

# Versuche zur lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion der Krebszellenschädigung

Experiments to the Lysosomal Cytolysis Chain Reaction of Cancer Cells Damage

M. von Ardenne und P. G. Reitnauer

Mitteilung aus dem Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden-Weißer Hirsch

(Z. Naturforsch. **29 c**, 425–432 [1974] ; eingegangen am 8. März 1974)

Cytolysis Chain Reaction, Multi-step Cancer Therapy, Hyperthermia, Hyperacidification,  
Ehrlich Ascites Carcinoma

After explaining the significance of a cytolysis chain reaction within the set of problems encountered in cancer therapy, all our previous studies on the lysosomal chain reaction and its problems are summarized. It follows a report on a new fundamental *in vitro* test showing that, at  $\text{pH} = 5.8$ ,  $T = 42^\circ\text{C}$  and in cell suspensions with high cell volume portion ( $\varepsilon_Z = 40 \cdot 10^{-3}$ ), EMAC cells are damaged very much quicker than in suspensions of only low cell volume ( $\varepsilon_Z = 2 \cdot 10^{-3}$ ). Furthermore, there is an increase in acidic phosphatase in the suspension milieu of high cell densities. In addition, it can be pointed out that the observed damaging of cells is closely linked with the complete inhibition of glucose metabolism.

The described findings are to be taken as a strong circumstantial evidence for the efficiency of cell damaging chain reactions.

## Zytolyse-Kettenreaktion und Problematik der Krebstherapie

Entdeckung und Beginn der Nutzung von Kettenreaktionen spiegeln sich in der Geschichte der Naturwissenschaften stets als revolutionierende Phasen der Entwicklung wider. Wir glauben daher, daß die Möglichkeit, innerhalb der vom Krebsgewebe erfüllten Räume gezielt eine Zytolyse-Kettenreaktion nahezu homogen einzusteuern, im Rahmen der Krebstherapie-Problematik hohes Interesse verdient. Bedingt durch die große Kompliziertheit der räumlichen Mikrotopografie der Zellversorgungs-lage im Interkapillarraum<sup>1–4</sup> sowie, zum Teil damit in Zusammenhang stehend, bedingt durch die sehr große Streuung der zellkinetischen Kenngrößen und der Therapieempfindlichkeit der Zellen in den Krebsgeweben ist eine homogene Zellvernichtung durch Cancerostatica bzw. ionisierende Strahlung nur sehr schwer zu erreichen. Hinzu kommt, daß gerade in kapillarfernen Bezirken mit Krebszellen niedrigster Therapieempfindlichkeit aus pharmakokinetischen Gründen die Wirkdosis von Cancerostatica auf Bruchteile des für Kapillarnähe gültigen Wertes zurückgeht<sup>5</sup>.

Aus den großen Schwierigkeiten der skizzierten Situation kann eine Zytolyse-Kettenreaktion heraus-

führen, bei der die Zellvernichtung durch einen von Cancerostatica- bzw. Strahlenwirkung verschiedenen Mechanismus im wesentlichen unabhängig von Zellversorgungs-lage, zellkinetischen Daten und Therapieempfindlichkeit der Krebszellen erfolgt. Ein solcher unterschiedlicher Mechanismus ist die lysosomale Zytolyse<sup>6,7</sup>. Die Erweiterung dieser Zytolyse zu einer lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion und die Untersuchung der Möglichkeiten zu ihrer gezielten Auslösung in Krebsgeweben bildet den Inhalt verschiedener seit 1965 durchgeführter Arbeiten, welche in<sup>8</sup> zusammengefaßt sind.

Die Einflußgrößen zur Auslösung der Zytolyse-Kettenreaktion in den Krebsgeweben eines Organismus sind lokale selektive pH-Wert-Erniedrigungen und Hyperthermie (mit etwas Unterstützung durch erhöhte Vitamin A-Retinol-Konzentration). Aus<sup>9</sup> ging hervor, daß die selektive Übersäuerung der Krebsgewebe in erster Näherung unabhängig ist von der Krebszellversorgungs-lage. Da auch die Überwärmung als Größe in erster Näherung unabhängig vom Ort im Gewebe ist, ergibt sich näherungsweise, daß eine bemerkenswert homogene Einsteuerung der Zytolyse-Kettenreaktion stattfinden muß. Die selektive Größe zur Einsteuerung der Zytolyse-Kettenreaktion ist die Absenkung des pH-Wertes in den Krebsgeweben (z. B. für unterkritischen Ablauf auf Werte  $\text{pH} = 5,8$  bis  $6,3$ ). An den Grenzen der Geweberräume mit lebenden, metabolisierenden Krebszellen endet Übersäuerung<sup>10</sup> und Zytolyse-Kettenreaktion,

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. h. c. M. von Ardenne, Forschungsinstitut, X-8051 Dresden, Zeppelinstraße 7.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

d.h. in unmittelbarer Nähe sowohl der Kapillaren als auch der nekroseerfüllten Räume. In diesen kritischen Übergangsgebieten gilt es, das Zurückbleiben kleiner Inseln von Aggregaten lebender Krebszellen, welche zu Rezidiven führen können, zu verhindern. Gemäß Konzept 1973<sup>11</sup> der Krebs-Mehrschritt-Therapie (KMT) soll daher versucht werden, durch kräftige Stimulierung der immunologischen Abwehr (Abwehr durch polymorphkernige Leukozyten in den kapillarnäheren Bezirken, Abwehr durch T-Lymphozyten in den nekrosenahen Bezirken) die Wahrscheinlichkeit für das Zurückbleiben solcher Inseln herabzusetzen.

