



Institut für Biotechnologie

*Entwicklung einer Fließbettechnik
zur Bewertung von Radiopharmaka
an Zellkulturen*

Thomas Noll

***Entwicklung einer Fließbettechnik
zur Bewertung von Radiopharmaka
an Zellkulturen***

Thomas Noll

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3658, Mai 1999
ISSN 0944-2952
Institut für Biotechnologie JÜl-3658
D5 (Diss. Universität Bonn)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung:

Diese Arbeit beschreibt die Entwicklung eines kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktors zur on-line Bewertung von Radiotracern an Zellkulturen. Der Bioreaktor kombiniert eine gewebeähnliche, dreidimensionale Zellkultivierung in offenporigen Mikroträgern mit einer Meßtechnik zur on-line Radioaktivitätserfassung. Die über lange Zeiträume stabile Betriebsweise im Fließgleichgewicht ermöglicht die Durchführung einer Vielzahl von Experimenten an der gleichen Zellkultur. Alle relevanten Parameter (O_2 , pH, T, etc.) können entsprechend den experimentellen Anforderungen eingestellt werden. Der Volumenstrom des zirkulierenden Mediums kann an den Blutvolumenstrom des in der Untersuchung simulierten Organismus angepaßt werden und die Dosierprofile der Radiotracer können variabel eingestellt werden, um die *in vivo* Verhältnisse zu simulieren. Die Entnahme und Untersuchung der immobilisierten Zellen ist jederzeit möglich. Unter Verwendung dieses Systems wurde die Aufnahmekinetik von 2-[^{18}F]Fluorodeoxyglukose (FDG) in humanen Gliomzellen (86HG39) untersucht und es konnte gezeigt werden, daß die Abhängigkeit der Lumped Konstanten (LC) für FDG von der Medienglukosekonzentration der im Rattenhirn ermittelten Abhängigkeit entspricht. Für normoglykämische Konzentrationen wurden für die Lumped Konstante Werte um 0,7 bestimmt, der in der Hypoglykämie bis auf einen Wert von 1,22 bei einer Glukosekonzentration von 3 mM anstieg. Die Geschwindigkeitskonstanten für das Dreikompartiment-Modell entsprachen denen, die *in vivo* mittels PET ermittelt wurden. Diese Übereinstimmungen belegen die Eignung des entwickelten Systems zur Bewertung von Radiotracern. In weiteren Untersuchungen wurde die Aufnahmekinetik der beiden diastereomeren Formen von 4-[^{18}F]Fluorprolin bestimmt. Es konnte gezeigt werden, daß beide Diastereomere nicht metabolisiert werden und eine identische intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration erreichen. Für das trans-Diastereomer wurden jedoch dreifach höhere Geschwindigkeitskonstanten ermittelt.

Abstract:

