

# DIAGNOSE UND THERAPIE VON KREBSZELLEN – VERSUCH EINER ZUSAMMENARBEIT VON FORSCHUNG UND MEDIZIN

B. Krammer-Reubel

Universität Salzburg, Abteilung für Biophysik, Österreich

W. Gruber

LKA Salzburg, OA der Abteilung für HNO

## Projektbeschreibung

Trotz intensiver, jahrzehntelanger Krebsforschung in allen Teilen der Welt gelang hinsichtlich Verbesserung von Diagnose und Therapie von Krebs noch kein entscheidender Durchbruch. Sehr gute Arbeitsgruppen wie z. B. die um T. Hunter, J. M. Bishop, R. A. Weinberg, bringen schrittweise mehr Licht ins Geschehen der Krebsinitiation und -promotion. Diese Fakten, zusammen mit Erkenntnissen auf dem Gebiet der Immunologie, zeichnen ein immer komplexer werdendes Bild der Krebsentstehung, die von der subzellulären Ebene über die Physiologie des Menschen bis hin zu psychischen Faktoren in Wechselwirkung mit dem ganzen Menschen tritt. Um Krebsentstehung zu verhindern, könnte man bzw. muß man sogar auf mehreren Ebenen gleichzeitig ansetzen, die vom Ausschalten von Karzinogenen in der Umwelt bis zur Hilfe bei psychischer Disposition reicht. Um wirksamere Maßnahmen ergreifen zu können, muß zunächst einmal die Diagnose verbessert werden. Derzeit ist nur ein histologisch-cytologisch-physiologisch-immunologisch manifester Tumor erkennbar. Gibt es vielleicht schon vorher elektrophysiologische Veränderungen, die eine Frühdiagnose erleichtern könnten? Wie aus der Literatur schon bekannt ist, unterscheiden sich Tumor und Normalgewebe in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften wie Membranpotential und Membranwiderstand (1).

Bei der Diagnose „Krebs“ werden seit mehreren Jahrzehnten drei Hauptgruppen an konventioneller Behandlung angewandt: Operation, Strahlentherapie und chemische Therapie. Seitdem ist keine entscheidend neue Therapieform eingeführt worden, zumal auch viele hoffnungsvolle Ansätze (z. B. Interferon; monoklonale Antikörper, u. a.) in ihren therapeutischen Auswirkungen auf einige wenige Krebsarten beschränkt blieben. Um eine generell wirksame, neue Therapieart zu finden, die auf einem anderen Niveau als auf dem der malignen Zelle ansetzt – denkbar wäre auf einer der Ebenen der komplexen Immunabwehr – sind nicht nur neue

Ideen und das Verarbeiten neuester Erkenntnisse notwendig, sondern auch ein Forscherteam mit neuesten Techniken und praktisch unbegrenzten Geldmitteln. Da der universitären Forschung i. a. Geräte, Geldmittel und Personal nur in begrenztem Ausmaß zur Verfügung stehen, können auch nur relativ kleine Schritte in der Erforschung verbesserter oder neuer Krebstherapien unternommen werden, die aber für den Fortschritt wesentlich sein können. Unter die neueren Therapien fällt auch die Photodynamische (Laser)therapie (PDT), die zwar schon prinzipiell einige Jahrzehnte bekannt ist, aber erst seit einigen Jahren aufgrund verbesserter Technik weltweit erforscht wird. Die klinische Anwendbarkeit ist noch nicht ins Routinestadium übergegangen, da bezüglich der Photosensibilisatoren und deren Effekte auf Zellen und Gewebe nach Anregung durch Bestrahlung noch einige Forschungsarbeit geleistet werden muß.

Im vorliegenden Projekt sollen in den nächsten Jahren neue Methoden der Krebsdiagnose eingeführt und die Photodynamische Lasertherapie näher untersucht und verbessert werden.

Beginnend mit dem Projekt soll als Ausgangsmaterial für die Versuche neben *in vitro*-Zelllinien und Gewebe aus Tierversuchen, die an anderen Abteilungen durchgeführt werden, menschliches Gewebe in Kultur gebracht werden. Während Abfall von Tumoroperationen ohne weitere Kultivierung für frühdiagnostische Erkennungsversuche und einige Anwendungen der PDT verwendet wird, sollen die Gewebekulturen nach erfolgreicher Zellproliferation ausschließlich für Versuche mit der Photodynamischen Lasertherapie eingesetzt werden.