Bei den erregenden theoretischen Aspekten der therapeutischen Mitnutzung der lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion mußte es eine Hauptaufgabe unserer Forschung sein, entweder den experimentellen Beweis für den *in vivo*-Ablauf der lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion unter KMT-Bedingungen zu erbringen, oder durch ein Mosaik zweckmäßig abgewandelter experimenteller *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen überzeugende Indizien hierfür zu erarbeiten. Wegen der experimentellen Schwierigkeit eines direkten Beweises sind wir den zweiten Weg gegangen. Leider sind die betreffenden Experimente über viele Einzelarbeiten verstreut und daher oft nur teilweise bekannt geworden. Auch ist es bei Führung eines Indizienbeweises stets willkommen, die Zahl der Indizien zu erhöhen. Aus diesem Grunde soll in den folgenden Abschnitten in Kurzform ein Hinweis auf die bisherigen experimentellen Arbeiten zu dieser Frage und der Bericht über einen weiteren Grundversuch zur lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion gegeben werden.

### **Frühere *in vitro*- und *in vivo*-Versuche als Indizien für den *in vivo*-Ablauf der Kettenreaktion in hochübersäuerten Geweben**

#### *In vitro*-Versuche

#### Schädigung von Krebszellen durch Hinzugabe von frisch zytolysierten Zellen

In ref. 12, Abb. 1 wird über einen Grundversuch zur Zytolyse-Kettenreaktion berichtet, bei dem unter Simulierung von KMT-Minimalbedingungen (pH = 6,3,  $T = 40^\circ\text{C}$ ) Ehrlich-Mäuse-Aszites-Carcinomzellen (EMAC-Zellen) durch Hinzugabe von verschieden hohen Anteilen frisch zytolysierter

Krebszellen gleicher Art verstärkt geschädigt werden. Es zeigte sich z.B., daß bei diesem Versuch, der bei einer Zellsuspensionsdichte  $\varepsilon_Z = 5 \cdot 10^{-3}$  und Standard-Krebsgewebekonzentrationen für Glukose und Sauerstoff vorgenommen wurde, die Zeitdauer für 50% Krebszellenschädigung (Anfärbbarkeit mit Trypanblau) von 300 min auf 180 min sich verkürzt, wenn der Anteil zugesetzter frisch zytolysierter Zellen von 25% auf 50% gesteigert wird.

Ein ähnlicher Versuch findet sich in ref. 13, Abb. 1. Hier wird für die gleiche Zellenart und Suspensionsdichte gezeigt, daß durch Zusatz von 50% frisch zytolysierter Zellen etwa die gleiche Krebszellenschädigung erzielt wird wie durch eine Strahlendosis von  $D = 1500 \text{ R}^*$ .

#### Schädigung von Krebszellen durch selektierte Lysosomen bzw. lysosomale Enzyme

Aus ref. 14 Abb. 2 und 3 geht hervor, daß z.B. unter gleichen Bedingungen wie bei den zuvor besprochenen *in vitro*-Versuchen (pH = 6,3,  $T = 40^\circ\text{C}$ ) die Zeit für 50-prozentige Krebszellenschädigung auf 80 min zurückgeht, wenn mit der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation selektierte Lysosomen (aus EMAC-Zellen, entsprechend 50% der gewählten Suspensionsdichte  $\varepsilon_Z = 5 \cdot 10^{-3}$ ) zugesetzt werden. Weiter ergibt sich aus diesen Messungen, daß unter sonst gleichen Bedingungen die Zeit für 50-prozentige Schädigung sich auf etwa 30 min verkürzt, wenn direkt die freigesetzten lysosomalen Enzyme aus den selektierten Lysosomen der Suspension zugegeben werden. Dieser *in vitro*-Versuch zeigt, daß unter KMT-Minimalbedingungen in den extrazellulären Raum gelangende freie lysosomale Enzyme entscheidend zur Schädigung benachbarter Krebszellen beitragen.

#### Freisetzung lysosomaler Enzyme in und aus Krebszellen unter KMT-Bedingungen

Einen experimentellen Hinweis, daß unter KMT-Bedingungen (pH = 6,2,  $T = 40^\circ\text{C}$ , Vitamin A-Retinol-Konzentration  $c_A = 5 \text{ bis } 10 \cdot 10^{-7} \text{ g ml}^{-1}$ ) schon nach etwa 10 min die Lysosomenmembranen und erst nach etwa 120 min die äußeren Zellmembranen zer-

\* In diesem Zusammenhang sei auf die Beobachtung hingewiesen, daß *in vivo*-gesundes Herzmuskelgewebe durch Oberflächenkontakt mit frisch thermisch abgetötetem Myokardgewebe geschädigt wird<sup>29</sup>.

stört werden, bringt (ref. 15, Abb. 6) durch Messung des zeitlichen intra- und extrazellulären Konzentrationsverlaufes für das Leitenzym saure Phosphatase. Analoge Verläufe wurden für die Leitenzyme Phospholipase und Esterase bei Messungen gefunden, welche in ref. 16, Abb. 3 wiedergegeben sind. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß unter KMT-Bedingungen der Zellerstörung die Schädigung der Lysosomenmembranen lange vorausgeht.