This study presents the development of a continuously operating fluidized-bed bioreactor for on-line evaluation of radiotracers *in vitro*, which combines tissue-like three-dimensional cell cultivation in open porous microcarriers with a technique for on-line radioactivity detection. The long time stability of steady-state permits a large number of experiments using the same culture. All relevant parameters (O_2 , pH, T, etc.) can be adjusted according to the experimental requirements. The flux of the circulating medium can be adapted to the blood flow of the corresponding organism, while the input function of the radiotracer is freely adjustable for simulation of *in vivo* conditions. Sampling and examination of the immobilized cells are possible at any time. Using this system, the kinetics of 2-[^{18}F]fluoro-2-deoxyglucose (FDG) in human glioma cells (86HG39) were studied and it was shown that the dependence of the lumped constant (LC) for FDG on the medium glucose concentration is similar to that obtained in the rat brain. For normoglycemic concentrations the LC was determined to be in the range of 0.7, while in hypoglycemia it increased progressively up to a value of 1.22 at a glucose concentration of 3 mM. The rate constants in the three compartment model were found to be similar to those obtained *in vivo* using PET; indicating the validity of the system for tracer evaluation. Furthermore the kinetics of both diastereomeric forms of 4-[^{18}F]fluoro-proline was investigated and found that both diastereomeres were not metabolized and reached an identical intracellular steady state concentration. The trans-form was transported three times faster than the cis-diastereomere, indicated by the rate constants.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Formelverzeichnis.....	X
1 Einleitung und Zielsetzung	1
Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit.....	2
2 Theoretische Grundlagen	5
2.1 Vom Wirkstoff zum Arzneimittel.....	5
2.2 <i>In vitro</i> Systeme.....	8
2.2.1 Ansätze für <i>in vitro</i> Modelle	9
2.2.2 Stufen der Entwicklung einer <i>in vitro</i> Methode.....	13
2.2.3 Anforderungen an <i>in vitro</i> Modelle.....	13
2.3 Zellzyklus und Zellzyklussynchronisation.....	15
2.4 Radiopharmazeutika für <i>in vivo</i> Untersuchungen.....	17
2.4.1 [¹⁸ F]-2-Fluor-2-Deoxyglukose	21
2.4.2 L-2-[¹⁸ F]Fluortyrosin und [¹⁸ F]-4-Fluorprolin.....	28
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Zellen.....	31
3.1.1 Humane Glioblastomzelllinie U-87 MG.....	31
3.1.2 Humane Glioblastomzelllinie U-373 MG.....	31
3.1.3 Humane Glioblastomzelllinie 86HG39.....	31
3.2 Kulturmedien	32
3.3 Stammhaltung	33
3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	33
3.5 Der Wirbelschichtreaktor als Kultursystem.....	34
3.6 Analytische Methoden	36
3.6.1 Zellzahl und Vitalität.....	36
3.6.2 Osmolalität.....	37

3.6.3	Glukose.....	38
3.6.4	Aminosäuren.....	38
3.6.5	Leitfähigkeit.....	38
3.6.6	Flowzytometrische Analysen.....	39
3.7	Radioaktivmessungen	40
3.7.1	Messung in Leighton-Tubes und Gewebekulturflaschen	41
3.7.2	Messung intrazellulärer Radiotracerakkumulation im Mikroträger.....	41
4	Ergebnisse	43
4.1	Der Wirbelschichtreaktor als <i>in vitro</i> Modell	43
4.1.1	Dosierprofile.....	46
4.1.2	Einfluß der Wirbelbetthöhe auf die Porosität im Wirbelbett.....	54
4.2	Auswahl der geeigneten Zelllinie	55
4.2.1	U-87 MG	56
4.2.2	U-373 MG	58
4.2.3	86HG39	61
4.3	Untersuchungen zur enzymatischen Ablösung immobilisierter Zellen vom Träger	65
4.4	Untersuchungen zur Zellzyklussynchronisation von 86HG39	67
4.5	Einfluß des Trägerspülens auf die immobilisierte Zellzahl	69
4.6	Bestimmung des Flüssigkeitsanteils im Wirbelbett mit immobilisierten Zellen.....	70
4.7	Untersuchungen zur Aufnahme von 2-[¹⁸F]Fluor-2-Deoxyglukose (FDG) im Wirbelschichtreaktor mit on-line Datenerfassung	74
4.7.1	Transportuntersuchung an immobilisierten Gliomzellen	75
4.7.2	Einfluß der Glukosekonzentration im Medium auf die FDG-Aufnahme	84
4.7.3	Zusammenfassung.....	89
4.8	Untersuchung zur Aufnahme der Diastereomere von 4-[¹⁸F]Fluorprolin.....	91
5	Diskussion	99
6	Zusammenfassung	103
7	Ausblick	107

8 Anhang	109
8.1 Untersuchungen zur Zellzyklussynchronisation von 86HG39	109
8.1.1 Versuche mit Hydroxyharnstoff	109
8.1.2 Versuche mit Aphidicolin	116
8.2 Lösungsweg der verwendeten Differentialgleichungen	125
8.3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	127
8.4 Liste der verwendeten Geräte	131
8.5 Literatur	133

