weitere Sphäroide für eine

untherapierte S-Only und/oder P-Only Bestimmung angesetzt, falls genügend Zellen aus dem Tumorgewebe gewonnen werden konnten. Diese wurden verwendet, um quantitative und qualitative Angaben zu den nicht therapierten Sphäroiden machen zu können. Patientenproben, bei denen keine autologen PBMCs zur Verfügung standen wurden nach dem gleichen Schema wie S+P therapiert. Es wurde je eine Platte für Messung 1 und 2 verwendet. Eine Platte mit Blank ohne Zellen wurde nicht benötigt. Die FACS Analyse wurde im 100µl Maßstab angesetzt. Es wurden also 100µl Therapie pro Well hinzugegeben, woraus sich ein Gesamtvolumen von 200µl pro Well ergab. Die Therapiensätze wurden analog zum ATP Assay berechnet und hergestellt. Die Therapiedauer wurde auf 96 Stunden festgelegt.

## 2.5 Analyse mittels ATP Assay

Die Analyse aller Proben wurde mittels CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay von Promega durchgeführt. Die ermittelten Rohdaten wurden in eine Excel-Datei überführt.

### 2.5.1 Durchführung

Das ATP Assay Reagenz (farblose bis leicht gelbliche klare Lösung) wurde nach Angaben des Lieferanten hergestellt. Die therapierten 96-Well Platten wurden zunächst für 30 min äquilibriert. Als nächster Schritt wurde nach Möglichkeit im Dunkeln mittels Multikanalpipette 100µl des Assay Reagenzes in jedes Well pipettiert, um das Verhältnis Wellinhalt: ATP Assay Reagenz von 1: 1 zu erhalten. Vor der zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Platten mit Hilfe eines Schüttlers für 2 min bei 200 rpm geschüttelt. Nach der Inkubation wurde der Wellinhalt gut durchgemischt und für die Lumineszenzmessung wurden 160µl davon in eine geeignete weiße 96-Well Platte mit U- Boden transferiert, luftblasen- und schaumfrei.

Die Messung am ELISA- Reader erfolgte nach den Gebrauchs- und Betriebsanweisungen mit standardisierten Parametern.

Aufgrund seiner zelllinienabhängigen Halbwertszeit sollte die Inkubationsdauer von 2 Stunden nicht überschritten werden, da sonst mit Signalverlust gerechnet werden muss. Als letzter Schritt wurden die Werte des ATP Assays in Excel exportiert und die Ergebnisse anhand einer Standardvorlage berechnet.

## 2.6 Analyse mittels FACS nach Methode 1

Die quantitative Zelltypisierung wurde mittels Durchflusszytometrie am FACS Calibur Gerät von Becton Dickinson nach standardisierter SOP durchgeführt.

Für die Detektion der Epithelzellen wurde ein Antikörper gegen EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule= CD326) eingesetzt. Zur Detektion der Leukozyten wurde CD45 eingesetzt. Für die FACS-Färbung und Auswertung wurden zwei verschiedene jedoch sehr ähnliche Methoden verwendet, die in den nächsten Kapiteln ausführlich erklärt werden. Zur Detektion von Zelltod in den Sphäroiden wurde in Methode 1 Propidium-Iodid (PI) und in Methode 2 TO-PRO-3 Iodid verwendet. Der FACS-Puffer wurde aus 500ml D-PBS, 5ml FCS und 0,1g Natriumazid hergestellt. Um die 10%-ge AB-Serum Lösung herzustellen wurden 9ml D-PBS und 1ml AB-Serum gemischt. Propidium Iodid (PI) ist stark toxisch und wird nur in geringer Konzentration benötigt. Dafür wurden 10µl PI Stocklösung in 50 ml FACS Puffer pipettiert, um auf eine Endkonzentration von 0,2 µg/ml zu kommen.

#### 2.6.1 Antikörper

Für EpCAM wurde als Fluoreszenzmarker APC ausgewählt (Klon EBA-1), der im roten Exzitationslaser (FL4) mit einer maximalen Wellenlänge von 640 nm gemessen wird und sein dazugehöriger Isotyp Antikörper APC-Isotype IgG1 (Klon MOPC-21).

Als Fluoreszenzmarker für CD45 wurde FITC (Klon 2D1) und die dazugehörige Isotyp Kontrolle FITC-Isotype IgG1 (Klon MOPC-21) benutzt. FITC verwendet den blauen Exzitationsleser (FL1) mit einer maximalen Wellenlänge von 488nm.

Die Antikörper wurden gemäß der standardisierten SOP verdünnt und angesetzt. Pro Färbung und Therapie wurden 100µl Antikörper berechnet. Die Isotyp Kontrollen konnten in einem gemeinsamen Tube angesetzt werden. Wichtig für das Gelingen der Färbung war es, die angesetzten Antikörper stets auf Eis und im Dunkeln zu lagern.

#### 2.6.2 Durchführung

Für die Doppelbestimmung wurden je 6 Sphäroide der jeweiligen Therapien in ein 15ml Zentrifugenröhrchen geerntet. Eine Doppelbestimmung war nur möglich, wenn genügend Gewebemenge vorhanden war. Nach einem Waschschrift der 96-Well-Platten mit D-PBS wurden die Röhrchen bei 4° mit 1200rpm für 15 min abzentrifugiert. Die FACS-Färbung wurde in einer 96- Well Spitzbodenplatte durchgeführt. Hierfür wurde das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert und auf die benötigten Kavitäten verteilt.

Nach mehrmaligen Zentrifugations- und Waschschritten wurden die Wells mit den angesetzten AK-Lösungen gemischt und in die zuvor richtig beschrifteten FACS-Röhrchen für die Messung transferiert. Die Proben wurden immer mit PI gemessen. Dazu wurde vor der FACS Messung jeweils 100µl PI zur Probe hinzugegeben (Verhältnis 1:1). Die ungefärbten Proben wurden einmal ohne und einmal mit PI gemessen.

Die detaillierte Beschreibung zur Messung und Kompensation der FACS-Analyse befindet sich aus Übersichtsgründen im Anhang (Kapitel 6.1.4 Seite 126).

## 2.7 Analyse mittels FACS nach Methode 2

12 der 37 FACS Patientenproben wurden nach Methode 2 gefärbt und gemessen. Diese Methode unterscheidet sich von der ersten insofern, dass als Zelltodindikator TO-PRO3 verwendet wurde und Trucount Beads zur absoluten Zellzahlbestimmung in den Röhrchen hinzugegeben wurden. Die Trucount Beads wurden von Becton Dickinson in eigenen Tubes geliefert und gemäß den Fachinformationen verwendet. Die Beads sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff PerCP markiert und strahlen in den FL3 Kanal. Da TO-PRO3 mit dem roten Exzitationslaser angeregt wird, musste in der FACS-Analyse nach Methode 2 ein PE-markierter anti-EpCAM-Antikörper zur Detektion der Epithelzellen verwendet werden.

In Methode 2 werden die Sphäroidernte, die Färbung bzw. Inkubation der Antikörper und die Schritte bis zum Transfer der Zellsuspension in die FACS-Röhrchen in gleicher Weise durchgeführt wie bei Methode 1. In den nächsten Abschnitten werden nur nochmals die Schritte erklärt, die von Methode 1 abweichen. Zunächst wurde eine 1:5 Verdünnung (200µl TO-PRO-3: 1000µl FACS Puffer) durchgeführt und diese Lösung nochmals 100-fach verdünnt, indem 10µl der Vorverdünnungslösung mit 1000µl FACS Puffer gemischt wurden (TO-PRO-3 Stocklösung 1mM).

### 2.7.1 Antikörper

Die Antikörper wurden ebenfalls nach standardisierter SOP berechnet und angesetzt.

### 2.7.2 Durchführung

Die Schritte der Färbung sind identisch zu denen in Methode 1 aufgeführten. Die Trucount beads wurden während der Antikörper Inkubation aus dem Kühlschrank entnommen und auf Raumtemperatur aufgewärmt. Dieser Schritt war wichtig, damit kein Kondenswasser in den Tubes gebildet wurde, welches das lyophilisierte Beadpellet lösen

und damit die Bead Messung verfälschen könnte. Es wurde zusätzlich ein Trucount Tube vorbereitet, der keine Zellen enthielt (Beads only). Dieser wurde für die spätere Kompensationseinstellung im FACS verwendet. Für die Kompensation von EpCAM und CD45 wurden zwei eigene Kontrollen mit Einfachfärbung mit angesetzt, um somit in der dualen (doppelten) Färbung die Wolken richtig zu erfassen. Die detaillierte Beschreibung zur Messung und Kompensation der FACS-Analyse befindet sich aus Übersichtsgründen im Anhang (Kapitel 6.1.5 Seite 127).

## 2.8 Auswertungen

Die Ergebnisse wurden in standardisierten Erhebungsbögen dokumentiert, ausgewertet und von einer zweiten Fachkraft vor Freigabe kontrolliert.

Für die Validierung bzw. Qualitätskontrolle der Tumorproben wurden folgende Parameter verwendet:

- Standzeit der Probe in TM bis zur Aufarbeitung
- Standzeit der Blutprobe bis zur Aufarbeitung
- Art der Lagerung des Blutes bis zur Aufarbeitung
- Aufarbeitungszeit der Tumorprobe
- Gesamte Zellzahl nach Aufarbeitung
- Inkubationszeit und Anzahl der generierten Sphäroide
- Vitalität der Probe nach Aufarbeitung (Trypanblaufärbung)
- Vitalität der Blutprobe nach Aufarbeitung (Trypanblaufärbung)
- Gesamtvitalität aller Zellen (FACS)
- Gesamtanteil, Anteil gefärbter vitaler Zellen, Vitalität der gefärbten Zellen (EpCAM<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup>) im FACS für beide Sphäroidgruppen (S-Only, P-Only)
- durchschnittliche/mediane metabolische Aktivität und durchschnittliche/mediane CPS im ATP für alle beide Subgruppen
- E zu T Ratio (gemessen) im FACS für gesamte und vitale Zellen

Für die Validierungsergebnisse im FACS wurde die tatsächliche Vitalität der Zellen (in %) ausgerechnet, indem die EpCAM und CD45 Dot Plots ohne Gate (alle Zellen, nicht nur vitale Zellen) dargestellt und den Anteil vitaler Zellen durch den Gesamtanteil der Zellen geteilt wurde. Für die Auswertung der Therapieergebnisse im FACS wurden dagegen

die Dot Plots mit Gate verwendet (nur vitale Zellen) um die therapiebedingte Abnahme der vitalen Zellen (in %) bewerten zu können.

### 2.8.1 Auswertung des ATP Assays

Die im Luminometer gemessenen Rohdaten wurden direkt in Excel exportiert und in QM konformen Tabellen eingetragen. Diese Tabellen beinhalteten (jeweils für S-Only und P-Only) die Angaben zu den CPS, die davon abzuziehenden BLANK Werte und die daraus errechnete metabolische Aktivität. Alle Werte wurden mit Standardabweichung angegeben. Um die metabolische Aktivität zu berechnen wurde im ersten Schritt der jeweilige BLANK (in CPS) von der dazugehörigen Wellplatte der Therapie (in CPS) abgezogen. Aus allen Therapie -Blank Werten wurde dann der Mittelwert errechnet. Je nach Menge des Tumorgewebes bzw. der aufgearbeiteten Zellzahl lag die Anzahl der Repeats zwischen drei und sechs Ansätzen. Als letzter Schritt wurde jeder einzelne Therapie-Blank Wert mit dem Mittelwert mal 100 gesetzt (Ergebnis in %). Daraus ergab sich also folgende Formel zur Berechnung der Restaktivität:

$$\text{metab. Zellaktivität in \%} = \frac{(\text{Therapie- Blank in CPS}) \times 100}{\text{Mittelwert aller Repeats (Therapie-Blank in CPS)}}$$

Als Referenzwert für die Therapien wurde die Lösungsmittelkontrolle (LMK) gewählt. TM/4, 5-FU, FO und FI wurden mit (falls vorhanden) LML, FOC und FIC wegen ihrem hohen Gehalt an in Cetuximab gelöstem Wasser mit LMH verrechnet. Somit werden alle in den Ergebnissen beschriebenen Werte in % LMK angegeben.

Nachdem die Daten vollständig in die standardisierten Tabellen eingetragen wurden, war es zusätzlich noch notwendig, mittels Boxplot im SPSS Statistics Programm Ausreißerwerte in der gegebenen Stichprobe (in den jeweiligen Therapiegruppen) zu identifizieren und aus der Auswertung zu eliminieren. Durch die damit durchgeführte Iteration wird die verbleibende Stichprobe (die Werte der Therapieoptionen) besser validiert. Dieser Vorgang wurde für beide Modelle (S-Only und P-Only) durchgeführt.

### 2.8.2 Auswertung der FACS- Analyse nach Methode 1

Im Auswertformular gingen folgende Parameter aus den im FACS gemessenen Rohdaten ein:

- gemessene Zellzahl für EpCAM<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> Zellen
- % Zellzahl IgG1 Isotyp EpCAM<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (vitale Zellen)
- % Zellzahl EpCAM<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (vitale Zellen)
- % Zellzahl IgG1 Isotyp CD45<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (vitale Zellen)
- % Zellzahl CD45<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> (vitale Zellen)
- E (Effektor= CD45): T (Target= EpCAM) Ratio

Nach Abzug der Isotyp Kontrolle von der dazugehörigen EpCAM<sup>+</sup> bzw. CD45<sup>+</sup> Zellzahl wurde analog zur oben beschriebenen Auswertmethode der Mittelwert der Werte berechnet und im Anschluss jeder einzelne Wert mit dem Mittelwert mal 100 gesetzt. Für die Mediumkontrolle TM/4 sowie für ,5-FU, FO und FI wurde die LMK mit geringem Wasseranteil (LML) als Bezug genommen. Für FOC und FIC dagegen wurde die LMK mit hohem Wasseranteil (LMH) als Bezugsgröße verwendet. Wenn nicht genügend Zellen vorhanden waren, wurde nur LMH angesetzt und diese auf alle Therapien bezogen. Aufgrund ungenügender Zellen aus der Tumorprobe wurden in der Regel maximal 2 Repeats für jeden Patienten angesetzt.

Die angewandte Formel für EpCAM<sup>+</sup> - Zellen lautet:

$$\text{vit. Zellen in \% LMK} = \frac{(\% \text{ Zellzahl EpCAM}^+/\text{PI}^- - \% \text{ Zellzahl Isotyp EpCAM}^+/\text{PI}^-) \times 100}{\% \text{ Zellzahl der passenden LMK}}$$

Wenn eine Doppelbestimmung möglich war, wurde aus den beiden Werten der Mittelwert berechnet und dieser für die weitere Auswertung benützt. Diese Formel musste für jede Therapieoption (FO, FOC, FI, FIC) sowie für die Mediumkontrolle TM/4 separat berechnet werden. Für die CD45<sup>+</sup> Zellen wurde analog dazu verfahren. Alle Rohdaten sowie die berechneten Werte wurden in einem dafür angelegten standardisierten Auswertbogen (Excel-Datei) eingetragen und im jeweiligen Patientenordner gespeichert. Die E: T Ratio errechnete sich aus dem Verhältnis % Zellzahl CD45<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>: % Zellzahl EpCAM<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>, wobei T immer auf die Einheitsgröße 1 gerechnet wurde.

### 2.8.3 Auswertung der FACS Analyse nach Methode 2

Im Auswertformular für Methode 2 gingen folgende Parameter aus den im FACS gemessenen Rohdaten ein:

- gemessene Beadzahl (jeweils für Isotyp-Kontrolle und Doppelfärbung)
- Zellzahl vital Isotyp EpCAM<sup>+</sup>
- Zellzahl vital EpCAM<sup>+</sup>
- Zellzahl vital Isotyp CD45<sup>+</sup>
- Zellzahl vital CD45<sup>+</sup>
- **E** (Effektor= CD45) : **T** (Target= EpCAM) Ratio

Auch in dieser Methode wurde im ersten Schritt der Auswertung die Zellzahl der Isotyp-Kontrolle von der dazugehörigen EpCAM<sup>+</sup> bzw. CD45<sup>+</sup> abgezogen und der Mittelwert aus den zwei Repeats (wenn Doppelbestimmung möglich) berechnet. Die Zellzahlen wurden in dieser Methode jedoch mit der Beadzahl verrechnet und in Bezug gesetzt (bei allen Proben bezogen auf 15.000 Zellen). Danach wurde analog zu 2.8.2 vorgegangen.

Die angewandte Formel für EpCAM<sup>+</sup> - Zellen lautet:

$$\text{vitale Zellen in \% LMK} = \frac{(\text{Zellzahl EpCAM}^+ \text{ vital} - \text{Zellzahl vital Isotyp-Kontrolle}) \times 100}{\text{Zellzahl der passenden LMK}}$$

Bei Proben mit einer Doppelbestimmung wurde aus Wert 1 und Wert 2 der Mittelwert berechnet. Diese Formel wurde für alle Werte der verschiedenen Therapieoptionen angewandt. Alle Rohdaten und berechneten Werte wurden in einem standardisierten Auswertbogen (Excel-Datei) eingetragen und im dazugehörigen Patientenordner gespeichert.

## 2.9 Statistische Auswertung

Für alle statistischen Auswertungen wurden je nach Fragestellung mehrere Excel-Dateien aus der oben beschriebenen Datenbank erstellt, die später in SPSS Statistics Version 22.0.0.0 importiert wurden. Vor Ausführung der statistischen Analysen wurden die übertragenen Daten auf ihre Vollständigkeit sowie Richtigkeit überprüft. Für die Korrelation aller wichtigen Merkmale hinsichtlich der Patienten wurde eine entsprechende Masterdatei in SPSS erstellt.

### 2.9.1 Testung auf Normalverteilung

Die intervallskalierten bzw. verhältnisskalierten Merkmale wurden zusätzlich auf Normalverteilung mithilfe des Kolmogorov- Smirnov- Test geprüft und die Ergebnisse als Q-Q-Diagramm dargestellt.

### 2.9.2 Univariate Analyse

Wenn die zu testenden Merkmale normalverteilt waren, wurde bei quantitativen Analysen der T-Test (Vergleich von zwei Gruppen) oder eine einfache Varianzanalyse (Vergleich mehrerer Gruppen) verwendet.

Wenn die Merkmale eine beliebige bzw. nicht normale Verteilung hatten, wurde für quantitativen Analysen der Mann-Whitney-U- Test (Vergleich von zwei Gruppen) bzw. der Kruskal- Wallis-Test beim Vergleich mehrerer Gruppen ausgewählt. Bei multipler Testung zwischen den verschiedenen Therapieansätzen wurde die Bonferroni-Methode zur Korrektur verwendet. Für die Annahme der Nullhypothese wurde das Signifikanzniveau für alle angewandten Tests auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

### 2.9.3 Korrelationsanalyse

Zur Berechnung und Darstellung von Korrelationen zwischen verschiedenen ordinal bzw. nominalskalierten Parametern wurde bei geringer Fallzahl der exakte Test nach Fischer (two-tailed) gewählt die dazugehörigen Kreuztabellen erstellt.

Bei allen verwendeten Testvariablen handelt es sich um unverbundene Variablen.

### 2.9.4 Kaplan-Meier-Kurven

Für die Berechnung der prognostischen Wertigkeit der Patientendaten im Hinblick auf Gesamtüberleben und progressionsfreiem Überleben der 125 Patienten wurden mittels SPSS Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Für die Darstellung der statistischen Signifikanz wurde der Log Rank (Mantel-Cox) -Test als Test auf Gleichheit der Überlebensverteilungen verwendet. Als Ereignis wurde der Tod des Patienten definiert. Das progressionsfreie Überleben bzw. Gesamtüberleben der Patienten wurde als Zeitraum zwischen Tag der OP und Datum des (tumorbedingten) Progressnachweises bzw. Todesdatum festgelegt. Eine Zensierung wurde vorgenommen, sobald keine Überlebensdaten mehr zur Verfügung standen oder es zu einem Loss to Follow-up kam.

Ein Todesereignis innerhalb der ersten vier Wochen nach Operation wurde nicht in die Analyse miteinbezogen.

### 2.9.5 Cox-Regressionsanalyse

Um den gegenseitigen Einfluss von Lebenszeit- Faktoren zu test und gegebenenfalls ihre Signifikanz zu bestätigen, wurde die Cox- Regressionsanalyse in schrittweise vorwärts herangezogen. Auch hier wird der Zeitraum bis zu einem Ereignis („time to event“) zwischen mehreren Gruppen verglichen, um einen Zusammenhang zu beweisen. Diese Faktoren wiederum haben Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten eines bestimmten Ereignisses, die sogenannte Hazard-Ratio. Diese wird ebenfalls mittels Cox- Regressionsanalyse angegeben.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patientenkollektivbeschreibung

Eine generelle Übersicht des Kollektivs der Primärtumoren dieser experimentellen Arbeit – aufgeteilt nach verschiedenen Parametern- ist in der nachstehenden Tabelle aufgeführt.

Parameter	n	Primärtumoren %
<b>Patienten-assozierte Parameter</b>		
Geschlecht	125	
weiblich	49	39,20
männlich	76	60,80
Alter (in Jahren)	125	
Durchschnitt (range)		68,67 (39-88)
Median		70,00
Standardabweichung		11,78
Body Mass Index	106	*
Durchschnitt (range)		26,21 (14,56-39,41)
Standardabweichung		4,30
< 18,5 kg/m <sup>2</sup>	3	2,83
> 18,5 kg/m <sup>2</sup> < 30 kg/m <sup>2</sup>	84	79,25
> 30kg/ m <sup>2</sup>	19	17,92

<b>Tumor-assoziierte Parameter</b>		
Lokalisation	125	
Coecum	18	14,40
Colon ascendens (+ re. Flexur)	34	27,20
Colon transversum	12	9,60
Colon descendens (+ li. Flexur)	7	5,60
Colon sigmoideum	44	35,20
Rectum (> 10 cm ab ano)	10	8,00
Tumorgröße (in cm)	111 *	
Durchschnitt (range)	5,06 (1,7-15,0)	
Median	4,50	
Standardabweichung	2,59	
Histologische Klassifikation	125	
muzinöses Adenokarzinom	5	4,00
Adenokarzinom	116	92,80
medulläres Karzinom	3	2,40
Siegelringzellkarzinom	1	0,80
pT Stadium	125	
1	2	1,60
2	19	15,20
3	81	64,80
4	23	18,40
pN Stadium	125	
0	77	61,60
1	33	26,40
2	15	12,00
cM Stadium	125 *	
0	112	89,60
1	11	8,80
keine Angaben	2	1,60
Grading (G)	125 *	
1	5	4,00
2	103	82,40
3	14	11,20
4	1	0,80
keine Angaben	2	1,60

Gefäßinvasion (V)	125	*	
0		116	92,80
1		6	4,80
keine Angaben		3	2,40
Lymphgefäßinvasion (L)	125	*	
0		95	76,00
1		28	22,40
keine Angaben		2	1,60
Perineuralscheideninvasion (Pn)	125	*	
0		55	44,00
1		7	5,60
keine Angaben		63	50,40
Radikalität der Operation (R)	125		
0		121	96,80
1		2	1,60
2		2	1,6
UICC Stadium	125		
I		19	15,20
II A		42	33,60
II B		7	5,60
II C		8	6,40
III A		4	3,20
III B		25	20,00
III C		9	7,20
IV A		6	4,80
IV B		5	4,00
CEA präoperativ (ng/ml)	125	*	
normal < 3,4		55	44,00
pathologisch > 3,4		43	34,40
keine Angaben		27	21,60
CA 19-9 präoperativ (U/ml)	125	*	
normal < 37		70	56,00
pathologisch > 37		10	8,00
keine Angaben		45	36,00
<b>Behandlungs-assoziierte Parameter</b>			
Operationsverfahren	125		

Hemikolektomie rechts	47	37,60
erweiterte Hemikolektomie rechts	12	9,60
Transversumresektion	4	3,20
Hemikolektomie links	7	5,60
erweiterte Hemikolektomie links	2	1,60
Sigmaresektion	22	17,60
anteriore Sigma/Rectumresektion	21	16,80
tiefe anteriore Rektumresektion	7	5,60
Hartmann-Op	1	0,80
subtotale Kolektomie	2	1,60
Chemotherapie präoperativ	125	
ja	0	0,00
nein	125	100,00
Adjuvante Chemotherapie	125	
UICC Stadium II		
empfohlen	16	12,80
durchgeführt	8	
abgelehnt	8	
UICC Stadium III/ IV		
empfohlen	49	39,20
durchgeführt	43	
abgelehnt	6	
Keine Chemotherapie notwendig	60	48,00
Angewandte Chemotherapie	51	
Xeloda/ 5-FU	15	29,41
Folfox/Xelox	31	60,78
Folfox + Bevazizumab	1	1,96
Folfiri + Bevazizumab	2	3,92
Folfiri + Cetuximab	1	1,96
Xeloda + Bevazizumab	1	1,96

Tab. 7: Patientenkollektivbeschreibung von n=125 CRC Patienten;

\* nicht alle Daten vorhanden

### 3.2 Klinisch-pathologische Daten der Primärtumoren

Die 125 Tumorproben, die aufgearbeitet und analysiert wurden, stammten zu 60,80 % von männlichen und zu 39,20% von weiblichen Patienten, mit einem durchschnittlichen

Alter von 68,67 Jahren (39-88 Jahre). Zusätzlich wurden Gewicht (in kg) und Größe (in m) der Patienten dokumentiert, um den durchschnittlichen den Body Maß Index (BMI) berechnen zu können. Dieser betrug 26,21 kg/m<sup>2</sup> (14,6-37,4kg/m<sup>2</sup>; SD 4,30). Bei 79,25% der Patienten lag der BMI zwischen 18,5 kg/m<sup>2</sup> und 30 kg/m<sup>2</sup>. Er konnte jedoch nur bei 106 Patienten erhoben werden, da die Angaben in den Akten fehlten. Da es Hinweise auf eine prognostische Relevanz hinsichtlich der Tumorlokalisierung gibt, wurde eine detaillierte Einteilung vorgenommen. Demnach befanden sich 51,20 % der Tumore im rechtsseitigen Colon und 48,80 % im linksseitigen Colon. Zum rechtsseitigen Colon wurden Coecum mit 14,40 %, Colon ascendens mit 27,20 % und Colon transversum mit 9,60 % gerechnet. Die Anteile im linksseiteigen Colon setzten sich zusammen aus 5,60 % Colon descendens, 35,20 % Colon sigmoideum und 8,00 % Rectum (> 10 cm ab ano). Zum Colon ascendens bzw. descendens wurde die jeweilige Flexur (rechte bzw. linke Flexur) dazu gezählt.

Alle Angaben zu den folgenden Parametern stammen aus dem pathologischen Institut des Klinikums Großhadern sowie der hausinternen Pathologien der externen Kliniken und wurden gemäß der aktuellen TNM-Klassifikation (siehe Ergänzung Material und Methoden) ausgewertet. Die Tumorgröße betrug durchschnittlich 5,06 cm (n=111) mit einer Standardabweichung von 2,59 cm und war mit den beschriebenen Kollektiven vergleichbar. Es konnten allerdings nicht alle Daten erhoben werden, da in einigen Pathologieberichten die Angaben zur genauen Tumorgröße fehlten.

Wenn man die Histologie der Tumoren betrachtet, wurden 116 Proben (92,80 %) als Adenokarzinome sowie 5 Proben (4,00 %) als muzinöse Adenokarzinome klassifiziert. In drei Proben erwies sich der Tumor als ein medulläres Karzinom und in einem einzelnen Fall als ein Siegelringzellkarzinom.

Ein weiterer ausgewerteter Parameter war der Differenzierungsgrad (Grading) des Tumors bzw. der Tumorzellen nach WHO (siehe Tab. A5 im Anhang Seite 124). Demnach wurden 4,00 % der Patienten als G1, 82,40 % als G2 und 11,20 % als G3 klassifiziert. Nur ein einziger Patient wies einen undifferenzierten Tumor (G4) auf. Über das Grading von zwei Patienten konnten keine Angaben gemacht werden.

Das T-Stadium, welches auf die Infiltrationstiefe des Tumors hinweist, wird in T1 bis T4 unterteilt (für Details siehe Tab. A3 im Anhang Seite 124). Eine Infiltration der Submukosa (T1) konnte in zwei Tumorproben ermittelt werden, eine Infiltration bis zur Muscularis propria (T2) schon in 19 Proben. Die überwiegende Zahl der Proben (64,80 %) wiesen ein T3 Stadium und 18,40 % ein T4 Stadium auf. Letzteres Stadium

weist darauf hin, dass der Tumor bereits benachbarter Organe infiltriert und korreliert mit einer ungünstigen Prognose. Bezüglich der lokoregionären Lymphknoten-Metastasierung (N-Stadium) im Operationspräparat ließen sich in 38,40 % der Patienten Lymphknotenmetastasen nachweisen (n=48). Davon befanden sich 26,40 % im pN1 (<3 LK-Metastasen; n=33) und 12,00 % im pN2 (>3 LK-Metastasen; n=15) Stadium. In 61,60 % der Tumorproben waren keine lokoregionären Lymphknotenmetastasen nachweisbar (pN0 Stadium).

Das klinische M-Stadium gibt Auskunft über das Vorhandensein von Fernmetastasen (meistens in Leber, Lunge und Peritoneum) und konnte bei 123 Patienten evaluiert werden. Zur Diagnosesicherung wurden vor allem die Computertomographie, Magnetresonanztomographie oder invasive Verfahren wie Biopsien verwendet. In manchen Fällen wurden die Metastasen intraoperativ festgestellt und gegebenenfalls behandelt. Bei 89,60 % der Patienten (n=112) waren keine Fernmetastasen auffindbar und 8,80 % der Patienten (n=11) hatten bei Erstdiagnose des Tumors bereits eine klinisch metastasierte Situation (cM1). Somit entspricht die Prozentuale für eine synchrone Metastasierung zum Operationszeitpunkt in unserem Kollektiv ungefähr der international publizierten Kollektive großer Studien [19].

Aus diesen soeben genannten drei Parametern (TNM-Klassifikation) ließ sich das UICC-Stadium ableiten und ergab folgendes Verteilungsmuster: 15,20% befanden sich im UICC I (n=19), 44,80% im UICC II (n= 57), 38 Patienten wiesen UICC III (31,20%) und 11 Patienten einen UICC Stadium IV auf. In der jeweiligen Stadieneinteilung kann man zusätzlich zwischen A, B und C differenzieren (Siehe Ergänzung Material und Methoden). Eine genaue Verteilung kann aus der Tabelle Patientenkollektiv entnommen.

Von großer Bedeutung ist dies vor allem im Stadium II, da es hier um die Entscheidung zur Durchführung einer prophylaktischen adjuvanten Chemotherapie trotz fehlender Lymphknoten- und Fernmetastasierung geht. Dies gilt für UICC Stadien IIB und IIC, da diese Patienten durch verschiedene Faktoren ein erhöhtes Risiko besitzen, im Verlauf Metastasen oder ein Rezidiv zu entwickeln [81]. Diese sogenannten „high risk“ Faktoren sind die Folgenden:

- Tumorinvasionstiefe bis ins Peritoneum viscerale (pT4a) oder in andere Organe (pT4b)
- Tumorperforation bzw. Operation unter Notfallbedingungen
- zu geringe Anzahl an mitentfernten Lymphknoten (< 12)

- Blutgefäßinvasion (V1)
- schlecht differenzierter Tumor (G3-4)
- Perineuralscheideninvasion (Pn1)
- Lymphgefäßinvasion (L1)

In meinem Patientenkollektiv wiesen sieben von den 57 Patienten im UICC II Stadium ein UICC IIB und acht Patienten ein UICC Stadium IIC auf.

Zusätzlich zum TNM bzw. UICC Stadium wurden von der Pathologie noch weitere tumor-assoziierte Parameter erhoben: Die Lymphgefäßinvasion (L-Stadium) weist auf Tumorbefall in den Lymphbahnen an und wurde bei 28 Patienten (22,40 %) gefunden (L1-Status). Die restlichen Patienten (n=95) wiesen ein L0 Status auf. In zwei Fällen konnte der Lymphgefäßstatus nicht erhoben werden. Beim V-Stadium wird der Einbruch des Tumors in das Venensystem nachgewiesen. Im Patientenkollektiv wurde dieser Nachweis in nur sechs Patienten (4,80 %) erbracht. 92,80 % der Patienten befanden sich in einem V0-Stadium und bei zwei Patienten war die Gefäßinvasion nicht beurteilbar. Für die Beurteilung der Perineuralscheideninvasion (Pn-Status) konnten nur eine im Vergleich zum Gesamtkollektiv geringe Fallzahl von n=62 verwendet werden. Der Grund hierfür ist, dass dieser Parameter nicht in allen Kliniken von den Pathologen standardmäßig untersucht wird. Von den 62 untersuchten Patienten wiesen 55 ein Pn0- Stadium und sieben Patienten ein Pn1-Stadium auf. Für die Beurteilung der chirurgischen Intervention diente der Resektionsstatus, auch Radikalität der Operation genannt, und wird in R0 (kein Residualtumor), R1 (mikroskopischer Residualtumor) und R2 (makroskopischer Residualtumor) unterteilt. Der residuelle Tumor reflektiert die Effektivität der Operation, beeinflusst weitere die Folgebehandlung des Patienten und ist somit ein wichtiger Prädiktor für die Prognose. In zwei der 125 Patienten wurde bezogen auf den operierten Primärtumor ein mikroskopischer Tumorrest gefunden. Bei einem Patienten wurde der Tumor aufgrund des Vorhandenseins einer Peritonealkarzinose belassen und eine palliative Behandlung angestrebt (R2).

Für die präoperative Diagnostik wurden bei einigen Patienten zusätzliche die Tumormarker CEA und CA 19-9 bestimmt. In 55 (44,00%) Patienten zeigte sich der CEA-Wert als normwertig (<3,4ng/ml) und in 34,40 % als pathologisch (>3,4ng/ml; n=43). Bei 27 Patienten wurde der CEA-Wert präoperativ nicht abgenommen. Der CA19-9 Wert wurde bei insgesamt 80 Patienten bestimmt. Davon war der Wert in 70 Patienten normal hoch (<37 U/ml) und in nur zehn Patienten pathologisch (>37 U/ml).

Die unterschiedlichen Operationsverfahren wurden entsprechend der Tumorlokalisation ausgewählt. So wurde in 37,60% der Patienten (n=47) eine Hemikolektomie rechts und in 8,8% (n=12) eine erweiterte Hemikolektomie rechts durchgeführt. 2 Patienten (1,60 %) erhielten eine subtotale Kolektomie und vier Patienten eine Transversumresektion (3,20 %). Bei den linksseitigen Tumoren wurden sieben Patienten (5,60 %) einer Hemikolektomie links, 22 Patienten (17,60 %) einer Sigmaresektion und 21 Patienten (16,80%) einer anterioren Sigma-/Rektumresektion unterzogen. Zwei Patienten erhielten eine erweiterte Hemikolektomie links. Eine tiefe anteriore Rektumresektion wurde bei sieben Patienten (5,60%) durchgeführt. Ein Patient erhielt aufgrund seines schlechten Allgemeinzustandes und metastatischer Situation eine Diskontinuitätsoperation nach Hartmann.

Keiner der 125 Patienten erhielt eine neoadjuvante Chemo- oder Radiotherapie.

### 3.2.1 Fotodokumentation der Sphäroide

Zur Dokumentation der Sphäroidbildung sowohl im untherapierten als auch im therapierten Status wurden lichtmikroskopische Bilder der Sphäroide erstellt. Aus Übersichtsgründen werden hier nur einzelne Beispiele aufgeführt.

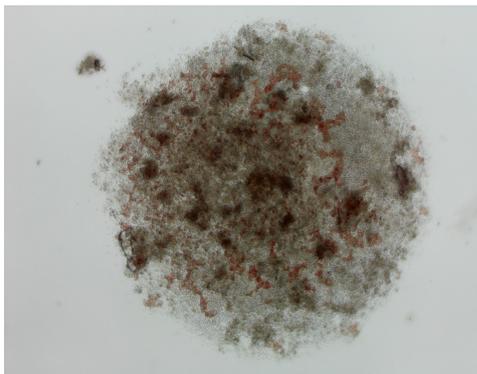


Abb. 2: Pat ID 4941 Therapie TM/4

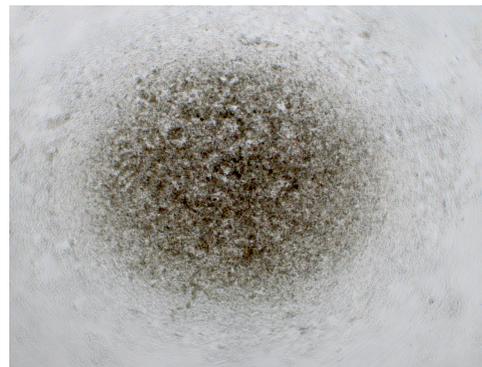


Abb.3: Pat ID 4659 Therapie FIC

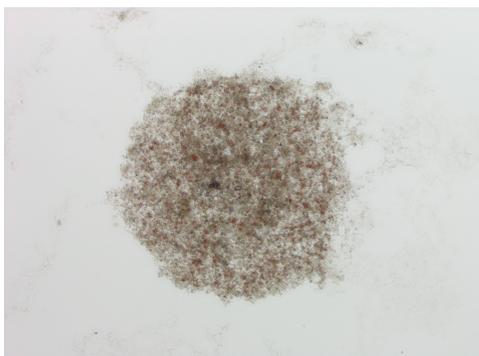


Abb. 2-5: Lichtmikroskopische Begutachtung der Sphäroide (S-Only) mit 4-facher Vergrößerung

### 3.3 Adjuvante Therapie und therapie-assoziiertes Follow-Up

#### 3.3.1 Adjuvante Chemotherapie

Die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie ist laut aktuellen nationalen Leitlinien (S3-Leitlinie 2013 Version 1.0) ab einem UICC Stadium III erforderlich, im UICC Stadium IIB und IIC wie oben beschrieben nur empfohlen. In unserem Kollektiv wurde folglich bei 65 Patienten (52,00%) die Indikation zu einer adjuvanten Chemotherapie gestellt. 48,00 % der Patienten (n=60) erhielten aufgrund ihres UICC Stadiums keine adjuvante Chemotherapie. Von den 15 Patienten im UICC IIB oder IIC willigten sieben einer adjuvanten Chemotherapie ein, acht hingegen lehnten diese trotz ärztlicher Empfehlung ab. Ein Patient wurde mit einem geringgradig differenzierten Siegelringzellkarzinom (G3) zwar als UICC Stadium IIA eingestuft, erhielt jedoch trotzdem eine adjuvante Chemotherapie.

Insgesamt unterzogen sich aus dem genannten Patientenkollektiv 40,80 % (n=51) einer adjuvanten Chemotherapie. Diese bestand bei 31 Patienten (60,78%) aus einem oxaliplatinbasierten Regime (FOLFOX-Schema/Xelox-Schema) und bei 15 Patienten (29,41%) aus einer 5-FU Monotherapie, die entweder oral in Form von Capecitabin (Xeloda) oder als Infusion verabreicht wurde. Aufgrund ihrer fernmetastasierten Situation erhielten drei Patienten eine Kombinationstherapie aus FOLFOX oder FOLFIRI mit einem monoklonalen Antikörper, namentlich Cetuximab (gegen EGF- Rezeptor) bzw. Bevacizumab (gegen VEGF-Rezeptor). Ein weiterer Patient erhielt dagegen die Kombination aus Xeloda mit Bevacizumab. Sechs Patienten im UICC Stadium III/IV entschieden sich gegen die Durchführung einer Chemotherapie bzw. waren aufgrund ihres Allgemeinzustandes nicht in der Lage, eine systemische Therapie zu erhalten.

#### 3.3.2 Unerwünschte Nebenwirkungen unter Chemotherapie

Für die Patienten, die sich einer Chemotherapie unterzogen haben, wurden im Follow-Up die unerwünschten Nebenwirkungen abgefragt und kategorisiert.

Die Tabelle A8 (Anhang Seite 117) zeigt die verschiedenen Toxizitäten sowie die Anzahl der Ereignisse, die in den jeweiligen zytostatischen Therapieschemata auftraten. Jede Zahl steht für ein einzelnes Ereignis und trat entweder alleine oder in Kombination mit anderen unerwünschten Nebenwirkungen auf.

Bezugnehmend auf die Tabelle kann man erkennen, dass auch in diesem Kollektiv die häufigsten Nebenwirkungen hämatologischen oder neurologischen Ursprungs sind, dicht gefolgt von Auswirkungen auf das gastrointestinale System. Diese Nebenwirkungen traten eindeutig häufiger bei Patienten mit einer oxaliplatin-basierten Therapie auf.

### 3.3.3 Klinische Follow-Up Daten

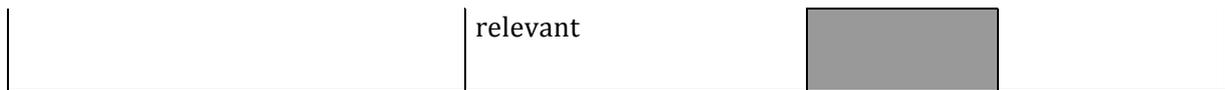
Für die Berechnung des Gesamtüberlebens bzw. des progressionsfreien Überlebens wurde im Durchschnitt ein klinisches Follow-Up von 42,9 Monaten über alle Patienten durchgeführt, wobei der Umfang zwischen 2-69 Monaten liegt. Da sich der Rekrutierungszeitraum zwischen Juli 2011 und Juli 2014 erstreckt, konnte die empfohlene Nachsorge von 5 Jahren durchgeführt werden.

Für das Gesamtüberleben wurde „Tod“ als zu analysierendes Ereignis und der Zeitraum von Operation bis Todestag als Zeitspanne bis zum genannten Ereignis gewählt und berechnet. Analog hierzu wurde für das progressionsfreie Überleben das Ereignis „Tumorprogress“ gewählt und die Zeitspanne zwischen Operationstag und Datum des diagnostizierten Progresses gewählt und in Monaten berechnet. Patienten, die innerhalb der ersten vier Wochen postoperativ oder nicht tumorbedingt verstarben, wurden nicht in die jeweilige Analyse miteinbezogen. Dies war bei drei Patienten der Fall. 18 von 19 Patienten mit einem UICC Stadium I sind nach dem erhobenen Follow-Up noch am Leben bzw. haben keinen Progress erlitten. Ein einzelner Patient ist als Folge einer Niereninsuffizienz verstorben. Im UICC Stadium II haben bereits neun Patienten (15,8 %) Metastasen oder ein Rezidiv entwickelt, acht davon sind nach Abschluss des Follow-Ups verstorben. Ein Patient aus diesem Kollektiv musste für die Erhebung der Überlebensdaten ausgeschlossen werden, da er zwei Tage postoperativ an Herzversagen verstorben ist. Ähnliche Ergebnisse konnten auch im UICC Stadium III gezeigt werden. Hier wurden bei 23,7% der Patienten (n=9) Metastasen bzw. ein Tumorrezidiv im Verlauf der Nachsorge gefunden, sieben dieser Patienten sind bereits verstorben. Allerdings ist ein Patient an einem Fahrradunfall verstorben, somit wird es nicht als tumorbedingtes Versterben kodiert. Die Patienten, die bereits synchrone Metastasen bei der Rekrutierung aufwiesen (n=11) sind mit Ausnahme eines Einzelnen ebenfalls progredient geworden und verstorben (Tab. A9 im Anhang Seite 117).

### 3.3.4 Log-Rank- (Mantel- Cox) -Test für Gesamtüberleben und progressionsfreie Überleben

In Tabelle 8 sind die analysierten Merkmale mit den jeweiligen Signifikanzniveaus für Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS) aufgelistet. Die dazugehörigen Kaplan-Meier- Kurven werden in den folgenden zwei Kapiteln für OS und PFS getrennt aufgezeigt. Es werden aus Übersichtsgründen nur die statistisch signifikanten Merkmale besprochen (grau markiert).

Parameter	Gruppierung	p-value PFS	p-value OS
Geschlecht	m vs. w	0,902	0,811
Alter bei OP in Jahren	</> Median	0,172	0,129
BMI in kg/m <sup>2</sup>	<18,5kg/m <sup>2</sup> >18,5<30kg/m <sup>2</sup> > 30 kg/m <sup>2</sup>	0,332	0,593
Tumordurchmesser in cm	</> Mittelwert	0,161	0,436
Tumorlokalisation im Colon	rechts vs. links	0,766	0,413
Histologie	Adeno vs. andere	0,423	0,874
UICC Stadium gruppiert	1/2 vs. 3/4	0,0001	0,005
T-Stadium gruppiert	1/2 vs. 3 vs. 4	0,008	0,100
N- Stadium gruppiert	0 vs. 1/2	0,0001	0,005
M-Stadium gruppiert	0 vs. 1	0,0001	0,0001
Grading	1/2 vs. 3/4	0,857	0,796
Lymphangiosis carcinomatosa (L)	0 vs. 1	0,001	0,001
Gefäßinvasion (V)	0 vs. 1	0,622	0,438
Perineuralscheideninvasion (Pn)	0 vs. 1	0,0001	0,0001
Radikalität der OP	0 vs. 1/2	0,0001	0,0001
CEA präop.	</> 3,4 ng/ml	0,016	0,038
CA19-9 präop.	</> 37,0 U/ml	0,002	0,001
Chemotherapie	ja vs. nein	0,024	0,101
Chemotherapie	FO vs. 5-FU	0,264	0,247
Leitliniengerechte Therapie	ja vs. nein vs. keine CTX notwendig	0,0001	0,011
Hämatotoxizität	ja vs. nein vs. nicht	0,040	0,119



Tab. 8: Log-Rank Daten bezogen auf Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreie Überleben (PFS)

### 3.3.5 Kaplan-Meier-Kurven

#### a) Gesamtüberleben

Im Hinblick auf das Gesamtüberleben finden sich ein statistischer Zusammenhang für die UICC-Klassifikation, den Nodalstatus sowie der Metastasierung mit  $p= 0,005$ ,  $p= 0,005$  bzw.  $p= 0,0001$ . Die Gefäßinvasion(V) und die Perineuralscheideninvasion (Pn) waren ebenfalls hoch signifikant mit p-Werten von 0,001 bzw. 0,0001, jedoch konnten hier deutlich weniger Fälle für die Analysen bei unvollständiger Patientendaten verwendet werden. Ferner spielt auch die Radikalität der OP für das Gesamtüberleben eine statistisch hoch signifikante Rolle, auch wenn hier nur zwei Patientin im Kollektiv ein R1 bzw. R2 Status hatten ( $p=0,0001$ ). Sowohl für das präoperativ venös abgenommene CEA als auch für das CA 19-9 zeigten sich mit p-Werten von 0,038 und 0,001 deutlich signifikante Zusammenhänge mit dem Überleben der Patienten. Bei dem Merkmal „Chemotherapie“, bei dem ein Vergleich zwischen Patientin mit/ohne sowie abgelehnter Chemotherapie gezogen wurde, zeigte sich nur die Tendenz eines Zusammenhangs mit einem p-Wert von 0,073. Bezüglich des Gesamtüberlebens gab es keinen Unterschied zwischen einer oxaliplatin- und einer 5FU- basierten Chemotherapie. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass das Gesamtüberleben von einer adäquaten Durchführung der leitliniengerechten Therapie abhängig ist. Patienten, bei denen es im Verlauf der Chemotherapie zu einer Dosisreduktion, zu einem Abbruch oder zu einem Wegfallen der Oxaliplatinkomponente gekommen ist bzw. die Chemotherapie komplett abgelehnt haben, zeigen eine schlechteres Gesamtüberleben verglichen zu den Patienten die das Chemotherapier regime eingehalten haben ( $p= 0,011$ ). Die dazugehörigen Kaplan-Meier Kurven befinden sich im Anhang (ab Seite 141).

