

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Frauengesundheit
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Der Einfluss von Insulin auf niedrig dosierte Zytostatikatherapie bei Mammakarzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Amelie Löwe
aus Tübingen

Mainz, 2021

Tag der Promotion:

07.12.2021

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1 Einleitung und Ziel der Dissertation.....	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Das Mammakarzinom.....	2
2.1.1 Epidemiologie.....	2
2.1.2 Mortalität.....	3
2.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren	3
2.1.3.1 Diabetes und Brustkrebs.....	3
2.1.4 Klinische und histopathologische Klassifikation	4
2.1.5 Metastasierung.....	6
2.1.6 Prognose.....	6
2.2 Therapie des Mammakarzinoms.....	7
2.2.1 Operative Therapie.....	7
2.2.2 Radiotherapie	8
2.2.3 Systemische Therapie	8
2.2.3.1 Neoadjuvante Therapie.....	9
2.2.3.2 Adjuvante Therapie.....	9
2.2.3.3 Palliative Therapie	11
2.2.4 Das Konzept der metronomischen Chemotherapie.....	11
2.2.4.1 Wirkung auf Endothelzellen und Faktoren der Angiogenese	14
2.2.4.2 Immunmodulierende Mechanismen	15
2.2.4.3 Direkte Effekte auf Tumorzellen	16
2.3 Insulin-induzierte Verstärkung der Zellantwort auf Zytostatika	17
2.4 Der Wirkstoff Mafosamid	19
2.5 Der Wirkstoff Vinorelbin.....	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Material	22
3.1.1 Chemikalien.....	22
3.1.2 Puffer und Lösungen	23
3.1.3 Medienzusätze	23
3.1.4 Kits	23

3.1.5	Zellkultur-Medien	23
3.1.6	Verbrauchsmaterialien	24
3.1.7	Gebrauchsmaterialien	25
3.1.8	Geräte	25
3.1.9	Computerprogramme	25
3.1.10	Zytostatika	26
3.1.10.1	Mafosfamid	26
3.1.10.2	Vinorelbin	26
3.1.11	Zelllinien	27
3.1.11.1	MCF-10A	27
3.1.11.2	MCF-7	27
3.1.11.3	T-47D	27
3.1.11.4	BT-549	27
3.1.11.5	MDA-MB-231	27
3.2	Methoden	28
3.2.1	Steriles Arbeiten	28
3.2.2	Zellkultur	28
3.2.2.1	Kultivierung humaner Zelllinien	28
3.2.2.2	Zellzahlbestimmung	28
3.2.2.3	Kryo-Konservierung	28
3.2.3	Analyse zellulärer Parameter	29
3.2.3.1	Proliferationsassay	29
3.2.3.2	Viabilitätsassay	31
3.2.3.3	Apoptose-Assay	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Optimierung von Beschichtung und Kultivierungsmedium	34
4.2	Einfluss von Insulin auf die Proliferation	40
4.3	Einfluss von Insulin auf die Viabilität	42
4.4	Einfluss von Insulin auf die Apoptoserate	44
4.5	Einfluss von Insulin auf die Wirkweise von Mafosfamid	46
4.6	Einfluss von Insulin auf die Wirkweise von Vinorelbin	50
5	Diskussion	54
5.1	Vergleich der Überlebenszeit von Tumorzellen hinsichtlich unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen	54
5.2	Einfluss von Insulin auf zelluläre Parameter	55
5.2.1	Einfluss von Insulin auf die Proliferationsrate	55

5.2.2	Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität	56
5.2.3	Einfluss von Insulin auf die Apoptoserate	57
5.3	Das Konzept der metronomischen Chemotherapie in der Zellkultur	59
5.4	Einfluss von Insulin auf niedrig dosierte Zytostatikatherapie	60
5.4.1	Einfluss von Insulin auf die Wirkung von Mafosfamid	61
5.4.2	Einfluss von Insulin auf die Wirkung von Vinorelbin	62
5.5	Methodenkritik	64
6	Zusammenfassung	66
7	Literaturverzeichnis	68
8	Anhang	83
8.1	Werte zu den Abbildungen	83
9	Danksagung	100
10	Lebenslauf	101

Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluorouracil
AGO	Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie e.V.
AK	Antikörper
AKT	AKT-Kinase
Aqua dest	<i>Aqua destillata</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BET	Brusterhaltende Therapie
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BMI	Body-Mass-Index
BRCA1/2	<i>Breast Cancer associated gene 1/2</i>
BrdU	5-Brom-2'desoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBR	<i>clinical benefit rate</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPA	Cyclophosphamid
CR	<i>Complete Response</i>
CTCAE	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
DC	<i>dendritic cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT2	Diabetes mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphat Buffered Saline</i>
EDTA	<i>Ethylen-diamine-tetraacetic-acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPC	<i>endothelial progenitor cells</i>
ER	Östrogenrezeptor

ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
et al.	<i>et alia</i> , und andere
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G1-G3	<i>Grading nach Elston und Ellis</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor-1
HR	Hormonrezeptor
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IGF1R	<i>Insulin-like growth factor receptor 1</i>
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
KG	Körpergewicht
KOF	Körperoberfläche
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDSC	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MTD	Maximal tolerierte Dosis
MTT	3, (4,5-Dimethyl-thiazol-2 yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid
MTX	Methotrexat
ORR	<i>objective response rate</i> , Gesamtansprechrage
OS	<i>overall survival</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
p.o.	<i>per os</i> , durch den Mund
PFS	<i>progression free survival</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PR	Progesteronrezeptor
PR	<i>Partial Response</i>
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria In Solid Tumors</i>
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RT	Raumtemperatur
SD	<i>Stable Disease</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAM	Tumor-assoziierte Makrophagen
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TNM	<i>tumor nodes metastasis</i> - Klassifikation maligner Tumoren
T _{reg}	Regulatorische T-Zellen
TSP-1	Thrombospondin-1
u.a.	unter anderem
UICC	<i>Union Internationale contre le Cancer</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der prozentualen Häufigkeit maligner Erkrankungen in Deutschland.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie im Vergleich.....	12
Abbildung 3: Zusammenfassung der Wirkmechanismen der metronomischen Chemotherapie.	17
Abbildung 4: Metabolisierung von Mafosfamid und Cyclophosphamid.	20
Abbildung 5: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von MCF-10A-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).	35
Abbildung 6: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von MCF-7-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B)	36
Abbildung 7: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von T-47D-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).	37
Abbildung 8: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von BT-549-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).	38
Abbildung 9: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von MDA-MB-231-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).	39
Abbildung 10: Proliferation der MCF-10A-, MCF-7-, T-47D-, BT-549- und MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von Insulin.	41
Abbildung 11: Viabilität der MCF-10A-, MCF-7-, T-47D-, BT-549 und MDA-MB-231- Zellen unter Einfluss von Insulin.	43
Abbildung 12: Apoptoserate der MCF-10A-, MCF-7-, T-47D-, BT-549- und MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von Insulin.	45
Abbildung 13: Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität unter Behandlung mit Mafosfamid...	49
Abbildung 14: Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität unter Behandlung mit Vinorelbin.	53

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung des Mammakarzinoms nach UICC-/AJCC-Stadium auf Basis der TNM-Klassifikation.....	5
Tabelle 2: Indikationen und Therapieoptionen bei adjuvanter Systemtherapie.....	10
Tabelle 3: Therapieoptionen im palliativen Setting.....	11
Tabelle 4: Berechnung der Insulinkonzentrationen.....	30
Tabelle 5: Assay zur Testung der Wirkung von Insulin auf die Proliferation mittels <i>Cell Proliferation ELISA BrdU</i> Kit der Firma Roche.....	30
Tabelle 6: MTT-Assay zur Beurteilung der Viabilität der Zellen nach Kultivierung auf unterschiedlich beschichteten 96-Well-Platten.....	31
Tabelle 7: MTT-Assay zur Testung der Wirkung von Insulin auf die Viabilität.....	32
Tabelle 8: MTT-Assay zur Testung der Wirkung einer Kombinationsbehandlung mit Insulin und Mafosfamid bzw. Insulin und Vinorelbin auf die Viabilität.....	32
Tabelle 9: Assay zur Testung der Wirkung von Insulin auf die Apoptoserate.....	33

1 Einleitung und Ziel der Dissertation

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Neubildung bei Frauen (1, 2). Im metastasierten Stadium erfolgt die Therapie in der Regel palliativ (3). Um betroffenen Frauen eine möglichst hohe Lebensqualität bieten zu können, müssen Therapiekonzepte mit geringer Toxizität bei gleichzeitig guter Ansprechrate zum Einsatz kommen. Zu diesen gehört das Konzept der niedrig dosierten Zytostatikatherapie, welches auch als „metronomische Chemotherapie“ bezeichnet wird (4). Im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie wird eine deutlich niedrigere Dosierung des Zytostatikums kontinuierlich, meistens in einem täglichen oder wöchentlichen Behandlungsschema *per os* (p.o.) verabreicht (5). Um das Therapieansprechen zu erhöhen, wird die Kombination der Zytostatika mit anderen Wirkstoffen diskutiert. Hierzu zählt auch das Peptidhormon Insulin. Mitogene Effekte und eine mögliche Erhöhung der Zellpermeabilität könnten die Wirkung der Zytostatika verstärken (6-8).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin weitere Erkenntnisse im präklinischen Bereich zu erlangen. Da sich die Therapie des Mammakarzinoms vor allem an der histologischen Klassifikation des Tumors orientiert, sollten fünf verschiedene Zelllinien mit unterschiedlichem Rezeptorstatus untersucht werden. In einem ersten Schritt sollten optimale Voraussetzungen für die Kultivierung der Tumorzellen ermittelt werden. Dabei sollte der Fokus darauf liegen die Viabilität der Brustkrebszellen über einen möglichst langen Zeitraum zu erhalten, um im weiteren Verlauf eine tägliche Applikation der Zytostatika nachahmen zu können. Im Anschluss sollte der Einfluss von verschiedenen Insulinkonzentrationen auf zelluläre Parameter untersucht werden. Die Kenntnisse über den Einfluss von Insulin auf die Proliferation, Viabilität und Apoptoserate der Tumorzellen sollten genutzt werden, um eine geeignete Insulinkonzentration für die Kombination mit einem Zytostatikum bestimmen zu können. Anschließend sollten die Tumorzellen mit niedrig dosiertem Mafosfamid bzw. Vinorelbin in Kombination mit Insulin behandelt werden. Dies sollte über einen mehrtägigen Zeitraum erfolgen, um das Konzept der metronomischen Chemotherapie nachahmen zu können. Die Analyse der Viabilität sollte die Grundlage für die Diskussion über den Einfluss und die Interaktion von Insulin und Zytostatikum auf die Tumorzellen darstellen.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Mammakarzinom

2.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom ist eine bösartige Erkrankung des Brustgewebes. Der Genese zugrunde liegt ein maligner Prozess, welcher in der Mehrzahl der Fälle vom Drüsengewebe ausgeht. Mit einem Anteil von circa (ca.) 29,5% ist es die am häufigsten vorkommende maligne Erkrankung der Frau (1, 9) (Abb.1). Im Jahr 2016 verzeichnete das Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts (RKI) rund 69.000 Neuerkrankungen der Brustdrüse in Deutschland (2). Weltweit lag die Anzahl der Neuerkrankungen im Jahr 2018 bei 2.088.849; dies entsprach 11,6% aller malignen Neubildungen (10). Das mittlere Erkrankungsalter von Frauen liegt bei 64 Jahren; erkrankte Männer sind im Durchschnitt 72 Jahre alt. Im Laufe des Lebens erkrankt jede achte Frau an einem Mammakarzinom. Dies entspricht einem Lebenszeitrisiko von 12,8% (11). Im Gegensatz dazu haben Männer ein Lebenszeitrisiko von nur 0,1%. Die Verteilung zwischen den Geschlechtern beträgt demnach 100:1.

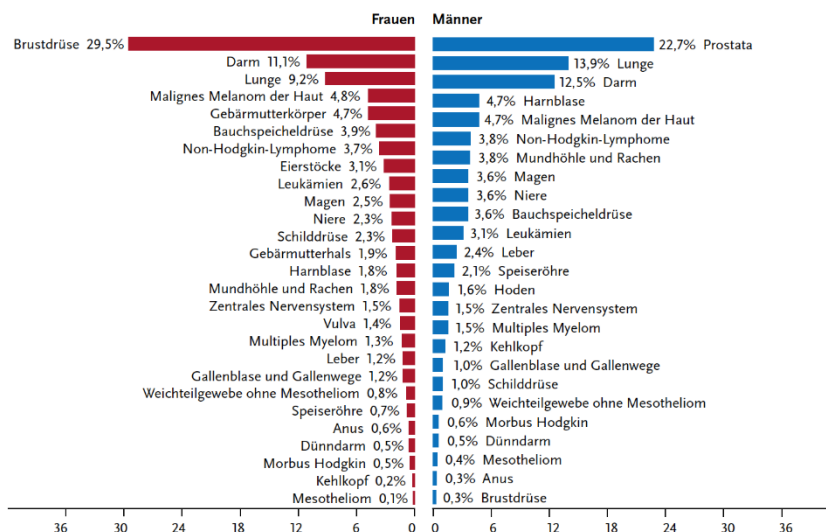


Abbildung 1: Darstellung der prozentualen Häufigkeit maligner Erkrankungen in Deutschland.

Die Daten beziehen sich auf das Jahr 2016. Erkrankungen der Brustdrüse haben mit 29,5% den höchsten Anteil bei Frauen (1).

2.1.2 Mortalität

Betrachtet man die altersstandardisierte Sterberate an Brustkrebs aus dem Jahr 2017, so lag diese bei 22,9 je 100.000 Personen in Deutschland (11). Die Entwicklung in den letzten Jahren zeigt einen stetigen Rückgang der altersstandardisierten Sterberate. Ein wesentlicher Grund hierfür könnte die Einführung des Mammographie-Screenings in den Jahren 2005-2009 sein. Die Diagnosestellung gelingt deutlich früher und es werden auch Tumoren entdeckt, die womöglich lebenslang unerkannt geblieben wären (9). Zudem haben auch Fortschritte in den Therapiemöglichkeiten dazu beigetragen die krebspezifische Mortalität zu senken. Auf die Gesamtmortalität haben Früherkennungsmaßnahmen jedoch keinen Einfluss, da die steigende Lebenserwartung die Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken erhöht (12, 13).

2.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Verschiedene genetische Faktoren steigern das Brustkrebsrisiko deutlich. Relevant sind vor allem Mutationen der Tumorsuppressorgene *Breast Cancer associated gene 1/2 (BRCA 1/2)*. Während das Lebenszeitrisiko ohne Vorliegen einer Mutation bei 12,8% liegt, haben Frauen mit *BRCA1*-Mutation ein kumulatives Risiko von 72%, mit *BRCA2*-Mutation liegt dieses bei 69% (14). Zu den allgemeinen Risikofaktoren gehören ein höheres Lebensalter, hohe Brustgewebisdichte und toxische Faktoren (Alkohol- und Nikotinabusus). Weiterhin spielen ein langer hormonell aktiver Zeitraum, d.h. eine frühe Menarche und eine späte Menopause, sowie keine oder nur wenige Schwangerschaften eine Rolle. Zudem gelten eine Hormonersatztherapie in der Postmenopause und die Einnahme oraler Kontrazeptiva als Risikofaktoren (15). Zu den hormonellen Risikofaktoren zählt auch Adipositas. Adipozyten enthalten das Enzym Aromatase, welches sie in die Lage versetzt Östrogene zu produzieren. Des Weiteren konnte die Erkrankung Diabetes mellitus Typ II (DMT2) in verschiedenen Studien als Risikofaktor identifiziert werden. Liegt ein DMT2 vor, steigt die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken um bis zu 10-20% an (16, 17).

2.1.3.1 Diabetes und Brustkrebs

Im Jahr 2017 wurde in der Zeitschrift *Diabetes Care* eine Studie veröffentlicht, die die Anzahl der Todesfälle durch Diabetes in Deutschland untersucht hat. 21% aller Todesfälle konnten der Erkrankung Diabetes zugeschrieben werden, 16% davon dem DMT2 (18). Diabetes und Brustkrebs haben folglich beide einen hohen Anteil an allen Todesursachen in Deutschland und ebenso weltweit. Der Zusammenhang zwischen den Erkrankungen ist aktuell Gegenstand der Forschung. Es gibt verschiedene Denkansätze, die eine mögliche Verbindung zwischen dem vermehrten Auftreten von Brustkrebs und einer erhöhten Mortalitätsrate bei Patientinnen mit Diabetes diskutieren (19, 20). Ein Mammakarzinom wird

bei Patientinnen mit Diabetes häufiger erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (21). Eine mögliche Erklärung könnte die körperliche Beeinträchtigung, die Patientinnen durch eine chronische Erkrankung haben, bieten. Mögliche Anzeichen einer Brustkrebserkrankung bleiben länger unbemerkt oder werden verdrängt (22). Einen weiteren Grund für das späte Erkennen der Erkrankung untersuchten Maruthur *et alia* (*et al.*) in einer Studie über den Zusammenhang zwischen Adipositas und Mammographie-Screening. Sie konnten zeigen, dass Patientinnen mit Adipositas signifikant seltener an einem Screening teilnahmen als normalgewichtige Frauen (23). Während Adipositas ein nachgewiesener Risikofaktor für DMT2 ist und dieser mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs einhergeht, konnten Maskarinec *et al.* demonstrieren, dass der Zusammenhang zwischen Diabetes und Brustkrebs bei Einbeziehung des Body-Mass-Index (BMI) geringer ausfiel (24, 25). Die gesteigerte Mortalitätsrate hängt vermutlich mit einer Einschränkung der Therapiemöglichkeiten zusammen. Srokowski *et al.* untersuchten die Komplikationshäufigkeit unter einer Chemotherapie bei Patientinnen mit Diabetes. Die Patientinnen litten nicht nur häufiger an Komplikationen, sondern mussten auch öfter hospitalisiert werden als Patientinnen ohne Diabetes. Am häufigsten traten Infektionen, Fieber, Anämie und Neutropenie auf (26). Durch die erhöhte Toxizitätsrate konnten viele Patientinnen nicht die reguläre Zytostatikadosis erhalten, weshalb die Ansprechrate auf die Chemotherapie geringer ausfiel und damit zu einer höheren Mortalitätsrate führte.

2.1.4 Klinische und histopathologische Klassifikation

Das Mammakarzinom kann in der gesamten Brust sowie im Bereich der Brustwarze auftreten. Am häufigsten ist es im oberen äußeren Quadranten der Brust lokalisiert. Einmal aufgetreten, wird es klinisch nach der *tumor nodes metastasis* (TNM)-Klassifikation maligner Tumoren eingeteilt (27). Diese bewertet die Tumorgröße (T), das Vorhandensein eines Lymphknotenbefalls (N) sowie das Vorliegen von Fernmetastasen (M). Aus diesen Komponenten ergibt sich die aktuelle UICC-Klassifikation, welche von der *Union Internationale contre le Cancer* (UICC) und dem *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) herausgegeben wird (*Tab.1*) Nach dieser richten sich die jeweiligen Therapieempfehlungen (27, 28). Zusätzlich wird durch einen Pathologen ein sogenanntes *Grading nach Elston und Ellis* (G1-G3) vorgenommen (29). Dieses beurteilt den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes. Hierbei entspricht G1 einem gut differenzierten Tumor, G2 einem mäßig differenzierten und G3 einem schlecht differenzierten Tumor (29, 30).

Tabelle 1: Einteilung des Mammakarzinoms nach UICC-/AJCC-Stadium auf Basis der TNM-Klassifikation.

Dargestellt ist eine Gegenüberstellung der UICC/AJCC-Stadien und der TNM-Klassifikation. Der Therapieansatz in den UICC/AJCC-Stadien 0-III ist primär kurativ. Im Stadium IV gilt ein palliativer Therapieansatz. Modifiziert nach dem Leitlinienprogramm Onkologie und dem *American Joint Committee on Cancer* (3, 28).

UICC-/AJCC-Stadium		TNM-Klassifikation	Therapieansatz	
0		Tis, N0, M0	Primär kurativ	
I	IA	T1, N0, M0		
	IB	T0-T1, N1mic, M0		
II	IIA	T0-T1, N1, M0 T2, N0, M0		
	IIB	T2, N1, M0 T3, N0, M0		
III	IIIA	T0-T2, N2, M0 T3, N1-N2, M0		
	IIIB	T4, N0-N2, M0		
	IIIC	Jedes T, N3, M0		
IV		Jedes T, jedes N, M1		Palliativ

Histopathologisch werden anhand des Ursprungsgewebes duktale von lobulären Neoplasien differenziert. Während die duktales Neoplasien vom Milchgangsepithel ausgehen, liegt der Ursprung der lobulären Neoplasien in den Milchdrüsenläppchen. Nach Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) werden invasive Karzinome ohne speziellen Typ (75% der Fälle) von jenen mit speziellem Typ (25% der Fälle) unterschieden (31). Invasive Karzinome ohne speziellen Typ weisen nestartige und kohäsive Tumorzellverbände auf. Im Gegensatz dazu zeigen invasive Karzinome mit speziellem Typ eher kleine und nicht-kohäsiv wachsende Tumorzellverbände. Diese sind häufig kettenförmig angeordnet.

Therapie relevant ist weiterhin die Bestimmung des Hormonrezeptor (HR)- und *Human epidermal growth factor receptor 2* (HER2)-Status. Die Expression des Östrogenrezeptors (ER) und Progesteronrezeptors (PR) wird immunhistochemisch beurteilt. Der Tumor wird als ER/PR-positiv bezeichnet, wenn mehr als 10% der Tumorzellen angefärbt sind. In diesem Fall ist eine endokrine Therapie erfolgversprechend (32, 33). Ebenso wird der HER2-Status immunhistochemisch bestimmt. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung ist die Genamplifikation über Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Ein positiver HER2-Status geht mit gutem Ansprechen auf eine Antikörpertherapie mit Trastuzumab einher (34). Sind

sowohl der HR-Status als auch der HER2-Status negativ, wird das Mammakarzinom als triple-negativ bezeichnet.

2.1.5 Metastasierung

Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate beim Mammakarzinom lag in den Jahren 2015/2016 bei ca. 80% (2). Einen relevanten Faktor für das Überleben bildet der Status der Metastasierung ab. Die Fähigkeit zu metastasieren ist ein Merkmal maligner Tumoren und trägt wesentlich zum Fortschreiten der Erkrankung bei (35). Metastasierung bedeutet, dass einzelne Zellen den Tumorverband verlassen und über verschiedene Wege (z.B. hämatogen oder lymphogen) in andere Körperregionen migrieren. Dort siedeln sie sich ab und beginnen sich zu teilen. Das invasive Mammakarzinom metastasiert häufig bereits in einem frühen Stadium. Dabei steigt das Risiko mit der Größe des Tumors (36, 37). Etwa 3,5% aller Patientinnen haben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Metastasen und ungefähr 12% aller Patientinnen treten im Lauf ihrer Erkrankung in das metastasierte Stadium über (38, 39). Sowohl eine lymphogene, als auch eine hämatogene Metastasierung ist möglich (40). Regionäre Lymphknotenmetastasen finden sich am häufigsten in der ipsilateralen Axilla des Primärtumors. Man teilt die Lymphknoten der Axilla in drei Level ein, welche sich an der Lokalisation zum *Musculus pectoralis minor* orientieren (41, 42). Lymphknotenmetastasen, die sich in der kontralateralen Axilla oder anderen Lokalisationen finden, zählen zu den Fernmetastasen. Wenn der Tumor Anschluss an das Gefäßsystem bekommt und hämatogen metastasiert, treten vor allem Knochenmetastasen auf. Des Weiteren metastasiert das Mammakarzinom häufig in Lunge, Pleura, Gehirn und Leber (43).

2.1.6 Prognose

Wie bei vielen anderen malignen Erkrankungen hängt die Prognose stark vom Zeitpunkt der Erstdiagnose ab. Vor allem das Tumorstadium und die Anzahl der befallenen Lymphknoten sind prognostisch relevant (44). Je kleiner der Tumor und je weniger Lymphknoten befallen sind, desto höher ist die Überlebenswahrscheinlichkeit (45, 46). Auch der HR- und der HER2-Status gelten als prognostische Faktoren (47, 48). Durch die Einführung von Früherkennungsmaßnahmen, wie zum Beispiel (z.B.) der Empfehlung zum Mammographie-Screening zwischen dem 50. und 69. Lebensjahr und einer Weiterentwicklung der Therapieoptionen, hat sich die Prognose in den letzten Jahren verbessert (49, 50). Die absolute 5-Jahres-Überlebensrate lag in den Jahren 2015/2016 bei ca. 80% (2). Neben der Tumorentität hat auch das Vorliegen von Vorerkrankungen, wie z.B. eine Diabeteserkrankung, eine Bedeutung für die Prognose. Yancik *et al.* zeigten in einer retrospektiven Studie über Komorbiditäten bei postmenopausalen Brustkrebs-Patientinnen, dass ca. 10% der Frauen an Diabetes erkrankt waren (51). Die Prävalenz des DMT2 in der

Gesamtbevölkerung liegt bei 7-8% und könnte eine mögliche Erklärung für das Vorhandensein gemeinsamer Risikofaktoren, z.B. Adipositas, höheres Alter und genetische Prädisposition, bieten (52). Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2010 wies nach, dass Patientinnen mit Diabetes eine bis zu 50% höhere Mortalitätsrate hatten als jene, die nicht an Diabetes erkrankt waren (19).

2.2 Therapie des Mammakarzinoms

2.2.1 Operative Therapie

Bei der Behandlung des Mammakarzinoms kann ein primär kurativer von einem palliativen Therapieansatz abgegrenzt werden. Die Wahl der Therapie basiert auf dem UICC-Stadium (Tab. 1). Operative Therapien erfolgen unter kurativen Voraussetzungen. Diese liegen bei einem lokal begrenzten Mammakarzinom bis UICC-Stadium IIA und bei einem lokal fortgeschrittenen Karzinom bis Stadium IIIC vor. Das Ziel der Operation ist immer die R0-Resektion. Das bedeutet, dass der Tumor vollständig reseziert wird und die Schnittränder in der histologischen Beurteilung frei von Tumorzellen sind. Nach dem Leitlinienprogramm der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF) sollte möglichst eine brusterhaltende Therapie (BET) angestrebt werden. Bezüglich des Überlebens ist die BET einer alleinigen Mastektomie nicht unterlegen, sofern auf die BET eine adjuvante Radiatio folgt (3). Kontraindikationen für die BET und damit Indikationen für eine Mastektomie sind die inkomplette Entfernung des Tumors, ein inflammatorisches Mammakarzinom, bestehende Kontraindikationen für eine adjuvante Radiotherapie und der ausgesprochene Wunsch der aufgeklärten Patientin.

Neben der operativen Behandlung des Lokalbefundes ist die Beurteilung des Lymphknotenstatus und ggf. die Entfernung befallener Lymphknoten relevant. Bei Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom und klinisch unauffälligem Lymphknotenstatus ist eine *Sentinel-Node*-Biopsie indiziert. Dabei wird der zuvor nuklearmedizinisch markierte Wächterlymphknoten über eine Hautmarkierung und *gamma*-Handsonde identifiziert und entfernt. Anschließend wird der Lymphknoten im intraoperativen Schnellschnitt auf pathologische Merkmale untersucht. Bei auffälligem Befund ist häufig eine Axilladisektion mit Entfernung von mindestens 10 Lymphknoten indiziert (3, 53).

2.2.2 Radiotherapie

Um das Risiko eines Lokalrezidivs zu senken, sollte nach einer BET eine Radiotherapie durchgeführt werden. Einzelne Ausnahmen bestehen nur dann, wenn eine begrenzte Lebenserwartung von weniger als 10 Jahren, ein kleiner, nodal-negativer, R0-resezierter, ER-/PR-positiver, HER2-negativer Tumor vorliegt und eine adjuvante endokrine Therapie durchgeführt wird. Auch nach Mastektomie ist eine Radiatio in bestimmten Fällen (pT4, pT3 mit Risikofaktoren wie L1, G3 und Alter < 50 Jahre, R1/R2-Resektion, mehr als 3 befallene axilläre Lymphknoten) leitliniengerecht indiziert. Die axilläre Radiatio sollte dann erfolgen, wenn ein hohes Rezidivrisiko für axilläre Lymphknotenmetastasen besteht und keine axilläre Dissektion erfolgt ist. Im palliativen Setting wird außerdem die Radiatio von Knochenmetastasen empfohlen, um die Schmerzsymptomatik zu lindern und die Frakturgefahr zu reduzieren (3).

2.2.3 Systemische Therapie

In der Systemtherapie mit einem kurativen Ansatz werden neoadjuvante von adjuvanten Therapiesituationen abgegrenzt. Beide basieren auf drei verschiedenen Behandlungsmöglichkeiten. Zu diesen zählen die Chemotherapie, die endokrine Therapie und die Antikörpertherapie. Die konventionelle Chemotherapie ist durch die zyklische Verabreichung hoher Dosen zytostatisch wirksamer Substanzen geprägt. Dabei wird das Behandlungskonzept der „maximal tolerierten Dosis“ (MTD) angewendet, um in den Teilungszyklus möglichst vieler Tumorzellen eingreifen zu können (54). Da die Wirkstoffe auch auf gesunde, sich schnell teilende Zellen wirken und in der Folge zu Nebenwirkungen führen, ist die Lebensqualität der Patientinnen oftmals eingeschränkt. Zu den häufigsten Veränderungen zählen Leukopenie und Anämie durch Myelosuppression, Fatigue, Alopezie, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe (55, 56). Zwischen den einzelnen Zyklen werden Behandlungspausen unterschiedlicher Länge eingehalten, um dem Körper eine Regenerationsmöglichkeit zu geben. In dieser Zeit können sich jedoch auch die Tumorzellen von den toxischen Effekten regenerieren und sogar Resistenzmechanismen entwickeln (57). Aus diesem Grund wird seit langer Zeit an Alternativen zur konventionellen Chemotherapie geforscht. Dazu zählen die zielgerichteten Therapien, die an sogenannten Biomarkern als Zielstruktur ansetzen und damit bestimmte Vorgänge auf Zellebene stören (58). Ein weiteres Konzept ist die metronomische Chemotherapie (2.2.4). Sie basiert auf der kontinuierlichen Gabe von zytostatisch wirksamen Substanzen. Die Dosierung ist dabei deutlich niedriger als bei einer konventionellen Chemotherapie. Dadurch kann das Auftreten von Nebenwirkungen verringert werden (4, 59).

2.2.3.1 Neoadjuvante Therapie

Eine neoadjuvante Therapie wird präoperativ bei Patientinnen mit inflammatorischem Mammakarzinom und solchen mit lokal fortgeschrittenem, primär inoperablem Tumor durchgeführt (3). Sie wird dann bevorzugt angewandt, wenn sowohl prä- als auch postoperativ das gleiche Chemotherapie-Schema indiziert wäre. Das Ziel einer neoadjuvanten Therapie ist die Verkleinerung des Tumors. Hieraus resultieren eine bessere Operabilität und die Möglichkeit einer BET. Die Therapiedauer sollte 18-24 Wochen betragen und mit einem Anthrazyklin und einem Taxan durchgeführt werden. HER2-positive Tumoren sollten zusätzlich mit dem monoklonalen Antikörper (AK) Trastuzumab behandelt werden. Hochrisikopatientinnen (Tumorgröße >2 cm, Lymphknotenbefall) wird eine duale Blockade mit Trastuzumab und Pertuzumab empfohlen. Triple-negative Mammakarzinome können zusätzlich mit Platinderivaten behandelt werden. Diese Therapie führt zu einer höheren Rate an histopathologischen Komplettremissionen. Die Toxizität ist jedoch hoch und ob ein Überlebensvorteil resultiert konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (3). Eine neoadjuvante endokrine Therapie mit Aromatasehemmern kann bei älteren, multimorbiden Patientinnen mit HR-positiven Tumoren angewandt werden.

2.2.3.2 Adjuvante Therapie

Eventuell zurückgebliebene Tumorzellen nach einer Operation sollen durch die adjuvante Chemotherapie vernichtet werden, um das Rezidivrisiko zu senken. Ob diese Art der Systemtherapie Anwendung findet, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zu diesen zählen das Tumorstadium, das Grading, der Lymphknotenstatus, der HR- und HER2-Status, das Alter der Patientin und der Menopausenstatus (60, 61) (*Tab.2*). Es scheint wichtig zu sein die Therapie zeitnah nach dem operativen Eingriff zu beginnen. Eine retrospektive Studie aus dem Jahr 2014 hat Daten von 6827 Patientinnen ausgewertet, die im Zeitraum von 1997 bis 2011 wegen eines invasiven Mammakarzinoms behandelt wurden. Der Zeitraum der Nachbeobachtung betrug fünf Jahre. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem Patientinnen mit rezeptornegativem beziehungsweise (bzw.) HER2-positivem Status von einer adjuvanten Chemotherapie profitierten, wenn die Behandlung so bald wie möglich, d.h. spätestens 30 Tage nach dem operativen Eingriff, eingeleitet wurde (62).