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Wirbelschichtreaktor zur kontinuierlichen Kultivierung von Säugerzellen.....	3
Abb. 2-1:	Stadien der Arzneimittelentwicklung.....	7
Abb. 2-2:	Zellzyklus von Säugerzellen.....	15
Abb. 2-3:	Radioaktiver Zerfall des Fluorisotops ^{18}F	18
Abb. 2-4:	Positronenemissionstomographische Diagnose eines Hirntumors mit FDG	21
Abb. 2-5:	Fließschema zur nukleophilen ^{18}F FDG-Synthese ohne Trägerzusatz	22
Abb. 2-6:	Vereinfachtes Schema des Glukosemetabolismus.....	23
Abb. 2-7:	Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme und Verstoffwechselung von Glukose und 2- ^{18}F Fluor-2-Deoxyglukose (FDG).....	24
Abb. 2-8:	Chemotherapiekontrolle mit ^{123}I -Iod- α -Methyltyrosin	28
Abb. 2-9:	Schema zur nukleophilen Darstellung von cis- ^{18}F -4-Fluorprolin	29
Abb. 2-10:	Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von 4- ^{18}F Fluorprolin	30
Abb. 3-1:	Fließschema des für Fermentationen verwendeten Wirbelschichtreaktors	34
Abb. 3-2:	Photographische Abbildung eines Wirbelschichtreaktors	35
Abb. 3-3:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines unbewachsenen Trägers	36
Abb. 3-4:	Analyse des zellulären DNA-Gehaltes mit dem Flow Cytometer	40
Abb. 4-1:	Fließschema des für Transportuntersuchungen mit Radiotracern verwendeten Wirbelschichtreaktors.....	45
Abb. 4-2:	Realisierung eines Dirac-Impulses im Wirbelschichtreaktor	46
Abb. 4-3:	Mischzeiten Θ 90 / 95 in Abhängigkeit vom Umlaufvolumenstrom	47
Abb. 4-4:	Volumenströme während der Simulation einer Sprungfunktion	49
Abb. 4-5:	Realisierung einer Sprungfunktion im Wirbelschichtreaktor.....	50
Abb. 4-6:	Vergleich der Geschwindigkeit der Konzentrationsgleichgewichtseinstellung nach Dirac-Impuls und Medien austausch.....	51
Abb. 4-7:	Meßsignale während einer Sprungfunktion im Wirbelschichtreaktor mit FDG	52
Abb. 4-8:	Expansion des Wirbelbettes während und nach der Sprungfunktion	53
Abb. 4-9:	Porosität im Wirbelbett in Abhängigkeit von der Fließgeschwindigkeit im Umlauf.....	54
Abb. 4-10:	Porosität im Wirbelbett in Abhängigkeit von der Wirbelbetthöhe	55
Abb. 4-11:	Batch-Fermentation von HTB-14 in Gewebekulturflaschen (T-25).....	57
Abb. 4-12:	Mikroskopische Aufnahme von U-87 MG in Gewebekulturflaschen: Bildung von schwach adhären ten multizellulären Spheroi den.....	57

