

Wt

Archives of Supplement 1985/II Oto-Rhino-Laryngology

Verhandlungsbericht 1985 der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie **Teil II: Sitzungsbericht**

Schriftleitung H. Rudert
Herausgeber E. Kastenbauer



Springer-Verlag
Berlin Heidelberg New York Tokyo

*56. Jahresversammlung der
Deutschen Gesellschaft für
Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde,
Kopf- und Hals-Chirurgie
29. - 23. 5. 1985, Berlin*

eine solche Untersuchung angestrebt und ebenso wie die regelmäßige Röntgenkontrolle des Thorax als Routineuntersuchung eingeführt werden.

Literatur beim Verfasser

96. T. P. U. Wustrow, A. Raffael, G. Valet (München): Mehrparametrische Flow-cytometrie zur prätherapeutischen Testung von Cytostatika

Inoperable Karzinome im Kopf-Halsbereich werden, soweit möglich, einer Chemotherapie zugeführt. Sollte noch eine Bestrahlung möglich sein, werden diese Patienten entweder vor der Bestrahlung mit Cytostatika oder, wie seit kurzem in unserem Klinikum, simultan mit Strahlen und Chemotherapeutika behandelt. Nachdem klinisch einige Plattenepithelkarzinome relativ gut auf Cytostatika ansprechen, während histologisch identische Geschwülste keine Größenabnahme zeigen, wäre es wünschenswert, prätherapeutisch die Sensitivität und Resistenz der Tumorzellen auszutesten. Dies ist umso wichtiger, da wirkungslose Cytostatika in den empirisch gewonnenen Therapieschemata, die starr für jeden Patienten angewendet werden, zu einem schnelleren Tumorwachstum und zu einer erhöhten Metastasierung führen können (Schmähl 1963; Limburg et al. 1964).

Die Vorhersage der chemotherapeutischen Wirkung mit der Autoradiographie dauert für die Klinik zu lange und die Einbaurate von Nukleinsäurevorstufen wie H^3 -Thymidin ist für solide Tumoren zu unspezifisch. Die Xenotransplantation von Tumorzellen in nackte Mäuse hat viele Nachteile, da beispielsweise nur 20–36% der Tumorzellen angehen, da eine Selektion aneuploider Zellklone mit einer veränderten Zellkinetik auftritt, da die Tierhaltung teuer und zeitaufwendig ist, da die Tumorstärke schlecht quantifizierbar ist, da die Angehraten je nach Alter, Rasse und Gesundheit der Tiere variieren und da exogen eine Differenzierung der Prä-T-Zellen zu reifen T-Zellen verursacht werden kann (Tabelle 1).

Die Ergebnisse mit der Klonierung von Tumorzellen in weichem Agar sind enttäuschend, da die Zellen untereinander Desmosomen ausbilden, so daß die Abstammung einer Kolonie von einer einzigen Zelle fraglich ist, da nur Stamm-

Tabelle 1. Xenotransplantation in nackte Mäuse

-
- Nur 20–36% etablierte Tumorlinien
(Fogh et al. 1980; Lindenberger et al. 1983; Wennerberg et al. 1983; Braakhuis et al. 1984)
 - Selektion aneuploider Zellklone
(Tropé et al. 1975, 1978; Biörklund et al. 1980; Videlöv et al. 1982)
 - Veränderte Zellkinetik
(Litterst et al. 1978; Wennerberg et al. 1983)
 - Teuer, zeitaufwendig
 - Schlechte Quantifizierbarkeit
 - Verschiedene Tumorstärken je nach Alter, Rasse oder bei Infektionen
 - Differenzierung zu reifen T-Zellen
(Raff 1973; Scheid et al. 1973, 1975; Blankwater et al. 1978; Ishikawa et al. 1980)
-