## **1. Untersuchung elektrischer Eigenschaften von Tumoren höheren Grades im Vergleich zu Normalgewebe desselben Patienten – Möglichkeiten einer Krebs-Frühdiagnose**

Die elektrophysiologischen Eigenschaften von Zellmembranen unterscheiden sich je nach Zellart, Zellzyklus, Änderung von zytobiologischen Parametern, Einfluß externer Parameter usw. Unterschiede im Membran-Ruhepotential (K-Potential) zeigen sich daher auch zwischen normalen und entarteten Zellen ein und desselben Zelltyps (1, 2, 3, 4, 5). Diese Kenntnis wird dazu verwendet, das Membran-Ruhepotential von Tumoren ab 3. Grad mit dem Normalgewebe desselben Patienten zu vergleichen. Als Referenzwert dient Normalgewebe von Patienten mit nicht maligner Erkrankung.

Dazu werden Operationsabfälle sofort nach der Operation verwendet. Die Stücke werden im Medium am Leben erhalten, bis sie innerhalb von wenigen Stunden mit der Methode der Transmembranruhepotential (TMRP)-Messung untersucht werden. Dabei sollen die elektrischen Membraneigenschaften von Tumoren unterschiedlicher Aggressivität festgestellt und eine mögliche Korrelation von TMRP und Tumorwachstumseigenschaften bzw. Metastasierungspotential, gemessen werden. Daneben sind die TMRP-Werte des Normalgewebes des erkrankten Patienten von Interesse: gibt es bereits eine elektrophysiologisch feststellbare „Entartung“ von histologisch, cytologisch und physiologisch normalen Zellen? Trägt

ein Krebskranker bereits die Information zur Entartung überall in sich? Frühere eigene Vorversuche mit kleinzelligen Karzinomen deuten diese Möglichkeit an (5).

Für den klinischen Bereich wäre von Bedeutung, daß durch elektrophysiologische Früh-Differenzierung und Früh-Diagnose höherer Entartungsstadien mittels Biopsieentnahme operative Eingriffe und verschiedene Therapieformen gezielter eingesetzt werden könnten. Es ist nicht bekannt, ob bereits Arbeiten anderer Autoren auf diesem Gebiet vorliegen.

## **2. Photodynamische Lasertherapie: neue Wege der Diagnose und Therapie von Tumoren**

Die photodynamische Lasertherapie bietet eine Alternative und Ergänzung zu den herkömmlichen Krebstherapien. Photosensibilisatoren wie die Hämato-porphyrin-Derivate (HPD), darunter z. B. die Wirk-Komponenten Photofrin II und DHE, reichern sich selektiv in Krebszellen der meisten Tumoren an, wenn sie durch das Blutssystem im Körper verteilt werden. 24–72 Stunden nach Applikation folgt eine Bestrahlung des Tumors mit Laserlicht (am besten mittels eines Farbstofflasers), wobei eine Wellenlänge von 400 nm die Photosensibilisatoren zur Fluoreszenz im Rotlichtbereich anregt und somit die Tumorzellen sichtbar macht. Dieser Umstand wird bereits während Operationen ausgenützt. Durch Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 630 nm werden die Photosensibilisatoren zum Zerfall und zur Produktion von phototoxischen Substanzen angeregt, die die Tumorzellen zerstören. Ein Einbau von HPD erfolgt auch in gesunden Zellen, doch in weit geringerer Rate.

Obwohl weltweit dazu bereits Forschungsarbeiten geleistet werden (6, 7, 8, 9, 10, 11), sind die Mechanismen, die bei den photodynamischen Vorgängen wirken, ziemlich unbekannt. Es wird angenommen, daß die besondere Selektivität des HPD auf seinen Gehalt an kovalent gebundenen Dimeren zurückzuführen ist, die bei ihrer Anlagerung an die Zellmembran zu Monomeren aufgespalten werden. Bei der Photosensibilisierung dürfte der Sensibilisator, durch die Absorption eines Photons im niedrigsten angeregten Singulettzustand befindlich, in den niedrigsten angeregten Triplettzustand übergehen und von da aus photochemische Reaktionen bewirken. Dabei wird Singulett-Sauerstoff mit der Möglichkeit der Umwandlung in andere reaktive Sauerstoffspezies wie z. B. das Hydroxylradikal oder das Sauerstoffanionradikal, gebildet, wodurch sich die Sauerstoffabhängigkeit der Prozesse erklären läßt (8, 9).

Innerhalb der Zelle scheinen HPD ihre Wirkung an der zellulären und mitochondrialen Membran zu entfalten. Mitochondrien- und Zellschwellung konnte beobachtet werden; Zellysis könnte als Ergebnis von Veränderungen der Zellmembran-Permeabilität entstehen. Aktiviertes HPD scheint auch auf mit den Mitochondrien assoziierte Enzymsysteme und auch auf die Mitochondrien selbst zu wirken, da es durch Einschränkung der Atmungsprozesse zum Zelltod kommt. Effekte auf die DNA sind angeblich reversibel (12) und von untergeordneter klinischer Bedeutung (wenig Nebenwirkungen!). Nach dem neuesten Forschungsstand (13)

gibt es jedoch Hinweise auf eine Schädigung der DNA durch verschiedene Photosensibilisatoren.