#### *In vivo-Versuche*

#### pH-abhängige Verstärkung von Zellschädigungen im Bereich der menschlichen Haut

Trotz der relativ niedrigen Temperatur herrschen wegen der sehr niedrigen pH-Werte (5,0 bis 5,5) in den äußeren lebenden Schichten menschlicher Haut Bedingungen, unter denen die lysosomale Zytolyse-Kettenreaktion unterkritisch, d. h. mit Verstärkung einer primären Zellschädigung abläuft. Das Hautgewebe ist daher ein günstiges Objekt, um experimentell *in vivo* die lysosomale Zytolyse-Kettenreaktion zu erkunden. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sind in ref. 17, Tab. 2 beschrieben. Nach unseren Befunden steigt bei der menschlichen Haut die Dosis für ein schwaches Strahlenerythem von normalerweise  $D = 750$  R auf fast 2000 R an, wenn der pH-Wert in den genannten tieferen Hautschichten durch längeres Waschen mit alkalischen Waschmitteln um ungefähr eine pH-Einheit während und für einige Zeit nach der Bestrahlung erhöht wird. Diese Beobachtung konnte inzwischen bei der Strahlenbehandlung einer größeren Zahl von Patienten durch H. Spies (Universitäts-Frauenklinik Greifswald, Direktor Prof. Dr. sc. med. E. Kraußold) bestätigt werden. Der große Einfluß von erhöhten pH-Werten auf die Senkung der Strahlenempfindlichkeit der Haut bzw. nach unseren Vorstellungen auf die Minderung des Verstärkungsfaktors der Kettenreaktion geht auch daraus hervor, daß beim Pferd, wo von Natur aus das Haut-pH in den kritischen Schichten um etwa eine pH-Einheit höher liegt als beim Menschen, die dem schwachen Strahlenerythem zugeordnete Dosis bei 1900 R liegt. Aus unseren Befunden läßt sich abschätzen, daß unter den Bedingungen der ungewaschenen menschlichen Haut die unterkritische lysosomale Zytolyse-Ketten-

reaktion mit einem Verstärkungsfaktor  $V \approx 3$  abläuft.

#### KMT-Ergebnisse am DS-Karzinom der Ratte

Aus Ergebnissen, die in ref. 18, Abschn. 5 zusammengefaßt sind, geht hervor, daß es nur dann gelingt, systematisch mit niedriger Strahlendosis am Herd ( $D < 1000$  R) eine Regression des DS-Karzinoms der Ratte herbeizuführen, wenn im Krebsgewebe die aus den *in vitro*-Versuchen bekannten Bedingungen für schnelle Freisetzung und starke Aktivierung der Lysosomenenzyme über ein angegebenes Zeitintervall aufrecht erhalten werden (optimierte Krebsgewebe-Übersäuerung in Kombination mit 40 °C Hyperthermie). Aus den bei diesen Versuchen zur Regression führenden niedrigen Strahlendosen läßt sich abschätzen, daß der Verstärkungsfaktor der Zytolyse-Kettenreaktion bei  $V \approx 5$  lag.

#### Kräftige Verstärkung der therapeutischen Wirkung in 15 von 17 Zwilling-Versuchsreihen mit Labortieren durch Hinzunahme von KMT-Hauptschritten

In einem Großversuch mit 921 Versuchstieren, welcher in ref. 19, Tab. 1 zusammengefaßt ist, wurde in Zwilling-Versuchsreihen mit verschiedenen Labortier-Tumorarten gezeigt, daß hochprozentige Heilungen nach Hinzunahme von KMT-Hauptschritten (optimierte Krebsgewebe-Übersäuerung + Hyperthermie) dort erzielbar sind, wo mit der Attacke klassischer Art (Cancerostatica, ionisierende Strahlung) allein gerade noch keine Heilung sich einstellte. Der Effekt einer hohen Verstärkung der Therapiewirkung wurde in 15 von 17 Zwilling-Versuchsreihen beobachtet.

Nach unserer Vorstellung ist die lysosomale Zytolyse-Kettenreaktion ein universaler Vorgang des Organismus, welcher überall dort ausgelöst wird, wo eine starke Gewebeübersäuerung eintritt. Wir haben die Vorstellung, daß dieser Vorgang bei verschiedenen Arten des Gehirntodes<sup>20</sup>, bei der Gewebe-Einschmelzung während bestimmter Phasen der Entzündung<sup>21</sup>, beim Myokardinfarkt<sup>22, 23</sup> und bei der generellen Autolyse nach Eintritt des Todes<sup>24</sup> abläuft.

## **In vitro-Grundversuch mit Krebszellensuspensionen verschiedener Dichte zur lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion**

### *Versuchskonzeption*

Kennzeichen und Definition einer für die Krebstherapie nutzbaren lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion ist, daß durch *in vivo* einsteuerbare Übersäuerung und Überwärmung aller Krebsgewebe die freigesetzten lysosomalen Enzyme während der Therapie im extrazellulären Raum auftreten und daß diese Enzyme infolge ihrer Aktivierung im sauren Milieu wesentlich zur Vernichtung weiterer Krebszellen des Gewebes beitragen. Bei *in vitro*-Versuchen zur Zytolyse-Kettenreaktion muß die Konzentration der extrazellulär auftretenden lysosomalen Enzyme um so höhere Werte erreichen und damit der Beitrag zur Vernichtung weiterer Krebszellen um so stärker werden, je größer die Dichte  $\epsilon_z$  der Krebszellensuspensionen ist. Ein *in vitro*-Versuch, der unter hinreichender Simulation der *in vivo*-Bedingungen<sup>25</sup> die Zunahme der Zellschädigung bei Erhöhung der Krebszellen-Suspensionsdichte  $\epsilon_z$  zeigt, würde ein weiteres eindrucksvolles Indiz für die Existenz der lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion unter bestimmten Gewebebedingungen darstellen. Über einen solchen Grundversuch wird in den folgenden Abschnitten berichtet.

