

Zytostatika Sensibilitätstestungen

H.H. Warnecke¹, G. Valet²

¹Frauenklinik Krankenhauszweckverband, Augsburg

²Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München

Summary

Different methods in drugtesting have different kinds of results. At the moment practicability is limited to big hospitals or institutions only because of time, money personnel and technical equipment required. First results of the clinical study (KSST) are rather disappointing. Future prospects, however of flowcytometry and other new methods are promising. All these methods must prove their practicability in everyday clinical work.

Einleitung

Bei der Chemotherapie bösartiger Erkrankungen ist es ähnlich wie in der Chirurgie und der Strahlentherapie: Die Ersttherapie entscheidet über das Schicksal des Patienten. Kommt diese nicht zum Tragen, entstehen oft Resistenzen und die Knochenmarksreserven erschöpfen sich. Angesichts einer schwer überschaubaren Fülle von Vorschlägen zur Chemotherapie ist die Hoffnung auf ein Testsystem verständlich. Es sollte zur Vermeidung überflüssiger Nebenwirkungen und hoher Therapiekosten schon frühzeitig eine Aussage über die individuelle Therapie getroffen werden.

Das Resistenzproblem

Das Problem der Zytostatika-Sensibilitätstestungen ist eng mit dem der Resistenz der Tumoren verknüpft. Dem Kliniker imponiert eine Resistenz als mangelndes Ansprechen auf eine antineoplastische Therapie. Diese kann chemotherapeutisch, hormonell oder immunologischer Natur sein. Mit klinischen Verlaufsbeobachtungen kann das Problem nur unvollständig erfaßt werden. (10).

Das Verhalten des Tumolvolumens nach einer antineoplastischen Therapie ist komplex. Nicht reaktive Zellen können erheblichen Anteil an einer Raumforderung haben. So sind auch Schrumpfungen des Tumors nicht nur von der Abtötung der Tumorzellen, sondern auch von Abräumreaktionen des Wirtes verursacht (Abb.) →

Der Titerverlauf einiger Tumormarker z.B. CEA kann paradox zum Ansprechen des Tumors sein.

Eine Tumorprogression kann durch Resistenz bedingt sein, aber auch durch Tumorheterogenität. Der onkologisch tätige Arzt unterscheidet mehrere Formen der Resistenz:

- A. Primäre Resistenz
- B. Erworbene Resistenz

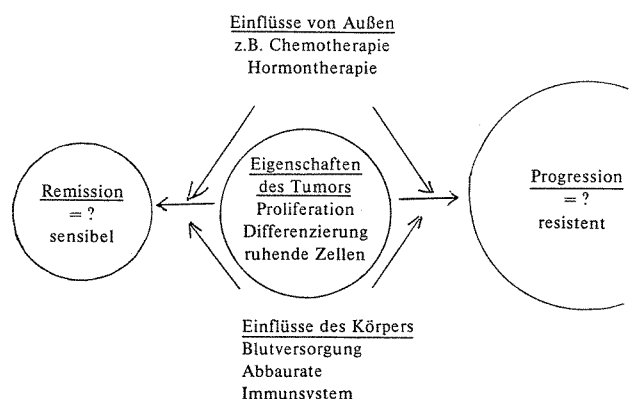
Ihre Ursache liegt in:

1. Kinetischer Resistenz
2. Kreuz- oder Pleiotroper-Resistenz
3. Resistenz durch Genamplifikation

Unter kinetischer Resistenz versteht man, daß im Gegensatz zu Tumoren mit hoher Wachstumsfraktion (z.B. bei embryonalen Karzinomen 90%), solche mit niedriger Wachstumsrate (z.B. Adenokarzinom 6%) kaum geheilt werden können. Hier setzt auch das Prinzip der adjuvanten Chemotherapie an. Die Tumorzellen sind postoperativ durch Wachstumshormon- und Wundheilungseinflüsse in eine zeitlich begrenzte Proliferation gekommen.

Dies kann, wie Studien zeigen, zu echten Heilungen führen, die später kaum mehr erreicht werden können (9).