Tabelle 2: Indikationen und Therapieoptionen bei adjuvanter Systemtherapie.

Gegenübergestellt sind die Chemotherapie, die endokrine Therapie und die Antikörpertherapie mit ihren jeweiligen Indikationen und den daraus resultierenden Therapieoptionen. Basierend auf den Empfehlungen des Leitlinienprogramms Onkologie (3).

	Chemotherapie	Endokrine Therapie	Antikörpertherapie
Indikationen	<ul style="list-style-type: none"> - HER2-positive Tumoren (ab pT1b, N0) - Triple-negative Tumoren - Lymphknotenbefall - G3-Differenzierung - Junges Erkrankungsalter (<35 Jahre) 	<ul style="list-style-type: none"> - HR-positive, invasive Tumoren - abhängig von Menopausenstatus 	<ul style="list-style-type: none"> - HER2-positive Tumoren mit einem Tumordurchmesser >1 cm
Therapieoptionen	<ul style="list-style-type: none"> - Kombination der 1. Wahl: Anthrazyklin (Topoisomerasehemmstoff) + Taxan (Mitosehemmstoff) - bei Triple-negativem Karzinom: zusätzlich Platinderivat (Alkylanz) - Beginn der Therapie max. 4-6 Wochen nach Operation -Therapiedauer 18-24 Wochen 	<p><u>Prämenopausal:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Tamoxifen (selektiver Östrogenrezeptor-Modulator) - Therapiedauer mind. 5 Jahre <p><u>Postmenopausal:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Tamoxifen - Aromatasehemmer - Therapiedauer mind. 5 Jahre 	<ul style="list-style-type: none"> - Mittel der 1. Wahl: Trastuzumab (Monoklonaler AK gegen HER2) - Therapiedauer mind. 1 Jahr

2.2.3.3 Palliative Therapie

Der palliative Therapieansatz wird bei Patientinnen mit Fernmetastasierung angewendet. Hierbei stehen die Symptomlinderung und die Verbesserung der Lebensqualität im Vordergrund. Die Auswahl eines geeigneten Therapieschemas orientiert sich an vorhandenen therapierbaren Targets, wie z.B. dem HER2- und HR-Status (3) (Tab. 3).

Tabelle 3: Therapieoptionen im palliativen Setting.

Gegenüberstellung der Kombinationen aus HR- und HER2-Status und den jeweiligen Therapieoptionen. Basierend auf den Empfehlungen des Leitlinienprogramms Onkologie (3).

	HR +	HR-
HER2 +	Trastuzumab + Aromatasehemmer, ggf. mit Pertuzumab zur dualen Blockade	1. Trastuzumab + Docetaxel 2. Trastuzumab + Lapatinib
HER2 -	Endokrine Therapie nach Menopausenstatus 1. Prä-/Perimenopausal: Tamoxifen 2. Postmenopausal: Aromatasehemmer, ggf. in Kombination mit Cyclin-abhängigen-Kinase (CDK)4/6-Inhibitoren	Platinbasierte Chemotherapie bevorzugt

2.2.4 Das Konzept der metronomischen Chemotherapie

Das Konzept der metronomischen Chemotherapie ist in den letzten Jahren in den Fokus aktueller Fragestellungen gerückt. Anwendung findet das Behandlungsschema im palliativen Kontext, wenn kein schnelles Ansprechen erzielt werden muss und die Verbesserung der Lebensqualität und die Kontrolle der Erkrankung im Vordergrund stehen (63-66). Die Medikation wird kontinuierlich und ohne lange Therapiepausen p.o. appliziert (Abb. 2). Dabei ist der therapeutische Effekt vielversprechend und die Nebenwirkungsrate niedrig. Die kostengünstige Behandlung erfolgt entweder wöchentlich oder täglich und wird aktuell in Phase-III-Studien getestet (67). Über verschiedene Angriffspunkte kann das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamt werden (68, 69).

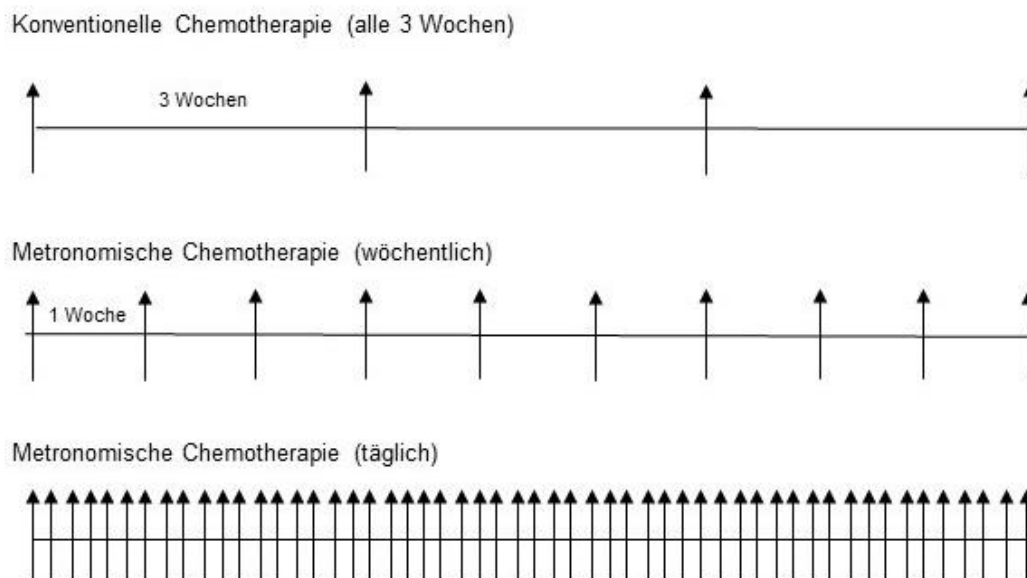


Abbildung 2: Schematische Darstellung der konventionellen und metronomischen Chemotherapie im Vergleich.

Die Pfeile stellen den Therapietag dar, die Bereiche dazwischen entsprechen den Behandlungspausen. Modifiziert nach Kerbel *et al.* (5).

Solide Tumoren besitzen die Fähigkeit neue Blutgefäße aus bereits vorgebildeten Blutgefäßen zu bilden. Dieser Prozess wird Angiogenese genannt und ist von verschiedenen Wachstumsfaktoren abhängig. Als Judah Folkman im Jahr 1971 erklärte, dass die Inhibition der Angiogenese eine Möglichkeit in der Tumorthherapie darstelle, wurde der Grundstein für die metronomische Chemotherapie gelegt (70). Heutzutage ist der Faktor, der hauptsächlich für die Angiogenese verantwortlich ist, als *vascular endothelial growth factor* (VEGF) bekannt (71, 72). In Tumoren ab einer Größe von mehr als 2 mm entsteht eine Hypoxie, da die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff nicht mehr ausreicht (73-75). Die Tumorzellen werden nekrotisch und apoptotisch (76). Der hypoxische Zustand führt zur Induktion von VEGF und damit zur Bildung neuer Blutgefäße (77). Es liegt nahe, dass die Angiogenese in der Folge als neuer Angriffspunkt in der Tumorthherapie etabliert wurde (78-82). Robert Kerbel unterstützte die Erkenntnis, dass zytotoxisch wirksame Substanzen die Gefäßneubildung in Tumoren hemmen können (83). Ein Review aus dem Jahr 2001 fasst alle Chemotherapeutika zusammen, die in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Studien eine anti-angiogene Wirkung zeigten (84).

Obwohl viele Chemotherapeutika eine anti-angiogene Wirksamkeit zeigen, kommt es in zahlreichen soliden Tumoren nicht zu einem dauerhaften Stillstand der Proliferation. Um mögliche Ursachen identifizieren zu können untersuchten Browder *et al.* das Alkylanz CPA

und dessen Wirkung auf die Endothelzellen. Sie applizierten CPA im konventionellen Behandlungsschema als MTD subkutan in immunkompetente, syngene Mäuse. Obwohl die Behandlung zur Apoptose der Endothelzellen führte, hatte sie keinen therapeutischen Vorteil. Die langen Behandlungspausen zwischen den einzelnen Zyklen könnten hierfür eine Erklärung bieten. Endothelzellen haben eine niedrigere Proliferationsrate als Tumorzellen, daher zeigen Substanzen, die in den Zellzyklus eingreifen, keine ausreichende Wirksamkeit. Die Endothelzellen bleiben intakt und können folglich die Tumorzellen in den Therapiepausen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgen und zu deren Regeneration beitragen. Browder *et al.* wendeten aus diesem Grund ein neues Therapieschema an. Sie behandelten die Zellen mit einer niedrigeren Dosis des Zytostatikums (170 mg/kg Körpergewicht (KG)). Die Behandlung erfolgte regelmäßig und ohne lange Therapiepausen. Der anti-angiogene Effekt fiel deutlich größer aus als bei dem konventionellen Behandlungsschema. Selbst Tumorzellen die zuvor eine Resistenz gegen CPA aufwiesen sprachen auf die Behandlung an (85). Kurz zuvor hatten auch Klement *et al.* ein niedrig dosiertes Behandlungsschema mit dem Wirkstoff Vinblastin in einer präklinischen Studie an Neuroblastom-Zelllinien angewendet. Sie konnten ebenfalls einen direkten anti-angiogenen Effekt nachweisen (86). Im Jahr 2000 wurde die Behandlung mit niedrig dosierten Zytostatika von Hanahan *et al.* in einem Artikel mit dem Titel „Less is more“ erstmals als „metronomische Chemotherapie“ bezeichnet (4).

Bisher wurde die metronomische Chemotherapie in verschiedenen Phase-II-Studien getestet. Etwa 80% der Studien konnten ein gutes Therapieansprechen und/oder einen klinischen Vorteil zeigen (69, 87, 88). Die erste große klinische Studie auf diesem Gebiet wurde 2002 publiziert (89). Colleoni *et al.* wendeten bei 63 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs ein metronomisches Behandlungsschema an. Die Patientinnen erhielten täglich 50 mg CPA p.o. und zusätzlich 2,5 mg MTX p.o. an Tag 1 und 2 jeder Behandlungswoche. Der therapeutische Effekt wurde über die VEGF-Konzentration im Serum gemessen. Diese sank im Verlauf der Behandlung und blieb auch in den folgenden 6 Monaten unter den Ausgangswerten. Die ORR betrug 19% und der klinische Gesamtnutzen 31,7% (*clinical benefit rate*, CBR; *Complete Response*, CR; *Partial Response*, PR; *Stable Disease*, SD > 24 Wochen). Für die Bewertung toxischer Effekte hat das *National Cancer Institute* die *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) entwickelt (90) Toxische Nebenwirkungen mit höherem CTCAE-Grad (>2) traten nur in Einzelfällen auf.

Eine weitere Studie von Orlando *et al.* schloss zwischen 2002 und 2005 22 Patientinnen mit metastasiertem HER2-positiven Brustkrebs ein (91). Die Patientinnen wurden mit einer

Kombination aus Trastuzumab und niedrig dosiertem MTX und CPA behandelt. Zuvor waren alle Patientinnen mit einer Kombination aus Trastuzumab und anderen Zytostatika behandelt worden, doch der Therapieerfolg blieb aus. Die niedrig dosierte Therapie führte bei 46% der Patientinnen zu einem klinischen Vorteil (CR + PR + SD nach 24 Wochen). Toxische Nebenwirkungen waren insgesamt milde. Diesen Vorteil hinsichtlich der Lebensqualität der Patientinnen konnten weitere Studien belegen (59, 89). Hierzu zählt auch die multizentrische, retrospektive Kohortenstudie VICTOR-6 (68). Über den Zeitraum von Januar 2011 bis Dezember 2016 wurden die Daten von 597 Patientinnen ausgewertet, die eine metronomische Chemotherapie bei fortgeschrittener Brustkrebserkrankung erhielten. Insgesamt konnte eine gute Effektivität der Therapie nachgewiesen werden. Die ORR betrug 25,8%, das *progression free survival* (PFS) 6,28 Monate. Die Abbruchrate aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen lag bei nur 8,7%. Vor allem ältere Patientinnen, die aufgrund ihres Alters und ihrer Komorbiditäten häufig keine konventionelle Chemotherapie mehr erhalten, könnten von der metronomischen Chemotherapie profitieren. In den *European Society for Medical Oncology (ESMO) International Consensus Guidelines* findet sich aufgrund guter Studienergebnisse eine Empfehlung für die metronomische Chemotherapie als mögliche Therapieoption bei fortgeschrittenem Brustkrebs (92). Auch die Kommission Mamma der Arbeitsgemeinschaft für Gynäkologische Onkologie e.V. (AGO) hat diese Empfehlung ausgesprochen (93).

2.2.4.1 Wirkung auf Endothelzellen und Faktoren der Angiogenese

Mehrere präklinische Studien konnten eine hohe Sensitivität aktivierter Endothelzellen auf niedrigere Konzentrationen von Zytostatika nachweisen (94-96). Dieser direkte toxische Effekt ist vor allem dann ausgeprägt, wenn die Behandlung ohne lange Therapiepausen durchgeführt wird. Die Inhibition der Angiogenese wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Hamano *et al.* wiesen im Mausmodell die erhöhte Expression von TSP-1 bei Behandlung mit niedrig dosiertem CPA nach (97). TSP-1 ist ein Tumorsuppressor und wird von Endothelzellen, Stromazellen, Thrombozyten und Tumorzellen produziert. Über eine Bindung an *cluster of differentiation* (CD) 36-Rezeptoren auf der Zellmembran von Endothelzellen wirkt TSP-1 anti-angiogen und anti-proliferativ (98-100). TSP-1 kann zudem an VEGF binden und über diesen Weg dessen angiogene Aktivität inhibieren (101).

Abschließend ist der Hypoxie-induzierte Faktor 1 (HIF-1) zu nennen, der die Expression von VEGF und dem *basic fibroblast growth factor* (bFGF) reguliert. Lee *et al.* führten einen *in vitro*-Versuch an humanen embryonalen Nierenzellen durch. Diese behandelten sie mit niedrig dosierten anthrazyklinhaltigen Chemotherapeutika. Die Behandlung führte zu einer erniedrigten Transkriptionsrate von HIF-1. Die Expression von VEGF war ebenso reduziert

(102). Weiterhin konnten Schito *et al.* nachweisen, dass metronomische Chemotherapie die Induktion von HIF innerhalb der Mikroumgebung eines metastasierten Tumors vermindert (103). Dies impliziert den anti-angiogenen Effekt. Neben der Angiogenese ist auch die Vaskulogenese für die Proliferation eines Tumors entscheidend. Diese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus Vorläuferzellen (*Endothelial Progenitor Cells* (EPC)). Die EPC entstammen dem Knochenmark. Bertolini *et al.* beurteilten die Wirkung von CPA auf das Vorhandensein von Endothelvorläuferzellen im Mausmodell (104). Sie behandelten die Mäuse mit der MTD und im Vergleich dazu mit einem niedrig dosierten Behandlungsschema. Es zeigte sich eine anhaltende Reduktion der zirkulierenden EPC bei Applikation von niedrig dosiertem CPA. In der Folge kam es zu einer verstärkten Hemmung der Tumorproliferation. Konventionell angewendet stieg die Anzahl der EPC nach Ende der Therapie erneut an. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist die Inhibition der Angio- und Vaskulogenese ein hauptsächlichlicher Wirkmechanismus der metronomische Chemotherapie.

2.2.4.2 Immunmodulierende Mechanismen

Metronomische Chemotherapie hat nicht nur Auswirkungen auf die Angiogenese, sondern auch auf die Immunmodulation. Regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) sind für die Tumorproliferation von Bedeutung. Sie zählen zu den $CD4^+CD25^+$ - Lymphozyten und können das Immunsystem unterdrücken, um das Risiko für Autoimmunerkrankungen zu senken. In vielen Tumorentitäten kommt es zu einer Anreicherung der T_{reg} -Zellen gefolgt von einer Unterdrückung der Immunantwort auf die Tumorzellen (105). Hohe T_{reg} -Level korrelieren mit verstärkter Tumorprogression und einer schlechteren Ansprechrate auf die Therapie (106). Lutsiak *et al.* untersuchten in einer präklinischen Studie die Funktionalität der T_{reg} -Zellen bei Behandlung gesunder Mäuse mit niedrig dosiertem CPA (107). Die Auswertung zeigte eine Reduktion und eine Funktionseinschränkung der T_{reg} -Zellen. Andere Lymphozytenarten wurden von der niedrig dosierten Therapie nicht beeinträchtigt. Ghiringhelli *et al.* konnten in einer klinischen Studie an neun metastasierten Patienten, die mit niedrig dosiertem CPA (50 mg p.o.) behandelt wurden, ebenfalls eine Reduktion der T_{reg} -Zellen nachweisen. Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit einer höheren Dosis CPA (200 mg p.o.) keine selektive Wirkung auf die T_{reg} -Zellen. Die immunmodulierenden Mechanismen der metronomischen Chemotherapie wirken über eine Reduktion der T_{reg} -Zellen, die zu einer erhöhten Immunantwort auf die Tumorzellen führt (105, 108).

Neben den T_{reg} -Zellen zählen die unreifen *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) zu den immunsupprimierenden Faktoren (109). Bei positivem Nachweis im Tumorbett verschlechtert sich die Prognose (110, 111). Über Stickstoffoxide, reaktive Sauerstoffspezies, Arginase und Interleukin (IL)-10 können die MDSC zu einer Suppression der Aktivierung von T- und

Natürlichen-Killer (NK)-Zellen führen (109, 112). Michels *et al.* konnten in *in vitro*-Versuchen zeigen, dass bei Anwendung von niedrig dosierten Zytostatika wie Paclitaxel die Differenzierung von MDSC zu reifen dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) gefördert wird (113). Die funktionell aktiven DC haben eine stimulierende Auswirkung auf das Immunsystem. Kaneno *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass DC, die mit niedrig dosierten Konzentrationen von MTX, Paclitaxel und Vinblastin *in vitro* behandelt wurden, erhöhte Mengen von CD83 und CD40 freisetzen (114). CD83 führt zur Reifung der dendritischen Zellen. CD40 ist relevant für die Interaktion der DC mit den T-Lymphozyten (115). Niedrig dosierte Zytostatika können somit die Reifung und Funktionalität von DC direkt beeinflussen. Auch Makrophagen spielen bei der Immunmodulation eine Rolle. Dabei werden zwei Typen unterschieden: die klassisch aktivierten Makrophagen (M1) und die alternativ aktivierten Makrophagen (M2) (116, 117). Während die Aktivierung der M1-Makrophagen zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt, sezernieren die M2-Makrophagen anti-inflammatorische Zytokine, fördern die Wundheilung und wirken als Immunsuppressoren (118). Tumor-assoziierte Makrophagen (TAM) ähneln den M2-Makrophagen (119). Über die Produktion von Zytokinen üben sie eine tumorfördernde Funktion aus. Bryniarski *et al.* konnten zeigen, dass die Behandlung von Makrophagen mit niedrig dosiertem CPA *in vitro* zu einer Umwandlung von M2- zu M1-Makrophagen führt (120). Damit wird die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-12 gefördert und anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und der *transforming growth factor beta* (TGF- β) werden herabreguliert. Dieser Eingriff in das Immunsystem scheint ein weiterer Grund für den Erfolg der metronomischen Therapie zu sein.

2.2.4.3 Direkte Effekte auf Tumorzellen

Die metronomische Chemotherapie zeigt des Weiteren direkte Effekte auf die Tumorzellen (69, 87, 121). Folkins *et al.* behandelten Gliomzellen in *in vitro*-Versuchen mit niedrig dosiertem CPA und konnten eine Reduktion der Tumor-Stammzellen nachweisen (122). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von mutierten Ovarialzellen mit Taxanen und Vincaalkaloiden über einen längeren Zeitraum zu einer Abhängigkeit der Zellen gegenüber den Wirkstoffen führte. Ein plötzlicher Entzug führte zum Zelltod (123-125). André *et al.* postulierten, dass man diesen Effekt nutzen könne, um den Erfolg metronomischer Therapie zu steigern (4D-Effekt: Drug-Driven Dependency/Deprivation). Behandlungspausen während der metronomischen Langzeittherapie könnten dazu führen, dass die medikamentenabhängigen und damit resistenten Tumorzellen abgetötet werden (126). Die vielfältigen Wirkmechanismen der metronomischen Chemotherapie werden im Folgenden zusammengefasst (*Abb. 3*).

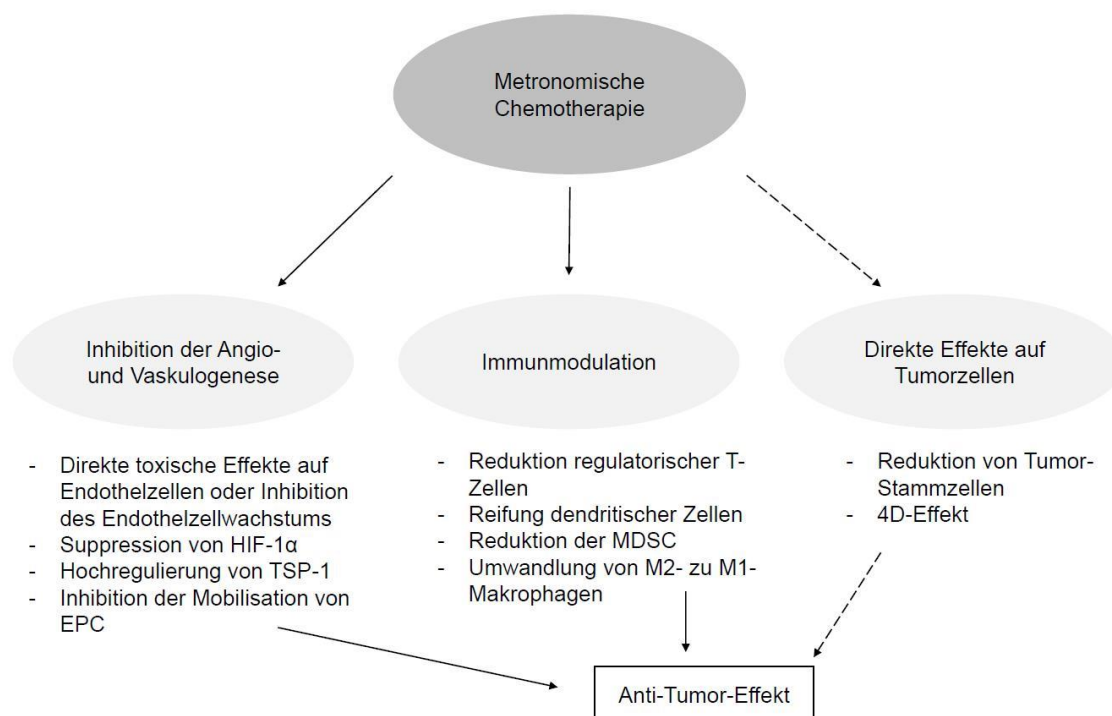


Abbildung 3: Zusammenfassung der Wirkmechanismen der metronomischen Chemotherapie.

Dargestellt sind die drei Hauptwirkmechanismen der metronomischen Chemotherapie. Über die Inhibition der Angiogenese und Vaskulogenese, eine Immunmodulation und direkte Effekte auf die Tumorzellen entsteht der Anti-Tumor-Effekt. Modifiziert nach Torimura *et al.* und Chen *et al.* (69, 121).

Neben den bekannten Wirkmechanismen der Zytostatika wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Wirksamkeit der Behandlung durch Insulin gesteigert werden könnte (8, 127-129).

2.3 Insulin-induzierte Verstärkung der Zellantwort auf Zytostatika

Insulin wirkt über den *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg proliferationsfördernd (130). *In vitro*-Versuche zeigten, dass MCF-7-Zellen, die sich gerade in der G₀/G₁-Phase befinden, durch Insulin stimuliert werden und wieder in den Zellzyklus eintreten (127-129). Der Anteil der Zellen in der S-Phase ist folglich erhöht. Basierend auf der Hypothese, dass Insulin zu einer gesteigerten Mitoseaktivität führt, untersuchten Alabaster *et al.* in den frühen 1980er Jahren MCF-7-Brustkrebszellen und testeten den Einfluss von Insulin auf die zytotoxische Wirkung von MTX *in vitro*. Sie konnten einen bis zu 10.000-fach verstärkten zytotoxischen Effekt nachweisen (6). 2003 führten Lasalvia-Prisco *et al.* eine randomisierte klinische Studie an 30 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs durch (7). Alle Patientinnen zeigten eine Resistenz gegenüber 5-Fluorouracil (5-FU), Adriamycin und CPA. Die Patientinnen wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt Insulin und MTX, die zweite nur MTX (2,5 mg/m² in 50 ml 30% Glucose) und die dritte nur Insulin (0,3 U/kg KG). Die Therapie erfolgte über zwei 21 Tage-dauernde Zyklen mit sieben Tagen Pause dazwischen. Messbare Läsionen wurden nach *Response Evaluation*

Criteria In Solid Tumors (RECIST) beurteilt. In der Gruppe, die MTX und Insulin erhielt, konnte das beste Ergebnis erreicht werden. Bei 9/10 Patientinnen schritt die Erkrankung nicht fort (SD). Im Jahr 2017 griffen Agrawal *et al.* diesen Gedanken auf und untersuchten den Einfluss von Insulin auf die Wirkung von 5-FU und CPA auf molekularer Ebene in MCF-7-Brustkrebszellen. Auch sie kamen zu dem Ergebnis, dass Insulin einen steigernden Effekt auf die Wirkung der Zytostatika hatte (8). Die Viabilität der Zellen war bei Kombination von 5-FU und CPA mit Insulin niedriger als ohne Insulin. Sie stellten die Überlegung an, dass Insulin die Brustkrebszellen für das Zytostatikum sensibilisiert. Die Aktivierung des Insulinrezeptors (IR) bzw. *Insulin-like growth factor receptor 1* (IGF1R) führt über den MAPK- und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) -Signalweg zu Zellwachstum und einer höheren Anzahl von Zellen in der S-Phase. Es ist allgemein bekannt, dass schnell wachsende Tumoren besser auf eine Chemotherapie ansprechen als langsam wachsende (35, 131). Chemotherapeutika wirken auf unterschiedliche Vorgänge in der Zelle. CPA beispielsweise bewirkt eine Störung der DNA-Replikation. Vinorelbin wirkt als Spindelgift mitosehemmend. Beide wirken demnach in der S-Phase des Zellzyklus. Hier ist die Zelle am angreifbarsten. Je mehr Zellen sich in dieser Phase befinden, desto wirksamer ist die Therapie. Des Weiteren könnte Insulin die Zellmembranpermeabilität erhöhen – ein Effekt, der bereits 1986 von Ayre *et al.* in Erwägung gezogen wurde – und dadurch zu einer gesteigerten Aufnahme des Zytostatikums in die Brustkrebszellen führen. Dies könnte den therapieunterstützenden Effekt von Insulin erklären (132).

Die Kombination der Insulinwirkung auf den Zellzyklus und die Zellmembranpermeabilität mit dem für metronomische Chemotherapie postulierten anti-angiogenen Effekt könnte zu einem bedeutenden therapeutischen Effekt führen (4). Für die metronomische Chemotherapie, d.h. niedrig dosierte, kontinuierliche Zytostatikatherapie, eignen sich Medikamente, die p.o. appliziert werden können. Hierzu zählen insbesondere Vinorelbin und CPA, das therapeutisch als dessen Stoffwechselprodukt Mafosfamid aktiv ist.

2.4 Der Wirkstoff Mafosfamid

Mafosfamid gehört zur Gruppe der Oxazaphosphorine, welche wiederum eine Untergruppe der alkylierenden Zytostatika ist. Dieser Gruppe zugehörig ist auch das CPA, ein sogenanntes Prodrug, welches durch Cytochrom-P450-Enzyme in der Leber aktiviert werden muss, um seine zytotoxische Wirkung zu entfalten (133) (*Abb.4*). Das durch enzymatische Umsetzung entstehende 4-OH-CPA steht mit dem Tautomer Aldophosphamid im Gleichgewicht. In der Zelle kann aus Aldophosphamid spontan Acrolein abgespaltet werden. Dabei entsteht die am stärksten alkylierende Verbindung: Phosphoramidmustard. Durch Bindung von Alkylgruppen an die DNA kommt es zum *Crosslinking* gegenüberliegender DNA-Stränge und in der Folge zu Strangbrüchen (134, 135). Das Resultat ist eine Störung der DNA-Synthese und schlussendlich die Apoptose. CPA kommt vielfältig zum Einsatz. Es ist ein Bestandteil der Kombinationschemotherapie des Ovarialkarzinoms, Non-Hodgkin-Lymphoms und Neuroblastoms (136). Auch bei der Behandlung des Mammakarzinoms findet es trotz hoch-emetogener Nebenwirkungen Anwendung (3, 137, 138). Mafosfamid ist ein Derivat des CPA. Entwickelt wurde es von den Asta-Werken in Bielefeld (139). Es hydrolysiert spontan zu 4-OH-CPA, weshalb keine Aktivierung durch Leberenzyme nötig ist. Im Jahr 1985 behandelten Bruntsch *et al.* Patienten, die an einem Malignom erkrankt waren, in einer Phase-I-Studie mit Mafosfamid (140). Alle Patienten zeigten zuvor Resistenzen gegen zytostatisch wirksame Substanzen und konnten keine Operation oder Radiotherapie erhalten. Mafosfamid wurde dreimal wöchentlich beginnend mit 160 mg/m² Körperoberfläche (KOF) intravenös appliziert. Die MTD lag bei 1000 mg/m² KOF. Es wurde eine niedrige hämatologische Toxizität beobachtet, jedoch entstanden starke Irritationen im Bereich der zur Applikation genutzten Vene. Dies könnte mit der hohen lokalen Konzentration von 4-OH-CPA zusammenhängen, die durch den spontanen Zerfall entsteht. Mafosfamid findet heutzutage vor allem *in vitro* Anwendung (141).

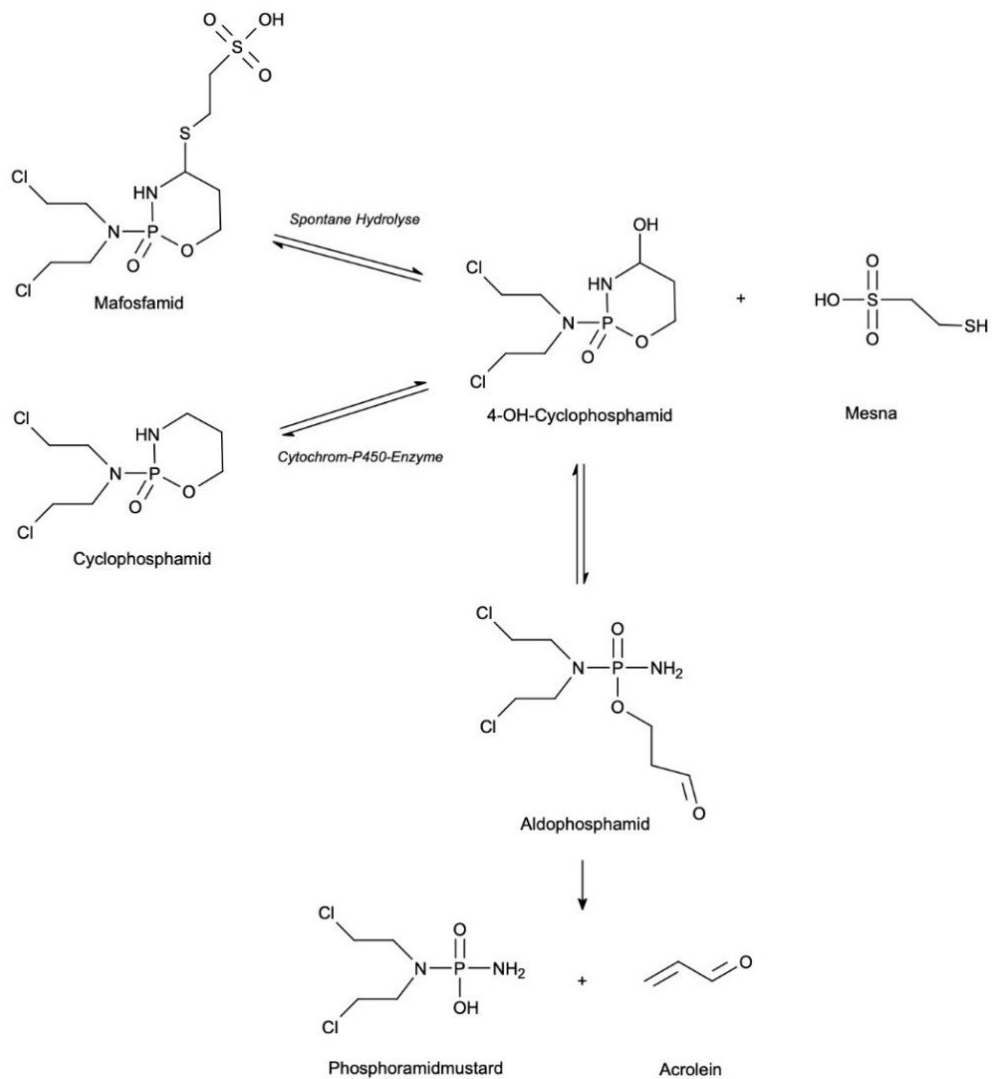


Abbildung 4: Metabolisierung von Mafosfamid und Cyclophosphamid.

