

Aktuelle Onkologie 16

Reihenherausgeber

G. A. Nagel, Göttingen; R. Sauer, Erlangen; H.W. Schreiber, Hamburg

Listed in *Current Contents*



W. Zuckschwerdt Verlag München · Bern · Wien

Prätherapeutische Tumortestung

Symposium der Arbeitsgemeinschaft
für Gynäkologische Onkologie (AGO)
der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe
und der Deutschen Krebsgesellschaft e.V.

Bremen, Juni 1984

Bandherausgeber:

W. Jonat, M. Kaufmann, F. Kubli, H. Maass

Mit 114 Abbildungen und 118 Tabellen

1985



W. Zuckschwerdt Verlag München · Bern · Wien

Durchflußzytometrische Zytostatikatestung an Patientenzellen gynäkologischer Tumoren

H.H. Warnecke, H. Kahle und G. Valet**

I. Frauenklinik der Universität München

*Arbeitsgruppe Krebszellforschung, Max-Planck-Institut für Biochemie,
Martinsried

Die Durchflußzytometrie verbindet die Möglichkeiten der Biochemie mit der Einzelzellbeobachtung des Mikroskops. Dadurch ergeben sich wesentliche neue Möglichkeiten, komplexe Zellsysteme, wie sie in Tumoren vorkommen, direkt auf ihre Reaktionen gegenüber Zytostatika zu untersuchen. Die Nachteile der nicht zufriedenstellenden Charakterisierbarkeit der DNS-synthetisierenden Zellen im Kurzzeitansatz (1-3), die methodischen Schwierigkeiten der Angeherten und der Empfindlichkeitsprüfung beim Zellkolonieansatz (4-7) oder im Tiermodell (8-10) werden vermieden. Die Gesamtinformation, die sich aus der durchflußzytometrischen Messung biochemischer Zelleigenschaften ergibt, ist deutlich größer als bei den anderen gegenwärtig angewandten Ansätzen.