Die Kreuz- oder Pleiotrope-Resistenz wird nach heutiger Auffassung durch Änderung der Membraneigenschaften hervorgerufen. Es können so die erforderlichen



Zytostatikakonzentrationen nicht mehr erreicht werden. Ursache scheint ein P-Glykoprotein zu sein, das durch ein mdr-Gen (multidrug-resistance) vererbt wird. Die Resistenz durch Genamplifikation bedingt eine Enzymvermehrung. Bekanntestes Beispiel ist die Resistenz gegen Methotrexat durch Vermehrung der Dihydrofolatreduktase.

Die Experimentalforschung hat uns Methoden aufgezeigt, die verschiedenen Resistenzen zu erkennen.

1. Klassische Tumorzellteste.
2. DNS-, S-Phase- und Proliferations-Untersuchungen.
3. Biochemische Untersuchungen zum Nachweis von Rezeptoren, P-Glykoprotein, Wachstumsfaktoren etc.
4. Genetische Methoden zum Nachweis wichtiger Gen-Abschnitte z.B. mdr, ras.

Im weiteren Verlauf meiner Ausführungen will ich mich nur mit den ersten beiden Gruppen beschäftigen. Schon frühzeitig haben Bemühungen eingesetzt, eine Aussage über die Empfindlichkeit der Krebszellen zu treffen:

Limburg	1964 (6)
Volm	1974 (17)
Bastert	1975, 1976 (2, 3)
Possinger	1976 (12)
Teufel	1977 (15)
Salmon u. Hamburger	1978 (13)
Bodgen	1979 (4)
Valet u. Warnecke	1984 (16)

Tab. 1

Was sagen die einzelnen Teste aus?

1. Der Test nach LIMBURG et al. hat wohl nur noch historische Bedeutung.
2. Der VOLM-Test oder Kurzzeittest in Einzelzellsuspension mit Einbau von radioaktiven Nukleotidpräkursoren.
Das Gewebe wird, falls kein Erguß vorliegt, zerkleinert. Es wird eine Einzelzellsuspension hergestellt, die 3 Stunden mit Zytostatika inkubiert wird. Anschließend wird 1 Stunde mit radioaktivem H3-Thymidin oder H3-Uridin inkubiert und im β -Counter gemessen.

Der Test vermag vor allem resistente Tumoren zu erkennen und hat den Vorteil, daß er so gut wie immer anwendbar ist. Der Test unterscheidet nicht zwischen den Krebszellen und den begleitenden Blut- oder Bindegewebszellen. Er mißt den Nucleotidumsatz, nicht die Zellvermehrung und nicht das Absterben der Tumorzellen. Dementsprechend ist er auch nur für Medikamente anwendbar, die in der S1- oder G1-Phase angreifen, nicht für Hormone, Mitosegifte, Kombinationen oder Strahlentherapie (11).

In den letzten Jahren hat es viele Abwandlungen dieses Testes gegeben. Eine große klinische Studie (Kooperative Studie für Sensibilitätstestung von Tumoren - KSST) läuft noch zur Zeit. An ihr wurden erstmals die praktischen Schwierigkeiten offenkundig (1, 8)

(Durchführbarkeit, Vergleichbarkeit, Ringversuch etc.) Erste Ergebnisse sind sehr ernüchternd. Es ließ sich keine signifikante Korrelation zwischen Testergebnis und Rezidivfreiheit oder gar Überlebenszeit beim Ovarialkarzinom zeigen. Beim Mammakarzinom korrelierte lediglich die Überlebenswahrscheinlichkeit mit der Einbaurate - einem lang bekannten Zusammenhang. Auch bei anderen Autoren ist eine gewisse Skepsis aufgetreten.

