

Wachstumsverzögerung und Tumorheilung nach Bestrahlung experimenteller Tumoren: Einfluß des Tumorstromas, genetischer Faktoren sowie strahlen- und chemotherapeutischer Vorbehandlungen

W. Budach, Tübingen

Einleitung und Fragestellung

Menschliche Tumoren sprechen auf Bestrahlung mit ionisierenden Strahlen sehr heterogen an. Selbst in der Primärbehandlung von Tumoren des gleichen histologischen Subtyps sind erhebliche interindividuelle Unterschiede erkennbar. Es gibt keine Informationen darüber, ob diese Heterogenität ausschließlich Folge der im Laufe der Tumorgenese stattfindenden Mutationen oder teilweise auch primär bestehender genetischer Unterschiede zwischen den Patienten ist. Eine Reihe von genetischen Syndromen, die mit einer mehr oder minder ausgeprägten Veränderung der Strahlenempfindlichkeit von Fibroblasten *in vitro* einhergehen, wurden bereits beschrieben. Fibroblasten- und Lymphozytenkulturen von zufällig ausgewählten Probanden unterscheiden sich signifikant in ihrer Strahlenempfindlichkeit, ohne daß erkennbare genetische Leiden vorliegen. Die Heterogenität der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren könnte teilweise in der Heterogenität der Normalgewebe begründet sein. Eine Korrelation zwischen der Strahlenempfindlichkeit von Normal- und Tumorgeweben würde diese Hypothese untermauern und gleichzeitig auf die Möglichkeit einer Prädiktion der Strahlenempfindlichkeit von Tumoren durch die Untersuchung von Normalgeweben hinweisen.

Das Tumorstroma, insbesondere die Endothelzellen von Tumorgefäßen, werden als "Target" für eine Strahlenbehandlung angesehen, da eine Schädigung der Endothelzellen indirekt auch die von dem betreffenden Gefäß abhängigen Tumorzellen beeinträchtigen kann. Ob die Gefäßschädigung tatsächlich zur Vernichtung einer wesentlichen Anzahl von Tumorzellen führt, konnte bisher auch in experimentellen Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden. Der Nachweis einer signifikanten Zerstörung von Tumorzellen durch die Strahlenreaktion des Stromas würde Modalitäten, die eine zusätzliche Schädigung von Endothelzellen herbeiführen, einen hohen Stellenwert in zukünftigen Therapiekonzepten zuweisen.

Vorbehandlungen von Tumoren mit Chemotherapie und möglicherweise auch mit Strahlentherapie können zur Induktion einer sekundären Resistenz der

Tumoren gegenüber weiterer Therapie führen. Ifosfamid und Adriamycin sind bei der chemotherapeutischen Behandlung von Weichteilsarkomen die effektivsten Substanzen. Die Auswirkung einer in klinischen Therapiekonzepten vorgesehenen, über mehrere Monate andauernden Chemotherapie auf die Wirksamkeit einer nachfolgenden Strahlentherapie ist weitgehend unbekannt.

Intensivierte Behandlungsprotokolle für lokal weit fortgeschrittene Weichteilsarkome versuchen zunehmend den Gesamtbehandlungszeitraum für Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie zu verkürzen. Dadurch werden Strahlen- und Chemotherapie teilweise simultan oder in kurzen Zeitabständen verabreicht. Der Einfluß dieses Vorgehens auf das Ansprechen von humanen Weichteilsarkomen auf die lokale Bestrahlung wurde bisher kaum untersucht.

Folgende Fragestellungen wurden daher experimentell untersucht:

1. Sind Tumoren, die in genetisch veränderten und dadurch ungewöhnlich strahlenempfindlichen Normalgeweben entstehen, ebenfalls ungewöhnlich strahlenempfindlich?
2. Welchen Einfluß hat die Strahlensensitivität der Stromalen Zellen eines Tumors auf das Ansprechen eines Tumors auf Bestrahlung?
3. Verändert eine länger anhaltende Vorbehandlung mit Strahlentherapie oder Chemotherapie das Ansprechen von Tumoren auf Bestrahlung?
4. Welchen Einfluß hat eine unmittelbar vor Bestrahlung eingesetzte Chemotherapie auf das Ansprechen eines Tumors?