#### b) Progressionsfreies Überleben

Für das progressionsfreie Überleben erwiesen sich die UICC-Klassifikation, der Tumordurchmesser, der Nodalstatus sowie die Metastasierung als signifikant mit  $p= 0,0001$ ,  $p= 0,008$ ,  $p= 0,0001$  und  $p= 0,0001$ . Je schlechter das UICC- Stadium, desto schlechter das progressionsfreie Überleben. Ebenfalls hoch signifikant waren die

Lymphgefäßinvasion (L) und die Perineuralscheideninvasion (Pn) mit  $p=0,001$  und  $p=0,0001$ . Die Radikalität der OP (R), sowie die präoperativ bestimmten Tumormarker CEA und CA 19-9 erreichten analog zum Gesamtüberleben ein deutliches Signifikanzniveau von  $p=0,0001$ ,  $p=0,016$  und  $p=0,002$ . Allerdings muss auch hier beachtet werden, dass für diese Parameter unvollständige Patientendaten vorliegen und deutlich weniger Proben zur Analyse verwendet werden konnten.

Auch für das progressionsfreie Überleben konnte kein Zusammenhang zwischen Tumorprogress und oxaliplatin –bzw. 5FU-basierter Therapie gezeigt werden. Die Einhaltung einer leitliniengerechten Chemotherapie wirkt sich ebenfalls auf das progressionsfreie Intervall aus. Patienten, die die vorgesehene Chemotherapie nicht komplettieren konnten, haben eine schlechtere Prognose bezüglich des progressionsfreien Überlebens ( $p=0,0001$ ). Die dazugehörigen Kaplan-Meier-Kurven befinden sich im Anhang (ab Seite 141).

### 3.3.6 Das Cox-Regressionsmodell

Um die signifikanten Merkmale auf ihre Unabhängigkeit untereinander zu testen wurde das Cox-Regressionsmodell mittels SPSS verwendet. Hierfür wurden die signifikanten Parameter aus den Kaplan-Meier-Schätzern herangezogen. Die Kodierung erfolgte analog zur Log-Rank-Testung mit 0 und 1, wobei die 0 das Fehlen des Risikos darstellt. Es wurde das progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben getestet. Für die Analyse wurden nur vollständige Datensätze der klinisch-pathologischen Parameter verwendet. Folglich wurden die Merkmale Perineuralscheideninvasion (Pn), das präoperativ gemessene CEA-Wert und CA 19-9 –Wert aus der COX-Regressionsanalyse herausgenommen.

Parameter	Gruppierung	Univariate Analyse (Log-Rank)	Multivariate Analyse (Cox Regression)		
			Exp (B)	Signifikanz	
		PFS p-value	HR	95% KI	p-value
M-Stadium gruppiert	0 vs. 1	0,0001	2,95	1,922- 4,529	0,0001
Lymphangiosis carcinomatosa (L)	0 vs. 1	0,001	-	-	0,175
Radikalität der OP	0 vs. 1/2	0,0001	4,826	1,616- 14,412	0,005
		OS p-value	Exp (B)	Signifikanz	
			HR	95% KI	p-value

N- Stadium gruppiert	0 vs. 1/2	0,005	-	-	0,365
M-Stadium gruppiert	0 vs. 1	0,0001	2,59	1,710- 3,923	0,0001
Lymphangiosis carcinomatosa (L)	0 vs. 1	0,001	-	-	0,264
Radikalität der OP	0 vs. 1/2	0,0001	4,068	1,363-12,138	0,012

Tab. 9: Cox-Regressionsdaten bezogen auf Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreie Überleben (PFS)

Sowohl für das progressionsfreie Intervall als auch für das Gesamtüberleben ist das M-Stadium der stärkste prognostische Faktor, gefolgt von der Radikalität der Operation. Eine Lymphangiosis carcinomatosa, die zunächst als alleiniges Merkmal ein signifikanter Risikofaktor darstellt, kann sich in der multivariaten Analyse nicht als unabhängiger Faktor durchsetzen. Eine lymphatische Metastasierung (pN1) stellt bezogen auf das Gesamtüberleben ebenfalls kein signifikanter unabhängiger Risikofaktor dar.

### 3.3.7 Testung auf Normalverteilung der klinisch-pathologischen Parameter

Für die verhältnisskalierten Parameter der klinisch-pathologischen Daten wurde mittels Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk Testung die Verteilung der Daten bestimmt. Aus den untenstehenden Signifikanzniveaus erkennt man ein nicht normalverteiltes Kollektiv bezüglich der beschriebenen Parameter.

Variablen	n	p-value K-S (2-seitig)	p-value S-W
Alter bei OP (in Jahren)	125	0,053	0,002
BMI	106	0,016	0,031
Tumordurchmesser (in cm)	111	0,0001	0,0001
CEA präop.	98	0,0001	0,0001
CA19-9 präop.	80	0,0001	0,0001

Tab.10: p-Werte für Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk Test der klinisch-pathologischen Parameter

## 3.4 Validierungsergebnisse ATP

### 3.4.1 Allgemeine Labordaten der ATP Patienten

Für den ATP Assay wurden 106 Gewebeproben von kolorektalen Karzinompatienten und 103 entsprechende Blutproben verwendet. Alle in diesem Abschnitt eingehenden

Daten beziehen sich auf diese 106 Proben Sowohl für die Labordaten als auch für die Subgruppenanalysen wurden für alle Therapieoptionen sowie die Kontrollen die Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest durchgeführt. Aus Gründen der Übersicht werden alle Ergebnisse im Anhang (Tabelle A10 auf Seite 118) aufgeführt. Da es sich um beliebig verteilte Daten handelt wurden für die statistischen Auswertungen Tests für nicht normalverteilte Daten verwendet.

Die unten aufgeführte Tabelle zeigt den allgemeinen Zustand der Tumorproben an:

<b>n=106</b>	<b>Standzeit in TM in min*</b>	<b>Standzeit in TM in h</b>	<b>Gewebemenge in mg</b>	<b>vitale Zellen in Mio</b>	<b>Aufarbeitungszeit in min</b>	<b>Menge Liberase in µl</b>	<b>Inkubationszeit (Sphäroide) in h</b>	<b>Therapiedauer in h</b>	<b>Anzahl generierter Sphäroide</b>
<b>MEAN</b>	1470,89	24,25	513,76	20,51	186,97	82,55	47,98	73,16	158,19
<b>MEDIAN</b>	1313,50	21,87	364,00	14,00	190,50	75,00	48,00	72,00	120,00
<b>MIN</b>	85,00	1,42	65,70	0,55	100,00	50,00	45,50	68,00	30,00
<b>MAX</b>	2866,00	47,77	6225,40	135,50	300,00	200,00	55,50	113,00	420,00
<b>STABW</b>	609,49	10,42	644,92	22,97	35,04	36,05	1,44	6,46	101,96

Tab 11: Auswertung verschiedener Qualitätsmerkmale der n=106 Tumorproben für die ATP-Analyse; \* entspricht kalter Ischämiezeit

Die durchschnittliche Standzeit der Gewebeprobe in Transportmedium betrug 1470,89 Minuten (85-2866,00 min; SD 609,49) und wir erhielten im Durchschnitt 513,76 mg Gewebe pro Patient (65-6225,40 mg; SD 644,92). Die mechanische und enzymatische Verdauzeit berechnete sich auf 186,97 min im Durchschnitt (100-300min; SD 35,04). Aus dem aufgearbeiteten Tumorgewebe ließen sich durchschnittlich 20,51 Millionen vitale Zellen isolieren (0,55- 135,50 Mio Zellen). Daraus ergibt sich eine Ausbeute von 3,99 Millionen vitaler Zellen pro 100mg Tumorgewebe. Die Menge an hinzugegebenem Liberase Enzym variierte zwischen 50 und 200 µl je nach Gewebegewicht mit einer Standardabweichung von 36,05. Die Sphäroide wurden im Durchschnitt für 47,98

Stunden inkubiert (45,50-55,50 h; SD 1,44) und für 73,16 Stunden therapiert (68,0-113,0 h; SD 6,46). Die Anzahl der generierten Sphäroide hing von der Zahl vitaler Zellen in der Gewebeprobe ab. Im Durchschnitt wurden 158,19 Sphäroide gebildet (30-420; SD 101,96). Die erste Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung der Proben wurde mittels Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die durchschnittliche vitale Zellzahl betrug 21,16 Millionen Zellen (1,25-135,5 Mio; SD 22,63) und die Vitalität berechnete sich auf 93,04 % (71,47-99,39; SD 4,32). Somit befanden sich alle Proben oberhalb der 70%-Vitalitätsgrenze und zeigten einen sehr guten Zustand der aufgearbeiteten Zellen.

Für die Beurteilung des Lagerungs- und Vitalitätszustandes der peripheren mononuklearen Blutzellen wurden folgende Daten erhoben:

<b>n= 103</b>	<b>Standzeit in TM in h</b>	<b>Vitale Zellen/ml Blut in Mio</b>	<b>Blutvolumen in ml</b>	<b>Vitalität nach Aufarbeitung in %</b>
<b>MEAN</b>	67,06	1,44	12,67	96,19
<b>MEDIAN</b>	71,92	1,11	13,00	97,07
<b>MIN</b>	0,08	0,05	5	84,92
<b>MAX</b>	122,92	5,91	19	99,68
<b>STABW</b>	22,42	1,19	1,82	3,05

Tab 12: Auswertung verschiedener Qualitätsmerkmale der n=106 Blutproben für die ATP-Analyse

Bezüglich der PBMC Proben galten die gleichen Werte für Inkubationszeit und Therapiedauer wie bei den Tumorproben. 91,5% der Blutproben (n= 97) wurden für die Dauer der Liegezeit (Standzeit bis zur Isolation) bei Raumtemperatur und ruhend gelagert. Nur sechs Proben konnten frisch direkt vor Beginn der Isolation entnommen werden. Bei drei Gewebeproben wurden keine Blutröhrchen mitgeliefert. Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Vitalität der Blutzellen zwischen den bei Raumtemperatur gelagerten und den frischen Blutproben (p=0,232).

Die mittlere Standzeit der Blutröhrchen vor Beginn der Isolation betrug 66,93 Stunden (0,08-122,92h; SD 22,42). Trotz der langen Liegedauer zeigte sich im Durchschnitt eine Vitalität der Blutzellen nach Aufarbeitung von 96,19% bei der Trypanblaufärbung (84,92-99,68%; SD 3,05). Das durchschnittliche Blutvolumen lag bei 12,67ml (5-19ml; SD 1,82). Trotz sehr ähnlicher Blutmengen pro Patient variiert die vitale Zellzahl/ml Blut zwischen 0,05 bis 5,9 Mio Zellen, mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 1,44 Mio und einer Standardabweichung von 1,19 Mio pro ml Blut.

### 3.4.2 Subgruppenergebnisse

Die zwei verschiedenen Testmodelle (Sphäroide alleine und PBMCs alleine) werden jeweils separat als Subgruppen analysiert. Wie bereits im Methodenteil erklärt beziehen sich die Mediumkontrolle (TM/4) sowie alle Therapieoptionen auf die entsprechende Lösungsmittelkontrolle (LMK). Sie werden also als Prozent der LMK angegeben. In diesem Abschnitt des Ergebnisteils wird erstmals die Qualität der Proben und der Auswertungen bezüglich des ATP Assays besprochen. Die Auswirkungen der verschiedenen Chemotherapeutika auf die Gewebeproben werden im zweiten Ergebnisteil evaluiert. Die nächststehende Tabelle gibt einen Überblick über die Anzahl an durchgeführten Analysen für jeden einzelnen Therapieansatz der jeweiligen Sphäroidmodelle. Aufgrund von Pipettierfehlern, Kontaminationen bei der Bebrütung oder zu geringer Anzahl der Sphäroide konnte nicht für jeden Therapieansatz die gesamten ATP-Analysen durchgeführt werden. Für die Sphäroidmodelle wurde im ATP Assay die Grundaktivität aller Proben gemessen und die Durchschnittswerte in der folgenden Tabelle aufgelistet. Diese Grundaktivität wird in Counts per second (CPS) gemessen. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Grundaktivität der Tumorzellen geringer ist als die der Blutproben.

	Sphäroidmodell			PBMC Modell		
	TM/4	LMH	LML	TM/4	LMH	LML
<b>MEAN</b>	19382	18568	25907	179269	205114	234132
<b>MEDIAN</b>	7268	6942	8452	73223	73272	108574
<b>MIN</b>	80	72	99	1260	1532	1263
<b>MAX</b>	243339	210402	257348	1467825	2662120	1628258
<b>STABW</b>	38234	35022	47646	282342	381991	327116

Tab. 13: Grundaktivität der ATP-Proben für TM/4, LMH und LML für beide Subgruppen (in CPS angegeben)

Um die Validität des ATP Assays als Auswertmethode zu verstärken, wurden die Blank-Werte der Platten (keine Zellen, nur TM/4 als Inhalt) hinsichtlich ihrer Grundaktivität ausgewertet. Dabei zeigte sich eine mittlere Stoffwechselaktivität von 21,41 CPS. Die einzelnen Werte variierten von 3,0 bis 153,50 CPS und es ergab sich eine

Standardabweichung von 24,96. Somit konnte bestätigt werden, dass die Stoffwechselaktivität des Transportmediums keine Auswirkung auf die Therapieansätze hat und problemlos als Kontrolle verwendet werden kann. Ferner wurde mithilfe der ermittelten durchschnittlichen Grundaktivität der Zellen und der Zellzahl pro Sphäroid die Grundaktivität jeder Zelle für die Mediumkontrolle aller drei Subgruppen berechnet.

	S-Only TM/4			P-Only TM/4		
	CPS	Zellzahl	CPS/ Zelle	CPS	Zellzahl	CPS/ Zelle
<b>MEAN</b>	19381,72	48746,63	0,40	179268,90	116127,70	1,59
<b>MEDIAN</b>	7267,58	50000	0,15	73223,00	63450	0,82
<b>MIN</b>	80,33	10000	0,01	1260,40	3250	0,08
<b>MAX</b>	243339,00	67000	4,87	1467825,17	711250,0	8,16
<b>STABW</b>	38234,49	7150,31	0,77	282341,73	129386,44	1,69

Tab. 14: durchschnittliche Grundaktivität pro Zelle für TM/4 in beiden Subgruppen(CPS/Zelle)

Es lässt sich folglich zeigen, dass es deutliche Unterschiede bezüglich der Grundaktivität der Zellen in den Subgruppen gibt. In S-Only wurde eine Grundaktivität von nur 0,40 CPS/Zelle im Durchschnitt verzeichnet, während die PBMC-Proben eine durchschnittliche Grundaktivität von 1,59 CPS/Zelle aufzeigen. Es lässt sich also schlussfolgern, dass im Allgemeinen Tumorzellen alleine eine geringere Grundaktivität haben als die PBMCs.

#### 3.4.2.1 Tumorsphäroide alleine (S-Only)

Eine Normalverteilung wurde anhand des Signifikanzniveaus nur bei den Therapieansätzen 5-FU, FI und FIC ( $p \geq 0,05$ ) angenommen. Daraus ergibt sich eine beliebige Verteilung der Daten. Folglich wurden für diese Subgruppe adäquate statistische Tests verwendet (Kruskal-Wallis-Test; Mann-Whitney-U-Test).

Die metabolische Aktivität der Lösungsmittelkontrolle wurde immer auf 100% gerechnet, da sie sich auf seine eigene mittlere Grundaktivität in Counts per seconds (CPS) bezieht. Die Lösungsmittelkontrolle mit hohem Wasseranteil (LMH) wurde bei allen 106 Gewebeproben, die für den ATP Assay benutzt wurden, angesetzt. Es ergab sich eine mittlere Grundaktivität von 18568 CPS (72-210401,67 CPS; SD 35022). Bei 74

von den 106 Gewebeprobe (69,8%) waren genügend Zellen vorhanden, um zusätzlich eine Lösungsmittelkontrolle mit geringem Wasseranteil (LML) zu testen. Dabei variierte die Grundaktivität zwischen 99 und 257348 CPS und es ergab sich eine mittlere Grundaktivität von 25907CPS mit einer Standardabweichung von 47646.

Die mittlere metabolische Aktivität von TM/4 betrug über alle Patienten 100,58 % (61,18-145,51%; SD 14,77). Hinsichtlich der Sphäroidzellzahl wurden im Durchschnitt 48627 Zellen pro Sphäroid (10000-67000 Zellen; SD 7473,78) mit einer durchschnittlichen Grundaktivität von 22823,09 CPS verwendet (80,33-243339,0 CPS; SD 41351,09). Daraus ergibt sich eine mittlere Grundaktivität von 0,47 CPS pro Zelle im Sphäroidmodell (0,01-4,87; SD 0,84). Um eine mögliche Abhängigkeit dieser Grundaktivität von der Standzeit der Gewebeprobe auszuschließen, haben wir die Labordaten mit den ATP-Ergebnissen mittels Regressionsanalyse korreliert (Spearman). Es zeigte sich tatsächlich eine negative Korrelation (siehe Trendlinie im Diagramm) zwischen beiden Parametern (Grundaktivität der Mediumkontrolle in CPS und Standzeit der Gewebeprobe in Minuten) mit einer Signifikanz von  $p= 0,002$ . Dies kann folglich ein Hinweis dafür sein, dass mit Zunahme der Standzeit die Grundaktivität der Tumorzellen, wenn auch nur in geringem Maße, abnimmt. Die mittlere metabolische Aktivität der Zellen hingegen ist nicht beeinträchtigt ( $p=0,189$ ) genauso wenig wie die Gesamtvitalität der Zellen in der Trypanblau-messung ( $p=0,257$ ). Es sollte also in Zukunft auf eine kürzere Standzeit geachtet werden, um allein die Grundaktivität der Tumorprobe nicht zu verschlechtern.

Die folgenden Diagramme zeigen die Abhängigkeiten der Grundaktivität sowie der Vitalität/ Aktivität der Tumorzellen von der Standzeit der Gewebeprobe.

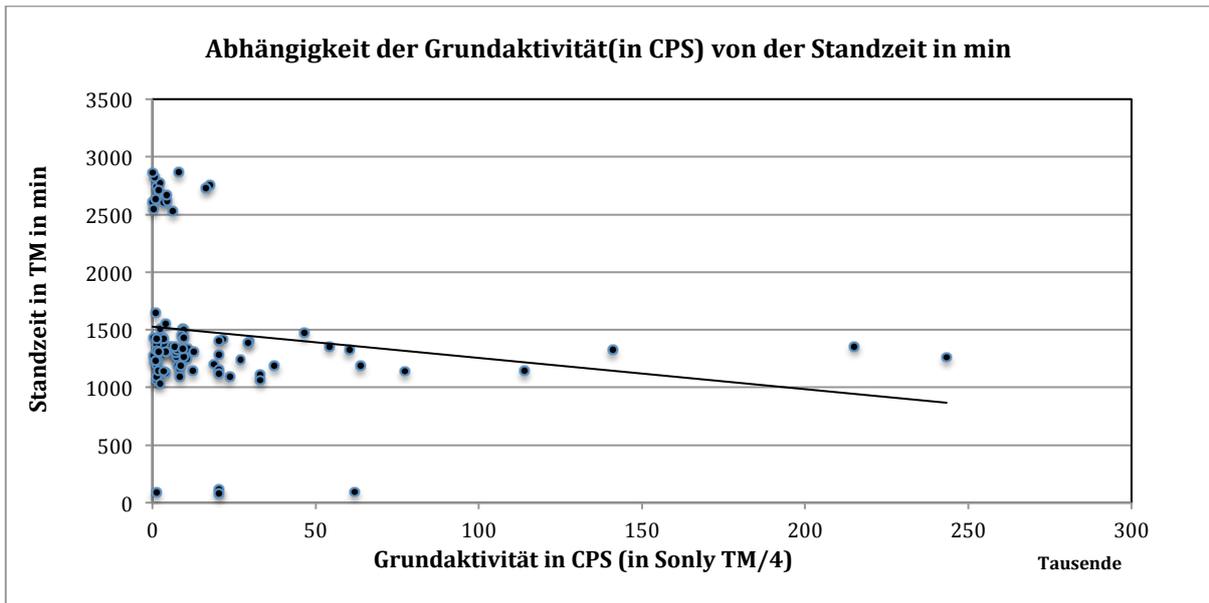


Abb. 6: Abhängigkeit der Grundaktivität (in CPS) von der Standzeit (in min)

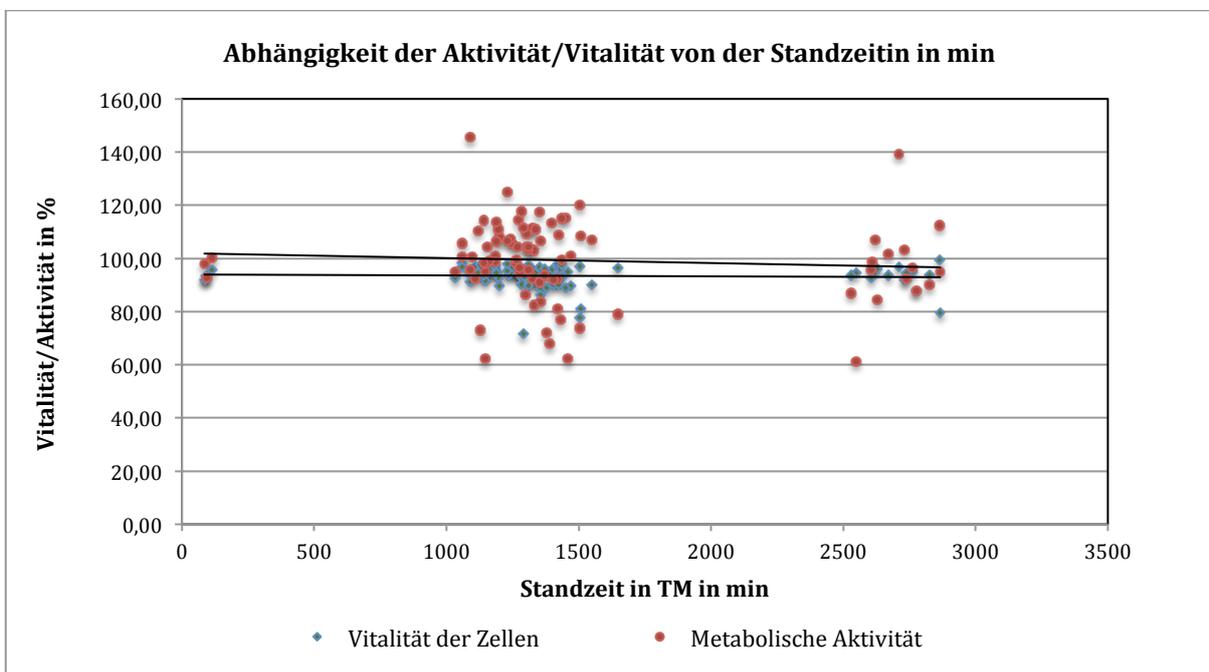


Abb. 7: Abhängigkeit der Aktivität/Vitalität von der Standzeit (in min)

### 3.4.2.2 PBMC-Ansätze alleine (P-Only)

Aus den oben genannten Ergebnissen des Kolmogorov-Smirnov- Anpassungstest ergeben sich ebenfalls beliebig verteilte Daten, da nur für die Therapieansätze 5-FU und FO eine Normalverteilung angenommen werden kann. Folglich werden für die P-only Gruppe die gleichen statistischen Tests verwendet wie für die S-Only Gruppe.

Bezüglich der Datenauswertung für LMH konnten 97,2 % der Blutproben (n= 103) verwendet werden. Die durchschnittliche Grundaktivität der LMH errechnete sich auf 205114 CPS (1532-2662120 CPS; SD 381991) während sie bei LML 234132 CPS betrug (1263-1628258; SD 327116). Für die letztere konnten aufgrund von geringer Zellzahl der Blutprobe nur 71 Proben analysiert werden. Die mittlere metabolische Aktivität für TM/4 war mit 100,33 % (73,78-164,51%; SD 11,3) fast identisch mit der in der S-Only Gruppe. Da die Zellzahl der PBMC-Ansätze abhängig von den gelieferten Mengen an Blutröhrchen war, variierte hier die Zellzahl zwischen 350 und 711250 Zellen pro Ansatz, mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 142553 Zellen (SD 149893).

Die mittlere Stoffwechselaktivität der Mediumkontrolle betrug 179269 CPS (1260-1467825 CPS; SD 282342). Daraus ergab sich eine durchschnittliche Aktivität von 2,01 CPS pro Zelle im PBMC-Modell. Um abhängige Faktoren für die metabolische Restaktivität (in %LMK) und Grundaktivität (in CPS) der P-Only Proben auszuschließen, wurden alle Labordaten mit den ATP Ergebnissen (mittels Regressionsanalyse und bivariate Korrelation nach Spearman) korreliert. Trotz langer Liegezeit der Blutröhrchen wurde die mittlere metabolische Aktivität der PBMCs nicht beeinträchtigt (p= 0,786). Bezüglich der Grundaktivität in CPS lässt sich in der Regressionsanalyse eine signifikante negative Regression mit der Standzeit des Blutes messen (p= 0,004). Daraus ergibt sich, dass die Grundaktivität der PBMCs (in CPS) mit Zunahme der Liegezeit der Blutröhrchen abnimmt. Trotz hoher Vitalität der Blutzellen nach Aufarbeitung muss mit einer Abnahme der Stoffwechselaktivität bei einer Zunahme der Liegedauer dieser Zellen gerechnet werden. Dies gilt auch für die Vitalität der Blutzellen mit einem Signifikanzniveau von p= 0,0001.

Folglich sollten die Blutröhrchen so schnell wie möglich isoliert und in die 96-Well-Platten pipettiert werden, um ihre Grundaktivität und Vitalität nicht zu beeinträchtigen.

Die unten aufgeführten Diagramme zeigen das Verhältnis der Grundaktivität der Blutzellen zur Standzeit der Proben sowie ihre Aktivität/ Vitalität.

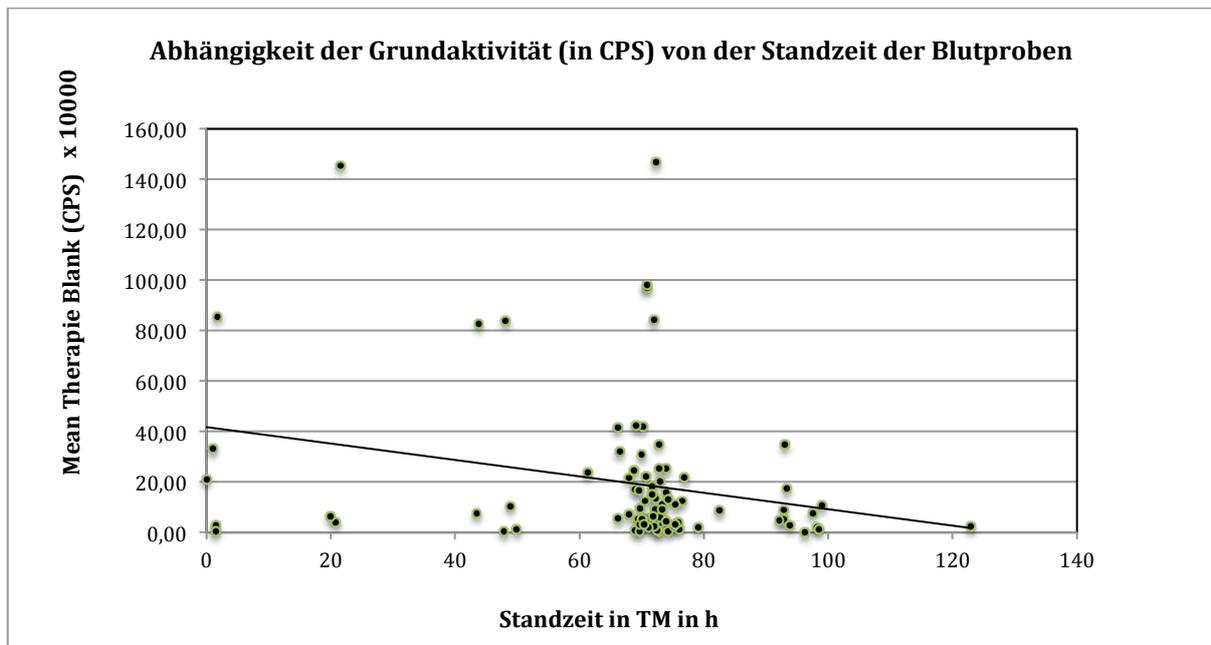


Abb. 8: Abhängigkeit der Grundaktivität (in CPS) von der Standzeit der Blutproben (in h)

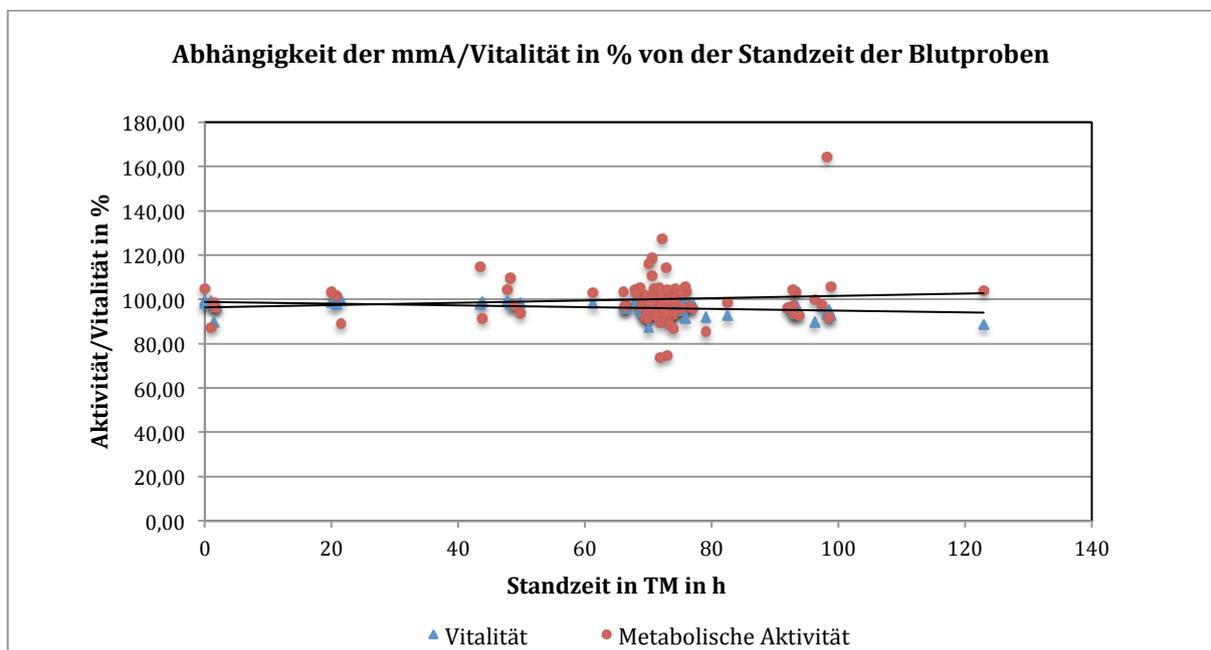


Abb. 9: Abhängigkeit der mMA/Vitalität in % von der Standzeit der Blutproben (in h)

### 3.5 Validierungsergebnisse FACS

#### 3.5.1 Allgemeine Labordaten der FACS Patienten

Für die FACS-Analyse wurden insgesamt 37 Tumorgewebeproben herangezogen, die jedoch nicht in gleichem Maße für alle 3 Subgruppen (S-Only, P-Only und S+P) verwendet werden konnten, da diese Methode aufwendig ist und eine größere Anzahl an Zellen pro Probe erfordert. Somit wurden 14 Proben für das Sphäroidmodell alleine

und 23 Proben für das Sphäroidmodell mit PBMCs verwendet. Unabhängig hiervon wurden 12 Tumorproben zusätzlich für die PBMC-Gruppe benutzt (nicht für Therapieansätze verwendet). Die im nächsten Abschnitt besprochenen Daten sind auf alle 37 Patienten bezogen und sind beliebig verteilt.

<b>n=37</b>	<b>Standzeit in TM in min</b>	<b>Gewebem enge in mg</b>	<b>Aufarbeitun gszeit in min</b>	<b>Menge Liberase in µl</b>	<b>Inkubation szeit in min</b>	<b>Anzahl Sphäroid e</b>
<b>MEAN</b>	1378,97	737,30	205,00	113,51	48,10	302,73
<b>MEDIAN</b>	1208	652,2	205	100	48	300
<b>MIN</b>	770	120,5	120	50	46	98
<b>MAX</b>	2760	2087,5	305	200	55,5	666
<b>STABW</b>	495,32	471,06	43,51	49,16	1,80	113,96

Tab. 15: Auswertung verschiedener Qualitätsmerkmale der n=37 Tumorproben für die FACS-Analyse

Die mittlere Standzeit der 37 Proben in Transportmedium betrug 1378,97 min (22,98 Stunden), wobei sie zwischen 770 und 2760 min variierte (SD 8,26). Die von der Pathologie gelieferte Gewebemenge hing von der Größe des Tumors ab, da nur ein gewisser Anteil an Gewebe für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt werden konnte. Diese errechnete sich auf durchschnittlich 737,30 mg (120,5-2087,5mg; SD 471,06). Je nach Gewebegewicht wurde die entsprechende Menge an Liberase Enzym für den enzymatischen Verdau verwendet. Die durchschnittliche Verdauzeit lag bei 205 min (120-305min; SD 43,51). Dies erforderte im Mittel 113,51 µl Enzym (50-200µl; SD 49,16). Die Anzahl der aus dem Gewebe generierten Sphäroide hing von der vitalen Zellzahl des Gewebestückes ab, die durchschnittlich 26,90 Millionen Zellen betrug (5,83-76,58; SD 17,55). Aus diesen vitalen Zellen wurden im Mittel 302,73 Sphäroide hergestellt (98-666; SD 113,96). Die Liegedauer lag durchschnittlich bei 92,50 % mit einer Standardabweichung von 4,27 (81,14-93,70%).

### 3.5.2 Subgruppenergebnisse

Hier gilt das Gleiche wie unter 3.4.2 erläutert. Die Mediumkontrolle und alle Therapieoptionen beziehen sich auch hier auf die entsprechende LMK und werden in Prozent dieser angegeben. Im nächsten Abschnitt wird die qualitative und quantitative

Analyse der Gewebeproben mittels FACS evaluiert. Es werden jeweils die EpCAM<sup>+</sup> - Zellen und CD45<sup>+</sup> - Zellen separat für die Subgruppen S-Only und S+P betrachtet. Die Auswirkung der Chemotherapeutika auf die beiden Zelltypen wird im zweiten Ergebnisteil besprochen. Die erhobenen Daten beziehen sich auf die nach 96 Stunden Therapieinkubation durchgeführte FACS-Analyse. Folglich sind die Sphäroide ca. 144 Stunden alt. Mittels Kolmogorov-Smirnov sowie Shapiro-Wilk Analyse erfolgte auch in diesem Kollektiv zunächst die Testung auf Normalverteilung. Der Shapiro-Wilk-Test wurde aufgrund der geringeren Fallzahlen zusätzlich durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Subgruppen wurden in einer gemeinsamen Tabelle aufgeführt, die einzelnen Ergebnisse jedoch in den jeweiligen Subgruppenanalysen erläutert. Die Tabellen A17/A18 befinden sich im Anhang auf Seite 129. Auch hier zeigte sich eine beliebige Verteilung der Daten.

#### 3.5.2.1 Sphäroidgruppe alleine (S-Only)

Die Mediumkontrolle sowie die Lösungsmittelkontrolle sind beliebig verteilt für die EpCAM<sup>+</sup> Zellen. Bei den CD45<sup>+</sup> Zellen handelt es sich um normalverteilte Daten. Folglich werden bei statistischen Fragen die Tests für nicht normalverteilte Daten verwendet.

Für die Vitalitätsbestimmungen in der Sphäroidgruppe konnten 35 Gewebeproben herangezogen werden. Die Gesamtvitalität der Zellen (ohne Rücksicht auf die EpCAM bzw. CD45 Färbung) errechnete sich auf 89,74% im Durchschnitt (72,25-97,72%; SD 5,44) und war somit trotz langer Liegezeit (ca. 6 Tage) der Sphäroide sehr gut. Man kann davon ausgehen, dass die Abnahme der vitalen Zellen durch die Gabe der Chemotherapeutika nicht von der langen Liegezeit beeinflusst wird.

Betrachtet man die EpCAM<sup>+</sup> - Zellen, so ergab sich ein durchschnittlicher Gesamtanteil von 48,01 % mit einer Standardabweichung von 17,31. Der Anteil an EpCAM<sup>+</sup>- Zellen zeigte eine Spanne von 11,45 bis 81,30 %, welche repräsentativ für das Kolonkarzinom ist. Die Vitalität dieser Zellen waren ebenfalls mit einem Mittelwert von 94,22% (63,76-99,31%; SD 7,12) hervorragend und zeigte, dass die Zellen keinen Schaden durch die lange Liegezeit davongetragen haben. Für die CD45<sup>+</sup>- Zellen konnten ebenfalls 35 der 37 Gewebeproben verwendet werden und der Gesamtanteil lag mit durchschnittlich 19,82% (1,83- 52,15%; SD 11,73) weit unter dem der EpCAM<sup>+</sup> - Zellen. Die Vitalität der CD45<sup>+</sup> - Zellen ergab ebenfalls einen weitaus niedrigen Mittelwert, nämlich 74,01%, der

zwischen 33,16 und 97,63% variierte (SD 15,16). Aus den oben errechneten Daten ergibt sich für die FACS Proben ein Anteil von durchschnittlich 32,17 %, der weder EpCAM<sup>+</sup> - noch CD45<sup>+</sup> - Zellen enthält. Dieser Anteil kann somit qualitativ nicht erfasst werden, da keine weiteren Marker für die Zelltypisierung verwendet wurden. Dies umfasst Zelltypen wie beispielsweise Fibroblasten, Erythrozyten und Makrophagen, die jedoch für die Fragestellung in dieser Arbeit nicht relevant sind und daher vernachlässigt werden können. Durch die Bestimmung der vitalen Anteile an EpCAM<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> - Zellen konnte nun auch die E: T -Ratio über alle 35 Patienten berechnet werden, um das Verhältnis von Leukozyten zu Epithelzellen im Tumorgewebe zu quantifizieren. Im Sphäroidmodell betrug das vitale E:T- Verhältnis im Durchschnitt nur 0,59:1 mit einem minimalen Anteil von 0,03:1 und einem maximalen Anteil von 4,55:1 (SD 0,78). Die Werte für die Einzelproben sind in Tabelle A11 (Anhang Seite 119) aufgelistet.

### 3.5.2.2 PBMC- Ansätze alleine (P-Only)

In dieser Subgruppe konnten aufgrund von ungenügender Anzahl an Blutzellen nur 12 Gewebeproben verwendet werden. Zwei Proben wurden während ihrer Liegezeit bei Raumtemperatur gerollert, 10 Proben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und nicht bewegt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Vitalität zwischen den beiden Gruppen (exakter Test nach Fischer; two-tailed  $p= 0,558$ ). Analog zu den zuvor analysierten Subgruppen wurden auch hier die Daten zunächst auf Normalverteilung getestet. Die Daten erwiesen sich als normalverteilt. Die Vitalität der kompletten Probe (ohne Rücksicht auf CD45- Färbung) lag bei 81,50% und variierte zwischen 58,79 und 95,91% (SD 11,10). Bezüglich des Anteils an CD45<sup>+</sup>- Zellen in den Proben, wurden sehr hohe Schwankungen beobachtet, die sich zwischen 2,49 und 91,57 % befanden mit einem Durchschnitt von 50,05% (SD 28,49). Dieser Befund bleibt umstritten, da in der Regel der CD45- Marker als Panleukozytenmarker benutzt wird und hier mittels FACS nicht analysiert werden konnte, um welche Zellen es sich in den restlichen Anteilen der Probe handelt (49,95%). Möglicherweise könnte es sich um Debris der Zellen bzw. andere Zellen des hämatopoetischen Systems handeln, die durch den Phicoll Gradienten bei der Aufarbeitung aus den Blutproben entfernt wurden und somit von dem CD45- Marker nicht mehr erfasst werden können. In allen Proben wurde kein Anteil an EpCAM<sup>+</sup> - Zellen gefunden. Die Vitalität der CD45<sup>+</sup> - Zellen errechnete sich nur auf 58,90% mit einer Standardabweichung von 29,46% (11,50-98,98%). Trotz hoher

Vitalität (durchschnittlich 97,57%) nach Isolation (gemessen durch Trypanblaufärbung) sterben ca. die Hälfte der Blutzellen innerhalb von 96 Stunden ab. Wenn man diese gleichen Proben im ATP Assay analysiert zeigt sich keine Veränderung der mittleren metabolischen Aktivität (hier bei 101,14%) und der Grundaktivität in CPS (hier bei 132332,17 CPS) zwischen Proben mit hoher und niedriger Vitalität.

Dies hat zur Folge, dass nur die Hälfte der isolierten PBMCs für die Auswertung des Effektes der Chemotherapeutika auf die Blutzellen berücksichtigt werden kann.

Um einen negativen Einfluss der Standzeit der Proben auf ihre Vitalität nach 96 Stunden auszuschließen wurden folgende Tabelle erstellt:

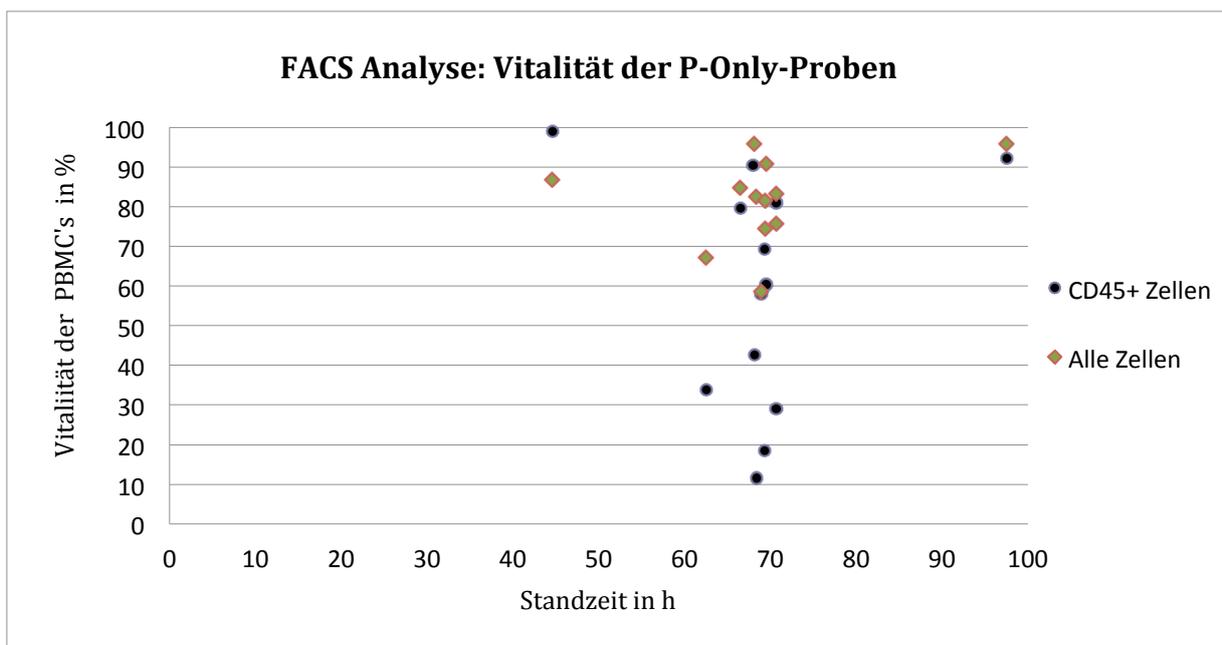


Abb. 10: FACS Analyse: Vitalität der P-Only Proben (in %) in Abhängigkeit der Standzeit (in h)

So wird deutlich, dass die Standzeit der Probe keinen Einfluss auf die Abnahme der vitalen PBMCs hat und diese beiden Faktoren nicht miteinander korrelieren, weder für alle (ungefärbte) Zellen ( $p=0,434$ ) noch für die CD45<sup>+</sup>- Zellen ( $p=0,989$ ).

### 3.5.2.3 Tumorsphäroide mit PBMC-Ansätzen (S+P)

Hinsichtlich der Normalverteilung der Daten ergab die Testung eine beliebige Verteilung der Mediumkontrolle sowie der Lösungsmittelkontrolle für EpCAM<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup> - Zellen. In diesem Modell konnten 22 der 37 Proben für die qualitative und quantitative Analyse herangezogen werden. Die Vitalität aller Zellen lag im Durchschnitt bei 88,27% mit einem minimalen Wert von 78,44 % und einem maximalen Wert von 98,50% sowie einer Standardabweichung von 5,6. Bezüglich der EpCAM<sup>+</sup> - Zellen zeigte sich ein

Gesamtanteil von durchschnittlich 33,85%, wobei der prozentuale Anteil zwischen 6,60% und 76,03% schwankte (SD 20,57). Die mittlere Vitalität von 93,60% war gut vergleichbar mit der in der Sphäroidgruppe (S-Only). Dabei variierten die Werte von 85,14 % bis 98,51 % (SD 4,20). Durch die Zugabe der PBMCs zu den Tumorsphäroiden erzielten wir einen deutlich höheren Gesamtanteil an CD45<sup>+</sup>- Zellen verglichen zur S-Only Gruppe. Dieser lag im Mittel bei 37,85% mit einer Standardabweichung von 12,90 (4,61-55,96%). Die Vitalität der CD45<sup>+</sup> - Zellen errechnete sich auf 86,39% im Durchschnitt (60,94-96,06; SD 8,40) und war besser als in S-Only. Zusammenfassend ergibt sich in diesen Proben ein Anteil von durchschnittlich 28,30 %, in welchem keine EpCAM<sup>+</sup> - oder CD45<sup>+</sup> - Zellen zu finden sind und somit für die Auswertungen nicht herangezogen werden kann. Mit diesen Angaben konnte schließlich die E: T- Ratio errechnet werden. Diese lag bei 1,87:1 im Durchschnitt (0,07-8,29; SD 1,77). Im Gesamten ist somit in dem S+P- Modell der Anteil an Leukozyten höher als der Anteil an Epithelzellen. Im zweiten Abschnitt des Ergebnisteils wird analysiert, ob dieser künstlich erhöhte Überschuss an Leukozyten Auswirkungen auf den Erfolg der Chemotherapeutika hat.

### 3.6 Therapieergebnisse ATP

In diesem Abschnitt meiner Arbeit werden die Therapieergebnisse besprochen, die durch die Anwendung der Chemotherapeutika auf die verschiedenen Modelle erzielt wurden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die beiden Subgruppen (S-Only und P-Only) separat aufgeführt. Für die Auswertungen wurden dieselben standardisierten Excel-Dateien verwendet wie unter 3.4. erläutert. Alle Rohdaten sowie statistischen Analysen wurden zuverlässig von einem zweiten Mitarbeiter überprüft, bevor sie in die Auswertungen eingingen.

#### 3.6.1 Allgemeine Übersicht

Eine allgemeine Übersicht aller Patientenproben in den Subgruppen S-Only und P-Only bietet die untenstehende Graphik. Insgesamt wurden 106 Probenanalysen durchgeführt. Für die S-Only sowie P-Only Gruppe wurden 103 Proben analysiert. Die detaillierte Tabelle A13 mit den jeweiligen Mittelwerten und Medianen sowie die Range und Standardabweichungen befindet sich im Anhang (siehe Seite 121).

