Laryng. Rhinol. Otol. 66 (1987) 451–456
© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Prätherapeutische Zytostatikatestung bei Kopf-Halskarzinomen*

T. P. U. Wustrow[1], *G. Valet*[2]

[1] Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenkranke, Ludwig-Maximilians-Universität, Klinikum Großhadern, München (Direktor: Prof. Dr. med. E. Kastenbauer)
[2] Arbeitsgruppe Krebszellforschung, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (Leiter: Prof. Dr. med. G. Valet)

Zusammenfassung

An Untersuchungen mit einer in vitro kultivierten Plattenepithelkarzinomzellinie aus dem Kopf-Halsbereich wird die mehrparametrische Durchflußzytometrie vorgestellt. Sie erlaubt die schnelle Bestimmung der Wirkung von verschiedenen Zytostatika oder deren Kombinationen sowohl in Kurz- als auch in Langzeitinkubationen. Zusätzlich kann erstmals bei Kopf-Halskarzinomen im gleichen Ansatz die Reaktion von Tumorzellen mit der von nicht malignen Zellen verglichen werden. Da die Testung in Gegenwart der lokalen immunkompetenten Zellen erfolgt, kann der Einfluß der lokal immunologisch wirksamen Zellen mituntersucht werden. Für jeden Patienten kann mit dieser Methode eine individuelle Chemosensitivität und Resistenz im autologen Serum gemessen werden, so daß ein unterschiedliches biologisches Verhalten der Tumorzellen auch innerhalb eines Tumors vor Therapiebeginn schnell bestimmt werden kann. Obwohl die klinische Korrelation noch nicht hergestellt wurde, werden die Vorteile der mehrparametrischen Durchflußzytometrie zur Zytostatikaaustestung gegenüber anderen Methoden dargestellt.

Pretherapeutic Cytotoxic Drug Testing in Carcinoma of the Head and Neck

In experiments with an in vitro cultured squamous cell carcinoma line of the head and neck the usefullness of multiparametric flow cytometry is demonstrated. With this method fast determinations of the different reaction profiles from various cytotoxic agents are feasable in short as well in long term incubation periods. For the first time the effects on tumor cells and on non malignant cells may be compared in the same analysis. As in each experiment local immunocompetent cells are present, their influence is in addition well documentable. Thus as soon as a direct clinical correlation will be demonstrated, multiparametric flow cytometry will allow an individual cytotoxic drug testing for chemosensitivity and resistance in autologous serum giving pretherapeutically further insights in the non-malignant biologic characteristics of the tumor cells and of the cells within a solid tumor. In the present study the advantages of the multiparametic flow cytometry towards other approaches for chemosensitiv drug testing will be discussed.

Einleitung

Patienten mit inoperablen Plattenepithelkarzinomen, die wegen der Tumorausdehnung, aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes oder auf eigenen Wunsch nicht operiert werden können, werden generell einer Chemotherapie mit anschließender Bestrahlung oder, wie seit kurzem in unserer Klinik, einer kombinierten Radio-Polychemotherapie zugeführt. Dabei werden je nach Erfahrung der Klinik eigene oder etablierte Protokolle ohne eine Modifikation für jeden Patienten angewendet. Da einige Tumoren auf eine Therapie gut ansprechen, während andere sich nicht verändern, wäre es wünschenswert, die Chemosensitivität und Resistenz der Geschwülste schon prätherapeutisch individuell zu testen. Voraussetzung dazu wäre, daß die in soliden Tumoren vorhandenen Zellpopulationen voneinander getrennt werden können, so daß die optimale zytotoxische Wirkung der Medikamente auf die Tumorzellen bei möglichst geringer Zerstörung der umgebenden, nicht malignen Zellen schnell bestimmt werden kann.

Material und Methoden

Die in vitro gezüchteten Zellen wurden aus den Kulturflaschen mit Trypsin-EDTA (0,05/0,02 %) abgelöst. Zu 2 ml Zellsuspension mit 2×10^5 Zellen wurden 20 µl des Zytostatikums in einer Endkonzentration, die der 10fachen der Plasmakonzentration von Patienten entspricht, hinzupipettiert. Als Zytostatikum der hier dargestellten Versuche verwendeten wir Aclacinomycinhydrochlorid (Aclacinomycin A; Behringwerke, Marburg; 16 µg/ml). Als Zellinie wurde ein Plattenepithelkarzinom aus der Zunge (SCC-25) verwendet (29). Die Zellen wurden bei 37° C für vier Tage mit 5 % CO_2 inkubiert und anschließend analysiert. Ein Teil der Zellen wurde nach Zytozentrifugation und Färbung nach Papanicoulaou lichtmikroskopisch untersucht.

250 µl der jeweiligen Zellsuspension wurden für die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes und der Esteraseaktivität mit 5 µl ADB (1,4-Diacetoxy-2,3-dicyanobenzol) in Dimethylformamid (1 mg/ml) für 10 Minuten bei Zimmertemperatur angefärbt, so daß wir als Endkonzentration 20 µg/ml erhielten (38, 44). Die Esteraseaktivität konnte dabei proportional der Intensität der Blaufärbung berechnet werden, nachdem ADB durch Esterasen in fluoreszierendes DCH (2,3-Dicyanohydrochinon) und Acetat gespalten wird (Abb. 1). Die Zellkerne der toten Zellen wurden gleichzeitig mit 5 µl Propidiumiodid (2 mg/ml) rot gefärbt (Abb. 2). Propidiumiodid wurde in 0,15 mol NaCl mit 10 mmol Tris/HCl (TBS, pH = 7,35) gelöst. Als internen Standard für Fluoreszenz und Volumen verwendeten wir poröse, monodisperse, NH_2-Gruppen tragende Latexpartikel mit einem Durchmesser von 4,88 µm (36), die mit 20 µg/ml DCH angefärbt waren. In einem Fluvo-Metricell Durchflußzytometer (11, 12) wurde das Zellvolumen, die blau/grüne und die rote Fluoreszenz der Zellen simultan bestimmt (Abb. 3 und 4). Das Zellvolumen wurde elektrisch (0,229 mA) in einer mit TBS gefüllten Kammer mit einer Geschwindigkeit von 500–1500 Zellen/Sekunde gemessen. Von einer HBO-100 Hochdruck Quecksilberdampflampe wurde die Fluoreszenz zwischen 300–400 nm angeregt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde entsprechend seiner Wellenlänge durch dichroitische Spiegel und Filter getrennt. Die Blaufluoreszenz wurde mit einer