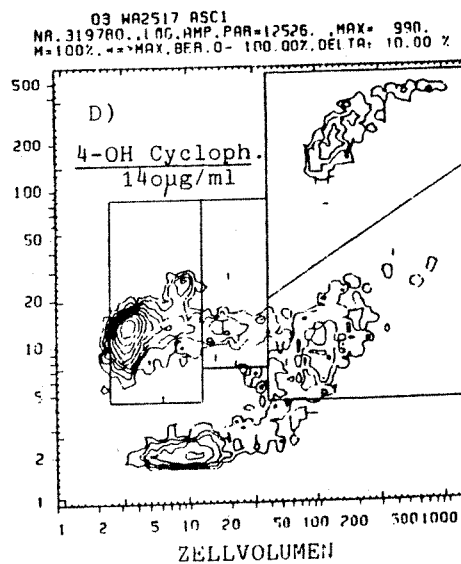
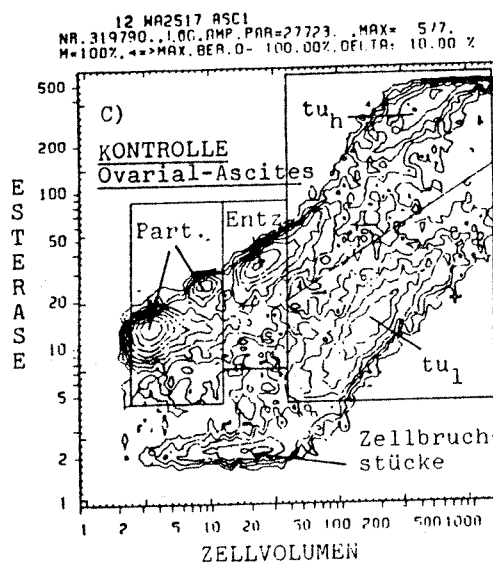
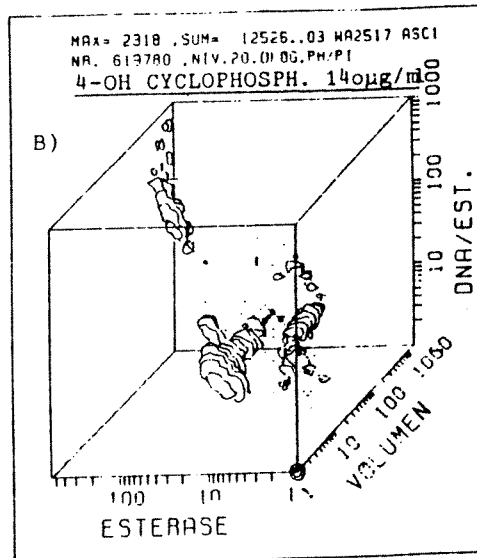
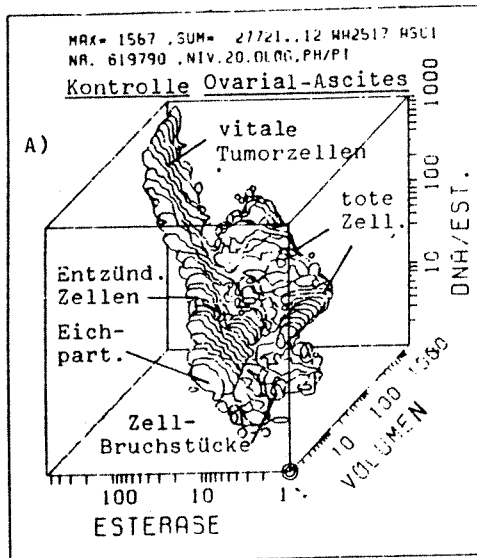
Im Kurzzeit-Assay wird eine Stoffwechselaktivität aller Zellen gemessen, im Kolonieansatz die Vermehrung der klonogenen Zellen, die eine wichtige, aber nur kleine Minderheit aller Tumorzellen darstellen, während im durchflußzytometrischen Test die Gesamtzahl der lebenden Tumorzellen als Maß für die Tumoralast des Patienten mit hoher Geschwindigkeit (ca. 1000 Zellen/sec) bestimmt wird (11). Die Herabsetzung der Tumoralast ist ja das Hauptziel der klinischen Behandlung. Mit der durchflußzytometrischen Messung kann erstmals zwischen der erwünschten Zytostatikawirkung auf die Tumorzellen und der unerwünschten Wirkung auf die Entzündungszellen (hauptsächlich Lymphozyten) unterschieden werden. Dies könnte in Zukunft vielleicht eine Vorhersage leukopenischer Reaktionen ermöglichen. Da der durchflußzytometrische Test keine Koloniebildung verlangt, genügt die Tumorerkleinerung mit einem elektrischen Gewebehacker, gefolgt von der Kultur unter möglichst