Unbekannt ist auch die Lokalisation des DHE innerhalb des Gewebes und damit der Ort des phototoxischen Zellschadens. Der Tumortod könnte wenigstens teilweise durch die Unterbrechung der Tumor-Blutversorgung mit folgender Hypoxie zustande kommen. Dafür spricht, daß sich DHE in vitro meistens nicht nur in Krebszellen anlagert, wo die Zellen gleichmäßig von der Nährlösung umspült werden.

HPD wird im klinischen Bereich sowohl als diagnostisches (Fluoreszenz) als auch therapeutisches Agens (Toxizität) angewandt. Es wurden bereits mehrere Testserien an Patienten (5000–6000 Patienten bis 1986) durchgeführt, wobei bei Tumoren an Oberflächen von inneren Organen ein Endoskop zum Heranführen der Lichtquelle verwendet wurde. Zur Bestrahlung im Gewebe werden Lichtleitfasern verwendet, die durch Kanülen in das Gewebe eingestochen werden. Die dabei entstehende geringe Wärmeentwicklung trägt zu einem positiv synergistischen Effekt von PDT und Hyperthermie bei. Als Nebeneffekte der PDT wurden gesteigerte Photosensitivität der Haut und Symptome ähnlich der Strahlenkrankheit festgestellt (12). Zudem dürfte sich HPD in Leber, Niere und Milz anreichern.

In dem geplanten Projekt soll die photodynamische Therapie in vitro untersucht werden. Als homogenes, standardisierbares Material dienen vorhandene Zellkulturen und tierische Organabfälle; um der klinischen Applikation näher zu kommen, werden menschliche Gewebeproben von Tumor und gesundem Gewebe desselben Patienten untersucht.

Das Projekt wird in 3 Stufen gegliedert:

1. Theoretisches Erarbeiten der photobiophysikalischen Grundlage und der verschiedenen Effekte auf zellularem Niveau aus der Literatur;
2. die Möglichkeiten des Einsatzes experimenteller physikalischer Nachweismethoden für die Dosimetrie (quantitativ) und für die Einbaukinetik (qualitativ) werden durchgedacht und bei geeigneten Methoden in die Praxis umgesetzt;
3. Erstellung von Dosis-Effekt-Kurven mittels in vitro-Versuchen mit Zellkulturen und Gewebeproben. Als Effekte bei gleichbleibender Dosis von HPD und Licht können zunächst Veränderungen mehrerer zellulärer Parameter qualitativ durchgetestet werden, bevor eine Auswahl eines relevanten Parameters erfolgt, um die quantitative Wirkung bei Veränderung der Dosis zu messen.

Die nach Applikation und Aktivierung des HPD interessanten zellulären Parameter – die Endpunkte – entsprechen denen, die bei Cytostatika-Testung allgemein angegeben werden (14, 15, 16, 17). Dabei werden Cytotoxizität, Lebensfähigkeit und Überleben untersucht.

Zur Messung der **Cytotoxizität** und **Lebensfähigkeit** gehören:

1. Untersuchung der Membranintegrität,
2. Messung der Atmung und Glycolyse,
3. Einbau von Radioisotopen,

Zur Messung des **Überlebens** gehören:

4. Clonogenität oder Kolonieformungstest,

5. Untersuchung über Spheroid-Beeinflussung,
6. Messung der Wachstumsrate,
7. Proteingehaltsbestimmungen.
8. Als neue Methode wird die Messung des elektrischen Widerstandes der Zellkulturen verwendet: das ist indirekt möglich über die Messung der Transmembranruhepotentials (TMRP).

Die Erforschung der Lokalisation und Wirkung von HPD in Zellen und im Gewebe kann bei uns durch die Messung folgender Parameter (parallel, alternierend oder alternativ) durchgeführt werden:

1. Messung der (elektrischen) Membraneigenschaften durch Trypan-Blue-Färbung und TMRP-Messung. (→ HPD soll speziell an der Membran wirken.)
2. Messung des Sauerstoffverbrauches der Zellen (intra- und extrazellulär), um die Sauerstoffabhängigkeit der HPD-Prozesse zu überprüfen.
3. Bestimmung der Wachstumsrate mittels Photometer, eventuell Einführung des Kolonieformungstestes.
4. Bestimmung des Proteinmusters von Membran und Plasma mittels Elektrophorese (im Aufbau).
5. Bestimmung von DNA-Schädigung: Messung von Einzel-, Doppelstrangbrüchen und der DNA-Syntheserate (noch nicht etabliert).
6. Messung der Einbaukinetik von HPD in die Zelle mittels Fluoreszenzmikroskopie.
7. Messung des Absorptionsspektrums des verwendeten Photosensibilisators.