Abb. 4-13: Kontinuierliche Fermentation von U-87 MG im Wirbelschichtreaktor	58
Abb. 4-14: Batchfermentation von U-373 MG in Gewebekulturflaschen (T-25)	59
Abb. 4-15: Kontinuierliche Fermentation von U-373 MG im Wirbelschichtreaktor	60
Abb. 4-16: Batchkultivierung von 86HG39 in Gewebekulturflaschen (T-25)	61
Abb. 4-17: Kontinuierliche Fermentation von 86HG39 im Wirbelschichtreaktor	62
Abb. 4-18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von immobilisierten 86HG39 im Wirbelschichtreaktor	63
Abb. 4-19: Einfluß der Enzymeinwirkzeit auf die Ablösequote immobilisierter Zellen	66
Abb. 4-20: Einfluß des Trägerwaschens auf die immobilisierte Zellzahl	69
Abb. 4-21: Ausschnitt aus dem Wirbelbett mit immobilisierten Zellen (Schematische Darstellung)	71
Abb. 4-22: Vergleich der Aufnahme von FDG und Fluorid im Reaktor und in Leighton-Tubes	72
Abb. 4-23: Schematische Darstellung der in eine Transportuntersuchung integrierten Porositätsbestimmung im Wirbelbett mit immobilisierten Zellen	73
Abb. 4-24: On-line Signale während und nach einer Sprungfunktion mit FDG (3 µCi/ml) im Wirbelschichtreaktor mit 86HG39 Gliomzellen	76
Abb. 4-25: Schematische Darstellung der Detektorsignalbearbeitung	78
Abb. 4-26: Meßsignale nach Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls und des Flüssigkeitsanteils im Wirbelbett	78
Abb. 4-27: Vergleich zwischen on-line und off-line bestimmter Radiotraceraufnahme der Zellen	79
Abb. 4-28: Kinetische Modellierung der zellulären FDG-Aufnahme	81
Abb. 4-29: Modellierung der intrazellulären Konzentrationsverläufe	82
Abb. 4-30: Glukoseabhängigkeit der Lumped Konstanten für FDG in humanen Gliomzellen im Vergleich zu entsprechenden Untersuchungen am gesunden Rattenhirn	88
Abb. 4-31: Transportuntersuchung mit cis-4-[¹⁸ F]Fluorprolin im Wirbelschichtreaktor	93
Abb. 4-32: Transportuntersuchung mit trans-4-[¹⁸ F]Fluorprolin im Wirbelschichtreaktor	93
Abb. 4-33: Vergleich der intrazellulären Aufnahme von cis- und trans-4-Fluorprolin	94
Abb. 4-34: Kinetische Modellierung der zellulären cis-Fluorprolin-Aufnahme	95
Abb. 4-35: Kinetische Modellierung der zellulären trans-Fluorprolin-Aufnahme	96
Abb. 4-36: Vergleich der intrazellulären Aufnahme von cis- und trans-4-Fluorprolin unter Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls	98
Abb. 8-1: Phasenverteilung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit (Konzentration Hydroxyharnstoff: 2 mM und 8 mM)	110

Abb. 8-2: Relative Zellgröße (Forward Scatter) und Zellgranularität (Sideward Scatter) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.....	112
Abb. 8-3: Toxizität in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit und der Hydroxyharnstoffkonzentration.....	113
Abb. 8-4: Synchronisationsexperiment nach 22 Stunden Vorinkubation mit Hydroxyharnstoff.....	115
Abb. 8-5: Vorversuch Aphidicolin (2 µg/ml): Phasenverteilung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.....	117
Abb. 8-6: Toxizität in Abhängigkeit von der Einwirkzeit.....	118
Abb. 8-7: Histogramm einer mit Aphidicolin (2 µg/ml) arretierten Gliomzellpopulation nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden	120
Abb. 8-8: Histogramm einer Gliomzellpopulation zwei Stunden nach Aufhebung der Arretierung mit Aphidicolin (2 µg/ml)	121
Abb. 8-9: Synchronisationsexperiment nach 20 Stunden Vorinkubation mit Aphidicolin ..	122

Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1:	Beispiele für Zellkulturen als <i>in vitro</i> Modell.....	10
Tab. 2-2:	Etablierte PET-Radiopharmaka und ihre Hauptanwendung	20
Tab. 2-3:	Geschwindigkeitskonstanten des zellulären Transports und Metabolismus von 2-[¹⁸ F]Fluor-2-Deoxyglukose in Hirntumoren (klinische Daten)	27
Tab. 3-1:	Zusammensetzung des Kulturmediums für U-87 MG und U-373 MG	32
Tab. 3-2:	Zusammensetzung des Kulturmediums für 86HG39	32
Tab. 4-1:	Gesamtzellzahl in unterschiedlichen Kultursystemen	43
Tab. 4-2:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellauswahl	64
Tab. 4-3:	Hemmstoffe der DNA-Synthese zur Zellzyklussynchronisation	68
Tab. 4-4:	Experimentelle Parameter einer Transportuntersuchung mit 2-[¹⁸ F]Fluor-2-Deoxyglukose im Wirbelschichtreaktor.....	75
Tab. 4-5:	Geschwindigkeitskonstanten des zellulären Transports und Metabolismus von 2-[¹⁸ F]Fluor-2-Deoxyglukose.....	81
Tab. 4-6:	Zellspezifische Glukose- und FDG-Aufnahmeraten sowie Lumped Konstanten in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Reaktor	86
Tab. 4-7:	Experimentelle Parameter der Transportuntersuchungen mit 4-cis- und 4-trans-[¹⁸ F]Fluorprolin	92
Tab. 4-8:	Geschwindigkeitskonstanten des zellulären Transports von [¹⁸ F]Fluorprolin	96
Tab. 8-1:	Mindestinkubationszeiten zur vollständigen Zellzyklussynchronisation	111
Tab. 8-2:	Verdopplungszeiten nach Vorinkubation mit Hydroxyharnstoff.....	114
Tab. 8-3:	Relativer DNA-Gehalt der Zellen in der Synthesephase (Peakmaximum) in Abhängigkeit von der Zeit nach Aufhebung der Blockierung	116
Tab. 8-4:	Verdopplungszeiten nach Vorinkubation mit Aphidicolin	119
Tab. 8-5:	Zusammensetzung der Pulvermedien DMEM, Ham's F12 und IMDM (Herstellerangaben)	127