Die Metabolisierung von Mafosfamid zu 4-OH-Cyclophosphamid und Mesna erfolgt durch spontane Hydrolyse, während das Prodrug Cyclophosphamid durch Cytochrom-P450-Enzyme aktiviert werden muss. 4-OH-Cyclophosphamid steht mit seinem Tautomer Aldophosphamid im Gleichgewicht. Aus diesem kann spontan Acrolein abgespalten werden und es entsteht Phosphoramidmustard. Dies ist ein starkes Alkylanz welches zum *Crosslinking* gegenüberliegender DNA-Stränge führt. Modifiziert nach Blaney *et al.* (142).

2.5 Der Wirkstoff Vinorelbin

Vinorelbin ist ein halbsynthetisches Derivat des Vincaalkaloids Vincristin. Es wird von dem französischen Unternehmen *Laboratoires Pierre Fabre* hergestellt und ist unter dem Handelsnamen Navelbine® bekannt. Seit 1996 wird es in Deutschland unter anderem (u.a.) zur Therapie des Mammakarzinoms und des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms eingesetzt (143). Vinorelbin kann intravenös oder oral appliziert werden. Die Wirkung von Vinorelbin beruht auf der Hemmung der Mitose, indem es als Antitubulin die Ausbildung der Mikrotubuli blockiert (144). Durch Unterbindung der Kernspindelbildung arretiert die Zelle in der Metaphase. Dieser Wirkmechanismus führt vor allem bei sich schnell teilenden Zellen erfolgreich zu einer Wachstumshemmung. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Vinorelbin auch die Funktionalität von Endothelzellen beeinträchtigt (145, 146). Diese anti-angiogene Wirkung zeigt Vinorelbin bereits in niedriger Dosierung. Der Wirkstoff eignet sich daher für das Konzept der metronomischen Chemotherapie. In diesem Zusammenhang führten Briasoulis *et al.* klinische Studien zur optimalen Dosierung von oralem Vinorelbin bei Behandlung von Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs durch (147, 148). Die Applikation von 50 mg Vinorelbin dreimal wöchentlich p.o. führte, verglichen mit niedrigeren Dosierungen, zu einer besseren Ansprechrate. Mit dieser Dosierung konnte eine stabile Serumkonzentration von 2,6 ng/ml erreicht werden. Addeo *et al.* führten eine weitere Studie an älteren Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs durch. Sie behandelten die Patientinnen mit 70 mg/m² Vinorelbin p.o. dreimal wöchentlich und konnten ebenso eine gute Ansprechrate erzielen (PFS 7,7 Monate, *overall survival* (OS) 15,9 Monate). Die Anzahl an toxischen Nebenwirkungen war dabei gering. Niedrig dosiertes Vinorelbin eignet sich daher besonders für ältere Patientinnen, da es gut toleriert wird und folglich die Lebensqualität erhöht (149).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

3, (4,5-Dimethyl-thiazol-2 yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid (MTT) #M2128	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
<i>Aqua destillata</i> . (<i>Aqua dest</i>) #0123	Fresenius Kabi, Sèvres, Frankreich
Choleratoxin #C8052	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Digitonin #D141	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	Thermo-Fisher, Waltham, USA
DMEM/HAM's F12 (1:1) (1x) #11320-074	
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS) #D8537	Sigma Aldrich. St. Louis, USA
<i>Epidermal growth factor</i> (EGF) #E9644	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol abs. (EtOH) #147194	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS) #1027106	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Fibronektin (<i>Bovine Protein</i>) #33010018	Thermo Scientific, USA
Gelatine (<i>Porcine skin</i>) #G8150	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Hydrocortisone #H0888	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Insulin <i>solution human</i> (10,6 mg/ml) #I9278	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Mafosfamid #D-17272	Niomech IIT GmbH, Bielefeld
Penicillin/Streptomycin (P/S) #P0781	Sigma Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin- <i>Ethylen-diamine-tetraacetic-acid</i> (EDTA) # T4049	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Terralin liquid #0297	Schülke & Mayr, Norderstedt
<i>Roswell Park Memorial Insitute</i> Medium	Thermo-Fisher, Waltham, USA
RPMI 1640 #21875-034	
Salzsäure (HCl) 1N #OC317952 UN1789	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 1M #160313	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS) #5136.1	Carl Roth, Karlsruhe
Staurosporin #S5921	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

3.1.2 Puffer und Lösungen

Fibronektin-Lösung	1 mg/ml in DPBS
Gelatine-Lösung	2 mg/ml in DPBS
MTT-Lösung	0,5% MTT in DPBS
SDS-Lösung	10% in Aqua dest.
Solubilisierungspuffer	49,5 ml SDS 10 % + 500 µl 1 N HCl

3.1.3 Medienzusätze

Choleratoxin	Stammlösung 100 ng/ml in DMEMF12
EGF	Stammlösung 20 µg / 50 µl in DPBS
Hydrocortisone	Stammlösung 260 µg/ml in DPBS
Insulin	Stammlösung 10,6 mg/ml

3.1.4 Kits

Cell proliferation ELISA, BrdU (colormetric) #11647229001	Roche, Basel, Schweiz
RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay #JA1011	Promega, Madison, USA

3.1.5 Zellkultur-Medien

Einfriermedium:	FCS + 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)
RPMI I:	RPMI + 10% FCS + 1% P/S
RPMI II:	RPMI + 5% FCS + 1% P/S
RPMI III:	RPMI + 1% P/S
DMEM F12 I:	500 ml DMEM F12 + 5% FCS + 1% P/S + 25 µl EGF (20 µg/ml) + 1 ml Hydrocortison-Stammlösung + 50 µl Choleratoxin-Stammlösung + 500 µl Insulin-Stammlösung

DMEM F12 II:	500 ml DMEM F12 + 5% FCS + 1% P/S + 25 µl EGF (20 µg/ml) + 1 ml Hydrocortison-Stammlösung + 50 µl Cholera-toxin-Stammlösung
DMEM F12 III:	DMEM F12 + 1% P/S

3.1.6 Verbrauchsmaterialien

BD Microlance™ 3 30G 0,3x13 #03087148	BD Biosciences, Bedford, USA
Cellstar Cell Culture Plate 96-Well #655180	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Einmalhandschuhe sempercare® nitrile #3000002119	Semperit, Wien, Österreich
Kryoröhrchen Cryogenic Tubes Nunc™, #375418	Thermo-Fisher, Waltham, USA
LUNA™ Cell Counting Slides #L12001	Logos Biosystems, Südkorea
Pasteurpipetten, Kunststoff #EKN7.1	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen Filter Tips, TipOne® 0,5-10 µl #S1121-3810, 2-20 µl #S1120-3810, 20-200 µl #S1120-8810, 100-1000 µl #S1126-7810	StarLab, Hamburg
Reaktionsgefäße Safe-Lock 0,5 ml #0030121023, 1,5 ml #0030120086, 2 ml #0030120094	Eppendorf, Hamburg
Serologische Pipetten 1 ml #604181, 2 ml #710180, 5 ml #606180, 10 ml #607180 25 ml #760180	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen mit Standard-Wachstumsoberfläche 75 cm² #658175	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 15 ml #188261, 50 ml #227261	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.7 Gebrauchsmaterialien

Corning™ Cool Cell® <i>Freezing Container</i>	Fisher Scientific, Waltham, USA
Finnpipette® F2 (0,2-2 µl)	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikroliterpipette Transferpette® S (100-1000 µl)	Brand, Wertheim
Mikroliterpipetten Transferpette® S-8 (10-100 µl, 20-200 µl)	Brand, Wertheim
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand, Wertheim
Pipetten Eppendorf <i>Research</i> (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg

3.1.8 Geräte

CO ₂ -Inkubator	Thermo-Fisher, Waltham, USA
Computer	Dell, Round Rock, USA
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Gerlingen
Gefrierschrank -80 °C	Nalgene Nunc Int, Penfield, USA
GloMax®- <i>Multi detection system</i>	Promega, Madison, USA
Heißluftsterilisator Heraeus Oven	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kryo Stickstofftank Locator 6 Plus	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Gerlingen
Labor-Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Labormikroskop DMRB	Leica, Wetzlar
LUNA™ <i>Automated Cell Counter</i>	logos Biosystems, Südkorea
Schüttler MTS 4	IKA-Werke, Staufen
Sicherheitswerkbank Heraeus HeraSafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Vacuumpumpe BVC control	Vacuubrand, Wertheim
Vortex	Heidolph, Schwabach
Wasserbad AquaLine AL18	Lauda, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau

3.1.9 Computerprogramme

Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
MoleculeSketch	Stefan Dolder, Schweiz

3.1.10 Zytostatika

3.1.10.1 Mafosfamid

Bezugsquelle: Niomech-IIT GmbH, Universität Bielefeld

Summenformel: $C_9H_{19}Cl_2N_2O_5PS_2$

Das eingesetzte Mafosfamid wurde in Pulverform bei 4 °C gelagert. Es hat ein Molekulargewicht von 500,45 g/mol. An den Versuchstagen wurden jeweils 2 mg Mafosfamid unter sterilen Bedingungen abgewogen und in 1 ml RPMI II- bzw. DMEM F12 II-Medium gelöst. Aus dieser Lösung wurden 100 µl entnommen und mit 9900 µl RPMI II- bzw. DMEM F12 II-Medium verdünnt, um eine Konzentration von 20 µg/ml zu erhalten. Im Folgeschritt wurden 5 ml dieser Lösung mit 5 ml Medium verdünnt. Dieser Verdünnungsschritt wurde sechsmal wiederholt. Direkt im *Well* wurde nochmal eine 1:2 Verdünnung vorgenommen, indem aus jeder hergestellten Konzentration jeweils 50 µl pro *Well* pipettiert und mit weiteren 50 µl Kulturmedium versetzt wurden.

3.1.10.2 Vinorelbin

Bezugsquelle: Apotheke der Universitätsmedizin Mainz

Summenformel: $C_{45}H_{54}N_4O_8$

Verwendet wurde Navelbine®, welches als fertige Stammlösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml aus der hauseigenen Apotheke bezogen wurde. Bei 4 °C gelagert war es 28 Tage lang haltbar. Für die Versuche wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Um eine Ausgangskonzentration von 10 ng/ml zu erreichen wurde 1 µl der Stammlösung in 10 ml Medium verdünnt. Nach Mischen der Lösung wurden 5 ml entnommen und in ein mit 5 ml Medium gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Dieser Verdünnungsschritt wurde sechsmal wiederholt. Pro *Well* wurden dann 50 µl der jeweiligen Konzentration pipettiert und mit weiteren 50 µl Medium verdünnt.

3.1.11 Zelllinien

3.1.11.1 MCF-10A

Diese Zelllinie (*American Type Culture Collection* ATCC® CRL-10317™, Rockville Maryland, USA) wurde 1984 etabliert und stammt aus dem Brustdrüsengewebe einer zum Zeitpunkt der Entnahme 36-jährigen Frau kaukasischer Herkunft. Sie ist nicht karzinogen und weit verbreitet, um die normale Funktion und Transformation von Brustzellen *in vitro* zu untersuchen (150, 151).

3.1.11.2 MCF-7

Diese Tumorzelllinie (ATCC® HTB-22™, Rockville Maryland, USA) wurde 1970 aus Pleurapunktat isoliert. Sie entstammt einem metastasierten Adenokarzinom der Brustdrüse einer zum Zeitpunkt der Entnahme 69-jährigen Frau kaukasischer Herkunft. Der HR-Status ist positiv (ER+, PR+), der HER2-Status ist negativ (HER2-) (152).

3.1.11.3 T-47D

Die Zelllinie T-47D (ATCC® HTB-133™, Rockville Maryland, USA) wurde gleichermaßen wie die MCF-7 Zelllinie aus Pleurapunktat gewonnen. Sie ist epithelialer Herkunft und entstammt einem infiltrierenden duktalem Karzinom einer zum Zeitpunkt der Entnahme 54 Jahre alten Patientin. Der Rezeptorstatus ist ER+, PR+ und HER2- (153).

3.1.11.4 BT-549

Diese Zelllinie (ATCC® HTB-122™, Rockville Maryland, USA) weist einen hypertriploiden Chromosomensatz auf und wurde 1978 aus einem papillären, invasiv wachsenden duktalem Mammakarzinom einer zum Zeitpunkt der Entnahme 72-jährigen Patientin isoliert. Die Zelllinie ist triple-negativ (ER-, PR-, HER2-) (154).

3.1.11.5 MDA-MB-231

Diese Tumorzelllinie (ATCC® HTB-26™, Rockville Maryland, USA) ist epithelialer Herkunft. Sie wurde aus Pleurapunktat einer zum Zeitpunkt der Entnahme 51 Jahre alten Patientin etabliert und stammt aus einem Adenokarzinom der Brustdrüse. Es handelt sich um triple-negative Zellen (155).

3.2 Methoden

3.2.1 Steriles Arbeiten

Die Arbeit mit humanen Zelllinien erfordert sterile Bedingungen, um Kontaminationen zu vermeiden. Um dies zu gewährleisten, wurden die verwendeten Medien und Reagenzien bei 4 °C gelagert. Vor Benutzung wurden sie im Wasserbad auf 37 °C erwärmt und anschließend wurden die Oberflächen mit 70%-igem Ethanol desinfiziert, bevor sie unter die sterile Werkbank gestellt wurden. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien wurden vor Gebrauch sterilisiert oder steril erworben.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen im Inkubator bei 37 °C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) kultiviert. Als Nährmedium wurde für die Tumorzellen RPMI I-Medium gewählt. Die Zelllinie MCF-10A benötigte DMEM F12 I als Nährmedium. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium aus nicht vollständig konfluent bewachsenen Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die adhärenen Zellen mittels 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst und nach individueller Inkubationszeit mit 9 ml RPMI I- bzw. DMEM F12 I-Medium versetzt, um die Trypsin-Reaktion durch das enthaltene FCS abzustoppen. Nach mehrmaliger Resuspension wurde immer ein kleines Volumen zur weiteren Kultivierung in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben und die restliche Zellsuspension entweder in ein Reaktionsgefäß überführt, um für einen Versuch genutzt werden zu können, oder verworfen.

3.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zu Beginn aller durchgeführten Versuche wurden die Zellen, wie unter 3.2.2.1 beschrieben, aus den Zellkulturflaschen mittels Trypsin-EDTA gelöst, mit Medium versetzt und in ein Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Volumen überführt. Aus der vollständig resuspendierten Zelllösung wurden 15 µl in eine *LUNATM Cell Counting Slide* pipettiert und automatisch im *LUNATM Automated Cell Counter* ausgezählt.

3.2.2.3 Kryo-Konservierung

Die Konservierung der humanen Zelllinien erfolgte in flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden 75 cm²-Zellkulturflaschen mit ca. 80% Konfluenz verwendet. Im ersten Schritt wurde das Medium entfernt. Es folgten ein Waschschrift mit DPBS und die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA zum Ablösen der Zellen. Die gelösten Zellen wurden mit 9 ml Vollmedium resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt, bevor sie für 5 min bei 300 x g zentrifugiert wurden. Um die Zellen während der Kryo-Konservierung zu schützen, wurde

das Zellpellet vom Medium befreit und stattdessen mit 1-1,5 ml Einfriermedium versetzt. Nach guter Resuspension wurde die Zellsuspension zügig in ein Kryoröhrchen pipettiert und in einem *Cool Cell* Behälter für 24 h bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung in den Stickstofftank zur längerfristigen Lagerung der Zellen.

Für die Re-Kultivierung der Tumorzellen wurden die Kryoröhrchen für zwei Minuten in ein 37 °C warmes Wasserbad gestellt. Die aufgetauten Zellen wurden in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 4 ml RPMI I-Medium bzw. DMEM F12 I-Medium versetzt. Es folgte eine Zentrifugation mit 1200 *rounds per minute* (rpm) bei 300 x g für fünf Minuten. Anschließend wurde das Medium abgenommen und das Zellpellet mit 2 ml Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt, mit 10 ml Medium versetzt und im Inkubator kultiviert.

3.2.3 Analyse zellulärer Parameter

3.2.3.1 Proliferationsassay

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte mit dem *Cell Proliferation ELISA BrdU* Kit der Firma Roche (*Tab.5*). Grundlage dieses Assays ist der Einbau von 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in die DNA und die nachfolgende Detektion mittels eines Antikörpers (AK). Im ersten Schritt wurden die Zellen, wie unter 3.2.2.1 und 3.2.2.2 beschrieben, aus den Zellkulturflaschen gelöst und gezählt. Im zweiten Schritt wurden 2500 Zellen/*Well* ausgesät und die 96-*Well*-Platten für 24 h im Inkubator kultiviert. Danach erfolgte die Behandlung mit Insulin für 24 h (*Tab. 4*). Nach Ablauf der Zeit wurden 10 µl/*Well* *BrdU-Labeling-Solution* (1:100 in DPBS verdünnt) pipettiert. Die vorgegebene Inkubationszeit der *BrdU-Labeling-Solution* bei 37 °C und 5% CO₂ wurde von 2 h auf 3 h erhöht, da hierdurch stabilere Ergebnisse erreicht werden konnten. So wurde gewährleistet, dass die proliferierenden Zellen genug Zeit haben anstelle von Thymidin BrdU in ihre DNA einzubauen. Nach der Inkubationszeit wurden die Überstände vorsichtig entfernt und 200 µl/*Well* *Fix-Denat*-Lösung zu den Zellen pipettiert. Während der 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur (RT) denaturierten die Proteine der Zellen und wurden im *Well* fixiert. Die Lösung wurde entfernt und im nächsten Schritt wurden 100 µl/*Well* Anti-BrdU-AK-Lösung zugegeben. Der AK wurde kurz vor Gebrauch 1:100 in *Antibody Dilution Solution* verdünnt. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei RT. Nach Entfernen der Lösung wurde die Platte dreimal mit je 200 µl/*Well* *Washing Solution* gewaschen und anschließend wurden 100 µl/*Well* Substratlösung pipettiert. Diese inkubierte für 15 min lichtgeschützt bei RT. In der Lösung ist das Substrat TMB enthalten, welches mit der Peroxidase reagiert, die an den Anti-BrdU-AK gekoppelt ist. Hierdurch kommt es zu einer blauen Farbreaktion, welche mit 25 µl/*Well* 1M H₂SO₄ abgestoppt wurde. Durch einminütiges Schütteln bei 300 rpm schlägt die Farbe von blau zu

gelb um. Im letzten Schritt wurde die Extinktion der Überstände mittels GloMax®-Multi detection system bei 450 nm Wellenlänge und 650 nm Referenzwellenlänge gemessen. Die Auswertung der Daten wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

Tabelle 4: Berechnung der Insulinkonzentrationen.

Die Konzentration der Insulin-Stammlösung betrug 10,6 mg/ml. Für die Konzentrationen 0,01–1 µg/ml Insulin wurde zuerst eine Verdünnung angesetzt. Diese setzte sich aus 1 µl Insulin und 999 µl Medium zusammen.

Konzentration in µg/ml	Insulin-Stammlösung in µl	Medium in µl
0,01	1,22 aus Verdünnung	1300
0,1	12,3 aus Verdünnung	1300
1	122,6 aus Verdünnung	1177
10	1,22	1300
20	2,45	1300
50	6,13	1300

Tabelle 5: Assay zur Testung der Wirkung von Insulin auf die Proliferation mittels Cell Proliferation ELISA BrdU Kit der Firma Roche.

Beschreibung des Vorgehens an den Versuchstagen 1-3.

Tag 1	Ausplattieren von 2500 Zellen/Well in RPMI I- bzw. DMEM F12 I-Medium
Tag 2	Behandlung der Zellen mit Insulin in Konzentrationen von 0,01–50 µg/ml in RPMI III- bzw DMEM F12 III-Medium
Tag 3	Quantifizierung der Proliferation über die BrdU-Inkorporation

3.2.3.2 Viabilitätsassay

Die Viabilität der Zellen wurde mittels MTT-Assay gemessen. Hierfür wurden 2500 Zellen pro *Well* in 100 µl RPMI I-Medium bzw. DMEM F12 I-Medium in eine 96-*Well*-Platte ausplattiert. Die Adhäsion der Zellen erfolgte für 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂. An den darauffolgenden Versuchstagen erfolgte die Behandlung der Zellen (*Tab. 6, Tab. 7, Tab. 8*). Am Tag der Durchführung des MTT wurden 10 µl einer 0,5%igen MTT-Lösung pro *Well* pipettiert. Auf eine vollständige Resuspension der Lösung wurde geachtet. Es folgte eine Inkubationszeit von 4 h bei 37 °C und 5% CO₂. In dieser Zeit wurde der gelbe Farbstoff des MTT von der mitochondrialen Dehydrogenase zu violetten Formazankristallen umgewandelt (156, 157). Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden 100 µl des Solubilisierungspuffers pro *Well* hinzugegeben. Hierdurch wurde der umgesetzte Farbstoff aus den Zellen herausgelöst. Die Lösung wurde in jedem *Well* gut resuspendiert. Nach weiteren 4 h im Inkubator wurde die Extinktion mittels GloMax®-*Multi detection system* gemessen. (Wellenlänge: 570 nm, Referenzwellenlänge: 650 nm). Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

Tabelle 6: MTT-Assay zur Beurteilung der Viabilität der Zellen nach Kultivierung auf unterschiedlich beschichteten 96-*Well*-Platten.

Beschreibung des Vorgehens an den Versuchstagen 1-4.

Tag 1	Vorbereitung der 96- <i>Well</i> -Platten Platte 1: Ohne Beschichtung Platte 2: 30 µl/ <i>Well</i> Fibronectin (c=1 mg/ml) Platte 3: 30 µl/ <i>Well</i> Gelatine (c=2 mg/ml)
Tag 2	Ausplattieren von 2500 Zellen/ <i>Well</i> in RPMI II- bzw. DMEM F12 II-Medium
Tag 3	a) Kultivierung der Zellen mit 100 µl RPMI I- bzw. DMEM F12 I-Medium b) Kultivierung der Zellen mit 100 µl RPMI III- bzw. DMEM F12 III-Medium
Tag 4	Durchführung des MTT-Assay

Tabelle 7: MTT-Assay zur Testung der Wirkung von Insulin auf die Viabilität.

Beschreibung des Vorgehens an den Versuchstagen 1-3.

Tag 1	Ausplattieren von 2500 Zellen/ <i>Well</i> in RPMI I- bzw. DMEM F12 I-Medium
Tag 2	Behandlung der Zellen mit Insulin in Konzentrationen von 0,01 – 50 µg/ml in RPMI III- bzw DMEM F12 III-Medium
Tag 3	Durchführung des MTT-Assay

Tabelle 8: MTT-Assay zur Testung der Wirkung einer Kombinationsbehandlung mit Insulin und Mafosfamid bzw. Insulin und Vinorelbin auf die Viabilität.

Die Behandlung der Zellen erfolgte mit 0, 0,01 oder 10 µg/ml Insulin. Mafosfamid wurde in Konzentrationen von 0 – 9,55 µg/ml getestet, Vinorelbin in Konzentrationen von 0,16 – 10 ng/ml. Als Kultivierungsmedium wurde ab Tag 2 Medium mit nur 5% FCS verwendet.

Tag 1	Ausplattieren von 2500 Zellen/ <i>Well</i> in RPMI I- bzw. DMEM F12 I-Medium
Tag 2	Wechsel auf RPMI II- bzw. DMEM F12 II-Medium
Tag 3	Behandlung der Zellen mit Insulin
Tag 4	Kombinationsbehandlung der Zellen Insulin und Mafosfamid bzw. Insulin und Vinorelbin
Tag 5	Kombinationsbehandlung der Zellen Insulin und Mafosfamid bzw. Insulin und Vinorelbin
Tag 6	Kombinationsbehandlung der Zellen Insulin und Mafosfamid bzw. Insulin und Vinorelbin
Tag 7	Durchführung des MTT-Assay

3.2.3.3 Apoptose-Assay

Mit Hilfe des *RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay* von Promega wurde die Apoptoserate untersucht (Tab. 9). Bei diesem Assay wird das Phosphatidylserin gemessen, welches während des apoptotischen Vorgangs von der inneren Zellmembran nach außen verlagert wird. Annexin V bindet an das Phosphatidylserin und wird mittels Lumineszenz detektiert (158). Zur Kontrolle der Apoptose wurde 1 µM Staurosporin verwendet. Staurosporin ist ein Proteinkinaseinhibitor und kann über die Caspase-3 Apoptose induzieren (159). Daneben kann Staurosporin konzentrationsabhängig zum Zellzyklusarrest führen (160). Digitonin in einer Konzentration von 50 µg/ml wurde zur Kontrolle der Nekrose verwendet. Digitonin ist ein Saponin, welches zur Permeabilisierung von Zellmembranen führt und damit zur Nekrose (161). Am Tag des Annexin V-Assays wurde das *2x Detection Reagent* nach Protokoll vorbereitet (162). Im folgenden Schritt wurden 100 µl der *2x Detection Reagent* pro *Well* pipettiert. Die *96-Well*-Platte wurde für 30 Sekunden bei 500-700 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurde die Lumineszenz direkt mit dem *GloMax®-Multi detection system* gemessen.

Tabelle 9: Assay zur Testung der Wirkung von Insulin auf die Apoptoserate.

Beschreibung des Vorgehens an den Versuchstagen 1-3.

Tag 1	Ausplattieren von 2500 Zellen/ <i>Well</i> in RPMI I- bzw. DMEM F12 I-Medium
Tag 2	a) Kultivierung der Kontrollzellen mit Medium b) Behandlung der Zellen mit Insulin in Konzentrationen von 0,01 – 50 µg/ml in RPMI III- bzw DMEM F12 III-Medium Apoptosekontrolle: Staurosporin 1 µM Nekrosekontrolle: Digitonin 50 µg/ml
Tag 3	Durchführung des <i>RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay</i>

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung von Beschichtung und Kultivierungsmedium

Das Konzept der metronomischen Chemotherapie besteht darin über einen längeren Zeitraum hinweg täglich eine niedrige Dosis eines Zytostatikums zu verabreichen. Um dies im experimentellen Modell nachzustellen, wurde zunächst die Viabilität der Zelllinien mittels MTT-Assay über einen Zeitraum von 72 h hinweg beobachtet. Dies sollte Aufschluss darüber geben, ob eine länger andauernde Kultivierung der Zellen möglich ist. Um optimale Bedingungen für Folgeversuche zu schaffen, wurden drei verschiedene Beschichtungen der 96-Well-Platten und zwei verschiedene Kultivierungsmedien getestet. Es wurden 96-Well-Platten ohne Beschichtung, mit Fibronectinbeschichtung und solche mit Gelatinebeschichtung verwendet. Weiterhin wurde zwischen einer Kultivierung der Zellen mit serumfreiem Medium und Medium mit Zusatz von 5% FCS unterschieden. Bei diesem Versuch wurde das Kultivierungsmedium alle 24 h erneuert.

Die MCF-10A-Zellen zeigten nach Kultivierung mit serumfreiem Medium in der Messreihe ohne Beschichtung und mit Fibronectinbeschichtung eine Reduktion der Viabilität um 37% bzw. 24% nach 72 h. Die Messreihe mit Gelatinebeschichtung zeigte bereits nach 24 h die niedrigste Viabilität. Im Vergleich dazu konnte bei Kultivierung mit 5% FCS-Medium beobachtet werden, dass die MCF-10A-Zellen bis zu 48 h nach Ausplattierung eine um 60% gesteigerte Viabilität aufwiesen. Nach 72 h blieb der Wert konstant oder sank wieder. Auch hier zeigte sich nur ein geringer Unterschied zwischen der Messreihe ohne Beschichtung und mit Fibronectinbeschichtung, während die Gelatinebeschichtung die niedrigste Viabilität zur Folge hatte (*Abb. 5*).

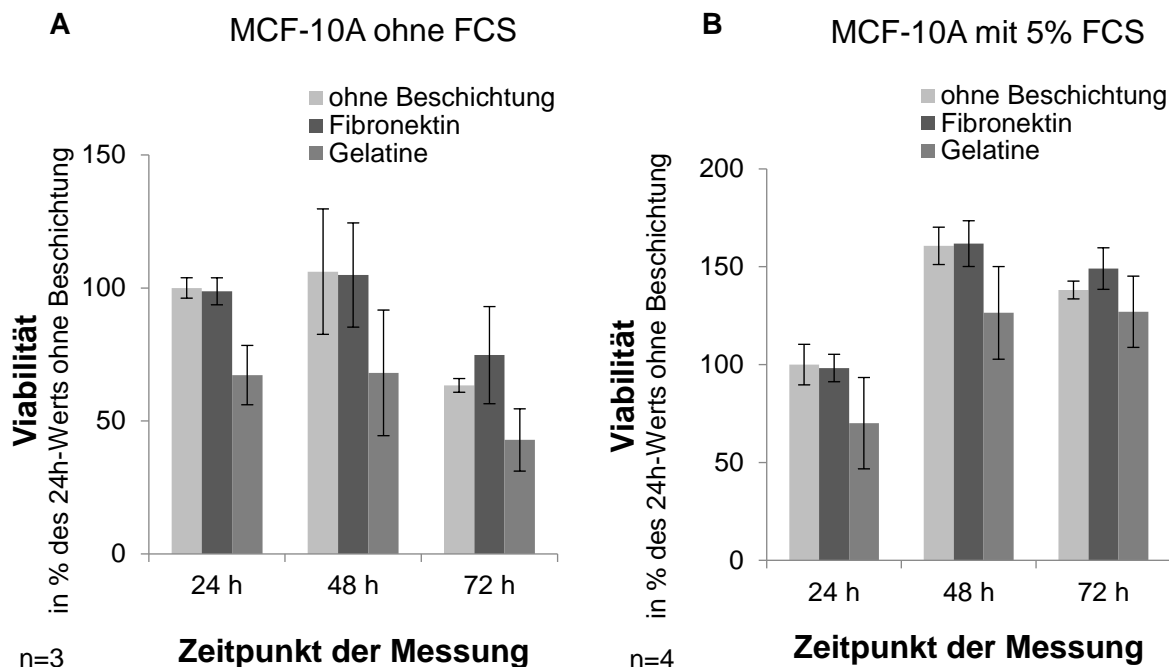


Abbildung 5: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von MCF-10A-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).

Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Getestet wurde die Viabilität auf unbeschichteten 96-Well-Platten im Vergleich zu Fibronectinbeschichtung und Gelatinebeschichtung. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von drei bzw. vier Versuchsdurchläufen bezogen auf den 24 h-Wert der Messreihe ohne Beschichtung, sowie die Standardabweichungen. Es wurden keine Signifikanzen (t-Test) festgestellt.

Die Viabilität der in serumfreiem Medium kultivierten MCF-7-Zellen sank im Zeitverlauf deutlich. Nach 72 h lag diese bei allen Beschichtungsansätzen unter 50%. Die Zellen, die auf 96-Well-Platten ohne Beschichtung kultiviert wurden, zeigten nach 24 h die höchste Viabilität. Nach 48 h und 72 h lag die Viabilität der Zellen bei Fibronectinbeschichtung wenige Prozentpunkte höher als bei den Zellen ohne Beschichtung. Die Gelatinebeschichtung führte insgesamt zur niedrigsten Zellviabilität. Im Vergleich dazu zeigten die Zellen, die im Medium mit 5% FCS kultiviert wurden, bei Fibronectinbeschichtung und ohne Beschichtung eine gesteigerte Viabilität nach 48 h und 72 h. Die Gelatinebeschichtung führte auch bei dieser Messreihe zur geringsten Viabilität (Abb. 6).