* Vorgetragen auf der 37. Tagung der Münchener Oto-Rhino-Laryngologischen Gesellschaft, 6. Dezemeber 1986;
mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft Wu 111/2–2

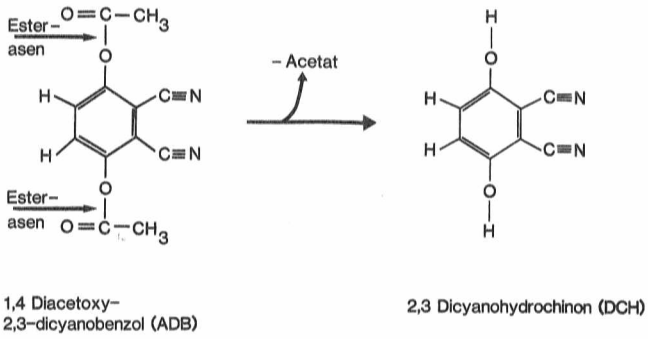

Abb. 1 Spaltung von ADB durch intrazelluläre Esterasen in Acetat und fluoreszierendes DCH.

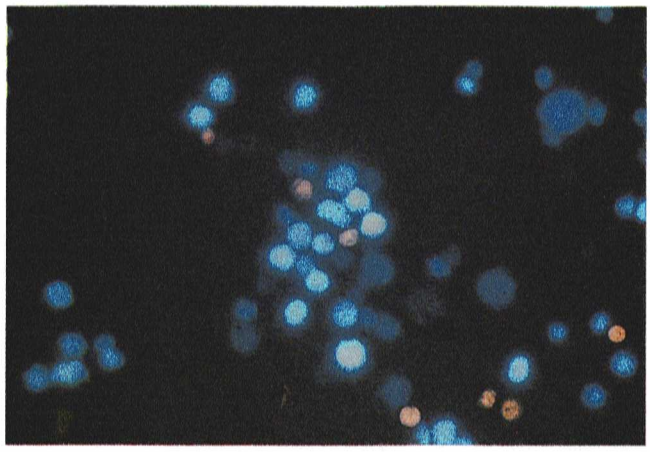

Abb. 2 Anfärbung von vitalen Zellen mit ADB (blau) und von toten Zellen mit Propidiumiodid (rot). Je nach Esteraseaktivität ändert sich die Intensität der Blaufärbung. Je nach intrazellulärem pH-Wert wechselt die Blau- in eine Grünfluoreszenz. Die Intensität der Rotfärbung entspricht dem nukleären DNS-Gehalt.

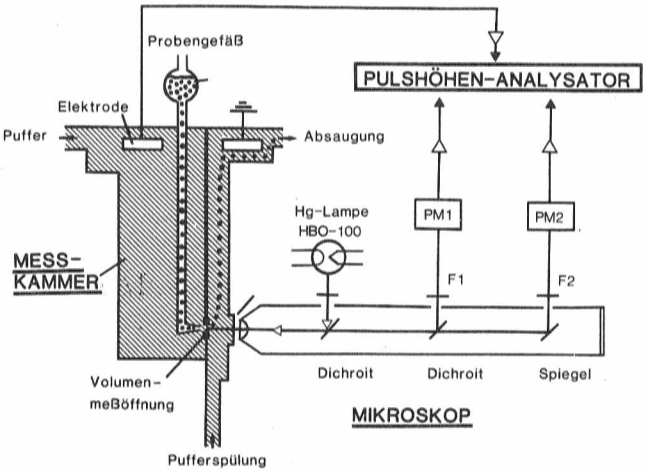

Abb. 3 Blockdiagramm des Fluvo-Metrizell Durchflußzytometers zur Volumen- und Fluoreszenzmeßung.

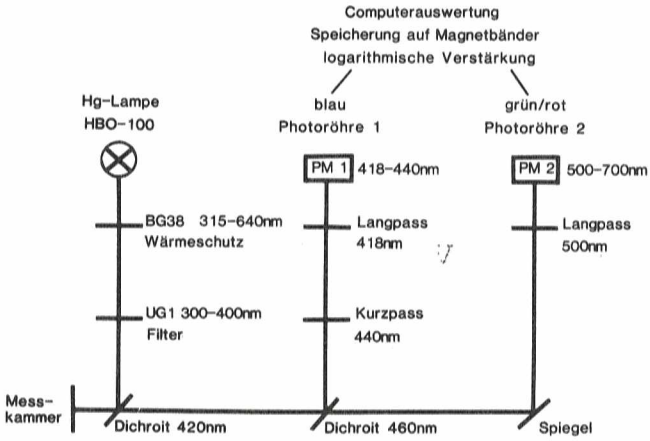

Abb. 4 Optisches System des Durchflußzytometers mit zwei getrennten Photoröhren.