Tabelle 2. Klonieobildung im weichen Agar

-
- Die Desmosomenbildung stellt die Entstehung einer Kolonie aus einer Zelle in Frage (Johns et al. 1982; Wustrow et al. 1984)
 - Nur ein kleiner Anteil des Tumors bildet Kolonien
 - Kein Vergleich mit nicht malignen Zellen
 - Zeitaufwendiges Zählen
 - Niedrige Kolonierbarkeit (0,001%) (Kapilläre Methode 0,014%)
 - Nur Kurzzeitinkubation, da nach Langzeitinkubation noch geringere Kolonierbarkeit
 - Nur 36% kultivierbar
-

zellen gezüchtet werden, da kein Vergleich mit nichtmalignen Zellen möglich ist, da die Klonierbarkeit auch mit der kapillären Methode sehr niedrig ist, da nur Kurzzeitinkubationen möglich sind und da insgesamt nur 36% der Kopf-Halstumoren kultivierbar sind (Tabelle 2).

Wir benützen das Fluvo-Metricell-Durchflußcytometer, bestehend aus einer Kammer, einem Mikroskop und dem Computerteil. Das Volumen jeder einzelnen Zelle wird in der Meßöffnung gemessen. Gleichzeitig wird die Fluoreszenz der Zellen von einer Hochdruck-Quecksilberdampflampe angeregt. Das optische System besteht aus 2 Photoröhren, die das Licht zwischen 418 und 440 nm, bzw. 500 und 700 nm registrieren. Das emittierte Licht wird über separate dichrotische Filter getrennt.

Der Farbstoff ADB wird nur von vitalen Zellen aufgenommen und von Esterasen, die in jeder Zelle vorhanden sind, zur fluoreszierenden Substanz DCH abgebaut. Die Fluoreszenzintensität ist somit proportional der Esteraseaktivität. Zusätzlich verändert DCH proportional zum intrazellulären pH sein Spektrum von blau nach grün. Auf diese Weise wird auch der intrazelluläre pH bestimmt. Gleichzeitig wurden die Kerne der toten Zellen mit Propidiumjodid entsprechend dem DNS-Gehalt rot angefärbt.

In einem 3-dimensionalen Häufigkeitshistogramm von Esteraseaktivität, Volumen und DNS-Gehalt ist die Verteilung am Beispiel der Zungenkarzinomzelllinie SCC-25 von Dr. Rheinwald in Boston/USA (1981) aufgezeichnet. Insgesamt wurden 15 500 Zellen gemessen. Jede Konturlinie entspricht dem Histogrammkanal, der 70% der gemessenen Signale für alle 3 Parameter enthält. Die Tumorzellen erscheinen als eine Wolke mit hoher Esteraseaktivität, großem Volumen und hohem DNS-Gehalt. Als internen Standard benützten wir gefärbte Latexpartikel mit definierter Größe, die sich mit kleinem Volumen und geringer Fluoreszenz abbilden. Nach einer Inkubation von 4 Tagen mit Aclacinomycin A (16 µg/ml) waren nahezu alle Tumorzellen verschwunden und die Zahl der toten Zellen war signifikant angestiegen.

Die Projektion der gemessenen Werte auf ein Diagramm von Esteraseaktivität und Volumen erlaubt die Unterscheidung von 4 Kompartimenten. Die Konturlinien spiegeln die logarithmische Häufigkeit in jedem Histogrammkanal wieder: Im ersten Kompartiment mit niedriger Fluoreszenz und kleinem Volumen fanden sich die Eichpartikel. Es konnten 2 weitere Kompartimente mit großem Volumen und niedriger bzw. hoher Esteraseaktivität und ein nahezu leerer Bereich dazwischen abgegrenzt werden. Nach Behandlung der Zellen mit Aclacinomycin A für 4 Tage waren nahezu alle Zellen aus dem Kompartiment mit großem Volumen und hoher Esteraseaktivität verschwunden. Wie in Cytozentrifugationspräparaten und mit Hilfe der Trypanblaufärbung gezeigt werden konnte, fanden sich im Kompartiment mit großem Volumen und niedriger Esteraseaktivität nur noch tote Zellen und Zellbruchstücke.