körpernen Bedingungen in des Patienten eigenem 1/2 verdünntem Serum bei 37°C in Mikrotiterplatten in Luft mit 5%CO₂ oder unter reduzierten Sauerstoffbedingungen. Die Zytostatika sind während der gesamten Inkubationszeit, die einen Tag (Stoßtherapie) oder sieben Tage (protrahierte Therapie) beträgt, vorhanden. Aszites und Pleuraergüsse werden wie angeliefert kultiviert. Antimikrobielle Substanzen werden nur bei unsterilen Proben zugesetzt. Da der Test nicht von Zellwachstum oder Koloniebildung abhängig ist, kann er praktisch in allen Fällen durchgeführt werden. So können selbst schwierig zu bearbeitende

Tumoren, wie gastrointestinale Malignome, gut untersucht werden. Der Ansatz ist nicht auf Zytostatikamonotherapie begrenzt. Es können ebenso gut auch Bestrahlung, Antihormone oder Kombinationstherapien geprüft werden. Außerdem werden nur verhältnismäßig wenige Zellen benötigt. 5×10^6 lebende Zellen reichen für die Testung von zehn Zytostatika einschließlich der Kontrollen und der Ausgangsmessung, was erheblich weniger Materialbedarf entspricht als bei anderen Tests (Zangenbiopsie reicht häufig).