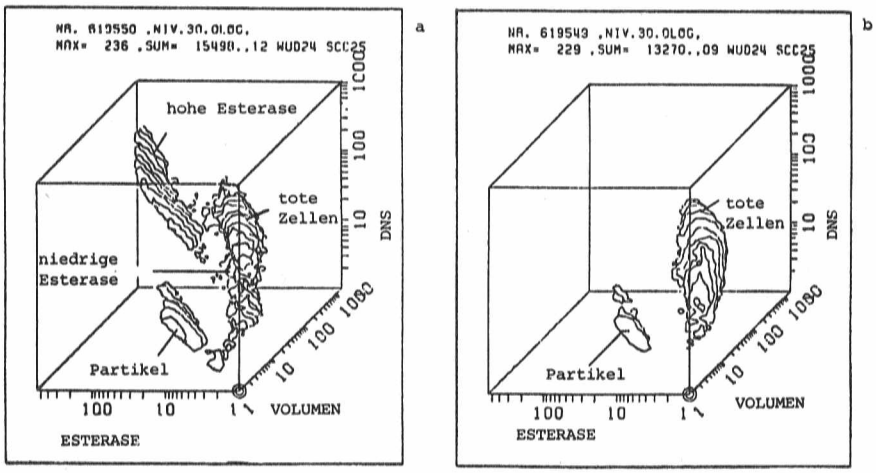

Abb. 5 Häufigkeitshistogramm von Esteraseaktivität, Volumen und DNS-Gehalt der Zungenkarzinomzellinie SCC-25.
a) ohne Behandlung
b) 4 Tage nach Inkubation mit Aclacinomycin A (16 μg/ml). Bei 37° C sind die Tumorzellen verschwunden, die in der Fraktion der Zellen mit hoher Esteraseaktivität, großem Volumen und hohem DNS-Gehalt enthalten sind. Als internen Standard wurden fluoreszenzgefärbte Latexpartikel verwendet.

Plattenepithelkarzinom des Zungengrundes ($T_1N_3M_0$)

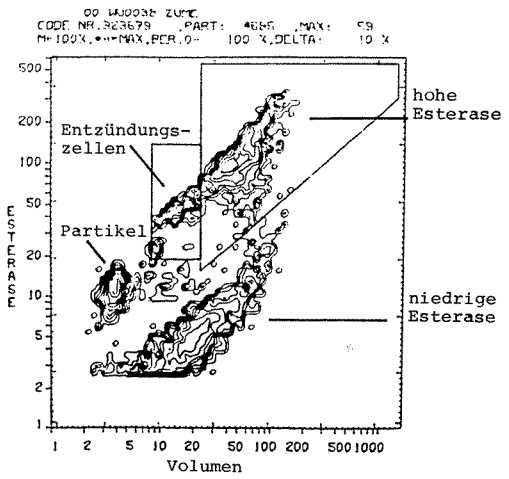

Abb. 6 Trennung der Entzündungszellen von Plattenepithelkarzinomzellen mit der mehrparametrischen Durchflußzytometrie bei einer Tumorprobe von einem Patienten mit einem Zungengrundkarzinom. Die Einteilung der Kompartimente erfolgte entsprechend den Ergebnissen von kultivierten Plattenepithelkarzinomzellinien und Zytozentrifugationsausstrichen. Als internen Standard wurden fluoreszenzgefärbte Latexpartikel verwendet.

Photoröhre zwischen 418–440 nm und die Rotfluoreszenz mit einer zweiten Röhre zwischen 500–700 nm aufgefangen. Die elektrischen Signale wurden logarithmisch (3 Dekaden) verstärkt. Die Meßwerte wurden mit Analog-Digitalwandlern digitalisiert, auf Magnetbänder gespeichert und mit Fortran IV Computerprogrammen ausgewertet (37).

Ergebnisse

In einem dreidimensionalen Häufigkeitshistogramm von Esteraseaktivität, DNS-Gehalt und Volumen ist die Verteilung am Beispiel der Plattenepithelkarzinomlinie der Zunge SCC-25 gezeigt (Abb. 5 a). Insgesamt wurden 15498 Zellen gemessen. Die logarithmische Fluoreszenzeinteilung der Esteraseaktivität und des DNS-Gehaltes sind als relative Einheiten dimensionslos. Eine Einheit der Volumenskala entspricht einem Volumen von 25 μm^3. Im Diagramm umfahren die Konturlinien die Kanäle, in denen 70 % aller gemessenen Partikel für alle drei Parameter erfaßt werden. Die Tumorzellen stellen sich als Wolke mit großen Volumina und hoher Esteraseaktivität dar. Tote Zellen wurden durch die Anfärbbarkeit mit Propidiumiodid und die Partikel als umschriebene Ansammlung mit kleinem Volumen und niedriger blau/grün Fluoreszenz erkannt.

Wurden die in vitro gezüchteten Zellen mit einem Zytostatikum für 4 Tage bei 37° C inkubiert, so verschwanden nahezu alle Tumorzellen (Abb. 5 b). In unserem Beispiel wurde die SCC-25 Linie der Zunge mit 16 μg/ml Aclacinomycin A behandelt. Die Zahl der toten Zellen stieg signifikant ($p < 0{,}01$) an.

Die Projektion der gemessenen Impulse der lebenden Zellen und der Partikel auf ein Diagramm von Volumen gegen DCH Fluoreszenzintensität erlaubte entsprechend der Häufigkeitsverteilung die Unterscheidung von 4 Kompartimenten (44):

α) kleines Volumen und niedrige Fluoreszenzintensität,
β) mittleres Volumen und niedrige Fluoreszenzintensität,
γ) großes Volumen und niedrige Fluoreszenzintensität,
δ) großes Volumen und hohe Fluoreszenzintensität.