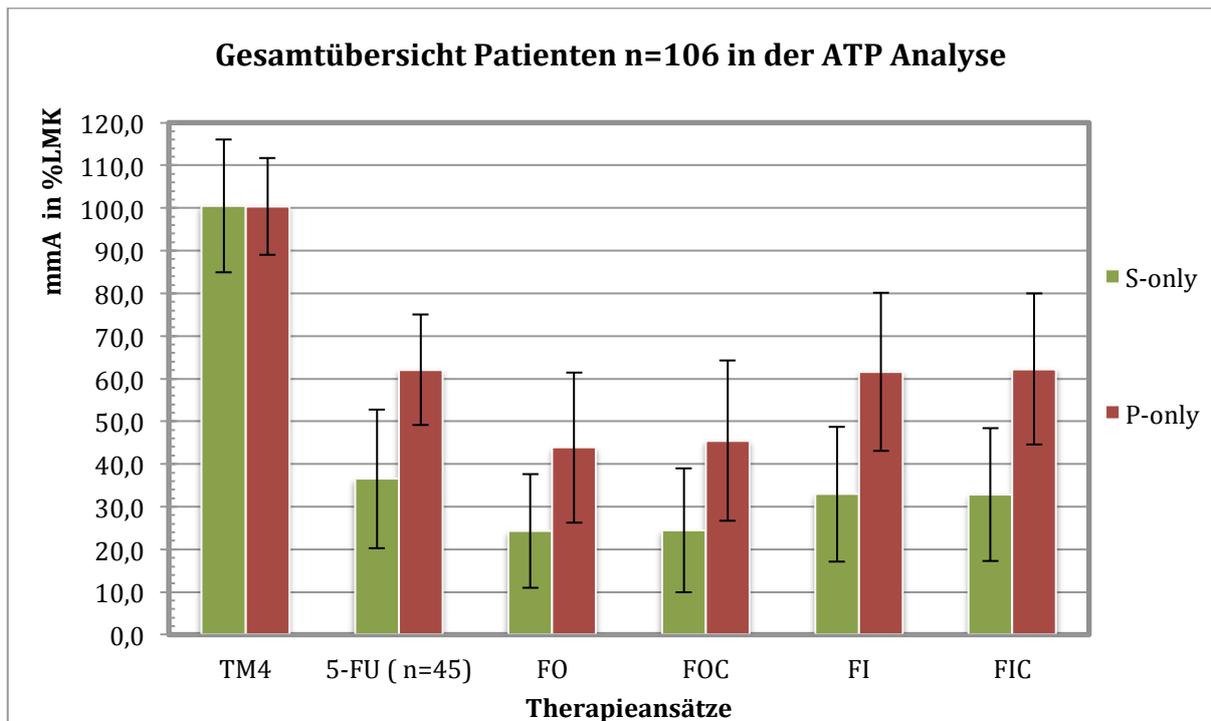


Abb.11: Gesamtanalysen der mma (in % LMK) der Proben für die Modelle S-Only und P-Only

Wie bereits in den Validierungsergebnissen bestätigt, erwiesen sich die unbehandelten (Medium-)kontrollen der Subgruppen als zuverlässiger Maßstab für den Vergleich mit den verschiedenen Therapieoptionen, da sie alle annähernd 100 % der metabolischen Aktivität der LMK entsprechen. Folglich hat die Therapiedauer von 72h keinen negativen Einfluss auf die zelluläre metabolische Aktivität der Mediumkontrolle. Wenn man die verschiedenen Therapien mit der Mediumkontrolle vergleicht, wird der Effekt der Chemotherapeutika auf die metabolische Aktivität der Tumor- und Blutproben ersichtlich. Die statistische Signifikanz zwischen den Therapien und der Mediumkontrolle sowie der Therapien untereinander (innerhalb eines Patienten) werden in den Subgruppenanalysen besprochen. Die relativ hohen Standardabweichungen zeigen, dass es zwischen den Patienten doch beachtliche Unterschiede in der Therapieeffektivität gibt und somit eine individualisierte Betrachtung der einzelnen Patientenergebnisse von großer Bedeutung ist. Folglich werden in den nächsten Abschnitten neben den allgemeinen Ergebnissen (über alle Patienten) zusätzlich einzelne Patienten analysiert. Diese beiden Analysen spielen eine wichtige Rolle, da es um individualisierte Tumorthherapie geht und wir versuchen, eine Methode zu validieren, durch welche die Kombination aus therapeutischem Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil ermöglicht wird und folglich die Entscheidung über eine bestmögliche Therapieempfehlung für den individuellen Patienten getroffen werden

kann. Dabei ist es von großer Bedeutung, die Ergebnisse der Blutproben mit den Tumorproben zu vergleichen.

### 3.6.2 Tumorsphäroide alleine (S-Only)

Die Ergebnisse in diesem Abschnitt der Doktorarbeit zeigen die Effektivität der verschiedenen Chemotherapeutika auf die Epithelzellen der Tumorproben.

#### 3.6.2.1 Vergleich der Mediumkontrolle TM/4 mit Chemotherapien

Im Kruskal-Wallis- Test zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Therapieoptionen mit  $p=0,0001$ . Um eine genauere Aussage treffen zu können wurde mittels Mann-Whitney-U-Test die Mediumkontrolle mit 5-FU, FO, FOC, FI und FIC separat beurteilt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zu entnehmen.

<b>Therapie</b>	<b>mma in %LMK (mean)</b>	<b>Anzahl der analysierten Proben</b>	<b>p-Wert (zweiseitig)</b>
TM/4	100,51	101	
FO	24,26	103	0,0001
TM/4	102,95	43	
5-FU	36,52	45	0,0001
TM/4	100,51	101	
FOC	24,47	103	0,0001
TM/4	100,51	101	
FI	32,92	103	0,0001
TM/4	100,51	101	
FIC	32,82	103	0,0001

Tab 16. Mann-Whitney-U Test der Therapieansätze vs. die Mediumkontrolle (TM/4)

Daraus wird ersichtlich, dass alle Chemotherapeutika eine signifikante Abnahme der metabolischen Restaktivität im Vergleich zur Mediumkontrolle bewirken.

Bezüglich der Therapie mit Cetuximab als Triplette lässt sich sagen, dass es keinen signifikanten Benefit sowohl in Kombination mit Oxaliplatin als auch mit Irinotecan gibt (FO vs. FOC  $p=0,916$ ; FI vs. FIC  $p=0,921$ ). Daher werden in den nächsten Kapiteln nur die Therapien 5-FU (als Monotherapie), FO und FI untereinander verglichen und ausgewertet.

### 3.6.2.2 Vergleich der Therapien FO und FI

Es gibt einen signifikanten Unterschied ( $p= 0,0001$ ) bezüglich der metabolischen Restaktivität zugunsten von FO, wenn man die statistische Analyse über alle getesteten Patienten ( $n= 103$ ) im Sphäroidmodell laufen lässt. Diese beträgt 25,00% bei FO und 33,61% bei FI mit einer Standardabweichung von 13,88 bzw. 16,46. Wenn man jedoch jeden Patienten individuell betrachtet, kann man in vielen Fällen erhebliche Unterschiede in der Wirkung von FO und FI feststellen. In 55,34% ( $n= 57$ ) der Patientenproben war FO mit einer durchschnittlichen metabolischen Restaktivität von 20,36% (SD 11,08) FI überlegen, dessen Restaktivität bei 34,50% (SD 14,27) lag und resultierte somit in einem signifikanten Wirkungsunterschied ( $p=0,0001$ ). Die einzelnen Testergebnisse mit dem jeweiligen Signifikanzniveau werden aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang als Tabelle (Tab. A14 Seite 125) aufgeführt. Auch für diese beiden Therapieschemata haben wir die Ergebnisse aus dem Sphäroidmodell mit denen des PBMC-Modells verglichen. Daraus lassen sich mehrere Aussagen über die Wirkung der Chemotherapeutika treffen. Die unten aufgeführte Graphik stellt die 57 Patientenproben dar, in der die FO-Therapie einer FI Therapie überlegen ist und vergleicht die Ergebnisse im Sphäroidmodell mit den Daten aus dem PBMC-Modell. Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Modellen FO die Therapie mit der niedrigeren metabolischen Restaktivität ist. Es zeigen nur vier Patienten (Batch Nr 4645/5052/5195/5205) im PBMC-Modell eine nicht signifikant stärkere Abnahme der metabolischen Aktivität von FO gegenüber FI (siehe Tab. A14). In den restlichen 53 Proben nimmt die metabolische Aktivität der PBMCs in den mit FO therapierten Proben signifikant mehr ab als in den mit FI therapierten Proben. Folglich weist FO in unserem *in vitro* PBMC-Modell eine höhere Hämatotoxizität auf als FI.

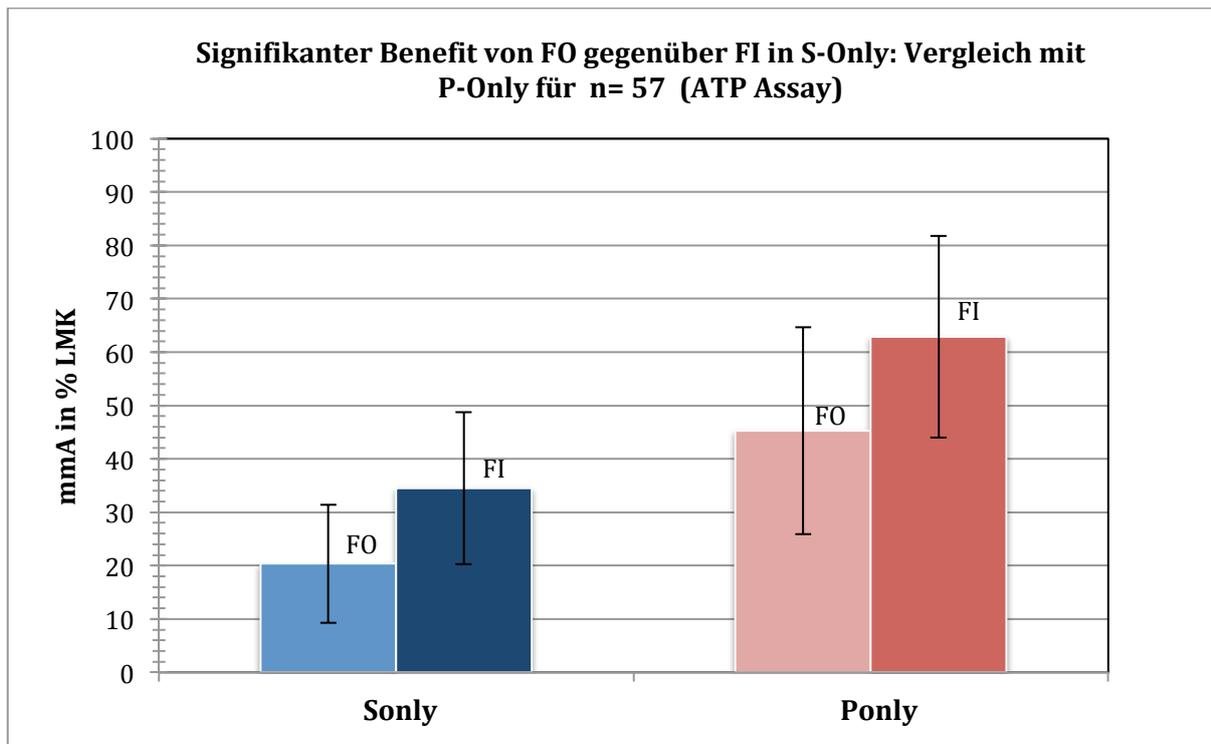


Abb. 12: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und FI bei n=57 Patienten mit signifikantem Benefit von FO über FI in S-Only

Weitere 39 der 103 Patientenproben zeigen in der individuellen statistischen Auswertung keinen signifikanten Vorteil der FO Therapie gegenüber FI mit einer durchschnittlichen metabolischen Aktivität von 31,28% (SD 14,22) bzw. 34,36% (SD 18,18) und einem Signifikanzniveau von  $p=0,469$ .

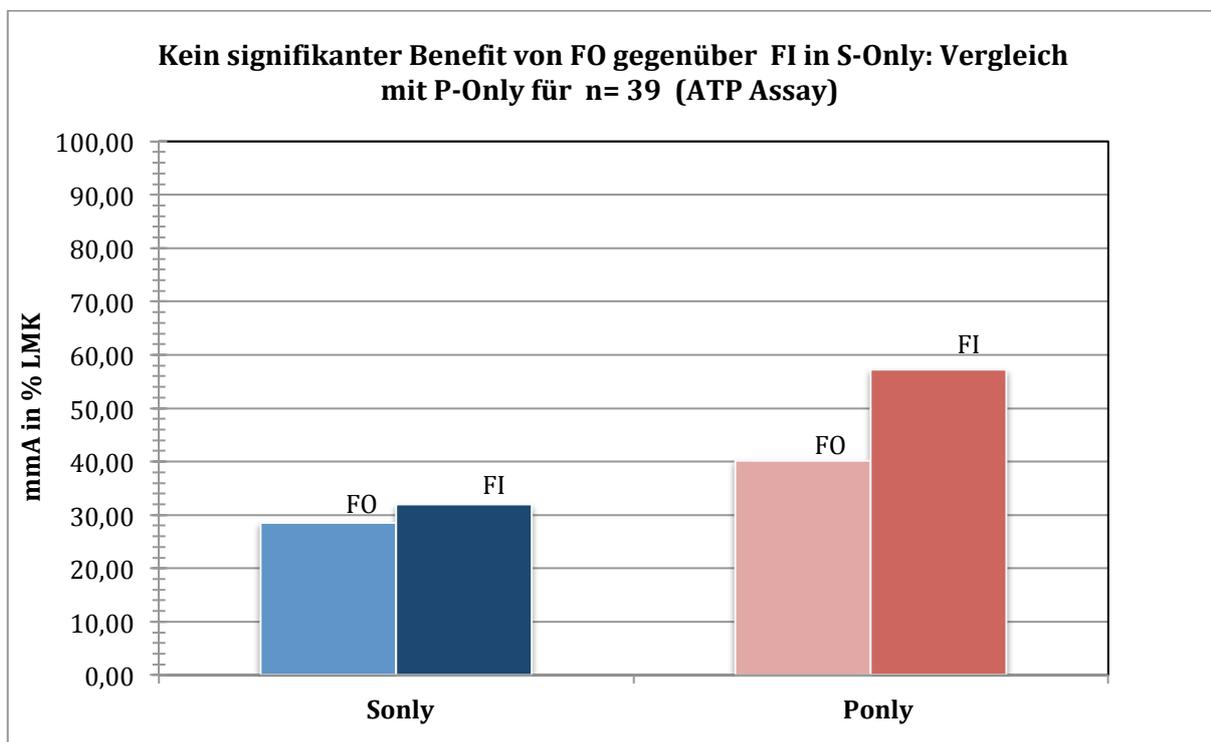


Abb. 13: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und FI bei n=39 Patienten mit gleichem Benefit von FO und FI in S-Only

Die Graphik zeigt die durchschnittliche metabolische Restaktivität der 39 Patientenproben mit gleich guter Wirkung von FO und FI in der S-Only Gruppe und ihre entsprechende Restaktivität in der P-Only Gruppe. Im PBMC-Modell weist die oxaliplatin-basierte Therapie eine höhere Abnahme der metabolischen Aktivität (über alle 39 Patienten) auf. Dies konnte in der statistischen Analyse mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,0001$  bewiesen werden.

In der individuellen Analyse der 39 Blutproben (siehe Tab. A14) wird ersichtlich, dass in 34 von 39 Proben die oxaliplatin-basierte Therapie eine höhere signifikante Abnahme der Restaktivität bewirkt als FI ( $p=0,0001$ ). Die metabolische Restaktivität liegt für FO bei durchschnittlich 41,33% (SD 13,60) gegenüber 58,66 % (SD 14,21) bei FI Therapie. FO zeigt folglich eine stärkere toxische Wirkung auf die hämatopoetischen Zellen als FI. In den restlichen 5 Blutproben gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Abnahme der metabolischen Aktivität von FO im Vergleich zu FI (Batch Nr. 4745/4772/4778/4828/4838).

Ein weiteres kleines Kollektiv von sieben der 103 Patienten zeigte in der individuellen statistischen Analyse eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität zugunsten von FI. Allerdings konnte dieses Ergebnis im Mann-Whitney-U-Test über alle sieben Patienten nicht bestätigt werden ( $p=0,406$ ), da die Fallzahl zu gering und die Standardabweichung zu hoch ist. Folglich müssen auch diese Tumor- bzw. Blutproben in ihrem 3-D-Modell als Einzelfälle betrachtet und ausgewertet werden. Betrachtet man die metabolische Restaktivität im PBMC-Modell, kann man eine höhere Abnahme für die oxaliplatin-basierte Therapie erkennen (FO 38,28 % SD 20,85; FI 56,80% SD 26,31). Trotz höherer Effektivität der FI Therapie gegenüber FO bleibt die metabolische Aktivität bezüglich der Blutzellen höher als die von FO, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Toxizität von FO auf die Blutzellen auch in diesem Kollektiv höher als bei einer Therapie mit FI ist. Auch hier kann aufgrund der geringen Fallzahl und hohen Standardabweichung keine statistische Signifikanz ermittelt werden ( $p=0,150$ ). Die untenstehende Graphik führt die beschriebenen Ergebnisse auf.

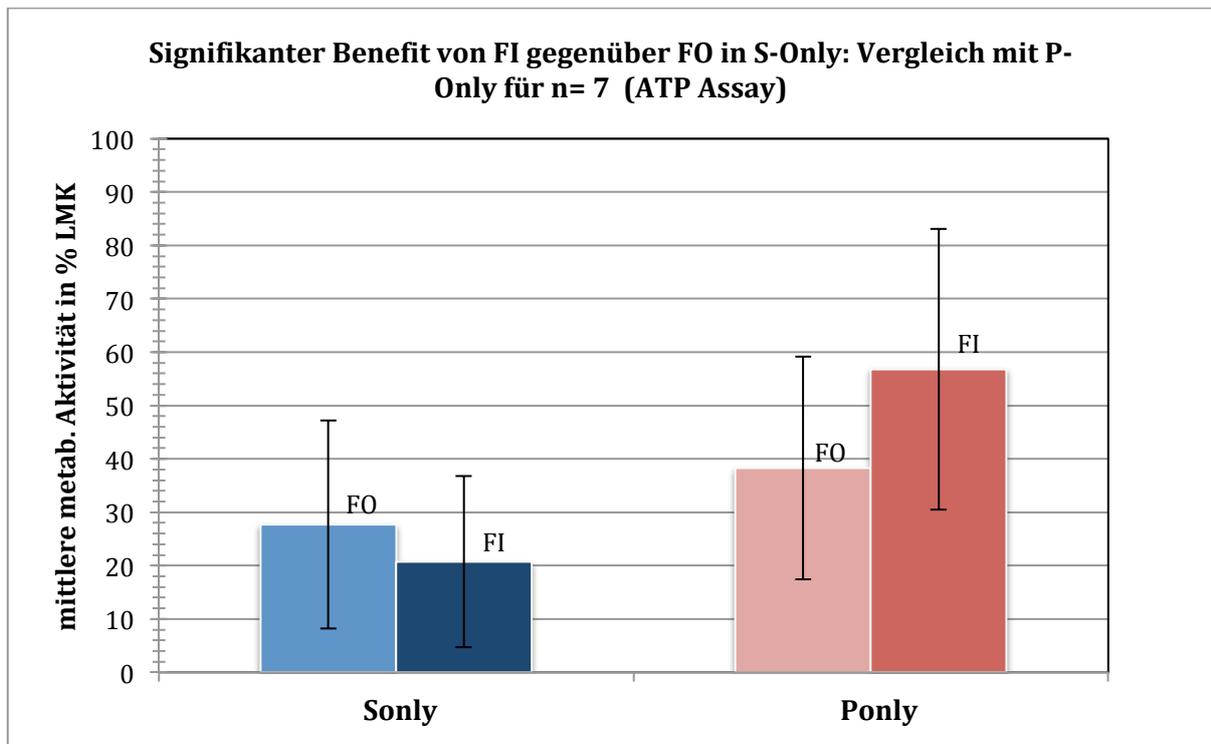


Abb. 14: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und FI bei n=7 Patienten mit signifikantem Benefit von FI über FO in S-Only

### 3.6.2.3 Vergleich der Therapien 5-FU und FO

Bei 45 der 106 Tumorproben wurde das Ansprechen einer 5-FU Monotherapie im Tumorsphäroidmodell getestet und mit FO verglichen. Wenn man diese Proben mit ihrer durchschnittlichen metabolischen Aktivität untereinander vergleicht, bestätigt sich das Ergebnis aus den großen bereits genannten Studien.

Die statistische Analyse ergab über alle Proben in S-Only (n=45) eine signifikant stärkere Abnahme der metabolischen Restaktivität bei FO (5-FU 36,52% FO 23,09%;  $p=0,0001$ ). Wenn man die individuellen Therapieergebnisse der Proben betrachtet, fallen deutliche Unterschiede auf. Die unten aufgeführten Graphiken zeigen die Subgruppenergebnisse der Proben im Sphäroidmodell sowie PBMC-Modell. Somit wird die zytotoxische Wirkung der Chemotherapeutika mit der hämatotoxischen Wirkung auf die Blutzellen verglichen.

In der individuellen Probenanalyse der einzelnen Patienten resultierte FO in 30 von 45 Proben mit einer durchschnittlichen metabolischen Restaktivität von 20,06 %, signifikant effektiver als 5-FU, welches im Durchschnitt eine metabolische Restaktivität von 36,51% aufwies ( $p=0,0001$ ). Die Tabelle mit den einzelnen Testergebnissen mit jeweiligem Signifikanzniveau befindet sich im Anhang (Tab. A15 Seite 125).

Im PBMC-Modell liegt die durchschnittliche metabolische Aktivität der Blutproben von FO bei 42,90% (SD 13,68) und die von 5-FU bei 62,96%(SD 12,00). In allen Proben weist die oxaliplatin-basierte Therapie (FO) im PBMC-Modell (für den jeweiligen gleichen Patienten) eine signifikant niedrigere mittlere metabolische Restaktivität im Vergleich zu 5-FU alleine auf ( $p=0,0001$ ).

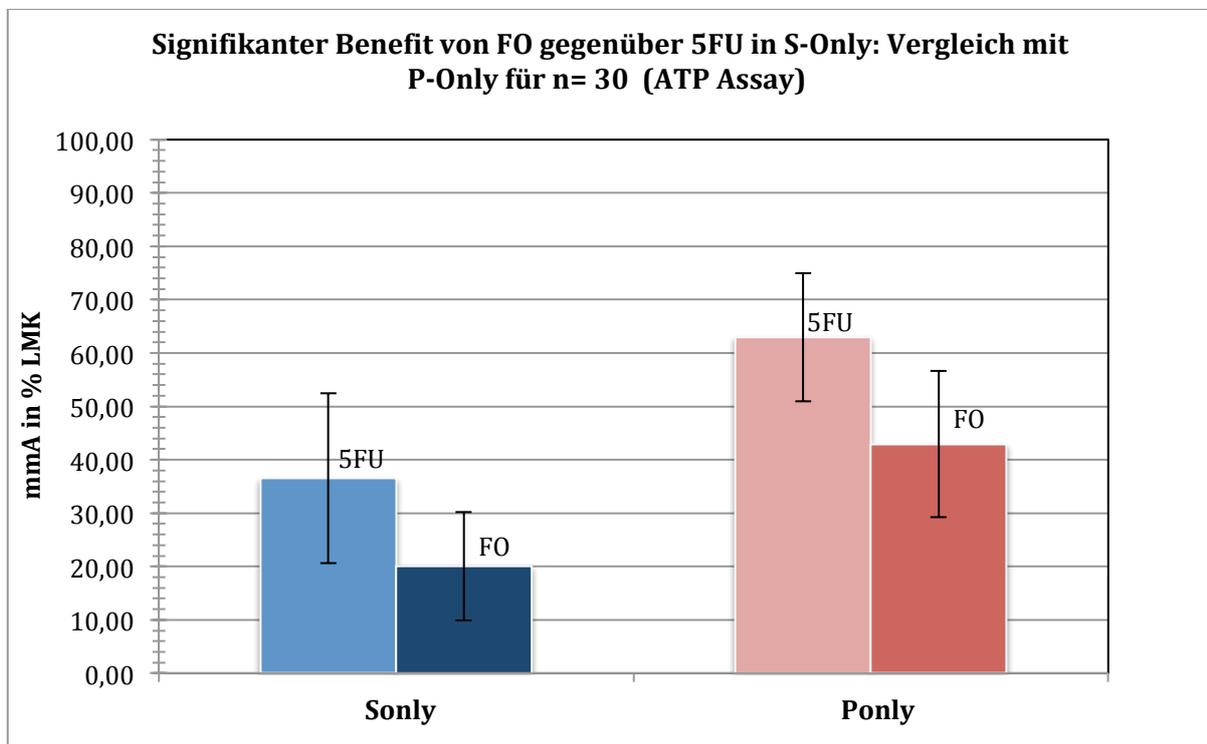


Abb. 15: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und 5-FU bei n=30 Patienten mit signifikanten Benefit von FO über 5-FU in S-Only

Bei den restlichen 15 Tumorproben konnte kein signifikanter Unterschied in der Abnahme der metabolischen Restaktivität zwischen 5-FU und FO festgestellt werden (5-FU 36,47% FO 29,29;  $p=0,191$ ). In der unten aufgeführten Graphik kann die durchschnittlichen metabolischen Restaktivitäten der 15 Patienten für S-Only und P-Only entnommen werden.

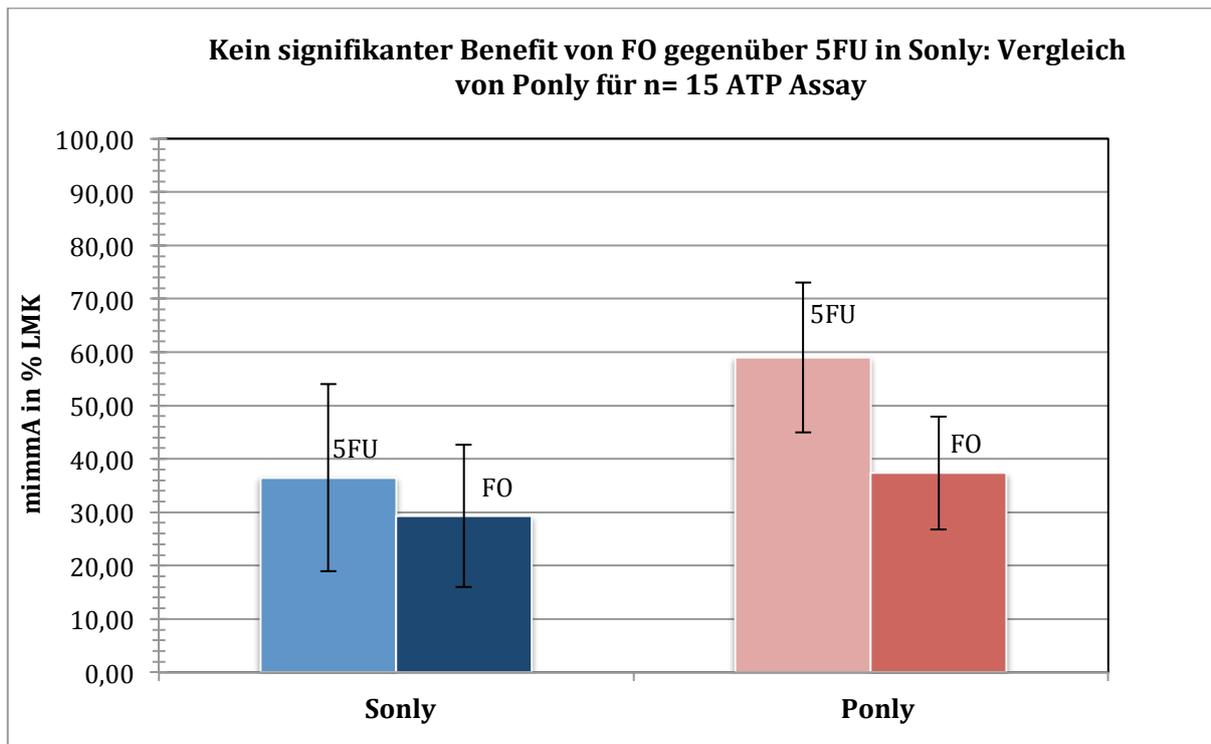


Abb. 16: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und 5-FU bei n=15 Patienten ohne signifikanten Benefit von FO über 5-FU in S-Only

Jede einzelne Probe im PBMC-Modell weist einen signifikanten Wirkungsunterschied zwischen den metabolischen Restaktivitäten von 5-FU und FO auf. Die Tabelle mit den p-Werten befindet sich aus Übersichtsgründen im Anhang (ab Seite 125). Über alle 15 Blutproben zeigt sich ebenfalls eine signifikant stärkere Abnahme der Restaktivität in FO gegenüber 5-FU (5-FU 58,99% FO 37,36%;  $p=0,0001$ ). Betrachtet man nur die PBMC-Sphäroide bezüglich der Abnahme ihrer metabolischen Restaktivität, so zeigt sich in allen 45 Proben eine stärkere Zytotoxizität von FO gegenüber 5-FU (5-FU 62,55% FO 44,04%;  $p=0,0001$ ). Dies weist darauf hin, dass die Oxaliplatin-Komponente einen höheren toxischen Effekt auf die hämatopoetischen Zellen hat.

#### 3.6.2.4 Vergleich der Therapien 5-FU und FI

In unserem 3-D Sphäroidmodell haben wir diese zwei Therapieoptionen FI vs 5-FU ebenfalls in 44 von 106 Patienten getestet. Eine Probe konnte nicht für die statistische Analyse herangezogen werden, da die entsprechenden Werte von FI im Sphäroidmodell fehlen (Batch-Nr. 4894). Es wurde keine Überlegenheit von 5-FU gegenüber FI bezüglich der Abnahme der metabolischen Aktivität nachgewiesen (5-FU 36,52% FI 32,70%;  $p=0,431$ ). Bei der individuellen statistischen Analyse wiesen jedoch 15 von 44 Patientenproben in der S-Only Gruppe eine signifikant höhere Abnahme der

metabolischen Aktivität in FI gegenüber 5-FU auf. Die jeweiligen p-Werte sind in der entsprechenden Tabelle im Anhang zu finden (Tab. A16 Seite 127). Dieses Ergebnis konnte aber nicht beim Vergleich der Mittelwerte über alle 15 Patientenproben bestätigt werden (FI 24,54% SD17,28; 5-FU 34,26% SD 19,17;  $p=0,165$ ). Diese fehlende Signifikanz ist möglicherweise mit der geringen Fallzahl verbunden sowie mit den hohen Standardabweichungen. Trotzdem nehmen wir an, dass die Therapie mit FI in den 15 individuell betrachteten Proben einen stärkeren Effekt auf die Tumorzellen bewirkt als 5-FU. Wir haben auch diese Tumorproben mit den entsprechenden PBMC-Proben verglichen. Die folgende Graphik zeigt, dass die mittlere metabolische Aktivität über alle 15 Blutproben zwischen 5-FU und FI fast identisch ist (5-FU 61,88% SD 13,12; FI 60,76% SD 11,15;  $p= 0,818$ ) und somit keine erhöhte Toxizität von FI nachgewiesen werden konnte.

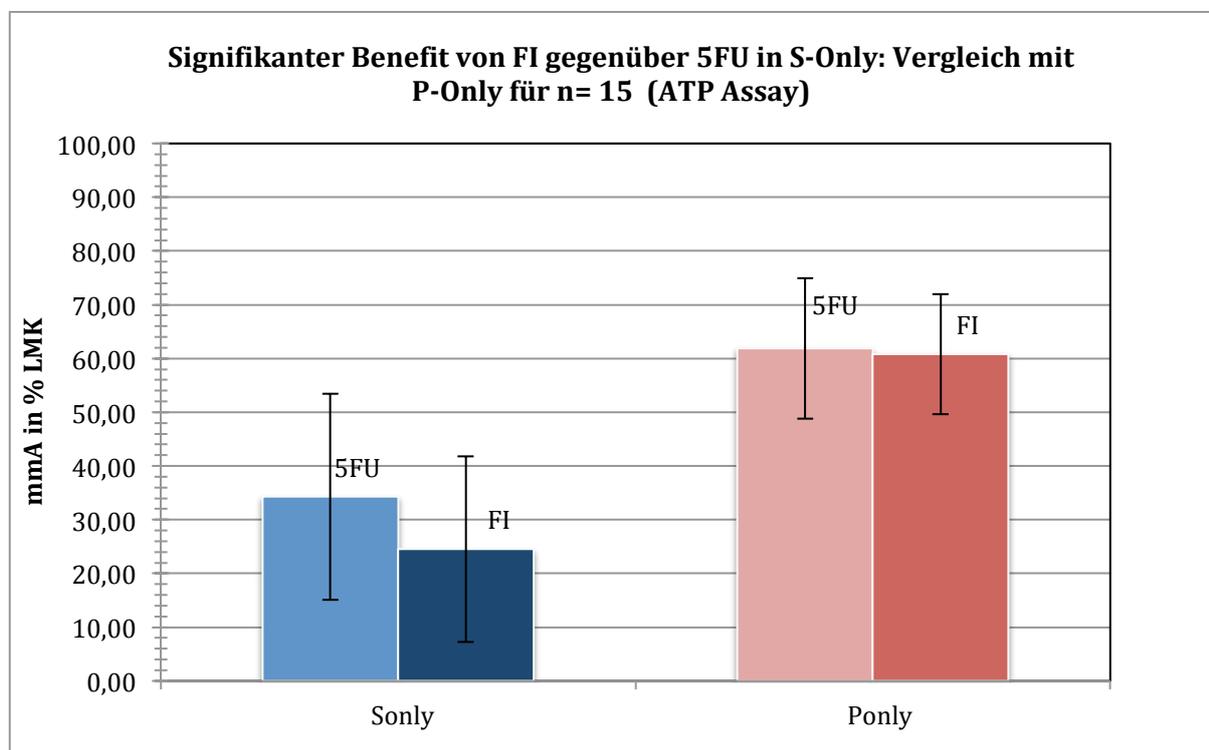


Abb. 17: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FI und 5-FU bei n=15 Patienten mit signifikantem Benefit von F0 über 5-FU in S-Only

Betrachtet man jedoch die Proben individuell, so kann bei fünf Blutproben ein signifikanter Unterschied der metabolischen Aktivität zwischen 5-FU und FI festgestellt werden. In drei dieser Blutproben zeigt FI tatsächlich eine niedrigere Aktivität und somit eine höhere hämatotoxische Wirkung als 5-FU (Batch Nr. 4865/5150/5173). Zwei

Proben weisen eine niedrigere metabolische Aktivität für 5-FU und somit eine höhere Hämatoxizität im Vergleich zu FI auf (Batch Nr. 4915/4946). Bei weiteren 26 der 44 Tumorproben (S-Only) zeigt die 5-FU Monotherapie einen ähnlichen Effekt auf die Tumorzellen wie die FI Therapie und ist damit nicht signifikant besser (5-FU 37,55% SD 14,23; FI 36,59% SD 13,20;  $p=0,817$ ). Die einzelnen p-Werte sind im Anhang in der entsprechenden Tabelle erfasst.

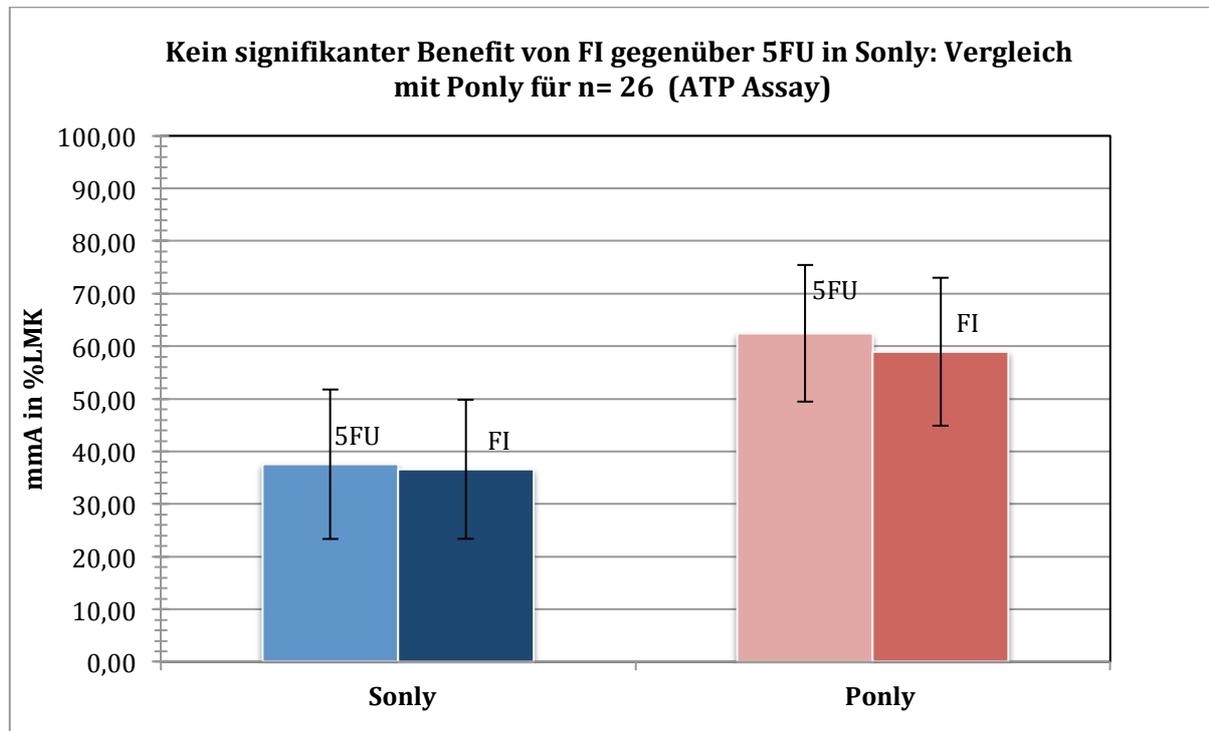


Abb. 18: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FI und 5-FU bei n=26 Patienten ohne signifikanten Benefit von F0 über 5-FU in S-Only

Betrachtet man nun für diese Patienten (n=26) die Ergebnisse in den PBMC-Sphäroiden, so ließen sich folgende Daten erheben: In 14 der 26 Proben (53,85%) zeigt sich ein signifikanter Unterschied in der Abnahme der metabolischen Restaktivität zwischen 5-FU und FI. Dabei handelt es sich bei 11 dieser Proben um eine höhere signifikante Abnahme der Restaktivität von FI (5-FU 64,02% SD 10,32; FI 54,11% SD 9,64 ;  $p=0,023$ ). Bei drei Proben (Batch Nr. 5134/5190/5201) zeigt sich das Gegenteil, nämlich eine höhere Hämatoxizität von 5-FU gegenüber FI bei einer durchschnittlichen metabolischen Aktivität von 58,35% (SD 2,13) für 5-FU und von 64,72% (SD 1,14) für FI. In der statistischen Analyse der Mittelwerte dieser drei Proben lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied erkennen ( $p= 0,513$ ), sodass auch hier eine individuelle

Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Patienten sowohl im Sphäroid- also auch im PBMC-Modell erfolgen muss. In den restlichen 12 Blutproben war kein Unterschied in der Abnahme der metabolischen Aktivität zu erkennen. In weiteren drei von den 44 Tumorproben (S-Only) bei der individuellen Analyse zeigte 5-FU eine signifikant höhere Effektivität gegenüber FI (Batch Nr. 4863/5218/5230). Die einzelnen p-Werte sind im Anhang aufgelistet. Die mittlere metabolische Aktivität dieser Proben beträgt 27,56% für 5-FU (SD 5,04) und 39,72% (SD12,16) für FI. Da es sich nur um ein kleines Kollektiv handelt mit hohen Standardabweichungen, kann über alle drei Proben keine signifikant bessere Effektivität von 5-FU bestätigt werden ( $p=0,275$ ). Auch hier müssen diese Proben individuell betrachtet werden. Im direkten Vergleich mit den entsprechenden drei Blutproben (P-Only) zeigt sich kein Unterschied bezüglich der Toxizität.

### 3.6.3 Das PBMC- Modell

Die Ergebnisse im PBMC-Modell wurden weitgehend im Sphäroidmodell durch den direkten Vergleich besprochen. Es soll im Allgemeinen die Toxizität der Chemotherapeutika auf die peripheren mononukleären Blutzellen getestet sowie signifikante Toxizitätsunterschiede zwischen den Zytostatika gezeigt werden.

In allen fünf direkten Vergleichen der Agenzien mit der Mediumkontrolle zeigt sich ein hochsignifikanter Unterschied in der Abnahme der metabolischen Restaktivität. (siehe Tabelle). Es ist also eindeutig, dass die chemotherapeutischen Agenzien eine negative (toxische) Wirkung auf die peripheren Blutzellen haben.

<b>Therapie</b>	<b>mmA in % LMK (mean)</b>	<b>Anzahl der analysierten Proben</b>	<b>p-Wert (2-seitig)</b>
TM/4 FO	100,41 43,87	99 103	0,0001
TM/4 5-FU	101,73 62,07	42 45	0,0001
TM/4 FOC	100,41 45,47	99 103	0,0001
TM/4 FI	100,41 61,60	99 102	0,0001
TM/4 FIC	100,41 62,25	99 102	0,0001

Tab. 17: Vergleich von TM/4 (mmA in %LMK) mit Therapieansätzen mittels Mann-Whitney-U-Test in P-Only

Analog zum Sphäroidmodell ist auch im PBMC-Modell ein direkter Vergleich der Therapieoptionen untereinander möglich. Alle Proben mit den individuellen Testergebnissen und ihren entsprechenden p-Werten sind im Anhang aufgelistet.

### 3.6.3.1 Vergleich der Therapien FO und FI

Beim Vergleich von FO und FI bezüglich der Toxizität auf die PBMCs wird deutlich, dass die Zugabe von Oxaliplatin die stärkste Wirkung auf die Blutzellen erzielt: 89 von 102 auswertbaren Proben weisen eine stärkere Abnahme der metabolischen Aktivität in FO (42,10 SD 16,49) als in FI auf (62,31% SD 17,98;  $p=0,0001$ ). Nur in weiteren 12 Proben zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen FO und FI (FO 54,16% SD 19,16 FI 59,20% SD 18,96;  $p=0,356$ ). In einer einzelnen Probe scheint FI eine niedrigere metabolische Restaktivität als FO zu haben mit einer Signifikanz von  $p=0,028$  in der individuellen Analyse (FO 70,0% FI 63,0%).

### 3.6.3.2 Vergleich der Therapien 5-FU und FO

Im direkten Vergleich von 5-FU als Monotherapie mit der Kombinationstherapie FO wird deutlich, dass die Zugabe von Oxaliplatin eine stärkere Abnahme der metabolischen Restaktivität bewirkt. Dies gilt für alle 45 Blutproben (5-FU 62,07% SD12,04 FO 41,40% SD12,98;  $p=0,0001$ ).

### 3.6.3.3 Vergleich der Therapien 5-FU und FI

Bei dieser Subgruppenanalyse sind die Ergebnisse der 45 Blutproben im PBMC-Modell heterogener. In 15 der 45 Proben erwies FI eine signifikant höhere Abnahme der metabolischen Aktivität als 5-FU (FI 55,21 SD 9,20 5-FU 65,23% SD 10,64;  $p=0,014$ ).

Bei weiteren 25 Proben konnte kein Vorteil für FI gegenüber 5-FU bewiesen werden, da die mittlere metabolische Restaktivität 60,87% (SD 14,60) für 5-FU bzw. 60,81% (SD 13,88) für FI betrug. In den restlichen fünf Proben (Batch Nr. 4915/4946/5134/5190/5201) hat 5-FU in der individuellen statistischen Analyse eine stärkere Wirkung als FI auf die Blutzellen. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahl lässt sich letzteres Ergebnis in der Analyse über alle fünf Proben nicht bestätigen (5-FU 58,57% SD 10,27 FI 65,71 SD 11,09;  $p=0,347$ ).

### 3.7 Therapieergebnisse FACS

In den nächsten Abschnitten werden die Therapieergebnisse für die bereits beschriebenen 37 Patienten der FACS Analyse besprochen. Die Datenanalysen der beiden Subgruppen S-Only und S+P werden getrennt voneinander beurteilt. Die Tabellen zu den Ergebnissen der Normalverteilung befinden sich aus Übersichtsgründen im Anhang (ab Seite 144).

#### 3.7.1 Sphäroidgruppe alleine (S-Only)

Aus den insgesamt 37 Proben wurden 14 Proben zu Sphäroiden verarbeitet ohne Zugabe von PBMCs. Bei den FACS- Daten handelt es sich sowohl für die EpCAM+ als auch für die CD45+ Zellen um beliebig verteilte Daten, die Tabelle mit den jeweiligen Signifikanzniveaus befindet sich im Anhang (ab Seite 130). Bei der Analyse der EpCAM+ Zellen wurden die Therapieansätze FO und FI mit der entsprechenden Mediumkontrolle verglichen und die (Rest-) Vitalität der Zellen nach Zugabe der Zytostatika gemessen. Im unten aufgeführten Diagramm sind die 14 Patientenproben mit den jeweiligen Therapieansätzen aufgeführt. Die Vitalität der Zellen ist in % der Lösungsmittelkontrolle angegeben. Aus technischen Gründen konnten bei den Proben 4932 und 4941 nicht alle Therapieansätze analysiert werden. Da ausserdem bei drei Proben keine Doppelbestimmung durchgeführt werden konnte, war eine statistische Analyse zur Signifikanzbestimmung nur bedingt durchführbar. Folglich werden diese FACS-Daten überwiegend deskriptiv zusammengefasst. Auch bei der FACS-Analyse wurden FOC und FIC mitgetestet. Da die Zugabe von Cetuximab keine Änderung im Therapieansprechen bewirkt hat, werden aus Übersichtsgründen die beiden Therapieansätze im Diagramm und im Text nicht erfasst. Die einzelnen Ergebnisse für die EpCAM+ sowie CD45+Zellen befinden sich im Anhang (Tab.A20 Seite 131).