Methodik und Ergebnisse

Zur Beantwortung der o.g. Fragestellungen wurden außer Zellkulturen vorwiegend experimentelle Tumoren murinen und humanen Ursprungs in verschiedenen Mausmodellen untersucht. Neben den voll immunkompetenten C3H-Mäusen wurden auch Labormäuse mit verschiedenen Keimlinienmutationen, die einerseits das Immunsystem und andererseits die Strahlenempfindlichkeit der Tiere beeinflussen, eingesetzt. Die Defekte im T-Zell System von Nacktmäusen (nu/nu) und im T- und B-Zell System von SCID-Mäusen (Severe Combined Immunodeficient) verhindern weitgehend die Abstoßung von humanen Geweben und ermöglichen die Untersuchung von humanen Tumoren auf der Maus. Eine erstmals im Jahr 1990 beschriebene Einzigartigkeit der SCID-Mäuse, die etwa um den Faktor drei erhöhte Strahlensensitivität ihrer Normalgewebe, ist eine weitere wichtige Voraussetzung zur Untersuchung des Einflusses stromaler und genetischer Faktoren auf das Ansprechen von Tumoren auf Bestrahlung.

ad 1. Zur Beurteilung der Auswirkung genetischer, die Strahlenempfindlichkeit

beeinflussender Veränderungen von Normalgeweben auf die Strahlenempfindlichkeit der in diesen Geweben entstehenden Tumoren wurden Normal- und Tumorgewebe von "Severe Combined Immunodeficient" (SCID) Mäusen und herkömmlichen Labormäusen (C3H) in vivo und in vitro auf ihre Strahlenempfindlichkeit untersucht. Nach Einzelbestrahlungen der Haut war die erforderliche Dosis zur Erzeugung einer feuchten Epitheliolyse bei SCID-Mäusen um den Faktor 1,7-3,7 geringer als bei C3H-Mäusen. Die letale Dosis für 50% der bestrahlten Tiere nach Ganzkörperbestrahlung mit Einzeldosen war 3 Gy in SCID- und 7,8 Gy in C3H-Mäusen, entsprechend einem Verstärkungsfaktor von 2,6. Die Strahlenempfindlichkeit embryonaler Fibroblasten von SCID- und C3H-Mäusen wurde in vitro im Kolonieüberlebenstest gemessen. Die Fibroblasten von SCID-Mäusen waren dreimal so strahlenempfindlich wie die Fibroblasten von C3H-Mäusen.

Zur Gewinnung von Tumorgewebe wurde das in Nagetieren hochpotente Karzinogen Methylcholanthren intramuskulär in Tiere beider Mäusestämme injiziert. Nach 70 bis 140 Tagen konnten aus allen behandelten Tieren undifferenzierte Weichteilsarkome am Injektionsort exzidiert und in vitro auf Plastik etabliert werden. Das Zellüberleben nach Einzelbestrahlung in vitro wurde für sieben SCID- und fünf C3H-Tumorzelllinien gemessen. Tumorzelllinien von SCID-Mäusen waren durchschnittlich um den Faktor 2,7 strahlenempfindlicher als die von C3H-Mäusen. Jeweils zwei SCID- und zwei C3H-Tumorzelllinien wurden zusätzlich in vivo auf SCID-Mäusen untersucht. Die auf dem rechten Hinterbein der Mäuse wachsenden Tumoren wurden dazu unter akut hypoxischen Bedingungen mit unterschiedlichen Einzeldosen bestrahlt, um Dosis-Wirkungskurven für Wachstumsverzögerung und Tumorheilung zu erstellen. Unabhängig vom Endpunkt der Untersuchungen waren SCID-Tumoren 2,6 mal so strahlenempfindlich wie C3H-Tumoren. Der Unterschied in der Strahlenempfindlichkeit der Normalgewebe zwischen SCID- und C3H-Mäusen konnte in gleicher Ausprägung auch für Tumorgewebe in vivo und in vitro nachgewiesen werden. Die Strahlenempfindlichkeit der Normalgewebe war in diesem experimentellen Modell damit prädiktiv für die Strahlenempfindlichkeit der Tumoren.