## Projektziele

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen an Tumoren und entartetem Gewebe sollen Aufschluß darüber geben, inwieweit

- a) das Normalgewebe eines Tumorpatienten im Vergleich zum Normalgewebe eines Patienten mit nicht maligner Erkrankung einen bereits gestörten Metabolismus besitzt,
- b) Tumoreinstufung und Metastasierungspotential korrelierbar sind mit dem TMRP,
- c) das TMRP von Tumor und Normalgewebe desselben Patienten unterscheidbar sind.

Sollten die Ergebnisse signifikante Unterschiede ergeben, können sie praktisch im klinischen Bereich angewandt werden. Messungen an Biopsien sollen die konventionelle Diagnose ergänzen und eventuell frühdiagnostische Aussagen machen können, die die Therapie und Operation beeinflussen. Postoperative und -therapeutische Messungen können zur Kontrolle des Patienten dienen.

Das Ziel der Versuche mit der Photodynamischen Lasertherapie ist es, die Lokalisation und Wirkung der HPD zunächst von möglichst vielen Seiten zu erfassen, um dann eine Auswahl der sensiblen Methoden zur Erstellung von Dosis-Effekt-Kurven vorzunehmen. Diese Grundlagenerforschung der Photodynamischen

Lasertherapie soll die bestehenden Kenntnisse erweitern, um die klinische Anwendung zu erleichtern. Außerdem ist beabsichtigt, diese Therapie theoretisch an den LKA Salzburg einzuführen und eine Umsetzung in die Praxis zu initiieren.

## Methoden

### KULTIVIERUNGSMETHODEN:

#### In vitro Kultivierung von Biopsien und Operationsabfällen:

Basierend auf den bisherigen Untersuchungen (12, 13) wird folgendes Konzept durchgeführt: Gewebestücke von Tumoren und gesunden Bereichen des jeweils gleichen Patienten werden im Krankenhaus möglichenfalls steril entnommen, dort in vorbereitete Kulturflaschen mit BME-Medium und Zusätzen gelegt und in einem Inkubator bei 37 Grad ca. eine Woche aufbewahrt. Am besten eignen sich dazu Gewebestücke mit der Größe von 1 mm<sup>2</sup>. Bei Züchtung von Gewebeproben in Petrischalen wird ein Deckglas auf das Gewebestück gelegt, damit dieses durch den Druck leichter anhaftet. Nach einer Woche wird das Medium gewechselt und restliche Gewebestücke und Blut entfernt. Zu diesem Zeitpunkt sollen bereits Tochterzellen am Boden der Flasche angewachsen sein. In den weiteren Wochen werden diese Zellen regelmäßig gefüttert und sollen mit Hilfe der Wachstumsfaktoren im Serum zu proliferieren beginnen. Die Angeheute dieser Gewebestücke beträgt nach Angaben der Literatur nur wenige % und ist stark vom Gewebetyp abhängig (14, 15, 16, 17). Das Mischgewebe vor allem der Tumoren wird erst bei der weiteren Kultivierung aufgetrennt, indem einige Zelllinien absterben. Das Endresultat sollte eine homogene Kultur sein, die allerdings den Verhältnissen in vivo nicht mehr entspricht. Leider ist eine vollständige Homogenisierung und eine Identifikation der verschiedenen Zelltypen (wie Bindegewebe) meist nicht möglich, da eine genaue Unterscheidungsmethode fehlt.

#### Kultivierung von in-vitro-Zellkulturen:

Zellkulturen und Biopsien werden in BME-Medium mit HEPES-Buffer und folgenden Zusätzen bei 37 Grad Celsius inkubiert: 10% FCS, 1% L-Glutamine, 1% Non-essential Amino Acids, 1% Penicillin + Streptomycin.

Zum Subkultivieren und teilweise zum chemischen Zerlegen von Geweben wird eine Trypsin/EDTA-Mischung verwendet. Die Vitalität der Zellen wird mittels Färbung mit Trypan Blue und anschließendem Auszählen am Hämozytometer bestimmt.

Zur längeren Lagerung von Zellsuspensionen werden die Zellen nach Zugabe von DMSO in Gefrier Röhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

### IN-VITRO-MESSMETHODEN

#### Etablierte Methoden

##### 1. Transmembranruhepotential (TMRP)-Messungen:

Zur Messung des Ruhepotentials der Zellmembran wird eine Glasmikroelektro-

de mit KC1-Füllung und einem Spitzendurchmesser von  $0,5 \mu\text{m}$  in die Zelle eingestochen, wobei mit ferngesteuertem Mikromanipulator unter mikroskopischer Sichtkontrolle gearbeitet wird. Das Signal wird über einen Vorverstärker am Verstärker in  $-mV$  umgewandelt und am Schreiber ausgegeben, nachdem der Stromkreis über die Referenzelektrode geschlossen wurde.