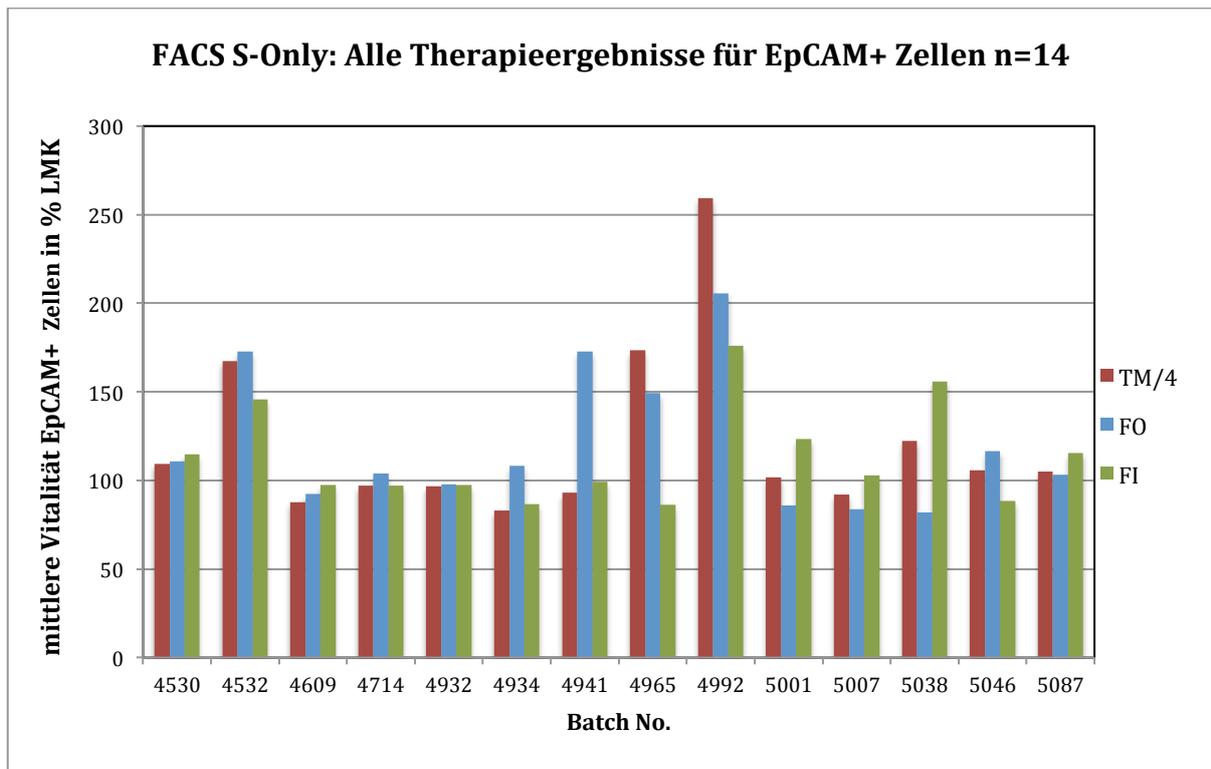


Abb. 19: Mittlere Vitalität in % LMK für EpCAM+ Zellen in der FACS-Analyse für S-Only

Bei der Datenauswertung fällt grundsätzlich auf, dass sowohl die Mediumkontrolle als auch die Proben mit den jeweiligen Zytostatikazusätzen eine hohe Vitalität aufweisen. Im Mittel beträgt die Vitalität der EpCAM+ Zellen über alle 14 Proben für die Mediumkontrolle 121,02% und zeigt eine hohe Standardabweichung (SD 48,35). Die durchschnittlichen Vitalitäten der Proben in den Therapieansätzen für FO und FI liegen nur knapp darunter (siehe Tabelle A24 ab Seite 146 im Anhang). In einigen Proben wurde sogar eine (deutlich) höhere Vitalität gemessen als in ihren entsprechenden Mediumkontrollen (Batch No. 4941, 5001, 5038). Dies könnte darauf hinweisen, dass es in allen Therapielinien zu keinem Ansprechen der Zytostatika gekommen ist und bei individuellen Proben bzw. Therapien eine Zellproliferation stattgefunden hat. Zusätzlich ist aus der Analyse der individuellen Patientenproben im Diagramm zu erkennen, dass nur in einzelnen Proben eine Abnahme der Vitalität im Vergleich zur Mediumkontrolle verzeichnet werden kann. In Probe Nr 4965 scheint die Therapie mit FI eine deutliche Abnahme der Vitalität zu bewirken, auch wenn die Vitalität sowohl der Mediumkontrolle als auch von FO weit über 100% der LMK liegen. In Probe 5038 zeigt FO im Vergleich zur Mediumkontrolle eine Abnahme der Vitalität während FI eine Vitalität von über 150% der LMK aufweist. Diese Beobachtungen können statistisch nicht bestätigt werden. Dies liegt einerseits an der oftmals hohen Standardabweichung

(aufgrund der heterogenen Probenergebnisse) und andererseits an den zu geringen Messreplikaten pro Probe. Die gleiche Datenauswertung wurde für die CD45+ Zellen durchgeführt und in dem unten stehendem Diagramm aufgeführt.

Bei den CD45+ Zellen beträgt die durchschnittliche Vitalität der Mediumkontrolle aller Proben 101,78% mit einer Standardabweichung von 39,01. In nur einer Probe zeigt sich eine deutlich höhere Vitalität (Batch No. 4532), welche auch in den mit Zytostatika therapierten Ansätzen zu beobachten ist. In mehreren Proben kann eine Abnahme der Vitalität von FO und FI im Vergleich zur Mediumkontrolle beobachtet werden (Batch No. 4932,4934,4941,4965). Wenn man diese Proben individuell statistisch analysiert, kann in keiner einzigen eine signifikante Abnahme der Vitalität bestätigt werden. Dies ist vermutlich auf die hohen Standardabweichungen bei den einzelnen Replikaten zurückzuführen. Bei den Proben, bei denen nur eine Messung durchgeführt werden konnte, war keine statistische Auswertung möglich. In den restlichen zehn von 14 aufgezeigten Proben kann man keine Abnahme der Zellvitalität in den CD45+Zellen beobachten. Die genauen Vitalitätsberechnungen können der Tabelle im Anhang (ab Seite 131) entnommen werden.

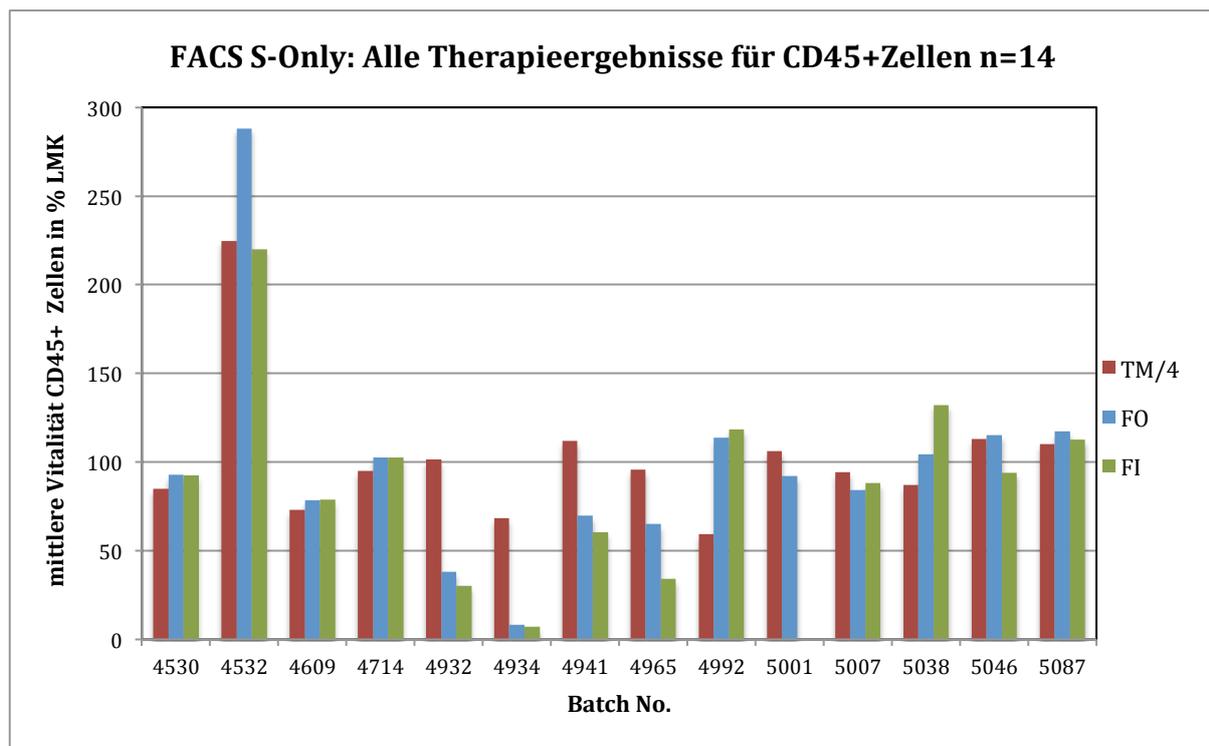


Abb. 20: Mittlere Vitalität in % LMK für CD45+ Zellen in der FACS-Analyse für S-Only

### 3.7.2 Tumorsphäroide und PBMCs (S+P)

Bei den 23 S+P- Proben wurden sowohl für die EpCAM+ Zellen als auch die CD45+ Zellen ähnliche Ergebnisse beobachtet wie bei den S-Only Auswertungen. In einer Probe konnte aus technischen Gründen keine Mediumkontrolle (TM/4) berechnet werden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mediumkontrolle und den jeweiligen Therapieansätzen gezeigt werden. Diese Auswertungen sind in den beiden unten aufgeführten Diagrammen nochmals vereinzelt dargestellt. Bei den EpCAM+ Zellen berechnet sich die durchschnittliche Vitalität der Mediumkontrolle auf 100,25% der LMK (SD 16,01) während die der Therapieansätze FO und FI alle darüber liegen (127,40% bzw. 119,10% LMK). Folglich gehen wir in allen 22 Proben davon aus, dass die Zytostatikatherapie trotz Zugabe von PBMCs nicht zu einer signifikanten Zunahme des Zelltodes geführt hat. Diese Ergebnisse konnten in der statistischen Analyse bestätigt werden. Eine detaillierte Auflistung der p-Werte befindet sich in den entsprechenden Tabellen im Anhang. Für die Probe 4522 konnte keine statistische Analyse aufgrund der fehlenden Replikate durchgeführt werden. In der Probe mit der Batch Nummer 4723 wurde sogar eine knapp 2,5-fache Zunahme der Vitalität in allen Therapieansätzen gegenüber der Mediumkontrolle verzeichnet.

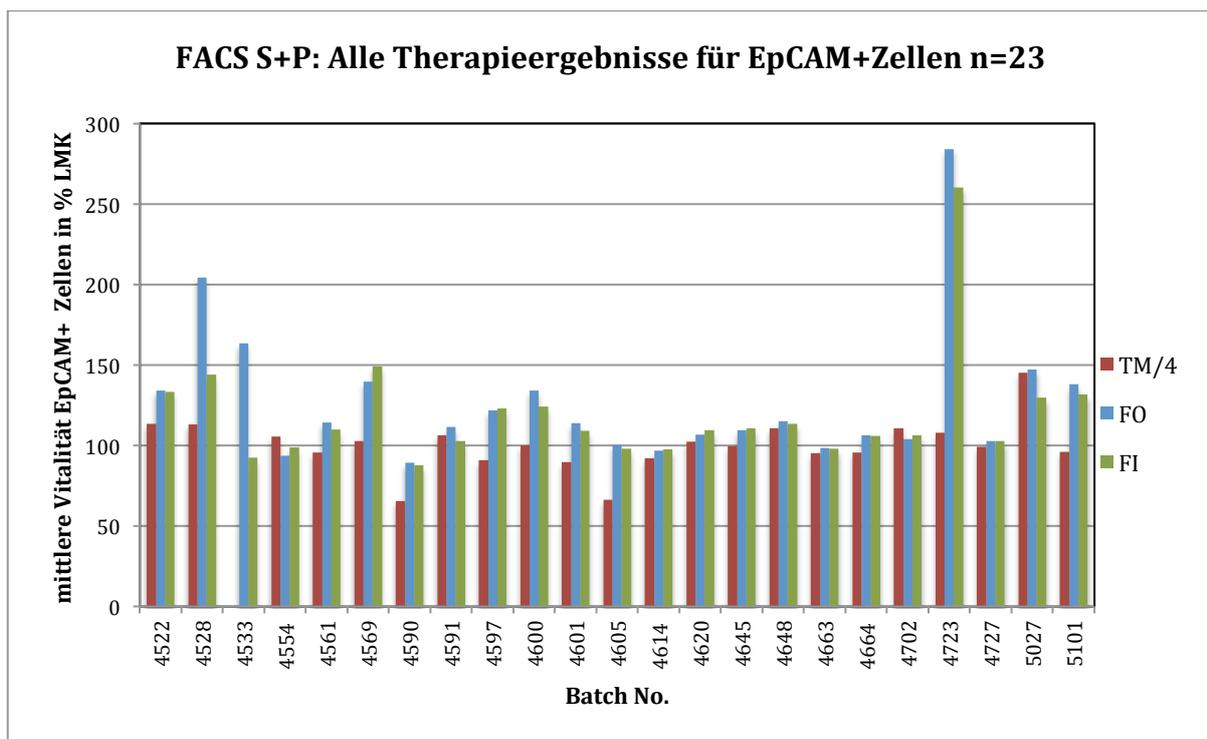


Abb. 21: Mittlere Vitalität in % LMK für EpCAM+ Zellen in der FACS-Analyse für S+P Modell

Bezüglich der CD45+ Zellen betrug die mittlere Vitalität der Mediumkontrolle 100,13% (SD 11,21). Für die Therapie FO wurde durchschnittlich die geringste Vitalität mit 85,89% (SD 18,66) berechnet. FI zeigt über alle Proben eine durchschnittliche Vitalität von 90,94 (SD 14,03). In 21 von den 23 Proben wurde ebenfalls eine statistische Analyse durchgeführt. In Probe Batch Nummer 4522 konnte keine Analyse erfolgen, da nur eine Messung pro Therapieansatz durchgeführt wurde (zu wenig Probenmaterial in der Aufarbeitung). Aufgrund der teilweise hohen Standardabweichungen der Auswertungen können jedoch auch bei dieser Subgruppe keine signifikanten Veränderungen in Bezug auf die Vitalität der Proben beobachtet werden. Bei der individuellen Betrachtung der Proben kann man im Diagramm bei den Batch No. 4597, 4664 und 5027 eine deutliche Abnahme der Vitalität der Therapieansätze im Vergleich zur Mediumkontrolle erkennen. Jedoch konnte dies nicht mit einer statistische Signifikanz bestätigt werden (für genaue p-Werte siehe Tabelle A21 im Anhang ab Seite 132).

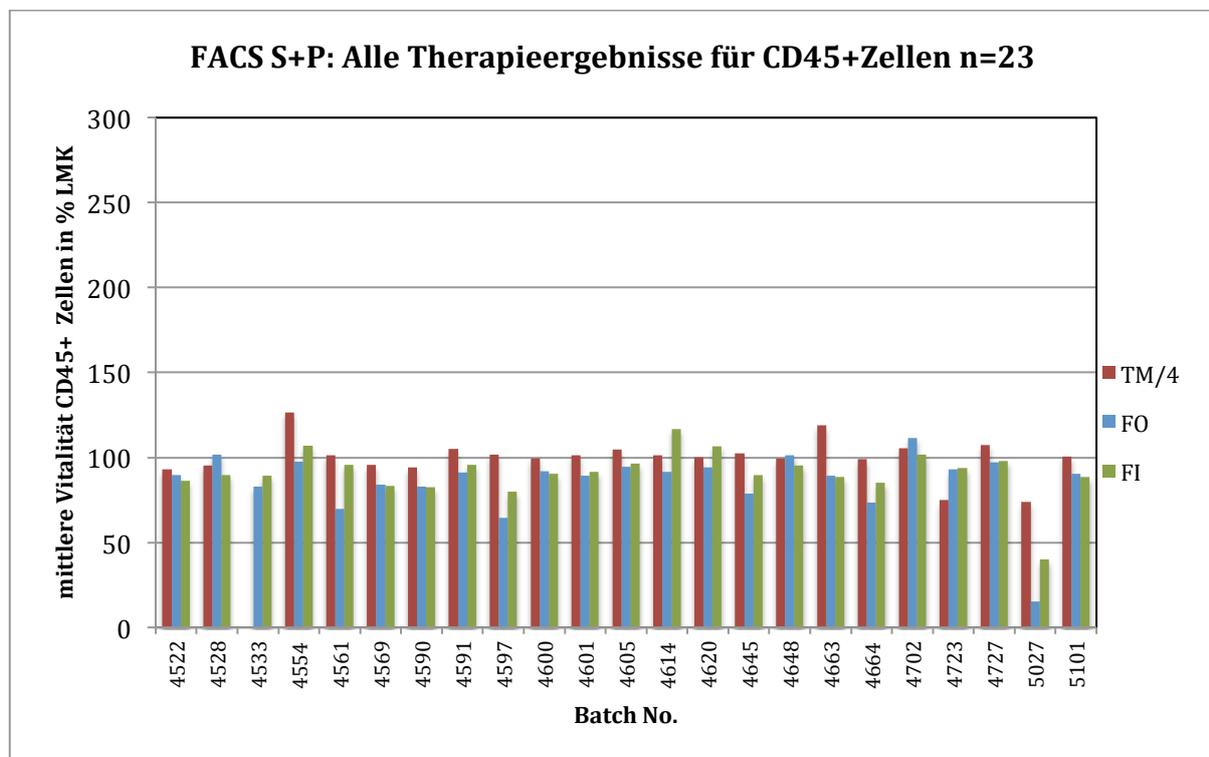


Abb. 22: Mittlere Vitalität in % LMK für CD45+ Zellen in der FACS-Analyse für S+P Modell

Um nun den additiven Effekt der PBMCs auf die Abnahme der Zellvitalität zu evaluieren, haben wir die gemessene E:T Ratio mit den jeweiligen Vitalitäten der Therapieansätze für beide gefärbten Zelltypen (EpCAM+ und CD45+ Zellen) verglichen und die Daten

miteinander korreliert. In den unten gezeigten Grafiken ist die mittlere Vitalität der Therapieansätze und ihre jeweilige E:T Ratio für EpCAM+ und CD45+ Zellen aufgeführt. Es konnte sowohl für die EpCAM+ als auch für die CD45+ Zellen kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der E:T Ratio und der Abnahme der mittleren Vitalität der unterschiedlichen Therapieansätze festgestellt werden. Die Auflistung der genauen P-Werte befindet sich im Anhang (ab Seite 134).

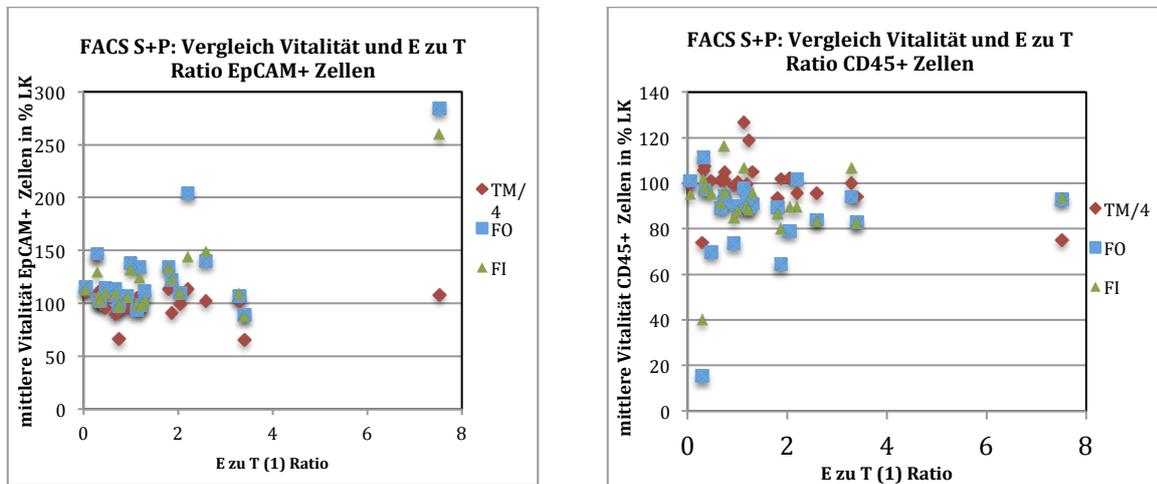


Abb.23: FACS S+P Vergleich Vitalität in %LMK und E:T Ratio für EpCAM+ und CD45+ Zellen

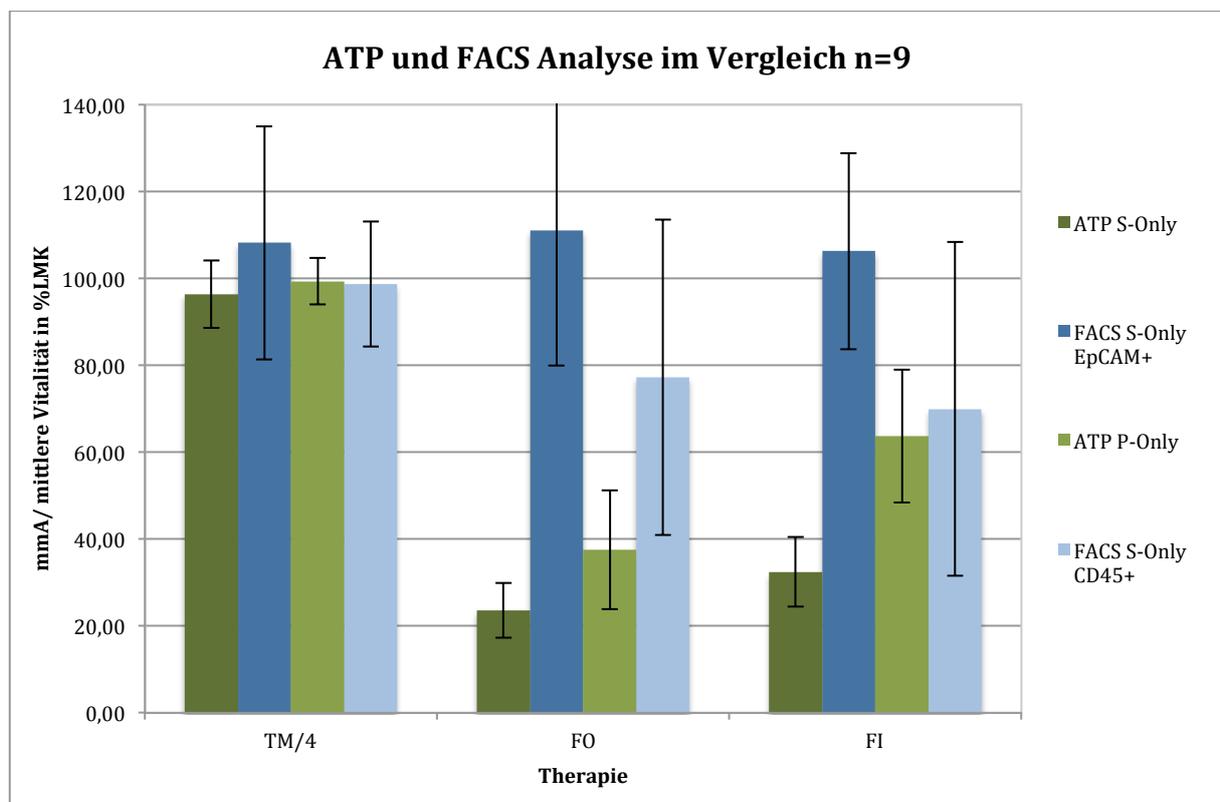
### 3.8 Therapieergebnisse von ATP und FACS im Vergleich

Um eine bessere Aussage über den Stellenwert der beiden Readout Systeme für das Therapieansprechen machen zu können haben wir bei den Proben mit genügend Tumormaterial sowohl eine FACS- als auch eine ATP-Analyse durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Für die Fragestellung der Zytostatikaeffektivität wurde die Abnahme der Zellvitalität im FACS mittels EpCAM+ Zellen mit der Abnahme der metabolischen Aktivität im ATP verglichen. Um die Zelltoxizität in den hämatopoetischen Zellen zu vergleichen wurden für die FACS-Analyse die CD45+ Zellen und in der ATP-Analyse die Proben mit den PBMCs (P-Only) verwendet.

Aufgrund der meist geringen Menge an Tumorgewebe konnte diese vergleichende Analyse nur für neun Patienten erfolgen. Die dazugehörigen Tabellen mit den jeweiligen durchschnittlichen Zellvitalitäten im FACS sowie die durchschnittlichen metabolischen Restaktivitäten im ATP jeder einzelnen finden sich im Anhang auf Seite 137. In der FACS-Analyse findet in den meisten Fällen wie bereits beschrieben nur eine marginale Veränderung der Zellvitalität sowohl für EpCAM+ als auch für CD45+ Zellen statt, die keine statistische Signifikanz aufweist. Um eine allgemeine Aussage über den Vergleich

bzw. die Effektivität der beiden Messmethoden geben zu können, wurden jeweils eine Graphik über alle Patienten erstellt. Die aufgeführten Graphiken zeigen die durchschnittlichen Ergebnisse der neun Proben für die einzelnen Therapieansätze. Hier kann man deutlich den Unterschied zwischen der Abnahme der metabolischen Aktivität im ATP-Assay (grüne Balken) und der Restvitalität der Zellen in der FACS-Analyse (EpCAM+ und CD45+ Zellen; blaue Balken) erkennen. Dies gilt nicht für die Mediumkontrolle, die im Wesentlichen in beiden Readout Systemen konstant bleibt.

a)



b)

Batch Nr.	TM/4 in %LMK	FO in %LMK	FI in %LMK
ATP S-Only	96,3	23,6	32,43
FACS S-Only EpCAM+	108,12	111,05	106,23
ATP P-Only	99,29	37,49	63,67
FACS S-Only CD45+	98,66	77,20	69,92

Abb. 24: ATP vs. FACS-Analyse: Vergleich mmA und mittlere Vitalität in % LMK für TM/4, FO und FI in ATP S-Only/P-Only und FACS S-Only EpCAM+ Zellen/CD45+ Zellen; b) Tabelle mit der dazugehörigen mmA bzw. mittleren Vitalität in %LMK für TM/4, FO und FI

Da es sich hier um eine geringe Fallzahl (n=9) mit geringer statistischer Relevanz handelt wurde auf eine statistische Analyse verzichtet und eine deskriptive Datenanalyse durchgeführt. Aus der Graphik kann man erkennen, dass es einen Unterschied für die Effektivität der Therapien zwischen den beiden Messmethoden gibt. Dies trifft sowohl für die Tumorzellen (EpCAM+) als auch für die Zellen des hämatopoetischen Systems (CD45+) zu. Der jeweilige Wert kann aus der Tabelle b) entnommen werden. Zusätzlich lässt sich zeigen, dass die Mediumkontrollen für alle Modelle sowohl in der FACS-Analyse als auch im ATP Assay überwiegend gleich bleiben. Während man also in der FACS-Analyse in S-Only keine Abnahme der Zellvitalität nach 120 Stunden detektieren kann, nimmt im ATP-Assay der gleichen Probe die metabolische Aktivität bereits innerhalb von 72 Stunden deutlich ab. In den Proben, in denen die EpCAM+ Zellen gemessen wurden, lässt sich diese Beobachtung durch alle Proben hinweg bestätigen. In den CD45+ Zellen lässt sich hingegen eine Abnahme der mittleren Vitalität verzeichnen, die jedoch nicht in gleichem Maße ausfällt wie die Abnahme der mittleren metabolischen Aktivität in der entsprechenden ATP-Analyse (P-Only). Da es sich hier um eine geringe Fallzahl (n=9) handelt, muss dies bei der Bewertung der Ergebnisse beachtet werden.

### 3.9 Univariate Korrelationen für die ATP-Analyse

#### 3.9.1 Korrelation der Mediumkontrolle mit den Labor- bzw. klinisch-pathologischen Parametern

Für die Subgruppen S-Only und P-Only wurden die univariaten Analysen separat durchgeführt. Als unabhängiger Parameter wurde die durchschnittliche metabolische Aktivität der Mediumkontrolle (TM/4) von S-Only sowie P-Only für die Korrelation verwendet. Aus den Labordaten wurden nur die Parameter Verdauzeit, Standzeit der Proben vor Aufarbeitung und Gewebemenge zur Analyse herangezogen. Für die PBMCs (P-Only) wurde die Standzeit des Blutes und die Vitalität nach Aufarbeitung als Korrelationsparameter verwendet. Hinsichtlich der klinisch pathologischen Daten wurden alle Parameter aus der Patientenkollektivbeschreibung analysiert. Aus Übersichtsgründen werden nachfolgend nur die statistisch signifikanten Korrelationen dargestellt. Alle nicht signifikanten Ergebnissen mit den dazugehörigen p-Werten befinden sich in Tabelle A27/A28 ab Seite 138 im Anhang.

### 3.9.1.1 Das Sphäroidmodell (S-Only)

Bezüglich der durchschnittlichen metabolischen Aktivität der Mediumkontrolle konnte im Sphäroidmodell gezeigt werden, dass sowohl der Nachweis von Fernmetastasen (cM1) als auch eine positive Lymphgefäßinvasion mit einer signifikant höheren metabolischen Aktivität im ATP Assay assoziiert ist (cM0 99,49%LMK vs. cM1 108,93% LMK  $p= 0,041$ ; L0 98,89%LMK vs. 105,58% LMK bzw.  $p= 0,024$ ). Ein weiterer Trend kann auch bezüglich der Tumorlokalisation beobachtet werden. Die durchschnittliche metabolische Aktivität der Mediumkontrolle scheint im linkseitigen Colon (105,53% LMK) höher zu sein als im rechten (97,36%LMK), obwohl dies mit einem Signifikanzniveau von  $p= 0,052$  nicht eindeutig signifikant ist.

### 3.9.1.2 PBMC-Modell (P-Only)

Im PBMC-Modell ergab die Korrelation der durchschnittlichen metabolischen Aktivität (TM/4) mit den klinisch-pathologischen Parameter ausschliesslich signifikanten Zusammenhang mit der Radikalität der Operation. Patienten mit einer R0-Resektion zeigten eine höhere metabolische Grundaktivität der Mediumkontrolle als Patienten mit einer R1/2- Resektion (R0,100,66%LMK vs. R1/2, 88,34%LMK  $p=0,029$ ). Im Patientenkollektiv waren allerdings nur zwei Proben als R1/2 klassifiziert worden. Die Prozentzahlen sowie die p-Werte für FOC und FIC sind aus Übersichtsgründen im Anhang der Ergebnisse aufgelistet.

### 3.9.2 Übersicht: *in vivo* Testung (Chemotherapie im Patientenkollektiv) und *in vitro* Testung (Chemotherapie im dazugehörigen 3D-Modell) Im Vergleich bezogen auf Hämatotoxizität und Therapieeinhaltung

Für den direkten Vergleich der angewandten Chemotherapie mit unseren Ergebnissen aus dem ATP Assay wurden die Patienten herangezogen (nur Patienten aus ATP-Kollektiv), die *in vivo* eine Chemotherapie erhalten haben. Für den Vergleich wurde zum einen als Outcome die tatsächlich eingetretene Hämatotoxizität als chemotherapie-assoziierte Nebenwirkung und die Therapieeinhaltung verwendet. Zum anderen wurde im dazugehörigen 3D-Modell verglichen, welche Chemotherapie statistisch signifikant als die effektivste abgeschnitten hat und welche Chemotherapie (am gleichen Patienten) die niedrigste Toxizität (PBMC-Modell) aufgezeigt hat.

Batch Nr.	Alter	UICC	Chemotherapie (erhalten)	beste Therapie in S-Only* (höchste Wirkung)	beste Therapie in P-Only* (niedrigste Toxizität)	Leitliniengerechte Therapie erhalten	Hämatotoxizität
4659	80	IIIc	FOLFOX	FO	FI	ja	nein
4663	56	IVb	FOLFOX	FO	FI	nein	ja
4688	64	IIIc	FOLFOX	FO	FI	ja	nein
4702	74	IIIb	FOLFOX	FI	FI	ja	ja
4708	71	IIIc	FOLFOX	FO= FI	FI	nein	ja
4718	66	IIIc	FI + Avastin	FO=FI	FI	ja	nein
4731	63	IIIc	FOLFOX	FO= FI	FI	ja	nein
4741	73	IIIb	FOLFOX	FO	FI	nein	nein
4750	63	IIIa	FOLFOX	FI	FI	nein	nein
4778	52	IIIb	XELOX	FO= FI	FO=FI	nein	nein
4781	74	IIIb	XELOX	FO	FI	nein	ja
4804	58	IIIb	XELOX	FO	FI	nein	ja
4805	74	IV	FI + Avastin	FO	FI	nein	nein
4838	65	IIIb	XELOX	FO= FI	FO=FI	nein	ja
4878	72	IIIb	FOLFOX	FO	FI	nein	ja
4888	86	IIIb	Xeloda	FO=FI=5FU	5FU=FI	ja	nein
4894	75	IIIc	Xeloda	FO =5FU	5FU	nein	nein
4925	68	IIIa	FOLFOX	FO	FI	nein	ja
4927	55	IVb	FOLFOX	FO	FI	nein	nein
4941	69	IVa	FI+ Cet	FO	FI	nein	nein
4965	72	IIIc	FOLFOX	FO	FI	nein	nein
4991	65	IIIa	FOLFOX	FO= FI	FI	ja	nein
5038	66	IIIc	FOLFOX	FO	FI	nein	ja
5046	50	IIIb	XELOX	FO	keine Angaben	nein	nein
5059	64	IIIb	FOLFOX	FO= FI	FI	nein	ja
5102	55	IVa	FO + Avastin	FO	FI	ja	nein
5133	58	IIIb	FOLFOX	FO	FI	ja	nein
5166	66	IIIb	FOLFOX	FO= FI	FI	nein	ja
5182	55	IIIb	XELOX	FO	FI	nein	ja
5185	50	IIIb	FOLFOX	FO	FI	nein	nein
5217	59	IIc	XELOX	FO= FI	FI	ja	nein
5219	77	IIIb	5-FU	FO	5FU	nein	ja
5245	68	IIIb	FOLFOX	FO	FI	nein	nein

Tab. 18: Vergleich *in vitro* mit *in vivo* Ergebnissen für S-Only und P-Only und Korrelation mit Follow-Up (Leitliniengerechte Therapie und Hämatotoxizität)

\* die jeweiligen Werte der mmA können aus den Tabellen im Anhang entnommen werden

In 20 von 33 Fällen weist FO im ATP-Assay die signifikant bessere Effektivität (Abnahme der mmA) als FI oder 5-FU auf. in neun von 33 Fällen ist FO gleichwertig zu FI und in weiteren zwei Fällen hat 5-FU ebenfalls die gleichwertige Effektivität wie FO. Wenn

man die Ergebnisse aus den P-Only Modell betrachtet lässt sich feststellen, dass in 27 von 33 Fällen die Therapie mit FI signifikant am wenigsten Toxizität (signifikant niedrigste Abnahme der mmA) aufweist. In nur sechs Fällen zeigt FO oder 5-FU eine gleiche (nicht signifikante) Abnahme der mmA im Vergleich zu FI. Im klinischen Setting ist eine oxaliplatinbasierte Therapie (FOLFOX bzw. XELOX) weiterhin Mittel der Wahl beim fortgeschrittenen CRC. Jedoch wird die Chemotherapie mit FO in den meisten Fällen (n=21) aufgrund des Nebenwirkungsprofils nicht leitliniengerecht durchgeführt, was in über 50% der Fälle (n=12) durch die chemotherapie-induzierte Hämatotoxizität bedingt ist. In der in-vitro Testung von P-Only im ATP-Assay zeigt FI in 11 von 12 dieser Fälle eine signifikant niedrigere Abnahme der mmA. In 2 dieser Fälle ist FI im S-Only Modell genauso effektiv wie FO, sodass bei diesen Patienten eine irinotecanbasierte Therapie als Alternative angeboten werden könnte. Dies verstärkt unsere Aussage, dass in Zukunft durch eine individuelle prätherapeutische Testung im 3D-Sphäroidmodell und PBMC-Modell eine adäquate, auf den Patienten zugeschnittene Therapie ausgewählt werden könnte. Durch die Durchführung dieser risikoadaptierten Systemtherapie könnte somit eine konsequentere Therapieeinhaltung gewährleistet werden.

#### 4. Diskussion

##### 4.1 Patientenkollektivbeschreibung

###### 4.1.1 Alter, Geschlecht, Tumorlokalisation

Gemäß den neuesten Publikationsdaten vom RKI ([www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs\\_node.html](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Darmkrebs/darmkrebs_node.html)) liegt das mediane Erkrankungsalter für Patienten mit CRC bei 72 Jahren für Männer und 76 Jahren für Frauen. Das mediane Erkrankungsalter in unserem Kollektiv mit 70 Jahren für beide Geschlechter liegt minimal unter dem vom RKI ermittelten Alter. Wenn man das mediane Erkrankungsalter getrennt betrachtet, liegt dieser für die Frauen im unseren Kollektiv bei 69 und für die Männer bei 71 Jahren. Diese Verteilung entspricht also nicht genau der aus den aktuellen Daten des RKI. Jedoch zeigt eine größere Studie von 2012 mit einem deutschen Kollektiv von über 160.000 Patienten ein medianes Erkrankungsalter von 70 Jahren (range 68-72) [82]. Somit kann bezüglich des Alters von einem repräsentativen Kollektiv in dieser Arbeit ausgegangen werden. Bezüglich des Verhältnis Männer zu Frauen liegt unser Kollektiv mit einem Verhältnis von 1,55: 1 in einem fast identischen Bereich wie für ganz Deutschland berechnet (1,51: 1). Wenn man die Tumorlokalisation betrachtet, waren 51,2% der Tumore im rechten Colon und

48,8 % im linken Kolon festgestellt worden. Dies weicht nur wenig von Werten in neuen Studien mit großen Patientenkollektiven ab [83]. Laut einer großen Studie von Lee et al. sowie von Taieb et al. zeigen Patienten mit einem rechtsseitigen Kolonkarzinom im UICC Stadium II oder III eine schlechtere 5-Jahres-Überlebensrate als Patienten mit Karziome im linken Kolon [84, 85]. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls für UICC Stadium III und IV des kolorektalen Karzinoms bestätigt [86]. Laut einer Studie von Lim et al. ist das rechtsseitige Kolonkarzinom mit einem schlechteren Nodalstatus, größerem Tumordurchmesser sowie höherem Grading assoziiert Lim [87]. Darüber hinaus wird postuliert, dass das rechtseitige Kolonkarzinom mit einer höheren Rate an BRAF Mutationen und MSI einhergeht als das linksseitige Kolon [88]. Einen positiven Effekt von Cetuximab auf das PFS und OS im linksseitigen Colon konnte nicht gezeigt werden [84]. In unserem Patientenkollektiv konnten wir diese Ergebnisse nicht bestätigen. Es konnte keine Korrelation zwischen Tumorlokalisierung und Gesamtüberleben der Patientin ermittelt werden. Aufgrund der nicht durchgeführten Genanalysen (wie z.B für BRAF- Mutation oder Mikrosateliteninstabilität) war eine Korrelation diesbezüglich nicht möglich. Zusätzlich war zum Zeitpunkt unserer Patientenrekrutierung und Tumoraufarbeitung die Abhängigkeit des Therapieansprechens von der Tumorlokalisierung nicht in dem Maße bekannt.

#### 4.1.2 TNM- Einteilung

Die Rekrutierung unseres Kollektivs erfolgte von Juli 2011 bis Juli 2014. Für die TNM- und UICC- Einteilung wurde die 7. Auflage der TNM- Klassifikation maligner Tumore verwendet. Im Januar 2017 wurde bereits die neuere 8. Auflage veröffentlicht. Hier wurden sowohl neue Tumorentitäten hinzugefügt, als auch kleine Veränderungen in den vorhandenen Tumorentitäten vorgenommen. Für das CRC gab es im Wesentlichen 2 Änderungen, die im beschriebenen Kollektiv nicht berücksichtigt werden:

- Neu eingeführtes pN1c für Tumorsatelliten in Subserosa oder Mesenterium ohne Nachweis von Lymphknotenresten und ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
- Peritonealmetastasen werden jetzt als neu eingeführtes Stadium pM1c (bisher pM1b) klassifiziert

Bezüglich der Verteilung des T-Stadiums liegt die Prozentuale bei 1,6%, 15,2%, 64,8% und 18,4% für T1, T2, T3 und T4. Diese Zahlen stimmen weitestgehend mit neueren Studiendaten von Van Cutsem et al. überein [89]. In den neuen Daten des RKI für 2013/2014 liegen die T1-Verteilung geschlechtsspezifisch etwas höher bei ca. 14-15%

und die T3-Verteilung etwas niedriger bei 50-54%. Im Vergleich zur PCT- Studie wurden in diesem Kollektiv auch Patientin im UICC Stadium I und II eingeschlossen, sodass hier kein Bias im Kollektiv aufgrund der Einschlusskriterien erfolgt ist.

Betrachtet man die lokoregionäre Metastasierung (N-Status) in unserem Kollektiv, haben 38,4% bereits bei Erstdiagnose Lymphknotenmetastasen (pN1/2), wobei die Anzahl der befallenen Lymphknoten (und damit die Einteilung in pN1 und pN2) in Abhängigkeit des T-Stadiums steht. Es ist allgemein bekannt, dass die lokoregionäre Metastasierung höchst prädiktiv für das Outcome der CRC Patienten ist [90]. Im regionalen Tumorregister München wird ein positiver Nodalstatus mit ungefähr 27% angegeben (<https://www.tumorregister-muenchen.de/facts/base/bC1820G-ICD-10-C18-C20-Darmtumor-Inzidenz-und-Mortalitaet.pdf>). In größeren Studien dagegen wird die Häufigkeit von pN0 und pN1/2 eher mit 47-50% angegeben, somit gibt es in unserem Kollektiv etwas weniger nodalmetastasierte Patienten als in größeren Kollektiven [91]. Bei Primärdiagnose befinden sich laut Studienlage ungefähr 20-25% der Patienten in einem fernmetastasierten Status [92]. In unserem Patientenkollektiv liegt dieser Wert bei 8,8%. Folglich haben wir weniger Patienten mit weit fortgeschrittenem Kolonkarzinom in die Arbeit aufgenommen. Was die UICC-Klassifikation betrifft, welche von diesen drei Parametern bestimmt wird, kommen wir mit unserem Kollektiv auf annähernd vergleichbaren Daten wie in größeren Studien [93] [94]. In der univariaten Analyse bzw. in den Kaplan-Meier-Kurven zeigen genau diese beschriebenen Faktoren auch einen signifikanten Einfluss auf das progressionsfreie Intervall sowie das Gesamtüberleben der Patienten. Es ist also nicht überraschend, dass ein positiver Nodalstatus in der Cox- Regressionsanalyse eine signifikante prognostische Wertigkeit aufzeigt. Ebenso erwiesen sich der M-Status und der R-Status als Einfluss nehmende Risikofaktoren für das progressionsfreie sowie Gesamtüberleben. Zusammenfassend kann von einem Patientenkollektiv mit leicht fortgeschrittenen Tumorstadium ausgegangen werden, welches als repräsentativ für unsere Fragestellung gewertet werden kann. In der multivariaten COX-Analyse stellt der Metastasierungsfaktor sowohl für das progressionsfreie Überleben als auch für das Gesamtüberleben weiterhin den prognostisch stärksten bzw. ungünstigsten Faktor dar, gefolgt von der Radikalität der Operation. In unserem Kollektiv war -über alle Patienten betrachtet- die Prozentzahl der UICC Stadium IV Patienten im Vergleich zu großen Kollektiven dagegen relativ gering. Um diese Aussage zu bekräftigen, sollten in Zukunft deutlich mehr Patienten mit metastasierten CRC rekrutiert werden. Der Nodalstatus

scheint für das Gesamtüberleben kein unabhängiger Faktor zu sein, obwohl ein UICC Stadium III die Hauptindikation für eine adjuvante Chemotherapie zur Prognoseverbesserung darstellt.

#### 4.1.3 Grading

Im Hinblick auf den Differenzierungsgrad der Tumore unseres Kollektivs waren knapp 86% der Tumorproben vom WHO Grading 1 und 2, das heißt gut bzw. mäßig differenziert. Die hierzu angegebenen Daten in Tumorregister München sowie anderen größeren Studien betragen ca. 75-80% für G1 und G2 kolorektale Tumore, also vergleichbar mit den Eigenschaften unseres Kollektivs [95]. Bekannt ist ebenfalls die Abhängigkeit des Langzeitprognose vom Differenzierungsgrad kolorektaler Tumore [96]. Dies konnten wir in den Kaplan-Meier-Schätzer mit signifikanten Ergebnissen für PFS und OS bestätigen.

#### 4.1.4 Adjuvante Chemotherapie

Anlehnend an die signifikanten Ergebnisse aus der MOSAIC- Studie von André et al. sowie der aktuellen internationalen und deutschen Leitlinien wird eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU in Kombination mit Oxaliplatin (FOLFOX oder XELOX) über einen Zeitraum von sechs Monaten weiterhin als absoluter Standard für Patienten mit einem kolorektalen Karzinom im UICC Stadium II high risk und III empfohlen [20, 24, 80]. In der Erstlinientherapie des metastasierten CRC kommt zusätzlich Irinotecan als Zytostatikum und die Gabe von monoklonalen Antikörpern im Sinne einer gezielten Tumorthherapie je nach RAS-Status zum Einsatz [97] [96]. Dieses leitliniengerechte Therapiekonzept kann auch im klinischen Follow-Up unseres Patientenkollektivs weitestgehend bestätigt werden. Trotzdem haben sich im Rahmen der Auswertung der Follow-Up Daten einige Problem- bzw. Ansatzpunkte der Leitlinien gezeigt.

In unserem Kollektiv wurden 16 Patienten identifiziert, die aufgrund ihrer klinischen Risikofaktoren in das UICC Stadium II B oder C eingestuft wurden. Davon erhielt jedoch nur die Hälfte der Patienten eine adjuvante Chemotherapie. Dies lag vor allem an der mangelnden Bereitschaft der Patienten, sich trotz eines negativen lokoregionären Metastasierungsstatus einer nebenwirkungsreichen systemischen Therapie unterziehen. Wie bereits in einer Studie von Kopetz und Taberero 2015 veröffentlicht, können diese „high risk“ Patienten seit einigen Jahren mithilfe des sogenannten ColoPrints, einem prognostisch aussagekräftigen „Genome signature“-Test,

identifiziert werden [98]. Bewiesenermaßen kann dieser Test das Risiko für ein Rezidiv erkennen und damit auch die Empfehlung für eine Chemotherapie im UICC Stadium II risikoadaptiert unterstützen. Darüber hinaus würde es laut unserer Datenlage Sinn machen, mithilfe unseres 3D-Sphäroidmodell eine Aussage über die Effektivität und Toxizität der in Frage kommenden Therapieschemata zu treffen, um somit eine individuelle patientenspezifische Beratung anzubieten. In unserem Kollektiv befinden sich keine Patienten, bei denen eine ColoPrint- Testung durchgeführt wurde. Jedoch wäre es in Zukunft denkbar, diese beiden Testmethoden für eine Optimale Therapiestratifizierung zu verwenden.