Bei diesem *in vitro*-Grundversuch wurden Werte für die EMAC-Zellsuspensionsdichte von  $\epsilon_z = 4 \cdot 10^{-2}$  und  $2 \cdot 10^{-3}$  gewählt. Der höhere Wert liegt immer noch um etwa eine Zehnerpotenz niedriger als der *in vivo*- $\epsilon_z$ -Wert der Krebsgewebe. *In vivo* bestehen daher in dieser Größe bedeutend günstigere Bedingungen für die Wirkung der Zytolyse-Kettenreaktion als bei dem  $\epsilon_z = 4 \cdot 10^{-2}$ -*in vitro*-Versuch. Diesem positiven Fakt steht der negative Fakt gegenüber, daß *in vivo* nicht die Homogenität einer Zellsuspension, sondern die Mikro-Inhomogenität eines Krebsgewebes vorliegt. Kenngrößen für diese Inhomogenität sind die Mittelwerte der Vaskularisationsparameter, wie Kapillarlänge  $l$  und Kapillardistanz  $d$  in Krebsgeweben. Nach<sup>1</sup> betragen die  $l$ - und  $d$ -Werte etwa 100  $\mu\text{m}$ . Es darf als sicher angenommen werden, daß bei dem Kettenreaktionsprozeß mit vielen Stunden Dauer die lysosomalen Enzyme durch Diffusion und Konvektion über Strecken um 100  $\mu\text{m}$  ziemlich gleichmäßig verteilt werden. Die Mikro-Inhomogenität des Krebsgewebes dürfte daher gegenüber der Homo-

genität beim *in vitro*-Versuch keinen kritischen Wirkungsrückgang der Kettenreaktion bedingen.

Bei unserem *in vitro*-Grundversuch wurden die Einflußgrößen zur Auslösung der Zytolyse-Kettenreaktion mit  $\text{pH} = 5,8$  und  $T = 42^\circ\text{C}$  gewählt. Gegenüber den KMT-Minimalbedingungen  $\text{pH} = 6,3$  und  $T = 40^\circ\text{C}$  *in vivo* sind dies günstigere Parameter. Ihre Bemessung erfolgte in der Absicht, die Zytolyse-Kettenreaktion ohne zusätzliche Einflußgrößen mit Wirkungsstreuung, d.h. konkret ohne auslösende Attacke mit Cancerostatica und ohne Lysosomenlabilisierung mit Vitamin A-Retinol untersuchen zu können. Bei  $\text{pH} = 5,8$  und  $T = 42^\circ\text{C}$  geht im vorgesehenen Zeitintervall von 60 bis 120 min\* die Kettenreaktion sprunghaft vom unterkritischen in den überkritischen Zustand über (Verstärkungsgrad  $V \rightarrow \infty$ ).

Durch Mitmessung der intrazellulären und extrazellulären sauren Phosphatase als lysosomales Leitenzym und durch Mitbestimmung des anaeroben Glukose-Verbrauchs der EMAC-Zellen erhofften wir tiefere Einblicke in den zeitlichen Ablauf der beteiligten Vorgänge zu gewinnen, d.h. Aspekte für eine Optimierung der Zytolyse-Kettenreaktion in den Krebsgeweben.

### **Material und Methode**

Mit Zellen des 8 bis 10 Tage alten Ehrlich-Mäuse-Azites-Carcinoms (EMAC-Zellen) wurde in LY-Medium eine Suspension von 4 Vol.-% Zellanteil ( $\epsilon_z = 4 \cdot 10^{-2}$ ) und hieraus durch Verdünnung im Verhältnis 1:20 eine weitere Suspension von nur 0,2 Vol.-% Zellanteil ( $\epsilon_z = 2 \cdot 10^{-3}$ ) angesetzt und jeweils 100 ml hiervon in zwei Temperier-Glasgefäße eingegeben. Durch den Deckel jedes Gefäßes führten Bohrungen für Glas-Rührstab, Thermometer, pH-Einstab-Elektrode, Gaseinleitungsrohr, Infusionsschläuche und zur Probenentnahme. Die Temperatur betrug  $42 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . Das pH wurde mit Milchsäure auf 5,80 eingestellt. Begast wurde mit 5 Vol.-%  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ . Die Glukosekonzentration betrug beim Start des Versuches 10 mg.-%. Mit einer Infusionsmaschine wurden 0,2 mg Glukose  $1\text{g}^{-1}$  Frischzellen  $1\text{min}^{-1}$  über die gesamte Versuchsdauer von 300 min zugegeben ( $< 1\text{ ml}$ . Lösung  $300\text{ min}^{-1}$ ) und in die Suspension mit nur 0,2 Vol.-% Zellen eine um den Faktor  $20^{-1}$  verdünnte Glukose-lösung. Das pH in der 4 Vol.-%-Suspension wurde

\* Bei Verdopplung dieser Zeitwerte genügt hierzu bereits ein  $\text{pH} = 6,1$ !



durch Infusion der gleichen Menge 12-prozentiger  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung konstant gehalten. Die pH-Werte beider Suspensionen wurden fortlaufend registriert und Abweichungen von Hand durch Zugabe geringer Mengen 1-prozentiger Milchsäure oder Stoppen der Bikarbonatzufuhr kompensiert. Maximal erfolgten kurzzeitige Abweichungen der pH-Werte vom Soll-Wert 5,8 um  $\pm 0,05$ . Alle 30 min wurden Proben für den Trypanblau-Test, die Glukosebestimmung (o-Toluidin-Methode) und für die Bestimmung der sauren Phosphatase abgenommen.