## 2. Sauerstoffpartialdruckmessungen:

### Intrazellulär:

Die Messung des gelösten Sauerstoffs in der Zelle erfolgt an der Platinbeschichtung einer Glasmikroelektrode, die Reduktionsvorgänge registriert. Die Signalverarbeitung erfolgt mit einem Chemical Microsensor; der weitere Versuchsaufbau entspricht dem der TMRP-Messungen.

### Extrazellulär:

Die Messung des gelösten Sauerstoffs in einem durch die Meßkammer definierten Volumen der Nährlösung um die Zellen erfolgt mittels einer polarographischen Clark-Elektrode mit Platinbeschichtung und integrierter Referenzelektrode. Die Signalverarbeitung erfolgt mit dem Chemical Microsensor, der den Sauerstoffgehalt in % ausgibt.

## 3. Wachstumsmessungen mittels Photometer:

Die auf Titrierplatten wachsenden Zellen werden gefärbt und photometrisch gemessen: von einem die Titrierplatte durchstrahlenden Licht einer bestimmten Wellenlänge wird eine der Zellzahl proportionale Lichtmenge absorbiert und gemessen.

4. Membranintegritätsüberprüfung mit Hilfe von Trypan Blue Färbung: Die gefärbten Zellen werden am Hämozytometer gezählt.
5. Zeitliche Verfolgung des Einbaus und der Lokalisation von HPD in die Zelle durch Fluoreszenzanregung bei  $400 \text{ nm}$  und Emissionsmessung mittels Fluoreszenzmikroskopie.
6. Zur Anregung der HPD mit einer Wellenlänge von  $630 \text{ nm}$  ist ein He-Ne-Laser ( $1 \text{ mW}$ ) vorhanden.
7. Absorptionsmessungen werden mit einem Spektralphotometer durchgeführt.

## Methoden im Aufbau:

1. Bestimmung des Proteinmusters von Membran und Plasma mittels Elektrophorese: Diese Versuche werden zunächst mit Material aus Leber und Milz *in vitro* durchgeführt. Sollten sich meßbare Effekte zeigen, sind Erweiterungen auf folgende Materialien geplant: menschliche Operationsabfälle von Tumoren und gesundem Gewebe und/oder Material aus anderen Organen, das bei Tierversuchen anderer Abteilungen abfällt und/oder *in-vitro*-Zellkulturen.

## 2. Flow Cytometrie.

## Methoden, die aufgebaut werden können:

Bestimmung von DNA-Schädigungen über a) die Messung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Methode: Einbau von Ethidium-Bromid in die DNA, alkalische

„Unwinding“ und Messung im Fluorometer), b) die Messung der DNA-Syntheserate (Methode: Einbau von Tritium-Thymidin und Messung mit dem Scintillationszähler).

Die dazu benötigten Geräte sind bis auf ein Spektralfluorometer bereits vorhanden.

## **Konkrete Planung der Versuchsdurchführung in den ersten zwei Jahren**

### **Ausbau bestehender Kontakte zu folgenden Arbeitsgruppen:**

Arbeitsgruppe mit HPD-Forschung in München, Klinikum Großhadern (Prof. Jocham) und Zentrales Laserlabor, GSF Neuherberg (Dr. Unsöld); Arbeitsgruppe mit HPD-Forschung in Wien, Lainzer Spital, Abteilung f. Strahlentherapie (Prof. Alt); Arbeitsgruppe mit HPD-Forschung in Wien, Univ. f. Bodenkultur, Abteilung Chemie (Prof. Ebermann); Verschiedene Ärzte an den LKA Salzburg, vor allem von den Abteilungen HNO und Lunge.

Weitere Inlands- und Auslandskontakte werden gesucht, die vor allem auf Kongressen und in Kooperationen geschlossen und ausgebaut werden sollen.

### **Literaturstudien:**

Material ist über die UB, medizinische Bibliothek und die vorhandenen Kontakte zu beziehen.

Dabei soll nicht nur die aktuellste, spezielle Literatur gelesen werden, sondern auch die Grundlagen in Photophysik und -biologie vertieft werden.

### **Durchführung der Versuche:**

#### **1. In-vitro-Kultivierung von Biopsien und Operationsabfällen:**

Wird bereits nach der beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu werden wöchentlich maximal 20 Biopsien von Tumor- und Normalgewebe sofort nach Entnahme in Kulturflaschen und Petrischalen bei 37 Grad inkubiert. Das Medium darf die Proben gerade nicht bedecken, um ein Wegschwimmen des Materials zu verhindern. Die meisten Proben werden aus technischen Gründen eine Woche lang in einem Inkubator in der LKA gelagert, bevor sie weiter kultiviert werden. Einige Biopsien, die kurz nach der Entnahme abgeholt werden können, werden an unserem Institut mechanisch zerkleinert, in Petrischalen inkubiert und mit einem Deckglas beschwert. Weiter wird nach der beschriebenen Methode verfahren: Nach einer Woche werden die anhaftenden und auswachsenden Gewebestückchen weiter kultiviert, indem Blut- und Gewebereste mit dem alten Medium gegen neues Medium ausgetauscht werden. In den folgenden Wochen wird lediglich Medium gewechselt, das durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren die vom Gewebe auswachsenden und anhaftenden Zellen zum Proliferieren bringen soll.

