

Versuche zur Erweiterung der Möglichkeiten für In-vitro-Studien an menschlichen Tumoren

In-vitro-Modellen menschlicher Tumoren kommt ständig grössere Bedeutung zu. Untersuchungen über morphologische, biochemische oder genetische Besonderheiten, über die Invasivität und die Kontaktphänomene bei Tumorzellen sowie Studien über die Wirkungen von Zytostatika und ionisierenden Strahlen auf neoplastische Zellen erfordern leicht zugängliche, definierte und repräsentative Tumormodelle. Gegenwärtig stehen uns die Verfahren der Explantat-, Zell- und Organkultur als Möglichkeiten, In-vitro-Modelle zu erhalten, zur Verfügung.

Wir benutzen seit einigen Jahren In-vitro-Kulturen menschlicher Tumoren als Modell für Fragen der zytostatischen Behandlung maligner Neoplasmen. Die Zellkulturtechnik hat sich dabei zweifelsohne bewährt, dennoch demonstriert die Tabelle die Schwierigkeiten, die bei einer Reihe von Tumoren auftreten. Insbesondere die wichtigen Mammakarzinome lassen sich schlecht in vitro kultivieren. Darüber hinaus gibt es immer wieder Fälle, bei denen infolge der Entdifferenzierung in vitro Zweifel am repräsentativen Charakter der Kulturen auftreten. Versucht man, diese Schwierigkeiten zu umgehen, indem man diejenigen der zurzeit bekannten In-vitro-Techniken benutzt, die ein organotypisches Wachstum gewährleisten, muss man dafür erhöhten Aufwand und Einschränkungen der mikroskopischen Beobachtungsmöglichkeiten an den Kulturen in Kauf nehmen.

Diese Situation hat uns zu Bemühungen um die methodische Weiterentwicklung auf dem Gebiet der In-vitro-Untersuchung menschlicher Tumoren geführt.

Grundlegende Überlegung unserer Arbeit ist dabei folgendes: Wir versuchen, lebende, mikroskopisch dünne Schnitte aus dem Gewebematerial herzustellen, sozusagen «monolayer» zu schneiden, die wir dann nach den Methoden der Organkultur explantieren. Zu 20–30 µm starken, lebenden Gewebschnitten gelangen wir dabei, indem wir das frische Biopsiematerial schonend unter Erhaltung seiner Vitalität einfrieren und dann mit einem gewöhnlichen Gefriermikrotom schneiden.

Wichtigstes Problem unseres Versuchsprogramms ist die Frage, inwieweit es überhaupt möglich ist, Gewebeblöcke von den zum Schneiden notwendigen Dimensionen ohne grössere Vitalitätseinbusse einzufrieren und wieder aufzutauen.

Dieses Problem scheint sich lösen zu lassen. Als zweckmässige *Methode* des Einfrierens erwies sich folgendes Verfahren: Wir legen die Biopsiestücke von 0,5–1 cm Kantenlänge zunächst für 3 h in ein modifiziertes Parker-Medium 199¹, welchem 7% Dimethylsulfoxid zugesetzt werden. Danach werden die Gewebestücke, bedeckt mit Dimethylsulfoxid-Medium, in Ampullen eingeschmolzen, und anschliessend wird mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min auf –75 °C abgekühlt. Bei dieser Temperatur kann das Gewebe verbleiben, in vielen Fällen bewahren wir die Ampullen aber auch bei –196 °C in flüssigem Stickstoff auf. So eingefrorenes Gewebe bleibt vital.

Das Proteinsynthesevermögen, gemessen am Einbau von ¹⁴C-markiertem Leucin, betrug nach 7 Tagen Einfrieren noch etwa 50% des Wertes von frischem Gewebe.

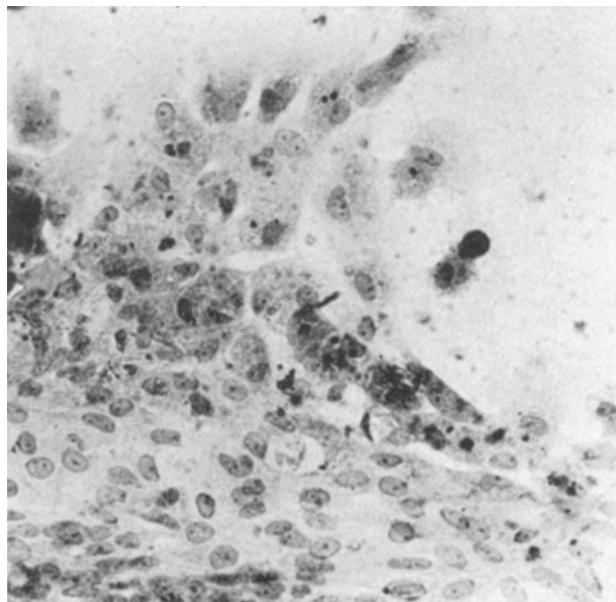
Trypsiniert man das eingefrorene und wieder aufgetaute Gewebe nach den üblichen Verfahren der Zellkulturtechnik oder legt daraus Explantatkulturen an, erreicht man ein gutes Wachstum. Die Figur zeigt eine intensiv wachsende Zellkultur aus 7 Tage lang eingefrorenem Gewebe.