Zur Messung werden die Zellen mechanisch geerntet, gewaschen und ebenso, wie ursprünglich die Ausgangszellen des Ansatzes spezifisch fluoreszenzgefärbt. Die Färbung erfolgt mit ADB (1,4-Diacetoxy-2,3-Dicyanobenzol (12)) zur Bestimmung der intrazellulären Esteraseaktivität und des pH-Wertes der lebenden Zellen (ADB hat ein pH-abhängiges Maximum der Fluoreszenzemission). Die DNS der toten Zellen wird gleichzeitig durch Propidium-Iodid (PI) gefärbt (PI dringt nur in tote Zellen ein). Als interner Standard für die Konzentration, das Volumen und die Fluoreszenz der Zellen dienen dem Ansatz zugefügte monodisperse Latexpartikel. Das Volumen sowie die Blau- und Grünfluoreszenz jeder Zelle werden sodann in einem Fluvometricell Durchflußzytometer (13) gemessen.

Die Auswertung der Ansätze geschieht automatisch mit einem Computer (11) (Abbildung 1) oder neuerdings auch mit dem Cytomic Mikroprozessor-Datenaufnahme- und Auswertesystem (14). Sie liefert das Onkobiogramm für den Kliniker (Abbildung 2). Neben der Anzahl der überlebenden Tumor- und Entzündungszellen wird der Quotient Entzündungszellen/Tumorzellen jedes Ansatzes ausgerechnet. Je höher er ist, umso mehr Entzündungszellen haben unter der Zytostatikawirkung überlebt. Die Empfehlung an den Kliniker sind Medikamente mit hoher Tumorzellreduktion und hohem Quotienten. Neuerdings werden die Tests bei drei Zytostatikakonzentrationen (0,1-, 1- und 10mal maximaler Serumspiegel) durchgeführt (Abbildung 3). Die methodische Reproduzierbarkeit sowohl bei Parallelkultur mehrerer Ansätze, wie auch bei wiederholter Abnahme (Aszites oder Pleuraergüsse) beim selben Patienten ist gut. Der Variationskoeffizient (Standardabweichung/Mittelwert $\times 100$ (%)) beträgt zwischen 10% und 20%. Die Vorhersagegüte des Ansatzes in Korrelation zur klinischen Wirksamkeit wird gegenwärtig im Kollektiv und Einzelfall überprüft. Als Vorinformation ergab die Mittelwertbildung des In-vitro-Therapieerfolges für jedes einzelne Zytostatikum aus zahlreichen Resistenzdiagrammen verschie-

Abbildung 1. Dreidimensionale Darstellung der simultanen Zellvolumen-, Esteraseaktivität-, pH- und DNA-Messung eines Kontrollansatzes (A) und eines mit einem aktiven Endoxan-Metaboliten behandelten Ansatzes (B) nach sieben Tagen Kultur bei 37°C. Die Abnahme der Tumor- und Entzündungszellen in der rechten Abbildung (B) im Vergleich



zum Kontrollansatz ist deutlich sichtbar. Das Diagramm ist auf den maximalen Kanalinhalt des Kubusdiagramms als 100% standardisiert. Die Konturlinien wurden bei Kanalinhalt von 0,6% des maximalen Kanalinhalts gezeichnet. Die Lage von lebenden Tumorzellen, Entzündungszellen, Eichpartikeln, toten Zellen und Zellbruchstücken ist aus den Diagrammen ersichtlich. Zur quantitativen Auswertung werden die Zellen der beiden Würfel (A, B) auf die Zellvolumen-Esterase-Ebene des Diagramms projiziert (C, D). Die geraden Linien geben die Begrenzung der Felder wieder, innerhalb der die Standardisierungspartikel (Part), die Entzündungszellen (Entz), die hoch (tu_h) und niedrig (tu_l) Esterase-aktiven Tumorzellen ausgewertet wurden. Bei diesen Zeichnungen wurde der Kanalinhalt logarithmiert und alle anderen Werte auf den maximalen Kanalinhalt (100%) standardisiert. Vom Maximum wurden in linearen Schritten von 10% nach unten Konturlinien gezeichnet. Eine logarithmische Einheit der Zellvolumenskala entspricht einem Zellvolumen von $13 \mu m^3$. Die Fluoreszenzskala ist in relative Fluoreszenzeinheiten geteilt.