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
BHK	Baby Hamster Kidney
BMFT	Bundesministerium für Forschung und Technologie
CHO	Chinese Hamster Ovary
cpm	counts per minute
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
FCS	Fetal Calv Serum (fötales Kälberserum)
FDG	[¹⁸ F]-2-Fluor-2-Deoxyglukose
FDG-6-P	[¹⁸ F]-2-Fluor-2-Deoxyglukose-6-Phosphat
GC	Gaschromatographie
GLUT	Glukose-Transportcarrier
h	Stunde
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LC	Liquid Chromatography
LD ₅₀	Substanzdosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben
Lsg	Lösung
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PET	Positronenemissionstomographie
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RNA	Ribonukleinsäure
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
T-25	Tissue-Flask (Gewebekulturflasche mit 25 cm ² Wachstumsfläche)

Formelverzeichnis

A_{sp}	spezifische Aktivität	[cpm/mmol]
A_{UL}	Radioaktivität im Umlauf	[cpm]
$A_{UL,t}^*$	zerfallskorrigierte Radioaktivität im Umlauf zur Zeit t	[cpm]
A_{WB}	Radioktivität im Wirbelbett	[cpm]
$A_{WB,t}^*$	zerfallskorrigierte Radioaktivität im Wirbelbett zur Zeit t	[cpm]
$A_{WB,t}^{soll}$	theoretische Radioaktivität im Wirbelbett zur Zeit t ohne zelluläre Aufnahme	[cpm]
A_{Zellen}	intrazellulär akkumulierte Aktivität	[cpm]
$C_{A,UL}$	Aktivitätskonzentration im Umlauf	[cpm/l]
C_b	FDG-Konzentration im Gewebe / in der Zelle	[mmol/l]
$C_{Glk,ein}$	Glukosekonzentration im Frischmedium	[mmol/l]
$C_{Glk,Rkt}$	Glukosekonzentration im Reaktor	[mmol/l]
C_m	FDG-6-Phosphat-Konzentration im Gewebe / in der Zelle	[mmol/l]
C_p	FDG-Konzentration im Blutplasma bzw. Medium	[mmol/l]
C_{soll}	gewünschte FDG-Sollkonzentration	[mmol/l]
C_t	Summe aus FDG- und FDG-6-Phosphat-Konz. in der Zelle	[mmol/l]
F	Porosität / Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett	[-]
k_1^*	Geschwindigkeitskonstante des FDG-Transportes Medium → Zelle bzw. Plasma → Gewebe	[min ⁻¹]
k_2^*	Geschwindigkeitskonstante des FDG-Transportes Zelle → Medium bzw. Gewebe → Plasma	[min ⁻¹]
k_3^*	Geschwindigkeitskonstante der FDG-Phosphorylierung	[min ⁻¹]
k_4^*	Geschwindigkeitskonstanten der FDG-6-Phosphat Dephosphorylierung	[min ⁻¹]
LC_{FDG}	Lumped Konstante	[-]
μ_{max}	maximale Wachstumsrate	[h ⁻¹]
$q_{Aktivität}$	zellspezifische Aktivitätsaufnahme	[cpm/10 ⁶ Zellen/min]
q_{FDG}	zellspezifische FDG-Aufnahmerate	[mmol/10 ⁶ Zellen/min]
q_{Glk}	zellspezifische Glukoseaufnahme	[mmol/10 ⁶ Zellen/min]
τ	Verweilzeit	[h]
$t_{1/2}$	Halbwertszeit	[min]
V_{Glas}	Glasanteil im Wirbelbett	[-]