3. Der Stammzellassay oder Salmon-Hamburger-Test. Hier wird wieder eine Einzelzellsuspension hergestellt. Nach ca. 1stündiger Exposition mit Zytostatika wird die Suspension zur Anzüchtung auf einen speziellen Softagar gebracht. Die Kultur wird unter definierten Bedingungen bebrütet. Nach 2-6 Wochen ist eine Aussage möglich, wenn eine Mindestanzahl von Kolonien gewachsen ist. Es wird die Proliferation beziehungsweise ihre Hemmung gemessen, nicht die Absterberate oder der Stoffwechsel. Wegen der oft schlechten Angehraten ist die Anwendbarkeit des Testes begrenzt (50%). Auch hiervon gibt es wieder zahlreiche Variationen, z.B. eine Kapillarmethode oder kürzere oder längere Inkubationen. Auch die Auswertkriterien können differieren (Vitalitätsfärbungen).

4. Zellkultur und Auswertung mit Hilfe der Durchfluß-Zytophotometrie.

Diese Methode wurde von Prof. VALET und mir entwickelt. Sie hat das Ziel, so körperähnlich wie möglich zu testen, d.h. meist in körpereigenem Medium. Die Einzelzellsuspension wird mit Zytostatika versetzt und 6-7 Tage lang unter definierten Bedingungen kultiviert. Die Suspension wird dann mit einem Farbstoff versetzt, der uns die Esteraseaktivität und somit lebendig/tot anzeigt. Ein zweiter Farbstoff färbt die DNS und ermöglicht die S-Phase und Polyploidie-Beurteilung. Anschließend wird in einem 3-Kanal-Durchflußzytophotometer gemessen. Die Messung erfaßt außer toten und lebenden Tumorzellen Entzündungszellen (Lymphozyten, Granulozyten), Erythrozyten und Eichpartikel. Sie ist somit reproduzierbar. Die Aussage ist:

1. Der Zelltod. Er kann auch erstmals in Relation von Tumor- zu Immunzellen gesetzt werden.
2. Es können biochemische Änderungen in den Zellen gemessen werden (z.B. pH, Membranpotential, Antigene).
3. Es ist eine Beurteilung der Polyploidie und der S-Phase möglich.

4. Da keine Zellvermehrung notwendig ist, kann dieser Test fast immer eingesetzt werden. Aussagen über Strahlentherapie sind möglich. Auch Kombinationen können getestet werden. Mit geeigneten Kriterien müßte auch ein Hormoneffekt zu erfassen sein.

5. Tiermodelle werden entweder an der thymusaplastischen Nacktmaus oder als subrenaler Kapselassay bei der immunkompetenten Maus durchgeführt (2, 4).

Sie sind sehr aufwendig. Das Ergebnis liegt erst nach 8–12 Wochen vor. – Der Patient hat schon längst seine Chemotherapie erhalten. – Die Angehrate ist sehr begrenzt. Selbst beim Ovarialkarzinom liegt sie nur bei 34% (11). Dieser Test wird meist in der pharmakologischen Forschung eingesetzt. Es sind Hormon-, Kombinations- und Strahlentherapien möglich. Probleme bereitet mitunter die unterschiedliche Verträglichkeit der Medikamente in bezug auf den Menschen. Eine Aussage über die Sensibilität scheint möglich.

Was sagen diese Tests aus?

Meist werden Konzentrationsreihen der Zytostatika gemessen. In hohen Konzentrationen sprechen fast alle Tumorzellen an. Bei therapeutisch erreichbaren Konzentrationen ist die Reaktion sehr unterschiedlich. Es gibt empfindliche, mäßig sensible und resistente Tumore. Wiederholt man solche Messungen bei laufender Chemotherapie, so wird man oft feststellen, daß nach einiger Zeit der Tumor in seiner Empfindlichkeit abnimmt. In den meisten Fällen kann eine Resistenz richtig vorausgesagt werden. Das Kriterium der Empfindlichkeit ist an weiteren Körper- und Tumoreigenschaften gekoppelt wie Durchblutung, Tumormasse, Proliferationsrate, Stoffwechsellage und Immunreaktion. Diese Größen werden durch die bisher üblichen Tests kaum erfaßt. Die Durchfluß-Zytophotometrie bietet erstmals die Möglichkeit, simultan einige dieser Unbekannten mit abzuklären.