Im Kompartiment α befinden sich die Latexpartikel. β ist in den Messungen von Plattenepithelkarzinomlinien aus dem Kopf-Halsbereich nahezu leer, in γ finden sich Zellbruchstücke und in δ Tumorzellen. Diese Abgrenzungen konnten durch wiederholte Messungen der Plattenepithelkarzinomlinien, die nicht durch andere Zellen, wie Lymphozyten oder Granulozyten kontaminiert sind, reproduziert werden. Wurden jedoch histologisch tumorfreie Lymphknoten, die im Rahmen einer Neck dissection entfernt worden waren, analysiert, so zeigte sich, daß überwiegend das Kompartiment β mit Zellen angefüllt war. In Zytozentrifugationspräperaten konnten diese Zellen als Entzündungszellen wie Lymphozyten und Monozyten identifiziert werden. Nach Inkubation der Zellinie SCC-25 mit Aclacinomycin A (16 μg/ml) für 4 Tage bei 37° C nahm die Zellzahl im Kompartiment mit großem Volumen und hoher Fluoreszenzintensität signifikant ($p < 0{,}05$) ab; es waren nur noch vereinzelt Zellen zu registrieren. Insgesamt wurden 3159 Zellen gemessen (b) und mit 9759 Kontrollzellen verglichen (a). Der logrithmische Wert des maximalen Kanalinhaltes des Histogramms wurde in 10 gleiche Teile geteilt, für die jeweils eine Konturlinie gezeichnet wurde. Die Konturlinie für den Histogrammkanal mit der niedrigsten Zahl enthielt 1 Partikel, während die höchste Konturlinie einer Zellzahl von 145 Zellen pro Kanal entsprach. Da die biologischen Zellverteilungen nicht exakt durch Begrenzungen zu trennen sind, nahm auch die Zellzahl im Kompartiment mit großem Volumen und niedriger Fluoreszenzintensität deutlich, jedoch nicht signifikant ab ($p > 0{,}05$).

An einer Biopsie von einem Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des Zungengrundes ($T_1N_3M_0$) konnte die Abgrenzung der Zellfraktionen, welche für Kopf-Halstumoren mit den Zellinien erarbeitet worden war, nachvollzogen werden (Abb. 6): im Kompartiment mit niedrigem Volumen und einer geringen DCH Fluoreszenz fanden sich vornehmlich Entzündungszellen und im Kompartiment mit großem Volumen und hoher DCH Fluoreszenz die Tumorzellen. Die gesamte Gewebeprobe bestand zu 22 % aus Entzündungszellen und zu 78 % aus Plattenepithelkarzinomzellen.

Diskussion

Da durch intrazelluläre Esterasen die ADB Lösung in fluoreszentes DCH und Acetat gespalten wird, kann somit die intrazelluläre Esteraseaktivität bestimmt werden (Abb. 1). DCH reichert sich in vitalen Zellen mit intakten Zellmembranen an. DCH ist zur Unterscheidung von lebenden zu toten Zellen und Zellbruchstücken nur bedingt geeignet, weil schwach positive, lebende Zellen schwer von toten Zellen abgegrenzt werden können. Dazu verwendeten wir jedoch Propidiumiodid, welches nur die Zellmembran von geschädigten Zellen durchdringt und die doppelsträngige DNS rot anfärbt. DCH und Propidiumiodid können im selben Wellenbereich von 300–400 nm angeregt werden, jedoch durch die verschiedenen Emissionsmaxima in getrennten Photoröhren registriert werden. Obwohl Propidiumiodid auch mit doppelsträngiger RNS reagiert, konnten keine Differenzen bei Färbung mit und ohne RNAse

gefunden werden, so daß Propidiumiodid bei der Anfärbung von Säugetierzellen als reiner DNS Farbstoff angesehen werden kann (15).
Das DCH, welches aus ADB durch Esterasen abgespalten wird, kann auch zur intrazellulären pH-Bestimmung verwendet werden (38), da es zwischen pH 5 und 9 seine Fluoreszenz von blau nach grün ändert. DCH liegt entsprechend dem pH als Dianion, Anion oder als neutrale oder protonierte Form vor, so daß daraus die verschiedenen Absorptions- und Emissionsspektren resultieren (3, 28). Die Bestimmung der absoluten intrazellulären pH erfolgte über eine Eichkurve, bei der die Verhältnisse der Blau/Grün-Fluoreszenz gegen den pH-Wert einer Eichlösung aufgetragen sind. *Raffael* (28) bestimmte den intrazellulären pH mit DCH bei menschlichen Monozyten (7, 14 ± 0,04 SEM), Lymphozyten (7,01 ± 0,06 SEM) und Granulozyten (6,79 ± 0,04 SEM).
Eine intrazelluläre Esteraseaktivität wird in jeder Zelle beobachtet. Esterasen sind Enzyme, die aromatische oder aliphatische Ester hydrolysieren. Sie unterscheiden sich durch ihre Hemmbarkeit und Substratspezifität. Durch die gleichzeitige Anfärbung mit Propidiumiodid konnte gezeigt werden, daß Esterase negative Zellen häufig absterbende Zellen sind; umgekehrt haben Zellen mit hoher Esteraseaktivität oder alkalischem intrazellulären pH eine hohe Stoffwechselfunktion (28) wie es für Tumorzellen typisch ist. Lymphozyten besitzen hohe Esterasekonzentrationen und eine um 0,1 niedrigere pH-Einheit als Granulozyten oder Makrophagen.

1. Indikation zur Chemotherapie

Fortgeschrittene, primär inoperable Malignome im Kopf-Halsbereich, inoperable Rezidive von voroperierten Tumoren und Patienten, die sich nicht operieren lassen möchten oder nur noch palliativ behandelt werden können, werden soweit möglich einer Chemotherapie zugeführt. Plattenepithelkarzinome des Zungengrundes, der Tonsillen, des Hypopharynx und ausgedehnte Geschwülste des Kehlkopfes sind die häufigsten Lokalisationen für eine Zytostase. Da inoperable Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches vornehmlich durch Strahlen zerstört werden müssen, werden diese Patienten vor der Behandlung in Kombination mit Zytostatika oder wie seit kurzem simultan mit Strahlen und Chemotherapeutika behandelt. Bis heute werden Zytostatika *starr* für jeden Patienten nach bekannten oder neuen Protokollen eingesetzt.