Ein weiterer Diskussionspunkt stellt das häufig fortgeschrittene Alter der Patienten bei Erstdiagnose dar. Laut Angaben der SEER-Datenbank ([https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2011/results\\_merged/sect\\_06\\_colon\\_rectum.pdf](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2011/results_merged/sect_06_colon_rectum.pdf)) sind ca. 40% der Patienten bei Erstdiagnose über 75 Jahre alt. Trotz stetig sich verbessernder Überlebensraten über alle CRC Patienten bleibt die Rate des Gesamtüberlebens bei älteren Patienten weiterhin niedrig [99]. Gründe hierfür sind zum einen die bereits vorhandenen Komorbiditäten zum Anderen aber auch eine reduzierte Behandlungsstrategie der verschiedenen Therapiesäulen, wie beispielsweise Diagnostik, Staging, Operation oder Chemotherapie [100]. Dies liegt wahrscheinlich an einer mangelnden Etablierung der Leitlinien für fortgeschrittene Altersgruppen, weil diese Patienten in den meisten klinischen Studien nicht berücksichtigt bzw. nicht eingeschlossen werden. Folglich ist eine adäquate Nutzen-Risiko Analyse im klinischen Alltag eine ernstzunehmende Herausforderung. Zwei große retrospektive Studien haben gezeigt, dass nur etwa 55% der über 70-jährigen CRC Patienten eine adjuvante Chemotherapie erhalten haben, wobei die Wahrscheinlichkeit der Durchführung einer Chemotherapie mit zunehmendem Alter drastisch abnahm. Nur noch 11-34% der über 80-Jährigen erhielten eine Systemtherapie [101, 102]. Seit den 90-er Jahren ist jedoch international bekannt, dass eine adjuvante 5-FU/Leucovorin basierte Chemotherapie auch für ältere Patienten einen signifikanten Benefit für das progressionsfreie sowie das Gesamtüberleben bedeutet [23]. Dabei spielt es keine signifikante Rolle, ob das 5-FU als intravenöse Gabe oder oral appliziert wird [40]. Allerdings gibt es seit der MOSAIC-Studie kontroverse Aussagen über den tatsächlichen Benefit einer 5-FU/Oxaliplatin-basierten Chemotherapie bei Patienten über 75 Jahren. Eine im JCO publizierte Studie aus dem Jahr 2013 analysierte knapp 14.500 Patienten bezüglich des Benefits einer oxaliplatinbasierten Chemotherapie bei älteren Patienten. Dabei konnte kein

signifikanter Unterschied in PFS und OS für Patienten über 70 Jahren festgestellt werden [103]. Aus den erhobenen Follow-Up Daten in unserem Patientenkollektiv lässt sich diese altersspezifische Problematik ebenfalls bestätigen. Bei knapp über der Hälfte der Patienten (n=65) war eine adjuvante oder palliative Chemotherapie empfohlen worden, die jedoch nur bei 51 Patienten tatsächlich durchgeführt wurde. Das Durchschnittsalter der Patienten, die eine oxaliplatinbasierte Therapie erhielten, lag bei 64 Jahren wohingegen das durchschnittliche Alter der Patienten, die eine 5FU-Monotherapie erhielten, deutlich höher bei 73 Jahren lag. Die Patienten, die eine adjuvante Chemotherapie im UICC Stadium II oder III ablehnten waren im Durchschnitt 72 Jahre alt. Wenn man das Erkrankungsalter der Patienten mit einer Empfehlung zur adjuvanten Chemotherapie in diesem Kollektiv betrachtet, kommt in mehreren Fällen eine leitliniengerechte Therapie nicht in Frage, sodass häufig auf eine „alternative“, weniger toxische Therapie ausgewichen werden musste wie z.B. eine Monotherapie mit 5-FU. Das konnte eine Studie von Lund et al. für ältere Patienten mit UICC Stadium IV CRC bereits bestätigen [104]. Diese Abweichungen vom normalen Chemotherapieregime konnten in unserem Kollektiv erst bei den ersten klinischen Follow-Ups ab 12 Monaten festgestellt und werden. Eine standardmäßige Testung von 5-FU im 3D-Sphäroidmodell wurde folglich erst zu einem späteren Zeitpunkt der Patientenrekrutierung eingeführt. Zusätzlich war es in manchen Fällen aufgrund mangelnder Gewebemenge nicht möglich, zusätzliche Therapieoptionen, wie beispielsweise eine 5-FU-Monotherapie, im Sphäroidmodell zu testen. Daher konnte eine *in vitro* Analyse der Effektivität von 5-FU als Monotherapie im Sphäroidmodell nur bei 45 Patienten erfolgen. Wenn man die Datenlage betrachtet, sollte auf jeden Fall bei einer zukünftigen chemotherapeutischen Testung im Sphäroidmodell eine 5-FU-Monotherapie standardmäßig durchgeführt werden.

Als weiterer Diskussionspunkt im Hinblick auf die adjuvante Chemotherapie beim UICC Stadium II high risk und III Kolonkarzinom ist der Einsatz von Irinotecan als alternative individualisierte Erstlinientherapie. Es ist seit über einem Jahrzehnt bekannt, dass eine adjuvante FOLFOX-Therapie vor allem zu einem verbesserten Gesamtüberleben der Patienten mit einem UICC Stadium II high risk und III CRC führt. Dies hat auch das letzte 10-Jahres-Überleben Update der MOSAIC Studie in der Publikation von André T et al. 2015 bestätigt [105]. Seit den publizierten Ergebnissen aus der FIRE-3 Studie werden 5-FU/Irinotecan leitliniengemäß in der metastasierten Situation sowohl in Kombination mit Cetuximab/Bevacizumab als auch in Kombination mit Oxaliplatin eingesetzt. Der

Einsatz von monoklonalen Antikörpern wird bedingt durch den RAS- Status [106]. Bei KRAS Wildtyp Tumoren scheint eine Erstlinientherapie mit Cetuximab für das PFS und OS besser zu sein als Bevacizumab [107]. Laut einer Publikation von Tournigand et al von 2004 spielt es bezüglich der Effektivität der Erstlinientherapie im Stadium UICC IV keine Rolle ob Oxaliplatin oder Irinotecan zuerst gegeben werden [26]. Bis dato gibt es jedoch keine Studien, die eine Überlegenheit von Irinotecan über Oxaliplatin oder eine 5-FU- Monotherapie in der adjuvanten Behandlung des UICC Stadium II/III CRC beweisen [108]. Darüber hinaus stellen die Chemotherapie-induzierten Nebenwirkungen eine wichtige Rolle in der Einhaltung der Systemtherapie dar und haben folglich einen enormen Einfluss auf die Lebenszeitprognose der Patienten. Wie bereits in der Patientenkollektivbeschreibung tabellarisch aufgeführt traten in unserem Patienten Follow-Up verschiedene Nebenwirkungen bei der Durchführung der Chemotherapie auf. Es wurde gezeigt, dass zu den häufigsten dosis-limitierenden Faktoren die hämatotoxischen (Neutropenie ca 30%), neurotoxischen (Polyneuropathie ca.16%) und gastrointestinalen (Diarrhoe ca. 14%) Wirkungen gehören.

Dies bestätigen weitestgehend auch die Ergebnisse mehrerer Studien, in denen die toxischen Nebenwirkungen bei der Therapie mit Irinotecan, Oxaliplatin, +/- 5-FU untersucht wurden [109] [110].

Bei einer irinotecanbasierten Therapie stehen Diarrhoe und Neutropenie an oberster Stelle bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens. Allerdings ist auch bekannt, dass die limitierenden Nebenwirkungen von den pharmakogenetischen, physiologischen und umweltbezogenen Faktoren jedes einzelnen Individuums abhängig sind. Dazu gehören zum Beispiel Mutationen im Enzym UGT1A1, Dysfunktionen in Organen wie Leber oder Nieren oder auch die synchrone Einnahme mehrere Medikamente [111].

Für die Bewertung und Evaluation der chemotherapie-induzierten gastrointestinalen Nebenwirkungen (z.B. Diarrhoe) gibt es bereits seit einigen Jahren 3D-Modelle, sogenannte Organoide, die das Mikrogewebe des Gastrointestinaltraktes nachahmen und für Toxizitätstestungen herangezogen werden [112]. In diesem Arbeitsfeld wurden bereits bemerkenswerte Fortschritte gemacht [113]. Aufgrund der Komplexität des Gewebes und der *in-vivo* Vorgänge sind jedoch noch weitere Strategien notwendig, um arzneimittelinduzierte Toxizitäten zu identifizieren Peters [114].

In unserem 3D-Sphäroidmodell können diese gastrointestinalen Faktoren zusätzlich bestimmt und in der Auswertung der Analysen berücksichtigt werden. Für Oxaliplatin hingegen ist schon lange bekannt, dass neben der Hämatotoxizität die Polyneuropathie

eine ausschlaggebende Rolle in der Einhaltung der Therapie spielt [115]. Dabei wird zwischen akuter (tritt direkt nach Infusion auf und ist rückläufig) und chronischer Polyneuropathie (tritt progressiv bei zunehmender kumulativer Dosis auf) unterschieden. Bei den meisten Patienten entwickelt sich die chemotherapie-induzierte periphere Polyneuropathie erst nach mehreren Zyklen eines platinhaltigen Zytostatikums und korreliert mit der Kumulativdosis [116]. Um jedoch die Pathophysiologie der oxaliplatin-induzierten Neurotoxizität zu untersuchen, werden Techniken benötigt, bei denen die axonale Erregbarkeit getestet und über bestimmte Scores die Schwere der Neuropathie ausgewertet werden kann. Dies war in unserem Tumorsphäroid-Modell nicht möglich und konnte ebenfalls in den Auswertungen der therapieinduzierten Nebenwirkungen nicht getestet werden. Auch in der Literatur ist bis dato kein ähnlich valides Modell zur Erfassung der chemotherapie-induzierten Neurotoxizität beschrieben. Das gleiche Problem stellte die Wertung vom 5-FU-induzierten Hand-Fuss-Syndrom dar. Je nach Schweregrad, muss auch beim Hand-Fuß-Syndrom eine Dosisreduktion, eine Unterbrechung oder ein Switch der Chemotherapie in Betracht gezogen werden [117].

In unserem 3D-Sphäroidmodell haben wir unabhängig von UICC Stadium und den patientenbezogenen Charakteristika alle Tumorproben auf Effektivität und Hämatotoxizität der verschiedenen Therapeutika getestet. Dabei wurde zwar bestätigt, dass in 55,4% der Tumorproben eine Oxaliplatin-basierte Chemotherapie gegenüber einer Irinotecan-basierten Therapie effektiver ist, jedoch zeigten 37,9% Patienten eine gleich gute zytotoxische Effektivität von Irinotecan im Vergleich zu Oxaliplatin. In den restlichen 6,7% der Tumorproben war sogar Irinotecan tendenziell effektiver als Oxaliplatin. Auch an den mitgetesteten Blutproben konnte bewiesen werden, dass über fast alle Patienten Irinotecan eine deutlich niedrigere Hämatotoxizität aufwies als Oxaliplatin. Gerade für ein immer älter werdendes Patientenkollektiv mit zunehmenden Komorbiditäten sollte dieser wichtige Aspekt bei der Therapieauswahl in Betracht gezogen werden. Es stellt sich folglich die Frage, ob eine Irinotecan-basierte Therapie unabhängig vom Schweregrad der Tumorerkrankung in bestimmten Ausnahmefällen eine angemessene Alternative zum nebenwirkungsreicheren Oxaliplatin darstellen könnte. Um jedoch diesen individualisierten Therapieansätzen in Bezug auf Hämatotoxizität mehr Bedeutung zusprechen zu können, sollte zukünftig eine detailliertere Auflistung unerwünschter Nebenwirkungen der Patienten geführt werden. Darüber hinaus lassen sich über das PBMC-Modell keine Rückschlüsse auf die

Erythrozyten und somit auf eine mögliche auftretende Anämie ziehen, da diese Blutzellen bereits im ersten Aufarbeitungsschritt *in vitro* eliminiert werden. Da diese genannten Nebenwirkungen genauso ausschlaggebend für die Einhaltung des Therapieregimes sind, stellt ihre mangelnde Erfassung in unserem Modell einen limitierenden Faktor dar.

## 4.2 Methodik/ In-vitro Testung

### 4.2.1 Tumorproben

Die 125 Tumorgewebeproben, die für die 3D-Testung verwendet wurden, stammten aus sechs verschiedenen Zentren mit unterschiedlichen Standorten bzw. Distanzen zu unserem chirurgischen Labor im Universitätsklinikum Großhadern. Die Verarbeitung der Proben aus Großhadern wurde meistens noch am selben Tag durchgeführt, wohingegen die Proben aus den weiter entfernten Zentren aufgrund der komplexeren Transportmöglichkeiten eine längere Liegedauer aufwiesen. Trotz der unterschiedlichen Liegezeiten gab es keine wesentlichen Unterschiede bezüglich des Zustandes der Proben und es konnten sehr gute Ergebnisse bezüglich der Vitalität der Tumorzellen vor Therapietestung bewiesen werden. Für die zukünftige Rekrutierung von Patientenproben kann also weiterhin ein multizentrisches Konzept in Betracht gezogen werden. Eine bereits im Ergebnisteil angesprochene Problematik stellt jedoch die Quantität der zur Verfügung gestellten Tumorproben dar. Abhängig von der Größe des Kolonpräparates bzw. des Tumors kann der Pathologe nur einen gewissen Anteil für Forschungszwecke freigeben, sodass die nutzbare Gewebemenge von Probe zu Probe stark variierte. Wenn man durchschnittliche Gewebemenge von 513,7mg betrachtet, kann von einer ausreichenden Bildung von Sphäroiden ausgegangen werden, die eine adäquate Therapietestung für FACS- und ATP- Analyse ermöglicht. Wenn man jedoch die Streubreite und Standardabweichung dieser Daten betrachtet (65,7 mg bis 6225,4mg, SD 644,9 mg) wird klar, dass in vielen Fällen die Gewebemenge für eine adäquate individuelle Testung nicht ausreichend war. Aufgrund der heterogenen Tumorgrößen der Patienten ist es unmöglich, in jedem Fall eine angemessene Gewebemenge zu erhalten. Somit muss eine Mindestmenge an verwendbarem Tumorgewebe festgeschrieben werden.

Ein weiterer problematischer Faktor ist die Heterogenität der Tumorzellen und die damit verbundene Tumorzellausbeute. Aufgrund der unterschiedlichen Zellzusammensetzung des Tumorgewebes variierte die Anzahl der vitalen Zellen

zwischen 0,55 – 135,5 Mio mit einer durchschnittlichen Zellausbeute von 3,99 Millionen Zellen/100mg Gewebe. Um eine vollständige Testung (FACS und ATP) aller Therapieoptionen mit den entsprechenden Mediumkontrollen durchführen zu können, wären ca. 20 Millionen Zellen notwendig. Betrachtet man nur die Durchschnittswerte scheint es durchaus möglich, genügend Zellen für die gesamte Sphäroidtestung zu erhalten. Wenn man jedoch die Standardabweichung betrachtet, wird ersichtlich, dass nicht bei allen Patienten eine Testung für alle leitliniengerechten Therapieregimes mit den entsprechenden Mediumkontrollen möglich ist.

#### 4.2.2 FACS: Vitalität der EpCAM+ und CD45+ Zellen

Ein wichtiger Aspekt in der Bewertung der FACS- Daten ist die Veränderung der Zellvitalität bzw. die Abnahme der vitalen Zellen für die im Tumorgewebe gemessenen EpCAM+ und CD45+ Zellen im zeitlichen Verlauf der Testung. Obwohl die Validierungsergebnisse gezeigt haben, dass dank einer stabilen Standzeit der Proben eine gute Ausgangsvitalität erzielt werden konnte, muss die Variable „Zeit“ als möglicher Störfaktor in der FACS-Analyse diskutiert werden. Für die Durchführung der Probenaufarbeitung, Sphäroidbildung, Zytostatikatestung und Auswertung waren im Vorfeld bereits standardisierte Schemata erarbeitet worden, welche für alle Proben verwendet wurde. Um jedoch eine Abhängigkeit der Zellvitalität von der Zeit auszuschließen, haben wir anhand eines nicht in dieser Arbeit gewerteten Kollektivs die Vitalität der EpCAM+ und CD45+ Zellen in der FACS-Analyse über 5 Tage beobachtet. Die Analyse wurde nur für die Mediumkontrolle (nicht behandelt) durchgeführt. Die Sphäroide wurden jeweils bei Therapiestart (S48h T0h), nach 48h (S72h T48h), nach 72h (S96 h T 72h) und nach 96h (S120h T96h) im FACS analysiert.

TM/4	Vitalität EpCAM+ 0h in %	Vitalität EpCAM+ 48h in %	Vitalität EpCAM+ 72h in %	Vitalität EpCAM+ 96h in %	Vitalität CD45+ 0h in %	Vitalität CD45+ 48h in %	Vitalität CD45+ 72h in %	Vitalität CD45+ 96h in %
	n=30	n= 15	n= 24	n= 13	n= 23	n=8	n= 17	n= 12
MEAN	59,26	72,62	82,59	84,92	57,15	56,72	51,49	41,43
MEDIAN	62,46	71,99	86,57	84,94	54,61	55,32	49,99	33,28
MIN	19,26	43,53	53,70	70,57	23,20	37,69	20,57	14,68
MAX	91,81	94,71	96,03	95,74	90,74	79,08	93,62	94,42

STABW	18,30	15,87	11,34	7,96	16,02	17,34	21,53	23,05
-------	-------	-------	-------	------	-------	-------	-------	-------

Tab. 19: Vitalität (in %) der EpCAM+ und CD45+ Zellen in Abhängigkeit der Zeit (in h) für die Mediumkontrolle (TM/4) S-Only

Aus der aufgeführten Tabelle 22 wird erkenntlich, dass die durchschnittliche Vitalität der EpCAM+ - Zellen nach 48 Stunden Sphäroidinkubation knapp unterhalb der 60%-Grenze liegt. Dennoch scheinen die Epithelzellen mit der Zeit zu proliferieren bzw. an Vitalität zu zunehmen und weisen nach 96 Stunden eine Vitalität von durchschnittlich 84,92% (70,57- 95,74%; SD 7,96) auf. Dies ist möglicherweise auf den positiven Einfluss von Zell-Zell-Kontakten bei Epithelzellen zurück zu führen [118].

Bei den CD45+ - Zellen kann dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Hier wird im Gegenteil deutlich, dass die mononukleären Zellen isoliert aus peripherem Blut mit der Zeit an Vitalität abnehmen. Nach 96 Stunden ist die Vitalität von 53,74% auf 41,92% gesunken und bestätigt somit auch den gegenteiligen Vitalitätsverlauf von Epithel- bzw. Tumorzellen und Zellen aus dem hämatopoetischen System. Diese Vitalitätsanalyse mittels FACS konnte allerdings nur für die CD45+ Zellen durchgeführt werden. Für die autologen Blutproben konnte aufgrund der geringen zur Verfügung gestellten Blutvolumen nur eine Vitalitätsbestimmung am Ende der Aufarbeitungsphase (siehe Teil: Material und Methoden) erfolgen. Für unser Sphäroidmodell bedeutet dies, dass eine lange Inkubationszeit der Blutproben zu schlechteren Vitalitätsergebnissen führen kann während Tumorproben eher von der Inkubationszeit profitieren.

#### 4.2.3 Therapieschema der Zytostatika

Für die Behandlung der Tumorsphäroide und der PBMC-Ansätze wurden die aus den aktuellen nationalen und internationalen Leitlinien zugelassenen Wirkstoffe (5-FU, Oxaliplatin, Irinotecan und Cetuximab) alleine oder in Kombination getestet. Um ähnliche Wirkstoffkonzentrationen wie im klinischen Setting zu erzielen wurde nach ausführlicher Literaturrecherche die maximale Plasmakonzentration (1x PPC) verwendet. Nach mehrstufigen Etablierungsprozessen wurden als Wirkdauer der Chemotherapeutika 72h für die ATP Analyse und 96h für die FACS-Analyse festgesetzt. Im Hinblick auf die Dosierung und das Timing der verwendeten Zytostatika bzw. Antikörper wurden alle Proben in gleicher Weise behandelt, sodass von validen Testergebnissen ohne Störvariablen ausgegangen werden kann. In der FACS-Analyse konnte dennoch nach 96h Therapiedauer in fast keiner Probe eine Abnahme der

Zellvitalität weder für EpCAM+ noch für CD45+ Zellen verzeichnet werden.

#### 4.2.4 FACS und ATP Analyse als Messmethode

Aufgrund der Fragestellung in dieser Doktorarbeit und der zu testenden Zelltypen wurden nach der Durchführung mehrerer Validierungspanels die Readout-Methoden der FACS-Analyse und des ATP-Assays (CellTiter Glo®) zur Messung der Therapieeffektivität herangezogen. Für die Entscheidungsfindung bezüglich Messung der metabolischen Aktivität wurden zunächst Vergleichsanalysen zwischen ATP- und MTS-Assay durchgeführt. Der MTS-Assay ist ein Verfahren, welches als kolorimetrische Messmethode für die sensitive Quantifizierung der Stoffwechselaktivität eingesetzt wird. Auch dieses Verfahren kann für die Testung von Zytostatika verwendet werden. Allerdings ist die Sensitivität deutlich geringer als im ATP-Assay und wird daher vor allem im Zelllinienbereich mit kurzen Inkubationszeiten angewandt [119, 120]. Folglich wurde der ATP-Assay als adäquate Messmethode für die Bestimmung der residuellen metabolischen Aktivität in Tumorzellen sowie PBMCs ausgewählt.

Im Bereich der Durchflusszytometrie ist die Zellvermessung/ -typisierung mittels FACS-Analyse das am häufigsten verwendete Verfahren. Es ist weltweit etabliert und wird vor allem zur Typisierung von Leukozyten sowie zur Bestimmung der Zellvitalität eingesetzt. Somit wurde die FACS-Analyse in unserem 3D-Sphäroidmodell für die qualitative Zusammensetzung der Proben und die Messung des Zelltodes verwendet. Anhand der in Kapitel 2 besprochenen Ergebnisse konnte jedoch gezeigt werden, dass nach der angesetzten Therapiedauer von 96h kaum eine Abnahme der Zellvitalität nachweisbar war. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, welche Faktoren ursächlich für dieses Phänomen sein könnten. Da die Standardabweichung innerhalb der Repeats für die Proben sehr ähnlich war und mit Ausnahme von drei Proben die Standzeit der Proben nur minimal variierte, gehen wir von einer guten Qualität mit validen Ergebnissen aus. Allerdings konnte nicht für jede aufgearbeitete Probe maximal zwei Repeats durchgeführt werden, da nicht genügend Zellen zur Verfügung standen. Für beide Antikörperfärbungen (CD45/EpCAM) wurde derselbe Hersteller über alle Probenanalysen verwendet und jeweils die gleiche Isotyp Kontrolle eingesetzt, sodass nicht von Qualitätsschwankungen der Färbungen ausgegangen werden kann. Auch der Einsatz von Trucount Beads für die FACS-Proben ab Batch No. 4932 (insgesamt n= 12) zeigten hinsichtlich der Zelltodmessung keine relevanten Messveränderungen im Vergleich zur vorherigen Methode. Zusammenfassend haben

wir festgestellt, dass für eine optimale Analyse mittels FACS (d.h. mindestens zwei Repeats, mehrere Messzeitpunkte, S-Only und S+P Messung für dieselbe Probe) eine sehr hohe Anzahl an Zellen notwendig ist, die häufig aufgrund der stark variierenden Gewebemenge nicht zu gewährleisten ist. Darüberhinaus lässt sich auf noch unerklärter Weise eine aussagekräftige Therapieeffektivität /-toxizität anhand der Zelltodbestimmung nicht identifizieren. Dies gilt sowohl für EpCAM+ als auch für CD45+ Zellen.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die Auswahl der Marker für die Leukozyten. Da nur ein einziger Leukozytenmarker aufgrund der geringen Gewebemengen verwendet werden konnte, wurde CD45 ausgewählt, da hiermit das weiteste Spektrum an Immunzellen detektiert werden kann. Eine Differenzierung von CD3+ und CD8+ Zellen, welche eine sehr hohe prognostische Wertigkeit bezüglich Effektivität der Chemotherapie und Gesamtüberleben haben, war in diesem Modell nicht möglich. Daher sind wir zu dem Entschluss gekommen, dass die FACS-Analyse für eine ausführliche Wirkstofftestung mit vielfältiger Zelltypdifferenzierung kein geeignetes Readout darstellt. Für eine qualitative Zelltypisierung der Gewebeproben kann die FACS-Analyse jedoch weiterhin als hilfreiche Messmethode angewandt werden. Falls die FACS-Analyse weiterhin als Testmethode für eine qualitative Messung (der Zellvitalität) im 3D-Sphäroidmodell herangezogen würde, wäre zu diskutieren, ob für einen optimalen Wirkungsvergleich der Therapeutika noch längere Zeitintervalle getestet werden sollten.

### 4.3 Ergebnisse der in vitro 3D-Testung im Sphäroidmodell (S-Only)

#### 4.3.1 Intrinsische („intrinsic“) und erworbene („acquired“) Zytostatika-Resistenz

Anhand der Ergebnisse aus der ATP-Analyse wurde ersichtlich, dass es zu einer signifikanten Abnahme der metabolischen Aktivität durch die Therapie mit 5-FU sowie mit FO/FOC/FI/FIC im Sphäroidmodell (S-Only) im Vergleich zur Kontrolle kam. Durchschnittlich (über alle 106 ATP Tumorproben) lag diese Aktivitätsabnahme deutlich über 60% der LMK, sodass man von einer maßgeblichen Effektivität der Therapien ausgehen kann. Wenn man die Proben jedoch individuell betrachtet, können Proben herausgefiltert werden (n=3), auf die die Therapie in Bezug auf die Effektivität weniger oder keinen Einfluss genommen hat. Dieses Phänomen, welches als „intrinsische“ Zytostatika-Resistenz bezeichnet wird, ist im klinischen Alltag eine bekannte und gefürchtete Herausforderung. Von einer „erworbenen“ Resistenz wird

gesprochen, wenn es nach initialem Ansprechen der Therapie zu einem Progress oder Rezidiv kommt. Der Hauptmechanismus für diese Resistenzen sind genetische und epigenetische Veränderungen, die den Tumorzellen Vorteile in Proliferation, Invasion und Mutation verschaffen und dadurch zu einer Progression der Erkrankung führen [121, 122]. Daher sind Next generation Sequencing- Technologien die Grundlage für neueste Studien, die versuchen, diese Mutationsmechanismen immer besser zu enthüllen [123]. Die Enthüllung von Mutationen in der RAS-Familie, BRAF/APC/PIK3CA- Mutationen, die zu verminderten Therapieansprechen beispielsweise bei der Anwendung von Cetuximab oder Bevacizumab führen, haben bereits zu wichtigen Veränderungen in der Entscheidungsfindung der Therapie für das fortgeschrittene CRC geführt [106, 124]. Trotzdem liegt das Rezidiv-Risiko im fortgeschrittenen CRC weiterhin bei 20-35%. Folglich sind auch in Zukunft mehr Studien zur Testung neuer therapeutischer Strategien notwendig, um weitere prädiktive Biomarker zu identifizieren, die zu einer besseren Selektion von Patientensubgruppen führen können. In unserem Sphäroidmodell haben wir drei Proben identifiziert, die auf eine Zytostatika-Resistenz hinweisen und haben sie mit den klinischen Daten verglichen. Die zur Diskussion stehenden Proben sind Batch No. 4781, 4858 und 4991 im Tumorsphäroidmodell (S-Only).

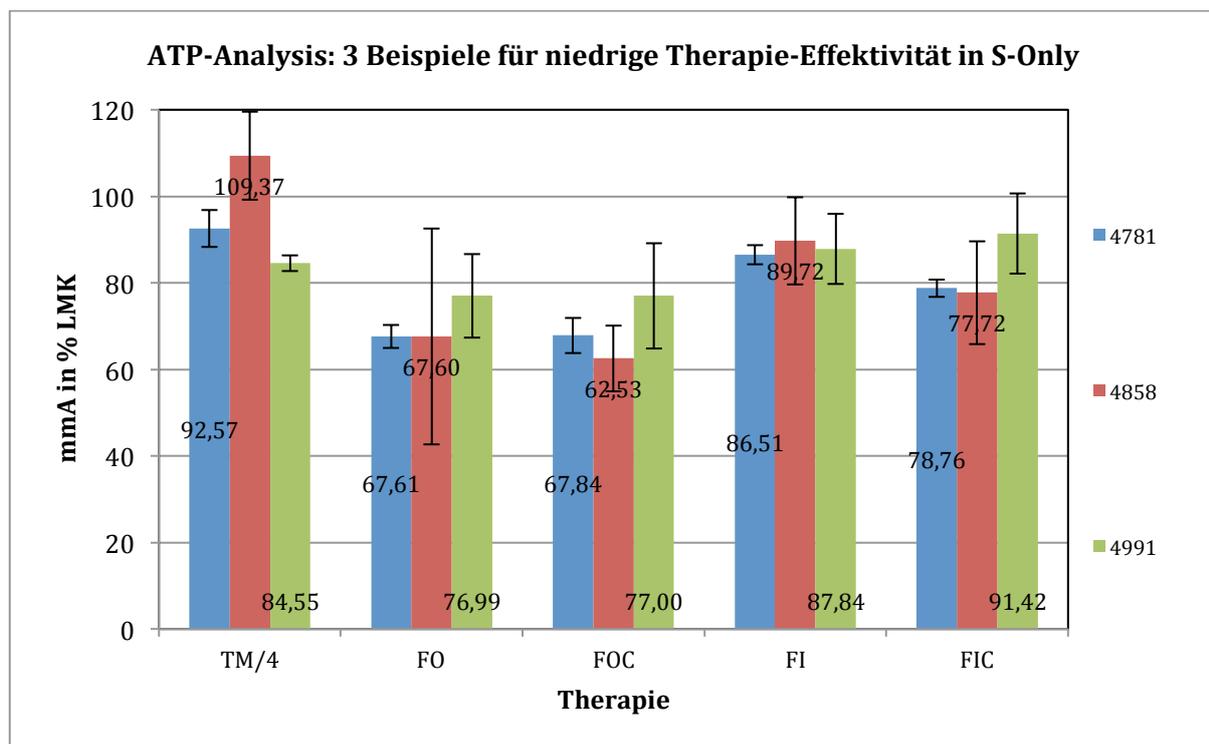


Abb. 25: mmA (in %LMK) für Batch Nr. 4781/4858/4991 als Beispiel für niedrige Therapie-

## Effektivität in S-Only

Betrachtet man die hier aufgeführten Balken der drei Proben kann man erkennen, dass die Abnahme der metabolischen Restaktivität im Gegensatz zu allen anderen Batch No. relativ gering ist und man somit von einer niedrigen Effektivität der Therapie ausgeht. Bei Batch No. 4991 kann keine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität in allen vier Therapiekombinationen verzeichnet werden. Hier kann also von einer Therapieresistenz ausgegangen werden. Zusätzlich hat die statistische Analyse gezeigt, dass es in Batch No. 4858 und 4991 keinen signifikanten Benefit einer Therapie von FO gegenüber FI gab. Bei Batch No. 4781 war das Signifikanzniveau mit  $p=0,050$  genau an der Grenze zugunsten FO. Für die klinische Relevanz dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob das schlechte Ansprechen durch klinisch-pathologische Faktoren erkannt werden kann oder sich im Outcome für den Patienten widerspiegelt. Batch No. 4781 und 4991 erhielten aufgrund der fortgeschrittenen UICC Stadium III eine adjuvante Chemotherapie mit Xelox bzw. FOLFOX. Batch No. 4858 erhielt keine Systemtherapie bei UICC Stadium II. Patient 4781 musste ab dem 4. Zyklus auf eine weitere Oxaliplatingabe aufgrund der Nebenwirkungen verzichten, bei Patient 4991 wurde die Chemotherapie gut vertragen und leitliniengemäß beendet. Bei keinem der drei Patienten wurde im Follow-Up ein Progress oder Tod festgestellt. Da in unserem Patientenkollektiv eine DNA-Analyse nicht möglich war und somit Informationen über eventuelle Mutationen im RAS-Gen oder BRAF- Mutationen nicht zur Verfügung standen, konnten wir keine Aussage über dessen Einfluss auf das erniedrigten Therapieansprechen treffen.

Wenn man also unser 3D-Tumorsphäroidmodell und die ATP-Analyse als Teil eines adäquaten Readout Systems für die Quantifizierung der Effektivität bzw. als Prädiktionsmarker für das Ansprechen der Chemotherapie zukünftig betrachten möchte müssen ergänzend Analysen in Form von DNA- Sequencing bzw. Mutationsanalysen durchgeführt werden. Nur durch zusätzliche Informationen über den Mutationsstatus des Tumors und durch das Zusammenführen aller notwendigen Ergebnisse können dezidierte Aussagen über die Therapieeffektivität gemacht werden.

### 4.3.2 Gleiche Effektivität von 5-FU/ FI gegenüber FO - Was tun?

In unserem Sphäroidmodell (S-Only) haben wir bereits im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt, dass es beim Vergleich zwischen 5-FU und FI mit FO mehrere Proben gibt, bei denen FO nicht den gemäß der Literatur erwarteten besseren Effekt bezüglich des

Therapieansprechens aufweist. Im direkten Vergleich von 5-FU und FO sind es 15 Proben, im direkten Vergleich von FI und FO sind es 39 Proben. Von diesen insgesamt 54 Proben zeigen sogar 10 Proben gleichzeitig einen gleich guten Effekt von 5-FU und FI gegenüber FO (die jeweiligen Werte mit Standardabweichungen und Signifikanzniveaus sind im Anhang ab Tab. A12 auf Seite 132 aufgelistet). Wie bereits angesprochen, spielen bei der Wahl der Erstlinientherapie das UICC Stadium, Alter der Patienten mit Komorbiditäten und der Mutationsstatus eine entscheidende Rolle. Nach Durchführung der Zytostatika-Testung im Sphäroidmodell mittels ATP Analyse kann eine Aussage über die zur Auswahl stehenden Therapeutika bezüglich ihrer Effektivität am jeweiligen Patienten getroffen werden. Somit stellt sich die Frage: welches Backbone wähle ich? Aus Übersichtsgründen werden in der nachfolgenden Tabelle nur die 10 Patientenbeispiele aufgelistet, bei denen sowohl 5-FU als auch FI eine gleiche Effektivität gegenüber FO aufzeigen. Analog können auch mit den restlichen 44 Proben dieselben Überlegungen hinsichtlich einer individuellen Therapieentscheidung erfolgen.

Batch Nr.	Alter bei OP	UICC	Chemo	mmA in % LMK 5FU S-Only	mmA in % LMK FO S- Only	mmA in % LMK FI S- Only
4863	84	Ila	keine	21,86	20,27	25,96
4888	86	IIIb	Xeloda	42,34	33,63	42,14
5112	84	IIIb	abgelehnt	15,62	16,36	15,76
5147	69	Ila	keine	41,95	41,17	40,17
5162	71	Ila	keine	38,44	33,48	27,98
5166	66	IIIb	FOLFOX	53,07	39,67	52,25
5180	77	Ila	keine	56,41	29,84	36,36
5217	59	Ilc	XELOX	39,92	33,55	52,25
5260	47	I	keine	20,51	19,49	15,71
5261	72	Ila	keine	47,42	51,37	51,88

Tab. 20: Patientenbeispiele (nach Batch Nr. sortiert) mit gleicher Effektivität von 5-FU und FI gegenüber FO (mmA in % LMK) für S-Only

In diesem exemplarischen Kollektiv sind nur vier Patienten vorhanden, die aufgrund ihres UICC- Stadiums eine adjuvante Chemotherapie erhalten sollten. Zwei Patienten haben eine oxaliplatinhaltige Chemotherapie erhalten, ein Patient erhielt nur 5-FU, ein weiterer Patient hat aufgrund des hohen Alters eine Chemotherapie komplett abgelehnt.

Einer der Patienten, die eine oxaliplatinhaltige Therapie erhalten hat (Batch Nr. 5166), musste aufgrund der hämatologischen und gastrointestinalen Nebenwirkungen die Therapie abbrechen. Da in der Bewertung unseres Sphäroidmodells 5-FU/FI eine gleiche Effektivität wie FO gezeigt haben, könnte man diesen Patienten tatsächlich eine alternative Therapie zu FO anbieten. Wenn man die dazugehörigen Blutprobenanalysen betrachtet, zeigen die PBMC-Ansätze (P-Only) in allen Proben eine geringere Toxizität von 5-FU/FI im Vergleich zu FO. Wie bereits diskutiert, ist eine alleinige Gabe von 5-FU bei älteren Patienten mittlerweile etabliert, ist mit weniger Nebenwirkungen behaftet und zeigt gute Ergebnisse in der Langzeitprognose. Eine Irinotecan-basierte Therapie im adjuvanten Setting bei nicht-metastasierter Situation könnte hier ebenfalls eine mögliche nebenwirkungsärmere Variante darstellen, die jedoch aktuell noch nicht im klinischen Alltag leitliniengerecht empfohlen wird. Zukünftig brauchen wir ein größeres Kollektiv an Patienten im UICC-Stadium III/IV, die dieses Effektivitätsprofil aufweisen, um bessere Aussagen über einen möglichen Backbone- Austausch (Oxaliplatin ↔ Irinotecan) machen zu können.

#### 4.4 Ergebnisse der in vitro 3D-Testung im PBMC-Modell

##### 4.4.1 Die Zusammensetzung der PBMCs

Um individuelle Behandlungskonzepte zu etablieren und personalisierte Behandlungsentscheidungen dezidierter treffen zu können ist die Benutzung von Patientenblutproben ein mächtiges Tool geworden. Prädiktive Gensignaturen aus Blutproben wurden bereits entwickelt, um ein besseres Verständnis hinsichtlich Krankheitsstatus zu erlangen oder um individuelle Immunantworten zu charakterisieren [125]. Allerdings ist dies kein einfaches Unterfangen, da Genexpressionsmuster in Blutzellen aufgrund der variablen Zellzusammensetzung sehr variieren können. Normalerweise machen T- und B- Lymphozyten ca. 75% der PBMCs aus, während Monozyten und NK-Zellen jeweils mit ca. 10% vertreten sind. Die restlichen Zelltypen wie z.B. die dendritischen Zellen machen nur etwa 1% aus [126]. Die neutrophilen Granulozyten, die in den Vollblutproben durchschnittlich 40-80% der Immunzellen ausmachen, werden durch die Isolation von PBMCs ausgeschlossen. Allerdings kann durch Kontaminationen oder fehlerhafte Isolation noch ein prozentualer Anteil von bis zu 20% in den PBMCs vorhanden sein.

In PBMC-Ansätzen wurden die PBMCs aus autologen Vollblutproben gemäß standardisierten Protokollen isoliert, sodass ebenfalls von einer ähnlichen zellulären

Zusammensetzung ausgegangen werden kann. Um jedoch einen genaueren Überblick über die verschiedenen Immunzellen und ihren Einfluss auf die Immunantwort zu haben, wäre die Bestimmung der Subgruppen via FACS-Analyse (Unterteilung in CD3+, CD4+, CD8+-Zellen, NK- Zellen und DC) eine optimale Ergänzung für dieses Modell.

#### 4.4.2 Einfluss der Zytostatika auf die PBMCs: P-Only als Prädiktor für die Hämatotoxizität?

Wie bereits postuliert, ist die Einhaltung der leitliniengerechten Chemotherapie für die Prognose der CRC Patienten von höchster Bedeutung. Dies gelingt jedoch nur, wenn keine dosislimitierenden Toxizitäten auftreten. Laut einer Studie von Soveri et al von 2014 wissen wir jedoch, dass Nebenwirkungen in ca. 60% auftreten, davon ca. die Hälfte in schwerem Ausmaß (Grad 3 und 4). Die hämatologischen Nebenwirkungen wie Leukopenie, Neutropenie und Thrombozytopenie treten jeweils in ca. 30%, 48% und 6% auf. Die nicht hämatologischen Nebenwirkungen treten sogar in ca. 85% der Fälle auf [12]. Aufgrund beschränkter bzw. nicht vorhandener Testmöglichkeiten haben wir uns in dieser Doktorarbeit jedoch nur auf die hämatotoxischen Nebenwirkungen der Zytostatika konzentriert. Andere dosislimitierende Nebenwirkungen konnten in unserem Modell nicht berücksichtigt werden. Somit sind sie nicht in die Korrelationsanalysen eingegangen. Anhand des PBMC-Modells (P-Only) haben wir mittels ATP-Assay versucht, das Ausmaß der Hämatotoxizität auf die jeweiligen Blutproben zu bestimmen. Wie bereits in den Ergebnissen aufgezeigt, hat sich die ATP-Analyse im Gegensatz zur FACS-Analyse als adäquates Read-Out System bewiesen. Es konnte mit der Ausnahme von einem Patienten in allen Proben eine signifikante Abnahme der metabolischen Restaktivität in P-Only aufgezeichnet werden. Aufgrund der geringen Kollektivgröße wird auf die Korrelation mit Überlebensdaten verzichtet. Im untersuchten Kollektiv konnte nicht festgestellt werden, ab wann eine gewisse Abnahme der metabolischen Restaktivität *in vitro* eine tatsächliche hämatologische Toxizität am Patienten bewirkt. Wir haben uns daher nur auf die Mittelwerte der metabolischen Restaktivität über alle Patientenproben festgelegt. Im klinischen Follow-Up konnte eine Nicht-Einhaltung der Therapie mit der erfassten Hämatotoxizität der Patienten nicht signifikant in Verbindung gebracht werden. Das Auftreten von hämatologischen Nebenwirkungen im Allgemeinen (ohne Bezug auf die Chemotherapie) korrelierte mit einem erniedrigten progressionsfreien Intervall, jedoch nicht mit dem Gesamtüberleben. Für zukünftige Analysen ist es von großer Bedeutung, in einem großen Kollektiv mit

hohen Fallzahlen mittels validen Cut-Off die quantitative Abnahme der metabolischen Aktivität mit dem Auftreten von hämatologischen Nebenwirkungen und in einem zweiten Schritt mit PFS bzw. OS besser korrelieren zu können. Zusammenfassend lässt sich hoffen, dass wir mit dem PBMC-Modell auf dem richtigen Weg sind, die *in vitro*-Technologie mit klinisch relevanten Ergebnissen zu verknüpfen und eine Optimierung der individuellen Krebstherapie voranzutreiben.

#### 4.5 Einfluss des E:T- Verhältnisses auf das Therapieansprechen:

##### therapeutisches Add-On Effekt durch Zugabe von PBMCs im S+P Modell in der FACS Analyse

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass die Interaktionen der Tumorzellen mit ihrer Mikroumgebung, welche Immunzellen und inflammatorische Zellen beinhaltet, einen erheblichen Effekt auf das Therapieansprechen der Patienten mit CRC hat und somit das klinische Outcome beeinflusst [127]. Die von Becht et al. beschriebene Immunstruktur, welche charakterisiert wird durch Densität, Lokalisation und Organisation der tumorinfiltrierenden Leukozyten in Karzinomen, ist maßgeblich verantwortlich für die Prognose der Patienten vor allem mit CRC. Eine hohe Dichte an intratumoralen T-Zellen, vor allem im Zentrum des Tumors sowie in der Invasionsfront, korreliert mit einem besseren progressionsfreien Überleben und Gesamtüberleben [128]. Diese Erkenntnisse haben dazu geführt, dass sich viele Forschungsgruppen (vor allem die Forschungsgruppe von Gallon et al.) auf den Aspekt der Immuntherapie beim CRC spezialisiert haben. Die Immuntherapie ist eine immer wichtiger werdende Säule bei der Therapieentscheidung für Patientin mit CRC genauso wie der Immunoscore, der ausschlaggebend für die Berechnung eines Rezidivrisikos dieser Patienten ist [129]. Um jedoch ebenfalls eine Aussage darüber treffen zu können, ob das Immunzellinfiltrat im CRC einen Einfluss auf das Therapieansprechen verschiedener Zytostatika hat, haben wir zusätzlich zu einem Sphäroidmodell (S-Only) und einem PBMC-Modell (P-Only) ein drittes Modell, das S+P-Modell, in der FACS Analyse getestet. Darin haben wir durch die Zugabe von PBMCs zu den Tumorzellen versucht, den additiven Effekt der Immunzellen auf die Effektivität der Zytostatikatherapie zu erfassen. Wenn man sich die einzelnen Ergebnisse aus dem S+P Modell veranschaulicht, kann ein additiver Effekt durch die Zugabe von PBMCs in der FACS-Analyse nicht gezeigt werden. Es konnten keine Unterschiede in der Abnahme der Zellvitalität festgestellt werden. Daher müssen einige Methodenansätze, die Teil dieser Arbeit sind, nochmals diskutiert und kritisch analysiert

werden. Zum einen muss eindeutig gesagt werden, dass PBMCs nicht mit tumorinfiltrierenden Lymphozyten gleichgesetzt werden dürfen. Somit kann *in vitro* eine exakte Imitation der Verhältnisse *in vivo* zwischen Tumorzellen und TIL's nicht erreicht werden. Wie bereits in der Literatur beschrieben, haben die verschiedenen Zellsubpopulationen der PBMC's und die TIL's unterschiedliche Funktionen bzw. Auswirkungen auf die Tumorzellen [130, 131]. In unserem Modell war es nicht möglich, den tatsächlichen Anteil an tumorinfiltrierenden Lymphozyten quantitativ zu bestimmen und somit die genaue E:T- Ratio angeben zu können. Nur die gemessenen und hinzugefügten PBMC's waren messbar. Bei der Zugabe von P (PBMCs) zu S (Tumorsphäroid) konnte demnach immer nur die dazugegebene E:T-Ratio bestimmt werden. Es musste folglich ein Faktor „X = unbekannt“ in die Analysen mit einfließen, der möglicherweise eine wichtige Rolle spielt aber für uns nicht messbar war. Des Weiteren wissen wir durch den Mangel an Gewebemenge für die unterschiedlichen Antikörperfärbungen im FACS nicht, wie hoch der Anteil an CD3+, CD8+ oder FoxP3+ Zellen im Tumorsphäroid ist und können keine Aussage über ein mögliches verbessertes Therapieansprechen treffen. Ein weiterer Diskussionspunkt ist die gemessene bzw. künstlich angehobene E:T- Ratio im S+P-Modell (FACS). Immunologische Studien arbeiten *in vitro* mit deutlich höheren E:T-Ratios als in unserem Modell. Diese beginnen zwar ebenfalls bei einer E:T-Ratio von 1:1, werden aber teilweise bis auf 200:1 hoch titriert [132, 133]. Im hier verwendeten Modell gleichen die E:T-Ratios folglich eher den *in-vivo* Verhältnissen im Patienten. Für die Proben in der FACS-Analyse lag der im Durchschnitt gemessene Anteil an CD45+- Zellen für das S+P-Modell bei 37,9% mit einer gemessenen E:T-Ratio von 1,87:1 (siehe Ergebnisteil). Jede Tumorprobe hat eine unterschiedliche Menge an PBMCs zugeführt bekommen. Folglich gleicht keine Probe einer anderen. Dies bedeutet, dass keine Vergleiche innerhalb einer bestimmten E:T-Ratio möglich waren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Für eine aussagekräftigere Analyse eine höhere Anzahl an Tumor- bzw. Blutproben herangezogen und eventuell eine genauere Subgruppenanalyse der beteiligten Immunzellen durchgeführt werden muss.