In 2-Parameterprojektionen konnte jede Zelllinie, wie am Beispiel der Zungenkarzinomlinie SCC-25 gezeigt, analysiert werden. Hervorzuheben ist, daß das Volumen der Tumorzellen sehr groß und die Esteraseaktivität im Vergleich zu Leukocyten, die bei 100 Einheiten liegen, sehr hoch ist. Jede Plattenepithelkarzinomlinie wie beispielsweise die Zungenkarzinomlinie SCC-15 (Rheinwald et al. 1981), die Hypopharynxlinie FaDu (Ragan 1972) und die Parotisplattenepithelkarzinomlinie HPac 79 (Zenner et al. 1983) zeigten ein ihr eigenes Reaktionsprofil. Die Dosis der Medikamente war die 10fache, die in der Klinik benützt wird. Die klinische Anwendung der Methodik kann an einer Biopsie von einem Plattenepithelkarzinom des Zungengrundes demonstriert werden. Herauszustellen ist, daß das Kompartiment, welches in den Zelllinienversuchen leer blieb, mit Entzündungszellen gefüllt war, wie in Cytozentrifugationspräparaten gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend erlaubt die mehrparametrische Durchflußcytometrie die schnelle Bestimmung der Wirkung von verschiedenen Cytostatika. Zusätzlich kann erstmalig die Reaktion von Tumorzellen mit der von normalen Entzündungszellen verglichen werden, da Tumorzellen große Volumina haben, einen erhöhten Stoffwechsel, repräsentiert durch eine erhöhte Esteraseaktivität, aufweisen und meistens aneuploid sind. Für jeden Tumor kann die individuelle Chemosensitivität in der humoralen und zellulären Zusammensetzung des Originaltumors untersucht werden. Diese Technik könnte in der Zukunft zusätzlich dazu beitragen, das unterschiedliche biologische Verhalten der individuellen Tumorzellen frühzeitig zu erkennen.

Literatur beim Verfasser

H. Bier (Düsseldorf): 1. Zunächst kann ihre Bewertung bisheriger Anti-Onkogramm-Modelle nicht unwidersprochen bleiben. Insbesondere die von ihnen zitierten Angehrten bei der Zellklonierung auf Platten erscheint mir zu niedrig, wobei ich auch die Ergebnisse von Prof. van Hoff, St. Antonio, vermisse, der zweifellos die größte Erfahrung mit diesem Modell hat und deutlich bessere Ergebnisse vorweisen kann.

2. Weiterhin wäre zu bemerken, daß die vorgestellte Methode der Flowcytometrie in Verwendung als Anti-Onkogramm von dem Max-Planck-Institut in München entwickelt wurde und im Handel frei erhältlich ist.

3. Der prinzipielle Nachteil der bisherigen Anti-Onkogramme, nämlich der weitgehende Ausschluß immunologischer Parameter im Rahmen der Austestung scheint mir auch in dem vorgestellten Modell nicht ausgeräumt. Diesem Punkt kommt insofern Bedeutung zu, da z. B. bei der Auswertung von Anti-Biogrammen in Abhängigkeit von dem immunologischen Milieu des Ansatzes deutliche Diskrepanzen entstehen.

H. P. Zenner (Würzburg): Wie kann die Durchflußzytometrie bei einer Probeexzision, welche aus Tumorzellen und ähnlich groß-gesunden Schwesterepithelzellen besteht, diese unterscheiden?

T. Wustrow (München); Schlußwort:

Zu Herrn Bier: Gerade unsere Methode eignet sich zur Integration der immunologischen Vorgänge, da wir die Tumorzellen zusammen mit den im Tumor vorhandenen Lymphozyten für vier Tage inkubieren. Zusätzlich werden die Zellen im autologen Serum kultiviert. Ebenso werden Zellen der angrenzenden Schleimhaut und deren Lymphozyten vor Kulturbeginn gemessen und die Daten mit denen von Tumorzellen im zytostatischen Ansatz verglichen.

Zu Herrn Zenner: Normale Epithelien haben einen geringeren Stoffwechselumsatz, so daß sie eine niedrigere DCH-Fluoreszenz zeigen und so von den malignen Tumorzellen mit hoher Esteraseaktivität und großem Volumen unterschieden werden können.