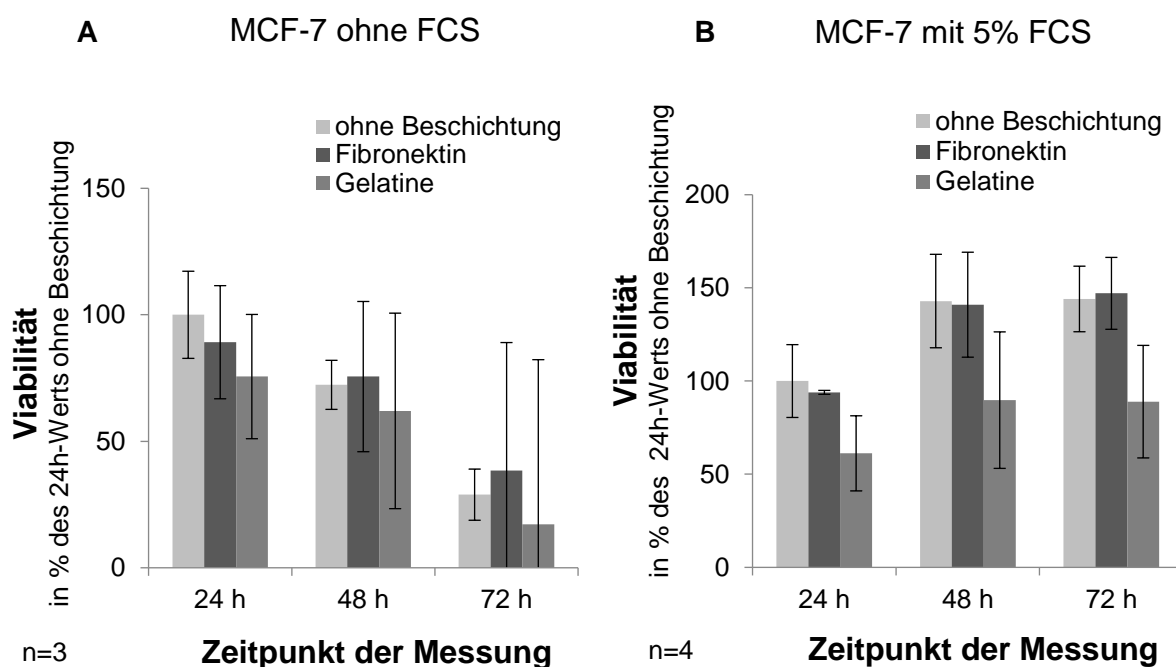


Abbildung 6: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von MCF-7-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B)

Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Getestet wurde die Viabilität auf unbeschichteten 96-Well-Platten im Vergleich zu Fibronektinbeschichtung und Gelatinebeschichtung. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von drei bzw. vier Versuchsdurchläufen bezogen auf den 24 h-Wert der Messreihe ohne Beschichtung, sowie die Standardabweichungen. Es wurden keine Signifikanzen (t-Test) festgestellt.

Die in serumfreiem Medium kultivierten T-47D-Zellen zeigten im Zeitverlauf eine kontinuierliche Senkung der Viabilität. Nach 72 h nahm diese bei allen Beschichtungen Werte unter 50% an. Im Vergleich zeigte die Messreihe mit der Gelatinebeschichtung jedoch leicht höhere Werte. Die Zellviabilität der Zellen bei Kultivierung mit 5% FCS stieg im Vergleich zum ersten Messwert nach 24 h an. Die Gelatinebeschichtung führte bei der Kultivierung mit 5% FCS zur niedrigsten Viabilität. Die Fibronektinbeschichtung bewirkte nach 72 h eine höhere Viabilität der Zellen im Vergleich zu jenen auf den 96-Well-Platten ohne Beschichtung (Abb. 7).

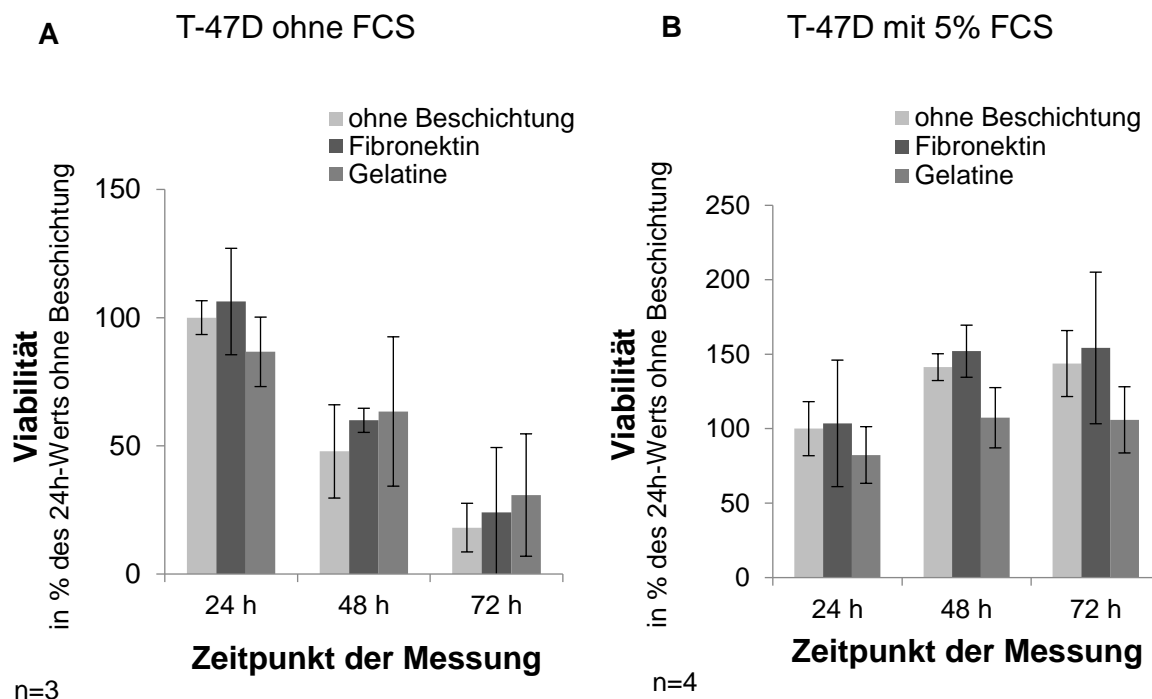


Abbildung 7: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von T-47D-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).

Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Getestet wurde die Viabilität auf unbeschichteten 96-Well-Platten im Vergleich zu Fibronektinbeschichtung und Gelatinebeschichtung. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von drei bzw. vier Versuchsdurchläufen bezogen auf den 24 h-Wert der Messreihe ohne Beschichtung, sowie die Standardabweichungen. Es wurden keine Signifikanzen (t-Test) festgestellt.

Die Zelllinie BT-549 zeigte bei der Kultivierung ohne FCS bei allen drei Messreihen einen Abfall der Viabilität. Der niedrigste Wert von 55% wurde bei der Gelatinebeschichtung erreicht. Die Beschichtung mit Fibronektin zeigte nach 72 h gegenüber den 96-Well-Platten ohne Beschichtung einen leichten Vorteil für die Viabilität der Zellen (Abb. 8).

Bei Kultivierung mit 5 % FCS lag die Viabilität insgesamt höher. Die Viabilität stieg im Verlauf auf bis zu 177% bei der Messreihe mit Fibronektinbeschichtung. Hiervon unterschied sich die Messreihe ohne Beschichtung nur um 2%. Die Gelatinebeschichtung führte im Vergleich wieder zu den niedrigsten Messwerten.

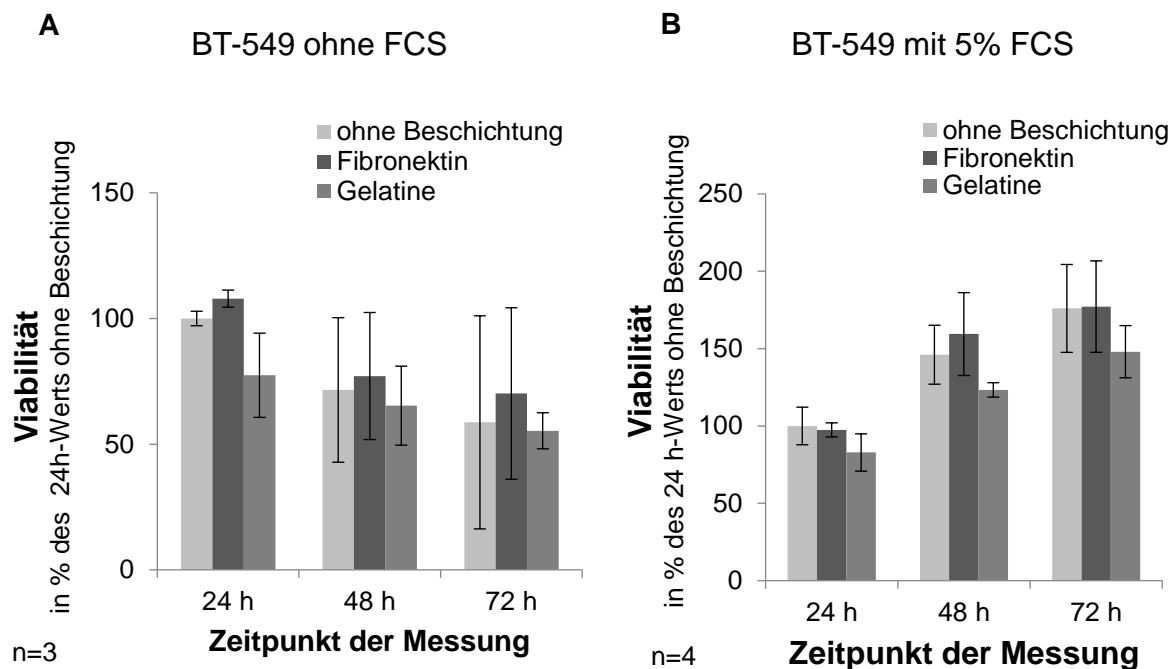


Abbildung 8: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von BT-549-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).

Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Getestet wurde die Viabilität auf unbeschichteten 96-Well-Platten im Vergleich zu Fibronectinbeschichtung und Gelatinebeschichtung. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von drei bzw. vier Versuchsdurchläufen bezogen auf den 24 h-Wert der Messreihe ohne Beschichtung, sowie die Standardabweichungen. Es wurden keine Signifikanzen (t-Test) festgestellt.

Die Kultivierung der Zelllinie MDA-MB-231 mit Medium ohne Zusatz von FCS zeigte nach 48 h keine Veränderung zum 24 h-Wert (Abb. 9). Nach 72 h sank die Viabilität um ca. 50% ab. Die Kultivierung mit 5% FCS führte bereits nach 48 h zu einer gesteigerten Viabilität. Den höchsten Wert von 179% erreichte die Messreihe mit Fibronectinbeschichtung nach 72 h. Im Vergleich zeigte die Messreihe mit Gelatinebeschichtung die geringste Viabilitätssteigerung.

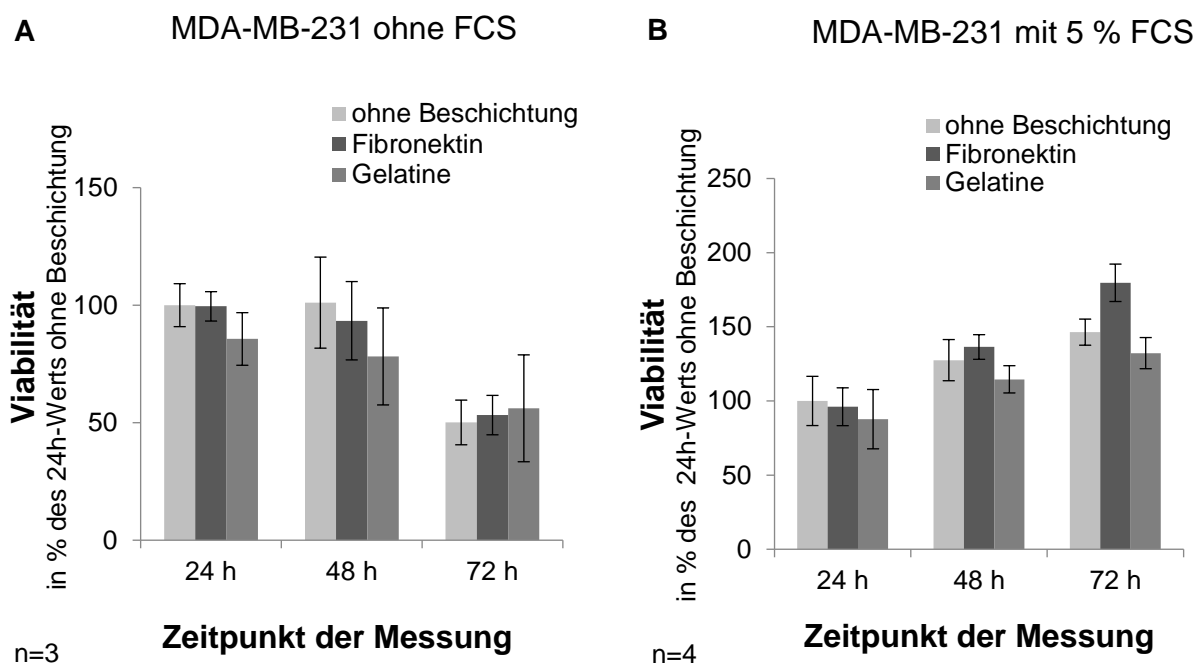


Abbildung 9: Einfluss verschiedener Beschichtungen auf die Zellviabilität von MDA-MB-231-Zellen bei Kultivierung mit Medium ohne FCS (A) bzw. mit 5% FCS (B).

Die Viabilität wurde mittels MTT-Assay ermittelt. Getestet wurde die Viabilität auf unbeschichteten 96-Well-Platten im Vergleich zu Fibronektinbeschichtung und Gelatinebeschichtung. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von drei bzw. vier Versuchsdurchläufen bezogen auf den 24 h-Wert der Messreihe ohne Beschichtung, sowie die Standardabweichungen. Es wurden keine Signifikanzen (t-Test) festgestellt.

Fasst man die Ergebnisse aus den oben vorgestellten Versuchen zusammen, lässt sich sagen, dass die Behandlung mit einem serumfreien Kultivierungsmedium für einen Versuch von längerer Behandlungsdauer ungeeignet ist. Die Behandlung mit 5% FCS führte im Vergleich dazu zu einer stabilen oder sogar gesteigerten Viabilität. Die Zelllinien zeigten die niedrigste Viabilität in Kombination mit der Gelatine-Beschichtung. Die Viabilität der Zellen zeigte nur geringfügige Unterschiede zwischen den unbeschichteten Versuchsansätzen und jenen mit Fibronektinbeschichtung. Für folgende Versuche wurde daher festgelegt, dass eine Behandlung mit 5% FCS auf unbeschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt werden soll.

4.2 Einfluss von Insulin auf die Proliferation

Die Fähigkeit zu proliferieren ist eine wesentliche Eigenschaft von Tumorzellen. Sie ermöglicht das Wachstum des Tumors und damit den Erkrankungsprogress. Der Einfluss von Insulin auf die Proliferation der Tumorzellen wurde mittels eines BrdU-basierten Assays untersucht. Um einen isolierten Effekt des Insulins darstellen zu können, wurden die Zellen während der 24-stündigen Behandlung mit serumfreiem Medium kultiviert.

Die Proliferationsfähigkeit der Zelllinie MCF-10A zeigte nur geringe Veränderungen durch Insulin (*Abb. 10 A*). In allen Konzentrationen wurde eine leichte Erhöhung der Proliferation um ca. 12 – 27% gemessen. Insulin führte in den MCF-7-Zellen in allen getesteten Konzentrationen, außer bei 10 µg/ml, zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation (*Abb. 10 B*). Nach einer Behandlung mit 10 µg/ml Insulin wurde ein maximaler Wert von 148% erreicht. Der niedrigste Wert von 123% wurde nach der Behandlung mit 0,01 µg/ml Insulin erreicht. Insulinkonzentrationen von 0,01 – 10 µg/ml führten in der T-47D-Zelllinie zu einer stetigen Proliferationssteigerung (*Abb. 10 C*). Der höchste Wert betrug 125% und wurde nach Behandlung mit 10 µg/ml erreicht. Ab einer Konzentration von 20 µg/ml sank die Proliferation, blieb jedoch immer noch höher als die der unbehandelten Zellen. Unter Einfluss des Insulins stieg die Proliferation der BT-549-Zellen bei keiner der verwendeten Konzentrationen um mehr als 8% (*Abb. 10 D*). Die Proliferationsrate der Zellen durch die verschiedenen Insulinkonzentrationen zeigte insgesamt nur geringe Unterschiede, war jedoch bei Behandlung mit 0,01 µg/ml Insulin signifikant erhöht ($p=0,0205$). Die Proliferation der MDA-MB-231-Zelllinie wurde durch Insulin nicht beeinflusst (*Abb. 10 E*). Insulin führte im Gegenteil zu einer geringen Proliferationssenkung. Der niedrigste Wert von 79% wurde nach einer Behandlung mit 0,01 µg/ml Insulin erreicht. Signifikant erniedrigt waren die Werte nach Behandlung mit 20 bzw. 50 µg/ml Insulin ($p=0,0268$ bzw. $p=0,0092$).

Zusammenfassend zeigte sich, dass Insulin den größten Einfluss auf die MCF-7-Zellen hatte. Die Zelllinien MCF-10A und T-47D zeigten gering gesteigerte Proliferationsraten. Die Proliferation der BT-549-Zellen und der MDA-MB-231-Zellen wurde von Insulin kaum oder sogar negativ beeinflusst.

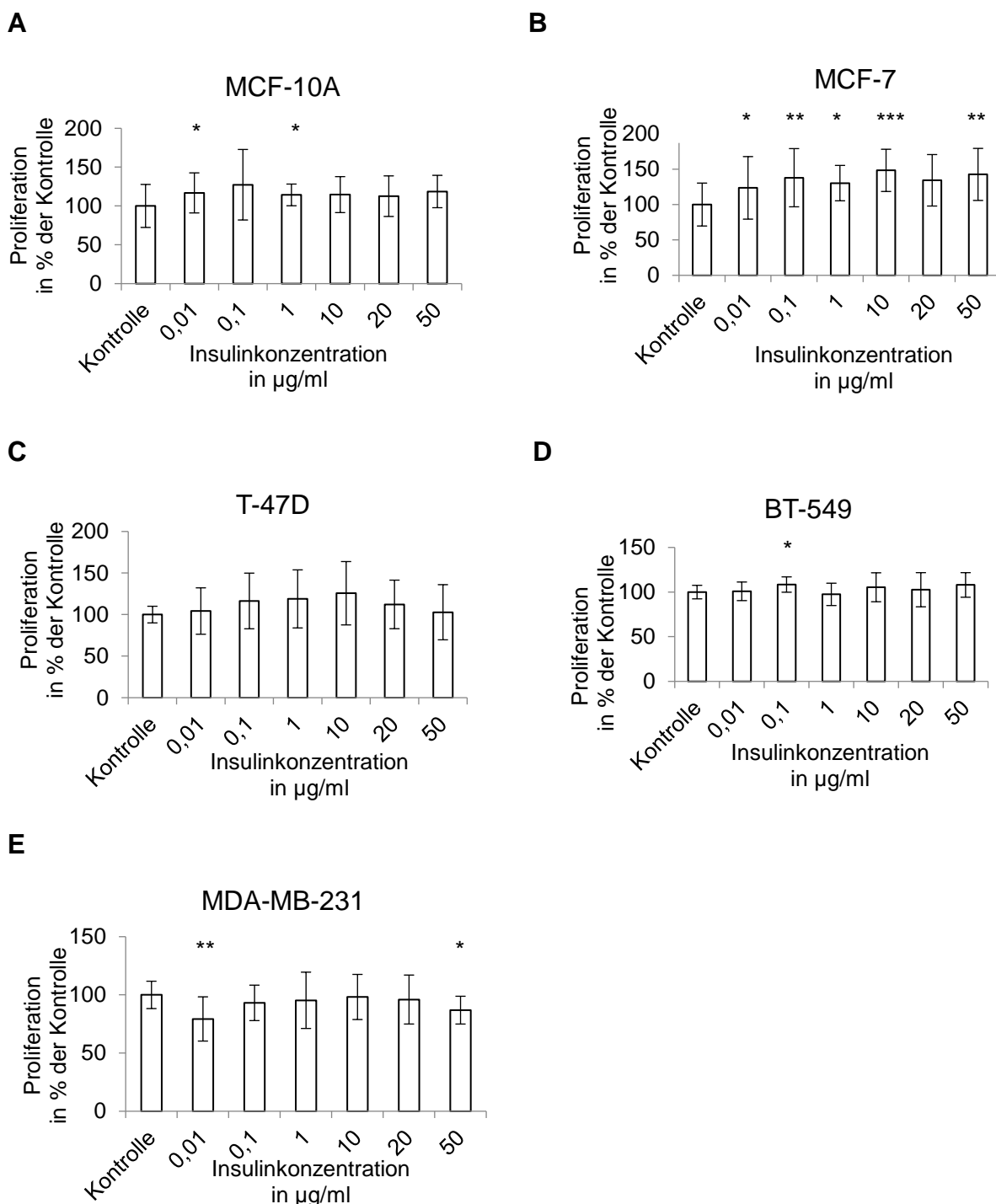


Abbildung 10: Proliferation der MCF-10A-, MCF-7-, T-47D-, BT-549- und MDA-MB-231- Zellen unter Einfluss von Insulin.

Die Bestimmung der Proliferation erfolgte mit dem *Cell Proliferation* ELISA BrdU Kit von Roche nach 24 h-Behandlung der Zellen mit Insulin in serumfreiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ergebnisse von jeweils drei Versuchsdurchläufen. Diese wurden auf den Kontrollwert ohne Insulinbehandlung (entspricht 100%) bezogen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert <0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle wurden mit einem Stern gekennzeichnet (p-Wert < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***)).

4.3 Einfluss von Insulin auf die Viabilität

In der Zelllinie MCF-10A induzierte Insulin eine Steigerung der Viabilität um maximal 14% bei Konzentrationen zwischen 0,01 und 20 µg/ml (*Abb. 11 A*), während 50 µg/ml Insulin zu einer Reduktion der Viabilität führte. Der niedrigste Wert lag bei ca. 84%. Die Zellviabilität der MCF-7-Zellen wurde durch Insulin in Konzentrationen zwischen 0,01 – 1 µg/ml kaum beeinflusst (*Abb. 11 B*). Den höchsten Prozentwert erreichten die Zellen nach einer Behandlung von 10 µg/ml Insulin, wobei dieser mit ca. 103% im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nur geringfügig höher lag. Ab einer Konzentration von 20 µg/ml sank die Viabilität stark und erreichte bei 50 µg/ml einen Wert von ca. 65%. Insulin beeinflusste die Viabilität der T-47D-Zellen nur leicht (*Abb. 11 C*). Die höchste Steigerung betrug 9% nach einer Behandlung mit 10 µg/ml Insulin. Ab einer Konzentration von 20 µg/ml verringerte sich die Zellviabilität. Signifikant auf ca. 89% ($p=0,0003$) und erreichte den niedrigsten Wert von ca. 74% nach Behandlung mit 50 µg/ml Insulin ($p=0,0412$). Die Proliferation der BT-549-Zellen wurde durch Insulin kaum beeinflusst (*Abb. 11 D*). 50 µg/ml Insulin führten insgesamt zur geringsten Zellviabilität von ca. 87%. Die Zellviabilität der MDA-MB-231-Zellen stieg bis zu einer Insulinkonzentration von 1 µg/ml leicht an und erreichte hier den höchsten Wert von 111% ($p = 0,1105$) (*Abb. 11 E*). Ab einer Konzentration von 10 µg/ml sank die Viabilität stetig auf ca. 82%. Zwischen 0,01 und 10 µg/ml Insulin reagierten alle Zelllinien mit einer leichten Steigerung der Viabilität. Diese betrug jedoch nicht mehr als 15%. Im Vergleich zeigten alle Zelllinien ab 20 µg/ml Insulin eine Reduktion der Viabilität.

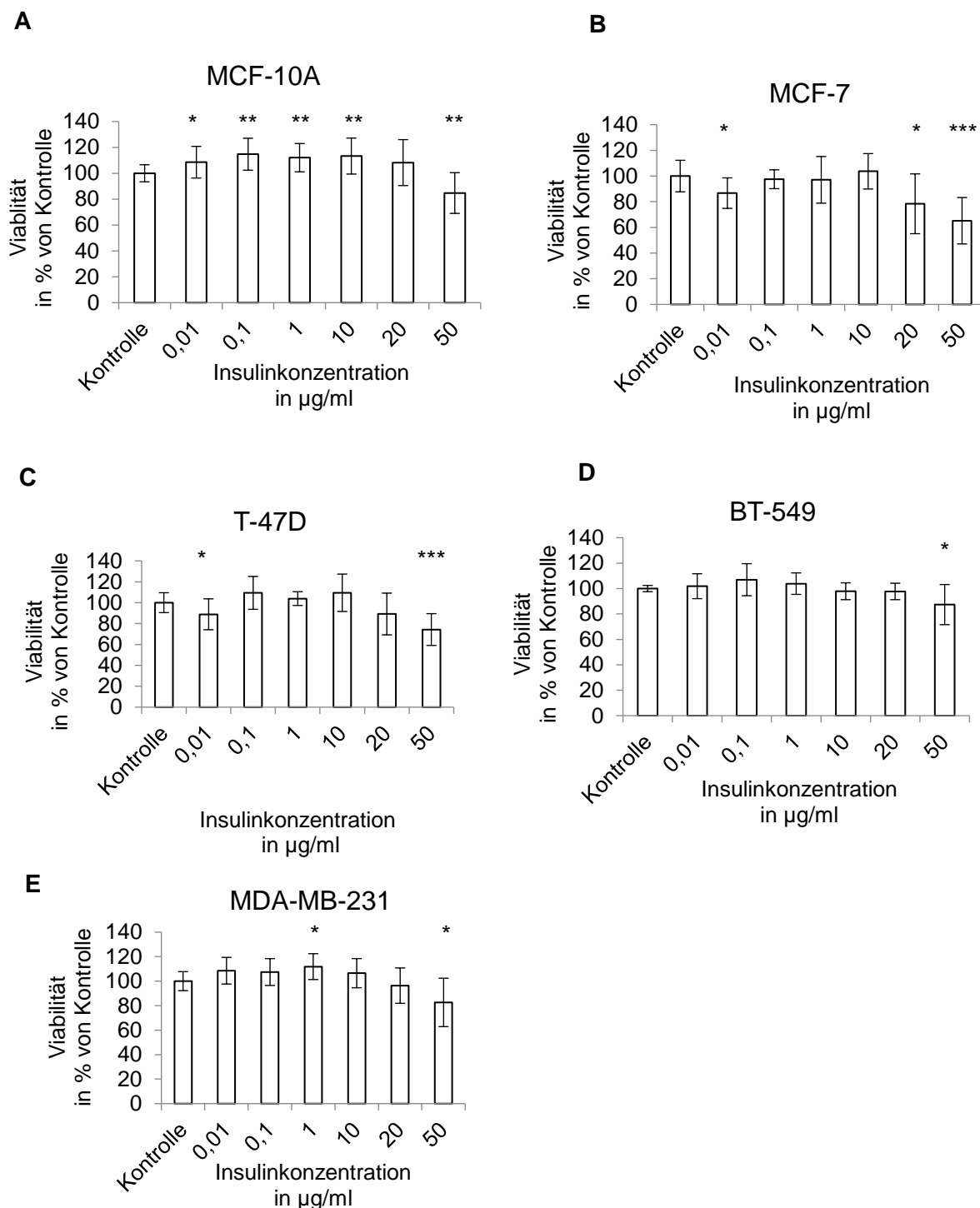


Abbildung 11: Viabilität der MCF-10A-, MCF-7-, T-47D-, BT-549 und MDA-MB-231- Zellen unter Einfluss von Insulin.

Die Auswertung erfolgte mittels MTT-Assay nach 24 h Behandlung der Zellen mit Insulin und FCS-freiem Medium. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von drei Versuchsdurchläufen. Diese wurden auf den Kontrollwert ohne Insulinbehandlung (entspricht 100%) bezogen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem p-Wert <0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrolle wurden mit einem Stern gekennzeichnet (p-Wert < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***)).

4.4 Einfluss von Insulin auf die Apoptoserate

Apoptose ist ein wichtiger zellulärer Prozess, um die Homöostase in einer normalen Zellpopulation aufrechtzuerhalten. Wenn das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose gestört wird, kann dies die Entstehung einer malignen Neubildung begünstigen. Durch inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder die Aktivierung von Onkogenen, welche die Apoptose-Signalproteine betreffen, ist die Apoptoserate in vielen Tumorentitäten erniedrigt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Insulin auf die Apoptoserate mittels eines Annexin-V-Assay *in vitro* ermittelt. In der nicht-malignen Zelllinie MCF-10A zeigte die Behandlung mit allen Insulinkonzentrationen zwischen 0,01 und 50 µg/ml im Vergleich zu den unbehandelten Zellen niedrigere Prozentwerte (*Abb. 12 A*). Folglich induziert Insulin keine Apoptose in den MCF-10A-Zellen. In den MCF-7-Zellen kam es ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml Insulin zu einem kontinuierlichen Anstieg der Apoptoserate (*Abb. 12 B*). Der höchste Wert von ca. 123% wurde nach Behandlung mit 20 µg/ml Insulin erreicht. Die Apoptoserate der T-47D-Zellen war nach Insulinbehandlung in allen Konzentrationen erhöht (*Abb. 12 C*). Der höchste Anstieg der Apoptoserate wurde nach Behandlung mit 20 µg/ml Insulin erreicht. Hier zeigte sich ein maximaler Wert von ca. 165%. Im Gegensatz zu den anderen Zelllinien zeigten die BT-549-Zellen nach Insulinbehandlung in allen Konzentrationen einen Anstieg der Apoptoserate. Der Maximalwert von ca. 281% wurde nach der Behandlung mit 20 µg/ml Insulin erreicht (*Abb. 12 D*). Die Standardabweichungen waren in diesem Versuch hoch und betrug Werte zwischen 57 und 108. Die MDA-MB-231-Zellen wiesen kaum Veränderungen hinsichtlich der Apoptoserate auf (*Abb. 12 E*). Insulin führte konzentrationsabhängig zu leichten Schwankungen um den Kontrollwert der unbehandelten Zellen.

Zusammenfassend führte Insulin in den Zelllinien MCF-7, T-47D und BT-549 zu einer Induktion der Apoptose. Alle drei Zelllinien erreichten den höchsten Wert der Apoptoserate nach Behandlung mit 20 µg/ml Insulin. Die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-10A wiesen keine eindeutige Erhöhung der Apoptoserate auf.

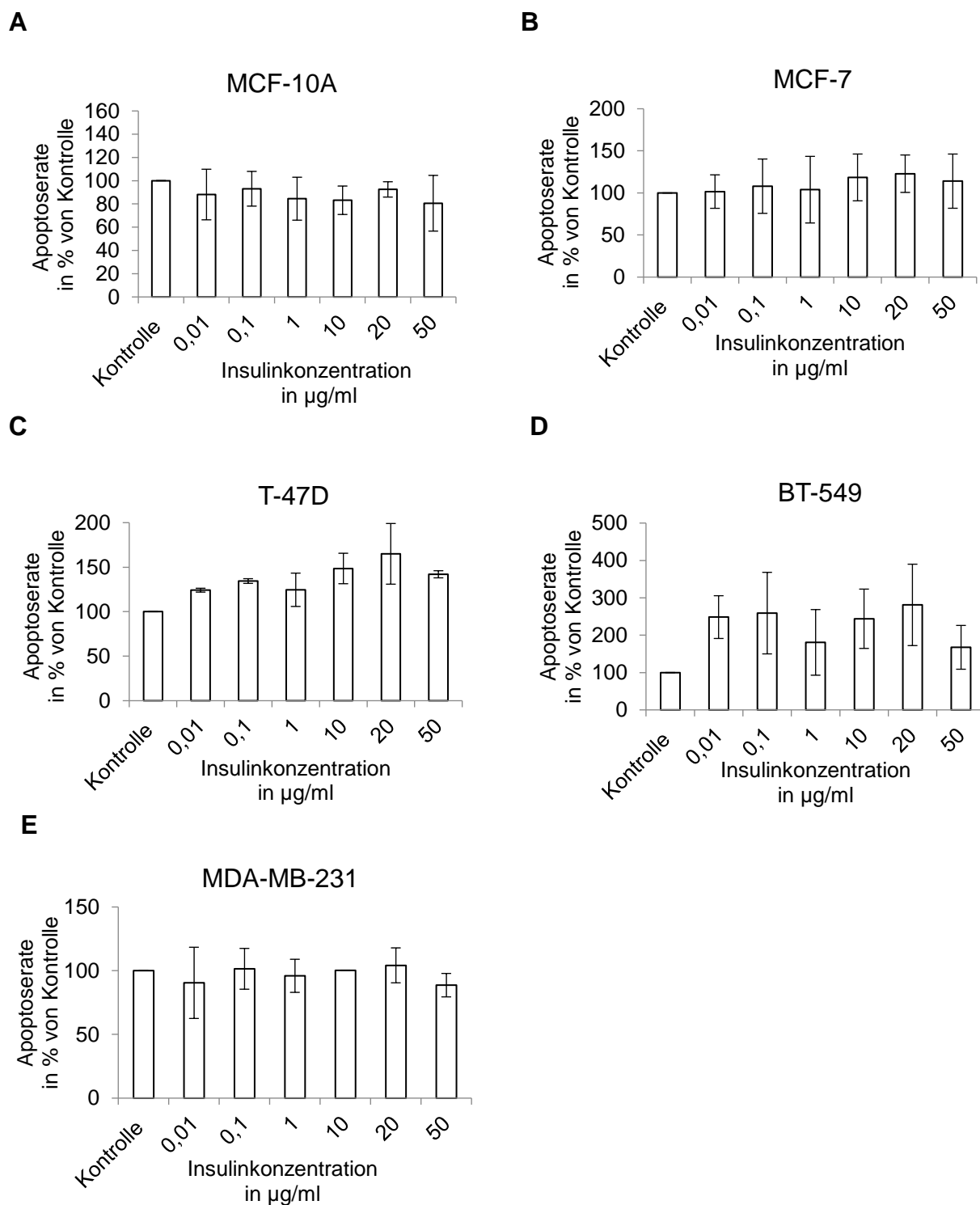


Abbildung 12: Apoptoserate der MCF-10A-, MCF-7-, T-47D-, BT-549- und MDA-MB-231-Zellen unter Einfluss von Insulin.