- ad 2. Zur Bestimmung des Einflusses der Strahlenempfindlichkeit des Tumorstromas auf das Ansprechen von Tumoren auf Bestrahlung wurden sechs murine und drei humane Tumorzelllinien mit bereits in Koloniebildungstests in vitro bekannter, sehr unterschiedlicher Strahlenempfindlichkeit untersucht. Zellsuspensionen dieser Zelllinien aus exponentiell wachsenden in vitro Kulturen wurden in das Subkutangewebe von zwei immundefizienten Mäusestämmen, einerseits den Nacktmäusen und andererseits den SCID-Mäusen eingebracht, die sich um den Faktor drei in der Strahlenempfindlichkeit ihrer Normalgewebe

unterscheiden. Die entstehenden Tumoren wurden jeweils auf eine größere Anzahl von Mäusen des gleichen Stammes weitertransplantiert. Dieses Vorgehen garantierte, daß die Tumoren der gleichen Zelllinie entweder von dem strahlenempfindlichen Stroma der SCID-Mäuse oder vom weniger empfindlichen Stroma der Nacktmäuse versorgt wurden. Anschließend wurden die Tumoren unter akut hypoxischen Bedingungen, d.h. mit abgeklemmter Blutzufuhr mit unterschiedlichen Einzeldosen bestrahlt. Das Ausmaß der Wachstumsverzögerung und die Wahrscheinlichkeit der lokalen Tumorkontrolle wurden für alle Dosisgruppen und Tumorlinien in beiden Mäusestämmen bestimmt. Die Dosen für eine 50%ige Wahrscheinlichkeit der lokalen Tumorkontrolle waren in den strahlenempfindlichen SCID-Mäusen nicht signifikant niedriger als in den Nacktmäusen. Die Dauer der Tumorrückbildung war dagegen auf SCID-Mäusen durchschnittlich um 27% länger als auf Nacktmäusen. Die dreimal so hohe Strahlenempfindlichkeit des Tumorstromas in SCID-Mäusen hatte keinen Einfluß auf die Tumorheilungswahrscheinlichkeit in einer Gruppe humaner und muriner Tumoren. Der strahleninduzierte Schaden an Tumorgefäßen und Endothelzellen trägt nicht in signifikanter Weise zur Tumorzellabtötung bei, kann allerdings den Zeitraum der Tumorremission verlängern.

- ad 3. Um den Einfluß einer lang andauernden chemotherapeutischen. oder strahlentherapeutischen Vorbehandlung zu ermitteln, wurde zunächst eine Gruppe von 16 auf der Nacktmaus etablierter humaner Weichteilsarkome auf ihre Empfindlichkeit auf Ifosfamid, Adriamycin, Dacarbazin und Cisplatin untersucht. Isotoxische Einzeldosen der genannten Zytostatika wurden den tumortragenden Tieren verabreicht und das Ausmaß der Wachstumsverzögerungen bestimmt. Nur zwei Tumorlinien reagierten sowohl auf Ifosfamid, Adriamycin und Dacarbazin empfindlich, keine Tumorlinie war gegen alle Chemotherapeutika empfindlich. Eine der beiden primär chemosensiblen Tumorlinien, ein schlecht differenziertes neurogenes Sarkom wurde zur Erzeugung einer sekundären Resistenz in bis zu 18 aufeinanderfolgenden Tumorpässagen auf der Maus mit Ifosfamid, Adriamycin oder Bestrahlung behandelt und die Wachstumsverzögerung dokumentiert. Auf Ifosfamid und Adriamycin trat bereits nach wenigen Vorbehandlungen eine Resistenz ein, die sich mit zunehmender Anzahl der Vorbehandlungen noch verstärkte. Nach sieben bis dreizehn weiteren Tumorpässagen auf der Maus ohne Selektionsdruck durch Chemotherapie war diese Resistenzbildung noch in unveränderter Ausprägung nachweisbar. Dagegen führten strahlentherapeutische Vorbehandlungen in 17 aufeinanderfolgenden Passagen zu keiner signifikanten Resistenz gegenüber weiterer Strahlenbehandlung. Die sekundäre Resistenz auf Ifosfamid und Adriamycin hatte keine Resistenzbildung gegenüber Strahlenbehandlung zur Folge, unabhängig davon, ob Wachstumsverzögerung oder Tumorheilung als Endpunkt der Untersuchungen

gewählt wurde.