Wir meinen, dass mit diesen Befunden eine ausreichende Grundlage für weitere Versuche auf diesem Gebiete

gegeben ist. Gegenwärtig bemühen wir uns um die Ausarbeitung geeigneter Techniken des Schneidens der eingefrorenen Gewebe und der Explantation der Schnitte. In einigen Fällen ist es uns bereits gelungen, eindeutig vitale Schnitte herzustellen. Die noch zu lösenden Probleme sind mehr technischer als grundsätzlich biologischer Natur.

In-vitro-Wachstum von Tumorzellen aus 158 soliden Tumoren und 42 neoplastischen Exsudaten

| Zahl | Tumorart | Gut-wachsende Kulturen | Angangsrate (%) |
|------|--|------------------------|-----------------|
| 42 | Exsudat | 35 | 83 |
| 30 | Mammakarzinom | 11 | 36,6 |
| 23 | LK-Metastase bzw. LK bei maligner Systemerkrankung | 12 | 52 |
| 18 | Weichteil- und Knochen-sarkome | 9 | 50 |
| 17 | Magenkarzinom | 3 | 18 |
| 12 | Bronchialkarzinom | 6 | 50 |
| 10 | Ovarialkarzinom | 4 | 40 |
| 9 | Maligne Struma | 8 | 89 |
| 5 | Hypernephrom | 4 | 80 |
| 4 | Melanom | 3 | — |
| 3 | Leukämisches Knochenmark | 1 | — |
| 3 | Hodentumor | 3 | — |
| 24 | Verschiedene maligne Tumoren | 13 | 54 |
| 200 | | 112 | 56 |



Primäre Zellkultur aus einem 7 Tage lang eingefrorenen Mammakarzinom der Ratte (Huggins-Tumor). H + E-Färbung.

¹ St. TANNEBERGER und G. BACIGALUPO, Dt. Gesundheitswesen 22, 11 (1967).

Die beschriebenen Versuche wurden mit dem Ziele durchgeführt, mittels der vitalen Gefrierschnitte das Repertoire der Möglichkeiten zum In-vitro-Studium menschlicher Tumoren zu erweitern. Darüber hinaus meinen wir, dass die Methode eventuell auch allgemein biologisch in folgenden Richtungen nützlich werden könnte: 1. Es könnte ganz generell möglich werden, vitale Gewebe exakt histologisch zu untersuchen. Das gefärbte histologische Präparat, das in jedem Falle eine Momentaufnahme darstellt, würde so durch die Betrachtung der Dynamik des lebenden Gewebes ergänzt werden können. 2. Vitale Gefrierschnitte könnten als Starter für organotypische Gewebekulturen verwendet werden. 3. Die Methode könnte ausreichend dünne, definierte Gewebe schnitte für biochemische, autoradiographische und ähnliche Untersuchungen liefern¹.

Summary. The paper describes some experiments designed to develop a new method for in vitro studies of human tumours. After having frozen the tissue carefully, maintaining its vitality, we cut living tissue slides of 20–30 μ thickness. Such slides may possibly be a tool for vital histology, a starter for organotypic tissue culture and a defined tissue specimen for biochemical, autoradiographical and similar studies.

St. TANNEBERGER

*Institut für Krebsforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin,
Bereich Robert-Rössle-Klinik, Abteilung Chemotherapie,
1115 Berlin-Buch (DDR), 27. September 1968.*

Analytisch-chemische Bestimmung nichtradioaktiver Stoffe mit einem Flüssig-Szintillationsspektrometer durch Radiolumineszenz und Absorptionsphotometrie im Čerenkov-Licht

Die heutzutage kommerziell erhältlichen Flüssig-Szintillationszähler stellen mit ihren zwei Photomultiplierröhren in Koinzidenzschaltung und den zugehörigen Verstärker- und Impulshöhenanalysatoren ein beträchtliches instrumentales Potential dar. Deshalb liegt es nahe, diese Apparate, die speziell für die Bestimmung der Radiotracer geschaffen wurden, auch für anderweitige Messungen einzusetzen¹. Es sollen hier drei Techniken kurz erörtert werden, die es erlauben, einen Flüssig-Szintillationszähler ohne jede Änderung für die chemische Bestimmung nichtradioaktiver Stoffe zu verwenden.