#### **2. Untersuchung elektrischer Eigenschaften von Tumoren:**

Es wurden bereits mehrere TMRP-Meßserien von Tumoren und gesunden Ge-

wegen durchgeführt. Dazu werden Tumoren ab dem 3. Grad und Normalgewebe des gleichen Patienten verwendet, die ein- bis zweimal wöchentlich anfallen. Die Operationsabfälle werden sofort nach der Operation abgeholt, auseinander geschnitten, mit PBS gewaschen und in Petrischalen mit BME gelegt. Die TMRP-Messungen werden in beschriebener Weise am frischen Schnitttrand durchgeführt, da an den alten Gewebsrändern die Zellen bereits abgestorben sind. Mindestens 30 Einzeleinstiche mit der Mikroelektrode ins Gewebe sind erforderlich, um statistisch gut auswertbare und abgesicherte Ergebnisse zu erhalten.

Insgesamt sollen etwa 100 Proben von je einem Tumor und Normalgewebe desselben Patienten und mindestens 30 Proben als Referenzwert von Patienten mit nicht maligner Erkrankung gemessen werden.

### 3. Photodynamische Lasertherapie:

Im Rahmen der nächsten zwei Jahre sind die schon erwähnten drei Projektstufen geplant (s. S. 4)

Nach der Erarbeitung des theoretischen Hintergrundes aufgrund von Literatur sollte klarer werden, inwieweit Einsatz und Entwicklung neuer experimenteller Methoden für eine genauere Dosimetrie, die auf dem Zahlenverhältnis der photochemisch erzeugten Singulett-Sauerstoffmoleküle zu den eingestrahlenen Photonen beruht, notwendig und vor allem mit unseren Mitteln möglich ist. Derzeit wären direkte Lichtdosenmessungen am Bestrahlungsort mittels isotroper Lichtdetektoren erforderlich (10). Die Beobachtung der Einbaukinetik in Zellen (Fibroblasten) und Gewebeteile wird mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, wobei die Rotlichtfluoreszenz der mit 400 nm angeregten HPD in den Zellen ausgenützt wird. Nach Probedurchgängen, bei denen die Konzentration und Dosis des Photosensibilisators und die Energie und Dosis des Lichts für den jeweiligen Zelltyp optimiert wurde, sind einige Wochen für Beobachtung und Messung geplant.

Auf der 3. Stufe sollen Dosis-Effekt-Kurven *in vitro* erstellt werden. Wie schon erwähnt, wird zunächst die Wirkung des HPD, bzw. der verschiedenen Unterkomponenten an verschiedenen Parametern verschiedener Zelltypen erforscht. Die Messungen mit Mikroelektroden erfordern festsitzende Proben wie Fibroblastenkulturen oder menschliche Gewebeproben, die Messung des Sauerstoffverbrauchs und die Elektrophorese erfordern Zell-Suspensionen, die aus Abfällen von Tierversuchen (z. B. Leber, Milz, Muskel) und Operationen gewonnen werden können, die Vitalitätsüberprüfung und die Wachstumsversuche benötigen proliferierende Zellen in einer Zellkultur (Fibroblasten oder proliferierende Gewebeproben). Fibroblastenkulturen und Operationsmaterial liegen in normalem und transformiertem Zustand vor. Sollten die grundlegenden Wirkungen des HPD bei transformierten und nicht transformierten Zellen vergleichbar sein – was zu erwarten ist –, dann wird hauptsächlich „gesundes“ Material für die verschiedenen Versuche verwendet. Die zu untersuchende Probe wird mit HPD in einer Dosis von einigen  $\mu\text{g}/\text{ml}$  einige Minuten lang inkubiert, wobei die genaue Konzentration des HPD und die Inkubationszeit je nach Zell-

art und Untersuchungsparameter experimentell zu bestimmen sind. In einer Zeitspanne von einigen Sekunden bis Minuten danach erfolgt die Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 630 nm zur Anregung der phototoxischen Vorgänge mittels eines He-Ne-Lasers mit einer Leistung von 1 mW. Als Endpunkte werden TMRP, Sauerstoffpartialdruck in der Zelle, Sauerstoffverbrauch einer Zellsuspension, Wachstumseigenschaften mittels Photometer und die Vitalität über Trypan Blue Färbung untersucht (s. Methoden). Der extrazelluläre Sauerstoffverbrauch von Proben kann während der Photoaktivierung des HPD gemessen werden, indem nach 1–2 Stunden Meßzeit im Dunkeln der Laserstrahl durch das Klarsichtfenster der Meßkammer auf die Probe gerichtet wird. Elektrophorese wird in Probedurchläufen zur Identifikation von (Membran)proteinen eingesetzt.