## Ergebnisse und Diskussion

Die von uns durchgeführten fünf Versuche führten bei quantitativen Unterschieden zu qualitativ einheitlichen Ergebnissen folgender Art:

1. Die Zellschädigung, gemessen an der Trypanblau-Anfärbbarkeit erfolgte in den EMAC-Zellsuspensionen der hohen Dichte  $\varepsilon_z = 40 \cdot 10^{-3}$  (4 Vol.-%) viel schneller, d. h. bei etwa gleichem Startpunkt über der Zeit steiler als in den Suspensionen mit

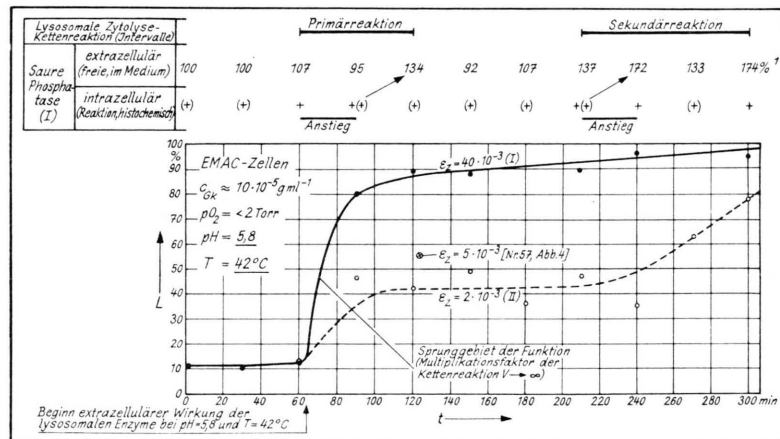


Abb. 1. *In vitro*-Messungen zur Schädigung L von EMAC-Zellen als Funktion der Zeit  $t$  einer Einwirkung von  $pH=5,8$  und  $T=42^\circ \text{C}$  bei hoher und geringer Dichte  $\varepsilon_z$  der Krebszellensuspension. Trypanblaufärbetest. LY-Medium. pH-Einstellung durch Milchsäure. Ergebnis: Starke Zunahme der Krebszellenschädigung bei Erhöhung der Zelldichte. Grundversuch zur Zytolysekettenreaktion.

<sup>1</sup> Es erfolgt offenbar eine sehr schnelle Bindung bzw. Inaktivierung der extrazellulären sauren Phosphatase an den Nachbarzellen. Siehe auch <sup>26</sup>.

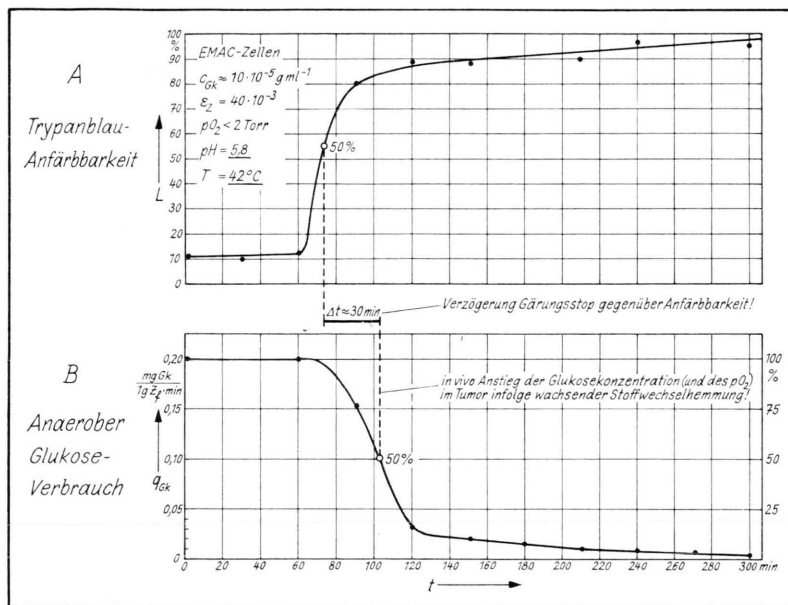


Abb. 2. *In vitro*-Messungen zur zeitlichen Relation zwischen Trypanblau-Anfärbbarkeit (A) und Hemmung der anaeroben Glykolyse (B) von EMAC-Zellen in hoher Suspensionsdichte bei Schädigung durch Einwirken von  $pH=5,8$  und  $T=42^\circ \text{C}$ . (Auslösung Zytolysekettenreaktion.)