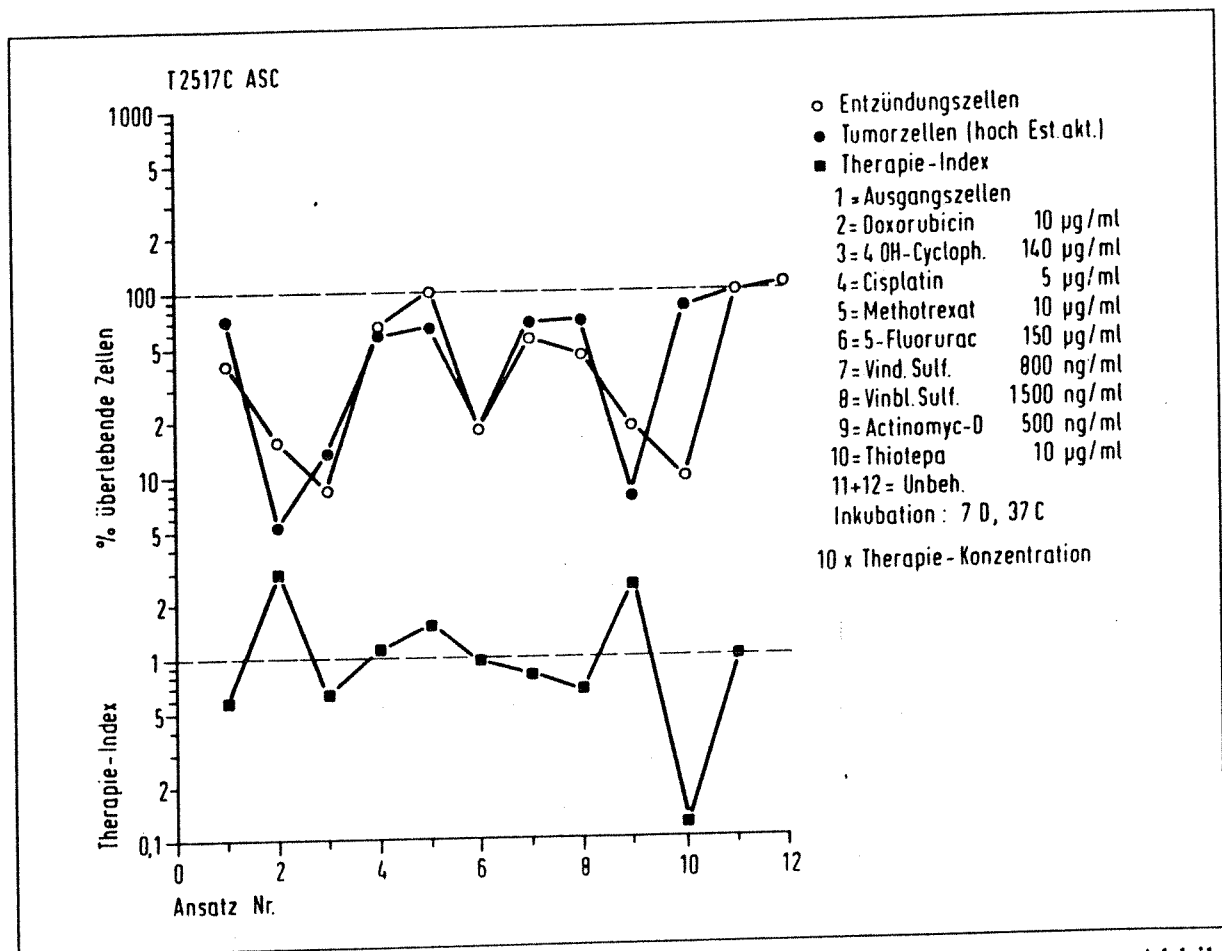


Abbildung 2. Ausgewertetes Resistenzdiagramm aller Ansätze des Versuches von Abbildung 1 (10fach therapeutische Konzentration der Zytostatika). Die Tumorzellen sind gegen Doxorubicin, 4-OH-Cyclophosphamid, Actinomycin-D und 5-Fluorouracil empfindlich. Die Entzündungszellen sind bei Doxorubicin und Actinomycin-D gut erhalten, weshalb sich Entzündungszell/Tumorzellquotienten zwischen 2 bis 3 ergeben. Das Absinken der Zellen unter 50% der jeweiligen Kontrollwerte entspricht einer signifikanten Zytostatikawirkung.

dener Patienten (n = 10 bis 30) z.B. bei Ovarialtumoren die Medikamente Cyclophosphamid, Thiotepa und Doxorubicin als wirksam (Abbildung 4), bei kolorektalen Tumoren neben zahlreichen Resistenzen die Medikamente 5-Fluorouracil und Doxorubicin, während Plattenepithelkarzinome der Zervix im wesentlichen resistent waren. Diese Resultate stehen im Einklang mit der klinischen Erfahrung. Auffällig ist die große Streuung der Mittelwerte. Sie unterstreicht die Wichtigkeit der Individualtestung der Patienten, weil bei praktisch allen Medikamenten Fälle von Resistenz und Empfindlichkeit gefunden wurden. Trotz der grundsätzlichen Übereinstimmung der gemittelten Resultate mit der empirischen klinischen Erfahrung (Ausnahme: Cisplatin, siehe Abbildung 4), ist gegenwärtig noch nicht sicher, ob mit diesem Ansatz auch im Einzelfall stets eine verlässliche Sensibilitätstestung möglich ist. Da nicht alle getesteten Patienten