Die Auswertung erfolgte mittels *Real Time Annexin V Apoptose Assay* von Promega nach 24 h Behandlung der Zellen mit Insulin und FCS-freiem Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei Versuchsdurchläufen. Diese wurden auf den Kontrollwert ohne Insulinbehandlung (entspricht 100%) bezogen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Es wurden keine Signifikanzen (t-Test) bestimmt.

4.5 Einfluss von Insulin auf die Wirkweise von Mafosfamid

Für den hier beschriebenen Versuch wurden zwei Insulinkonzentrationen zur Behandlung der Zellen festgelegt. Untersucht wurde die Wechselwirkung von 0,01 µg/ml und 10 µg/ml Insulin mit Mafosfamid. Als Vergleich diente eine Behandlungsreihe ohne Insulinzugabe.

Die Zellviabilität der Zelllinie MCF-10A zeigte zwischen 0,15 und 1,2 µg/ml Mafosfamid keinen Unterschied zu den unbehandelten Zellen (*Abb. 13 A*). Ab 2,3 µg/ml fiel sie jedoch kontinuierlich und erreichte den niedrigsten Wert von ca. 54% bei Behandlung mit 9,5 µg/ml Mafosfamid. Diese Versuchsreihe zeigt, dass die Zellviabilität der MCF-10A-Zellen nur von Mafosfamid beeinflusst wurde, Insulin jedoch in keiner der getesteten Konzentrationen einen wesentlichen Einfluss hatte.

Die MCF-7-Zellen zeigten bei Behandlung mit 0,6 µg/ml Mafosfamid eine Reduktion der Viabilität auf Werte zwischen 71% und 80% ($p=0,0011$). Danach stieg die Viabilität bei 1,2 µg/ml und 2,3 µg/ml erneut an und sank ab 4,8 µg/ml stetig (*Abb. 13 B*). Die niedrigste Viabilität von ca. 30% wurde mit 9,5 µg/ml Mafosfamid und einer Behandlung von 0,01 µg/ml Insulin erreicht ($p=0,7189$). Im Vergleich zur Behandlung ohne Insulin zeigten die Zellen mit Insulinbehandlung bis 0,3 µg/ml Mafosfamid eine höhere Viabilität. Ab 0,6 µg/ml Mafosfamid zeigten die Zellen mit 0,01 µg/ml Insulin insgesamt eine niedrigere Viabilität als die Zellen ohne Insulinbehandlung. Die Viabilität der mit 10 µg/ml Insulin behandelten Zellen lag höher (ca. 33% bei 9,5 µg/ml Mafosfamid) als die jener Zellen mit 0,01 µg/ml Insulin (ca. 29% bei 9,5 µg/ml Mafosfamid), jedoch niedriger als die der unbehandelten Zellen (ca. 42% bei 9,5 µg/ml Mafosfamid).

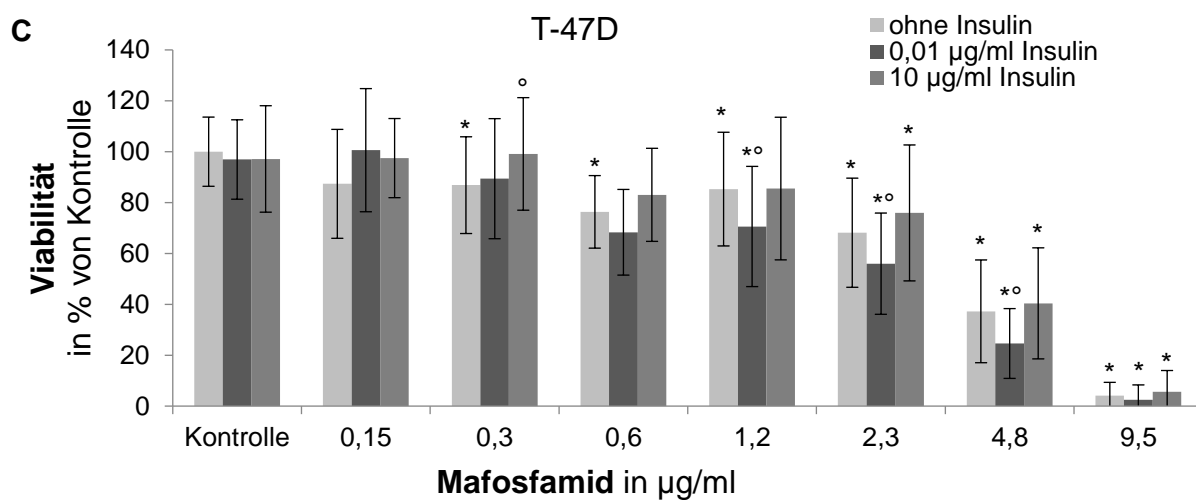
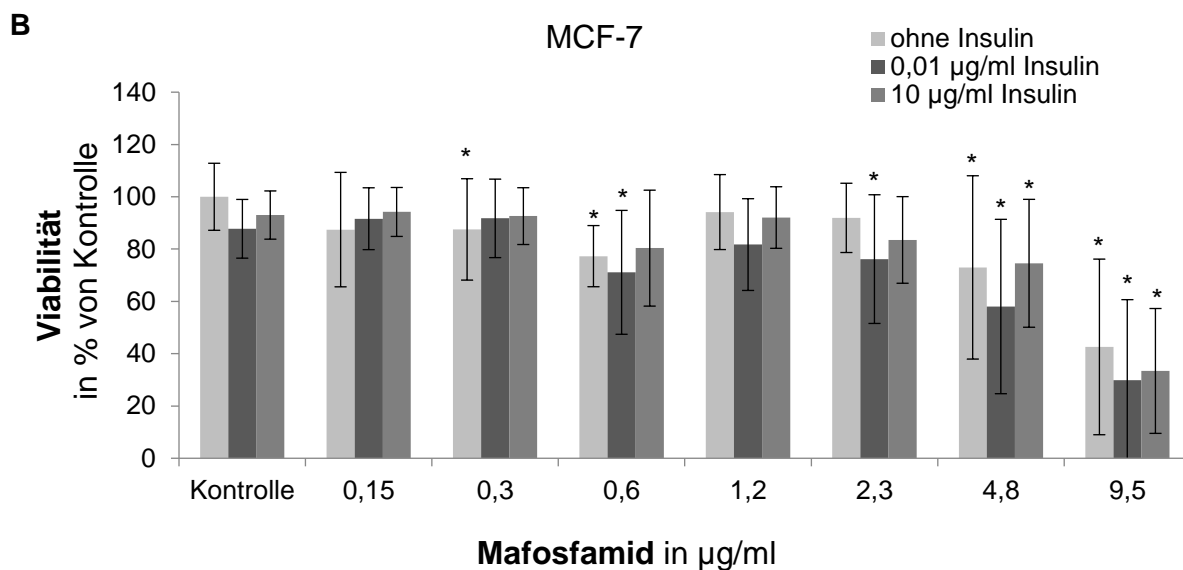
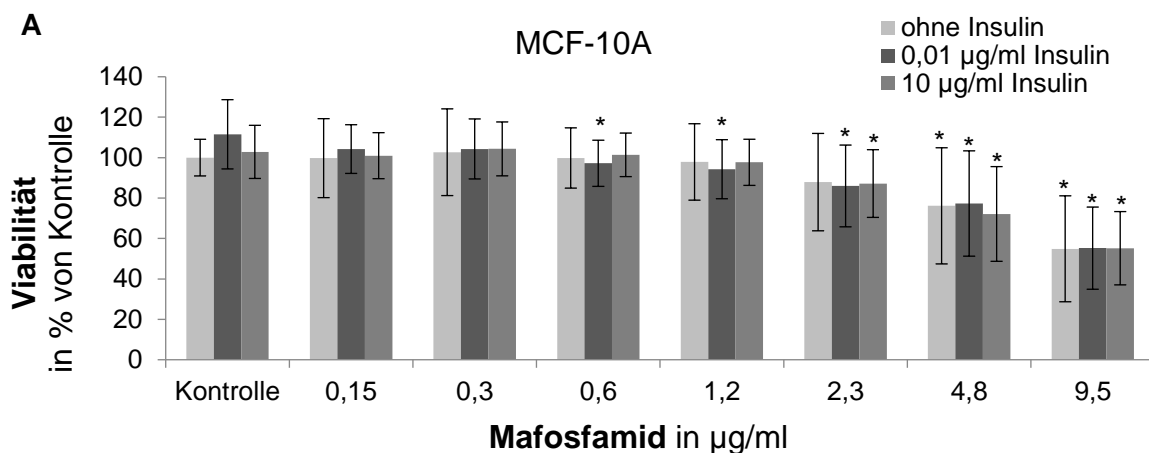
Die Viabilität der T-47D-Zellen zeigte sich nach Behandlung mit Mafosfamid reduziert (*Abb. 13 C*). Ab einer Konzentration von 4,8 µg/ml Mafosfamid sank die Viabilität um ca. 50%. Im Bereich von 0,15 und 0,3 µg/ml Mafosfamid wirkte Insulin protektiv und führte im Vergleich zu den Insulin-unbehandelten Zellen zu einer höheren Viabilität. Diese lag bei ca. 99% nach kombinierter Behandlung mit 10 µg/ml Insulin und 0,3 µg/ml Mafosfamid ($p=0,0478$). Ab 0,6 µg/ml Mafosfamid blieb die Viabilität der Zellen, die mit 10 µg/ml Insulin behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen tendenziell höher oder gleich hoch. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit 0,01 µg/ml Insulin zu einer, im Vergleich zu den ohne Insulin behandelten Zellen, signifikant niedrigeren Zellviabilität (2,3 µg/ml Mafosamid $p=0,0019$, 4,8 µg/ml $p=0,0438$, 9,5 µg/ml $p=0,0081$).

Die Zellviabilität der BT-549-Zellen sank ab der Behandlung mit 0,6 µg/ml Mafosfamid (*Abb. 13 D*). Am deutlichsten reduzierte sich die Viabilität unter Behandlung mit 9,5 µg/ml Mafosfamid. Hier zeigten vor allem die Zellen, die mit 10 µg/ml Insulin behandelt wurden, mit

ca. 48% eine deutlich niedrigere Viabilität. Diese war jedoch nicht signifikant ($p=0,1250$). Insgesamt führte die Behandlung mit Insulin nicht zu einer signifikant höheren Viabilität.

Die Behandlung mit Mafosfamid führte in der Zelllinie MDA-MB-231 nach Behandlung mit $0,6 \mu\text{g/ml}$ zu einer Reduktion der Viabilität auf Werte zwischen 61% und 66% (*Abb. 13 E*). Nach Behandlung mit $1,2 - 4,8 \mu\text{g/ml}$ Mafosfamid lagen die Viabilitätswerte höher als nach Behandlung mit $0,6 \mu\text{g/ml}$ Mafosfamid. Dabei lag die Viabilität der Zellen, welche mit $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin behandelt wurden, bis zu 13% niedriger als die der Kontrolle ohne Insulinbehandlung ($p=0,0759$ bei $4,8 \mu\text{g/ml}$ Mafosfamid). Die niedrigste Viabilität fand sich bei der Behandlung mit $9,5 \mu\text{g/ml}$ Mafosfamid. Die kombinierte Behandlung mit Insulin zeigte keinen signifikanten Unterschied bei Mafosfamidkonzentrationen von $0,15$ und $0,3 \mu\text{g/ml}$. Mafosfamid in Konzentrationen von $1,2 - 9,5 \mu\text{g/ml}$ führte in Kombination mit Insulin zu erniedrigten Viabilitätswerten. Diese lagen im Vergleich zu den Insulin-unbehandelten Zellen um 10-15% niedriger. Dabei hatten $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin einen stärkeren Einfluss als $0,01 \mu\text{g/ml}$ Insulin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellviabilität mit steigender Konzentration von Mafosfamid sinkt. Dabei zeigte sich bei allen Zelllinien, außer der MCF-10A-Zelllinie, eine verstärkte Reduktion der Viabilität bei $0,6 \mu\text{g/ml}$ Mafosfamid. Insulin beeinflusste die Zellviabilität bei niedrigen Mafosfamidkonzentrationen eher positiv. Bei höheren Mafosfamidkonzentrationen führte Insulin im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen zu einer Reduktion der Viabilität. Der Einfluss von Insulin auf die Zellen zeigte keine klare Tendenz. Während die Zelllinie MDA-MB-231 bei einer Behandlung mit $10 \mu\text{g/ml}$ Insulin eine niedrigere Viabilität aufwies, wurde die Viabilität der Zelllinien MCF-7 und T-47D durch eine Konzentration von $0,01 \mu\text{g/ml}$ stärker negativ beeinflusst. Die Zelllinien BT-549 und vor allem MCF-10A wiesen die geringsten Differenzen zwischen den einzelnen Behandlungsarten auf.



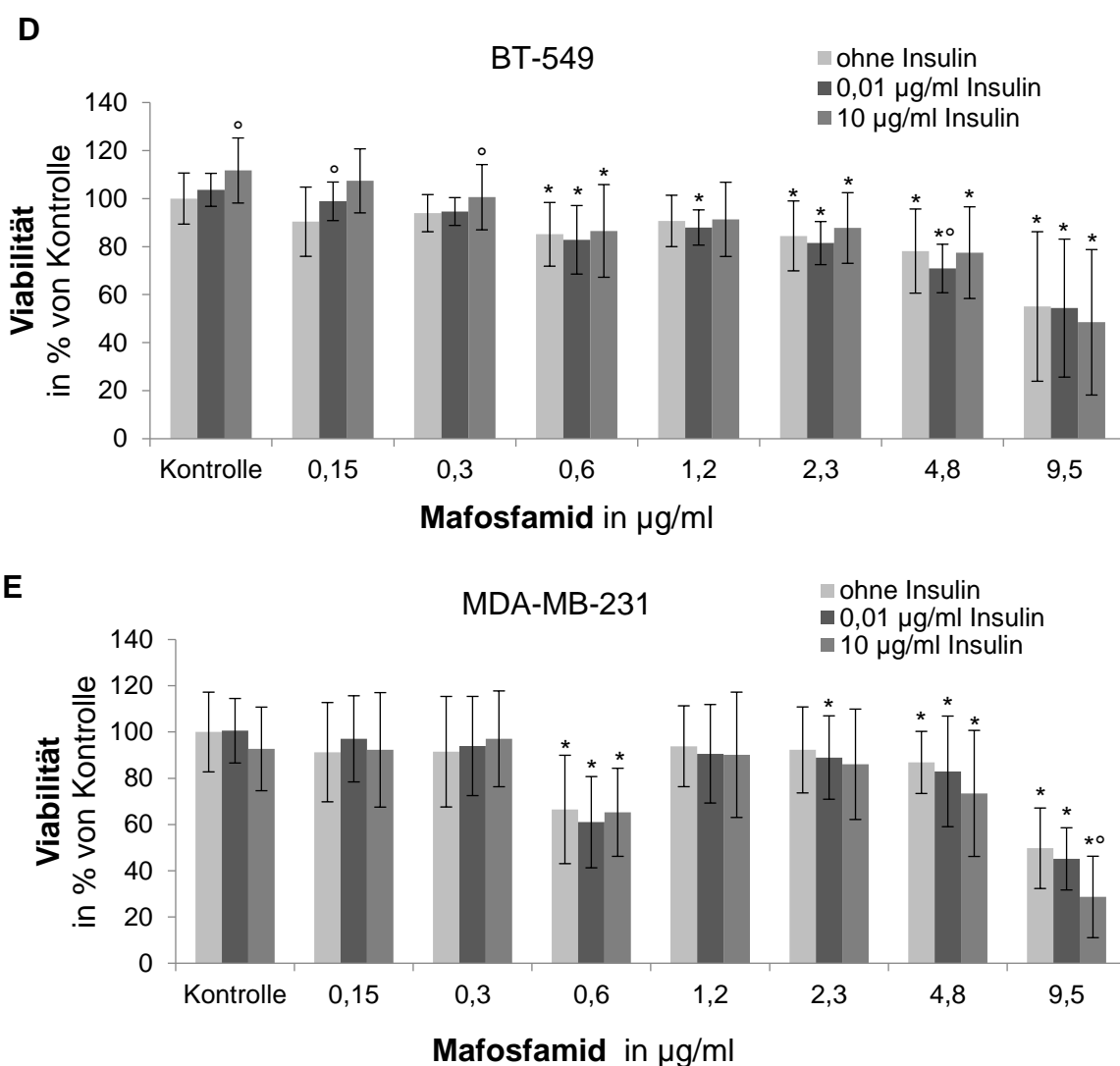


Abbildung 13: Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität unter Behandlung mit Mafosfamid.

Die Quantifizierung der Viabilität erfolgte mittels MTT-Assay. Die Zellen wurden ohne Insulin, mit 0,01 µg/ml Insulin oder 10 µg/ml Insulin behandelt. Zusätzlich erfolgte die Behandlung mit Mafosfamid (0,15-9,5 µg/ml) an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tab. 8). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Versuchsdurchläufen. Diese wurden auf den Kontrollwert ohne Insulin- und Mafosfamidbehandlung (entspricht 100%) bezogen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert <0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Insulin wurden mit einem Kreis (°) gekennzeichnet.

A) MCF-10A, B) MCF-7, C) T-47D, D) BT-549, E) MDA-MB-231

4.6 Einfluss von Insulin auf die Wirkweise von Vinorelbin

Die Durchführung dieses Versuches erfolgte wie in *Tab. 9* und unter 3.2.3.2 beschrieben. Getestet wurde das Zytostatikum Vinorelbin in Konzentrationen von 0,16 – 10 ng/ml. Je höher die Vinorelbinkonzentration war, desto niedriger war die Viabilität der MCF-10A-Zellen (*Abb. 14 A*). Ab einer Konzentration von 2,5 ng/ml Vinorelbin zeigte sich ein deutlicher Abfall der Viabilität um mehr als 40%. Der Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität war positiv. Die Viabilität war bei allen Vinorelbinkonzentrationen nach Behandlung mit 10 µg/ml Insulin signifikant höher als nach Behandlung ohne Insulin (exemplarisch für 0,6 ng/ml Vinorelbin und 10 µg/ml Insulin $p=0,0003$).

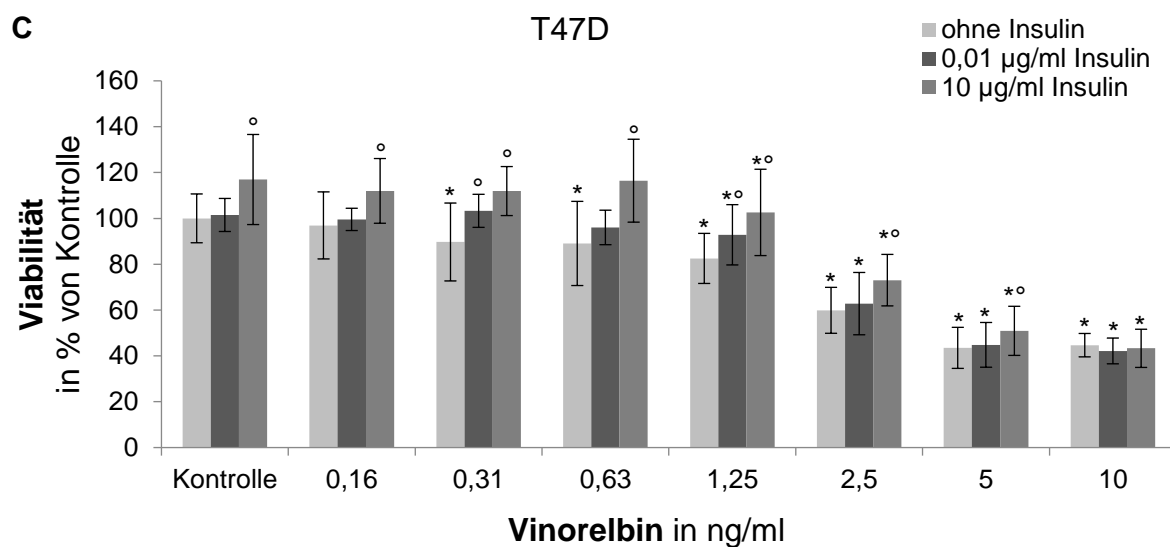
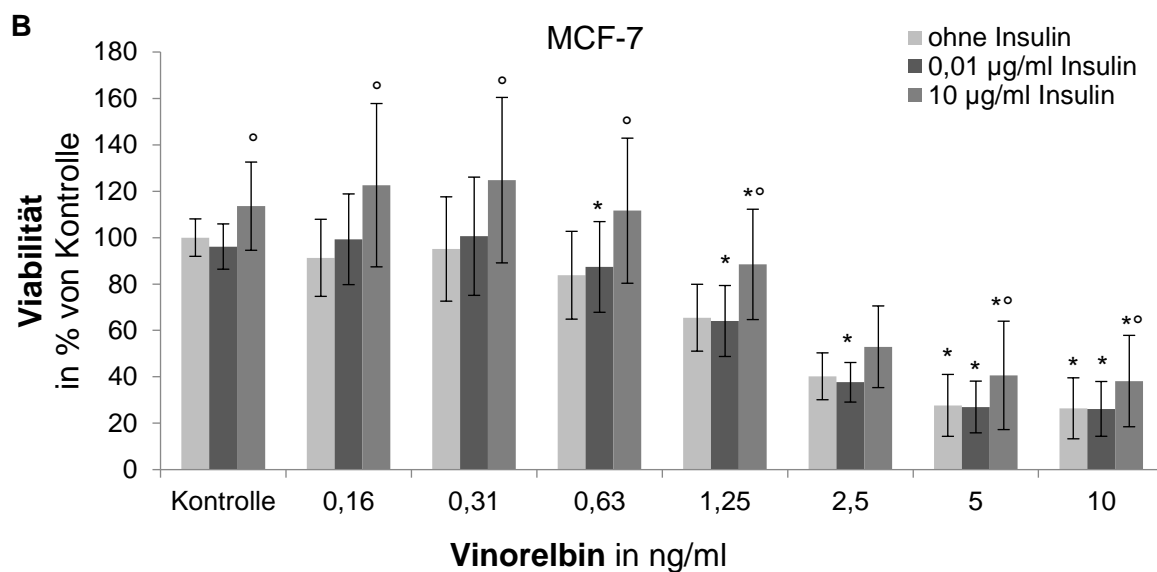
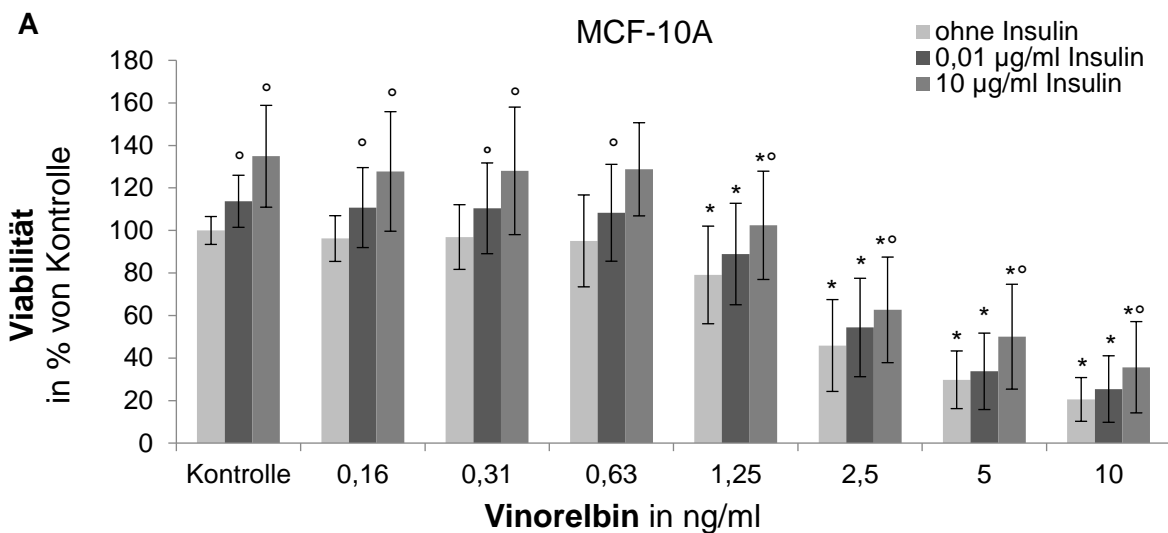
Vinorelbin führte mit steigender Konzentration zu einer reduzierten Viabilität der MCF-7-Zellen (*Abb. 14 B*). Ab 2,5 ng/ml Vinorelbin lag diese unter 60%. Insulin beeinflusste die Viabilität vor allem in einer Konzentration von 10 µg/ml. Die Viabilität war signifikant höher als ohne Insulinbehandlung (exemplarisch für 2,5 ng/ml Vinorelbin und 10 µg/ml Insulin $p=0,0004$). Die Behandlung mit 0,01 µg/ml Insulin führte nicht zu einer signifikant höheren Viabilität als ohne Insulinbehandlung.

Auch die T-47D-Zellen zeigten einen kontinuierlichen Abfall der Viabilität ab der Behandlung mit 2,5 ng/ml Vinorelbin (*Abb. 14 C*). Die Zellviabilität sank ab einer Konzentration von 5 ng/ml Vinorelbin auf unter 60%. Die Viabilität der Zellen, die mit 10 µg/ml Insulin behandelt wurden, lag nach der Behandlung mit 5 ng/ml Vinorelbin im Vergleich am höchsten ($p=0,0206$). Nach 10 ng/ml Vinorelbin zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlung mit und ohne Insulin.

Die BT-549-Zellen wiesen eine niedrigere Zellviabilität auf je höher die Vinorelbinkonzentration lag (*Abb. 14 D*). Die Viabilität sank bereits bei 1,25 ng/ml auf unter 60%. 0,01 µg/ml Insulin beeinflusste die Wirkung von Vinorelbin im Vergleich zu den unbehandelten Zellen kaum, während 10 µg/ml Insulin im Vergleich zu den ohne Insulin behandelten Zellen einen positiven, wenn auch nicht signifikanten Einfluss auf die Zellviabilität hatte.

Vinorelbin führte bei den MDA-MB-231-Zellen mit steigender Konzentration zu einer reduzierten Viabilität (*Abb. 14 E*). Ab 2,5 ng/ml Vinorelbin lag die Zellviabilität unter 60%. Insulin beeinflusste die Wirkung nur geringfügig. Zwischen 0,01 und 10 µg/ml Insulin war ebenfalls nur ein geringer Unterschied auf die Vinorelbinwirkung festzustellen.

Insgesamt potenzierte Insulin die Wirkung des Zytostatikums Vinorelbin nicht. Auch höhere Insulinkonzentrationen von 10 µg/ml führten nicht zu einer verstärkten Wirkung des Zytostatikums. Im Gegenteil zeigte sich hier eine Steigerung der Zellviabilität. Insulin hatte einen protektiven Effekt auf die Zellen. Ab einer Konzentration von 2,5 ng/ml Vinorelbin lag die Viabilität der Zelllinien unter 60%. Ausnahme waren hier die T-47D-Zellen, welche erst ab 5 ng/ml Vinorelbin eine Viabilität unter 60% aufwiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ab 2,5 ng/ml bzw. 5 ng/ml Vinorelbin ein direkter toxischer Effekt auf die Tumorzellen erreicht wird.



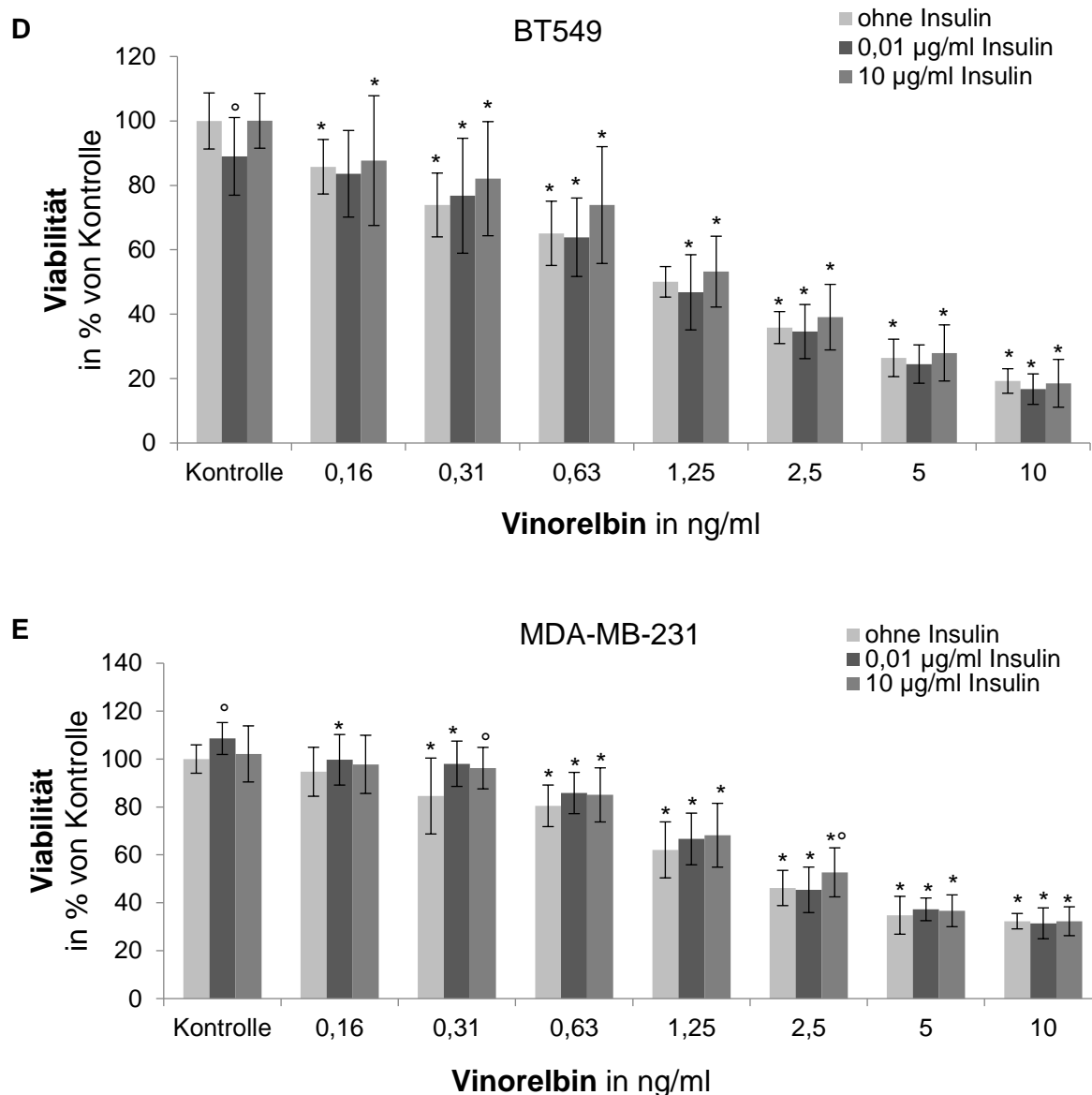


Abbildung 14: Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität unter Behandlung mit Vinorelbin.

Die Quantifizierung der Viabilität erfolgte mittels MTT-Assay. Die Zellen wurden ohne Insulin, mit 0,01 µg/ml Insulin oder 10 µg/ml Insulin behandelt. Zusätzlich erfolgte die Behandlung mit Vinorelbin (0,16-10 ng/ml) an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tab. 8). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Versuchsdurchläufen. Diese wurden auf den Kontrollwert ohne Insulin- und Vinorelbinbehandlung (entspricht 100%) bezogen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichung an. Signifikanzen wurden mit einem t-Test ermittelt und bei einem P-Wert <0,05 angenommen. Signifikante Unterschiede bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe wurden mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede bezogen auf die Kontrollgruppe ohne Insulin wurden mit einem Kreis (°) gekennzeichnet.