2. Zytostatikawirkung

Da in der Klinik einige Plattenepithelkarzinome relativ gut auf Zytostatika ansprechen, während histologisch identische Geschwülste keine Größenabnahme zeigen, wäre es wünschenswert, eine prätherapeutische individuelle Testung der einzelnen Medikamente oder deren Kombinationen durchzuführen. Dies ist um so wichtiger, da wirkungslose Zytostatika in den empirisch gewonnenen Therapieschemata den einzelnen Patienten sinnlos schädigen! So wurde in Tierversuchen beschrieben, daß nach Behandlung mit Cyclophosphamid oder Triäthyleniminobenzochinon eine vermehrte Tumorangehrate und eine erhöhte Metastasierung auftrat, so daß die behandelten Tiere schneller als die unbehandelten starben (17, 31). Zusätzlich kann eine Chemotherapie zu einem schnelleren Tumorwachstum führen (1, 13, 14). Das durch Zytostatika geschädigte Immunsystem könnte sogar zu einer beschleunigten Tumorproliferation führen (9, 14, 31).

3. Zytostatikatestung in vitro

a) Morphologie, Nukleinsäurestoffwechsel

In älteren Arbeiten wurden als zytotoxische Effekte morphologische (4) oder biochemische Veränderungen herangezogen (24). Nachdem die Nukleinsäuresynthese ein Maß für das Wachstum von Tumorzellen ist, wurde zuerst von *Volm* und Mitarb. (40) die Einbauverminderung radioaktiv markierter Nukleinsäurevorstufen unter Zytostatikaeinwirkung zur individuellen Testung verwendet. Dabei wurde eine Sensibilitäts- (wirksame Substanzen) oder eine Resistenztestung (unwirksame Medikamente) durchgeführt. Da Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich solide Tumoren sind, müssen die Tumorproben zu Einzelzellsuspensionen zerkleinert werden, so daß Zellzerstörungen mit einer Freisetzung von Nukleotiden zu falschen Ergebnissen der inkorporierten Präkursoren des Nukleinsäurestoffwechsels führen (33). Zusätzlich können nur solche Zytostatika geprüft werden, die eine Veränderung der DNS- oder RNS-Synthese bewirken. So kann z. B insbesondere nach Kurzzeiteinwirkung die Mitosearretierung von Vincaalkaloiden oder die Schädigung von Zellen in der G_0-Phase des Zellzyklus durch Bleomycin nicht untersucht werden. Weiterhin kann eine Resistenztestung nur an stark proliferierenden Tumorzellen durchgeführt werden. Da Plattenepithelkarzinome vom Kopf-Halsbereich nur sehr langsam wachsen und selbst in vitro kultivierte Plattenepithelkarzinomlinien eine Verdoppelungszeit von 28–48 Std. haben (43), ist diese Testung aus methodischen Gründen für solide Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich nicht geeignet. Nachdem in Gewebsproben solider Tumoren auch unterschiedliche Anteile von nicht malignen- und Entzündungszellen enthalten sind, verfälscht die Messung der Einbaurate von Nukleinsäurepräkursoren in Einzelzellsuspensionen die tatsächliche Situation. Aus diesem Grund wurde die Inkorporation von Nukleinsäurevorstufen und die chemotherapeutische Hemmung des Tumorzellstoffwechsels vornehmlich bei Leukämien oder an malignen Tumorzellen aus Ergüssen von Körperhöhlen angewendet. Auch die Bewertung der Wirkung von Chemotherapeutika auf solide Tumoren mit der Autoradiographie (26) wurde in der Klinik nur spärlich eingesetzt, weil die Untersuchungen zu lange dauern.

b) Koloniebildung im weichen Agar

Anfänglich erschien mit der Klonierung von Tumorzellen in weichem Agar eine bessere Vorhersage der Zytostatikaempfindlichkeit möglich (8, 10, 21). Jedoch konnten Kopf-Halstumoren auch von der erfahrensten Arbeitsgruppe um *von Hoff* nur in 36 % der Tumorproben in Kultur gebracht werden (22) und selbst bei diesen wuchs nur eine kleine Fraktion der Tumorbiopsie (sogenannte Stammzellen) in vitro an (8, 10, 21). Die Klonierungsrate lag für Kopf-Halsgeschwülste bei nur 0,006 % und mit der Methode in Kapillaren bei 0,014 % (23). Es zeigte sich zusätzlich, daß aus einem soliden Mammakarzinom der Maus unterschiedliche Klone mit verschiedener Zellverdoppelungszeit, Morphologie und Empfindlichkeit auf Zytostatika isoliert werden konnten (9). Auch die Hypothese, daß aus nur *einer* „Tumorzelle" *eine* Kolonie hervorgeht,

ist fraglich, weil die Zellen Aggregate und Cluster bilden. Diese Forderung wird um so schwieriger, da für die zytostatische Testung möglichst viele Kolonien kultiviert werden müssen. Ab einer größeren Zelldichte bilden die Zellen zusätzlich Desmosomen, wie wir es in unseren Kulturen der Tumorzellinien zeigen konnten, so daß eine Kolonie nicht unbedingt aus einer Zelle entstanden ist. Wurden die Zellen in einer solchen Dichte ausgesät, daß mehr als 30 Kolonien pro Kulturschale gefunden wurden, so entstammten nur 15–75 % der Kolonien aus einer Zelle (34). Somit ist auch eine Austestung in größeren Verdünnungsreihen mit dieser Methode unmöglich. Erschwerend ist weiterhin, daß die Kulturen unterschiedlich in vitro differenzieren.