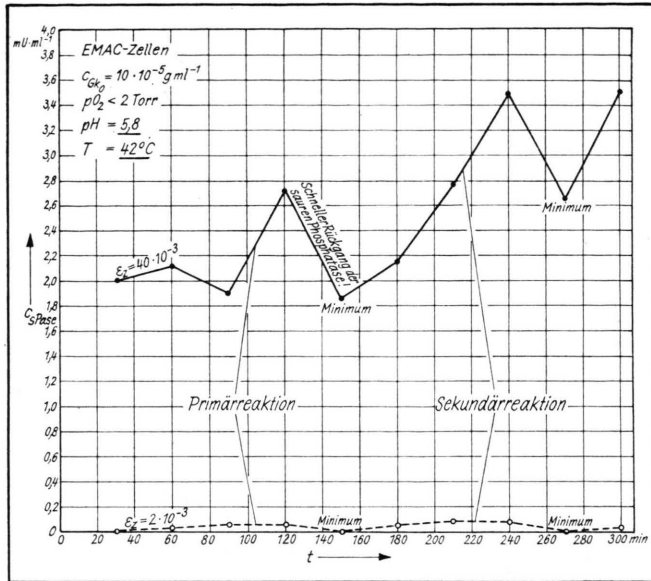


Abb. 3. Messungen der Konzentration  $c_{sPase}$  des lysosomalen Leitenzyms, saure Phosphatase im Überstand des LY-Mediums als Funktion der Zeit  $t$  einer Einwirkung von  $pH=5,8$  und  $T=42^\circ C$  bei verschiedenen Dichten  $\varepsilon_Z$  der EMAC-Zellsuspension. Ergebnis: Beobachtung von zwei Konzentrationsmaxima.

nur  $\varepsilon_Z = 2 \cdot 10^{-3}$  (0,2 Vol.-%) wie aus dem in Abb. 1 gezeigten Beispiel zu ersehen ist.

- Die Zellschädigung, gemessen an der Hemmung des anaeroben Glukoseverbrauches (Glykolyse) war bei  $\varepsilon_Z = 2 \cdot 10^{-3}$  gegenüber  $\varepsilon_Z = 40 \cdot 10^{-3}$  ebenfalls bzw. noch mehr verzögert, als dies im TB-Test zum Ausdruck kam.
- Gegenüber dem TB-Test trat die Zellschädigung nach dem Glukose-Verbrauch-Test etwas verzögert auf. Ein Beispiel über diesen Sachverhalt ist in Abb. 2 dargestellt.
- Die Bestimmung der extrazellulären sauren Phosphatase führte bei  $\varepsilon_Z = 40 \cdot 10^{-3}$  zu dem 10- bis 20-fachen mittleren Wert wie bei  $\varepsilon_Z = 2 \cdot 10^{-3}$ ; bei  $\varepsilon_Z = 40 \cdot 10^{-3}$  zeigte sich außerdem ein deutlicher Anstieg der Werte im Verlauf der 300-min-Inkubation, der bei  $\varepsilon_Z = 2 \cdot 10^{-3}$  nicht in Erscheinung trat.
- Der Verlauf der Aktivität der sauren Phosphatase deutete eine Zweigipfeligkeit an, zu deren Sicherung allerdings weitere Versuche und Bestimmungen in kürzeren Zeitabständen erforderlich wären. Die beiden letzten Befunde werden in Abb. 3 gebracht. — Auch die intrazelluläre saure Phosphatase, die allerdings nur in einem Versuch histochemisch bestimmt wurde, zeigt an zwei Stellen schwache in interessanter Korrelation mit den anderen Meßgrößen stehende Maxima, wie aus Abb. 1 hervorgeht.

Das beschleunigte Absterben der Krebszellen in Suspensionen mit höherem Anteil Zellen gegenüber sehr verdünnten Zellsuspensionen bei sonst völlig identischen Bedingungen beweist, daß die Zellen selbst (zuerst absterbende Zellen) einen wesentlichen Beitrag zur Abtötung weiterer Zellen liefern. Dieses Ergebnis steht in völliger Übereinstimmung mit unseren in den vorangegangenen Abschnitten erläuterten Auffassungen und früheren experimentellen Befunden zur Wirkung einer lysosomalen Zytolyse-Kettenreaktion. Die Freisetzung der lysosomalen Enzyme wird in unserem Versuchsmodell außerdem durch den Anstieg der sauren Phosphatase in der konzentrierteren Zellsuspension dokumentiert. Wie Tab. I zeigt, nimmt die Konzentration

Tab. I. Bei verschiedener Dichte  $\varepsilon_Z$  der EMAC-Zellsuspension gemessene Konzentration  $c_{sPase}$  des lysosomalen Leitenzyms saure Phosphatase im LY-Medium. Messung im Überstand bei Erreichen der Anfärbungsquote  $L \approx 85\%$  im Trypanblau-Färbetest. Wie auch das Ergebnis Abb. 1 andeutet, nimmt die Intensität der Kettenreaktion nicht proportional der Enzyme-Konzentration im Medium zu, sondern langsamer. Im  $c_{sPase}$ -Verlauf gemäß Abb. 3 spiegelt sich wider, daß ein mehr oder weniger großer Enzymanteil schließlich von Targets in der Suspension (z. B. zunächst überlebenden Zellen) aufgenommen wird.

$\varepsilon_Z$	$c_{sPase}$ $mU \cdot ml^{-1}$
$2 \cdot 10^{-3}$	0,08
$40 \cdot 10^{-3}$	1,84
$100 \cdot 10^{-3}$	7,00

$c_{sPase}$  der extrazellulären sauren Phosphatase etwa auf das Zwanzigfache zu, wenn  $\varepsilon_Z$  von  $2 \cdot 10^{-3}$  auf  $40 \cdot 10^{-3}$  erhöht wird! Leider sind *in vivo* entsprechende Nachweise schwer oder überhaupt nicht zu führen, da das Aufbrechen der Lysosomen sowie die Freisetzung und Verteilung ihrer Enzyme gerade dazu führen können, daß geringere Werte an saurer Phosphatase gefunden werden<sup>26</sup>.