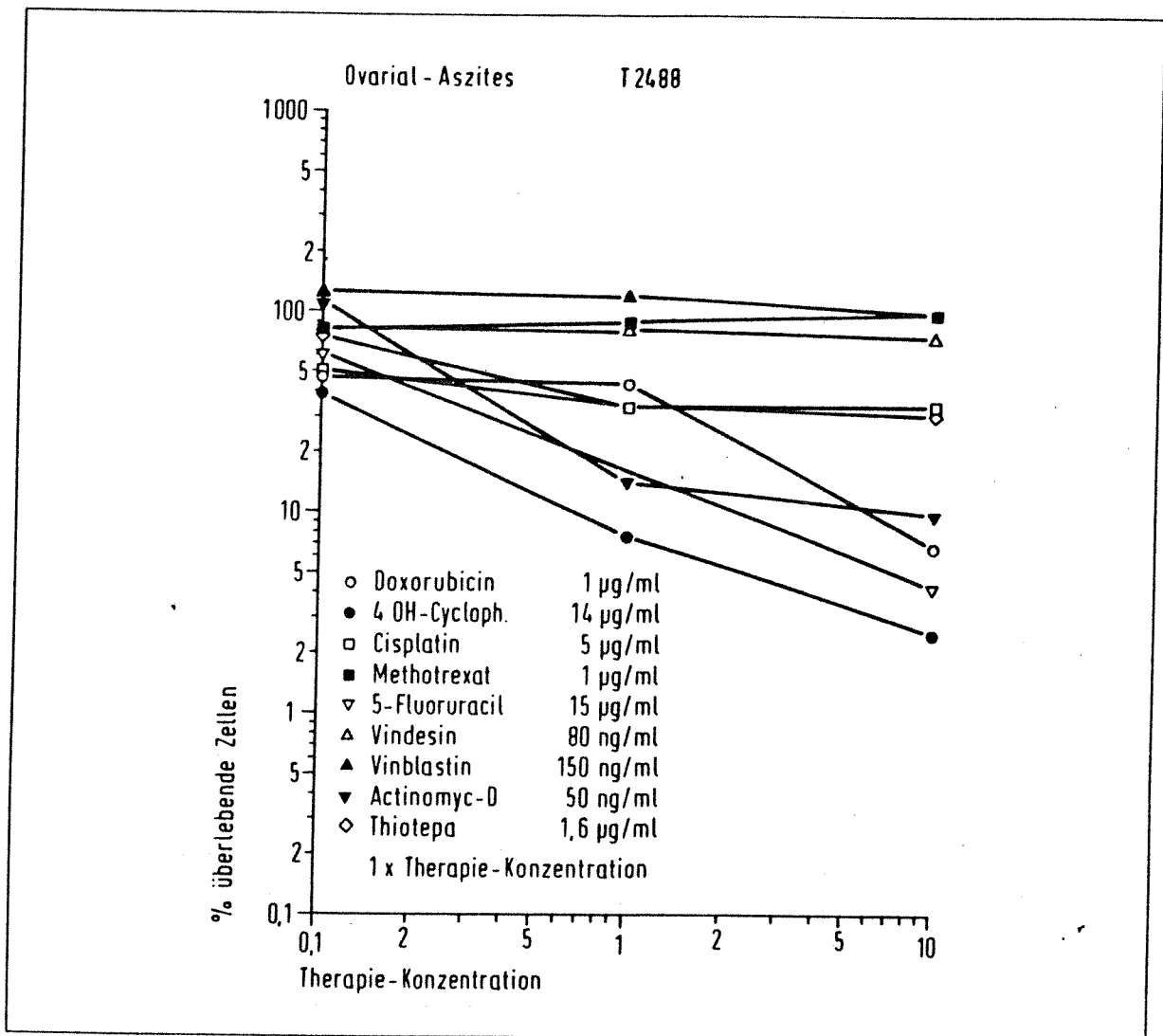


Abbildung 3. Beispiel für ein konzentrationsabhängiges Resistenzdiagramm (0,1-, 1- und 10mal therapeutische Konzentration). Im therapeutisch möglichen Bereich sprechen die Tumorzellen auf Cyclophosphamid und Actinomycin-D an.

auch zytostatisch behandelt wurden, bedarf es größerer Fallzahlen, bis ein statistisch gesichertes Urteil diesbezüglich abgegeben werden kann.

Neben dem Onkobiogramm liefert der Ansatz Information über das Zellvolumen, die Esteraseaktivität und das intrazelluläre pH der überlebenden Zellen und über das Volumen und die DNS-Verteilung der toten Zellen. Diese Werte werden für die Entzündungs- und die Tumorzellen automatisch berechnet. Sie erlauben es, Schlüsse auf systematische Medikamentwirkungen bei den verschiedenen Zelltypen zu ziehen. Der Ansatz ist sowohl bezüglich der Zellfärbung, Messung und Auswertung, aber zukünftig für Pleuraergüsse und Aszites auch bezüglich der Ansatzherstellung automatisierbar.

Zusammengefaßt erscheinen die biologischen, biochemischen und instrumentellen Möglichkeiten des neuentwickelten Ansatzes von großem Interesse für die praktische Zytostatikatestung an Patientenzellen in der Klinik.