c) Xenotransplantation

Alternativ wird der Xenotransplantation von Tumoren auf nackte Mäuse eine zunehmende Bedeutung zugesprochen. Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches bildeten jedoch nur in 14–30 % etablierte Tumorlinien (2, 18, 42). Zusätzlich führte die Transplantation auf nackte Mäuse zu einer Selektion von aneuploiden Zellklonen (35, 42), die lediglich das Wachstum von biologisch aggressiveren Tumoranteilen widerspiegelt (8, 20). Zusammen mit der klonalen Zusammensetzung des Xenotransplantats unterscheiden sich die Tumoren in der Maus von den ursprünglich menschlichen Geschwülsten bezüglich ihres zellkinetischen Verhaltens (19, 42). Somit können die Ergebnisse von Zytostatika, die in den Zellzyklus eingreifen, nicht auf den menschlichen Orginaltumor übertragen werden. Die Xenotransplantation ist zusätzlich teuer und durch die Tierhaltung im „Laminar flow" sehr zeitaufwendig. Um mehrere Chemotherapeutika mit den Kontrollen in verschiedenen Konzentrationen und Kombinationen auszutesten, wäre schon für einen einzigen Patienten eine sehr große Tierkolonie (mehr als 100 Tiere) nötig. Da die Tumoren des Kopf-Halsbereiches meistens bakteriell kontaminiert sind, werden mit dem Tumorimplantat auch Bakterienbestandteile transplantiert. Diese könnten bei den thumusaplastischen Mäusen einen unspezifischen Differenzierungsreiz auf die vorhandenen Vorläufer T-Zellen ausüben, so daß sich reife T-Zellen in der nackten Maus entwickeln können, wie es in der Peritonealhöhle oder unter dem Einfluß von Thymushormonen beschrieben ist (27, 30). Genauso wie die exogenen Differenzierungsreize führen auch Infektionen oder ein fortgeschrittenes Alter im gleichen Mäusestamm zu einer unterschiedlichen Tumorangehrate und einem verminderten Tumorwachstum. In eigenen Beobachtungen zeigte sich nach Transplantationen von in vitro kultivierten Plattenepithelkarzinomzellen zur gleichen Zeit in junge oder ältere Mäuse oder sogar in junge Mäuse nach längerer Rückkreuzung eine deutlich verminderte Tumorangehrate, so daß die Zellzahl der Tumorinjektion um mehr als eine Zehnerpotenz erhöht werden mußte. Zuletzt sei erwähnt, daß thymusaplastische Mäuse entsprechend ihrer Rasse ein unterschiedliches Immunsystem z. B. mit einer hohen oder niedrigen Aktivität von natürlichen Killerzellen oder natürlichen zytotoxischen Zellen aufweisen. Die meisten Argumente treffen auch für die Tumortransplantation unter die Nierenkapsel der Maus zu (25). Von *Braakhuis* (2) wird deshalb der Xenotransplantation auf die nackte Maus nur ein Platz zur Austestung neuer Zytostatika eingeräumt.

d) Durchflußzytometrie

Mit der Durchflußzytometrie wurde bei Tumoren im Kopf-Halsbereich bisher nur der DNS-Gehalt bestimmt. *Wannenmacher* und Mitarb. (41) beschrieben nach 5-Fluoruracilinfusion einen Anstieg der Zellen in der G_2M Phase des Zellzyklus nach 10 Stunden und eine Abnahme nach 14 Stunden. *Schumann* und Mitarb. (32) beobachteten mit Ethidiumbromid als Farbstoff einen partiellen Stop von Plattenepithelkarzinomzellen in der G_2M Phase (Anstieg von 3 auf 11 %) 30 Stunden nach zweimaliger Zugabe von Bleomycin. In ähnlicher Weise zeigten *Ganzer* und Mitarb. (7) Veränderungen der Zellkinetik nach dem Versuch einer Teilsynchronisation mit 5-Fluoruracil. *Lampe* und Mitarb. (16) bestimmten mit Propidiumiodid die Ploidie bei 32 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im oberen Respirationstrakt. Sie fanden eine schlechtere Prognose bei aneuploiden Tumoren. Erst kürzlich untersuchten *Ensley* und Mitarb. (5) die optimale Anfärbetechnik mit Propidiumiodid bei Kopf-Halstumoren.