## 5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom stellt trotz der Einführung neuer Prädiktionsmarker und damit verbundener zielgerichteter Therapeutika hinsichtlich Therapieansprechen/-einhaltung, Nebenwirkungsprofil und Langzeitprognose weiterhin eine

Herausforderung im klinischen Alltag dar. Obwohl durch optimierte Therapiestrategien (chirurgische Resektion, Chemotherapie und Antikörpertherapie) das Langzeitüberleben verbessert werden konnte, bleibt das fortgeschrittene metastasierte CRC eines der häufigsten krebisbedingten Todesursachen weltweit. Laut nationalen und internationalen Leitlinien wird im adjuvanten Setting eine oxaliplatin-basierte Therapie einer alleinigen 5-FU Monotherapie sowie einer irinotecanbasierten Therapie vorgezogen, da durch die Gabe von Oxaliplatin das Gesamtüberleben und progressionsfreie Intervall signifikant verlängert werden kann. Allerdings kann eine Monotherapie mit 5-FU sowie alternativ eine Therapie mit Irinotecan bei individueller Risikoeinschätzung der Patienten (Alter, Komorbiditäten, UICC II high risk Stadium, Metastasierung), und bei Kontraindikationen gegen Oxaliplatin durchaus empfohlen werden. Im Rahmen der SpheroPCT- Studie (Ethiknummer 252/04) wurden 125 Tumorgewebeproben von CRC Patienten und ihre jeweiligen Blutproben gesammelt, aufgearbeitet und mit unterschiedlichen Methoden bezüglich ihrer Effektivität und Toxizität analysiert. So ließen sich im ATP-Assay für die behandelten Tumorproben folgende Befunde zeigen: eine Oxaliplatin-basierte Therapie ist in 55,34% bzw. 66,67% der Proben wirksamer als eine Irinotecan-basierte Therapie bzw. eine alleinige Gabe von 5-FU. Gleichzeitig aber werden unter anderem schwerwiegendere hämatotoxische Nebenwirkungen bei der Gabe von FO beobachtet. Im direkten Vergleich von 5-FU mit FI konnte in 59% der Tumorproben ein vergleichbarer Effekt der beiden Zytostatika nachgewiesen werden. In 34% der Proben war FI in der individuellen Analyse die effektivere Therapie, jedoch ohne statistische Signifikanz über alle Proben. Da es sich um eine kleine Fallzahl handelt, sollten diese Ergebnisse in einer größeren Kohorte nochmals analysiert werden. Die hohen Standardabweichungen im Patientenspezifischen Sphäroidmodell reflektieren die Heterogenität der primären kolorektalen Karzinome zwischen den Patienten im Therapieansprechen. Wenn man die Ergebnisse im PBMC-Modell betrachtet wird deutlich, dass FO im Vergleich zu FI und 5-FU die stärkste hämatotoxische Wirkung hat. In 87,2% der Proben weist FO gegenüber FI eine signifikant höhere Abnahme der metabolischen Restaktivität an ( $p=0,0001$ ). Alle 45 Proben, bei denen 5-FU als Monotherapie vs. FO getestet wurde, zeigen eine signifikant höhere Abnahme der metabolischen Aktivität für FO ( $p=0,0001$ ). Im direkten Vergleich von 5-FU gegenüber FI zeigen 33,3% eine signifikant höhere Abnahme der metabolischen Aktivität zugunsten FI (höhere Toxizität von FI;  $p=0,014$ ), in 25 Proben jedoch war die Abnahme der Restaktivität nicht signifikant. In den restlichen 5 Proben

konnte ein Trend zugunsten 5-FU beobachtet werden. Trotz signifikantem Benefit einer oxaliplatin-basierten Chemotherapie kann diese durch unerwartete, vor allem hämato- und neurotoxische Nebenwirkungen häufig nicht entsprechen den Leitlinienempfehlungen durchgeführt bzw. beendet werden. In der individuellen Patientenanalyse konnten jedoch einzelne Patienten herausgefiltert werden, die ein besseres Therapieansprechen auf FI aufwiesen. Diese einzelnen Patienten würden im klinischen Setting gegebenenfalls bezüglich der Effektivität und Hämatotoxizität von einer irinotecan-basierten Therapie profitieren.

Die Ergebnisse der ATP-Analyse könnten darauf hinweisen, dass durch diese Methode der *in vitro* Testung bei einem Teil der Patienten zwischen 5-FU Monotherapie, FOLFOX oder FOLFIRI- Therapie entschieden werden kann, indem man individuell das Wirkungsprofil der Chemotherapeutika auf Tumor- und Blutzellen analysiert.

Aus diesen beiden Modellen kann man zusammenfassend schließen, dass einerseits die Zellkulturergebnisse den Empfehlungen der Leitlinien bzw. den großen Studien entsprechen, andererseits eine individuelle Analyse und ganzheitliche Betrachtung der einzelnen Patientenproben einen hohen Stellenwert erhalten sollte, da dadurch einzelne Ausnahmefälle gut erkannt werden könnten. Somit wäre es denkbar, einzelnen Patienten eine alternative, modifizierte Therapieempfehlung auszusprechen, die unter Umständen eine bessere Wirkung auf die Tumor- bzw. Blutzellen zeigen würde. Ziel einer optimierten individuellen Empfehlung wäre ebenso eine signifikante Verminderung von Therapieabbrüchen und somit eine Verbesserung der Langzeitprognose zu erreichen.

Zusammenfassend betrachtet gibt es bei der FACS-Analyse im Hinblick auf die Abnahme der Vitalität der Zellen für EpCAM+ und CD45+ Zellen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der unbehandelten Mediumkontrolle und den oxaliplatin- bzw. irinotecanbasierten Therapieansätzen (FO/FOC bzw. FI/FIC). Dies gilt sowohl für den Vergleich der gesamten Proben miteinander sowie für die individuelle Betrachtung der einzelnen Proben untereinander. Auch durch Zugabe von PBMCs zu den Sphäroiden (S+P Modell, n= 23) kann kein additiver Effekt im Sinne einer Steigerung des Zelltods in den EpCAM+ Zellen erzielt werden. Die Zytostatikabehandlung scheint jedoch eine stärkere negative Beeinflussung (stärkere Abnahme der Zellvitalität) auf die CD45+ Zellen zu haben, wenn auch diese statistisch nicht nachgewiesen werden kann. Aus unseren Daten lässt sich erschliessen, dass sich die FACS-Analyse als Readout-System für die Auswertung der Effektivität der Therapien auf die Tumorzellen in diesem 3D-

Sphäroidmodell nicht eignet und lediglich zur quantitativen/qualitativen Zelltypisierung verwendet werden sollte.

Bezüglich des Gesamtüberlebens konnten in der univariaten Analyse bzw. im Kaplan-Meier-Schätzer die Faktoren Nodalstatus (pN), M-Status, L-Status (Lymphangiosis carcinomatosa), Perineuralscheideninvasion, Radikalität der OP sowie der präoperative CEA und CA19-9 Wert als Einflussfaktoren identifiziert werden. Für das progressionsfreie Überleben galten zusätzlich noch die Tumorgröße und der Einsatz einer Chemotherapie (durchgeführt ja /nein) als beeinflussende Faktoren. In der Cox-Regressionsanalyse zählten jedoch nur der Metastasierungsstatus und die Radikalität der OP als beeinflussende Faktoren.

## 6. Anhang

### 6.1 Tabellen und Ergänzungen zu Einleitung sowie Material und Methoden

#### 6.1.1 Tabellen zu Einleitung

##### a) 5-FU mit Leucovorin (LV)

<b>Name</b>	<b>Schema</b>	<b>Anwendung</b>	<b>Dosierung (mg/m<sup>2</sup> KOF)</b>	<b>Dauer</b>
De-Gramont (LV5FU2)	Tag1 und 2, q2w	Zunächst LV 2h , dann 5-FU als Bolus , danach 22h i.v	LV 200 5FU 400 Bolus/ 600 i.v	12 Zyklen
Wöchentliches Protokoll	1 Zyklus à 6 Gaben q1w + 1-2 w Pause	Zunächst LV 2h, dann 5-FU als Bolus (1h nach Start von LV)	LV 500 5FU 500	3 Zyklen
Mayo-Protokoll	Tag1-5 , Wdh. Woche 4 und 8, danach alle 5 Wochen	LV als Bolus , 5FU als Bolus	LV 20 5-FU 425	6 Zyklen (3 Zyklen q4w, 3 Zyklen q5w)
Machover Protokoll	Tag 1-5, q4w	LV als Bolus, 5-FU als Bolus	LV 200 5-FU 370	6 Zyklen

AIO Protokoll	Woche 1-6, dann 1w Pause	Zunächst LV 2h , dann 5-FU als Dauerinfusion 24h	LV 500 5-FU 2600	2 Zyklen
Dauerinfusion (PVI)	venöse Infusion	Dauerinfusion	5-FU 300/ Tag	12 Wochen
orale Einnahme (Capecetabin)	Tag 1-14, 1w Pause,q3w	orale Einnahme morgens und abends		8 Zyklen

Tab. A1: Therapieschemata für die adjuvante Chemotherapie von 5-FU/Leucovorin beim kolorektalen Karzinom

b) 5-FU mit Oxaliplatin und Leucovorin (LV)

Name	Schema	Anwendung	Dosierung (mg/m <sup>2</sup> KOF)	Dauer
FOLFOX 4	5-FU/LV d1 und d2, q2w OX nur d1	5-FU Bolus, d1 und d2, dann über 22h d1 und d2 LV Bolus d1 und d2 OX über 2h d1	5-FU 400 Bolus und 600 Dauerinfusion LV 200 OX 85	12 Zyklen ( 6 Monate)
(m)FOLFOX 6	d1 q2w	LV über 2h d1 5-FU Bolus d1, dann Dauerinfusion über 2d OX über 2h d1	5-FU 1600 (400 Bolus, 1200 Dauerinfusion) LV 400 OX 85	
FLOX	5-FU/LV d1, d8, d15, d22, d29, d36, dann 2w Pause OX nur an d1, d15, d29	LV über 2h , dann 5-FU Bolus OX über 2h	5-FU 500 LV 500	3 Zyklen (6 Monate)

XELOX	Tag 1- 14 , 7 Tage Pause q3w	OX i.v als Infusion, 5-FU oral (morgens und abends)	OX 130 5-FU 2000(mg)	8 Zyklen (6 Monate)
-------	------------------------------------	---	-------------------------	---------------------------

Tab. A2. : Therapieschemata für die adjuvante Chemotherapie von 5-FU/Oxaliplatin beim kolorektalen Karzinom

### 6.1.2 Ergänzungen: Klinisch-pathologische Parameter

#### a) TNM- Klassifikation / UICC-Stadium

T Primärtumor (Infiltrationstiefe)	Tis T1 T2 T3 T4	Carcinoma in situ Infiltration der Submucosa Infiltration der Muscularis propria Infiltration der Subserosa a) Infiltration des viszeralen Peritoneums b) Infiltration umliegender Organe
N Regionale Lymphknoten	N0 N1 N2	keine regionale Lymphknoteninfiltration 1-3 Lymphknotenmetastasen ≥ 4 Lymphknotenmetastasen
M Fernmetastasen	M0 M1	keine Fernmetastasen Fernmetastasen

Tab A3. TNM- Klassifikation

UICC/AJCC-Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1-T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T4a	N0	M0
IIc	T4b	N0	M0
IIIa	T1-T2	N1	M0

IIIb	T3-T4	N1	M0
IIIc	T1-T4	N2	M0
IV	T1-T4	alle N	M1

Tab. A4 UICC/AJCC- Klassifikation Kolorektales Karzinom

## b) Grading

<b>Grading</b>	<b>histopathologische Definition</b>	<b>Beurteilung/</b>
G1	> 95% drüsenähnlicher Struktur = gut differenzierte Tumore	
G2	50-90% drüsenähnlicher Struktur = mäßig differenzierte Tumore	
G3	5-50% drüsenähnlicher Struktur = schlecht differenzierte Tumore	
G4	< 5% drüsenähnlicher Struktur = undifferenzierte Tumore	

Tab. A5 Grading Einteilung gemäß WHO

## 6.1.3 Ergänzungen: Skalierung der statistischen Merkmale

### a) Patienten-assoziierte und klinische Parameter

<b>Merkmal</b>	<b>Skalierung</b>
Geschlecht	nominal
Alter (in Jahren)	Verhältnis
Body-Mass- Index	Verhältnis
Tumorlokalisation	nominal
Tumorgröße (in cm)	Verhältnis
Histologie	nominal
TNM- Stadium	ordinal
UICC- Stadium	ordinal
L- Invasion	ordinal
V- Invasion	ordinal
Pn-Invasion	ordinal
R- Status	ordinal

CEA	Verhältnis
CA 29-9	Verhältnis
Operationsverfahren	nominal
CTX präoperativ	ordinal
adjuvante CTX	ordinal
angewandte CTX	nominal

Tab.A6: statistische Merkmale und ihre dazugehörige Skalierung

b) Laborchemische Parameter

<b>Merkmal</b>	<b>Skalierung</b>
Standzeit (Blut) bis Aufarbeitung in h	Verhältnis
Standzeit (Gewebe) in TM in min	Verhältnis
Gewebemenge in mg	Verhältnis
Aufarbeitungszeit/Verdau in min	Verhältnis
Inkubationszeit Sphäroide in min	Verhältnis
Anzahl generierter Sphäroide (ATP)	Verhältnis
Anzahl generierter Sphäroide (FACS)	Verhältnis
Therapiedauer in h (ATP)	Verhältnis
Therapiedauer in h (FACS)	Verhältnis
Anzahl vitaler Zellen in Mio	Verhältnis
Vitalität der Zellen nach Aufarbeitung	Verhältnis

Tab. A7: Laborchemische Parameter und ihre dazugehörige Skalierung

#### 6.1.4 Ergänzungen: Messung und Kompensation FACS Methode 1

Das FACS-Gerät musste vor Gebrauch stets nach einer vom Hersteller vorgegebenen Einschalttroutine eingeschaltet werden. Für die FACS Messung wurde aktuelle Messmaske geöffnet, die die folgenden Dot Plots und Histogramme enthielt:

- Dot Plot: SSC/FSC (y/x; SSC = Voltage (Spannung), FSC= Amp Gain (Verstärkung))
- Dot Plot: FSC/FL3 (y/x; FL3= PI)
- Dot Plot: FL2/FL1 (x/y; FL1= FITCS)
- Dot Plot: FL2/FL4 (x/y; FL4= APC)
- Dot Plot : FL4/FL1 (y/x)
- Histogramm : FL1
- Histogramm: FL4

Anschließend mussten die instrumental settings für das FACS geladen und die zu messende Zellzahl pro Messung festgelegt werden.

Zudem wurden ebenfalls die Patienten Batch Nummer (Patient ID), der Speicherort, der Dateiname (Sample ID), der File Count sowie das Probenpanel eingestellt.

Als nächster Schritt wurde die Zellpopulation mithilfe der ungefärbten Probe (immer Lösungsmittelkontrolle) eingestellt. Die Zellpopulation wurde so positioniert, so dass alle Zellen im SSC/FSC Plot sichtbar lagen (erfolgt durch Fenster „Detectors/Amps“).

Danach erfolgte die Einstellung der negativen Population mit der Isotypkontrolle. Dazu wurde im Dot Plot FL2/FL1 bzw. FL2/FL4 jeweils ein Quadrant gelegt und im Fenster „Detectors/Amps“ die FL1-4 Spannungen so eingestellt, dass die negative Population im unteren linken Quadranten platziert war.

Für die Fluoreszenzkomensation (zur Korrektur der Spektralüberlappung) wurde das TM/4 Röhrchen mit den FITC markierten Zellen (CD45) gemessen. Dabei sollten die Zellen im Plot FL2/FL1 mithilfe des „Compensation“ Fensters so eingestellt werden, dass die FITCS Population im unteren rechten Quadranten lagen.

Da der APC Kanal (FL4) durch den zweiten Laser angeregt wird, brauchte man hierfür nicht zu kompensieren, da sich die Spektralfarben nicht überlappen können.

Nach Beenden der Kompensation wurden alle weiteren Proben gemessen. Bei Doppelbestimmung (Von jeder Therapie wurden 2 Proben erstellt) wurde zuerst ein kompletter Therapieansatz durchgemessen, während die anderen Proben im Kühlschrank im Dunkeln gelagert wurden.

Die Einstellungen in den Doppelbestimmungen wurden nicht mehr verändert, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können und nicht zu verfälschen.

### 6.1.5 Ergänzungen: Messung und Kompensation FACS Methode 2

Die Messmaske sollte die folgenden Dot Plots und Histogramme enthalten:

- Dot Plot: SSC/FSC (y/x)
- Dot Plot: FL2/FL3 (y/x; FL2= EpCAM-PE; FL3=Trucount beads-PerCP)
- Dot Plot: FSC/FL4 (y/x; FL4= TO-PRO-3 -APC)
- Dot Plot: FL2/FL1 (y/x; FL1= CD45- FITC)
- Dot Plot: FL2/FL4 (y/x)
- Dot Plot: FL1/FL4 (y/x)
- Histogramm für FL1, FL2 und FL4

Der Dot Plot FL2/FL3 sollte die Region R4 enthalten, welche die Beads selektiv erfasst und für den Messstop der Probe wichtig ist. Damit die Beads während der Messung erfasst werden konnten, wurde der Threshold (= Reizschwelle) für FSC auf „0“ gesetzt.

Die Kompensation wurde exakt wie in Methode 1 durchgeführt mit dem einzigen Unterschied, dass die Autofluoreszenz (Isotyp Kontrolle) durch Spannungsänderungen in den FL1-4 Kanälen als diagonalen Streifen dargestellt wurde (Achsen Schnittpunkt 0/0).

Als nächstes wurde das Trucount bead Röhrchen ohne Zellen (beads only) gemessen und die Region R4 so angepasst, dass die Beads komplett erfasst wurden. Zuletzt wurden die Röhrchen mit CD45-FITC und EpCAM-PE allein gemessen und notwendigerweise kompensiert, bevor alle weiteren Proben der Reihe nach analysiert wurden.

## 6.2 Tabellen zu Patientenkollektivbeschreibung

### 6.2.1 Tabelle unerwünschte Nebenwirkungen der verschiedenen Chemotherapien

Unerwünschte Nebenwirkungen					
Toxizität	Ereignisse	total n	5-FU Monotherapie	Oxaliplatin basierte Therapie	andere*
gastrointestinal	Nausea/Erbrechen	10	1	3	
	Diarrhoe		4	2	

hämatologisch		14	2	11	1
allgemein	Fatigue		1		
	Ödeme			1	
	Hypotension			1	
	Leberentzündung	10		2	
	Allergische Reaktion			2	
	Ösophagitis				1
	Thrombose			2	
Hand-Fuss-Syndrom		4	3	1	
kardiopulmonal	Koronarspasmus	1		1	
	Dyspnoe	1		1	
neurologisch	Polyneuropathie	12		12	

Tab. A8: Unerwünschte Nebenwirkungen unter Chemotherapie; \*kombinierte Therapie mit Bevacicumab oder Cetuximab

## 6.2.2 Tabelle therapiebezogene Todesfälle nach UICC Einteilung

UICC Stadium	stadienbedingte Todesfälle	Oxaliplatin basiert	5-FU Mono	andere*	keine Chemotherapie	nicht tumor-assoziiert
I	1	0	0	0	0	1
II	8	0	1	0	6	1
III	7	3	0	1	2	1
IV	10	1	4	4	1	0

Tab. A9: Therapiebezogene Todesfälle nach UICC Einteilung; \*Kombinationstherapie mit Bevacicumab oder Cetuximab

## 6.3 Tabellen zu Labordaten ATP- Analyse

### 6.3.1 Tabelle Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test

Variablen	n	p-Wert (2-seitig)
<b>S-Only</b>		Kolmogorov- Smirnov- Test
mean therapy blank CPS TM4	100	0,000
mean therapy blank CPS LMH	106	0,000
mean therapy blank CPS LML	74	0,000
mean metabolic activity TM4	102	0,026
mean metabolic activity 5FU	45	0,200
mean metabolic activity FO	104	0,030
mean metabolic activity FOC	104	0,000
mean metabolic activity FI	104	0,126

mean metabolic activity FIC	104	0,086
<b>P-Only</b>		
mean therapy blank CPS TM4	99	0,000
mean therapy blank CPS LMH	103	0,000
mean therapy blank CPS LML	71	0,000
mean metabolic activity TM4	99	0,000
mean metabolic activity 5FU	45	0,200
mean metabolic activity FO	103	0,186
mean metabolic activity FOC	103	0,001
mean metabolic activity FI	102	0,011
mean metabolic activity FIC	102	0,040

Tab.A10: Kolmogorov-Smirnov-Test für S-Only und P-Only (ATP)

## 6.4 Tabellen zu Validierungsergebnissen

### 6.4.1 Zelltypisierung FACS S-Only

<b>S-Only Mediumkontrolle TM/4</b>					
Batch No.	Anteil EpCAM+ Zellen	Anteil CD45+ Zellen	Andere Zelltypen	CD45/ EpCAM Ratio	
4522	58,53	1,83	39,64	0,03	
4528	38,76	31,46	29,79	0,81	
4530	26,48	35,69	37,84	1,35	
4532	36,23	15,53	48,25	0,43	
4554	41,75	23,09	35,17	0,55	
4561	56,94	10,09	32,97	0,18	
4569	37,67	18,92	43,42	0,50	
4590	30,75	42,93	26,33	1,40	
4591	53,09	21,12	25,80	0,40	
4597	36,32	28,63	35,05	0,79	
4600	58,15	25,68	16,17	0,44	
4601	59,38	25,44	15,19	0,43	
4605	47,55	17,74	34,71	0,37	
4609	54,35	10,84	34,82	0,20	
4614	72,67	27,28	0,05	0,38	
4620	50,56	13,25	36,20	0,26	
4645	48,88	21,25	29,88	0,43	
4648	60,65	4,78	34,57	0,08	
4663	29,33	43,94	26,74	1,50	
4664	65,14	11,27	23,60	0,17	
4702	70,37	14,95	14,69	0,21	

4714	43,44	18,21	38,36	0,42
4723	44,34	18,00	37,67	0,41
4727	73,18	19,57	7,25	0,27
4932	19,90	15,24	64,86	0,77
4934	31,66	3,77	64,57	0,12
4941	11,45	52,15	36,40	4,55
4965	62,25	21,87	15,89	0,35
4992	34,30	7,73	57,98	0,23
5001	81,30	3,86	14,84	0,05
5007	21,81	20,15	58,05	0,92
5027	33,91	25,79	40,31	0,76
5038	65,25	9,07	25,69	0,14
5046	48,39	25,33	26,29	0,52
5087	75,67	7,24	17,09	0,10
<b>MEAN</b>	<b>48,01</b>	<b>19,82</b>	<b>32,17</b>	<b>0,59</b>
<b>MEDIAN</b>	<b>48,39</b>	<b>18,92</b>	<b>34,57</b>	<b>0,41</b>
<b>MIN</b>	<b>11,45</b>	<b>1,83</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>
<b>MAX</b>	<b>81,30</b>	<b>52,15</b>	<b>64,86</b>	<b>4,55</b>
<b>STABW</b>	<b>17,31</b>	<b>11,73</b>	<b>15,04</b>	<b>0,78</b>

Tab. A11: Anteil (in %) der vitalen EpCAM+/CD45+ Zellen sowie anderer Zelltypen mit der EpCAM/CD45-Ratio im FACS S-Only Modell zum Zeitpunkt S48h T0h

#### 6.4.2 Zelltypisierung FACS S+P-Only

<b>S+P Mediumkontrolle TM/4</b>					
Batch No.	Anteil EpCAM+ Zellen	Anteil CD45+ Zellen	Andere Zelltypen	CD45/ EpCAM Ratio	
4522	23,51	48,18	28,31	2,05	
4528	11,21	26,36	62,43	2,35	
4554	27,44	32,32	40,25	1,18	
4561	52,31	26,45	21,25	0,51	
4569	17,90	50,67	31,43	2,83	
4590	10,60	39,71	49,69	3,75	
4591	26,70	40,82	32,49	1,53	
4597	17,64	36,00	46,37	2,04	
4600	36,33	48,41	15,27	1,33	
4601	46,83	32,34	20,84	0,69	
4605	37,20	30,50	32,31	0,82	
4614	51,33	40,58	8,09	0,79	

4620	10,77	37,71	51,53	3,50
4645	20,15	45,30	34,56	2,25
4648	65,53	4,61	29,87	0,07
4663	20,93	55,96	23,12	2,67
4664	55,71	54,06	-9,76	0,97
4702	70,28	23,06	6,66	0,33
4723	6,60	54,73	38,67	8,29
4727	76,03	27,25	-3,28	0,36
5027	33,91	25,79	40,31	0,76
5101	25,88	52,05	22,08	2,01
<b>MEAN</b>	<b>33,85</b>	<b>37,85</b>	<b>28,30</b>	<b>1,87</b>
<b>MEDIAN</b>	<b>27,44</b>	<b>37,71</b>	<b>31,43</b>	<b>1,33</b>
<b>MIN</b>	<b>6,60</b>	<b>4,61</b>	<b>-9,76</b>	<b>0,07</b>
<b>MAX</b>	<b>76,03</b>	<b>55,96</b>	<b>62,43</b>	<b>8,29</b>
<b>STABW</b>	<b>20,57</b>	<b>12,90</b>	<b>17,77</b>	<b>1,77</b>

Tab. A12: Anteil (in %) der vitalen EpCAM+/CD45+ Zellen sowie anderer Zelltypen mit der EpCAM/CD45-Ratio im FACS S+P Modell zum Zeitpunkt S48h T0h

## 6.5 Tabellen zu Ergebnisdaten ATP-Analyse

### 6.5.1 Tabelle Übersicht Patientenproben n=106 in ATP Gesamtanalyse

Therapy	S-Only	P-Only
<b>TM/4</b>	n= 102	n= 99
Mean	100,51	100,41
Median	100,60	98,86
STABW	15,57	11,37
Min	61,18	73,78
Max	145,51	164,51
<b>5-FU</b>	n= 45	n= 45
Mean	36,52	62,07
Median	36,10	59,36
STABW	16,27	12,94
Min	4,02	30,58
Max	72,07	95,36
<b>FO</b>	n= 104	n= 103
Mean	24,26	43,87
Median	22,03	41,76
STABW	13,32	17,63
Min	0,97	3,55
Max	77	101,92
<b>FOC</b>	n= 104	n= 103

	Mean	24,47	45,47
	Median	22,06	41,64
	STABW	14,56	18,79
	Min	2,31	3,81
	Max	87,84	111,27
<b>FI</b>		n= 104	n= 102
	Mean	32,92	61,60
	Median	32,61	60,15
	STABW	15,81	18,51
	Min	1,02	9,85
	Max	91,42	120,61
<b>FIC</b>		n= 104	n= 102
	Mean	32,82	62,25
	Median	31,32	60,36
	STABW	15,57	17,67
	Min	1,62	10,71
	Max	84,55	121,27

Tab A13: Übersicht der mittleren metabolischen Restaktivität der Patientenproben n=106 für die ATP-Gesamtanalyse S-Only und P-Only

### 6.5.2 Tabelle Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich: FO/FI

Batch No.	FO Sonly		FI Sonly		p-Wert	FO Ponly		FI Ponly		p-Wert
	mmA in % LMK	STABW	mmA in % LMK	STABW		mmA in % LMK	STABW	mmA in % LMK	STABW	
5219	2,16	0,17	2,75	0,32	0,006*	26,56	0,39	60,09	2,88	0,011*
4659	4,83	0,23	8,48	0,41	0,050*	35,18	0,86	47,39	0,41	0,050*
4839	7,54	2,54	12,80	1,86	0,006*	36,18	2,96	65,15	4,61	0,004*
4663	7,86	0,26	16,43	0,60	0,021*	24,00	0,57	35,95	0,96	0,021*
5205	7,96	1,35	16,04	3,41	0,006*	50,50	1,96	53,31	4,42	0,200
5108	9,33	0,34	15,10	2,18	0,011*	9,33	0,34	15,10	2,18	0,011*
5234	9,39	2,65	23,38	2,21	0,004*	34,28	1,17	55,88	3,54	0,014*
4892	9,51	0,53	15,18	4,13	0,014*	51,03	1,60	74,78	3,59	0,016*
4918	10,44	1,15	16,17	1,42	0,004*	57,07	3,74	87,00	5,03	0,004*
5195	10,62	0,96	32,39	7,30	0,004*	76,82	1,42	77,25	2,65	0,715

5236	12,09	2,24	18,24	4,10	0,016*	41,76	2,72	46,31	1,72	0,010*
4927	12,32	0,85	35,56	6,04	0,004*	38,56	0,84	60,37	1,30	0,006*
5133	12,33	1,01	27,64	5,18	0,011*	52,55	2,10	62,64	5,09	0,006*
5027	13,00	1,48	33,94	4,95	0,004*	28,11	1,01	46,16	2,15	0,004*
5214	13,00	1,75	25,35	4,04	0,004*	59,37	6,32	75,57	3,85	0,004*
4688	13,52	3,88	23,75	1,80	0,021*	31,79	0,44	60,96	3,44	0,021*
4907	13,61	3,18	41,84	8,11	0,004*	29,00	1,87	48,93	4,66	0,004*
5041	13,74	1,89	27,68	1,85	0,004*	30,41	1,03	49,20	0,70	0,004*
4965	14,34	1,02	21,89	2,34	0,004*	28,68	1,59	59,42	18,32	0,004*
4648	14,61	1,07	21,75	1,81	0,009*	70,00	3,39	63,01	2,21	0,028*
4755	15,29	1,86	36,30	2,02	0,004*	40,90	3,56	62,57	7,16	0,004*
5182	15,64	0,69	22,76	6,12	0,025*	38,91	1,87	51,56	2,65	0,004*
5230	16,26	3,18	49,00	15,63	0,004*	46,38	5,55	58,97	3,30	0,004*
4929	16,73	3,58	32,14	7,54	0,006*	82,71	1,87	86,21	2,98	0,078
5125	16,83	1,97	24,48	5,27	0,010*	33,01	3,52	56,73	2,87	0,006*
4723	16,95	2,60	23,26	2,30	0,006*	40,75	1,19	52,53	1,64	0,004*
5079	17,11	6,17	33,65	8,78	0,010*	22,46	0,58	54,16	1,00	0,006*
5087	18,34	0,99	40,34	9,82	0,006*	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
5185	19,45	1,95	43,09	5,86	0,004*	37,55	0,76	50,67	0,15	0,011*
5201	19,51	3,80	32,13	1,94	0,004*	44,05	1,60	77,22	1,21	0,006*
5218	19,78	1,16	44,20	5,23	0,006*	34,37	0,29	56,66	4,99	0,020*
5135	20,65	4,54	31,77	4,71	0,006*	42,56	0,91	51,12	1,92	0,004*
4941	20,79	2,48	31,02	3,56	0,004*	35,10	2,05	61,63	3,45	0,004*
4932	21,08	4,18	30,80	4,90	0,011*	56,77	0,22	88,79	6,52	0,011*
4805	21,21	3,45	36,05	4,15	0,004*	101,92	9,32	116,99	5,66	0,025*
5038	21,39	1,94	39,82	3,42	0,006*	30,03	2,19	47,33	7,70	0,009*
5271	21,60	4,24	44,82	10,54	0,004*	43,60	1,68	57,06	3,57	0,006*
5151	23,22	2,98	38,42	2,11	0,004*	25,78	0,65	68,59	1,08	0,006*
5245	23,44	1,56	39,47	2,87	0,004*	26,91	0,46	51,80	1,78	0,011*
4943	23,87	1,24	36,01	5,34	0,008*	81,85	1,79	93,87	4,29	0,006*
5134	23,88	4,39	48,31	2,80	0,006*	45,99	1,46	64,32	2,14	0,004*

5104	23,89	0,91	60,49	10,12	0,006*	49,47	1,32	73,01	8,59	0,004*
4832	24,51	1,12	32,45	2,30	0,004*	68,76	2,24	n.a	n.a	n.a
5190	26,04	11,98	44,45	14,10	0,025*	29,87	1,63	52,62	0,05	0,020*
4741	26,06	2,20	40,38	6,37	0,004*	70,41	3,09	80,99	0,26	0,004*
5052	26,64	1,57	47,97	6,48	0,006*	63,59	0,21	63,31	1,76	0,855
4804	26,81	3,93	43,35	2,82	0,021*	74,47	4,69	102,56	6,29	0,021*
4645	28,18	0,76	35,24	0,83	0,050*	9,64	0,61	13,80	4,41	0,513
5046	30,03	5,31	39,28	1,96	0,010*	n.a	n.a	n.a	n.a	
4925	31,05	2,98	37,85	3,76	0,016*	65,41	0,82	74,69	1,40	0,004*
4915	31,14	4,04	47,70	5,32	0,009*	47,22	2,94	76,74	10,15	0,009*
5213	32,61	2,38	46,02	6,92	0,005*	52,56	4,80	65,94	9,58	0,006*
5102	33,30	1,42	42,91	5,27	0,010*	58,29	1,75	76,22	1,90	0,004*
4878	38,51	3,56	52,71	2,55	0,009*	27,27	1,34	46,08	0,09	0,010*
5174	42,41	11,75	68,32	6,65	0,006*	28,03	1,77	54,74	1,71	0,004*
5145	46,25	3,81	56,02	2,74	0,009*	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
4781	67,61	2,71	77,01	1,50	0,050*	77,01	2,59	98,55	3,01	0,004*
5150	4,55	2,25	1,02	0,40	0,004**	42,49	1,31	67,14	1,67	0,006*
5222	6,83	1,22	4,49	0,59	0,006**	55,78	8,49	81,20	10,77	0,006*
4664	19,82	0,89	17,45	1,24	0,021**	3,55	0,12	9,85	0,06	0,020*
4750	23,46	0,58	15,24	0,35	0,050**	64,97	4,86	79,39	6,42	0,050*
4702	35,99	4,20	25,80	3,24	0,006**	20,55	1,11	31,95	0,91	0,006*
4802	49,44	10,44	36,89	4,49	0,050**	35,69	1,71	66,72	3,01	0,006*
4933	53,99	3,82	44,55	3,82	0,005**	44,96	3,75	61,37	0,82	0,006*
4718	9,32	1,10	10,50	1,59	0,465	40,17	1,25	57,23	1,80	0,006*
4946	13,39	2,84	11,45	0,44	0,201	29,92	1,34	57,65	4,89	0,011*
5136	13,98	2,71	14,93	5,81	0,688	44,77	1,26	49,02	1,10	0,006*
4945	14,51	2,96	14,64	0,45	0,829	55,47	0,30	88,14	1,51	0,025*
5112	16,36	2,76	15,76	1,21	0,337	35,38	0,74	54,35	1,65	0,006*
4745	17,14	4,61	16,46	2,86	0,749	52,84	12,54	57,79	2,09	0,337
4731	17,97	1,47	24,66	3,31	0,337	41,68	0,56	50,48	1,76	0,004*
5260	19,49	6,72	15,71	3,61	0,262	37,83	1,59	61,00	1,24	0,006*

4863	20,27	1,46	25,96	1,22	0,200	51,23	1,57	76,97	2,32	0,006*
4778	21,37	5,69	24,31	11,24	0,631	32,91	3,84	39,02	6,82	0,055
5059	22,46	0,97	22,74	7,90	1,000	26,05	0,54	56,32	2,12	0,004*
4865	23,17	4,48	19,06	4,07	0,262	32,40	1,52	59,99	5,88	0,016*
4983	24,72	0,63	25,65	3,64	1,000	33,02	1,06	57,41	2,13	0,004*
4934	24,83	8,13	25,45	1,88	0,394	54,67	2,40	87,42	1,68	0,025*
5007	26,40	3,99	26,67	5,31	0,873	25,49	2,48	55,67	5,11	0,004*
4708	26,48	3,42	25,38	2,30	0,251	59,49	1,86	81,70	2,52	0,014*
4852	26,98	7,35	28,41	6,85	0,749	39,57	0,85	54,99	1,35	0,004*
4646	28,02	6,96	26,11	2,93	0,827	7,99	0,34	30,13	1,79	0,050*
4982	28,03	6,06	39,56	10,30	0,513	31,95	0,89	49,11	5,51	0,050*
4838	28,48	1,39	34,96	6,09	0,127	58,94	15,87	76,79	12,65	0,275
5163	31,10	5,39	32,76	3,26	0,631	39,13	1,17	48,38	1,21	0,004*
5173	32,19	3,56	36,73	4,76	0,055	42,05	1,64	47,59	0,94	0,004*
4772	33,19	6,97	35,81	3,21	0,262	61,90	7,61	62,40	3,73	0,873
5180	36,36	23,59	36,36	16,40	1,000	18,49	2,76	28,24	3,15	0,006*
5162	33,48	6,26	27,98	5,87	0,201	36,88	1,94	48,03	2,07	0,004*
5217	33,55	21,23	52,25	17,91	0,092	45,53	1,75	60,20	3,67	0,004*
4888	33,63	12,07	42,14	7,52	0,248	45,49	8,51	56,62	4,90	0,028*
4816	33,91	4,00	33,59	4,81	0,936	36,14	1,78	63,13	1,70	0,004*
5001	35,24	4,84	36,57	7,35	0,522	53,78	1,80	69,43	1,07	0,004*
5101	36,35	1,53	38,03	5,16	0,423	68,95	0,17	76,60	2,07	0,006*
4807	36,72	5,14	38,68	3,02	0,423	44,00	3,67	76,89	7,05	0,004*
5166	39,67	2,32	52,25	12,43	0,248	29,57	2,13	60,77	1,90	0,006*
5147	41,17	5,57	40,17	7,88	0,749	35,15	4,02	44,13	3,04	0,010*
5036	44,30	17,47	66,78	41,29	0,513	65,98	2,56	74,22	1,64	0,050*
4828	44,85	8,62	36,76	2,67	0,149	55,59	8,43	54,40	10,17	1,000
5261	51,37	13,93	51,88	8,77	0,873	20,78	0,96	39,97	2,45	0,004*
4727	54,89	6,62	56,51	3,60	0,337	26,01	1,76	46,00	1,15	0,004*
4858	67,60	24,99	89,72	10,09	0,078	45,49	8,51	56,62	4,90	0,004*
4991	76,99	12,18	87,84	9,28	0,055	49,31	1,89	73,11	5,17	0,004*

Tab. A14: Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich FO/FI in S-Only mit der jeweiligen mmA und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau

FO> FI    FI> FO    FO=FI

\* Effektivität/Toxizität FO>FI ; \*\* Effektivität/Toxizität FI>FO

6.5.3 Tabelle Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich: 5-FU/ FO

Batch No.	5-FU Sonly		FO Sonly		p-Wert	5-FU Ponly		FO Ponly		p-Wert
	mmA in % LMK	STABW	mmA in % LMK	STABW		mmA in % LMK	STABW	mmA in % LMK	STABW	
5219	4,02	0,52	2,16	0,17	0,006*	57,31	3,43	26,56	0,39	0,011*
5222	8,51	1,00	6,83	1,22	0,025*	95,36	11,74	55,78	8,49	0,004*
5205	18,67	6,35	7,96	1,35	0,006*	59,36	1,72	50,50	1,96	0,004*
5182	24,60	4,18	15,64	0,69	0,011*	52,21	2,12	38,91	1,87	0,004*
5214	24,63	4,98	13,00	1,75	0,004*	81,66	4,36	59,37	6,32	0,004*
5136	24,72	4,43	13,98	2,71	0,006*	50,34	1,44	44,77	1,26	0,004*
4965	25,00	5,04	14,34	1,02	0,004*	58,64	2,24	28,68	1,59	0,004*
4946	26,60	5,85	13,39	2,84	0,006*	47,85	8,20	29,92	1,34	0,011*
5234	27,81	2,79	9,39	2,65	0,004*	58,01	4,29	34,28	1,17	0,011*
5218	29,40	2,45	19,78	1,16	0,006*	56,93	2,97	34,37	0,29	0,020*
5135	31,35	5,14	20,65	4,54	0,010*	57,12	0,68	42,56	0,91	0,006*
5230	31,43	5,40	16,26	3,18	0,004*	60,37	6,43	46,38	5,55	0,004*
5271	32,40	6,09	21,60	4,24	0,010*	65,24	3,36	43,60	1,68	0,006*
4892	32,45	6,81	9,51	0,53	0,011*	70,48	2,26	51,03	1,60	0,006*
5201	33,04	5,19	19,51	3,80	0,006*	67,23	2,44	44,05	1,60	0,006*
4865	34,47	4,22	23,17	4,48	0,006*	68,90	3,77	45,49	8,51	0,004*
5195	35,29	2,03	10,62	0,96	0,006*	75,51	1,82	76,82	1,42	0,234*
4941	36,10	2,89	20,79	2,48	0,004*	62,13	3,51	35,10	2,05	0,004*
4943	38,14	15,27	23,93	1,24	0,011*	93,20	4,77	81,85	1,79	0,006*

5185	38,43	6,92	19,45	1,95	0,004*	48,51	2,28	37,55	0,76	0,006*
4907	38,92	3,88	13,61	3,18	0,004*	52,35	4,51	29,00	1,87	0,006*
5151	40,65	4,11	23,22	2,98	0,004*	70,14	1,27	25,78	0,65	0,006*
5245	42,13	4,03	23,44	1,56	0,004*	54,79	1,71	26,91	0,46	0,004*
5163	42,99	3,99	31,10	5,39	0,006*	50,66	2,74	39,13	1,17	0,004*
5173	52,92	2,96	32,19	3,56	0,004*	52,44	1,18	42,05	1,64	0,004*
4915	57,42	2,06	31,14	4,04	0,014*	69,96	0,99	47,22	2,94	0,009*
5213	61,07	2,54	32,61	2,38	0,006*	66,38	9,89	52,56	4,80	0,016*
5145	62,09	1,14	46,25	3,81	0,014*	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
5134	67,89	20,54	23,88	4,39	0,004*	59,35	1,30	45,99	1,46	0,004*
5174	72,07	13,15	42,41	11,75	0,006*	63,28	3,52	28,03	1,77	0,004*
5150	4,33	1,50	4,55	2,25	0,873	70,50	2,21	42,49	1,31	0,009*
5112	15,62	2,26	16,36	2,76	0,630	55,79	2,68	35,38	0,74	0,006*
5236	16,34	6,57	12,09	2,24	0,109	55,90	5,05	41,76	2,72	0,004*
5260	20,51	5,60	19,49	6,72	0,873	67,06	2,34	37,83	1,59	0,004*
4863	21,86	3,32	20,27	1,46	0,423	76,06	1,08	51,23	1,57	0,006*
5162	38,44	7,72	33,48	6,26	0,332	46,01	2,24	36,88	1,94	0,004*
4982	38,88	10,48	28,03	6,06	0,275	48,55	0,20	31,95	0,89	0,050*
5217	39,92	15,74	33,55	21,23	0,423	68,41	0,62	45,53	1,75	0,011*
5190	40,73	2,34	26,04	11,98	0,088	48,47	2,64	29,87	1,63	0,004*
5147	41,95	2,21	41,17	5,57	1,000	81,46	4,49	35,15	4,02	0,006*
4888	42,34	12,37	33,63	12,07	0,462	75,93	5,72	57,48	6,06	0,009*
5261	47,42	13,01	51,37	13,93	0,631	49,90	2,59	20,78	0,96	0,004*
5166	53,07	16,66	39,67	2,32	0,327	60,51	1,35	29,57	2,13	0,004*
5180	56,41	24,87	29,84	26,47	0,272	30,58	1,03	18,49	2,76	0,006*
4894	69,29	21,59	49,80	20,06	0,275	49,70	1,15	45,98	1,90	0,050*

FO > 5FU    FO = 5FU

\* Effektivität/Toxizität FO > 5FU

Tab. A15: Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich 5-FU/FO in S-Only mit der jeweiligen mmA und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau

6.5.4 Tabelle Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich: 5-FU/ FI

Batch No.	5-FU Sonly		FI Sonly		p-Wert	5-FU Ponly		FI Ponly		p-Wert
	mmA in % LMK	STABW	mmA in % LMK	STABW		mmA in % LMK	STABW	mmA in % LMK	STABW	
5219	4,02	0,52	0,32	3,13	0,005*	57,31	3,43	60,09	2,88	0,180
5150	4,33	1,50	1,02	0,40	0,004*	70,50	2,21	67,14	1,67	0,045*
5222	8,51	1,00	4,49	0,59	0,004*	95,36	11,74	81,20	10,77	0,055
5136	24,72	4,43	14,93	5,81	0,022*	50,34	1,44	49,02	1,10	0,144
4946	26,60	5,85	11,45	0,44	0,009*	47,85	8,20	57,65	4,89	0,037**
5234	27,81	2,79	23,38	2,21	0,020*	58,01	4,29	55,88	3,54	0,465
4892	32,45	6,81	15,18	4,13	0,006*	70,48	2,26	74,78	3,59	0,055
4865	34,47	4,22	19,06	4,07	0,004*	68,90	3,77	56,62	4,90	0,004*
4941	36,10	2,89	31,02	3,56	0,037*	62,13	3,51	61,63	3,45	0,873
5162	38,44	7,72	27,98	5,87	0,044*	46,01	2,24	48,03	2,07	0,055
5163	42,99	3,99	32,76	3,26	0,006*	50,66	2,74	48,38	1,21	0,109
5173	52,92	2,96	36,73	4,76	0,004*	52,44	1,18	47,59	0,94	0,004*
4915	57,42	2,06	47,70	5,32	0,027*	69,96	0,99	76,74	10,15	0,028**
5213	61,07	2,54	46,02	6,92	0,006*	66,38	9,89	65,94	9,58	0,873
5145	62,09	1,14	56,02	2,74	0,014*	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
4863	21,86	3,32	25,96	1,22	0,028**	76,06	1,08	76,97	2,32	0,715
5218	29,40	2,45	44,20	5,23	0,004**	56,93	2,97	56,66	4,99	0,631
5230	31,43	5,40	49,00	15,63	0,037**	60,37	6,43	58,97	3,30	0,522
5112	15,62	2,26	15,76	1,21	0,810	55,79	2,68	54,35	1,65	0,522
5236	16,34	6,57	18,24	4,10	0,749	55,90	5,05	46,31	1,72	0,004*
5205	18,67	6,35	16,04	3,41	0,423	59,36	1,72	53,31	4,42	0,010*
5260	20,51	5,60	15,71	3,61	0,078	67,06	2,34	61,00	1,24	0,006*
5182	24,60	4,18	22,76	6,12	0,470	52,21	2,12	51,56	2,65	0,522
5214	24,63	4,98	25,35	4,04	0,749	81,66	4,36	75,57	3,85	0,037*
4965	25,00	5,04	21,89	2,34	0,150	58,64	2,24	59,42	18,32	0,055
5135	31,35	5,14	31,77	4,71	0,873	57,12	0,68	51,12	1,92	0,006*
5271	32,40	6,09	44,82	10,54	0,078	65,24	3,36	57,06	3,57	0,004*

5201	33,04	5,19	32,13	1,94	0,470	67,23	2,44	77,22	1,21	0,009**
5195	35,29	2,03	32,39	7,30	0,715	75,51	1,82	77,25	2,65	0,337
4943	38,14	15,27	36,01	5,34	0,522	93,20	4,77	93,87	4,29	0,631
5185	38,43	6,92	43,09	5,86	0,261	48,51	2,28	50,67	0,15	0,142
4982	38,88	10,48	39,56	10,30	0,513	48,55	0,20	74,78	3,59	0,513
4907	38,92	3,88	41,84	8,11	0,262	52,35	4,51	48,93	4,66	0,273
5217	39,92	15,74	52,25	17,91	0,378	68,41	0,62	60,20	3,67	0,011*
5151	40,65	4,11	38,42	2,11	0,262	70,14	1,27	68,59	1,08	0,175
5190	40,73	2,34	44,45	14,10	0,394	48,47	2,64	52,62	0,05	0,020**
5147	41,95	2,21	40,17	7,88	0,470	81,46	4,49	44,13	3,04	0,006*
5245	42,13	4,03	39,47	2,87	0,149	54,79	1,71	51,80	1,78	0,004*
4888	42,34	12,37	42,14	7,52	0,805	75,93	5,72	75,31	11,39	0,754
5261	47,42	13,01	51,88	8,77	0,522	49,90	2,59	39,97	2,45	0,004*
5166	53,07	16,66	52,25	12,43	0,806	60,51	1,35	60,77	1,90	0,855
5180	56,41	24,87	36,36	16,40	0,169	30,58	1,03	28,24	3,15	0,109
5134	67,89	20,54	48,31	2,80	1,000	59,35	1,30	64,32	2,14	0,004**
5174	72,07	13,15	68,32	6,65	0,423	63,28	3,52	54,74	1,71	0,006*
4894	69,29	21,59	n.a	n.a	n.a	49,70	1,15	n.a	n.a	n.a

Tab. A16: Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich 5-FU/FI in S-Only mit der jeweiligen mma und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau

FI> 5FU    FI=5FU    5FU>FI

\* Effektivität/Toxizität FI>5-FU ; \*\* Effektivität/Toxizität 5-FU>FI

## 6.6 Tabellen zu Labor-/Ergebnisdaten der FACS-Analyse

### 6.6.1 Tabelle Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk der Medium/Lösungsmittelkontrollen

a) für S-Only und S+P

Variablen	Häufigkeiten	p-Wert K-S	p-Wert Shapiro Wilk
<b>S-Only</b>			
Vitality all cells TM/4	35	0,056	0,002
% vital EpCAM cells TM/4	35	0,200	0,755
Fraction of EpCAM cells TM/4	35	0,200	0,917
Vitality EpCAM cells TM/4	35	0,000	0,0001

% vital CD45 cells TM/4	35	0,200	0,062
Fraction of CD45 cells TM/4	35	0,200	0,108
Vitality CD45 cells TM/4	35	0,200	0,172
Vitality all cells LMH	16	0,200	0,479
% vital EpCAM cells LMH	16	0,059	0,053
Fraction of EpCAM cells LMH	16	0,059	0,033
Vitality EpCAM cells LMH	16	0,036	0,001
% vital CD45 cells LMH	15	0,200	0,105
Fraction of CD45 cells LMH	15	0,200	0,100
Vitality CD45 cells LMH	15	0,200	0,192
<b>S+P</b>			
Vitality all cells TM/4	23	0,200	0,492
% vital EpCAM cells TM/4	22	0,068	0,069
Fraction of EpCAM cells TM/4	22	0,108	0,108
Vitality EpCAM cells TM/4	22	0,009	0,037
% vital CD45 cells TM/4	22	0,200	0,669
Fraction of CD45 cells TM/4	22	0,200	0,258
Vitality CD45 cells TM/4	22	0,058	0,013
% vital EpCAM cells LMH	22	0,003	0,011
Fraction of EpCAM cells LMH	22	0,001	0,015
Vitality EpCAM cells LMH	22	0,091	0,015
% vital CD45 cells LMH	22	0,200	0,680
Fraction of CD45 cells LMH	22	0,200	0,748
Vitality CD45 cells LMH	22	0,200	0,405

Tab. A17: Kolmogorov-Smirnov-Test sowie Shapiro-Wilk Analyse für S-Only/ S+P der Medium/Lösungsmittelkontrollen (FACS)

b) für P-Only

Variablen	Häufigkeiten	p-Wert K-S	p-Wert Shapiro Wilk
Vitality all PBMCs (ungefärbt)	12	0,200	0,631
% vital CD45 cells	13	0,200	0,140
Fraction of CD45 cells	13	0,200	0,647
Vitality CD45 cells	13	0,200	0,464

Tab. A18: Kolmogorov-Smirnov-Test sowie Shapiro-Wilk Analyse für P-Only der Medium/Lösungsmittelkontrollen (FACS)

6.6.2 Tabelle Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilk der Therapieergebnisse FACS

a) für FACS S-Only

Variablen S-Only	Häufigkeiten	p-Wert K-S	p-Wert Shapiro Wilk
Mean % LK EpCAM TM/4	14	0,001	0,0001
Mean % LK EpCAM FO	14	0,016	0,019
Mean % LK EpCAM FOC	13	0,200	0,699
Mean % LK EpCAM FI	14	0,074	0,024
Mean % LK EpCAM FIC	12	0,079	0,254
Mean % LK CD45 TM/4	14	0,001	0,0001
Mean % LK CD45 FO	14	0,001	0,002
Mean % LK CD45 FOC	13	0,035	0,021
Mean % LK CD45 FI	13	0,200	0,380
Mean % LK CD45 FIC	12	0,200	0,279

b) für FACS S+P

Variablen S+P	Häufigkeiten	p-Wert K-S	p-Wert Shapiro Wilk
Mean % LK EpCAM TM/4	22	0,106	0,018
Mean % LK EpCAM FO	22	0,0001	0,0001
Mean % LK EpCAM FOC	22	0,0001	0,0001
Mean % LK EpCAM FI	22	0,007	0,0001
Mean % LK EpCAM FIC	22	0,007	0,0001
Mean % LK CD45 TM/4	22	0,043	0,008
Mean % LK CD45 FO	22	0,001	0,0001
Mean % LK CD45 FOC	22	0,001	0,0001
Mean % LK CD45 FI	22	0,043	0,001
Mean % LK CD45 FIC	22	0,200	0,601

Tab. A19: Kolmogorov-Smirnov-Test sowie Shapiro-Wilk Analyse der Therapieergebnisse FO/FOC/FI/FIC für a) S-Only und b) S+P

6.6.3 Tabellen Vitalität für EpCAM+ und CD45+ in S-Only

a) Mediumkontrolle TM/4

Batch No.	% EpCAM vital mean	STABW EpCAM vital	Vitalität EpCAM in % LMK	STABW	% CD45 vital mean	STABW CD45 vital	Vitalität CD45 in % LMK	STABW
<b>S-Only: Mediumkontrolle TM/4</b>								
4530	32,69	2,31	109,26	7,73	28,71	3,49	85,05	10,33
4532	39,47	1,97	167,49	8,34	10,50	2,84	224,60	60,80
4609	56,92	1,06	87,90	1,64	8,50	4,94	73,09	42,44
4714	49,54	3,37	97,04	6,59	14,88	0,21	94,93	1,35

Batch No.	Vitale Zellzahl EpCAM mean	STABW EpCAM vital	MEAN % LK	STABW LK	Vitale Zellzahl CD45 mean	STABW CD45 vital	MEAN % LK	STABW LK
4932	3030,72		96,66		1060,36		101,36	
4934	17335,46		83,00		150,00		68,50	
4941	6655,72		92,97		38236,25		111,78	
4965	26351,85	7111,46	173,40	25,20	2267,69	191,48	95,57	17,84
4992	77764,06	15419,38	259,41	32,71	5819,04	709,24	59,26	3,56
5001	53939,95	715,67	101,65	15,82	5654,71	292,64	106,16	11,52
5007	6715,68	2534,02	92,16	13,99	5587,10	2049,51	94,24	18,36
5038	9641,90	3590,00	122,37	1,08	953,86	693,45	86,96	37,78
5046	9674,40	3411,11	105,89	3,42	3454,66	966,14	113,09	11,82
5087	46800,31	10764,73	105,02	14,74	3907,39	894,33	110,29	20,50

### b) Therapieansatz FO

Batch No.	% EpCAM vital mean	STABW EpCAM vital	Vitalität EpCAM in % LMK	STABW	% CD45 vital mean	STABW CD45 vital	Vitalität CD45 in % LMK	STABW
<b>S-Only: Therapieansatz FO Methode 1</b>								
4530	33,12	0,91	110,70	3,05	31,29	1,51	92,71	4,48
4532	40,72	12,86	172,80	54,55	13,47	1,46	288,13	31,16
4609	59,80	5,46	92,35	8,43	9,12	0,49	78,42	4,26
4714	53,05	5,93	103,91	11,62	16,10	0,69	102,71	4,42
Batch No.	Vitale Zellzahl EpCAM mean	STABW EpCAM vital	MEAN % LK	STABW LK	Vitale Zellzahl CD45 mean	STABW CD45 vital	MEAN % LK	STABW LK
<b>S-Only: Therapieansatz FO Methode 2</b>								
4932	3061,87		97,69		400,30		38,26	
4934	23975,16		108,35		38,29		8,38	
4941	9904,84		172,69		19822,84		69,84	
4965	29818,43	14776,00	149,24	43,30	1569,60	337,50	64,98	3,61
4992	54362,76	5815,92	205,48	1,65	11124,10	234,02	113,79	9,45
5001	46142,81	6795,10	85,96	0,41	4873,04	171,87	92,12	17,93
5007	6067,93	1924,60	83,88	7,41	4976,52	1649,62	84,22	13,29
5038	5570,71	2200,67	81,81	59,01	1093,87	533,35	104,47	16,00
5046	10699,95	4022,98	116,65	6,69	3566,69	1212,06	115,35	4,78
5087	45403,56	2296,26	103,20	14,59	4142,76	490,88	117,22	8,77

### c) Therapieansatz FI

Batch No.	% EpCAM vital mean	STABW EpCAM vital	Vitalität EpCAM in % LMK	STABW	% CD45 vital mean	STABW CD45 vital	Vitalität CD45 in % LMK	STABW
<b>S-Only: Therapieansatz FI Methode 1</b>								
4530	34,28	0,44	114,59	1,47	31,28	0,70	94,13	92,67
4532	34,33	6,52	145,68	27,67	10,28	5,56	303,96	219,89
4609	63,11	3,07	97,46	4,74	9,17	0,76	78,85	6,57
4714	49,65	4,44	97,26	8,70	16,06	0,51	102,46	3,25
Batch No.	Vitale Zellzahl EpCAM mean	STABW EpCAM vital	MEAN % LK	STABW LK	Vitale Zellzahl CD45 mean	STABW CD45 vital	MEAN % LK	STABW LK
<b>S-Only: Therapieansatz FI Methode 2</b>								

4932	3049,24		97,29		316,73		30,27	
4934	19207,61		86,80		33,44		7,32	
4941	5696,87		99,33		17206,40		60,62	
4965	13178,51	4733,44	86,21	20,48	826,63	185,32	34,18	1,58
4992	46303,28	427,90	176,03	19,05	11556,71	646,40	118,35	13,94
5001	64296,08	17778,84	123,44	50,72	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
5007	7456,47	2390,04	103,03	9,46	5243,89	2094,74	88,19	20,22
5038	11668,71	1360,29	155,85	42,07	1296,85	169,94	132,23	29,28
5046	8180,88	3448,85	88,49	9,44	2961,67	1299,77	93,87	6,17
5087	51139,86	3528,49	115,60	2,57	3978,31	295,85	112,68	3,44

Tab. A20: Vitalitätsberechnung nach Methode 1 und 2 in S-Only für EpCAM+ und CD45+Zellen für a) Mediumkontrolle TM/4; b) Therapie mit FO; c) Therapie mit FI

#### 6.6.4 Tabellen Vitalität für EpCAM+ und CD45+ in S+P

##### a) Mediumkontrolle TM/4

Batch No.	% EpCAM vital mean	STABW EpCAM vital	Vitalität EpCAM in % LMK	STABW	% CD45 vital mean	STABW CD45 vital	Vitalität CD45 in % LMK	STABW
<b>S+P: Mediumkontrolle TM/4 Methode 1</b>								
4522	26,59		113,34				93,16	
4528	11,92	4,02	113,10	38,19	26,23	1,25	95,49	4,56
4533	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
4554	29,45	1,75	105,42	6,25	33,29	4,09	126,63	15,58
4561	56,77	1,58	95,80	2,66	26,59	0,07	101,26	0,27
4569	19,75	3,14	102,62	16,31	51,19	0,53	95,63	0,99
4590	11,27	0,01	65,69	0,04	38,34	0,84	94,20	2,07
4591	29,62	0,04	106,47	0,13	38,35	1,63	105,04	4,47
4597	18,44	4,94	90,99	24,36	34,46	1,48	101,86	4,37
4600	41,71	3,25	99,88	7,79	49,52	1,36	99,62	2,73
4601	48,68	1,34	89,91	2,47	32,49	0,31	101,50	0,97
4605	40,44	4,37	66,47	7,18	30,31	0,40	104,77	1,37
4614	57,99	1,80	92,18	2,85	42,59	0,06	101,49	0,15
4620	11,02	1,36	102,42	12,62	36,26	0,37	100,14	1,02
4645	21,08	0,15	99,55	0,70	43,18	0,11	102,33	0,27
4648	68,69	0,02	110,92	0,03	3,66	0,14	99,32	3,84
4663	85,30	2,66	95,46	2,97	105,08	23,40	118,82	26,46
4664	59,98	0,11	95,75	0,18	55,72	0,06	99,01	0,10
4702	72,53	3,26	110,86	4,98	23,03	1,36	105,60	6,26
4723	7,58	2,43	107,83	34,52	56,98	25,07	74,91	32,96
4727	78,03	0,86	99,39	1,10	27,32	0,84	107,33	3,31
Batch No.	Vitale Zellzahl EpCAM mean	STABW EpCAM vital	MEAN % LK	STABW LK	Vitale Zellzahl CD45 mean	STABW CD45 vital	MEAN % LK	STABW LK
<b>S+P: Mediumkontrolle TM/4 Methode 2</b>								
5027	9853,79	1908,69	145,09	7,35	2317,27	97,39	74,03	57,85
5101	9846,47	1099,02	96,25	10,56	17367,50	60,59	100,71	0,35

##### b) Therapieansatz FO

Batch No.	% EpCAM vital mean	STABW EpCAM vital	Vitalität EpCAM in % LMK	STABW	% CD45 vital mean	STABW CD45 vital	Vitalität CD45 in % LMK	STABW
<b>S+P: Therapieansatz FO Methode 1</b>								

4522	31,47		134,14		46,03		89,76	
4528	21,54	1,53	204,46	14,50	27,90		101,58	
4533	6,68		163,33		4,86		82,94	
4554	26,16	2,88	93,66	10,33	25,69	1,84	97,74	6,99
4561	67,82	2,57	114,45	4,33	18,34	0,00	69,84	0,00
4569	26,88	2,31	139,65	12,01	44,91	0,28	83,90	0,52
4590	15,34	2,21	89,42	12,91	33,71	0,38	82,84	0,94
4591	31,00	1,22	111,43	4,40	33,22	6,18	91,00	16,93
4597	24,72	5,82	121,96	28,72	21,83	4,24	64,52	12,52
4600	56,06	3,30	134,24	7,89	45,62	0,92	91,77	1,85
4601	61,75	0,41	114,07	0,76	28,53	1,22	89,11	3,82
4605	61,09	0,52	100,41	0,85	27,35	0,93	94,52	3,20
4614	60,88	0,08	96,77	0,13	38,44	4,14	91,61	9,88
4620	11,50	1,42	106,83	13,21	34,07	0,54	94,08	1,50
4645	23,22	0,67	109,66	3,17	33,28	5,59	78,87	13,24
4648	71,16	0,01	114,91	0,01	3,73	0,20	101,22	5,37
4663	88,07	3,62	98,55	4,05	78,99	5,56	89,32	6,29
4664	66,76	1,31	106,56	2,09	41,38	0,04	73,52	0,06
4702	67,95	0,25	103,86	0,38	24,29	2,76	111,40	12,65
4723	19,96	2,30	284,06	32,71	70,78	0,86	93,06	1,13
4727	80,65	1,15	102,72	1,47	24,74	1,36	97,21	5,33
Batch No.	Vitale Zellzahl EpCAM mean	STABW EpCAM vital	MEAN % LK	STABW LK	Vitale Zellzahl CD45 mean	STABW CD45 vital	MEAN % LK	STABW LK
<b>S+P: Therapieansatz FO Methode 2</b>								
5027	10027,50	2264,34	147,06	2,63	525,85	617,09	15,34	17,53
5101	14109,48	2456,58	137,91	23,75	15554,45	982,53	90,25	1,11

### c) Therapieansatz FI

Batch No.	% EpCAM vital mean	STABW EpCAM vital	Vitalität EpCAM in % LMK	STABW	% CD45 vital mean	STABW CD45 vital	Vitalität CD45 in % LMK	STABW
<b>S+P: Therapieansatz FI Methode 1</b>								
4522	31,26		133,25		44,32		86,43	
4528	15,17	0,95	144,00	8,99	24,64	0,73	89,70	2,65
4533	3,79		92,67		5,23		89,25	
4554	27,60	0,84	98,80	3,01	28,07	0,49	106,79	1,88
4561	65,14	2,76	109,92	4,67	25,12	0,44	95,66	1,67
4569	28,75	5,80	149,39	30,13	44,62	0,19	83,35	0,36
4590	15,05	0,64	87,76	3,71	33,60	3,25	82,57	7,99
4591	28,65	0,71	102,98	2,57	34,93	1,66	95,67	4,55
4597	24,97	3,73	123,19	18,39	27,05	0,96	79,97	2,84
4600	51,92	0,59	124,32	1,41	44,96	1,25	90,43	2,52
4601	59,05	2,52	109,08	4,65	29,27	0,05	91,42	0,15
4605	59,59	0,98	97,95	1,62	27,91	0,48	96,47	1,66
4614	61,52	0,95	97,78	1,52	48,95	2,69	116,65	6,42
4620	11,78	1,12	109,48	10,38	38,64	0,43	106,70	1,19
4645	23,40	0,54	110,53	2,54	37,77	2,49	89,51	5,90
4648	70,29	0,75	113,51	1,21	3,51	0,42	95,25	11,51
4663	87,63	4,13	98,06	4,62	78,34	5,67	88,59	6,41
4664	66,42	1,92	106,03	3,07	47,84	1,63	85,00	2,90
4702	69,64	1,27	106,44	1,93	22,21	1,91	101,86	8,76
4723	18,28	4,32	260,14	61,50	71,30	0,27	93,75	0,35
4727	80,62	0,13	102,68	0,17	24,94	0,50	97,98	1,97

Batch No.	Vitale Zellzahl EpCAM mean	STABW EpCAM vital	MEAN % LK	STABW LK	Vitale Zellzahl CD45 mean	STABW CD45 vital	MEAN % LK	STABW LK
<b>S+P: Therapieansatz FI Methode 2</b>								
5027	9150,64	4525,18	129,69	34,68	1333,95	730,58	40,15	18,66
5101	13475,92	182,39	131,74	2,03	15200,98	218,80	88,36	5,40

Tab. A21: Vitalitätsberechnung nach Methode 1 und 2 in S+P für EpCAM+ und CD45+Zellen für a) Mediumkontrolle TM/4; b) Therapie mit FO; c) Therapie mit FI

### 6.6.5 P-Werte aus Mann-Whitney-U Test für S+P FACS Therapieergebnisse

#### a) EpCAM+

Batch No.	EPCAM + Zellen				
		FO	FOC	FI	FIC
4528	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,667	0,333
4554	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	1,000	0,333	0,667
4561	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4569	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4590	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4591	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	1,000
4597	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,667	0,333	0,333	0,333
4600	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4601	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4605	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4614	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4620	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	1,000	0,667	0,667	0,667
4645	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,667	0,333	0,333
4648	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4663	TM/4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,667	0,333

4664	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4702	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,667	0,333
4723	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4727	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,667	0,333	0,333
5027	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	1,000	0,333	1,000	0,667
5101	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333

b) CD45+

Batch No.	CD45+ Zellen				
		FO	FOC	FI	FIC
4528	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,667	0,667	0,333	1,000
4554	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4561	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4569	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4590	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4591	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,667	0,333	0,333	0,333
4597	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4600	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4601	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	1,000
4605	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4614	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	1,000	0,333	0,333
4620	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	1,000	0,333	0,333	0,333
4645	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	1,000	0,333	0,333

4648	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s..	n.s.	n.s.
	p-value	0,667	0,333	1,000	0,333
4663	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4664	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s..	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
4702	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,667	0,333	0,667	0,667
4723	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	1,000	1,000	1,000	1,000
4727	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333
5027	<b>TM/4</b>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,667	1,000
5101	<b>TM/4</b>	n.s..	n.s.	n.s.	n.s.
	p-value	0,333	0,333	0,333	0,333

Tab. A22: Mann-Whitney-U-Testung mit p-Werten von TM/4 vs. den einzelnen Therapieregimes FO/FOC/FI/FIC in S+P in der FACS-Analyse; a) für EpCAM+ Zellen; b) für CD45+ Zellen

#### 6.6.6 P-Werte aus Kruskal-Wallis Test in S+P: Vergleich aller Therapien untereinander n=22 für EpCAM+ und CD45+

Batch No.	EpCAM +	p-value	CD45 +	p-value
4522	n.s.	0,406	n.s.	0,406
4528	n.s.	0,093	n.s.	0,675
4554	n.s.	0,101	n.s.	0,101
4561	n.s.	0,155	n.s.	0,067
4569	n.s.	0,254	n.s.	0,089
4590	n.s.	0,089	n.s.	0,380
4591	n.s.	0,155	n.s.	0,447
4597	n.s.	0,106	n.s.	0,078
4600	n.s.	0,093	n.s.	0,093
4601	n.s.	0,101	n.s.	0,479
4605	n.s.	0,081	n.s.	0,120
4614	n.s.	0,333	n.s.	0,093
4620	n.s.	0,860	n.s.	0,081
4645	n.s.	0,096	n.s.	0,463
4648	n.s.	0,078	n.s.	0,373
4663	n.s.	0,359	n.s.	0,297
4664	n.s.	0,297	n.s.	0,078
4702	n.s.	0,155	n.s.	0,199
4723	n.s.	0,155	n.s.	0,401
4727	n.s.	0,244	n.s.	0,183

5027	n.s.	0,274	n.s.	0,155
5101	n.s.	0,183	n.s.	0,101

Tab. A23: Kruskal-Wallis Test in S+P: Vergleich aller Therapien untereinander (n=22) für EpCAM+ und CD45+ Zellen

### 6.6.8 Tabellen Ergebnisse FACS/ ATP – Analysen von n= 9 Patientin und E: T Ratio

I) FACS: Vitalität in% LMK der EpCAM+ Zellen in S-Only					II) FACS: Vitalität in% LMK der CD45+ Zellen in S-Only				
Batch No.	TM/4	FO	FI	E zu T (1)	Batch No.	TM/4	FO	FI	E zu T (1)
4932	96,66	97,69	97,29	0,35	4932	101,36	38,26	30,27	0,35
4934	83,00	108,35	86,80	0,001	4934	68,50	8,38	7,32	0,001
4941	92,97	172,69	99,33	5,75	4941	111,78	69,84	60,62	5,75
4965	173,40	149,24	86,21	0,09	4965	95,57	64,98	34,18	0,09
5001	101,65	85,96	123,44	0,10	5001	106,16	92,12	n.a.	0,10
5007	92,16	83,88	103,03	0,83	5007	94,24	84,22	88,19	0,83
5038	122,37	81,81	155,85	0,10	5038	86,96	104,47	132,23	0,10
5046	105,89	116,65	88,49	0,35	5046	113,09	115,35	93,87	0,35
5087	105,02	103,20	115,60	0,08	5087	110,29	117,22	112,68	0,08
MEAN	108,12	111,05	106,23	0,85	MEAN	98,66	77,20	69,92	0,85
MIN	83,00	81,81	86,21	0,00	MIN	68,50	8,38	7,32	0,00
MAX	173,40	172,69	155,85	5,75	MAX	113,09	117,22	132,23	5,75
STABW	26,85	31,14	22,57	1,85	STABW	14,38	36,28	43,87	1,85

Tab. A25: Vitalität (in% LMK) in der FACS-Analyse der einzelnen Proben und im Durchschnitt für I) EpCAM+Zellen in S-Only; II) CD45+Zellen in S-Only;

I) ATP: mmA in %LMK für S-Only			
Batch No.	TM/4	FO	FI
4932	92,18	21,08	30,80
4934	95,75	24,83	25,45
4941	99,32	20,79	31,02
4965	108,64	14,34	21,89
5001	81,11	35,24	36,57
5007	95,58	26,40	26,67
5038	92,40	21,39	39,82
5046	98,56	30,03	39,28
5087	103,19	18,34	40,34
MEAN	96,30	23,60	32,43
MIN	81,11	14,34	21,89
MAX	108,64	35,24	40,34
STABW	7,73	6,31	6,88

II) ATP: mmA in %LMK für P-Only			
Batch No.	TM/4	FO	FI
4932	105,18	56,77	88,79
4934	103,38	54,67	87,42
4941	104,74	35,10	61,63
4965	97,82	28,68	59,42
5001	98,77	53,78	69,43
5007	92,68	25,49	55,67
5038	99,81	30,03	47,33
5046	89,64	30,41	49,20
5087	101,62	22,46	54,16
MEAN	99,29	37,49	63,67
MIN	89,64	22,46	47,33
MAX	105,18	56,77	88,79
STABW	5,32	13,65	15,33

Tab. A26: mmA (in %LMK) in der ATP- Analyse der einzelnen Proben und im Durchschnitt für I) S-Only und II) P-Only

## 6.7 Tabellen der univariaten Analysen und Korrelationen

### 6.7.1 Tabelle für S-Only der univariaten Analyse/ Korrelationen der Mediumkontrolle

Parameter 1	Gruppierung 1	Parameter 2	Gruppierung 2	p- value	Statistische r Test
<b>Gewebe-assozierte Parameter</b>					
Standzeit Gewebe in TM in h	<3h ≥3h -24h ≥24-48h	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,437	Kruskal-Wallis
Gewebemenge in mg	</> 364,00	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,751	Mann-Whitney-U
Verdauzeit in min	</> 186,16	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,682	Mann-Whitney-U
Menge an Liberase in µl	< 75µl >75- 150µl > 150µl	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,218	Kruskal-Wallis
<b>Patienten-assozierte Parameter</b>					
Alter bei OP in Jahren	</> 70,0	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,536	Mann-Whitney-U
BMI in kg/m <sup>2</sup>	< 18,5 kg/m <sup>2</sup> > 18,5 < 30 kg/m <sup>2</sup> > 30 kg/m <sup>2</sup>	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,533	Kruskal-Wallis

<b>Tumor-assoziierte Parameter</b>					
Tumordurchmesser in cm	</> 5,06	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,539	Mann-Whitney-U
Tumorlokalisation im Colon	links vs. rechts	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,052	Mann-Whitney-U
Histologie	Adeno vs. andere	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,583	Mann-Whitney-U
Grading	1/2 vs. 3/4	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,815	Mann-Whitney-U
UICC Stadium gruppiert	1/2 vs. 3/4	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,461	Mann-Whitney-U
T-Stadium gruppiert	1/2 vs. 3 vs. 4	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,404	Kruskal-Wallis
N- Stadium gruppiert	0 vs. 1/2	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,461	Mann-Whitney-U
M-Stadium gruppiert	1 vs. 0	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,041	Mann-Whitney-U
Lymphangiosis carcinomatosa (L)	1 vs. 0	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,024	Mann-Whitney-U
Gefäßinvasion (V)	0 vs. 1	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,143	Mann-Whitney-U
Perineuralscheideninvasion (Pn)	0 vs. 1	mmA in % LMK TM/4 S-Only	100,51	0,293	Mann-Whitney-U
<b>Therapie-assoziierte Parameter</b>					
Radikalität der OP	0 vs. 1/2	Met. Aktivität ATP TM/4 S-Only	100,51	0,119	Mann-Whitney-U
CEA präop.	</> 3,4 ng/ml	Met. Aktivität ATP TM/4 S-Only	100,51	0,972	Mann-Whitney-U
CA19-9 präop.	</> 37,0 U/ml	Met. Aktivität ATP TM/4 S-Only	100,51	0,832	Mann-Whitney-U

Tab. A27: univariate Varianzanalyse für TM/4 (mmA in % LMK) der Labor – sowie klinisch-pathologischen Parameter in S-Only

### 6.7.2 Tabelle für P-Only der univariate Analyse/ Korrelationen der Mediumkontrolle

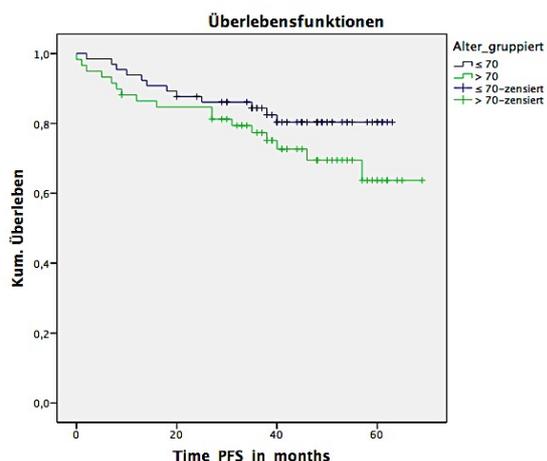
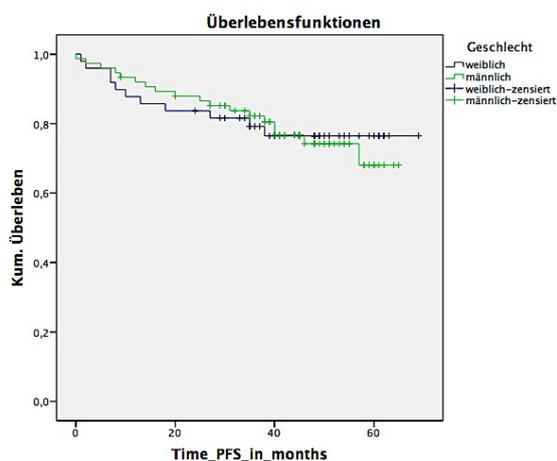
<b>Parameter 1</b>	<b>Gruppierung 1</b>	<b>Parameter 2</b>	<b>Gruppierung 2</b>	<b>p- value</b>	<b>Statistische r Test</b>
Standzeit Blut in h	<48h ≥48h -72h ≥72	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,574	Kruskal-Wallis
Vitalität TB nach Aufarbeitung	</> 96,24	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,617	Mann-Whitney-U
Alter bei OP in Jahren	</> 70,0	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,657	Mann-Whitney-U
BMI in kg/m <sup>2</sup>	< 18,5 kg/m <sup>2</sup> > 18,5 < 30 kg/m <sup>2</sup> > 30 kg/m <sup>2</sup>	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,691	Kruskal-Wallis
<b>Tumor-assoziierte Parameter</b>					
Tumordurchmesser	</> 5,06	mmA in % LMK TM/4 P-	100,41	1,129	Mann-

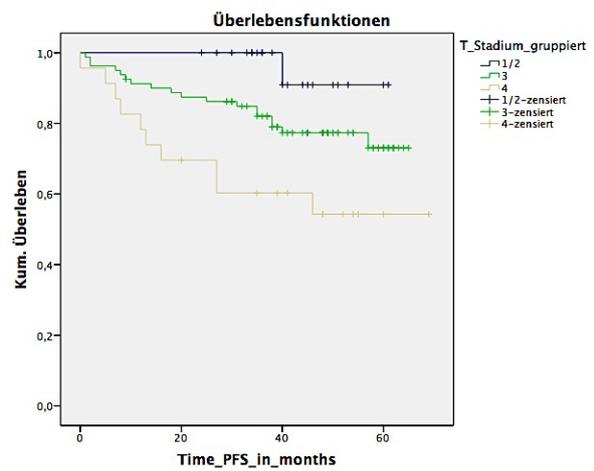
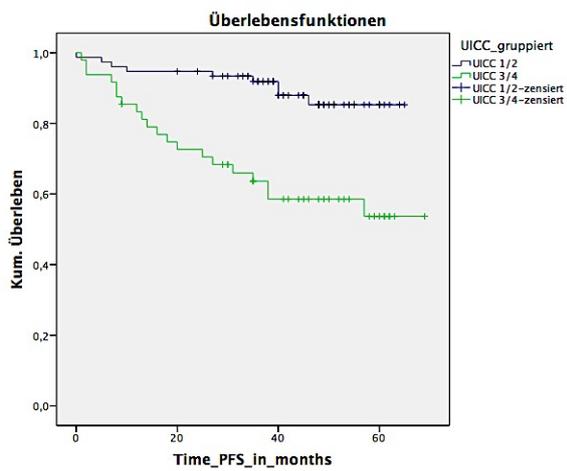
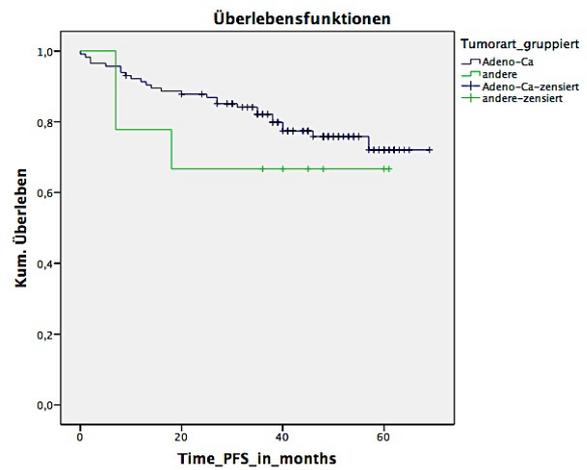
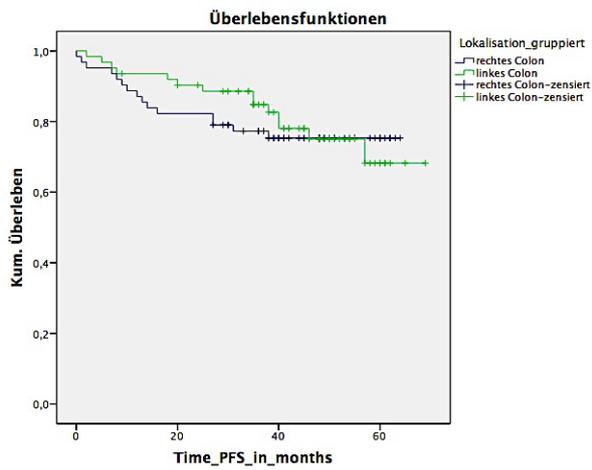
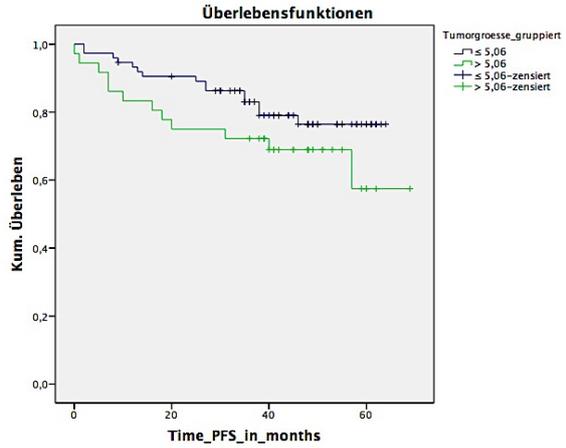
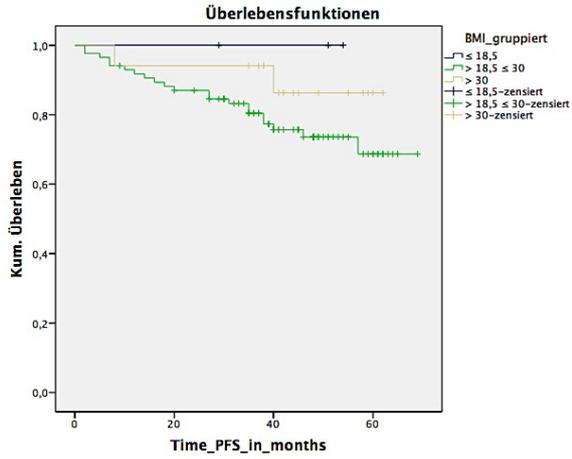
in cm		Only			Whitney-U
Tumorlokalisation im Colon	rechts vs. links	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,295	Mann-Whitney-U
UICC Stadium gruppiert	1/2 vs. 3/4	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,576	Mann-Whitney-U
T-Stadium gruppiert	1/2 vs. 3 vs. 4	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,148	Kruskal-Wallis
Histologie	Adeno vs. andere	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,897	Mann-Whitney-U
Grading	1/2 vs. 3/4	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,574	Mann-Whitney-U
N- Stadium gruppiert	0 vs. 1/2	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,576	Mann-Whitney-U
M-Stadium gruppiert	0 vs. 1	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,789	Mann-Whitney-U
Lymphangiosis carcinomatosa (L)	0 vs. 1	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,703	Mann-Whitney-U
Gefäßinvasion (V)	0 vs. 1	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,953	Mann-Whitney-U
Perineuralscheideninvasion (Pn)	0 vs. 1	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,596	Mann-Whitney-U
<b>Therapie-assoziierte Parameter</b>					
Radikalität der OP	0 vs. 1/2	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,029	Mann-Whitney-U
CEA präop.	</> 3,4 ng/ml	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,566	Mann-Whitney-U
CA19-9 präop.	</> 37,0 U/ml	mmA in % LMK TM/4 P-Only	100,41	0,092	Mann-Whitney-U

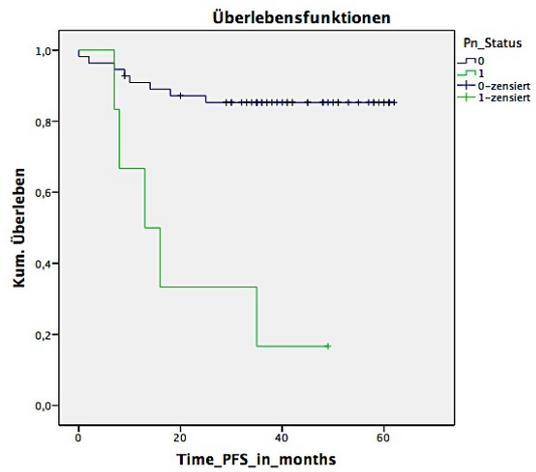
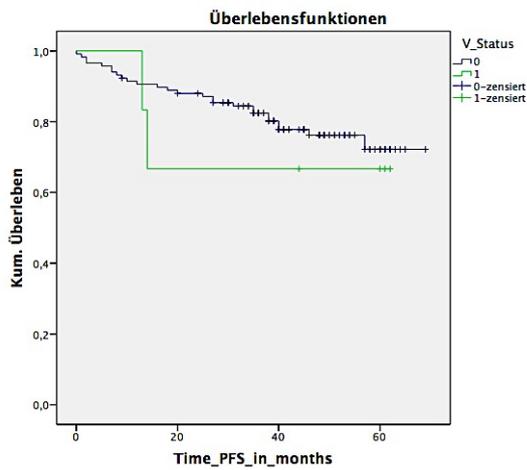
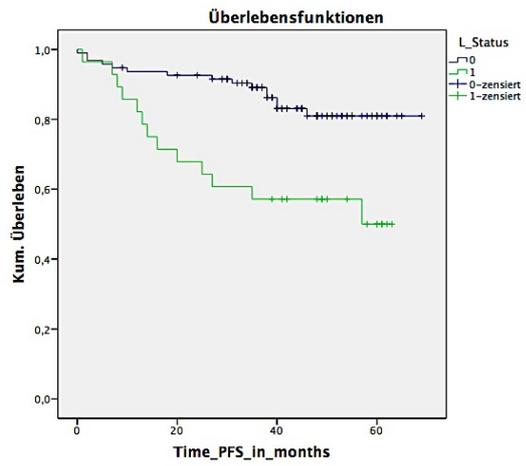
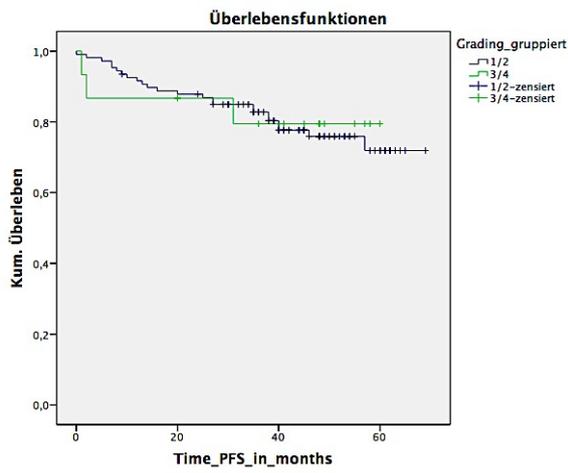
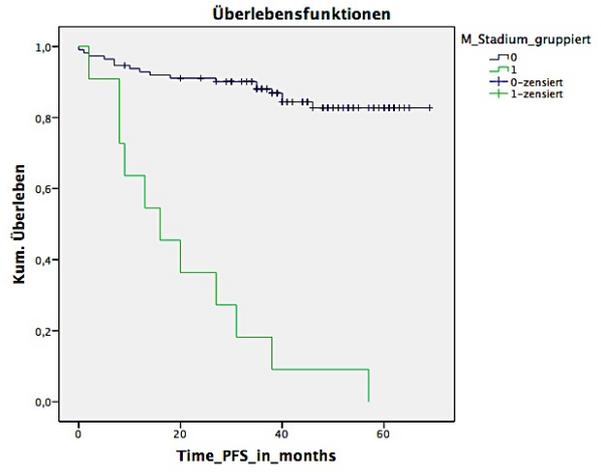
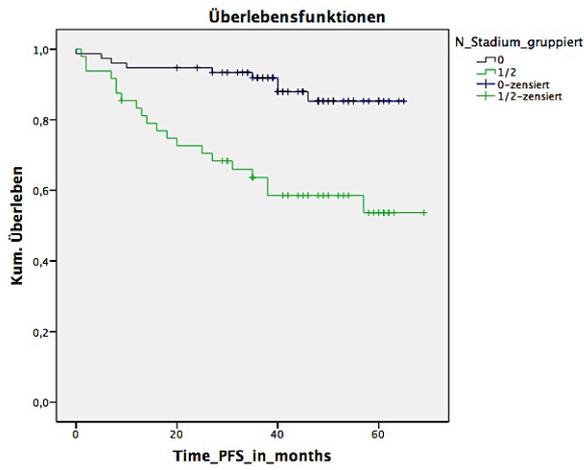
Tab. A28: univariate Varianzanalyse für TM/4 (mmA in % LMK) der Labor – sowie klinisch-pathologischen Parameter in P-Only

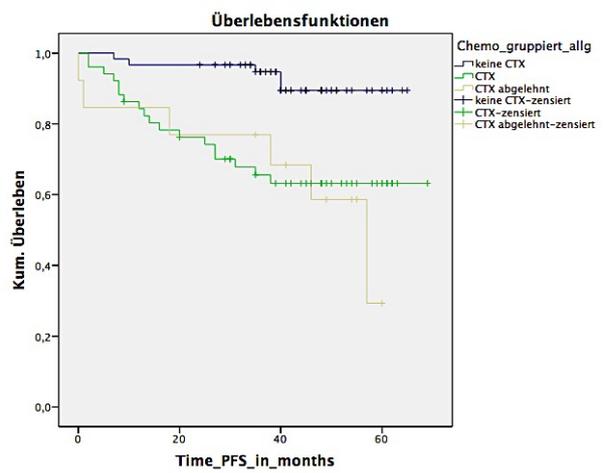
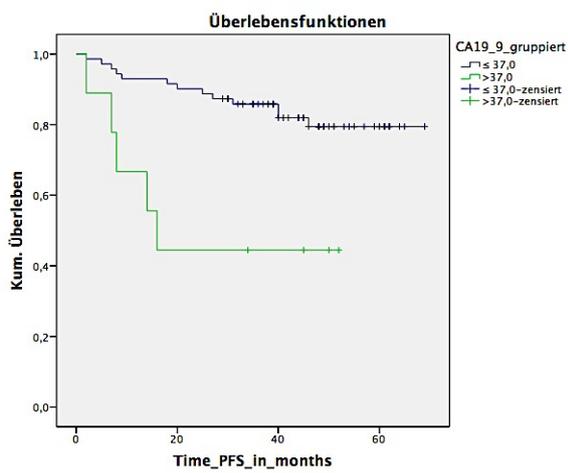
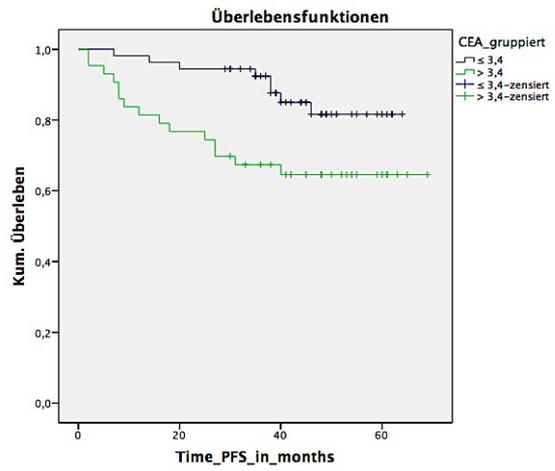
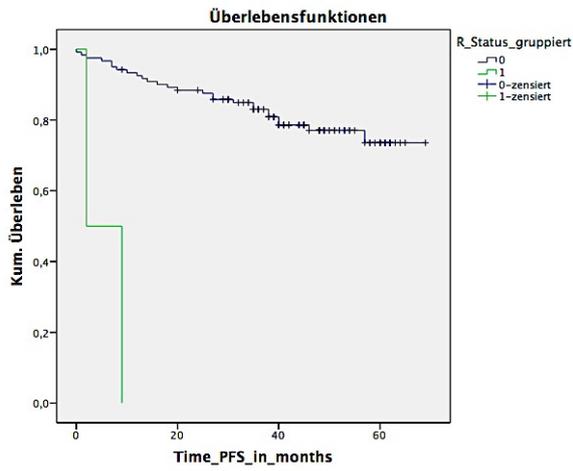
## 6.8 Graphiken der Kaplan-Meier Kurven

### 6.8.1 Kaplan-Meier-Kurven für progressionsfreie Überleben (klinische Parameter)

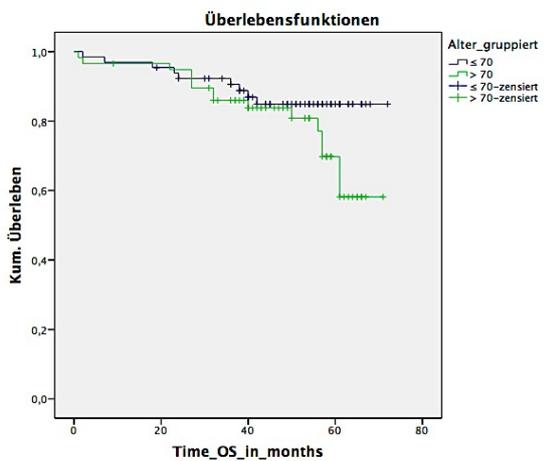
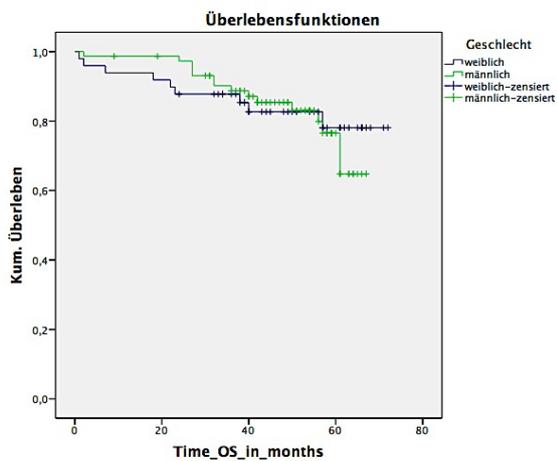