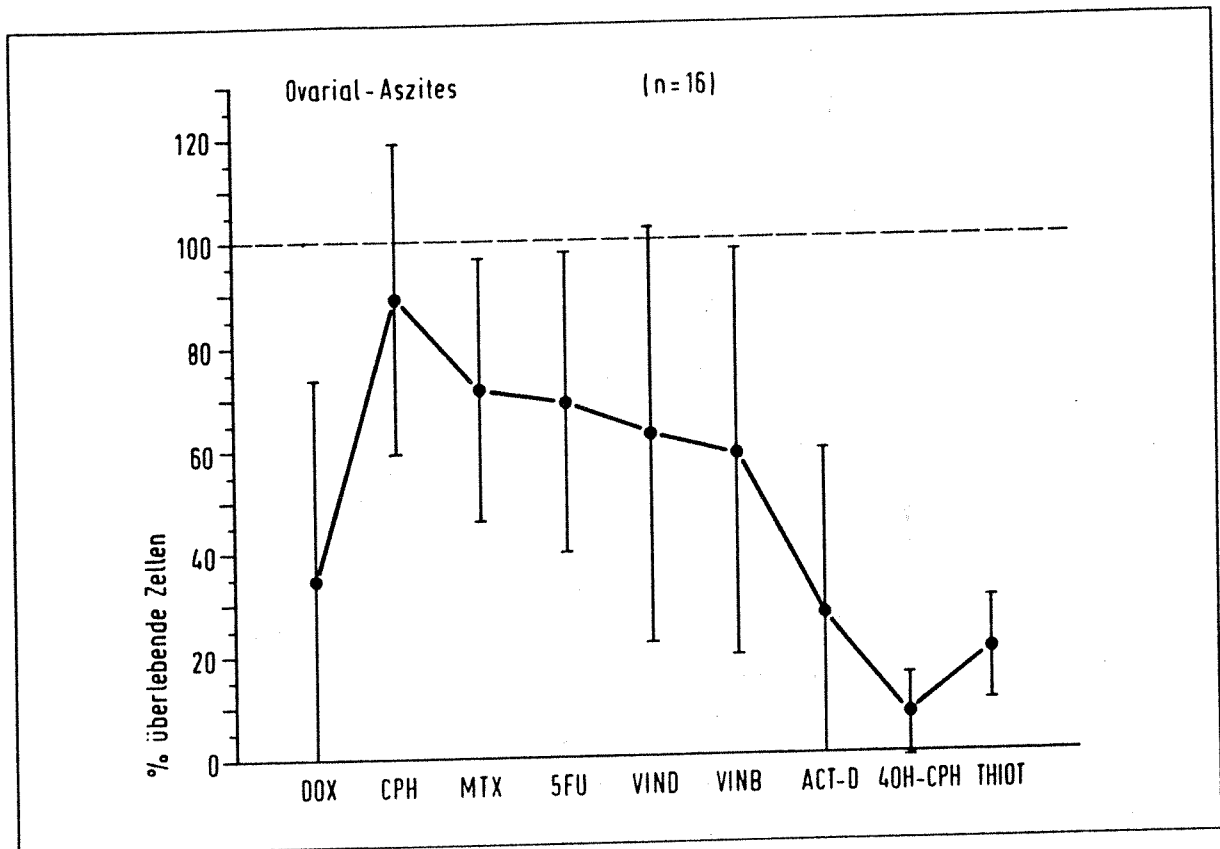


Abbildung 4. Gemitteltetes Resistenzdiagramm aller Tests von 16 verschiedenen Patienten mit Ovariakarzinom-Aszites. Zur Mittelung wurden die Einzelkurven bei 10fach therapeutischer Dosierung (siehe Abbildung 2) verwendet. Empfindlichkeiten dieser Tumorart gegen Doxorubicin, Actinomycin-D, 4-OH-Cyclophosphamid und Thiotepa sind sichtbar. Resistenz wurde im Mittel gegen nicht aktiviertes Cyclophosphamid, Cisplatin, Methotrexat, 5-Fluorouracil, Vindesin- und Vinblastinsulfat gefunden. Die Ursache für den fehlenden Erfolg der Cisplatin-Behandlung in dieser Versuchsserie lag mit Wahrscheinlichkeit an der Inaktivierung des Platinkomplexes beim Einfrieren der Medikamentstammlösungen. Nicht aktiviertes Cyclophosphamid war erwartungsgemäß nicht zytostatisch aktiv. Auffällig ist die hohe Standardabweichung der Mittelwerte, die auf die individuell unterschiedliche Empfindlichkeit der Tumorzellen verschiedener Patienten gegenüber Zytostatika hinweist. Dieser Befund unterstreicht die Bedeutung der individuellen Zytostatikatestung an Patiententumorzellen.