A) MCF-10A B) MCF-7 C) T-47D D) BT-549 E) MDA-MB-231

5 Diskussion

5.1 Vergleich der Überlebenszeit von Tumorzellen hinsichtlich unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen

Fetales Kälberserum (FCS) wurde von Theodore Puck in den 1950er Jahren als Zusatz für Kulturmedien etabliert (163). Zu den enthaltenen Inhaltsstoffen gehören eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Vitaminen und Proteinen, die für die Kultivierung der Zellen nötig sind (164). FCS steht jedoch hoch in der Kritik. Neben der ethischen Fragwürdigkeit bezüglich der Gewinnung des Produkts ist vor allem zu bedenken, dass es ein Naturprodukt ist und die Zusammensetzung individuellen Schwankungen unterliegen kann. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann daher erhebliche Schwierigkeiten darstellen (165). In dieser Arbeit stand die Untersuchung des Insulineinflusses auf zelluläre Parameter im Mittelpunkt. Um mögliche Fehlerquellen bezüglich des Hormoneinflusses durch FCS auf die Zellen zu verringern, erfolgte im ersten Versuch eine Optimierung der Kultivierungsbedingungen. Die Standardkonzentration von FCS im Kulturmedium beträgt 10%. In einem Viabilitätsassay wurde die Kultivierung der Zellen mit serumfreiem Medium mit der Kultivierung mit 5%-igem FCS-Zusatz verglichen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ohne zugesetztes FCS war schlechter als bei der Kultivierung mit 5% FCS. Dies könnte vor allem daran liegen, dass die Zellen auf die Wachstumsfaktoren, Vitamine und Proteine aus FCS angewiesen sind und eine Kultivierung ohne den Zusatz von FCS die Viabilität der Zellen reduziert.

Die Literatur stützt diese Ergebnisse im Hinblick auf die längerfristige Kultivierung der Zellen (85, 166). Browder *et al.* und O'Reilly *et al.* wendeten bei der Versuchsdurchführung ebenfalls 5%-iges FCS an. Zusätzlich kultivierten sie die Zellen in Gelatine-beschichteten Zellkulturplatten. Die Oberfläche der Kulturgefäße kann einen Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung haben. Adhäsionsfaktoren wie Fibronectin oder Gelatine können die Überlebenszeit der Zellen verlängern (167). Die Zellkulturplatten wurden in dieser Arbeit 24 h vor dem Aussäen der Zellen mit Fibronectin (1 mg/ml) oder Gelatine (2 mg/ml) beschichtet. Im Vergleich zeigten die Zellen, die in Gelatine-beschichteten Zellkulturplatten kultiviert wurden, eine niedrigere Viabilität. In der Literatur ist ein antiproliferativer Effekt von Gelatine auf K-562-Zellen (Erythroleukämie-Zellen) beschrieben. Dieser trat bei Konzentrationen größer 3,75 mg/ml Gelatine auf. Niedrigere Konzentrationen wurden nicht untersucht. Der negative Effekt von Gelatine auf die Viabilität der Tumorzellen könnte durch eine direkte Interaktion zwischen den Zellen und der Gelatine hervorgerufen werden (168). Fibronectin ist als Glykoprotein für die Interaktion zwischen den Zellen und den Komponenten der

Extrazellulärmatrix (EZM) relevant. Es stellt die Zell-Zell-Kommunikation, Zelladhäsion und Zellproliferation sicher (169, 170). Mit der Intention eine physiologischere Umgebung für die Zellen zu schaffen, wurden die Zellkulturplatten mit Fibronectin beschichtet. Jedoch weist Fibronectin *in vitro* keine messbare Erhöhung der Viabilität maligner Zellen auf. Folgeversuche wurden aufgrund dieser Erkenntnisse mit unbeschichteten Kulturgefäßen durchgeführt.

5.2 Einfluss von Insulin auf zelluläre Parameter

Verschiedene Studien haben bereits den Einfluss von Insulin auf zelluläre Parameter wie Proliferation und Viabilität *in vitro* untersucht (171-173). Die angewendeten Insulinkonzentrationen und deren Inkubationszeit variieren stark. Daher erfolgte zu Beginn der vorliegenden Arbeit eine Testung unterschiedlicher Insulinkonzentrationen auf die Proliferation, Viabilität und Apoptoserate der verwendeten Zelllinien.

5.2.1 Einfluss von Insulin auf die Proliferationsrate

In der Literatur wurde der Einfluss von 0,1 – 250 nM Insulin auf die Proliferation von MCF-7-Zellen untersucht (129, 172, 173). Dies entspricht 0,00058 – 1,45 µg/ml Insulin. Agrawal *et al.* verwendeten mit 40 µg/ml Insulin eine deutlich höhere Konzentration, um die Wechselwirkung zwischen Insulin und CPA zu untersuchen (8). In der vorliegenden Arbeit wurden Insulinkonzentrationen zwischen 0,01 und 50 µg/ml eingesetzt. Die Auswahl dieser Konzentrationen ist angelehnt an die Seruminsulinkonzentrationen eines gesunden Menschen, die im Nüchternzustand zwischen 0,00012 und 0,001 µg/ml beträgt (174, 175). Die MCF-7-Zellen wurden im Vergleich zu den anderen Zelllinien am stärksten durch Insulin beeinflusst. Die Proliferation stieg signifikant bei allen Insulinkonzentrationen (ausgenommen 20 µg/ml). Der höchste Prozentwert zeigte sich nach Behandlung mit 10 µg/ml Insulin. Die Ergebnisse dieser Arbeit korrelieren mit vorherigen Studien. Chen *et al.* beschrieben den stärksten proliferativen Effekt auf MCF-7-Zellen nach Behandlung mit 0,15 µg/ml Insulin, während Lu *et al.* eine signifikante Steigerung der Proliferationsrate von 0,6 bis 1,5 µg/ml Insulin auf Kolorektalkarzinom-Zellen nachwies (171, 172). Ähnlich reagierten die T-47D-Zellen, die ebenso den höchsten Wert bei 10 µg/ml Insulin erreichten. Höhere Konzentrationen führten zu einer Reduktion der Proliferationsrate. Durch die mitogenen Eigenschaften von Insulin wäre eine deutlich stärkere Proliferationserhöhung erwartet worden. Dennoch finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass das Modell der Zellkultur und die alleinige Behandlung der Zellen mit Insulin nicht ausreichend sein könnte, um die Zellzyklusaktivität zu erhöhen. Lai *et al.* untersuchten die G₀/G₁-S-Phase-Progression der MCF-7-Zellen durch Insulin und Östrogen (176). Ihre Ergebnisse zeigten, dass nur eine synergistische Aktivierung der Östrogen- und Insulin-Signalwege zu einer verstärkten

Proliferation führten. Zieht man die Expression der IR und IGF1R hinzu, zeigt die Zelllinie MCF-7 im Vergleich zu einer nicht-malignen Brustepithelzelllinie eine erhöhte Expression (177). Davison *et al.* verglichen zudem die Expression der IR und IGF1R von HR⁺- und triple-negativen Brustkrebszelllinien (178). Dabei zeigten die HR-positiven-Zelllinien MCF-7, T-47D und die triple-negative Zelllinie MDA-MB-231 höhere Expressionswerte als die triple-negative Zelllinie BT-549. Diese exprimiert im Vergleich kaum IR und IGF1R. Daher ist ein Zusammenhang zwischen HR- und IR-Status unwahrscheinlich. Die geringe Rezeptorexpression in der BT-549-Zelllinie korreliert mit dem Ergebnis, dass Insulin die Proliferationsrate dieser Zellen nicht beeinflusste.

Eine ähnliche Rezeptorsituation zeigt sich auch in der MCF-10A-Zelllinie (178). Insulin führte auch in dieser Zelllinie zu keiner starken Proliferationssteigerung. Dieser Effekt könnte jedoch ebenso mit den Zellkultivierungsbedingungen zusammenhängen. Die Kultivierung der MCF-10A-Zellen erfolgt mit DMEM F12-Medium, dem für die standardmäßige Kultivierung 10 µg/ml Insulin zugesetzt werden. Obwohl der Versuch mit serumfreiem DMEM F12-Medium durchgeführt wurde, könnte der stimulatorische Effekt durch Insulin aufgrund der routinemäßigen Zugabe von 10 µg/ml Insulin schwächer ausgeprägt sein. Im Gegensatz dazu ist das Ergebnis der MDA-MB-231-Zelllinie nicht durch die Rezeptorexpression zu erklären. Diese Zelllinie exprimiert den IR und IGF1R im Vergleich zu anderen triple-negativen Zelllinien stärker (178). Eine Erhöhung der Proliferationsrate durch Insulin ließ sich jedoch nicht nachweisen. Dieses Ergebnis stimmt mit der in der Literatur beschriebenen Überexpression des Glykoproteins PC-1 überein (179). Belfiore *et al.* wiesen eine 3-30-fach erhöhte Expression dieses Membranproteins in der MDA-MB-231-Zelllinie nach (179). Die Funktion des Glykoproteins liegt in der Inhibition der Tyrosinkinaseaktivität des IR. Obwohl der IR und IGF1R von den Tumorzellen exprimiert wird, ist die metabolische und mitogene Wirkung von Insulin in der Summe gehemmt (179).

5.2.2 Einfluss von Insulin auf die Zellviabilität

Viabilität und Proliferation sind zwei wichtige Parameter der zellulären Aktivität. Mittels BrdU-Inkorporation kann die Zellteilungsrate gemessen werden. Diese erlaubt jedoch keine Aussage über die Viabilität, da sich nicht alle lebenden Zellen zum Zeitpunkt der Messung in der Mitose befinden. Um eine qualifizierte Aussage über die Wirkung unterschiedlicher Insulinkonzentrationen auf die Zellaktivität treffen zu können, wurde mittels MTT-Assay die Viabilität gemessen. Bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml Insulin blieb die Viabilität in allen Zelllinien stabil. Die Prozentwerte lagen nur gering über bzw. unter 100%. Folglich beeinflusst Insulin die Viabilität der Zelllinien im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen bis zu einer Konzentration von 10 µg/ml nicht. Höhere Konzentrationen führten

jedoch bei allen Zelllinien zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Reduktion der Viabilität (Abschnitt 4.3). Es ist anzunehmen, dass Insulin in Konzentrationen von 20 µg/ml und höher hemmend auf die Stoffwechselaktivität der Zellen wirkt. In der Literatur getestete Insulinkonzentrationen lagen deutlich niedriger als jene in der vorliegenden Arbeit und wurden vor allem im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Proliferationsrate getestet. Lediglich Agrawal *et al.* untersuchten den Einfluss von 40 µg/ml Insulin auf die Viabilität von MCF-7-Zellen. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigten eine Viabilitätssenkung durch Insulin (8). Eine mögliche Erklärung könnte ein negativer Feedback-Mechanismus sein, der durch sehr hohe, nicht physiologische Insulinkonzentrationen ausgelöst werden könnte und in der Folge die Aktivität des PI3K-/AKT-Kinase (AKT)-Signalwegs herunterreguliert (180). Ebenso könnte eine Herabregulation der IR eine erniedrigte Viabilitätsrate zur Folge haben. Mountjoy *et al.* beschrieben diesen Prozess bei Behandlung von MCF-7- und T-47D-Zellen mit hohen Insulinkonzentrationen im Bereich von 1 bis 100 µg/ml (181). Die genauen Gründe für die erniedrigte Stoffwechselaktivität bleiben dennoch unklar. Im Hinblick auf das Verhältnis zwischen Proliferationsrate und Viabilität wurde im nächsten Schritt ein Apoptose-Assay durchgeführt. Dieser sollte Aufschluss darüber geben, ob Insulin ab einer gewissen Konzentration die Apoptose tatsächlich induziert oder ob eine größere Anzahl an Zellen im Verhältnis zu den proliferierenden Zellen stoffwechselinaktiv ist.

5.2.3 Einfluss von Insulin auf die Apoptoserate

Insulin wirkt als anaboles Hormon wachstumsstimulierend und anti-apoptotisch. Der Zustand der Hyperinsulinämie im frühen Stadium einer Diabetes-Erkrankung ist kritisch und wird in der Literatur nicht nur mit makrovaskulären Komplikationen, sondern auch mit einem erhöhten Risiko für die Karzinogenese verschiedener Tumorentitäten assoziiert (182-184). Der Grund ist eine zur Tumorprogression führende Überstimulation wachstumsfördernder Signalwege (185, 186). In hohen Konzentrationen könnte Insulin jedoch auch gegenteilige Effekte aufweisen. In Zusammenhang mit den Betazellen des Pankreas beschrieben Guillen *et al.* einen biphasischen Effekt von Insulin (187). Die längerfristige Behandlung (15-24 h) mit Insulin in hohen Konzentrationen (10-100 nM) induzierte in Betazellen die Apoptose. In weiteren Studien konnte die Induktion der Apoptose durch Insulin in Zellen des braunen Fettgewebes und Retinazellen eines Hühnerembryos nachgewiesen werden (188, 189). Als mögliche Ursache wurde die Produktion pro-apoptotischer Faktoren durch Mitochondrien als Reaktion auf den durch Insulin ausgelösten oxidativen Stress diskutiert. In Tumorzellen könnte diese Reaktion in Folge einer niedrigeren Aktivität der Mitochondrien und Mutationen in Proteinen der Bcl-2-Familie geringer ausfallen (190). Eine weitere wichtige Rolle spielt die Expression der Caspase-3, die zu den Effektorcaspasen der Zelle gehört und wichtig für die

Spaltung verschiedener Proteine ist (191). MCF-7-Zellen exprimieren keine Caspase-3 und zeigen daher oft eine Resistenz gegen Apoptose-induzierende Substanzen (192, 193).

Im Gegensatz dazu konnten Devarajan *et al.* in MCF-10A- und T-47D-Zellen die Expression der Caspase-3 nachweisen (194). Die T-47D-Zellen zeigten in diesem Zusammenhang einen klaren Anstieg der Apoptoserate. Bereits das Zehnfache der physiologischen Serumkonzentration von Insulin, also 0,1 µg/ml, induzierte die Apoptose. Der Maximalwert wurde nach der Behandlung mit 20 µg/ml Insulin erreicht. Setzt man diese Werte in einen Zusammenhang mit der stagnierenden Proliferationsrate und der reduzierten Viabilität, lässt sich schließen, dass Insulin ab einer Konzentration von 10 µg/ml die Apoptoserate der T-47D-Zellen erhöht. Obwohl die MCF-7-Zelllinie keine Caspase-3 exprimiert, konnte ein leichter Anstieg der Apoptoserate ab 10 µg/ml Insulin nachgewiesen werden. Die Proliferationsrate dieser Zellen war unter diesen Insulinkonzentrationen ebenfalls erhöht. Da jedoch die Viabilität ab einer Konzentration von 20 µg/ml Insulin reduziert war, lässt dies vermuten, dass die Anzahl der Zellen in der Apoptose höher ist als die Anzahl der proliferierenden Zellen.

Die Apoptoserate der MCF-10A-Zelllinie zeigte sich nach Behandlung mit Insulin in Konzentrationen von 0,01 – 50 µg/ml reduziert, während die Proliferationsrate bei allen Konzentrationen anstieg. Die Viabilität blieb bis 20 µg/ml Insulin erhöht. Dies könnte bedeuten, dass sich mehr MCF-10A-Zellen in der Proliferation befinden als in der Apoptose. Da MCF-10A-Zellen in der Zellkultivierung auf Insulin angewiesen sind, könnte ein Gewöhnungseffekt an hohe Insulinkonzentrationen vorliegen. Die molekularen Mechanismen sind jedoch nicht geklärt.

Die Zelllinie MDA-MB-231 wurde durch Insulin kaum beeinflusst. Sowohl Apoptoserate, als auch Proliferationsrate und Viabilität zeigten bei allen getesteten Insulinkonzentrationen nur geringe Abweichungen vom Kontrollwert. Die MDA-MB-231-Zellen weisen wie unter 5.2.1 beschrieben die Expression des Glykoproteins PC-1 auf, welches die Tyrosinkinaseaktivität des IR hemmt. Demzufolge können weder proliferationsfördernde noch apoptoseinduzierende Signalwege aktiviert werden, was die Insensitivität dieser Zelllinie erklären könnte.

In der BT-549-Zelllinie zeigte sich im Vergleich die höchste Apoptoserate, wobei kein eindeutiger Einfluss von Insulin auf die Viabilitäts- und Proliferationsrate der BT-549-Zellen nachgewiesen werden konnte. Aufgrund sehr hoher Standardabweichungen könnte ein technischer Fehler in der Versuchsdurchführung vermutet werden.

5.3 Das Konzept der metronomischen Chemotherapie in der Zellkultur

Die niedrig dosierte Zytostatikatherapie im Sinne von metronomischer Chemotherapie befindet sich derzeit in der klinischen Testung und wird bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs ohne hohen Remissionsdruck angewendet. Das Prinzip basiert auf der täglichen oralen Applikation einer niedrigen Dosis eines Zytostatikums ohne Therapieunterbrechung (86). Ein wichtiger Vorteil ist das günstige Toxizitätsprofil und eine hierdurch bedingte Verbesserung der Lebensqualität. Überlegungen den zytostatischen Effekt durch Insulin zu verstärken bestehen bereits seit Jahrzehnten (132, 195). In verschiedenen präklinischen und klinischen Studien konnte eine Verstärkung des therapeutischen Effekts durch Insulin nachgewiesen werden (6-8, 196, 197). Um auf dem Gebiet der niedrig dosierten Zytostatikatherapie weitere Erkenntnisse im Hinblick auf die Wechselwirkung zwischen Insulin und Zytostatikum, optimale Dosierung und Relevanz des Rezeptorstatus zu erlangen, wurden die Zelllinien mit den Zytostatika Mafosfamid (die aktive Form von Cyclophosphamid) und Vinorelbin behandelt. Diese Zytostatika können p.o. appliziert werden und eignen sich daher für das Konzept der metronomischen Chemotherapie. Die präklinische Anwendung kann jedoch nur in Anlehnung an das Therapiekonzept stattfinden.

Für die vorliegende Arbeit waren die Ergebnisse von Cerrito *et al.* von besonderem Interesse (198). Sie testeten die Wirkung von niedrig dosiertem Vinorelbin auf die Viabilität der triple-negativen Tumorzelllinien MDA-MB-231 und BT-549. Dabei wurden die Zellen mit einer Dichte von 1500 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Versuchsdauer betrug 96 h, wobei das Kultivierungsmedium und das Zytostatikum alle 24 h erneuert wurden, um das metronomische Therapiekonzept nachzuahmen. In der vorliegenden Arbeit wurden daran anlehnend 2500 Zellen/Well in einer 96-Well-Platte ausgesät. Die Behandlung erfolgte ebenfalls für insgesamt 96 h. Das Medium wurde alle 24 h erneuert, wobei in den ersten 24 h nur Insulin zugesetzt wurde, gefolgt von einer dreimaligen Behandlung mit Insulin und Zytostatikum.

Metronomische Chemotherapie zeigt neben direkten toxischen Effekten auf Tumorzellen vor allem eine Wirkung auf Endothelzellen und Zellen des Immunsystems (5, 69, 83, 86, 94). In der Zellkultur kann nur der direkte toxische Effekt untersucht werden, da das gesamte Mikromilieu des Tumors fehlt. Weiterhin variieren die in der Literatur angegebenen Kultivierungsbedingungen bezüglich Kultivierungsmedium, Zusatz und Konzentration von FCS, Zelldichte im Well und Frequenz der Mediumwechsel. Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen folglich kritisch diskutiert und möglicherweise durch weitere *in vivo*-Studien ergänzt werden.

5.4 Einfluss von Insulin auf niedrig dosierte Zytostatikatherapie

Die zytotoxische Wirkung von Chemotherapeutika auf Zelllinien verschiedener Tumorentitäten kann durch Insulin verstärkt werden (8, 196). Die genauen molekularen Mechanismen sind nicht abschließend geklärt. Zum einen könnte Insulin die Zellmembranpermeabilität der Brustkrebszellen für Chemotherapeutika steigern und so zu einer erhöhten intrazellulären Konzentration führen (6, 132). Eine zweite Theorie ist, dass der mitogene Effekt von Insulin zu einer höheren Anzahl an Zellen in der S-Phase führt (129). Dadurch werden die Tumorzellen gezielter in der sensiblen Phase geschädigt. Im Anschluss an die Analyse der zellulären Parameter und deren Beeinflussung durch Insulin wurden zwei Konzentrationen für die Kombinationsbehandlung mit Mafosamid bzw. Vinorelbin ausgewählt. Die Seruminsulinkonzentration eines gesunden Menschen im Nüchternzustand liegt zwischen 0,00012 und 0,001 µg/ml. Nach der Durchführung eines oralen GlucoSetoleranztests können diese Referenzwerte um das 6- bis 10-fache ansteigen (174, 175). Somit kann eine Serumkonzentration von bis zu 0,01 µg/ml Insulin erreicht werden. Diese Konzentration wurde basierend auf den genannten Referenzwerten in der vorliegenden Arbeit für die Folgeversuche verwendet. Zudem wurde eine zweite, deutlich höhere Insulinkonzentration von 10 µg/ml gewählt, um einen möglichen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Zytostatikabehandlung ermitteln zu können. Ein möglicher Effekt sollte unabhängig von der direkten Insulinwirkung auf die Zellen untersucht werden. 10 µg/ml Insulin beeinflussten die Zelllinien in dem durchgeführten MTT-Assay nicht negativ, während höhere Konzentrationen zu einer Viabilitätssenkung führten.

Besonders relevant für diese Entscheidung waren die Ergebnisse von Alabaster *et al.* hinsichtlich einer verbesserten Ansprechrate von MCF-7-Zellen auf MTX nach Kombinationsbehandlung mit 10 µg/ml Insulin (6). Lasalvia-Prisco *et al.* erzielten in einer klinischen Studie Erfolge bei therapieresistenten Brustkrebspatientinnen durch die kombinierte Behandlung mit Insulin und niedrig dosiertem MTX (7). Das Konzept der niedrig dosierten Zytostatikatherapie ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da es für Patientinnen im metastasierten Stadium und Therapieresistenz eine Möglichkeit der Lebensverlängerung ohne schwerwiegende Nebenwirkungen durch eine konventionelle Chemotherapie bietet (89). Das metastasierte Mammakarzinom könnte dadurch zu einer chronischen Erkrankung werden. Allerdings ist eine große Anzahl der Tumoren gegen niedrig dosierte Zytostatikatherapie resistent und auch Tumoren, die zu Beginn ein Ansprechen gezeigt haben, können im Verlauf der Behandlung Resistenzmechanismen entwickeln (199). Aus diesem Grund wird das Therapieschema häufig mit weiteren Behandlungsmodalitäten kombiniert. Zu diesen gehören insbesondere VEGF-Inhibitoren, Immuncheckpoint- und CDK4/6-Inhibitoren sowie zielgerichtete Therapien, wie z.B. mit

60

Trastuzumab, aber auch konventionelle Chemotherapie und Radiatio (91, 199-204). In der vorliegenden Arbeit interessierte vor allem, ob Insulin einen Einfluss auf niedrig dosierte Zytostatikatherapie haben könnte.

5.4.1 Einfluss von Insulin auf die Wirkung von Mafosfamid

CPA findet in vielen klinischen Studien zur metronomischen Chemotherapie Anwendung (205). *In vitro*-Studien sind jedoch rar, da CPA als *Pro-Drug* in der Leber aktiviert werden muss, um seine Wirkung zu entfalten. Das in dieser Arbeit verwendete Mafosfamid kann im Gegensatz zu CPA durch spontane Hydrolyse in die aktive Form 4-OH-CPA umgewandelt werden (141). Für die vorliegende Arbeit wurden, anlehnend an die maximal gemessenen Serumkonzentrationen in präklinischen und klinischen Studien zu pharmakokinetischen Parametern, Konzentrationen zwischen 0,15 und 9,5 µg/ml gewählt (206-210). Es konnte gezeigt werden, dass Mafosfamid allein ab einer Konzentration von 4,8 µg/ml in den T-47D-Zellen und ab 9,5 µg/ml in allen anderen Zelllinien zu einer Viabilitätssenkung unter 60% führte. In der Arbeit von Bocci *et al.* findet sich ein Hinweis darauf, dass Mafosfamid die Proliferationsrate von Tumorzellen auch bei einer längeren Inkubationszeit von 144 h erst durch höhere Konzentrationen (1000 nM) senkt (94). Bocci *et al.* verwendeten hierbei die Zelllinie MDA-MB-435, welche lange als eine Modell-Zelllinie für Brustkrebs genutzt wurde, jedoch nach genaueren Nachforschungen als Melanomzelle identifiziert wurde (211). Weiterhin konnten Bocci *et al.* zeigen, dass Endothelzellen bereits durch sehr niedrige Konzentrationen in der Proliferation gehemmt werden. Dies impliziert, dass sich die Wirkweise von Mafosfamid zwischen den einzelnen Zelltypen unterscheidet (205).

In der vorliegenden Arbeit zeigte die kombinierte Behandlung der Zellen mit Insulin in der MCF-10A-Zelllinie keinen Unterschied. Die HR-positiven Zelllinien zeigten ab 0,6 µg/ml Mafosfamid in Kombination mit 0,01 µg/ml Insulin ein geringfügig verbessertes Ansprechen. In den triple-negativen Zelllinien führten 10 µg/ml Insulin in Kombination mit höheren Mafosfamidkonzentrationen zu einer niedrigeren Viabilität im Vergleich. Insgesamt konnte in dieser Arbeit kein verbessertes Ansprechen der Tumorzellen auf Mafosfamid nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit jenen in der Arbeit von Agrawal *et al.* (8). Sie konnten eine deutliche Viabilitätssenkung in MCF-7-Zellen nach Kombinationsbehandlung mit Insulin und CPA nachweisen. Kritisch anzumerken ist jedoch, dass Agrawal *et al.* die Zellen mit 40 µg/ml Insulin für 8 h inkubierten. Diese Konzentration zeigte in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit eine direkte Reduktion der Zellviabilität. Zudem behandelten sie die Zellen mit sehr hohen CPA-Konzentrationen zwischen 400 und 4000 µg/ml. In der vorliegenden Arbeit wurden deutlich niedrigere Konzentrationen verwendet.

In der Literatur ist der wirkungsverstärkende Effekt von Insulin durch eine erhöhte Chemosensibilität der Zellen erklärt (196). Dies basiert einerseits auf der proliferationsfördernden Wirkung von Insulin mit der Folge, dass sich eine höhere Anzahl an Zellen in der vulnerablen S-Phase befindet (6, 127). Andererseits schrieben Ayre *et al.* Insulin eine Wirkung auf die Membranpermeabilität zu, wodurch es zu einer gesteigerten Aufnahme der Zytostatika in die Zellen kommt (195). Im Hinblick auf die Potenzierung der niedrig dosierten Zytostatikatherapie durch Insulin fand sich in dieser Arbeit kein Hinweis. Dies könnte mit einer unzureichenden Versuchsdauer zusammenhängen. Direkte toxische Effekte könnten durch Mutationen im Tumorsuppressorprotein p53, DNA-Reparaturvorgänge oder andere erworbene Resistenzmechanismen verzögert auftreten (212). Eine entsprechend längere Behandlungsdauer der Zellen wäre daher sinnvoll. Ebenso könnte die Reaktion der Zellen auf erhöhte Insulinkonzentrationen und eine Anpassung der molekularen Mechanismen länger als 72 h dauern.

5.4.2 Einfluss von Insulin auf die Wirkung von Vinorelbin

In der Onkologie ist Vinorelbin p.o. seit 2003 für die Therapie des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms und seit 2005 auch für das fortgeschrittene anthrazyklinresistente Mammakarzinom zugelassen (213). Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen wurden in Anlehnung an zwei Dosisfindungsstudien festgelegt (147, 148). Briasoulis *et al.* schlossen Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren in ihre Studien ein und behandelten mit Dosierungen zwischen 20 mg und 70 mg Vinorelbin p.o. Während der Studie wurde die Vinorelbinkonzentration im Serum ermittelt. Diese lag zwischen 0,33 und 4,07 ng/ml. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien mit Konzentrationen zwischen 0,16 und 10 ng/ml Vinorelbin behandelt. Ab einer Konzentration von 2,5 ng/ml zeigten alle Zelllinien eine Viabilitätssenkung um mindestens 40%. Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse aus Vorarbeiten zur Pharmakokinetik von Vinorelbin in niedriger Dosierung. Briasoulis *et al.* demonstrierten, dass die Behandlung mit 50 mg Vinorelbin dreimal wöchentlich eine optimale Dosierung für Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs darstellt. Die gemessene Serumkonzentration von Vinorelbin betrug im Median $2,6 \pm 0,69$ ng/ml. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen, dass 2,5 ng/ml Vinorelbin *in vitro* und 50 mg Vinorelbin *in vivo* die niedrigste Dosierung mit gleichzeitig ausreichend zytotoxischem Effekt darstellen. Die zuvor als relevant gefundenen Insulinkonzentrationen potenzierten die Wirkung von Vinorelbin nicht. Höhere Insulinkonzentrationen von 10 µg/ml Insulin zeigten eine protektive Wirkung gegenüber Vinorelbin. Cerrito *et al.* untersuchten die Wirkung von Vinorelbin auf den Zellzyklus der triple-negativen Zelllinien MDA-MB-231 und BT-549 (198). In der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting, FACS*) konnten sie eine signifikante Reduktion der Zellzahl in der G₀/G₁-Phase nachweisen. Durch Insulin werden

Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befinden, stimuliert und gehen in die S-Phase über (127-129). Folglich könnte angenommen werden, dass die zytotoxische Wirkung von Vinorelbin durch den proliferationsstimulierenden Effekt von Insulin aufgehoben wird.

Es ist relevant die Ergebnisse verschiedener Studien heranzuziehen, die den Zusammenhang zwischen einer Insulinbehandlung bei Diabetes und dem Risiko für eine Krebserkrankung untersuchen. Mehrere Studien zeigten, dass eine Insulinbehandlung zu einem erhöhten Krebserkrankungsrisiko führte (214, 215). Mu *et al.* und Peairs *et al.* berichteten weiterhin über ein erhöhtes Mortalitätsrisiko bei Komorbidität von Diabetes mellitus und Brustkrebs (19, 20). Zu bedenken ist jedoch, dass über 90% aller Diabetiker an einem DM2 leiden (216). Die Behandlung mit Insulin erfolgt bei diesen Patienten erst dann, wenn die Basistherapie (Gewichtsreduktion, orale Antidiabetika) versagt hat. Es ist davon auszugehen, dass Typ-2-Diabetiker, die eine Insulintherapie erhalten, an vielen Komorbiditäten erkrankt sind. Ein erhöhtes Krebserkrankungsrisiko und eine gesteigerte Mortalität können folglich durch Confounder verursacht sein (17, 26). Hierzu gehören der BMI, eine verzögerte Diagnose, die Anzahl an Komorbiditäten und die erhöhte Hospitalisierungsrate aufgrund von Nebenwirkungen unter einer Chemotherapie. Andere Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen Diabetes und einem erhöhten Krebserkrankungsrisiko feststellen (217, 218).

In der vorliegenden Arbeit konnte kein verbessertes Ansprechen der Zelllinien durch Insulin auf die zytostatische Therapie nachgewiesen werden. Im Gegenteil zeigten die Zellen bei kombinierter Behandlung mit Insulin eine höhere Viabilität. Goetsch *et al.* untersuchten in einer präklinischen Studie die Interaktion zwischen einem humanisierten anti-IGF1R-AK und Vinorelbin (219). Sie konnten zeigen, dass die Behandlung mit dem AK zu einer erniedrigten Tumorpheriferation der MCF-7-Zellen führt. Eine Hemmung des IGF1R, der durch den *Insulin-like growth factor-1* (IGF-1) und Insulin aktiviert werden kann, führt also zu einer Herabregulation der Zellzyklusaktivität. Die Behandlung mit Insulin könnte im Umkehrschluss einen protektiven Effekt auf die Tumorzellen haben. Dies würde sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit decken.

5.5 Methodenkritik

Der Einfluss von Insulin auf niedrig dosierte Zytostatikatherapie wurde mittels verschiedener Assays untersucht. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurde das *Cell Proliferation ELISA BrdU Kit* der Firma Roche verwendet. Dabei wurde die vorgeschriebene Dauer der BrdU-Inkorporation von 2 h auf 3 h erhöht. Im Vergleich wurden geringere Standardabweichungen bei den triple-negativen Zelllinien beobachtet. Dies könnte durch die Zellteilungsgeschwindigkeit beeinflusst worden sein, da die triple-negativen Zelllinien deutlich schneller proliferieren als die HR-positiven Zelllinien und folglich mehr BrdU in ihre DNA einbauen können als langsam proliferierende Zellen.