Diese zellulären Effekte sollen je eine Woche lang abwechselnd untersucht werden. Danach werden die empfindlichsten Methoden ausgewählt, bzw. zusätzlich Methoden der DNA-Untersuchungen wie SSB- und DSB-Messung und Messung der DNA-Syntheserate etabliert. Sobald die zellulären Endpunkte festgelegt sind, werden Dosis-Effekt-Kurven erstellt, wobei als Dosis wahlweise die Art und/oder Konzentration des Sensibilisators und/oder die Photonenenergie, -zahl, bzw. -rate variiert werden kann. Die Präsenz von Sauerstoff kann auch eine Variable sein (10).

## Vorläufige Ergebnisse

### Elektrophysiologische Messungen an Tumoren und gesundem Gewebe:

In insgesamt ca. 1000 Einzelmessungen wurde bisher nach der beschriebenen Methode das TMRP von je 7 Tumor- und Normalgewebeproben desselben Patienten und 18 Proben von Patienten mit nicht malignen Erkrankungen gemessen. Die Messungen der Tumor- und entsprechenden Normalgewebeproben erfolgten in 5 Fällen 1–2 Stunden nach der Entnahme und in 2 Fällen 1–2 Tagen danach. Mittelwerte und Standardabweichung, die aus den ca. 30 Einzelmessungen einer Probe gebildet werden, können wegen zu geringer Datenmenge noch nicht statistisch ausgewertet werden. Eine Tendenz läßt sich dennoch aus der Tabelle (1) ersehen: die TMRP-Werte von Tumoren liegen bis zum Vielfachen über den Werten des „normalen“ Gewebes desselben Patienten, wenn die Messungen unmittelbar (1–2 Stunden) nach der Operation durchgeführt wurden. In den zwei Fällen, in denen die Messungen 1–2 Tage nach der Operation erfolgten, sind die Werte der beiden Proben gleich niedrig. Die TMRP-Werte der Proben von Patienten mit nicht malignen Erkrankungen liegen im Bereich der Tumorwerte und damit weit über den Normalgewebswerten der Krebspatienten.

Die Tumoren scheinen in ihrer metabolischen Aktivität ähnlich dem wirklich gesunden Gewebe zu sein, während das sog. „normale“ Gewebe des Krebspatienten einen verlangsamten (geschädigten?) Stoffwechsel haben könnte. Im allgemeinen läßt sich nämlich vom Membranruhepotential auf die Stoffwechselaktivität von Zellen schließen (3).

Tabelle 1: TMRP-Messungen an Tumor- und Normalgewebe desselben Patienten und von gesundem Gewebe (Patienten mit nicht maligner Erkrankung); (geometrischer) Mittelwert und (geometrische) Standardabweichung.

Probe	Gewebe	Mittelwert $\pm$ St.abw. (-mV)	geom. Mittelwert * geom. St.abw. (-mV)
Patient 1	Tumor	27.0 $\pm$ 22.4	19.6 * 2.3
	Normalgew.	14.2 $\pm$ 12.8	9.9 * 2.3
Patient 2	Tumor (*)	5.1 $\pm$ 2.0	4.7 * 1.5
	Normalgew.	5.5 $\pm$ 2.4	5.0 * 1.5
Patient 3	Tumor	14.9 $\pm$ 5.3	14.0 * 1.4
	Normalgew.	2.5 $\pm$ 2.1	1.9 * 1.9
Patient 4	Tumor	18.9 $\pm$ 6.0	18.0 * 1.4
	Normalgew.	6.3 $\pm$ 6.5	4.1 * 2.6
Patient 5	Tumor	5.9 $\pm$ 3.5	4.8 * 2.0
	Normalgew.	1.9 $\pm$ 1.1	1.7 * 1.7
Patient 6	Tumor (*)	4.5 $\pm$ 2.1	4.0 * 1.7
	Normalgew.	4.7 $\pm$ 1.1	4.6 * 1.3
Patient 7	Tumor	26.5 $\pm$ 8.0	25.2 * 1.4
	Normalgew.	15.0 $\pm$ 5.9	14.1 * 1.4
Patient 8	Tumor	16.9 $\pm$ 6.8	15.3 * 1.6
	Normalgew.	4.7 $\pm$ 2.7	4.1 * 1.7
Patient 9	ges. Gew.	17.2 + 6.2	15.9 * 1.5
Patient 10		20.9 + 9.6	18.0 * 1.6
Patient 11		8.8 + 1.9	8.6 * 1.3
Patient 12		10.6 + 3.7	10.0 * 1.4
Patient 13		11.5 + 2.7	11.2 * 1.3
Patient 14		17.6 + 4.4	17.0 * 1.3
Patient 15		20.7 + 4.3	20.3 * 1.2
Patient 16		9.9 + 3.0	9.5 * 1.4
Patient 17		16.4 + 10.2	14.0 * 1.8
Patient 18		21.2 + 8.5	19.5 * 1.5
Patient 19		11.8 + 3.3	11.4 * 1.3
Patient 20		13.8 + 3.9	13.2 * 1.4
Patient 21		15.3 + 3.3	14.9 * 1.3
Patient 22		20.5 + 8.6	18.9 * 1.5
Patient 23		12.9 + 3.9	12.3 * 1.4
Patient 24		14.1 + 3.3	13.6 * 1.3
Patient 25		10.9 + 3.1	10.5 * 1.3
Patient 26		13.0 + 4.0	12.4 * 1.4