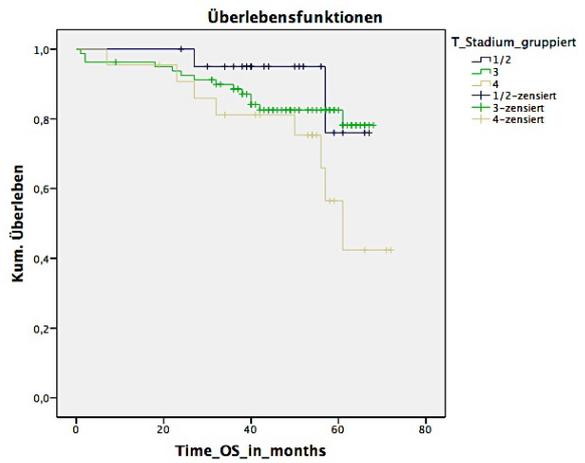
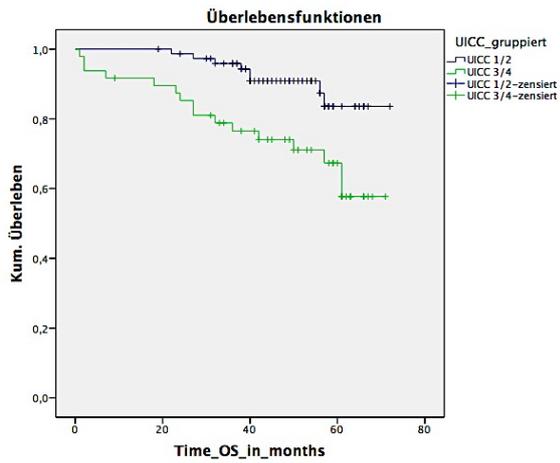
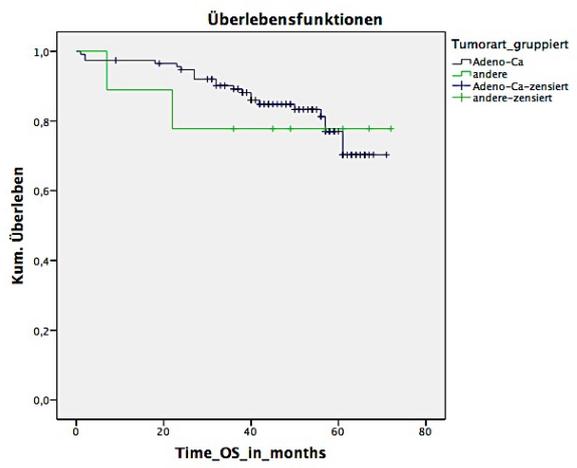
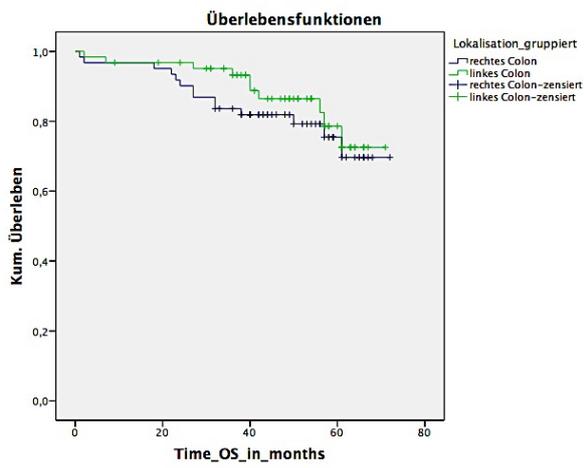
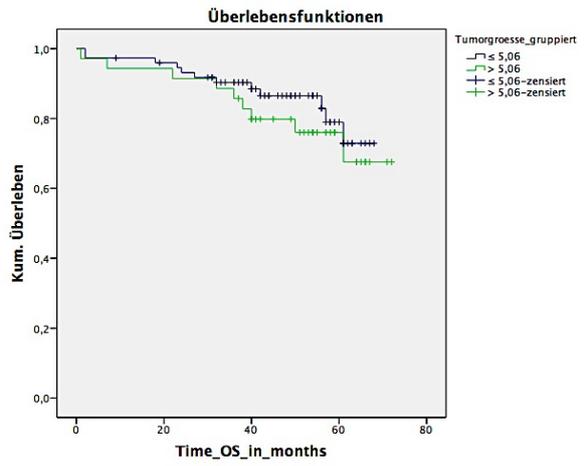
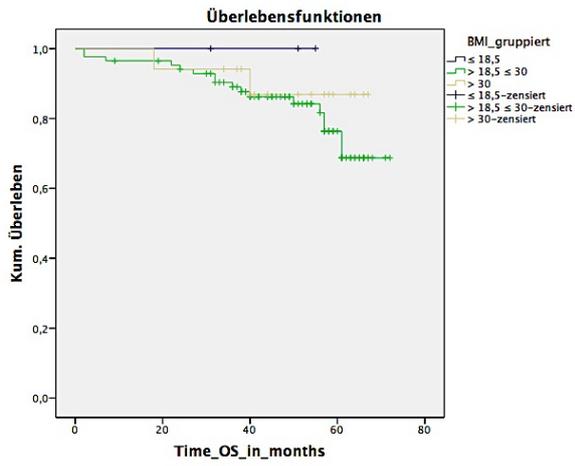


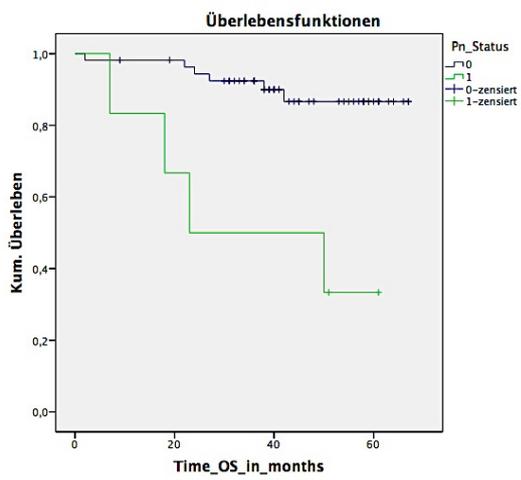
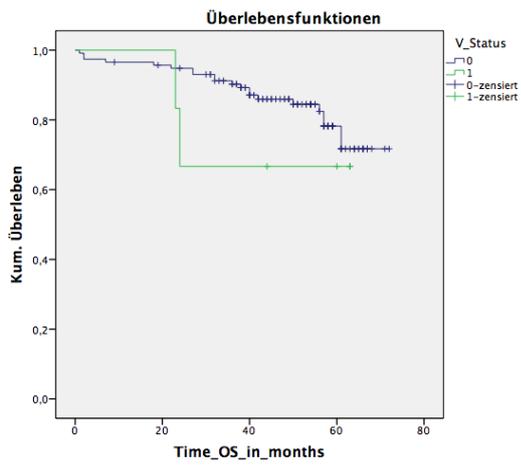
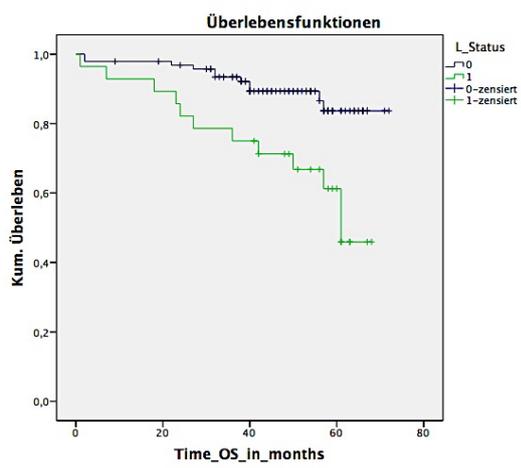
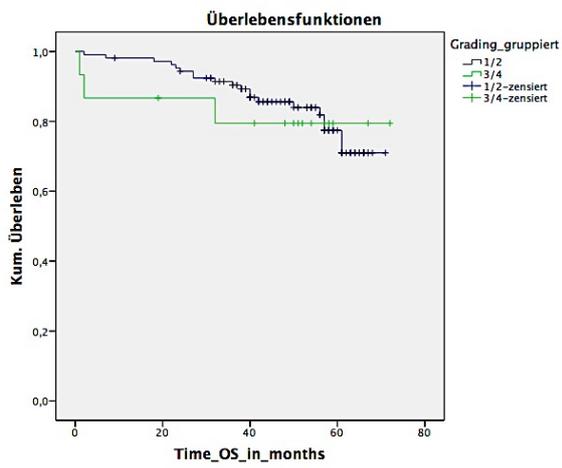
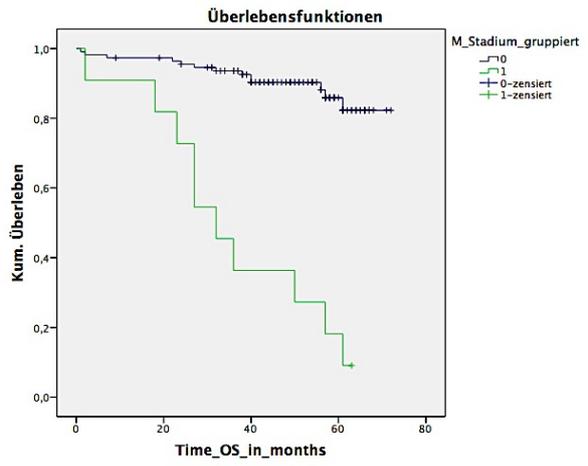
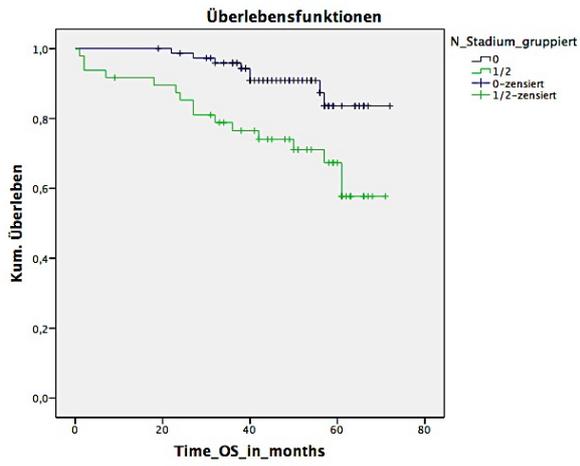


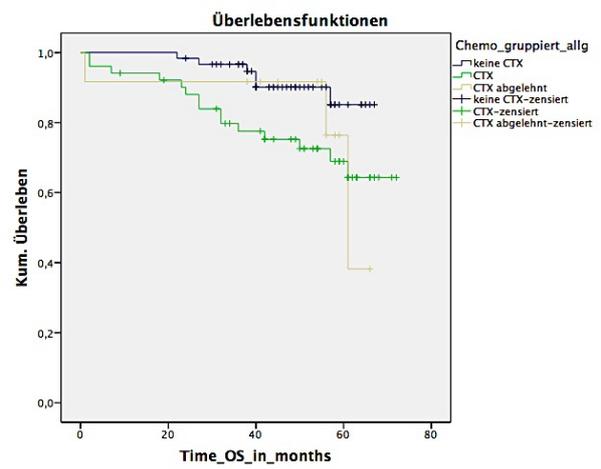
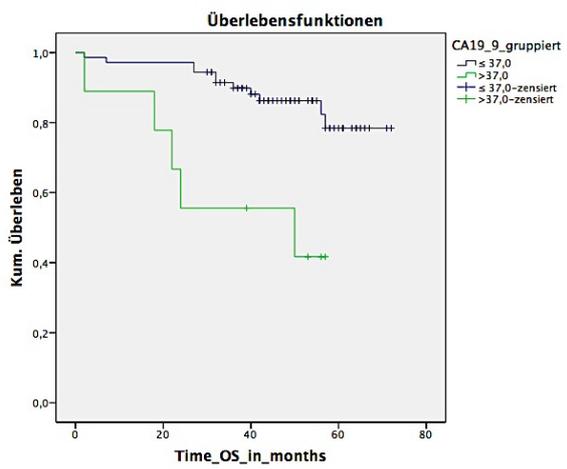
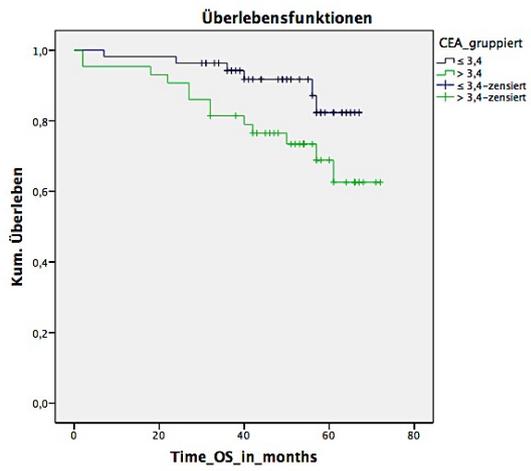
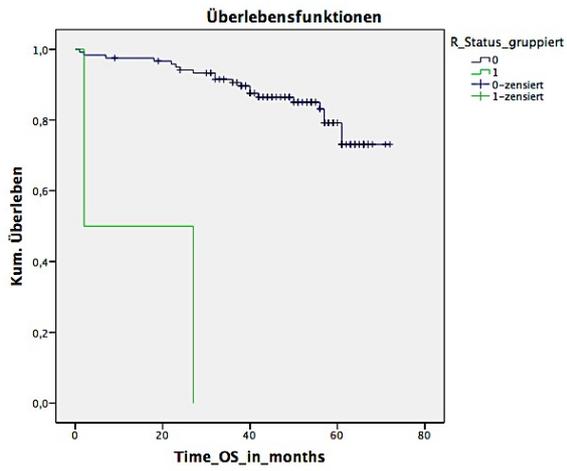


## 6.8.2 Kaplan-Meier-Kurven für Gesamtüberleben (klinische Parameter)











## Eidesstattliche Versicherung

Rava, Laura

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

**„Individuelle Therapiewahl durch Patienten-spezifisches in-vitro Modelling beim primären kolorektalen Karzinom“**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Köln, den 01.02.2022

Laura Rava

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

## Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikroliter
5-FU	5-Fluoruracil
AB	Antibiotika
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
al.	altera
ANOVA	Analysis of Variance
AM	Antimykotika
APC	Allophycocyanin
ASA	American Society of Anaesthesiology
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
CA	Carcinoma
CA-19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
CD	Cluster of Differentiation
CEA	Carcinoembryonic Antigen
cm	Zentimeter
CPS	Counts per second
CRC	Colorectal Cancer Carcinoma
CRF	Case Report Form
CT	Computertomographie
CTX	Chemotherapie
DMEM/F12	Dulbecco Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12
DPBS	Dulbecco Phosphate-Buffered Saline
E	Effektor
EBA-1	EpCAM Antibody -1
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food and Drug Administration
FI	5-FU, Irinotecan
FIC	5-FU, Irinotecan, Cetuximab
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL 1-4	Exzitationslaser 1-4
FO	5-FU, Oxaliplatin
FOC	5-FU, Oxaliplatin, Cetuximab
FOLFIRI	Folinic acid, 5-Fluoruracil, Irinotecan
FOLFOX	Folinic acid, 5-Fluoruracil, Oxaliplatin
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
IgG	Immunglobulin G
h	Stunden

HR	Hazard Ratio
HTCR	Human Tissue and Cell Research
kg	Kilogramm
KO	Kontrolle
Kras	Kirsten Ras
KRK	Kolorektales Karzinom
K-S	Kolmogorov-Smirnov
L	Lymphgefäßinvasion
li.	links
LMH	Lösungsmittel mit hohem Wasseranteil
LMK	Lösungsmittelkontrolle
LML	Lösungsmittel mit niedrigem Wasseranteil
M	Metastasierungsstatus
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mA	metabolische Aktivität
MAX	Maximum
mmA	mittlere metabolische Aktivität
mAk	monoklonale Antikörper
mg	Milligramm
min	Minuten
MIN	Minimum
Mio	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPC-21	Mouse IgG1 kappa monoclonal isotype control
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
MSI	Mikrosateliten-Instabilität
N	Nodalstatus
NEAA	Non essential Amino Acids
n=	Numerum (= Anzahl)
ng	nanogramm
nm	Nanometer
path.	pathologisch
PBS	Phosphate bufferes Saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	programmed Death-1
PD-L	programmed Death- Ligand
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PI	Propidium Iodid
Pn	Perineuralscheideninfiltration
PPC	Peak Plasma Concentration
QM	Qualitätsmanagement
R	Resektionsstatus
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma

re.	rechts
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S	Sphäroidinkubation
SC	Solvent Control (= LMK)
SD	Standard Deviation (Abweichung)
SSC	Sideward Scatter
SN- 38	aktiver Metabolit von Irinotecan
SOP	Standard Operating Procedure
STABW	Standardabweichung
s.u.	siehe unten
S-W	Shapiro-Wilk
T	Therapiezeit (in Stunden)
T	Target
T	Tumorgröße (in Verbindung mit TNM)
Tab.	Tabelle
TIL	Tumor infiltrating Leucocyte
TM	Transportmedium
U	Units
UICC	Union internationale Contre le Cancer
V	Gefäßinvasion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VM	Verdaumedium
vs.	versus
W	Watt
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
Xelox	Xeloda, Oxaliplatin
ZKM	Zellkulturmedium

### **Tabellenverzeichnis:**

Tab.1 : Dosisanpassung der Zytostatika nach Leukozyten-/Thrombozytenzahl

Tab 2a: Beurteilung des Therapieansprechens unter Chemotherapie

Tab 2b: Beurteilung des Gesamtansprechens unter Chemotherapie

Tab. 3: Verwendete Materialien für Gewebeaufarbeitung, Isolation von PBMCs, ATP-Analyse und FACS-Analyse

Tab. 4: Verwendete Geräte für Gewebeaufarbeitung, Isolation von PBMCs, ATP-Analyse und FACS-Analyse

Tab. 5: Tabelle zur Bestimmung der Liberasemenge (in  $\mu\text{l}$ ) bezogen auf Gewebegewicht

Tab. 6: Konzentrationsangaben sowie PPC- Angaben zur Herstellung der  
Chemotherapie- Ansätze

Tab. 7: Patientenkollektivbeschreibung von n=125 CRC Patienten

Tab. 8: Log-Rank Daten bezogen auf Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreie  
Überleben (PFS)

Tab. 9: Cox-Regressionsdaten bezogen auf Gesamtüberleben (OS) und progressionsfreie  
Überleben (PFS)

Tab. 10: p-Werte für Kolmogorov-Smirnov und Shapiro-Wilk Test der klinisch-  
pathologischen Parameter

Tab 11: Auswertung verschiedener Qualitätsmerkmale der n=106 Tumorproben für die  
ATP-Analyse

Tab 12: Auswertung verschiedener Qualitätsmerkmale der n=106 Blutproben für die  
ATP-Analyse

Tab. 13: Grundaktivität der ATP-Proben für TM/4, LMH und LML für beide Subgruppen  
(in CPS angegeben)

Tab. 14: durchschnittliche Grundaktivität pro Zelle für TM/4 in beiden Subgruppen  
(CPS/Zelle)

Tab. 15: Auswertung verschiedener Qualitätsmerkmale der n=37 Tumorproben für die  
FACS- Analyse

Tab. 16: Mann-Whitney-U Test der Therapieansätze vs. die Mediumkontrolle (TM/4)

Tab. 17: Vergleich von TM/4 (mmA in %LMK) mit Therapieansätzen mittels Mann-  
Whitney-U-Test in P-Only

Tab. 18: Vergleich *in vitro* mit *in vivo* Ergebnissen für S-Only und P-Only und  
Korrelation mit Follow-Up (Leitliniengerechte Therapie und Hämatotoxizität)

Tab. 19: Vitalität (in %) der EpCAM+ und CD45+ Zellen in Abhängigkeit der Zeit (in h) für die Mediumkontrolle (TM/4) S-Only

Tab. 20: Patientenbeispiele (nach Batch Nr. sortiert) mit gleicher Effektivität von 5-FU und FI gegenüber FO (mma in % LMK) für S-Only

### **Tabellenverzeichnis Anhang:**

Tab. A1: Therapieschemata für die adjuvante Chemotherapie von 5-FU/Leucovorin beim kolorektalen Karzinom

Tab. A2: Therapieschemata für die adjuvante Chemotherapie von 5-FU/Oxaliplatin beim kolorektalen Karzinom

Tab. A3: TNM- Klassifikation

Tab. A4: UICC/AJCC- Klassifikation Kolorektales Karzinom

Tab. A5: Grading Einteilung gemäß WHO

Tab. A6: statistische Merkmale und ihre dazugehörige Skalierung

Tab. A7: Laborchemische Parameter und ihre dazugehörige Skalierung

Tab. A8: Unerwünschte Nebenwirkungen unter Chemotherapie

Tab. A9: Therapiebezogene Todesfälle nach UICC Einteilung

Tab. A10: Kolmogorov-Smirnov-Test für S-Only und P-Only (ATP)

Tab. A11: Anteil (in %) der vitalen EpCAM+/CD45+ Zellen sowie anderer Zelltypen mit der EpCAM/CD45-Ratio im FACS S-Only Modell zum Zeitpunkt S48h T0h

Tab. A12: Anteil (in %) der vitalen EpCAM+/CD45+ Zellen sowie anderer Zelltypen mit der EpCAM/CD45-Ratio im FACS S+P Modell zum Zeitpunkt S48h T0h

Tab. A13: Übersicht der mittleren metabolischen Restaktivität der Patientenproben n=106 für die ATP-Gesamtanalyse S-Only und P-Only

Tab. A14: Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich FO/FI in S-Only mit der jeweiligen mma und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau

Tab. A15: Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich 5-FU/FO in S-Only mit der jeweiligen mmA und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau

Tab. A16: Mann-Whitney-U-Test für Therapievergleich 5-FU/FI in S-Only mit der jeweiligen mmA und Standardabweichung sowie Signifikanzniveau

Tab. A17: Kolmogorov-Smirnov-Test sowie Shapiro-Wilk Analyse für S-Only/ S+P der Medium/Lösungsmittelkontrollen (FACS)

Tab. A18: Kolmogorov-Smirnov-Test sowie Shapiro-Wilk Analyse für P-Only der Medium/Lösungsmittelkontrollen (FACS)

Tab. A19: Kolmogorov-Smirnov-Test sowie Shapiro-Wilk Analyse der Therapieergebnisse FO/FOC/FI/FIC für a) S-Only und b) S+P

Tab. A20: Vitalitätsberechnung nach Methode 1 und 2 in S-Only für EpCAM+ und CD45+Zellen für a) Mediumkontrolle TM/4; b) Therapie mit FO; c) Therapie mit FI

Tab. A21: Vitalitätsberechnung nach Methode 1 und 2 in S+P für EpCAM+ und CD45+ Zellen für a) Mediumkontrolle TM/4; b) Therapie mit FO; c) Therapie mit FI

Tab. A22: Mann-Whitney-U-Testung mit p-Werten von TM/4 vs. den einzelnen Therapieregimes FO/FOC/FI/FIC in S+P in der FACS-Analyse ; a) für EpCAM+ Zellen; b) für CD45+ Zellen

Tab. A23: Kruskal-Wallis Test in S+P: Vergleich aller Therapien untereinander (n=22) für EpCAM+ und CD45+ Zellen

Tab. A24: Mann-Whitney-U- Test mit p-Werten beim Vergleich Vitalität der EpCam+ Zellen (S+P) in FACS-Analyse und mmA in ATP-Analyse (S+P)

Tab. A25: Vitalität (in% LMK) in der FACS-Analyse der einzelnen Proben und im Durchschnitt für I) EpCAM+Zellen in S-Only; II) CD45+Zellen in S-Only; III) EpCAM+ Zellen in S+P; IV) CD45+Zellen in S+P

Tab. A26: mmA (in %LMK) in der ATP- Analyse der einzelnen Proben und im Durchschnitt für I) S-Only und II) P-Only

Tab. A27: Univariate Varianzanalyse für TM/4 (mmA in % LMK) der Labor – sowie klinisch-pathologischen Parameter in S-Only

Tab. A28: Univariate Varianzanalyse für TM/4 (mmA in % LMK) der Labor – sowie klinisch-pathologischen Parameter in P-Only

### **Abbildungsverzeichnis:**

Abb. 1: Zeitliches Schema für die Aufarbeitung der Proben (Tumor und/oder Blut)

Abb. 2: Pat ID 4941 Therapie TM/4

Abb. 3: Pat ID 4659 Therapie FIC

Abb. 4: Pat ID 4832 Therapie FI

Abb. 5: Pat ID 5195 Therapie TM/4

Abb. 6: Abhängigkeit der Grundaktivität (in CPS) von der Standzeit (in min)

Abb. 7: Abhängigkeit der Aktivität/Vitalität von der Standzeit (in min)

Abb. 8: Abhängigkeit der Grundaktivität (in CPS) von der Standzeit der Blutprobe (in h)

Abb. 9: Abhängigkeit der mmA/Vitalität in % von der Standzeit der Blutprobe (in h)

Abb. 10: FACS Analyse: Vitalität der P-Only Proben (in %) in Abhängigkeit der Standzeit (in h)

Abb.11 : Gesamtanalysen der mmA (in% LMK) der Proben für die Modelle S-Only und P-Only

Abb. 12: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und FI bei n=57 Patienten mit signifikantem Benefit von FO über FI in S-Only

Abb. 13: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und FI bei n=39 Patienten mit gleichem Benefit von FO und FI in S-Only

Abb. 14: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und FI bei n=7

Patienten mit signifikantem Benefit von FI über FO in S-Only

Abb. 15: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und 5-FU bei n=30

Patienten mit signifikanten Benefit von FO über 5-FU in S-Only

Abb. 16: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FO und 5-FU bei n=15

Patienten ohne signifikanten Benefit von FO über 5-FU in S-Only

Abb. 17: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FI und 5-FU bei n=15

Patienten mit signifikantem Benefit von FO über 5-FU in S-Only

Abb. 18: mittlere metabolische Aktivität in S-Only und P-Only von FI und 5-FU bei n=26

Patienten ohne signifikanten Benefit von FO über 5-FU in S-Only

Abb. 19: Mittlere Vitalität in % LMK für EpCAM+ Zellen in der FACS-Analyse für S-Only

Abb. 20: Mittlere Vitalität in % LMK für CD45+ Zellen in der FACS-Analyse für S-Only

Abb. 21: Mittlere Vitalität in % LMK für EpCAM+ Zellen in der FACS-Analyse für S+P

Modell

Abb. 22: Mittlere Vitalität in % LMK für CD45+ Zellen in der FACS-Analyse für S+P

Modell

Abb.23: FACS S+P Vergleich Vitalität in %LMK und E:T Ratio für EpCAM+ und CD45+ Zellen

Abb. 24: ATP vs. FACS-Analyse: Vergleich mmA und mittlere Vitalität in % LMK für TM/4, FO und FI in ATP S-Only/P-Only und FACS S-Only EpCAM+ Zellen/CD45+ Zellen;

b) Tabelle mit der dazugehörigen mmA bzw. mittleren Vitalität in %LMK für TM/4, FO und FI

Abb. 25: mmA (in %LMK) für Batch Nr. 4781/4858/4991 als Beispiel für niedrige Therapie-Effektivität in S-Only

## Literaturverzeichnis

1. Hagland, H.R., et al., *Molecular Pathways and Cellular Metabolism in Colorectal Cancer*. Dig Surg, 2013. **30**(1): p. 12-25.
2. Brenner, H., M. Kloor, and C.P. Pox, *Colorectal cancer*. Lancet, 2014. **383**(9927): p. 1490-1502.
3. Park, J.S., et al., *Validation of the seventh edition of the American Joint Committee on cancer tumor node-staging system in patients with colorectal carcinoma in comparison with sixth classification*. J Surg Oncol, 2012. **106**(6): p. 674-9.
4. Chen, S.L., et al., *Lymph node ratio as a quality and prognostic indicator in stage III colon cancer*. Ann Surg, 2011. **253**(1): p. 82-7.
5. Le Voyer, T.E., et al., *Colon cancer survival is associated with increasing number of lymph nodes analyzed: a secondary survey of intergroup trial INT-0089*. J Clin Oncol, 2003. **21**(15): p. 2912-9.
6. Mlecnik, B., et al., *Tumor immunosurveillance in human cancers*. Cancer Metastasis Rev, 2011. **30**(1): p. 5-12.
7. Church, S.E. and J. Galon, *Tumor Microenvironment and Immunotherapy: The Whole Picture Is Better Than a Glimpse*. Immunity, 2015. **43**(4): p. 631-3.
8. Galon, J., et al., *Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours*. J Pathol, 2014. **232**(2): p. 199-209.
9. Galon, J., et al., *The immune score as a new possible approach for the classification of cancer*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 1.
10. Becht, E., et al., *Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers*. Adv Immunol, 2016. **130**: p. 95-190.
11. Oberg, A., et al., *Different occurrence of CD8+, CD45R0+, and CD68+ immune cells in regional lymph node metastases from colorectal cancer as potential prognostic predictors*. Int J Colorectal Dis, 2002. **17**(1): p. 25-9.
12. Soveri, L.M., et al., *Association of adverse events and survival in colorectal cancer patients treated with adjuvant 5-fluorouracil and leucovorin: Is efficacy an impact of toxicity?* Eur J Cancer, 2014. **50**(17): p. 2966-74.
13. Kidwell, K.M., et al., *Long-term neurotoxicity effects of oxaliplatin added to fluorouracil and leucovorin as adjuvant therapy for colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project trials C-07 and LTS-01*. Cancer, 2012. **118**(22): p. 5614-22.
14. Alberts, S.R., et al., *Effect of oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin with or without cetuximab on survival among patients with resected stage III colon cancer: a randomized trial*. JAMA, 2012. **307**(13): p. 1383-93.
15. Allegra, C.J., et al., *Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial*. J Clin Oncol, 2013. **31**(3): p. 359-64.
16. Kasi, P.M. and A. Grothey, *Chemotherapy-Induced Neutropenia as a Prognostic and Predictive Marker of Outcomes in Solid-Tumor Patients*. Drugs, 2018. **78**(7): p. 737-745.
17. Tan, X., et al., *Chemotherapy-induced neutropenia and the prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis of cohort studies*. Expert Rev Anticancer Ther, 2017. **17**(11): p. 1077-1085.

18. Haller, D.G., et al., *Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer*. J Clin Oncol, 2011. **29**(11): p. 1465-71.
19. Sargent, D., et al., *Two or three year disease-free survival (DFS) as a primary end-point in stage III adjuvant colon cancer trials with fluoropyrimidines with or without oxaliplatin or irinotecan: data from 12,676 patients from MOSAIC, X-ACT, PETACC-3, C-06, C-07 and C89803*. Eur J Cancer, 2011. **47**(7): p. 990-6.
20. Andre, T., et al., *Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial*. J Clin Oncol, 2009. **27**(19): p. 3109-16.
21. Shi, Q., et al., *Comparison of outcomes after fluorouracil-based adjuvant therapy for stages II and III colon cancer between 1978 to 1995 and 1996 to 2007: evidence of stage migration from the ACCENT database*. J Clin Oncol, 2013. **31**(29): p. 3656-63.
22. Biagi, J.J., et al., *Association between time to initiation of adjuvant chemotherapy and survival in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2011. **305**(22): p. 2335-42.
23. Gill, S., et al., *Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?* J Clin Oncol, 2004. **22**(10): p. 1797-806.
24. Labianca, R., et al., *Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2013. **24 Suppl 6**: p. vi64-72.
25. Schmoll, H.J., et al., *ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making*. Ann Oncol, 2012. **23**(10): p. 2479-516.
26. Tournigand, C., et al., *FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study*. J Clin Oncol, 2004. **22**(2): p. 229-37.
27. Neugut, A.I., et al., *FOLFOX and FOLFIRI Use in Stage IV Colon Cancer: Analysis of SEER-Medicare Data*. Clin Colorectal Cancer, 2019. **18**(2): p. 133-140.
28. Saltz, L.B., et al., *Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803*. J Clin Oncol, 2007. **25**(23): p. 3456-61.
29. Sastre, J., et al., *Elderly patients with advanced colorectal cancer derive similar benefit without excessive toxicity after first-line chemotherapy with oxaliplatin-based combinations: comparative outcomes from the 03-TTD-01 phase III study*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **70**(2): p. 134-44.
30. Kumar, A., et al., *Effect of Adjuvant FOLFOX Chemotherapy Duration on Outcomes of Patients With Stage III Colon Cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2015. **14**(4): p. 262-8 e1.
31. Ahn, J.B., et al., *Monthly 5-days 5-fluorouracil and low-dose leucovorin for adjuvant chemotherapy in colon cancer*. Cancer Lett, 2001. **167**(2): p. 215-24.
32. Dobie, S.A., et al., *Completion of therapy by Medicare patients with stage III colon cancer*. J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(9): p. 610-9.
33. Cortejoso, L., et al., *Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2013. **71**(6): p. 1463-72.
34. Trotti, A., et al., *CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment*. Semin Radiat Oncol, 2003. **13**(3): p. 176-81.

35. Basch, E., et al., *Development of the National Cancer Institute's patient-reported outcomes version of the common terminology criteria for adverse events (PRO-CTCAE)*. J Natl Cancer Inst, 2014. **106**(9).
36. Marsoni, S. and I. International Multicenter Pooled Analysis of Colon Cancer Trials, *Efficacy of adjuvant fluorouracil and leucovorin in stage B2 and C colon cancer. International Multicenter Pooled Analysis of Colon Cancer Trials Investigators*. Semin Oncol, 2001. **28**(1 Suppl 1): p. 14-9.
37. Sanoff, H.K., et al., *Comparison of adverse events during 5-fluorouracil versus 5-fluorouracil/oxaliplatin adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer: a population-based analysis*. Cancer, 2012. **118**(17): p. 4309-20.
38. Mazzuca, F., et al., *Pre-treatment evaluation of 5-fluorouracil degradation rate: association of poor and ultra-rapid metabolism with severe toxicity in a colorectal cancer patients cohort*. Oncotarget, 2016. **7**(15): p. 20612-20.
39. Saif, M.W., et al., *Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(22): p. 1543-52.
40. Twelves, C., et al., *Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer*. N Engl J Med, 2005. **352**(26): p. 2696-704.
41. Yothers, G., et al., *Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses*. J Clin Oncol, 2011. **29**(28): p. 3768-74.
42. Grothey, A., *A comparison of XELOX with FOLFOX-4 as first-line treatment for metastatic colorectal cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2009. **6**(1): p. 10-1.
43. Schwartzberg, L.S., et al., *PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2014. **32**(21): p. 2240-7.
44. Heinemann, V., et al., *A study-level meta-analysis of efficacy data from head-to-head first-line trials of epidermal growth factor receptor inhibitors versus bevacizumab in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer*. Eur J Cancer, 2016. **67**: p. 11-20.
45. Oh, S.Y., et al., *Phase II study of irinotecan/S-1 combination chemotherapy for patients with oxaliplatin-refractory colorectal cancer*. Invest New Drugs, 2011. **29**(5): p. 1050-6.
46. Heinemann, V. and S. Stintzing, *FOLFIRI with cetuximab or bevacizumab: FIRE-3-authors' reply*. Lancet Oncol, 2014. **15**(13): p. e583-4.
47. Moosmann, N., et al., *Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: AIO KKR-0104--a randomized trial of the German AIO CRC study group*. J Clin Oncol, 2011. **29**(8): p. 1050-8.
48. Clarke, S.J., et al., *Single-agent irinotecan or FOLFIRI as second-line chemotherapy for advanced colorectal cancer; results of a randomised phase II study (DaVINCI) and meta-analysis [corrected]*. Eur J Cancer, 2011. **47**(12): p. 1826-36.
49. Schmiegel, W., et al., *Capecitabine/irinotecan or capecitabine/oxaliplatin in combination with bevacizumab is effective and safe as first-line therapy for metastatic colorectal cancer: a randomized phase II study of the AIO colorectal study group*. Ann Oncol, 2013. **24**(6): p. 1580-7.

50. Van Cutsem, E., et al., *Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(7): p. 692-700.
51. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status*. J Clin Oncol, 2011. **29**(15): p. 2011-9.
52. Bolen, C.R., M. Uduman, and S.H. Kleinstein, *Cell subset prediction for blood genomic studies*. BMC Bioinformatics, 2011. **12**: p. 258.
53. Nichita, C., et al., *A novel gene expression signature in peripheral blood mononuclear cells for early detection of colorectal cancer*. Aliment Pharmacol Ther, 2014. **39**(5): p. 507-17.
54. Barlev, E., et al., *A novel method for screening colorectal cancer by infrared spectroscopy of peripheral blood mononuclear cells and plasma*. J Gastroenterol, 2016. **51**(3): p. 214-21.
55. Taube, J.M., et al., *Implications of the tumor immune microenvironment for staging and therapeutics*. Mod Pathol, 2018. **31**(2): p. 214-234.
56. Smoragiewicz, M., et al., *Neutropenia and relative dose intensity on adjuvant FOLFOX chemotherapy are not associated with survival for resected colon cancer*. J Gastrointest Cancer, 2014. **45**(4): p. 460-5.
57. Therasse, P., *Measuring the clinical response. What does it mean?* Eur J Cancer, 2002. **38**(14): p. 1817-23.
58. Litiere, S., et al., *RECIST - learning from the past to build the future*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(3): p. 187-192.
59. Therasse, P., et al., *New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada*. J Natl Cancer Inst, 2000. **92**(3): p. 205-16.
60. Friedrich, J., et al., *A reliable tool to determine cell viability in complex 3-d culture: the acid phosphatase assay*. J Biomol Screen, 2007. **12**(7): p. 925-37.
61. Ghosh, S., et al., *Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: a high density oligonucleotide array study*. J Cell Physiol, 2005. **204**(2): p. 522-31.
62. Mostov, K., T. Su, and M. ter Beest, *Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(4): p. 287-93.
63. Kunz-Schughart, L.A., et al., *The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model*. J Biomol Screen, 2004. **9**(4): p. 273-85.
64. Hirschhaeuser, F., et al., *Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again*. J Biotechnol, 2010. **148**(1): p. 3-15.
65. Santini, M.T. and G. Rainaldi, *Three-dimensional spheroid model in tumor biology*. Pathobiology, 1999. **67**(3): p. 148-57.
66. Kelm, J.M., et al., *Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types*. Biotechnol Bioeng, 2003. **83**(2): p. 173-80.
67. Keller, G.M., *In vitro differentiation of embryonic stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 862-9.
68. Kondo, J., et al., *Retaining cell-cell contact enables preparation and culture of spheroids composed of pure primary cancer cells from colorectal cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(15): p. 6235-40.

69. Jeppesen, M., et al., *Short-term spheroid culture of primary colorectal cancer cells as an in vitro model for personalizing cancer medicine*. PLoS One, 2017. **12**(9): p. e0183074.
70. Halfter, K., et al., *Prospective cohort study using the breast cancer spheroid model as a predictor for response to neoadjuvant therapy--the SpheroNEO study*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 519.
71. Mayer, B., et al., *Multicellular gastric cancer spheroids recapitulate growth pattern and differentiation phenotype of human gastric carcinomas*. Gastroenterology, 2001. **121**(4): p. 839-52.
72. Kang, S.M., et al., *A feasibility study of adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA) as a chemosensitivity test for lung cancer*. Cancer Res Treat, 2005. **37**(4): p. 223-7.
73. Zhou, Y., et al., *Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells*. Cancer Res, 2012. **72**(1): p. 304-14.
74. Vidal, S., et al., *Flow cytometry analysis of leukocytes in induced sputum from asthmatic patients*. Immunobiology, 2012. **217**(7): p. 692-7.
75. Herzenberg, L.A., et al., *The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford*. Clin Chem, 2002. **48**(10): p. 1819-27.
76. Went, P.T., et al., *Frequent EpCam protein expression in human carcinomas*. Hum Pathol, 2004. **35**(1): p. 122-8.
77. De Leij, L., et al., *SCLC-cluster-2 antibodies detect the pancarcinoma/epithelial glycoprotein EGP-2*. Int J Cancer Suppl, 1994. **8**: p. 60-3.
78. Trowbridge, I.S. and M.L. Thomas, *CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 85-116.
79. Tchilian, E.Z., et al., *A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1308-13.
80. Pox, C., et al., *[S3-guideline colorectal cancer version 1.0]*. Z Gastroenterol, 2013. **51**(8): p. 753-854.
81. Quasar Collaborative, G., et al., *Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study*. Lancet, 2007. **370**(9604): p. 2020-9.
82. Majek, O., et al., *Survival from colorectal cancer in Germany in the early 21st century*. Br J Cancer, 2012. **106**(11): p. 1875-80.
83. Benedix, F., et al., *Comparison of 17,641 patients with right- and left-sided colon cancer: differences in epidemiology, perioperative course, histology, and survival*. Dis Colon Rectum, 2010. **53**(1): p. 57-64.
84. Taieb, J., et al., *Association of Prognostic Value of Primary Tumor Location in Stage III Colon Cancer With RAS and BRAF Mutational Status*. JAMA Oncol, 2018. **4**(7): p. e173695.
85. Lee, L., et al., *Lower survival after right-sided versus left-sided colon cancers: Is an extended lymphadenectomy the answer?* Surg Oncol, 2018. **27**(3): p. 449-455.
86. Arnold, D., et al., *Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials*. Ann Oncol, 2017. **28**(8): p. 1713-1729.
87. Lim, D.R., et al., *Comparison of oncological outcomes of right-sided colon cancer versus left-sided colon cancer after curative resection: Which side is better outcome?* Medicine (Baltimore), 2017. **96**(42): p. e8241.

88. Lee, M.S., D.G. Menter, and S. Kopetz, *Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes*. J Natl Compr Canc Netw, 2017. **15**(3): p. 411-419.
89. Cheung, W.Y., et al., *Determinants of Early Mortality Among 37,568 Patients With Colon Cancer Who Participated in 25 Clinical Trials From the Adjuvant Colon Cancer Endpoints Database*. J Clin Oncol, 2016. **34**(11): p. 1182-9.
90. Maguire, A. and K. Sheahan, *Controversies in the pathological assessment of colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(29): p. 9850-61.
91. Ribic, C.M., et al., *Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer*. N Engl J Med, 2003. **349**(3): p. 247-57.
92. Arkenau, H.T., et al., *Efficacy of oxaliplatin plus capecitabine or infusional fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: a pooled analysis of randomized trials*. J Clin Oncol, 2008. **26**(36): p. 5910-7.
93. O'Connor, E.S., et al., *Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features*. J Clin Oncol, 2011. **29**(25): p. 3381-8.
94. Rosenberg, R., et al., *The prognostic value of lymph node ratio in a population-based collective of colorectal cancer patients*. Ann Surg, 2010. **251**(6): p. 1070-8.
95. Roth, A.D., et al., *Integrated analysis of molecular and clinical prognostic factors in stage II/III colon cancer*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(21): p. 1635-46.
96. Barresi, V., et al., *Histological grading in colorectal cancer: new insights and perspectives*. Histol Histopathol, 2015. **30**(9): p. 1059-67.
97. Elez, E., G. Argiles, and J. Tabernero, *First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: Interpreting FIRE-3, PEAK, and CALGB/SWOG 80405*. Curr Treat Options Oncol, 2015. **16**(11): p. 52.
98. Kopetz, S., et al., *Genomic classifier ColoPrint predicts recurrence in stage II colorectal cancer patients more accurately than clinical factors*. Oncologist, 2015. **20**(2): p. 127-33.
99. Quaglia, A., et al., *The cancer survival gap between elderly and middle-aged patients in Europe is widening*. Eur J Cancer, 2009. **45**(6): p. 1006-16.
100. Aparicio, T., et al., *Half of elderly patients routinely treated for colorectal cancer receive a sub-standard treatment*. Crit Rev Oncol Hematol, 2009. **71**(3): p. 249-57.
101. Sanoff, H.K., et al., *Effect of adjuvant chemotherapy on survival of patients with stage III colon cancer diagnosed after age 75 years*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2624-34.
102. Schrag, D., et al., *Age and adjuvant chemotherapy use after surgery for stage III colon cancer*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(11): p. 850-7.
103. McCleary, N.J., et al., *Impact of age on the efficacy of newer adjuvant therapies in patients with stage II/III colon cancer: findings from the ACCENT database*. J Clin Oncol, 2013. **31**(20): p. 2600-6.
104. Lund, C.M., et al., *Age-dependent differences in first-line chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: the DISCO study*. Acta Oncol, 2018. **57**(11): p. 1445-1454.
105. Andre, T., et al., *Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study*. J Clin Oncol, 2015. **33**(35): p. 4176-87.
106. Heinemann, V., et al., *FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2014. **15**(10): p. 1065-75.

107. Modest, D.P., et al., *Impact of Subsequent Therapies on Outcome of the FIRE-3/AIO KRK0306 Trial: First-Line Therapy With FOLFIRI Plus Cetuximab or Bevacizumab in Patients With KRAS Wild-Type Tumors in Metastatic Colorectal Cancer*. J Clin Oncol, 2015. **33**(32): p. 3718-26.
108. Papadimitriou, C.A., et al., *A randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with irinotecan, leucovorin and fluorouracil versus leucovorin and fluorouracil for stage II and III colon cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group study*. BMC Med, 2011. **9**: p. 10.
109. Munker, S., et al., *Chemotherapy for metastatic colon cancer: No effect on survival when the dose is reduced due to side effects*. BMC Cancer, 2018. **18**(1): p. 455.
110. Hamza, S., et al., *Toxicity of oxaliplatin plus fluorouracil/leucovorin adjuvant chemotherapy in elderly patients with stage III colon cancer: a population-based study*. Ann Surg Oncol, 2014. **21**(8): p. 2636-41.
111. Fujita, K., et al., *Irinotecan, a key chemotherapeutic drug for metastatic colorectal cancer*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(43): p. 12234-48.
112. Peters, M.F., et al., *Human 3D Gastrointestinal Microtissue Barrier Function As a Predictor of Drug-Induced Diarrhea*. Toxicol Sci, 2019. **168**(1): p. 3-17.
113. Belair, D.G., et al., *Human ileal organoid model recapitulates clinical incidence of diarrhea associated with small molecule drugs*. Toxicol In Vitro, 2020. **68**: p. 104928.
114. Peters, M.F., et al., *Developing in vitro assays to transform gastrointestinal safety assessment: potential for microphysiological systems*. Lab Chip, 2020. **20**(7): p. 1177-1190.
115. Grothey, A., *Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity*. Semin Oncol, 2003. **30**(4 Suppl 15): p. 5-13.
116. Staff, N.P., et al., *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A current review*. Ann Neurol, 2017. **81**(6): p. 772-781.
117. Janusch, M., et al., *The hand-foot syndrome--a frequent secondary manifestation in antineoplastic chemotherapy*. Eur J Dermatol, 2006. **16**(5): p. 494-9.
118. Green, S.K., et al., *Antiadhesive antibodies targeting E-cadherin sensitize multicellular tumor spheroids to chemotherapy in vitro*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(2): p. 149-59.
119. Andreotti, P.E., et al., *Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma*. Cancer Res, 1995. **55**(22): p. 5276-82.
120. Crouch, S.P., et al., *The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity*. J Immunol Methods, 1993. **160**(1): p. 81-8.
121. Crea, F., et al., *Epigenetics and chemoresistance in colorectal cancer: an opportunity for treatment tailoring and novel therapeutic strategies*. Drug Resist Updat, 2011. **14**(6): p. 280-96.
122. Sun, X., et al., *Gene signatures associated with drug resistance to irinotecan and oxaliplatin predict a poor prognosis in patients with colorectal cancer*. Oncol Lett, 2017. **13**(4): p. 2089-2096.
123. Nobili, S., et al., *Emerging drugs in refractory colorectal cancer*. Future Med Chem, 2015. **7**(12): p. 1491-501.
124. Sanz-Garcia, E., et al., *BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives*. Ann Oncol, 2017. **28**(11): p. 2648-2657.
125. Gervasoni, A., et al., *Molecular signature detection of circulating tumor cells using a panel of selected genes*. Cancer Lett, 2008. **263**(2): p. 267-79.

126. Autissier, P., et al., *Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans*. Cytometry A, 2010. **77**(5): p. 410-9.
127. Roelands, J., et al., *Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
128. Becht, E., et al., *Cancer immune contexture and immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2016. **39**: p. 7-13.
129. Pages, F., et al., *International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study*. Lancet, 2018. **391**(10135): p. 2128-2139.
130. Kleiveland, C.R., *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, in *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*, K. Verhoeckx, et al., Editors. 2015: Cham (CH). p. 161-167.
131. McLean, M.H., et al., *The inflammatory microenvironment in colorectal neoplasia*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e15366.
132. Hoppner, M., et al., *A flow-cytometry based cytotoxicity assay using stained effector cells in combination with native target cells*. J Immunol Methods, 2002. **267**(2): p. 157-63.
133. Miller, F.R. and A.A. Blazkovec, *The importance of the ratio between effector and target cells for detection of serum blocking of tumor lymphocytolysis*. Immunol Commun, 1978. **7**(1): p. 81-9.