Die Ergebnisse des MTT-Assay zeigten teilweise hohe Standardabweichungen. Dies könnte mit der methodischen Durchführung zusammenhängen. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte während der ersten Versuche mittels Pipettierwanne und Mehrkanalpipette (Multipipette®). Für jede Reihe der 96-Well-Platte wurden mit der Multipipette 100 µl pro Kanal aus der Pipettierwanne aufgezogen und pipettiert. Im Gegensatz dazu wurde für den zuletzt durchgeführten MTT-Assay zur Untersuchung der Wirkweise von Insulin in Kombination mit Vinorelbin auf die Viabilität eine Multipipette® verwendet. Dies ermöglichte schnelleres Pipettieren, da bei dieser Einkanalpipette mittels einer Dispenserspitze pro Pipettiervorgang 2 ml aufgezogen werden konnten. Durch Betätigen des Druckknopfes konnten nacheinander 100 µl pro Well pipettiert werden. Im Vergleich zur Multipipette® wurden mit der Multipipette® gleichmäßigere Zellzahlen pro Well und geringere Standardabweichungen erreicht. Überdies hat das Vincaalkaloid Vinorelbin gegenüber Mafosfamid einen Vorteil in der Verfügbarkeit. Es ist als fertige Stammlösung erhältlich. Dadurch wurde die Anwendung des Zytostatikums *in vitro* erleichtert. Die Handhabung von Mafosfamid war im Vergleich erschwert. Das Zytostatikum liegt nur als Feststoff vor und musste für jeden Versuchsdurchgang mit Hilfe einer Feinwaage im Milligramm-Bereich abgewogen werden. Die durchgeführten Versuche mit Vinorelbin zeigten konstantere Ergebnisse und geringere Standardabweichungen als jene mit Mafosfamid

Zur Ermittlung der Apoptoserate wurde der *Real Time Annexin V Apoptose Assay* von Promega verwendet. Bei der Durchführung des Assays traten mehrere Probleme auf. Da die Proliferationsrate und Viabilität zu einem bestimmten Endpunkt gemessen wurden, sollte der Endpunkt des Apoptose-Assays mit diesem übereinstimmen. Aus diesem Grund wurde die Detektionsreagenz nach Ablauf der 24-stündigen Behandlung mit Insulin in die Wells pipettiert. Die Messung der Apoptoserate wurde nur zu einem Zeitpunkt durchgeführt und nicht im Zeitverlauf wie im Protokoll der Firma beschrieben (162). Die Aussagekraft der

vorliegenden Ergebnisse ist daher eingeschränkt. Ein weiterer Kritikpunkt ergab sich aus der angewendeten Zellzahl. Das Protokoll sieht eine Zellzahl von 10.000 pro *Well* in einer 96-*Well*-Platte vor. Um die Ergebnisse mit dem BrdU- und MTT-Assay vergleichen zu können wurden nur 2500 Zellen pro *Well* ausgesät. Zu ergänzen ist, dass der Versuch nur zweimal durchgeführt werden konnte, weshalb die Validität der Ergebnisse ebenfalls eingeschränkt ist. Die Überlegung, die Apoptoserate mittels FACS-Analyse zu ermitteln, wurde verworfen. Dies begründet sich in der Anzahl an Zelllinien und getesteten Konzentrationen, die zu einer außerordentlich hohen Anzahl an Proben geführt hätten. Dies wäre im Rahmen dieser Arbeit nicht durchführbar gewesen.

6 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Neoplasie bei Frauen (1, 2). Im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium ist eine mögliche Therapieoption die metronomische Chemotherapie (93, 220). Diese basiert auf dem Grundgedanken „Less is more“, welcher im Jahr 2000 von Hanahan *et al.* geprägt wurde (4). Die Kontrolle der Erkrankung und eine hohe Lebensqualität stehen dabei im Vordergrund. Drei wesentliche Wirkmechanismen kennzeichnen die metronomische Chemotherapie (69, 121). Erstens: eine Wirkung auf Endothelzellen und Faktoren der Angiogenese (94, 96, 221). Zweitens: immunmodulierende Mechanismen (113, 222). Drittens: ein direkter toxischer Effekt auf die Tumorzellen (122, 223). Des Weiteren könnte das Ansprechen der Tumorzellen auf metronomische Chemotherapie durch Insulin erhöht werden (7, 8). Insulin aktiviert über eine Rezeptortyrosinkinase u.a. den PI3K-/AKT- und MAPK-Signalweg und induziert dadurch mitogene Effekte (130). Die höhere Anzahl an Tumorzellen in der vulnerablen S-Phase und Effekte auf die Zellmembranpermeabilität könnten die Wirksamkeit von Zytostatika potenzieren (132, 197).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Insulin auf metronomische Chemotherapie untersucht. Für die Versuche wurden zwei triple-negative Zelllinien (MDA-MB-231 und BT-549), zwei HR-positive/HER2-negative Zelllinien (MCF-7 und T-47D) und eine Kontrollzelllinie aus gesundem Brustdrüsengewebe (MCF-10A) verwendet. Im ersten Versuch wurden mittels MTT-Assay optimale Kultivierungsbedingungen definiert. Für alle Folgeversuche wurden 96-Well-Platten ohne Beschichtung und ein Kultivierungsmedium mit 5% FCS verwendet. Da Insulin konzentrationsabhängig wirkt, wurden die Tumorzellen im nächsten Schritt für 24 h mit 0,01 – 50 µg/ml Insulin behandelt. Die Bestimmung der Proliferation erfolgte mittels Quantifizierung der BrdU-Inkorporation. Für die Messung der Viabilität wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die Apoptoserate wurde mit Hilfe eines Annexin V-/Necrosis-Assay bestimmt. Die Insulinkonzentrationen 0,01 µg/ml und 10 µg/ml wurden als relevant für Folgeversuche identifiziert. Dabei entsprechen 0,01 µg/ml Insulin der postprandialen Seruminsulinkonzentration eines gesunden Menschen (175). 10 µg/ml Insulin entsprechen der höchsten Insulinkonzentration ohne negativen Einfluss auf die Zelllinien. Anschließend wurde der Einfluss von Insulin auf niedrig dosierte Zytostatika mittels MTT-Assay untersucht. Als Zytostatika wurden Mafosfamid (die aktive Form von Cyclophosphamid) und Vinorelbin gewählt, da sie *in vivo* peroral angewendet werden können. Die Zellen wurden in 96-Well-Platten für 24 h kultiviert, es folgte die Behandlung mit 0,01 µg/ml bzw. 10 µg/ml Insulin für weitere 24 h. Im Anschluss erfolgte an drei aufeinander

folgenden Tagen die kombinierte Behandlung mit Insulin und Mafosfamid (0,15 – 9,55 µg/ml) bzw. Vinorelbin (0,16 – 10 ng/ml).

Die Kombination von 10 µg/ml Insulin mit höheren Konzentrationen Mafosfamid führte in den triple-negativen Zelllinien zu einer reduzierten Viabilität. Die Wirkung von Mafosfamid wurde durch Insulin jedoch nicht signifikant potenziert. Die HR-positiven-/HER2-negativen Zelllinien zeigten nach Behandlung mit 10 µg/ml Insulin eine erhöhte Viabilität. Daraus könnte geschlossen werden, dass Insulin hier am ehesten einen protektiven Einfluss auf die Zellen hatte und die Wirksamkeit von Mafosfamid reduziert wurde.

Die Viabilität der mit Vinorelbin behandelten Tumorzellen wurde durch Insulin vor allem in den HR-positiven Tumorzelllinien erhöht. Dabei hatten 10 µg/ml Insulin einen stärkeren Effekt als 0,01 µg/ml Insulin. Unabhängig von der Insulinbehandlung konnte in allen Zelllinien ab einer Konzentration von 2,5 ng/ml Vinorelbin eine Reduktion der Viabilität unter 60% ermittelt werden. 2,5 ng/ml Vinorelbin *in vitro* entsprechen demnach der niedrigsten wirksamen Dosierung bei gleichzeitig ausreichend zytotoxischem Effekt.

Ein möglicher limitierender Faktor der vorliegenden Arbeit ist, dass nur eine Aussage über das Verhalten der Zellen *in vitro* getroffen werden kann. In der Zellkultur kann die Wirkung der metronomischen Chemotherapie nur bedingt beurteilt werden. Die Zielkomponenten Immunsystem und Endothelzellen fehlen. Um mögliche Wirkmechanismen und Interaktionen des vielversprechenden Therapiekonzepts weiter untersuchen zu können, ist es nötig die Versuche an ein *in vivo*-Modell anzupassen.

Zusammenfassend hat die vorliegende Arbeit gezeigt, dass Insulin einen Einfluss auf die Viabilität der metronomisch behandelten Tumorzellen hat. Dieser ist abhängig von der Insulinkonzentration, dem gewählten Zytostatikum und der Tumorzelllinie. In den triple-negativen Zelllinien führte die Kombination von niedrig dosiertem Mafosfamid mit Insulin zu einer reduzierten Viabilität, während der Effekt von Insulin auf die mit Vinorelbin behandelten HR-positiven Tumorzelllinien eher protektiv war.

7 Literaturverzeichnis

1. Koch-Institut R. Zentrum für Krebsregisterdaten, Krebs gesamt 2019 [updated 17.12.2019; cited 2020. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Krebs_gesamt/krebs_gesamt_node.html.
2. Robert Koch-Institut. Zentrum für Krebsregisterdaten, Brustkrebs 2017 [cited 2019. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html
3. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Version 4.3 2020 [updated Februar 2020; cited 2019. Available from: <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/>.
4. Hanahan D, Bergers G, Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(8):1045-7.
5. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(6):423-36.
6. Alabaster O, Vonderhaar BK, Shafie SM. Metabolic modification by insulin enhances methotrexate cytotoxicity in MCF-7 human breast cancer cells. *European journal of cancer & clinical oncology*. 1981;17(11):1223-8.
7. Lasalvia-Prisco E, Cucchi S, Vazquez J, Lasalvia-Galante E, Golomar W, Gordon W. Insulin-induced enhancement of antitumoral response to methotrexate in breast cancer patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2004;53(3):220-4.
8. Agrawal S, Luc M, Ziolkowski P, Agrawal AK, Pielka E, Walaszek K, et al. Insulin-induced enhancement of MCF-7 breast cancer cell response to 5-fluorouracil and cyclophosphamide. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2017;39(6):1010428317702901.
9. RKI. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016 2016 [updated 2016; cited 2019. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?blob=publicationFile
10. (IRAC) WaIAfRoC. Cancer Today 2019 [updated March 2019; cited 2019. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>.
11. Krebsregisterdaten Zf. Krebs in Deutschland 2015/2016 [cited 2020. Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html.
12. Bernhard Wörmann SA, Marija Balic, Thomas Decker, Tanja Fehm, Richard Greil, Nadia Harbeck, Barbara Krug, Friedrich Overkamp, Oliver Rick, Frederik Wenz, Diana Lüftner. Mammakarzinom der Frau Januar 2018 [Available from: https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mammakarzinom-der-frau/@_@guideline/html/index.html#ID0EG.
13. Krebsforschungszentrum D. Krebsstatistiken: So häufig ist Krebs in Deutschland [updated 17.12.2019; cited 2021. Available from: <https://www.krebsinformationsdienst.de/tumorarten/grundlagen/krebsstatistiken.php>.

14. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *Jama*. 2017;317(23):2402-16.
15. Rojas K, Stuckey A. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2016;59(4):651-72.
16. Wolf I, Sadetzki S, Catane R, Karasik A, Kaufman B. Diabetes mellitus and breast cancer. *The Lancet Oncology*. 2005;6(2):103-11.
17. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes care*. 2010;33(7):1674-85.
18. Jacobs E, Hoyer A, Brinks R, Kuss O, Rathmann W. Burden of Mortality Attributable to Diagnosed Diabetes: A Nationwide Analysis Based on Claims Data From 65 Million People in Germany. *Diabetes care*. 2017;40(12):1703-9.
19. Peairs KS, Barone BB, Snyder CF, Yeh HC, Stein KB, Derr RL, et al. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(1):40-6.
20. Mu L, Zhu N, Zhang J, Xing F, Li D, Wang X. Type 2 diabetes, insulin treatment and prognosis of breast cancer. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2017;33(1).
21. van de Poll-Franse LV, Houterman S, Janssen-Heijnen ML, Dercksen MW, Coebergh JW, Haak HR. Less aggressive treatment and worse overall survival in cancer patients with diabetes: a large population based analysis. *International journal of cancer*. 2007;120(9):1986-92.
22. Fleming ST, Pursley HG, Newman B, Pavlov D, Chen K. Comorbidity as a predictor of stage of illness for patients with breast cancer. *Medical care*. 2005;43(2):132-40.
23. Maruthur NM, Bolen S, Brancati FL, Clark JM. Obesity and mammography: a systematic review and meta-analysis. *Journal of general internal medicine*. 2009;24(5):665-77.
24. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *The Journal of cardiovascular nursing*. 2002;16(2):17-23.
25. Maskarinec G, Jacobs S, Park SY, Haiman CA, Setiawan VW, Wilkens LR, et al. Type II Diabetes, Obesity, and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2017;26(6):854-61.
26. Srokowski TP, Fang S, Hortobagyi GN, Giordano SH. Impact of diabetes mellitus on complications and outcomes of adjuvant chemotherapy in older patients with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(13):2170-6.
27. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2018;472(5):697-703.
28. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(4):290-303.
29. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.

30. Howell LP, Gandour-Edwards R, O'Sullivan D. Application of the Scarff-Bloom-Richardson tumor grading system to fine-needle aspirates of the breast. *American journal of clinical pathology*. 1994;101(3):262-5.
31. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast care (Basel, Switzerland)*. 2013;8(2):149-54.
32. Fisher ER, Osborne CK, McGuire WL, Redmond C, Knight WA, 3rd, Fisher B, et al. Correlation of primary breast cancer histopathology and estrogen receptor content. *Breast cancer research and treatment*. 1981;1(1):37-41.
33. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(1):18-43.
34. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2005;353(16):1659-72.
35. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research*. 2010;70(14):5649-69.
36. Koscielny S, Tubiana M, Le MG, Valleron AJ, Mouriessse H, Contesso G, et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *British journal of cancer*. 1984;49(6):709-15.
37. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(8):591-602.
38. Peart O. Metastatic Breast Cancer. *Radiologic technology*. 2017;88(5):519m-39m.
39. Rios N, Adaskina N, Fromke C, Papendorf F, Schippert C, Koch A, et al. The Benefit of Baseline Staging-Risk Assessment of Distant Breast Cancer Metastases by Tumor Stage. *Anticancer research*. 2016;36(9):4909-14.
40. Fisher B, Fisher ER. The interrelationship of hematogenous and lymphatic tumor cell dissemination. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1966;122(4):791-8.
41. Veronesi U, Rilke F, Luini A, Sacchini V, Galimberti V, Campa T, et al. Distribution of axillary node metastases by level of invasion. An analysis of 539 cases. *Cancer*. 1987;59(4):682-7.
42. Standardized management of breast specimens recommended by Pathology Working Group, Breast Cancer Task Force. *American journal of clinical pathology*. 1973;60(6):789-98.
43. Kimbung S, Loman N, Hedenfalk I. Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. *Seminars in cancer biology*. 2015;35:85-95.
44. Saadatmand S, Bretveld R, Siesling S, Tilanus-Linthorst MM. [Influence of tumour stage at breast cancer detection on survival in modern times: population based study in 173,797 patients]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*. 2016;160:A9800.
45. de Boer M, van Dijck JA, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VC. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010;102(6):410-25.
46. Colzani E, Liljegren A, Johansson AL, Adolfsson J, Hellborg H, Hall PF, et al. Prognosis of patients with breast cancer: causes of death and effects of time since diagnosis, age, and tumor characteristics. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(30):4014-21.

47. Gomez HL, Castaneda CA, Vigil CE, Vidaurre T, Velarde RG, Cruz WR, et al. Prognostic effect of hormone receptor status in early HER2 positive breast cancer patients. *Hematology/oncology and stem cell therapy*. 2010;3(3):109-15.
48. Sun Z, Shi Y, Shen Y, Cao L, Zhang W, Guan X. Analysis of different HER-2 mutations in breast cancer progression and drug resistance. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(12):2691-701.
49. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Benbrahim-Tallaa L, Bouvard V, Bianchini F, et al. Breast-cancer screening--viewpoint of the IARC Working Group. *The New England journal of medicine*. 2015;372(24):2353-8.
50. Broeders M, Moss S, Nystrom L, Njor S, Jonsson H, Paap E, et al. The impact of mammographic screening on breast cancer mortality in Europe: a review of observational studies. *Journal of medical screening*. 2012;19 Suppl 1:14-25.
51. Yancik R, Wesley MN, Ries LA, Havlik RJ, Edwards BK, Yates JW. Effect of age and comorbidity in postmenopausal breast cancer patients aged 55 years and older. *Jama*. 2001;285(7):885-92.
52. Gesellschaft DD. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2019 [updated 14.11.2018; cited 2020. Available from: https://www.deutsche-diabetes-gesellschaft.de/fileadmin/Redakteur/Stellungnahmen/Gesundheitspolitik/20181114gesundheitsbericht_2019.pdf.
53. e.V. AGO. Operative Therapie des Mammakarzinoms unter onkologischen Aspekten 2020 [updated 02.03.2020; cited 2020. Available from: https://www.ago-online.de/fileadmin/ago-online/downloads/leitlinien/kommission_mamma/2020/PDF_DE/2020D%2008_Operative%20Therapie%20des%20Mammakarzinoms%20unter%20onkologischen%20Aspekten.pdf.
54. Mathijssen RH, Sparreboom A, Verweij J. Determining the optimal dose in the development of anticancer agents. *Nature reviews Clinical oncology*. 2014;11(5):272-81.
55. Sitzia J, Huggins L. Side effects of cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil (CMF) chemotherapy for breast cancer. *Cancer practice*. 1998;6(1):13-21.
56. Tao JJ, Visvanathan K, Wolff AC. Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2015;24 Suppl 2:S149-53.
57. Kim JJ, Tannock IF. Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nature reviews Cancer*. 2005;5(7):516-25.
58. Aalders KC, Tryfonidis K, Senkus E, Cardoso F. Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives. *Cancer treatment reviews*. 2017;53:98-110.
59. Munzone E, Colleoni M. Clinical overview of metronomic chemotherapy in breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2015;12(11):631-44.
60. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9472):1687-717.
61. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thurlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2011;22(8):1736-47.

62. Gagliato Dde M, Gonzalez-Angulo AM, Lei X, Theriault RL, Giordano SH, Valero V, et al. Clinical impact of delaying initiation of adjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(8):735-44.
63. Schmidt ME, J. ; Pukrop, T. ; Reichle, A. . *Metronome Chemotherapie*. Thieme Praxis Report. 2016.
64. Cazzaniga ME, Cordani N, Capici S, Cogliati V, Riva F, Cerrito MG. *Metronomic Chemotherapy*. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9).
65. Fedele P, Sanna V, Fancellu A, Marino A, Calvani N, Cinieri S. De-escalating cancer treatments during COVID 19 pandemic: Is metronomic chemotherapy a reasonable option? *Critical reviews in oncology/hematology*. 2021;157:103148.
66. Fares JE, El Tomb P, Khalil LE, Atwani RW, Moukadem HA, Awada A, et al. *Metronomic chemotherapy for patients with metastatic breast cancer: Review of effectiveness and potential use during pandemics*. *Cancer treatment reviews*. 2020;89:102066.
67. Simsek C, Esin E, Yalcin S. *Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the Literature and Clinical Experience*. *Journal of oncology*. 2019;2019:5483791.
68. Cazzaniga ME, Pinotti G, Montagna E, Amoroso D, Berardi R, Butera A, et al. *Metronomic chemotherapy for advanced breast cancer patients in the real world practice: Final results of the VICTOR-6 study*. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2019;48:7-16.
69. Torimura T, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Ueno T, Kerbel RS, et al. *Metronomic chemotherapy: possible clinical application in advanced hepatocellular carcinoma*. *Translational oncology*. 2013;6(5):511-9.
70. Folkman J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *The New England journal of medicine*. 1971;285(21):1182-6.
71. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. *Science (New York, NY)*. 1989;246(4935):1306-9.
72. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. *Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF*. *Science (New York, NY)*. 1989;246(4935):1309-12.
73. Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* *Journal of the National Cancer Institute*. 1990;82(1):4-6.
74. Fidler IJ, Ellis LM. *The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis*. *Cell*. 1994;79(2):185-8.
75. Folkman J. *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. *Seminars in oncology*. 2002;29(6 Suppl 16):15-8.
76. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. *Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression*. *Nature medicine*. 1995;1(2):149-53.
77. Ferrara N, Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor*. *Endocrine reviews*. 1997;18(1):4-25.
78. Judy BF, Aliperti LA, Predina JD, Levine D, Kapoor V, Thorpe PE, et al. *Vascular endothelial-targeted therapy combined with cytotoxic chemotherapy induces inflammatory intratumoral infiltrates and inhibits tumor relapses after surgery*. *Neoplasia (New York, NY)*. 2012;14(4):352-9.
79. Bergers G, Benjamin LE. *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):401-10.

80. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
81. Pahernik S, Harris AG, Schmitt-Sody M, Krasnici S, Goetz AE, Dellian M, et al. Orthogonal polarisation spectral imaging as a new tool for the assessment of antivasular tumour treatment in vivo: a validation study. *British journal of cancer*. 2002;86(10):1622-7.
82. Shahneh FZ, Baradaran B, Zamani F, Aghebati-Maleki L. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Human antibodies*. 2013;22(1-2):15-9.
83. Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1991;13(1):31-6.
84. Miller KD, Sweeney CJ, Sledge GW, Jr. Redefining the target: chemotherapeutics as antiangiogenics. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(4):1195-206.
85. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer research*. 2000;60(7):1878-86.
86. Klement G, Baruchel S, Rak J, Man S, Clark K, Hicklin DJ, et al. Continuous low-dose therapy with vinblastine and VEGF receptor-2 antibody induces sustained tumor regression without overt toxicity. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(8):R15-24.
87. Romiti A, Cox MC, Sarcina I, Di Rocco R, D'Antonio C, Barucca V, et al. Metronomic chemotherapy for cancer treatment: a decade of clinical studies. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;72(1):13-33.
88. Pasquier E, Kavallaris M, Andre N. Metronomic chemotherapy: new rationale for new directions. *Nature reviews Clinical oncology*. 2010;7(8):455-65.
89. Colleoni M, Rocca A, Sandri MT, Zorzino L, Masci G, Nole F, et al. Low-dose oral methotrexate and cyclophosphamide in metastatic breast cancer: antitumor activity and correlation with vascular endothelial growth factor levels. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2002;13(1):73-80.
90. Institute NC. Common Terminology Criteria for Adverse Events v5.0 2017 [updated 01.03.2018; cited 2019. Available from: https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm.
91. Orlando L, Cardillo A, Ghisini R, Rocca A, Balduzzi A, Torrissi R, et al. Trastuzumab in combination with metronomic cyclophosphamide and methotrexate in patients with HER-2 positive metastatic breast cancer. *BMC cancer*. 2006;6:225.
92. Cardoso F, Paluch-Shimon S, Senkus E, Curigliano G, Aapro MS, André F, et al. 5th ESO-ESMO international consensus guidelines for advanced breast cancer (ABC 5). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2020;31(12):1623-49.
93. e.V. AGO. Diagnostik und Therapie früher und fortgeschrittener Mammakarzinome 2020.
94. Bocci G, Nicolaou KC, Kerbel RS. Protracted low-dose effects on human endothelial cell proliferation and survival in vitro reveal a selective antiangiogenic window for various chemotherapeutic drugs. *Cancer research*. 2002;62(23):6938-43.
95. Vacca A, Iurlaro M, Ribatti D, Minischetti M, Nico B, Ria R, et al. Antiangiogenesis is produced by nontoxic doses of vinblastine. *Blood*. 1999;94(12):4143-55.

96. Wang J, Lou P, Lesniewski R, Henkin J. Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anti-cancer drugs*. 2003;14(1):13-9.
97. Hamano Y, Sugimoto H, Soubasakos MA, Kieran M, Olsen BR, Lawler J, et al. Thrombospondin-1 associated with tumor microenvironment contributes to low-dose cyclophosphamide-mediated endothelial cell apoptosis and tumor growth suppression. *Cancer research*. 2004;64(5):1570-4.
98. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *The Journal of cell biology*. 1997;138(3):707-17.
99. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nature medicine*. 2000;6(1):41-8.
100. Guo N, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD. Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer research*. 1997;57(9):1735-42.
101. Gupta K, Gupta P, Wild R, Ramakrishnan S, Hebbel RP. Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Angiogenesis*. 1999;3(2):147-58.
102. Lee K, Qian DZ, Rey S, Wei H, Liu JO, Semenza GL. Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(7):2353-8.
103. Schito L, Rey S, Xu P, Man S, Cruz-Muñoz W, Kerbel RS. Metronomic chemotherapy offsets HIF α induction upon maximum-tolerated dose in metastatic cancers. *EMBO Mol Med*. 2020;12(9):e11416.
104. Bertolini F, Paul S, Mancuso P, Monestiroli S, Gobbi A, Shaked Y, et al. Maximum tolerable dose and low-dose metronomic chemotherapy have opposite effects on the mobilization and viability of circulating endothelial progenitor cells. *Cancer research*. 2003;63(15):4342-6.
105. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2007;56(5):641-8.
106. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4(+)/CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2006;55(9):1064-71.
107. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)/CD25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood*. 2005;105(7):2862-8.
108. Loeffler M, Kruger JA, Reisfeld RA. Immunostimulatory effects of low-dose cyclophosphamide are controlled by inducible nitric oxide synthase. *Cancer research*. 2005;65(12):5027-30.
109. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(8):4499-506.
110. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are

- associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(51):18538-43.
111. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*. 2004;10(9):942-9.
112. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. 2011;480(7378):480-9.
113. Michels T, Shurin GV, Naiditch H, Sevko A, Umansky V, Shurin MR. Paclitaxel promotes differentiation of myeloid-derived suppressor cells into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner. *Journal of immunotoxicology*. 2012;9(3):292-300.
114. Kaneno R, Shurin GV, Tourkova IL, Shurin MR. Chemomodulation of human dendritic cell function by antineoplastic agents in low noncytotoxic concentrations. *Journal of translational medicine*. 2009;7:58.
115. Tong AW, Papayoti MH, Netto G, Armstrong DT, Ordonez G, Lawson JM, et al. Growth-inhibitory effects of CD40 ligand (CD154) and its endogenous expression in human breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(3):691-703.
116. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:453-61.
117. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2000;164(12):6166-73.
118. Heusinkveld M, van der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *Journal of translational medicine*. 2011;9:216.
119. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell death and differentiation*. 2014;21(1):15-25.
120. Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Zemelka M, Ptak W. Influence of cyclophosphamide and its metabolic products on the activity of peritoneal macrophages in mice. *Pharmacological reports : PR*. 2009;61(3):550-7.
121. Chen YL, Chang MC, Cheng WF. Metronomic chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. *Cancer letters*. 2017;400:282-92.
122. Folkins C, Man S, Xu P, Shaked Y, Hicklin DJ, Kerbel RS. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer research*. 2007;67(8):3560-4.
123. Cabral F, Abraham I, Gottesman MM. Isolation of a taxol-resistant Chinese hamster ovary cell mutant that has an alteration in alpha-tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1981;78(7):4388-91.
124. Kavallaris M, Kuo DY, Burkhart CA, Regl DL, Norris MD, Haber M, et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(5):1282-93.
125. Yang CP, Verdier-Pinard P, Wang F, Lippaine-Horvath E, He L, Li D, et al. A highly epothilone B-resistant A549 cell line with mutations in tubulin that confer drug dependence. *Molecular cancer therapeutics*. 2005;4(6):987-95.

126. André N, Pasquier E. Response to 'Intermittent androgen blockade should be regarded as standard therapy in prostate cancer'. *Nature clinical practice Oncology*. 2009;6(2):E1.
127. Lorincz AM, Sukumar S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2006;13(2):279-92.
128. Mawson A, Lai A, Carroll JS, Sergio CM, Mitchell CJ, Sarcevic B. Estrogen and insulin/IGF-1 cooperatively stimulate cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of c-Myc and cyclin D1. *Molecular and cellular endocrinology*. 2005;229(1-2):161-73.
129. Gross GE, Boldt DH, Osborne CK. Perturbation by insulin of human breast cancer cell cycle kinetics. *Cancer research*. 1984;44(8):3570-5.
130. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: supporting acts and new players. *Journal of molecular endocrinology*. 2011;47(1):R1-10.
131. Shackney SE, McCormack GW, Cuchural GJ, Jr. Growth rate patterns of solid tumors and their relation to responsiveness to therapy: an analytical review. *Annals of internal medicine*. 1978;89(1):107-21.
132. Ayre SG, Perez Garcia y Bellon D, Perez Garcia D, Jr. Insulin potentiation therapy: a new concept in the management of chronic degenerative disease. *Medical hypotheses*. 1986;20(2):199-210.
133. Germanas J, G. Pandya A. Alkylating agents. *Dermatologic Therapy*. 2002;15:317-24.
134. Information NCfB. Cyclophosphamide [updated 17.08.2019; cited 2019. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclophosphamide>
135. Kohn KW. Beyond DNA cross-linking: history and prospects of DNA-targeted cancer treatment--fifteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer research*. 1996;56(24):5533-46.
136. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nature reviews Clinical oncology*. 2009;6(11):638-47.
137. Hesketh PJ, Bohlke K, Lyman GH, Basch E, Chesney M, Clark-Snow RA, et al. Antiemetics: American Society of Clinical Oncology Focused Guideline Update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(4):381-6.
138. Basch E, Prestrud AA, Hesketh PJ, Kris MG, Feyer PC, Somerfield MR, et al. Antiemetics: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(31):4189-98.
139. Brock N, Pohl J. Arzneimittelentwicklung in der Onkologie. Status und Ausblick unter besonderer Berücksichtigung des Standortes Deutschland. *Arzneimittel-Forschung*. 2000;50(10):946-53.
140. Bruntsch U, Groos G, Hiller TA, Wandt H, Tigges FJ, Gallmeier WM. Phase-I study of mafosfamide-cyclohexylamine (ASTA-Z-7557, NSC 345 842) and limited phase-I data on mafosfamide-lysine. *Investigational new drugs*. 1985;3(3):293-6.
141. Brock N. Oxazaphosphorine cytostatics: past-present-future. Seventh Cain Memorial Award lecture. *Cancer research*. 1989;49(1):1-7.
142. Blaney SM, Boyett J, Friedman H, Gajjar A, Geyer R, Horowitz M, et al. Phase I clinical trial of mafosfamide in infants and children aged 3 years or younger with newly diagnosed embryonal tumors: a pediatric brain tumor consortium study (PBTC-001). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(3):525-31.

143. Ärzteblatt D. Mitosehemmer Vinorelbin: Wirksam und gut verträglich. Dtsch Arztebl International. 1996;93(9):555-.
144. Information NCfB. Vinorelbine, CID=5311497 [updated 17.08.2019; cited 2019. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vinorelbine>
145. Schwartz EL. Antivascular actions of microtubule-binding drugs. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(8):2594-601.
146. Kruczynski A, Poli M, Dossi R, Chazottes E, Berrichon G, Ricome C, et al. Anti-angiogenic, vascular-disrupting and anti-metastatic activities of vinflunine, the latest vinca alkaloid in clinical development. European journal of cancer (Oxford, England : 1990). 2006;42(16):2821-32.
147. Briasoulis E, Aravantinos G, Kouvatseas G, Pappas P, Biziota E, Sainis I, et al. Dose selection trial of metronomic oral vinorelbine monotherapy in patients with metastatic cancer: a hellenic cooperative oncology group clinical translational study. BMC cancer. 2013;13:263.
148. Briasoulis E, Pappas P, Puozzo C, Tolis C, Fountzilas G, Dafni U, et al. Dose-ranging study of metronomic oral vinorelbine in patients with advanced refractory cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15(20):6454-61.
149. De Iuliis F, Salerno G, Taglieri L, Lanza R, Scarpa S. On and off metronomic oral vinorelbine in elderly women with advanced breast cancer. Tumori. 2015;101(1):30-5.
150. ATCC. MCF10A (ATCC® CRL-10317) 2016 [Available from: https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-10317.aspx?geo_country=de#generalinformation.
151. Qu Y, Han B, Yu Y, Yao W, Bose S, Karlan BY, et al. Evaluation of MCF10A as a Reliable Model for Normal Human Mammary Epithelial Cells. PloS one. 2015;10(7):e0131285.
152. ATCC. MCF7 (ATCC® HTB-22™) 2016 [Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-22.aspx>
153. ATCC. T-47D (ATCC® HTB-133™) 2016 [Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-133.aspx>
154. ATCC. BT-549 (ATCC® HTB-122™) 2016 [Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-122.aspx#generalinformation>.
155. ATCC. MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™) 2016 [Available from: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-26.aspx>
156. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983;65(1-2):55-63.
157. Riss TL MR, Niles AL, et al. Cell Viability Assays: Sittampalam GS, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]; 2013 [updated 2016 Jul 1; cited 2019 11.08.2019]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.
158. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. The Journal of experimental medicine. 1995;182(5):1545-56.

159. Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, et al. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. *Pharmacological research*. 2000;42(4):373-81.
160. Abe K, Yoshida M, Usui T, Horinouchi S, Beppu T. Highly synchronous culture of fibroblasts from G2 block caused by staurosporine, a potent inhibitor of protein kinases. *Experimental cell research*. 1991;192(1):122-7.
161. Eid SY, El-Readi MZ, Wink M. Digitonin synergistically enhances the cytotoxicity of plant secondary metabolites in cancer cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(14):1307-14.
162. Corporation P. RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay. 2017.
163. Puck TT, Cieciura SJ, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine*. 1958;108(6):945-56.
164. van der Valk J, Bieback K, Buta C, Cochrane B, Dirks WG, Fu J, et al. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *Altex*. 2018;35(1):99-118.
165. Baker M. 1,500 scientists lift the lid on reproducibility. *Nature*. 2016;533(7604):452-4.
166. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79(2):315-28.
167. Aota S, Nomizu M, Yamada KM. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(40):24756-61.
168. Kojima T, Koide T, Nagata H, Inamura Y, Sano M, Ito N, et al. Effect of gelatins on human cancer cells in vitro. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2003;18(2):147-55.
169. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science*. 2010;123(Pt 24):4195-200.
170. Walker C, Mojares E, Del Rio Hernandez A. Role of Extracellular Matrix in Development and Cancer Progression. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(10).
171. Lu CC, Chu PY, Hsia SM, Wu CH, Tung YT, Yen GC. Insulin induction instigates cell proliferation and metastasis in human colorectal cancer cells. *International journal of oncology*. 2017;50(2):736-44.
172. Chen H, Zhang ZW, Guo Y, Wang Y, Liu Y, Luo N, et al. The proliferative role of insulin and the mechanism underlying this action in human breast cancer cell line MCF-7. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2012;17(4):658-62.
173. Wei ML, Duan P, Wang ZM, Ding M, Tu P. High glucose and high insulin conditions promote MCF7 cell proliferation and invasion by upregulating IRS1 and activating the Ras/Raf/ERK pathway. *Molecular medicine reports*. 2017;16(5):6690-6.
174. Bioscientia. Insulin (nüchtern) (Serum gefroren (S)) 2019 [cited 2019. Available from: https://www.bioscientia.de/diagnostik-app/de/labortests/insulin-nuechtern/?a=listing&leistung_nr=18732.
175. Berlin IL. Insulinresistenz (erweiterter oraler Glucosetoleranztest-oGTT) 2019 [cited 2019. Available from: https://www.imd-berlin.de/leistungsverzeichnis/parameter.html?tx_ajdiagnostics_analyse%5Banalyse%5D=150390&tx_ajdiagnostics_analyse%5Btitle%5D=Insulinresistenz%20%28erweiterter%20oraler%20Glucosetoleranztest%29&tx_ajdiagnostics_analyse%5Bsynonym

[%5D=Insulin%20Diabetes%20%20Funktionsteste%20LADA%20Prediabetes%20Metabolisches%20Syndrom&tx_ajdiagnostics_analyse%5Baction%5D=showmod&tx_ajdiagnostics_analyse%5Bcontroller%5D=Analyse&cHash=2d94222fc127730f6fb1247bda44cc2b.](#)

176. Lai A, Sarcevic B, Prall OW, Sutherland RL. Insulin/insulin-like growth factor-I and estrogen cooperate to stimulate cyclin E-Cdk2 activation and cell Cycle progression in MCF-7 breast cancer cells through differential regulation of cyclin E and p21(WAF1/Cip1). *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(28):25823-33.
177. Milazzo G, Giorgino F, Damante G, Sung C, Stampfer MR, Vigneri R, et al. Insulin receptor expression and function in human breast cancer cell lines. *Cancer research*. 1992;52(14):3924-30.
178. Davison Z, de Blacquiere GE, Westley BR, May FE. Insulin-like growth factor-dependent proliferation and survival of triple-negative breast cancer cells: implications for therapy. *Neoplasia (New York, NY)*. 2011;13(6):504-15.
179. Belfiore A, Costantino A, Frasca F, Pandini G, Mineo R, Vigneri P, et al. Overexpression of membrane glycoprotein PC-1 in MDA-MB231 breast cancer cells is associated with inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1996;10(11):1318-26.
180. Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends in cell biology*. 2001;11(11):437-41.
181. Mountjoy KG, Holdaway IM, Finlay GJ. Insulin receptor regulation in cultured human tumor cells. *Cancer research*. 1983;43(10):4537-42.
182. Muntoni S, Muntoni S, Draznin B. Effects of chronic hyperinsulinemia in insulin-resistant patients. *Current diabetes reports*. 2008;8(3):233-8.
183. Gupta K, Krishnaswamy G, Karnad A, Peiris AN. Insulin: a novel factor in carcinogenesis. *The American journal of the medical sciences*. 2002;323(3):140-5.
184. Draznin B. Mitogenic action of insulin: friend, foe or 'frenemy'? *Diabetologia*. 2010;53(2):229-33.
185. Leitner JW, Kline T, Carel K, Goalstone M, Draznin B. Hyperinsulinemia potentiates activation of p21Ras by growth factors. *Endocrinology*. 1997;138(5):2211-4.
186. Finlayson CA, Chappell J, Leitner JW, Goalstone ML, Garrity M, Nawaz S, et al. Enhanced insulin signaling via Shc in human breast cancer. *Metabolism: clinical and experimental*. 2003;52(12):1606-11.
187. Guillen C, Bartolome A, Nevado C, Benito M. Biphasic effect of insulin on beta cell apoptosis depending on glucose deprivation. *FEBS letters*. 2008;582(28):3855-60.
188. Porras A, Zuluaga S, Valladares A, Alvarez AM, Herrera B, Fabregat I, et al. Long-term treatment with insulin induces apoptosis in brown adipocytes: role of oxidative stress. *Endocrinology*. 2003;144(12):5390-401.
189. Calvaruso G, Vento R, Gerbino E, Lauricella M, Carabillo M, Main H, et al. Insulin and IGFs induce apoptosis in chick embryo retinas deprived of L-glutamine. *Cell death and differentiation*. 1997;4(3):209-15.
190. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(9):647-56.
191. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell death and differentiation*. 1999;6(2):99-104.
192. Janicke RU. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast cancer research and treatment*. 2009;117(1):219-21.

193. Yang XH, Sladek TL, Liu X, Butler BR, Froelich CJ, Thor AD. Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer research*. 2001;61(1):348-54.
194. Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*. 2002;21(57):8843-51.
195. Ayre SG, Garcia y Bellon DP, Garcia DP, Jr. Insulin, chemotherapy, and the mechanisms of malignancy: the design and the demise of cancer. *Medical hypotheses*. 2000;55(4):330-4.
196. Jiao SC, Huang J, Sun Y, Lu SX. [The effect of insulin on chemotherapeutic drug sensitivity in human esophageal and lung cancer cells]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2003;83(3):195-7.
197. Ayre SG, Perez Garcia y Bellon D, Perez Garcia D, Jr. Neoadjuvant low-dose chemotherapy with insulin in breast carcinomas. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1990;26(11-12):1262-3.
198. Cerrito MG, De Giorgi M, Pelizzoni D, Bonomo SM, Digiacomo N, Scagliotti A, et al. Metronomic combination of Vinorelbine and 5Fluorouracil is able to inhibit triple-negative breast cancer cells. Results from the proof-of-concept VICTOR-0 study. *Oncotarget*. 2018;9(44):27448-59.
199. Riesco-Martinez M, Parra K, Saluja R, Francia G, Emmenegger U. Resistance to metronomic chemotherapy and ways to overcome it. *Cancer letters*. 2017;400:311-8.
200. Derosa L, Galli L, Orlandi P, Fioravanti A, Di Desidero T, Fontana A, et al. Docetaxel plus oral metronomic cyclophosphamide: a phase II study with pharmacodynamic and pharmacogenetic analyses in castration-resistant prostate cancer patients. *Cancer*. 2014;120(24):3923-31.
201. Shaked Y, Emmenegger U, Francia G, Chen L, Lee CR, Man S, et al. Low-dose metronomic combined with intermittent bolus-dose cyclophosphamide is an effective long-term chemotherapy treatment strategy. *Cancer research*. 2005;65(16):7045-51.
202. Srivastava K, Hu J, Korn C, Savant S, Teichert M, Kapel SS, et al. Postsurgical adjuvant tumor therapy by combining anti-angiopoietin-2 and metronomic chemotherapy limits metastatic growth. *Cancer cell*. 2014;26(6):880-95.
203. Bottini A, Generali D, Brizzi MP, Fox SB, Bersiga A, Bonardi S, et al. Randomized phase II trial of letrozole and letrozole plus low-dose metronomic oral cyclophosphamide as primary systemic treatment in elderly breast cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(22):3623-8.
204. Takano S, Kamiyama H, Mashiko R, Osuka S, Ishikawa E, Matsumura A. Metronomic treatment of malignant glioma xenografts with irinotecan (CPT-11) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Journal of neuro-oncology*. 2010;99(2):177-85.
205. Penel N, Adenis A, Bocci G. Cyclophosphamide-based metronomic chemotherapy: after 10 years of experience, where do we stand and where are we going? *Critical reviews in oncology/hematology*. 2012;82(1):40-50.
206. Bocci G, Kerbel RS. Pharmacokinetics of metronomic chemotherapy: a neglected but crucial aspect. *Nature reviews Clinical oncology*. 2016;13(11):659-73.
207. Emmenegger U, Shaked Y, Man S, Bocci G, Spasojevic I, Francia G, et al. Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of chronic low-dose metronomic cyclophosphamide therapy in mice. *Molecular cancer therapeutics*. 2007;6(8):2280-9.

208. Chen CS, Doloff JC, Waxman DJ. Intermittent metronomic drug schedule is essential for activating antitumor innate immunity and tumor xenograft regression. *Neoplasia* (New York, NY). 2014;16(1):84-96.
209. Bazzola L, Foroni C, Andreis D, Zanoni V, M RC, Allevi G, et al. Combination of letrozole, metronomic cyclophosphamide and sorafenib is well-tolerated and shows activity in patients with primary breast cancer. *British journal of cancer*. 2015;112(1):52-60.
210. Stempak D, Gammon J, Halton J, Moghrabi A, Koren G, Baruchel S. A pilot pharmacokinetic and antiangiogenic biomarker study of celecoxib and low-dose metronomic vinblastine or cyclophosphamide in pediatric recurrent solid tumors. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2006;28(11):720-8.
211. Prasad VV, Gopalan RO. Continued use of MDA-MB-435, a melanoma cell line, as a model for human breast cancer, even in year, 2014. *NPJ breast cancer*. 2015;1:15002.
212. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of pathology*. 2005;205(2):275-92.
213. Heyn G. Orale Therapie mit Vinorelbin *Pharmazeutische Zeitung*; 2006 [updated 13.04.2006; cited 2019. Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-162006/orale-therapie-mit-vinorelbin/>.
214. Currie CJ, Poole CD, Gale EA. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(9):1766-77.
215. Hemkens LG, Grouven U, Bender R, Gunster C, Gutschmidt S, Selke GW, et al. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: a cohort study. *Diabetologia*. 2009;52(9):1732-44.
216. Gesundheit Bf. Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 2018 [updated 13.11.2018. Available from: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/diabetes.html>.
217. Bronsveld HK, Peeters P, de Groot MCH, de Boer A, Schmidt MK, De Bruin ML. Trends in breast cancer incidence among women with type-2 diabetes in British general practice. *Primary care diabetes*. 2017;11(4):373-82.
218. Rosenstock J, Fonseca V, McGill JB, Riddle M, Halle JP, Hramiak I, et al. Similar risk of malignancy with insulin glargine and neutral protamine Hagedorn (NPH) insulin in patients with type 2 diabetes: findings from a 5 year randomised, open-label study. *Diabetologia*. 2009;52(9):1971-3.
219. Goetsch L, Gonzalez A, Leger O, Beck A, Pauwels PJ, Haeuw JF, et al. A recombinant humanized anti-insulin-like growth factor receptor type I antibody (h7C10) enhances the antitumor activity of vinorelbine and anti-epidermal growth factor receptor therapy against human cancer xenografts. *International journal of cancer*. 2005;113(2):316-28.
220. Cardoso F, Costa A, Senkus E, Aapro M, André F, Barrios CH, et al. 3rd ESO-ESMO International Consensus Guidelines for Advanced Breast Cancer (ABC 3). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(1):16-33.
221. Hirata S, Matsubara T, Saura R, Tateishi H, Hirohata K. Inhibition of in vitro vascular endothelial cell proliferation and in vivo neovascularization by low-dose methotrexate. *Arthritis and rheumatism*. 1989;32(9):1065-73.
222. Banissi C, Ghiringhelli F, Chen L, Carpentier AF. Treg depletion with a low-dose metronomic temozolomide regimen in a rat glioma model. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2009;58(10):1627-34.

223. Andre N, Tsai K, Carre M, Pasquier E. Metronomic Chemotherapy: Direct Targeting of Cancer Cells after all? Trends in cancer. 2017;3(5):319-25.

8 Anhang

8.1 Werte zu den Abbildungen

Werte der Abbildung 5

MCF-10A	Zeit	Viabilität in %			Standardabweichung		
		Ohne Beschichtung	Fibronektin	Gelatine	Ohne Beschichtung	Fibronektin	Gelatine
A	24 h	100,00	98,74	67,24	3,83	5,08	11,16
	48 h	106,13	104,85	68,08	23,58	19,58	23,62
	72 h	63,37	74,73	42,84	2,58	18,26	11,70
B	24 h	100,00	98,26	70,07	10,36	7,01	23,35
	48 h	160,68	161,82	126,44	9,55	11,69	23,67
	72 h	138,13	149,07	127,01	4,57	10,62	18,21

Werte der Abbildung 6

MCF-7	Zeit	Viabilität in %			Standardabweichung		
		Ohne Beschichtung	Fibronektin	Gelatine	Ohne Beschichtung	Fibronektin	Gelatine
A	24 h	100,00	89,16	75,58	17,23	22,36	24,56
	48 h	72,31	75,58	62,01	9,69	29,69	38,65
	72 h	28,91	38,40	17,18	10,12	50,63	65,08
B	24 h	100,00	93,94	61,20	19,54	1,05	20,16
	48 h	142,94	140,98	89,76	25,08	28,17	36,62
	72 h	144,06	147,07	88,94	19,54	19,29	30,20

Werte der Abbildung 7

T-47D	Zeit	Viabilität in %			Standardabweichung		
		Ohne Beschichtung	Fibronectin	Gelatine	Ohne Beschichtung	Fibronectin	Gelatine
A	24 h	100,00	106,28	86,66	6,59	20,75	13,55
	48 h	47,82	59,94	63,39	18,18	4,71	29,12
	72 h	18,09	23,99	30,80	9,49	25,34	23,86
B	24 h	100,00	103,58	82,33	18,15	42,50	19,02
	48 h	141,32	152,03	107,34	8,99	17,50	20,25
	72 h	143,74	154,23	105,92	22,15	50,91	22,24

Werte der Abbildung 8

BT-549	Zeit	Viabilität in %			Standardabweichung		
		Ohne Beschichtung	Fibronectin	Gelatine	Ohne Beschichtung	Fibronectin	Gelatine
A	24 h	100,00	107,91	77,42	2,90	3,40	16,76
	48 h	71,58	77,12	65,33	28,75	25,28	15,71
	72 h	58,67	70,16	55,32	42,39	34,12	7,17
B	24 h	100,00	97,44	82,85	12,17	4,57	12,03
	48 h	146,08	159,41	123,32	19,05	26,78	4,63
	72 h	175,99	177,14	148,00	28,41	29,55	16,87

Werte der Abbildung 9

MDA-MB-231	Zeit	Viabilität in %			Standardabweichung		
		Ohne Beschichtung	Fibronectin	Gelatine	Ohne Beschichtung	Fibronectin	Gelatine
A	24 h	100,00	99,50	85,62	9,13	6,24	11,20
	48 h	101,09	93,37	78,17	19,37	16,67	20,64
	72 h	50,11	53,23	56,11	9,51	8,38	22,73
B	24 h	100,00	96,09	87,70	16,59	12,76	20,00
	48 h	127,52	136,39	114,57	13,89	8,31	9,20
	72 h	146,41	179,69	132,24	8,80	12,63	10,51

Werte der Abbildung 10 A

MCF-10A	Insulin in µg/ml	Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	27,71	
	0,01	116,83	25,81	0,0508
	0,1	127,38	45,39	0,0305
	1	114,27	13,97	0,0699
	10	114,63	23,16	0,0359
	20	112,60	26,14	0,2079
	50	118,63	20,86	0,1083

Werte der Abbildung 10 B

MCF-7	Insulin in µg/ml	Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	30,31	
	0,01	123,56	44,14	0,0164
	0,1	137,91	41,11	0,0017
	1	130,28	24,97	0,0162
	10	148,31	29,84	0,0001
	20	134,25	36,36	0,0891
	50	142,55	36,79	0,0066

Werte der Abbildung 10 C

T-47D	Insulin in µg/ml	Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	10,01	
	0,01	104,27	27,91	0,5711
	0,1	116,40	33,48	0,3353
	1	118,88	34,93	0,1708
	10	125,69	38,12	0,1052
	20	112,24	29,20	0,6822
	50	102,80	33,15	0,3482

Werte der Abbildung 10 D

BT-549	Insulin in µg/ml	Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	7,59	
	0,01	100,86	10,42	0,8019
	0,1	108,44	8,60	0,0205
	1	97,45	12,52	0,4645
	10	105,39	16,19	0,1965
	20	102,65	19,12	0,6005
	50	108,00	13,78	0,1144

Werte der Abbildung 10 E

MDA MB-231-	Insulin in µg/ml	Proliferation in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	11,74	
	0,01	79,32	19,01	0,0092
	0,1	93,13	15,23	0,2124
	1	95,32	24,18	0,5269
	10	98,21	19,37	0,8349
	20	96,00	21,03	0,5618
	50	86,88	11,94	0,0268

Werte der Abbildung 11 A

MCF-10A	Insulin in µg/ml	Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	6,60	
	0,01	108,54	12,23	0,0471
	0,1	114,70	12,33	0,0049
	1	112,06	10,93	0,0058
	10	113,28	13,92	0,0078
	20	108,24	17,76	0,1686
	50	84,74	15,72	0,0058

Werte der Abbildung 11 B

MCF-7	Insulin in µg/ml	Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	12,27	
	0,01	86,70	11,88	0,0348
	0,1	97,52	7,35	0,5156
	1	97,04	18,18	0,6093
	10	103,69	13,80	0,4460
	20	78,39	23,31	0,0124
	50	65,19	18,08	0,0002

Werte der Abbildung 11 C

T-47D	Insulin in µg/ml	Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	9,53	
	0,01	88,86	14,79	0,0412
	0,1	109,36	15,72	0,1048
	1	103,92	6,61	0,1956
	10	109,47	17,90	0,1618
	20	89,18	19,95	0,0864
	50	74,26	15,21	0,0003

Werte der Abbildung 11 D

BT-549	Insulin in µg/ml	Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	2,46	
	0,01	101,85	9,80	0,5836
	0,1	106,98	12,59	0,0798
	1	103,86	8,46	0,1830
	10	97,87	6,62	0,3196
	20	97,73	6,48	0,2819
	50	87,38	15,79	0,0149

Werte der Abbildung 11 E

MDA-MB-231	Insulin in µg/ml	Viabilität in %	Standardabweichung	p-Wert
	Kontrolle	100,00	7,74	
	0,01	108,53	10,87	0,0623
	0,1	107,41	10,96	0,0542
	1	111,84	10,56	0,0114
	10	106,48	11,91	0,1105
	20	96,32	14,43	0,4513
	50	82,61	19,76	0,0137

Werte der Abbildung 12 A

MCF-10A	Insulin in µg/ml	Apoptoserate in %	Standardabweichung
	Kontrolle	100,00	0,00
	0,01	88,11	21,77
	0,1	93,05	14,92
	1	84,52	18,47
	10	83,20	12,24
	20	92,50	6,59
	50	80,60	23,98

Werte der Abbildung 12 B

MCF-7	Insulin in µg/ml	Apoptoserate in %	Standardabweichung
	Kontrolle	100,00	0,00
	0,01	101,62	19,89
	0,1	108,01	32,28
	1	103,87	39,58
	10	118,43	27,81
	20	122,85	22,25
	50	114,01	32,21

Werte der Abbildung 12 C

T-47D	Insulin in µg/ml	Apoptoserate in %	Standardabweichung
	Kontrolle	100,00	0,00
	0,01	124,20	2,15
	0,1	134,42	2,64
	1	124,59	18,74
	10	148,55	17,13
	20	165,00	34,07
	50	142,01	4,00

Abbildung 12 D

BT-549	Insulin in µg/ml	Apoptoserate in %	Standardabweichung
	Kontrolle	100,00	0,00
	0,01	248,39	57,18
	0,1	259,01	109,10
	1	180,63	87,84
	10	243,90	79,39
	20	281,03	108,92
	50	167,45	58,60

Werte der Abbildung 12 E

MDA-MB-231	Insulin in µg/ml	Apoptoserate in %	Standardabweichung
	Kontrolle	100,00	0,00
	0,01	90,47	27,94
	0,1	101,50	16,01
	1	96,01	12,98
	10	100,33	0,11
	20	104,22	13,72
	50	88,66	9,20

Werte der Abbildung 13 A

MCF-10A	Viabilität in %			Standardabweichung		
	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle	100,00	111,53	102,84	9,08	17,14	13,14
0,15	99,73	104,24	100,96	19,53	12,04	11,38
0,29	102,67	104,28	104,31	21,45	14,85	13,33
0,59	99,83	97,20	101,38	14,89	11,42	10,78
1,19	97,86	94,26	97,68	18,90	14,61	11,42
2,33	87,89	86,00	87,17	24,09	20,24	16,74
4,78	76,14	77,29	72,13	28,74	26,05	23,43
9,55	54,88	55,23	55,17	26,21	20,34	18,13

MCF-10A	p-Werte				
	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle		0,0526	0,4333		
0,15	0,9579	0,1407	0,8306	0,2909	0,7035
0,29	0,6774	0,6638	0,6442	0,3226	0,8157
0,59	0,9705	0,1586	0,6338	0,0423	0,7789
1,19	0,6734	0,2387	0,9572	0,0307	0,3600
2,33	0,0624	0,6533	0,8614	0,0064	0,0431
4,78	0,0066	0,7443	0,3105	0,0020	0,0029
9,55	0,0000	0,8747	0,8840	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 13 B

MCF-7	Viabilität in %			Standardabweichung		
	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle	100,00	87,75	93,01	12,82	11,23	9,21
0,15	87,44	91,61	94,19	21,89	11,83	9,36
0,29	87,52	91,75	92,61	19,38	15,01	10,86
0,59	77,29	71,11	80,37	11,70	23,68	22,17
1,19	94,15	81,72	92,06	14,33	17,54	11,77
2,33	91,93	76,16	83,49	13,24	24,60	16,56
4,78	72,99	58,03	74,56	35,04	33,34	24,45
9,55	42,58	29,91	33,39	33,59	30,75	23,88

MCF-7	p-Werte				
	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle		0,1339	0,2096		
0,15	0,1840	0,4322	0,2407	0,3230	0,7605
0,29	0,1699	0,1444	0,3995	0,2885	0,9278
0,59	0,0011	0,6515	0,4664	0,0069	0,1381
1,19	0,3957	0,1453	0,6396	0,1124	0,8503
2,33	0,0981	0,3426	0,1286	0,0328	0,1320
4,78	0,0243	0,4716	0,8179	0,0008	0,0332
9,55	0,0002	0,7189	0,1371	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 13 C

T-47D	Viabilität in %			Standardabweichung		
	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle	100,00	96,93	97,15	13,61	15,60	20,92
0,15	87,36	100,59	97,48	21,41	24,21	15,55
0,29	86,84	89,39	99,13	19,01	23,60	22,12
0,59	76,35	68,33	83,04	14,26	16,84	18,29
1,19	85,29	70,60	85,51	22,36	23,62	28,04
2,33	68,15	55,99	75,92	21,45	19,91	26,72
4,78	37,24	24,60	40,37	20,19	13,72	21,83
9,55	4,14	2,43	5,68	5,19	5,89	8,31

T-47D	p-Werte				
	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle		0,4501	0,5803		
0,15	0,0616	0,0524	0,0621	0,5099	0,9525
0,29	0,0365	0,6705	0,0478	0,2537	0,7731
0,59	0,0001	0,0727	0,2771	0,0000	0,0709
1,19	0,0490	0,0019	0,9659	0,0004	0,1708
2,33	0,0003	0,0438	0,3202	0,0000	0,0116
4,78	0,0000	0,0081	0,5737	0,0000	0,0000
9,55	0,0000	0,2122	0,3830	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 13 D

BT-549	Viabilität in %			Standardabweichung			
	Mafosamid in µg/ml	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle		100,00	103,64	111,68	10,64	6,87	13,55
0,15		90,37	98,86	107,36	14,42	8,03	13,34
0,29		93,93	94,61	100,58	7,73	5,79	13,58
0,59		85,12	82,82	86,54	13,27	14,27	19,31
1,19		90,68	87,95	91,34	10,69	7,33	15,46
2,33		84,45	81,46	87,75	14,56	8,97	14,71
4,78		78,14	70,89	77,48	17,51	10,10	19,07
9,55		55,07	54,39	48,48	31,14	28,73	30,29

BT-549	p-Werte					
	Mafosamid in µg/ml	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle			0,1298	0,0450		
0,15		0,3502	0,0180	0,0904	0,9707	0,8459
0,29		0,3967	0,3386	0,0140	0,1591	0,8503
0,59		0,0303	0,2594	0,7222	0,0001	0,0003
1,19		0,2428	0,3432	0,2554	0,0004	0,0527
2,33		0,0067	0,3792	0,0692	0,0000	0,0000
4,78		0,0011	0,0034	0,8948	0,0000	0,0000
9,55		0,0000	0,9782	0,1250	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 13 E

MDA-MB-231 Mafosfamid in $\mu\text{g/ml}$	Viabilität in %			Standardabweichung		
	Ohne Insulin	0,01 $\mu\text{g/ml}$ Insulin	10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin	Ohne Insulin	0,01 $\mu\text{g/ml}$ Insulin	10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin
Kontrolle	100,00	100,55	92,69	17,24	13,96	18,08
0,15	91,27	97,04	92,28	21,48	18,63	24,76
0,29	91,49	93,95	97,04	23,90	21,45	20,71
0,59	66,50	61,01	65,27	23,45	19,73	19,05
1,19	93,85	90,60	90,14	17,49	21,30	27,11
2,33	92,25	88,96	86,03	18,60	18,03	23,88
4,78	86,85	82,97	73,44	13,44	23,92	27,27
9,55	49,73	45,14	28,67	17,40	13,45	17,61

MDA-MB-231 Mafosfamid in $\mu\text{g/ml}$	p-Werte				
	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 $\mu\text{g/ml}$ Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 $\mu\text{g/ml}$ Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 $\mu\text{g/ml}$
Kontrolle		0,9021	0,2157		
0,15	0,1904	0,2257	0,7935	0,5657	0,9296
0,29	0,2283	0,7125	0,1635	0,3508	0,4138
0,59	0,0002	0,3170	0,7981	0,0000	0,0000
1,19	0,3052	0,5011	0,5467	0,1279	0,6921
2,33	0,1820	0,5509	0,2852	0,0412	0,2733
4,78	0,0245	0,4614	0,0759	0,0189	0,0139
9,55	0,0000	0,2916	0,0029	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 14 A

MCF-10A Vinorelbin in ng/ml	Viabilität in %			Standardabweichung		
	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle	100,00	113,73	134,89	6,56	12,25	23,94
0,16	96,20	110,76	127,76	10,75	18,81	28,11
0,31	96,90	110,40	128,04	15,21	21,34	30,00
0,62	95,08	108,32	128,76	21,60	22,78	21,91
1,25	79,09	88,92	102,42	22,97	23,87	25,46
2,5	45,89	54,37	62,66	21,60	23,15	24,84
5	29,77	33,75	50,05	13,55	17,98	24,66
10	20,53	25,42	35,67	10,29	15,64	21,47

MCF-10A Vinorelbin in ng/ml	p-Werte				
	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle		0,0035	0,0006		
0,16	0,3247	0,0148	0,0012	0,3802	0,3205
0,31	0,5182	0,0256	0,0039	0,4274	0,3231
0,62	0,4690	0,0006	0,0003	0,2096	0,3612
1,25	0,0106	0,1559	0,0090	0,0007	0,0013
2,5	0,0000	0,0607	0,0079	0,0000	0,0000
5	0,0000	0,0851	0,0005	0,0000	0,0000
10	0,0000	0,0556	0,0031	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 14 B

MCF-7	Viabilität in %			Standardabweichung			
	Vinorelbin in ng/ml	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle		100,00	96,15	113,57	8,06	9,75	19,01
0,16		91,30	99,28	122,60	16,62	19,54	35,20
0,31		95,10	100,60	124,76	22,48	25,48	35,67
0,62		83,79	87,36	111,61	18,92	19,55	31,28
1,25		65,48	64,06	88,46	14,40	15,30	23,79
2,5		40,22	37,65	52,95	10,09	8,53	17,59
5		27,70	27,01	40,63	13,34	11,16	23,36
10		26,42	26,18	38,17	13,14	11,81	19,69

MCF-7	p-Werte					
	Vinorelbin in ng/ml	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle			0,2879	0,0454		
0,16		0,1366	0,0520	0,0018	0,4053	0,1928
0,31		0,4872	0,1139	0,0001	0,4208	0,1351
0,62		0,0140	0,2633	0,0007	0,0609	0,7399
1,25		0,0000	0,6797	0,0023	0,0000	0,0006
2,5		0,0000	0,0831	0,0004	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,6156	0,0056	0,0000	0,0000
10		0,0000	0,8358	0,0006	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 14 C

T-47D Vinorelbin in ng/ml	Viabilität in %			Standardabweichung		
	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle	100,00	101,49	116,95	10,64	7,21	19,65
0,16	96,92	99,55	111,99	14,63	4,86	14,12
0,31	89,69	103,29	111,92	17,01	7,21	10,69
0,62	89,05	96,04	116,45	18,36	7,53	18,08
1,25	82,53	92,82	102,61	10,92	13,16	18,84
2,5	59,89	62,81	73,04	10,02	13,60	11,24
5	43,50	44,82	50,92	8,96	9,76	10,71
10	44,67	42,17	43,30	5,11	5,64	8,33

T-47D Vinorelbin in ng/ml	p-Werte				
	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle		0,7092	0,0082		
0,16	0,4035	0,5964	0,0088	0,2719	0,2419
0,31	0,0388	0,0242	0,0002	0,4246	0,2361
0,62	0,0067	0,1865	0,0047	0,0774	0,8834
1,25	0,0000	0,0019	0,0025	0,0141	0,0256
2,5	0,0000	0,3610	0,0006	0,0000	0,0000
5	0,0000	0,3881	0,0206	0,0000	0,0000
10	0,0000	0,0964	0,5809	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 14 D

BT-549	Viabilität in %			Standardabweichung			
	Vinorelbin in ng/ml	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle		100,00	88,99	100,04	8,70	12,06	8,51
0,16		85,77	83,59	87,68	8,45	13,45	20,14
0,31		73,90	76,77	82,07	9,91	17,85	17,71
0,62		65,10	63,88	73,88	9,97	12,18	18,13
1,25		50,05	46,79	53,22	4,73	11,66	11,00
2,5		35,84	34,60	39,08	4,97	8,41	10,18
5		26,43	24,52	27,97	5,81	5,95	8,71
10		19,25	16,74	18,54	3,81	4,74	7,41

BT-549	p-Werte					
	Vinorelbin in ng/ml	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle			0,0139	0,9925		
0,16		0,0035	0,5941	0,7520	0,2786	0,0214
0,31		0,0000	0,5094	0,0893	0,0464	0,0004
0,62		0,0000	0,7466	0,1199	0,0002	0,0000
1,25		0,0000	0,3941	0,3905	0,0000	0,0000
2,5		0,0000	0,6450	0,3348	0,0000	0,0000
5		0,0000	0,0949	0,3803	0,0000	0,0000
10		0,0000	0,0960	0,6615	0,0000	0,0000

Werte der Abbildung 14 E

MDA-MB-231						
Vinorelbin in ng/ml	Viabilität in %			Standardabweichung		
	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin	Ohne Insulin	0,01 µg/ml Insulin	10 µg/ml Insulin
Kontrolle	100,00	108,57	102,12	5,92	6,66	11,70
0,16	94,69	99,69	97,78	10,21	10,55	12,13
0,31	84,56	98,03	96,21	15,84	9,47	8,65
0,62	80,47	85,81	85,02	8,68	8,62	11,29
1,25	62,08	66,64	68,19	11,68	10,79	13,32
2,5	46,17	45,40	52,71	7,36	9,51	10,24
5	34,78	37,25	36,66	7,89	4,74	6,64
10	32,31	31,44	32,29	3,22	6,45	6,04

MDA-MB-231					
Vinorelbin in ng/ml	p-Werte				
	Ohne Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu unbehandelter Kontrolle	0,01 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 0,01 µg/ml	10 µg/ml Insulin im Vgl. zu Kontrolle mit 10 µg/ml
Kontrolle		0,0041	0,5186		
0,16	0,0824	0,2634	0,4370	0,0201	0,2617
0,31	0,0104	0,0040	0,0282	0,0006	0,0503
0,62	0,0001	0,1616	0,3097	0,0000	0,0026
1,25	0,0000	0,3678	0,1773	0,0000	0,0001
2,5	0,0000	0,7487	0,0199	0,0000	0,0000
5	0,0000	0,4186	0,4126	0,0000	0,0000
10	0,0000	0,6725	0,9918	0,0000	0,0000

9 Danksagung

Aus der elektronischen Version entfernt

10 Lebenslauf

Aus der elektronischen Version entfernt

Aus der elektronischen Version entfernt