(\*) Messung 1 2 Tage nach Entnahme

## Literatur

1. P. L. Altman, D. D. Katz (ed.), CELL BIOLOGY, Biological Handbooks, Bethesda, Maryland, 1976.
2. M. Tao (ed.), MEMBRANE ABNORMALITIES AND DISEASE, Vol. I and II, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
3. R. C. Niemtzw (ed.), MEMBRANE POTENTIALS AND CHARACTERISTICS OF IMMUNE AND TUMOR CELLS, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1985.
4. B. Reubel, D. Beran, Biophysikalische Meßmethoden zur Diagnose neoplastischer Transformation bei Lungenbiopsien, Jb. der Medizin, in press.
5. F. Steinhäusler, W. Huber, M. Huber, W. Wutz, Korrelation Zelltyp und Membranruhepotential beim Bronchuskarzinom, Proc. 18. J. Tagung der Österr. Ges. f. Lungenerkrankungen und Tuberkulose, Linz (1985): 153–154.
6. H. Schneckenburger, F. Pauker, E. Unsöld, D. Jocham, Intracellular distribution and retention of the fluorescent components of Photofrin II, Photobiochem. and Photobiophys. 10 (1985) 61–67.
7. J. F. Evensen, J. Moan, J. W. Winkelman, Toxic and phototoxic effects of tetraphenylporphinesulphonate and haematoporphyrin derivate in vitro, Int. J. Rad. Biol., 1987, Vol. 51, 3, 477–491.
8. G. Moreno, A. Atlante, C. Salet, R. Santus, F. Vinzens, Photosensitivity of DNA replication and respiration to haematoporphyrin derivative (Photofrin II) in mammalian CV-1 cells, Int. J. Rad. Biol., 1987, Vol. 52, 2, 231–222.
9. B. Röder, Möglichkeiten und Tendenzen bei der Entwicklung neuer Sensibilisatoren für die Photodynamische Therapie und Fluoreszenzdiagnostik von Tumoren, Z. Erkrank., Atm.org 1969 (1987), 218–228.
10. E. Unsöld, D. Jocham, Grundlagen photodynamischer Laser-Therapieverfahren, Chirurg (1988) 59, 76–80.
11. E. Unsöld, C. Ell, R. Sroka, S. Stocker, Fluorescence Diagnosis and Photodynamic Therapy-Evaluation of Sensitizers by Comparison of their Pharmacokinetics in PHOTOSENSITIZATION, MOLECULAR; CELLULAR AND MEDICAL ASPECTS, ed: G. Moreno, R. H. Pottier, T. C. Truscott, 1988, Springer-Verlag.
12. D. Jocham, persönliche Mitteilung.
13. R. Ebermann, persönliche Mitteilung.
14. R. I. Freshney (ed.), ANIMAL CELL CULTURE – A PRACTICAL APPROACH, IRL Press Oxford-Washington DC, 1896.
15. J. Paul, ZELL- UND GEWEBEKULTUREN, Walter de Gruyter Berlin–New York, 1980.
16. M. Kaufmann, F. Kubli, Gegenwärtiger Stand der Chemosensibilitätstestung von Tumoren, Dtsch.med.Wschr. 108 (1983) p. 150–154.
17. M. Axhausen, R. Matthias, Klinische Erfahrungen mit der in-vitro-Testung von Chemotherapeutika, HNO (1985) 33: 374–376.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Berichte der Naturwissenschaftlich-Medizinischen Vereinigung in Salzburg](#)

Jahr/Year: 1988

Band/Volume: [9](#)

Autor(en)/Author(s): Krammer-Reubel B., Gruber W.

Artikel/Article: [DIAGNOSE UND THERAPIE VON KREBSZELLEN - VERSUCH EINER ZUSAMMENARBEIT VON FORSCHUNG UND MEDIZIN. 135-146](#)