Das oben Gesagte gilt vor allem für stark proliferierende Tumore. Tumore mit langsamer Zellteilungsrate werden möglicherweise eher durch eine kontinuierliche Gabe der Zytostatika erfaßt. Von der theoretischen Seite könnte man sich für die langsam wachsenden Tumoren auch andere Therapie-Kautelen vorstellen, um die kinetische Resistenz zu überwinden (Stimulation mit Östradiol, Insulin oder Wachstumsfaktoren). Diese Zusammenhänge sind bisher nur ungenügend untersucht. Einige Medikamente scheinen auch nicht sofort zum Zelltod zu führen (man spricht vom transmittotischen Zelltod), sondern schädigen die Zelle subletal. Aus diesem Grunde haben einige Testsysteme Probleme mit cis-Platin. Die gefundene Empfindlichkeit entspricht nicht der klinischen. Noch ein Wort zum Immunsystem. Wie schon gesagt, kann das Zytophotometer Entzündungs-

zellen messen und differenzieren. Es ist so möglich, den Einfluß der Chemotherapie auf die körpereigene Abwehr zu erfassen. Neuere Arbeiten scheinen darauf hinzuweisen, daß über eine Lymphozytendifferenzierung auch eine Aussage über die Prognose des Patienten möglich ist. [Okt3, Okt8 Lymphozyten] (5).

Die zweite Gruppe der in der Übersichtstabelle aufgeführten Testmethoden scheint nach neueren Publikationen (14, 18, 19) sehr viel besser mit dem rezidivfreien Intervall oder dem Überleben zu korrelieren. Daher haben sich zunehmend namhafte Untersucher von den klassischen Tumorzelltesten weg gewandt und impulszytophotometrischen Messungen oder den älteren DNA-Messungen der Feulgenfärbung zugewandt. Mit beiden Methoden ist eine Prognose auf Grund von S-Phase- und Ploidie-Status möglich.

Berücksichtigt man, daß die Angehrate und die Koloniezahl der Stammzellteste auf Proliferation beruht, so kann dies auch als Prognosekriterium verwandt werden. Ähnliches gilt für H3-Thymidineinbaurate, dem Ti. In einer Studie konnte gezeigt werden, daß das Ansprechen auf eine Chemotherapie einen etwa doppelt so hohen Ti voraussetzt [15% vs 7,1%] (14). Ganz ähnlich sind die Zusammenhänge mit der Thymidinkinase. 87% der Patienten mit hoher Thymidinkinase sprachen auf eine Chemotherapie an, jedoch nur 13%, wenn die Enzymkonzentration im Tumor niedrig war (19).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die einzelnen Methoden unterschiedliche Aussagen treffen. Die Anwendbarkeit dürfte wegen des großen zeitlichen, finanziellen, personellen und technischen Aufwandes vorerst auf große Kliniken und Institute beschränkt sein. Die ersten Ergebnisse aus der klinischen Studie (KSST) sind eher enttäuschend.

Die Zukunftsperspektiven der Durchflußzytophotometrie und anderer neuerer Methoden sind sehr vielversprechend. Sie müssen aber erst ihre Anwendbarkeit auf den klinischen Alltag beweisen.

Literatur

- 1 G. Bartzke, H. Rössler, R. Kreienberg: Ergebnisse der Kurzzeit-Sensibilitätstestung maligner gynäkologischer und Mammakarzinomen. Archives of Gynecology and Obstetrics Vol 242, S 461, (1987)
- 2 Bastert, G.: Heterotransplantation menschlicher Tumoren, vorzugsweise Mammakarzinome, auf thymusaplastische nu/nu Mäuse. In wissenschaftliches und klinisches Testmodell. Habilitationsschrift Frankfurt (1976)
- 3 Bastert, G., H. Schmidt-Matthiesen, R. Gerner, D. Nord, R.T. Michel, G. Leppien: In-vitro-Testung der Sensibilität von Mammakarzinomen gegen Zytostatika. Dtsch. med. Wschr. 100, S 2035 (1975)
- 4 Bogden, A.E., P.M. Haskelk, D.J. Le Page, D.E. Kelton, W.R. Cobb and H.J. Esber: Growth of human tumor xenografts im-