Für die Programmierung der Haupttherapie und für die Empfehlung der Optimaldistanz-Nachtherapie<sup>27</sup> im KMT-Konzept 1973<sup>11</sup> ist der Befund von großer Bedeutung, daß bei Vorhandensein hoher Zelldichten (*in vivo*-Situation) es durch die Wirksamkeit der freigesetzten Hydrolasen (wie Abb. 2 zeigte) sehr schnell zu einem völligen Stopp des Glukoseverbrauchs kommt. Bei Ablauf der Zytolyse-Kettenreaktion *in vivo* erfolgt durch den Metabolismusstopp ein entsprechender Anstieg der Substratkonzentration (Glukose,  $O_2$ ) im Krebsgewebe und damit eine Sensibilisierung der noch nicht abgetöteten restlichen Krebszellen<sup>27</sup>.

Die stoßartige Verbesserung der Substratversorgung von Krebszellen der  $G_0$ -Fraktion, welche die Anfangsphase der Kettenreaktion noch überleben, wird im KMT-Konzept<sup>11</sup> dazu genutzt, um gemäß<sup>30</sup> diese kritischen Zellanteile mit 12 h-Zeitabstand noch ein zweites Mal teilsynchronisiert anzugreifen.

Unter den Bedingungen des KMT-Konzeptes 1973 läuft die lysosomale Zytolyse-Kettenreaktion in den Krebsgeweben in der Regel unterkritisch ab. Die unterkritische Kettenreaktion bewirkt die selektive Verstärkung einer primären „auslösenden“ Krebszellenabtötung. Der erzielte Verstärkungsgrad ist unterschiedlich und steigt, wie schon erwähnt wurde, an, z. B. mit Zunahme der Übersäuerung, der Hyperthermietemperatur, der Vitamin A-Retinol-Konzentration und der Zeitdauer mit Aufrechterhaltung der Kettenreaktionsbedingungen im Krebsgewebe. Um die volle therapeutische Wirkung der Zytolyse-Kettenreaktion zu erhalten, kommt es entscheidend darauf an, daß die primäre „auslösende“ Krebszellenabtötung stoßartig zu Beginn des Kettenreaktionsintervalls erfolgt. Diese Forderung bedeutet, daß die primäre Krebszellenabtötung mit Freisetzung der Lysosomen in einer Zeitspanne erfolgen muß, die sehr klein ist gegen das Kettenreaktionsintervall im KMT-Konzept 1973 von etwa 20 h. Diese Forderung bedeutet weiter, daß es darauf ankommt, die zeitliche Programmierung aller

mit dieser Problematik korrelierenden Maßnahmen im KMT-Konzept 1973<sup>11</sup> sehr genau innezuhalten. Eine möglichst stoßartige primäre Krebszellenabtötung ist nach<sup>5</sup> dann gegeben, wenn ein schnell in Wirkform übergehendes bzw. gleich in Wirkform vorliegendes (oder im Tumor schnell aktiviertes) Cancerostaticum geringer Massenzahl mit schnell wirkenden Abtötungsmechanismus und geringem Verbrauch im Krebsgewebe zur Anwendung kommt und wenn gleichzeitig gegen die Hauptgeschwulst ein Stoß ionisierender Strahlung (Herddosis jeweils nur um 800 R) eingesetzt wird.

Hauptziel der weiteren KMT-Forschung ist es, die lysosomale Zytolyse-Kettenreaktion in den Krebsgeweben des Organismus überkritisch (Verstärkungsgrad  $V = \infty$ ) ablaufen zu lassen. Aus theoretischer Sicht würde sich dann eine „auslösende“ Attacke mit Cancerostatica oder ionisierender Strahlung erübrigen, die (stimulierte) immunologische Abwehr bliebe dadurch in voller Stärke erhalten und die therapeutische Wirkung könnte in erster Näherung unabhängig von den zellkinetischen Daten der Krebszellen (Krebszellart, Versorgungstopografie des Krebsgewebes) werden. Vom Mechanismus aus betrachtet wäre so eine universale Krebstherapie\* denkbar, deren Erfolgsaussichten nur durch das Übersäuerungsprofil in den kritischen Übergangsgebieten zu den gesunden bzw. zu den nekrotischen Bereichen limitiert würden. Konkrete Wege zur Annäherung an dieses hohe Ziel sind Bemühungen um die weitere Herabsetzung der Krebsgewebe-pH-Werte auf z. B. 5,5 bis 5,8 (vielleicht durch Fortsetzung der in ref. 28 begonnenen Forschungen) und die stärkere Labilisierung der Lysosomen z. B. durch höhere (lokale) Überwärmung der Krebsgewebe.

Die Durchführung dieser Arbeit erfolgte im Auftrag des Ministeriums für Gesundheitswesen der DDR, Berlin, innerhalb des Komplexthemas „Krebs-Mehrschritt-Therapie“ (Thementräger Forschungsinstitut Manfred von Ardenne) unter der Wissenschaftskonzeption Geschwulstkrankheiten. Für die Durchführung der Versuche danken wir unseren Mitarbeiterinnen Ch. Hentschel, M. Krusche sowie S. Eisold, I. Fülle und H. Stephan, für die Bestimmung der extrazellulären sauren Phosphatase Herrn W. Krüger und seinen Mitarbeiterinnen G. Binder und R. Domaschka, für den histochemischen Nachweis der sauren Phosphatase Frau H. Lippmann und ihrer Mitarbeiterin K. Völkel.