- ad 4. Die Veränderung des Ansprechens von Tumoren auf Strahlenbehandlung durch eine unmittelbar zuvor verabreichte Chemotherapie mit Ifosfamid oder mit Adriamycin wurde an zwei chemo- und strahlenempfindlichen humanen Weichteilsarkomen auf der Nacktmaus untersucht. Isoeffektive Dosen von Ifosfamid oder Adriamycin, die ohne zusätzliche Bestrahlung eine spezifische Wachstumsverzögerung von 10 bewirken, d.h. die klonogenen Zellen der Tumoren um ca. drei Dekaden dezimieren, wurde den tumortragenden Tieren entweder 48 Stunden oder 1 Stunde vor der lokalen Bestrahlung des Tumors verabreicht. Die Bestrahlung der Tumoren erfolgte mit unterschiedlich hohen Einzeldosen unter akut hypoxischen Bedingungen.

Die aus der Kombination beider Modalitäten zu erwartende Verringerung der Strahlendosis für eine isoeffektive Wachstumsverzögerung oder Tumorheilungswahrscheinlichkeit war bei beiden Sarkomlinien geringer als rechnerisch vorhergesagt. Bei diesen Kalkulationen wurde die spezifische Wachstumsverzögerung zugrunde gelegt, bei der die beobachteten Wachstumsverzögerungen auf die Tumorverdopplungszeiten der unbehandelten Kontrolltumoren normiert werden. Die beobachteten Tumorverdopplungszeiten der Rezidivtumoren nach alleiniger Chemotherapie waren bei den beiden untersuchten Tumorkomlinien allerdings um den Faktor zwei verlängert. Durch Normierung der spezifischen Wachstumsverzögerung auf diese prolongierten Tumorverdopplungszeiten gelang eine weit bessere Vorhersage der tatsächlich beobachteten Effekte der Kombinationsbehandlung. Adriamycin zeigte in beiden Sarkomlinien eine annähernd additive Wirkung, wohingegen nach Ifosfamid bei einer Sarkomlinie ein unteradditiver und bei der anderen Sarkomlinie ein überadditiver Effekt in Kombination mit Bestrahlung erkennbar war. Die Wirkungen ließen sich gleichermaßen auf dem Endpunkt der Wachstumsverzögerung und der Tumorheilung nachweisen. Die Heterogenität der Ergebnisse mit Ifosfamid weisen darauf hin, daß - bei gleicher Wirksamkeit des Zytostatikums als Einzelmodalität - die Kombination mit Bestrahlung in Abhängigkeit von der Tumorkomlinie, selbst bei Tumoren der gleichen Entität, zu nicht vorhersehbaren Interaktionen führen kann.

Schlußfolgerungen

Der Einsatz experimenteller Tumoren auf Mäusen mit definierten Keimlinienmutationen, die das Immunsystem und die Strahlenempfindlichkeit der Tiere betreffen, ermöglicht die Aufklärung komplexer Wechselwirkungen zwischen Normal- und Tumorgewebe, die mit in vitro Methoden bisher nicht untersucht werden können. Der hohe Stellenwert von Tiermodellen wird dadurch unterstrichen.

Die wichtigsten Schlußfolgerungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Strahlenempfindlichkeit von Normalgeweben ist im experimentellen Modell prädiktiv für die Strahlenempfindlichkeit von Tumoren der entsprechenden Normalgewebe. Das Tumorstroma, insbesondere Endothelzellen, sind kein "Target" bei der Vernichtung schnell wachsender Tumoren durch Bestrahlung. Intensive und lang anhaltende chemotherapeutische Vorbehandlungen führen nach den vorliegenden Untersuchungen zu keiner Veränderung der Strahlensensitivität des Tumors, wohingegen bei simultaner Strahlen- und Chemotherapie nicht vorhersehbare Interaktionen auftreten können.