- planted under the renal capsule of normal immunocompetent mice. *Exp. Cell. Biol.* 47, S 281 (1979)
- 5 Lelle, R.J., W. Heidenreich, H.H. Peter: Charakterisierung lymphoider Zellen durch monoklonale Antikörper bei Patientinnen mit gynäkologischen Karzinomen. *Onkologie* 9, S36 (1986)
 - 6 Limburg, H., M. Krahe: Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine Sensibilitätstestung gegen neuere Zytostatika, *Dtsch. med. Wschr.* 89, S1938 (1964)
 - 7 Look, A.T., F.A. Hayes, R. Nitschke, N.B. McWilliams, A.A. Green: Cellular DNA Content as a predictor of Response to chemotherapy in Infants with unresectable neuroblastoma, *N. Engl. J. Med.* 311, S231 (1984)
 - 8 Melchert, F., G. Bartzke, H. Rssler, R. Kreienberg: Welche Entscheidungshilfe bietet die Zytostatika-Sensibilitätstestung für den Einsatz der Chemotherapie bei Mamma- und Ovarialkarzinompatientinnen? In: *Aktuelle Geburtshilfe u. Gynäkologie*, Hrsg.: Melchert, F., Beck, L., Hepp, H. Knapstein, P.G., Kreienberg, R. Springer Verlag Berlin, S. 255 (1986)
 - 9 Nissen-Meyer, R., K. Kjellgren, K. Malmio, B. Mansson, T. Norin: Surgical adjuvant chemotherapy. Results with one short course with cyclophosphamide after mastectomy for breast cancer. *Cancer* 41, S2088 (1978)
 - 10 R. Osieka: Das Resistenzproblem in der medizinischen Onkologie. *Die gelben Hefte (Behring-Werke)* 3/87 S123 (1987)
 - 11 Pfeleiderer, A.: Testung der Tumorsensibilitt gegen Zytostatika in Ovarialkarzinom. Hrsg.: Zander, J., Urban u. Schwarzenberg München 1982
 - 12 Possinger, K., R. Hartenstein, H. Ehrhart: Resistenztestung von menschlichen Tumoren gegenüber Cytostatika, *Klin. Wschr.* 54, S 349 (1976)
 - 13 Salmon, S.E., A.W. Hamburger, B. Soehnen, B.G. Durie, D. Alberts, S. Moon, T.E.: Quantitation of differential sensibility of human-tumor stem cells to anticancer drugs, *N. Engl. J. Med.* 298, S 1321 (1978)
 - 14 Sulkes, A., Rb. Livingston, Wk. Murphy: Tritiated Thymidine labeling index and response in human breast cancer. *JNCI* 62, 513-515, (1979)
 - 15 Teufel, G., A. Pfeleiderer, O. Doerjer, J. Weigand: Untersuchungen über den Einbau von Nucleotid-Präkursoren in Einzellsuspensionen von Ovarial- und Zervixkarzinomen unter dem Einfluß von Zytostatika. *Arch. Gynäk.* 223, S163 (1977)
 - 16 Valet, G., H.H. Warnecke, H. Kahle: New Possibilities of Cytostatic Drug Testing on Patient Tumor Cells by Flow Cytometry. *Blut* 49, S37 (1984)
 - 17 Volm, M., K. Kaufmann, K. Wayss, K. Goertler, J. Mattern: Gezielte Tumor-Chemotherapie durch Onkobiogramme. *Dtsch. med. Wschr.* 99, S 38 (1974)
 - 18 Zajicek J., K. in Schwalm, G. Doderlein, K.H. Wulf: *Klinik d. Frauenheilkunde und Geburtshilfe*, Bd. 7 Urban und Schwarzenberg München 1979
 - 19 Zhang H.J., B.J. Kennedy, Dt. Kiang: Thymidine kinase as a predictor of response to chemotherapy in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 4, S221-225 (1984)

Anschrift der Verfasser

Dr. med. Dr. rer. nat. H.H. WARNECKE
Krankenhauszweckverband Augsburg
Frauenklinik
Stenglinstr. 1
D-8900 Augsburg