- \* In diesem Zusammenhang sei daran erinnert, daß auch bei der unspezifischen, körpereigenen Abwehr durch polymorphkernige Leukozyten die Krebszellenvernichtung infolge Zytolyse durch Freisetzung und Aktivierung lysosomaler Enzyme im sauren Milieu eintritt (verstärkt unter KMT-Redingungen wegen des langfristig auf etwa 6,0 erniedrigten pH-Wertes der Krebsgewebe). Aus diesen Abwehrzellen freigesetzte lysosomale Enzyme können den Ablauf der Zytolyse-Kettenreaktion intensivieren.
- <sup>1</sup> P. Vaupel, H. Günther, J. Grothe u. G. Aumüller, Z. ges. exp. Med. **156**, 283 [1971].
  - <sup>2</sup> H. Günther, P. Vaupel, H. Metzger u. G. Thews, Z. Krebsforsch. **77**, 26 [1972].
  - <sup>3</sup> M. von Ardenne u. F. Rieger, Mitteilungsdienst d. Ges. z. Bekämpfung d. Krebskrankheit Nordrhein-Westf., im Druck.
  - <sup>4</sup> M. von Ardenne u. F. Rieger, Archiv Geschwulstforsch., im Druck.
  - <sup>5</sup> M. von Ardenne u. A. von Ardenne, Arzneimittel-Forsch., im Druck.
  - <sup>6</sup> Ch. de Duve, Lysosomes and Chemotherapy in R. J. C. Harris, Biological Approaches to Cancer Chemotherapy. Academic Press, New York 1961.
  - <sup>7</sup> Ch. de Duve, R. Wattiaux u. M. Wibo, Biochem. Pharmacol. **9**, 97 [1962].
  - <sup>8</sup> M. von Ardenne, Theroretische und experimentelle Grundlagen der Krebs-Mehrschritt-Therapie. 2. Auflage. VEB Verlag Volk und Gesundheit. Berlin 1970/71.
  - <sup>9</sup> M. von Ardenne u. F. Rieger, Z. Naturforsch. **21b**, 472 [1966].
  - <sup>10</sup> M. von Ardenne, R. A. Chaplain, P. G. Reitnauer u. K. Rohde, Acta biol. med. germ. **25**, 671 [1970].
  - <sup>11</sup> M. von Ardenne, Therapie der Gegenwart **113**, **48**, 194 [1974].
  - <sup>12</sup> M. von Ardenne u. P. G. Reitnauer, Z. ärztl. Fortbildung **63**, 965 [1969].
  - <sup>13</sup> M. von Ardenne u. R. A. Chaplain, Naturwiss. **55**, 448 [1968].
  - <sup>14</sup> M. von Ardenne, R. A. Chaplain u. F. Rieger, Z. Krebsforsch. **72**, 258 [1969].
  - <sup>15</sup> M. von Ardenne, R. A. Chaplain u. P. G. Reitnauer, Arch. Geschwulstforsch. **33**, 331 [1969].
  - <sup>16</sup> M. von Ardenne u. P. G. Reitnauer, Arzneimittel-Forsch. **20**, 323 [1970].
  - <sup>17</sup> M. von Ardenne u. P. G. Reitnauer, Z. Naturforsch. **25b**, 872 [1970].
  - <sup>18</sup> M. von Ardenne, R. A. Chaplain u. P. G. Reitnauer, Dtsch. Ges.wesen **24**, 924 [1969].
  - <sup>19</sup> M. von Ardenne, Die selektive Verstärkung einer primären Krebszellenschädigung als Fundamentalprozeß der Krebs-Mehrschritt-Therapie. Vortrag 12. 10. 1969 Turin. III. Symposio internazionale sul trattamento loco regionale dei tumori.
  - <sup>20</sup> M. von Ardenne, P. G. Reitnauer u. K. Rohde, Dtsch. Ges.wesen **25**, 1677 [1970].
  - <sup>21</sup> M. von Ardenne, Umschau **73**, 172 [1973].
  - <sup>22</sup> M. von Ardenne u. P. G. Reitnauer, Cardiol. Bull. Acta cardiologica **4,5/51** [1971].
  - <sup>23</sup> M. von Ardenne u. P. G. Reitnauer, Card. Bull. Acta cardiol. **6/7**, 137 [1972/73].
  - <sup>24</sup> M. von Ardenne, Naturwiss. **57**, 43 [1970].
  - <sup>25</sup> M. von Ardenne, W. Krüger u. F. Rieger, Archiv Geschwulstforsch. **29**, 36 [1967].
  - <sup>26</sup> I. T. Dingle u. H. B. Fell, Lysosomes in Biology and Pathology, Vol. 2, p. 193, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, London 1969.
  - <sup>27</sup> M. von Ardenne, Z. Naturforsch. **27b**, 1547 [1972].
  - <sup>28</sup> M. von Ardenne u. P. G. Reitnauer, Krebsgeschehen **6**, 25 [1974].
  - <sup>29</sup> V. S. Salmanovich, Electrolytes and Cardiovascular Diseases (E. Bajusz, ed.), Vol. 2, p. 100, S. Karger, Basel/New York 1966.
  - <sup>30</sup> M. von Ardenne, Naturwissenschaften **60**, 483 [1973].