Literatur

- 1 Volm, M.; Wayss, K.; Kaufmann, M. and Mattern, J.: Pretherapeutic detection of tumor resistance and the results of tumor chemotherapy. *Eur. J. Cancer* 15: 983-994 (1979).
- 2 Teufel, G.: Erfahrungen mit dem Kurzzeit-Tumortest nach Volm bei der Primärtherapie des Ovariakarzinoms. *Onkologie* 7: Suppl. 2. 58-64 (1984).
- 3 Sanfilippo, O.; Daidone, M. G.; Costa, A.; Canetta, R. and Silvestrini, R.: Estimation of the differential sensitivity of the non-Hodgkin lymphomas to anticancer drugs. *Eur. J. Cancer* 17: 217-226 (1981).

- 4 Ali-Osman, S.; Maurer, H. R. and Bier, J.: In vitro cytostatic drug testing in the human tumor stem cell assay: Modified method for the determination of the sensitivity index. *Tumor Diag. Ther.* 4: 1-6 (1983).
- 5 Courtenay, V.D.; Selby, P.J.; Smith, I.E.; Milis, J. and Peckham, M.J.: Growth of human tumor cell colonies from biopsies using two soft agar techniques. *Br. J. Cancer* 38: 77-82 (1978).
- 6 Hamburger, A. W.; Salmon, S. E. and Kim, M. B.: Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar. *Cancer Res.* 38: 3438-3444 (1978).
- 7 Runge, H. M.; Bücke, W. and Neumann, H. A.: Die Bedeutung des Koloniebildungs-tests beim Ovarialkarzinom. *Onkologie* 7: Suppl. 2, 66-73 (1984).
- 8 Kleine, W.: Transplantation von malignen Ovarialkarzinomen auf thymusaplastische nu/nu-Mäuse. *Onkologie* 7: Suppl. 2, 74-80 (1984).
- 9 Bogden, A. E.; Cobb, W.R.; Le Page, D.J.; Haskell, P.M.; Gulkin, T.A.; Ward, A.; Kelton, D.E. and Esber, H. J.: Chemotherapy responsiveness of human tumors at first transplant generation xenografts in the normal mouse. *Cancer* 48: 10-20 (1981).
- 10 Klinga, K.; Kaufmann, M.; Runnebaum, B. und Kubli, F.: Prolaktinrezeptoren im Mammakarzinomgewebe. In: Jonat, Kaufmann, Kubli, Maass: Prätherapeutische Tumortestung. *Akt. Onkol.* 16 (Zuckschwerdt, München/Bern/Wien 1985).
- 11 Valet, G.; Warnecke, H. H. and Kahle, H.: New possibilities of cytostatic drug testing on patient tumor cells by flow-cytometry. *Blut* 49: 37-43 (1984).
- 12 Valet, G.; Raffael, A.; Moroder, L.; Wünsch, E. and Ruhenstroth-Bauer, G.: Fast intracellular pH determination in single cells by flowcytometry. *Naturwissenschaften* 68: 265-266 (1981).
- 13 Kachel, V.; Glossner, E.; Kordwig, E. and Ruhenstroth-Bauer, G.: Fluvo-Metricell, a combined cell volume and fluorescence analyzer. *J. Histochem. Cytochem.* 25: 804-812 (1977).
- 14 Kachel, V.; Schedler, K.; Schneider, H. and Haack, L.: Cytomic data system module, modern electronic devices for flowcytometric data handling and presentation. *Cytometry* 5: 299-303 (1984).

Für die Verfasser: *Dr. H. H. Warnecke*, Frauenklinik im Krankenhauszweckverband, Stenglinstraße 1, D-8900 Augsburg