e) Mehrparametrische Durchflußzytometrie

Der Vorteil der multiparametrischen Durchflußzytometrie liegt in der Möglichkeit die zytotoxische Antwort von Tumorzellen mit nicht-malignen epithelialen Keratinozyten und mesenchymalen Entzündungszellen (Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten) zu vergleichen. Zellen mit kleinem Volumen und geringer Esteraseaktivität sind vornehmlich Lymphozyten, während große Zellen mit hoher Esteraseaktivität nahezu ausschließlich Tumorzellen sind (39). Zusätzlich können die malignen Zellen analytisch von nicht-malignen, epithelialen oder mesenchymalen Zellen dadurch unterschieden werden, daß Tumorzellen überwiegend aneuploid sind. Nachdem die Trennungsgrenzen für die Zellen mit den permanent kultivierten Plattenepithelkarzinomzellinien aus dem Kopf-Halsbereich als positive Kontrollen festgelegt wurden, ist es in Zukunft möglich, diese Methodik an Biopsien von Patienten zu erproben. Dabei müßten die Daten der Proben von der angrenzenden gesunden Schleimhaut und von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mit denen aus dem Tumorgewebe gegenübergestellt werden. Ein weiterer Vorteil der multiparametrischen Durchflußzytometrie liegt darin, daß durch die Gegenwart von autologem Serum und Lymphozyten die humorale und zelluläre Zusammensetzung des Originaltumors in vitro bestmöglichst nachgeahmt werden kann. Neben der quantitativen Trennung erlaubt die mehrparametrische Durchflußzytometrie die Bestimmung von physiologischen und biochemischen Parametern, wie das Zellvolumen, der intrazellulären pH-Konzentration, die DNS-Verteilung und die Esteraseaktivität. Durch die Antikörpermarkierung wie z. B. gegen Keratin oder Vimetin oder durch monoklonale Antikörper gegen Tumorantigene auf Plattenepithelkarzinomen wird zukünftig eine noch schärfere Trennung mit einer direkten Zuordnung der Veränderung durch Zytostatika möglich sein. Hervorzuheben ist, daß tote Zellen durch ihre Anfärbung mit Propidiumiodid identifiziert werden können. In ersten Tumorbiopsien von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen konnte im 4tägigen zytotoxischen Ansatz kein Überwachsen von Fibroblasten beobachtet werden. Die Verwendung von Latexpartikeln mit einer einheitlichen Größe von 4,88 μm diente bei der Durchflußzytometrie als interner Standard zur Berechnung des Zellvolumens und der Fluo-

reszenz. Unter Verwendung entsprechender Fluoreszenzfarbstoffe könnten in der Zukunft mit der multiparametrischen Durchflußzytometrie der Gehalt an zellulären Proteinen, Lipiden, Zelloberflächenrezeptoren und die Aktivität intrazellulärer Enzyme schnell bestimmt werden, so daß metabolische Veränderungen unter Zytostatikaeinwirkung in vivo und in vitro schnell für den Patienten individuell analysiert werden können. Mit entsprechenden Computerprogrammen könnte in der Zukunft die gesamte Untersuchung automatisiert werden.

Literatur

(1) Bickis, I. J., I. W. D. Henderson, J. H. Quastel: Biochemical studies of human tumors. Cancer 19 (1966) 103–113

(2) Braakhuis, B. J. M.: Transplantation of human head and neck cancer xenografts in athymic nude mice. Academisch Proefschrift. Free University Press, Amsterdam (1987) 1–107

(3) Brown, R. G., G. Porter: Effect of pH on the emission and absorption characteristics of 2, 3-dicyano-p-hydroquinone. J. Chem. Soc., Faraday Trans. I 73 (1977) 1281–1285

(4) Eagle, H., G. E. Foley: The cytotoxic activity of carcinolytic agents in tissue culture. Am. J. Med. 21 (1956) 739–749

(5) Ensley, J. F., Z. Maciorowski, J. Crissman, S. Sapareto, C. Haas, D. Decker, T. Corbett, J. Jacobs, J. Kish, M. Al-Sarraf: Clinical correlation and technical problems encountered in flow cytometric examination of clinical specimens of advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. Int. Conference on Head and Neck Cancer, Baltimore/U.S.A., Abstract 94 (1984) 46

(6) Freudenthal, R. I., A. P. Leber, D. C. Emmerling, G. A. Kerchner, A. Ovejera: Comparison of the drug metabolizing enzymes in the liver and kidneys of homocygous nude Swiss and DBA/2 mice. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 15 (1976) 267–278

(7) Ganzer, U., G. Ryzmann, K. H. Vosteen: Kritische Überlegungen zur Zeitfolge der einzelnen Behandlungsschritte bei der Synchronisationstherapie bösartiger Geschwülste. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. 214 (1977) 291–202

(8) Hamburger, A. W., S. E. Salmon: Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 197 (1977) 461–463

(9) Heppner, G. H., D. L. Dexter, T. De Nucci, F. R. Miller, P. Calabresi: Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. Cancer Res. 38 (1978) 3758–3763

(10) Johns, M. E.: The clonal assay of head and neck tumor cells: Results and clinical correlations. Laryngoscope 92 (Suppl. 28) (1982) 1–26

(11) Kachel, V., E. Glossner, E. Kordwig, G. Ruhenstroh-Bauer: Fluvo-Metricell, a combined cell volume and cell fluorescence analyser. J. Histochem. Cytochem. 25 (1977) 804–812

(12) Kachel, V.: Sizing of cells by the electrical resistence pulse technique. Methodology and application in cytometric systems. In: Cell analysis. Catsimpoolas N. (ed.). Plenum Press, N.Y., London (1982) 195–331

(13) Knock, F. E.: Sensitivity tests for cancer chemotherapy. Arch. Surg. 83 (1961) 890–893

(14) Kondo, T.: Prediction of response of tumor and host to cancer chemotherapy. Natl. Cancer Inst. Monogr. 34 (1972) 251–256

(15) Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell. Biol. 66 (1975) 188–193

(16) Lampe, H. B., A. Flint, G. Wolf, K. McClatchey, J. Hudson: Flow cytometry: DNA analysis of squamous cell carcinomas in the upper aerodigestive tract. Int. Conference on Head and Neck Cancer. Baltimore/U.S.A., Abstract 65 (1984) 46

(17) Limburg, H., M. Krahe: Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neue Zytostatika. Dtsch. Med. Wochenschr. 89 (1964) 1938–1946

(18) Lindenberger, J., U. Ganzer, H. P. Fortmeyer: Die Heterotransplantation bösartiger Kopf- und Halsgeschwülste auf thymusaplastische nackte Mäuse. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. 220 (1978) 117–128

(19) Litterst, C. L., B. J. Sikic, E. G. Mimuaugh, A. M. Guarino, T. E. Gram: In vitro drug metabolism in male and female athymic, nude mice. Life Sci. 22 (1978) 1723–1730