Die erste Technik beruht auf der Messung der Lumineszenz, die eine radioaktive Quelle in der zu untersuchenden Lösung hervorruft. Die von uns verwendete Quelle besteht aus einem dünnen elektrolytischen Belag von Plutonium-239 auf einem Platinblech von 11 × 9 mm, welches durch einen Stiel am Deckel einer gewöhnlichen Messflasche befestigt ist und senkrecht axial in die Lösung zu tauchen kommt. Die Emissionsrate beträgt 2×10^4 dps. Es wurde ein α -Strahler eingesetzt, um die Erzeugung von Čerenkov-Strahlung, die die Messergebnisse unübersichtlich gemacht hätte, zu vermeiden. Indessen zeigte sich ein weicher β -Strahler (^3H als tritiumindizierter Toluol) ebenso brauchbar. Zahlreiche organische Stoffe sind radiolumineszent und können dadurch in einer Lösung, die diese Eigenschaft sonst nicht aufweist, quantitativ bestimmt werden. So lassen sich z. B. Bruchteile eines Prozents Benzol oder Toluol in Cyclohexan mit einer relativen Genauigkeit von besser als 1% mühelos bestimmen. Umgekehrt können Stoffe, die in einer radiofluoreszierenden Lösung eine chemische Löschwirkung aufweisen, durch die Messung des Löschungsgrades ebenfalls quantitativ analysiert werden. So lassen sich einige Zehntelprozente Cyclohexen in Toluol oder Benzol mit der gleichen Präzision bestimmen. Der Messbereich erstreckt sich von 0–100% der genannten Komponenten. Die Methode ist besonders empfindlich für starke Löschagenzen; Biacetyl und Acetophenon können z. B. im 10^{-4} -bis- 10^{-3} -mg-Bereich einwandfrei quantitativ ermittelt werden. Ist keiner der Stoffe des zu analysierenden Systems radiolumineszent, so wird das betreffende Analysengut mit einer fluoreszierenden Lösung vermischt. Auf diese Weise lässt sich ein Cyclohexen-Cyclohexan-Gemisch in Toluol analysieren. Desgleichen kann der

Wassergehalt vom Äthylalkohol zwischen 0 und 5% Wasser durch Messung einer 100-mg-Probe in 20 ml einer Lösung, bestehend aus 19 ml Toluol + 0,2 ml Dioxan + 1 ml PPO/POPOP Szintillatorlösung, auf 0,1% genau ermittelt werden. Die Methode ist nicht spezifisch und eignet sich vor allem für die quantitative Bestimmung einer gegebenen Komponente in einer Mischung von bekannter qualitativer Zusammensetzung. Die Empfindlichkeit kann um einen Faktor 20–50 noch erhöht werden, wenn man die herkömmlichen Szintillationsmessflaschen durch Küvetten von 0,4–1 ml Inhalt ersetzt.

Die zweite Technik stellt eine Variante der Absorptionsphotometrie dar. Als Lichtquelle dient ein dickes Kapillarrohr aus Quarz, das am Deckel einer gewöhnlichen Messflasche axial befestigt ist. Das verwendete Čerenkov-Licht wird im Quarz durch die harte β -Strahlung eines im Kapillarraum eingeschlossenen radioaktiven Präparates erzeugt. Wir haben etwa 100 μc ^{90}Sr zusammen mit dem im radioaktiven Gleichgewicht befindenden ^{90}Y eingesetzt. Das Spektrum des emittierten Lichtes reicht vom IR bis zum UV, mit einer gleichmässig wachsenden Verteilungsdichte in Richtung der abnehmenden Wellenlängen. Der nützliche Bereich ist im wesentlichen durch die Durchlässigkeit der sich im optischen Wege befindenden Gerätewände sowie durch die spektrale Empfindlichkeit der Photomultiplierröhren bestimmt. Bei Verwendung einer genügend starken Quelle ist es möglich, durch Einlegen eines Lichtfilters zwischen Quelle und Lösung einen engeren Spektralbereich auszusondern. Eine Bestimmung geht derart vor sich, dass die Zählrate mit dem gewählten Lösungsmittel allein und sodann in Anwesenheit des betreffenden Stoffes gemessen wird, worauf die Konzentration des letzteren anhand einer früher aufgestellten Eichkurve ermittelt wird. Die Methode ist empfindlich und genau und zeichnet sich aus durch einen ausserordentlich ausgedehnten

¹ Dies wurde schon gemacht, siehe zum Beispiel die Mitteilung von S. ADDANKI, J. F. SOTOS und PH. D. REARICK in Anal. Biochem. 14, 261 (1966). Indessen wurde bisher lediglich über die Verfolgung chemilumineszierender Prozesse berichtet, wozu die Szintillationszähler wenig geeignet sind, da in jenem Falle einzelne Photonen statt Szintillationen emittiert werden.