

Wulf - Georg Drope

Dr. med. dent.

### **In vitro - Histokultur als Modellsystem zur gewebserhaltenden Kultivierung humaner Tumorzellen**

Geboren am 04. 03. 1968 in Freiburg/Brsg.

Reifeprüfung am 25. 04. 1989 in Mosbach

Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom WS 1991 bis SS 1997

Vorphysikum am 24. 03. 1993 an der Universität Heidelberg

Physikum am 28. 09. 1994 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Staatsexamen am 25. 07. 1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Labormedizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Fiehn

Der Einsatz von Monolayer - Zellkulturen ist für Chemosensitivitätstests von Tumorzellen nur bedingt geeignet, da ihre Etablierung unsicher und zeitaufwendig ist und sie bezüglich der Chemosensitivität vielfach von der in vivo - Situation abweichen.

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde in Kooperation mit der chirurgischen Universitätsklinik und dem Pathologischen Institut das sogenannte „Histokulturverfahren„ für humane Tumorzellen etabliert, bei dem die Zellen im originären Gewebeverband des Tumors belassen und Gewebepreparate auf Kollagenschwämmchen in Nährlösung kultiviert werden, wovon eine Annäherung an die in vivo - Situation bezüglich des Stoffwechsel- und Proliferationsverhaltens der Tumorzellen erhofft wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden 9 verschiedene Gewebe kolorektaler Karzinome in diesem System kultiviert. Zwei Präparate konnten wegen einer fungalen Kontamination nicht analysiert werden. Die übrigen Gewebe wurden mit den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil und Doxorubicin in verschiedenen Konzentrationen behandelt, die in etwa therapeutisch wirksamen Plasmaspiegeln entsprachen. Die Messung des Glucosespiegels im Kulturmedium jeweils beim Medienwechsel wurde als eine nicht

invasive Methode verwendet, um die Viabilität und Chemoresponsivität der kultivierten Gewebe zu beschreiben. Am Ende des dreiwöchigen Kulturzeitraums wurde eine Messung des MTT – Umsatzes in den kultivierten Proben durchgeführt. Mit diesem Test wird die mitochondriale Stoffwechselaktivität untersucht. Er geht allerdings mit dem Untergang des untersuchten Gewebes einher.

Es konnte mit beiden Verfahren gezeigt werden, daß das Kultivierungsverfahren über mindestens drei Wochen den Erhalt stoffwechselaktiven Gewebes ermöglicht, mit einem im wesentlichen konstanten Glukoseverbrauch. Interessanterweise zeigten Gewebe verschiedener Primärtumoren einen deutlich unterschiedlichen Glucoseumsatz pro mg kultivierten Gewebes, der jedoch nicht mit der Proliferationsaktivität (MIB-1), Tumorstadium oder histologischem Typ korrelierte.

Der in der vorliegenden Studie angewandte MTT - Test zum Nachweis von Stoffwechselaktivität und Chemosensitivität zeigte neben der Viabilität der Kulturgewebe auch eine deutlich erkennbare Dosis – Wirkungsbeziehung bei Anwendung von 5-Fluorouracil, dagegen aber eine weitgehende Resistenz des Tumorgewebes gegen Doxorubicin. Dieser Befund spiegelte die klinische Wirksamkeit von 5-Fluorouracil im Gegensatz zu dem bei dieser Erkrankung wirkungslosen Doxorubicin wider und war damit ein zusätzlicher Indikator für den Erhalt differenzierten Tumorgewebes über den Kulturzeitraum. Die Untersuchungsparameter Glucoseverbrauch und MTT - Extinktion zeigten ähnliche, aber nicht in allen Fällen übereinstimmende Veränderungen in den behandelten Proben gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Dabei fand sich überraschenderweise eine Korrelation zwischen hoher Chemoresponsivität und dem Vorliegen einer p53-Überexpression sowie erhöhter MIB - Werte in den Primärtumoren.

Weiterführende Studien müssen zeigen, welche Bedeutung den abweichenden Ergebnissen zwischen MTT - Inhibition und den GC - abgeleiteten Werten zukommt und ob sich die Beziehungen der Chemosensitivität zum p53- und MIB-1 Status an einer größeren Fallzahl bestätigen lassen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen jedoch einen Einsatz des Histokultursystems für die experimentelle Testung neuer biologischer und genterapeutischer Ansätze als eine vielversprechende Möglichkeit zur präklinischen Testung neuer Therapieverfahren erscheinen.