(20) Mattern, J., K. Wayss, D. Haag, H. Toomes, M. Volm: Different growth rates of lung tumours in man and their xenografts in nude mice. Eur. J. Cancer 16 (1980) 289–291

(21) Mattox, D. E., D. D. v.Hoff: Culture of human head and neck cancer stem cells using soft agar. Arch. Otolaryngol. 106 (1980) 672–674

(22) Mattox, D. E., D. D. v. Hoff, G. M. Clark, T. B. Aufdemorte: Factors that influence growth of head and neck squamous carcinoma in the soft agar cloning assay. Cancer 53 (1984) 1736–1740

(23) Mattox, D. E., D. D. v. Hoff, I. Ramzy, H. D. Schantz, J. Buchok: The capillary cloning assay in head and neck cancer. Int. Conference of Head and Neck Cancer, Baltimore/U.S.A., Mai 1984 (1985) im Druck

(24) McAllister, R. M., R. W. Grunmeier, L. L. Coriell, W. S. Blakemore: A quantitative technique for the measurement of in vitro cytotoxity of 5-fluor-2-desoxyuridine (FUDR), nitrogen mustard (NH2), and other antitumor agents. Cancer 12 (1959) 938–943

(25) McCormick, K. J., W. R. Panje, S. Selzer, R. H. Merrick: Single agent chemotherapy for head and neck cancers. Arch. Otolaryngol. 109 (1983) 715–718

(26) Orsulakova, A., U. Ganzer, J. Lindenberger, R. Neusa, K. D. Stumpe: Die Bedeutung von Zellzyklusuntersuchungen für den Therapieplan bösartiger Tumoren. Arch. Oto-Rhino-Laryngol. 223 (1979) 406–409

(27) Raff, M. C.: Θ-bearing lymphocytes in nude mice. Nature 246 (1973) 350–351

(28) Raffael, A.: Charakterisierung von Peritonealmakrophagen des Meerschweinchens mittels der Durchflußzytometrie. Dissertation der LMU München (1984)

(29) Rheinwald, J. G., M. A. Beckett: Tumorgeneic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. Cancer Res. 41 (1981) 1657–1663

(30) Scheid, M. P., M. K. Hoffman, K. Komuro, U. Hämmerling, J. Abbot, E. A. Boyse, G. H. Cohen, J. A. Hooper, R. S. Schulof, A. L. Goldstein: Differentiation of T cells induced by preparations from thymus and nonthymic agents. The determined state of precursor cell. J. Exp. Med. 138 (1973) 1027–1032

(31) Schmähl, D.: Wert und Gefahr der Krebs-Chemotherapie. Dtsch. Med. Wochenschr. 88 (1963) 1463–1468

(32) Schumann, J., F. Ehring, W. Göhde: Cell synchronization in solid tumors. In: Recent results in cancer research. E. Grundmann, R. Gross (eds.) Vol. 52, Springer Verlag, Berlin, New York (1975) 206–214

(33) Seeber, S., C. G. Schmidt: Zum Problem der prätherapeutischen Sensibilitätsbestimmung von Tumoren durch Inkorporationsstudien in vitro. Klin. Wochenschr. 55 (1977) 1127–1136

(34) Singer, J. W., P. J. Fialkow, L. W. Dow, C. Ernst, L. Steinmann: Unicellular or multicellular origin of human granulocyte-macrophage colonies in vitro. Blood 54 (1979) 1395–1399

(35) Tropé C., K. Aspegren, S. Kullander, B. Astedt: Heterogenous response of disseminated human ovarian cancers to cytostatics in vitro. Acta Obstet. Gynecol. Scand. 58 (1979) 543–546

(36) Ugelstad, J., P. C. Mork: Swelling of oligomer-polymer particles. New methods of preparation of emulsions and polymer dispersions. Adv. Colloid Interface Science 13 (1980) 101–140

(37) Valet, G.: Graphical representation of three-parameter flow cytometer histograms by a newly Fortran IV computer program. In: Flow cytometry IV. O. Laerum, T. Lindmo, E. Thoraud (eds.). Universitetsforlaget, Bergen, Norway (1980) 125–129

(38) Valet, G., A. Raffael, L. Moroder, E. Wünsch, G. Ruhenstroh-Bauer: Fast intracellular pH determination in single cells by flow cytometry. Naturwissenschaften 68 (1981) 265–266

(39) Valet, G., H. H. Warneke, H. Kahle: New possibilities of cytostatic drug testing on patient tumor cells by flow cytometry. Blut 49 (1984) 37–43

(40) Volm, M., R. Spielhoff, R. Süss: Schnellbestimmung der DNS-Synthese mit H3-Thymidin. Naturwissenschaften 55 (1968) 390–391

(41) Wannenmacher, M., E. Esser, J. Glupe, J. Schumann: Klinische und experimentelle Untersuchungen zur Strahlenbehandlung inoperabler Tumoren nach Teilsynchronisation. Strahlentherapie 147 (1974) 1–9

(42) Wennerberg, J.: Changes in growth pattern of human squamous cell carcinoma of the head and neck during serial passages in nude mice. Int. J. Cancer 33 (1984) 245–250

(43) Wustrow, T. P. U., I. Schinko, J. Kerner: Electron-microscopical and functional studies of in vitro cultured head and neck cancer cell lines. Int. Conference on Head and Neck Cancer, Baltimore/U.S.A., Abstract 187 (1984) 45

(44) Wustrow, T. P. U., A. Raffael, G. Valet: Cytotoxic drug testing in Head and neck cancer by multiparametric flow cytometry. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 112 (1986) 1078–1084

Priv.-Doz. Dr. med. Thomas P. U. Wustrow
Oberarzt der Klinik und Poliklinik für
Hals-Nasen-Ohrenkranke
Universität München, Klinikum Großhadern
Marchioninistraße 15
8000 München 70