

60. Tagung der Vereinigung Bayerischer Chirurgen

Zytostatika-Wirkung

Ein neuartiges Verfahren zur Beurteilung der Wirkung auf menschliche Tumorzellen

Tumorzellen sprechen individuell auf Zytostatika an. Das birgt die Gefahr einer nutzlosen und durch ihre Nebenwirkungen sogar schädlichen Therapie. Deshalb wird versucht, bereits vor Behandlung durch *in vitro*-Tests ungeeignete Medikamente auszuschließen. Inkorporationsstudien mit radioaktiv markierten DNS-Vorläufern (2, 6) sind jedoch nicht frei von biologisch-methodischen Problemen (4) und Tumorstammzell-Klonierungsverfahren (3, 7) gekennzeichnet durch begrenzte Anwendbarkeit und großen Arbeitsaufwand.

Wir haben deshalb einen andersartigen Test entwickelt: Prinzip ist die Inkubation von Tumorzellen mit Zytostatika in der Gewebekultur unter patientennahen Bedingungen und die anschließende Messung der Effekte mit der Durchflußzytometrie.

Methodik. Frisches, steriles Tumormaterial wird mechanisch zu Einzelsuspensionen verarbeitet, in autologem Serum auf Mikrotiterplatten aufgeteilt und mit oder ohne Zusatz von Zytostatikum 7 Tage (37° C, 5% CO₂) im Brutschrank kultiviert. An jedem Tumor werden so 9 Zytostatika ausgetestet (jeweils mit dem 10fachen der üblichen therapeutischen Serumkonzentration, gemäß dem Ziel, Resistenzen eindeutig abzuklären) und mit den unbehandelten Kontrollen verglichen. Zur Messung werden die Zellen aus den Kulturen entnommen und mit dem Fluoreszenzfarbstoff ADB (1,4-Diacetoxy 2,3 - Dicyanobenzol) und PJ (Propidium-Jodid) gefärbt. ADB markiert die lebenden Zellen, deren Esterase-Aktivität und das intrazelluläre pH (5); PJ färbt die toten Zellen und deren DNS. Jeder einzelnen Probe wird als Standort für Zellkonzentration und Fluoreszenz eine einheitliche Menge gefärbter, monodisperser 6µ-Eichpartikel zugemischt. Im Fluvo-Metricell-Durchflußzytometer werden anschließend von allen Zellen und Partikeln simultan das Volumen, der pH-Wert, die Esterase-Aktivität sowie der DNS-Gehalt gemessen. Nach automatischer Computerauswertung folgt der Ausdruck aller Ergebnisse.

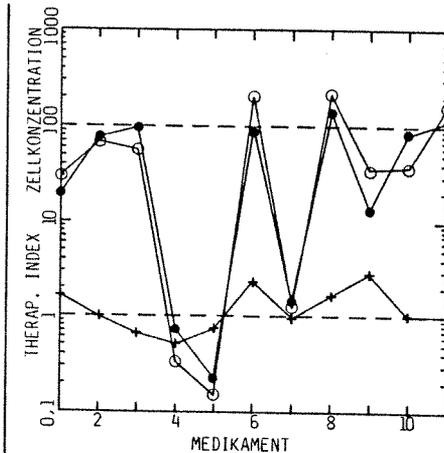


Abb. 1: Resistenzdiagramm: Lymphknotenmetastase Mamma-Karzinom
Auf der Abszisse sind mit Nr. 1 bis 9 die Zytostatika-inkubierten Zellkulturen (1 = Adriblastin, 2 = Endoxan, 3 = Cisplatin, 4 = Methotrexat, 5 = Fluor Uracil, 6 = Velbe, 7 = Dactinomycin, 8 = Vincristin, 9 = Aclacinomycin) gekennzeichnet, mit Nr. 10 und 11 die unbehandelten Kontrollen. Auf der Ordinate sind die zugehörigen gemessenen Zellkonzentrationen sowie der aus dem Quotienten von überlebenden Entzündungszellen zu Tumorzellen gebildete therapeutische Index angegeben (logarithmische Skala, standardisiert auf 100% Zellkonzentration bzw. Index 1 der unbehandelten Kontrollen). ○ = Entzündungszellen, ● = Tumorzellen, + = therap. Index.

Ergebnisse. Die Basisauswertung sind Histogramme mit Darstellung und Abgrenzung der verschiedenen Zellarten und Partikeln nach Volumen und Esterase-Aktivität. Die Zahl der in einer Kultur lebenden bzw. überlebenden Tumorzellen oder Entzündungszellen wird aus ihrem Verhältnis zur standardisierten Eichpartikelzahl berechnet. Die Ergebnisse der verschiedenen Zytostatika und der unbehandelten Kontrollen werden in einem *Resistenzdiagramm* zusammengefaßt (Beispiel: siehe Abb. 1). Auf der Abszisse sind die einzelnen Medikamente und die

Kontrollen, auf der Ordinate die jeweilige Zahl der Tumorzellen bzw. Entzündungszellen, bezogen auf 100% der Kontrollen, angetragen. So findet sich z. B. bei der Lymphknotenmetastase eines Mamma-Karzinoms (Abb. 1) eine Reduktion der Tumorzellen zwischen 80% und 99% bei den Zytostatika 1, 4, 5, 7 und 9; gegenüber den Medikamenten 2, 3, 6 und 8 erweisen sich die Tumorzellen als resistent.

Die gesondert erfaßte Wirkung auf die Entzündungszellen gibt Hinweise auf hier weniger schädigende Medikamente. Das Verhältnis von verbliebenen Entzündungszellen zu Tumorzellen nach Zytostatika-Inkubation wird als *therapeutischer Index* bezeichnet und ebenfalls im Resistenzdiagramm dargestellt. Zur vergleichenden mikroskopischen Beurteilung werden von allen Proben zytologische Präparate angefertigt.

Über die Globalinformation „Überleben oder Abtötung von Tumorzellen“ hinaus werden mit dem Test *weitere wesentliche morphologische und Stoffwechselfparameter* eines Tumors gemessen wie Tumorzell-Volumenverteilung, Verhältnis von lebenden zu toten Zellen, intrazelluläres pH, Esterase-Aktivität, DNS-Verteilung und Ploidie. Für jeden dieser Parameter lassen sich die Effekte der einzelnen Zytostatika sowie die Befunde der unbehandelten Kontrollen in einem *Übersichtsdiagramm* ausdrücken.

Das hier vorgestellte Testverfahren zeichnet sich noch durch eine sehr hohe Anwendbarkeitsrate aus. Bislang konnten selbst bei soliden Tumoren alle Messungen verwertet werden. Als Vorzug erweist sich die Möglichkeit, wie schon die Auswertung in Zukunft auch den gesamten Meßvorgang voll zu *automatisieren*. Die Vergleiche von Testergebnis und klinischem Verlauf ergaben gute Übereinstimmungen von *In vitro*- und *In vivo*-Resistenz.

(Autorreferat R. Wirsching, L. Rüssmann, J. Koller, Chir. Univ.-Klinik der Universität München, G. Valet, Arbeitsgruppe Krebszellforschung am MPI f. Biochemie, Martinsried b. München)