$V_{\text{Glas+Zellen}}$	Zell- und Glasanteil im Wirbelbett	[-]
V_{it}	Vitalität	[%]
V_{l}	Flüssigkeitsvolumen im Wirbelschichtreaktor	[ml]
X_{ges}	Gesamtzellzahl	[10^6]
$X_{\text{ges,Rkt}}$	Reaktorgesamtzellzahl	[10^6]
X_{vit}	vitale Zellzahl	[10^6]
Z_{t}	Restradioaktivitätsanteil zur Zeit t	[-]

1 Einleitung und Zielsetzung

„Wenn ich einen Versuch beginne, der letzten Endes zum Tod des Tieres führt, empfinde ich ein tiefes Gefühl des Bedauerns, daß ich ein blühendes Leben unterbreche..., daß ich mit grober, ungebildeter Hand einen unaussprechlich kunstvollen Mechanismus zerbreche. Aber ich ertrage das im Interesse der Wahrheit, zum Nutzen des Menschen.“

(Iwan Petrowitsch Pawlow 1849-1936)

Trotz ethischer Bedenken, wie sie im obigen Zitat zum Ausdruck kommen, repräsentieren Tierversuche auch heute immer noch den Standard in den meisten pharmakologischen und toxikologischen Untersuchungen. Dies ist eine Konsequenz aus den Schwierigkeiten, die Komplexität und die Vielzahl der im lebenden Organismus stattfindenden Prozesse durch *in vitro* Modelle erfolgreich zu simulieren (Goldberg 1989).

Tierversuche haben jedoch erhebliche Nachteile. So liefern sie meist wenige Informationen über die den Arzneimittelwirkungen zugrundeliegenden zellulären Effekte und Kontrollmechanismen und – vielleicht noch bedeutsamer – bieten keine Gewähr, daß die erzielten Ergebnisse direkt auf die Wirkung im Menschen extrapoliert werden können. Als Beispiel sei der orale LD₅₀-Wert für Naphthalen angeführt, der bereits zwischen Mäusen und Ratten um 600% differiert! (Shuler 1996)

Aus diesen Einschränkungen erwächst, über die ethisch-moralische Argumentation hinaus, nicht nur ein wissenschaftlich geprägtes Interesse an, sondern sogar die Notwendigkeit von Alternativ- und Ergänzungsmethoden (DelRaso 1993, Frazier 1993).

Im Zuge des enormen Aufschwungs, den die biomedizinischen Techniken in den vergangenen zwei Dekaden erfahren haben, sind eine Vielzahl solcher Methoden entwickelt worden. Insbesondere isolierte tierische und menschliche Zellen sind so zu einem methodischen Instrumentarium geworden, das aus großen Forschungsbereichen, wie der Biochemie, der Immunologie, der Virologie sowie der Impfstoff- und Arzneimittelentwicklung kaum mehr wegzudenken ist. Viele *in vitro* Modelle weisen jedoch Limitierungen auf, die ihre Anwendbarkeit als Ersatzmethode zum Tierversuch stark einschränken, da wesentliche Aspekte nur unzureichend mimikriert werden. Dies betrifft besonders die Kultivierungsbedingungen. Bereits geringe Abweichungen von den physiologischen *in vivo* Verhältnissen können zu erheblichen Veränderungen im Wachstumsverhalten, im Metabolismus und anderen zellulären Reaktionen führen - Veränderungen, die den Wert der erzielten Ergebnisse in Frage stellen können. Hier, in der Entwicklung und Bereitstellung optimierter Kultivierungsmethoden, liegt deshalb eine zentrale Aufgabe und eine Chance für die moderne Zellkulturtechnik.

Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Konzeption, der Realisierung und der Evaluierung eines *in vitro* Modells zur Bewertung radioaktiv markierter Substanzen (Radiotracer) an Zellen.

Solche Untersuchungen werden bisher *in vitro* an immobilisierten Zellen in zweidimensionaler Kultur (Gewebe Kulturflecken, Leighton-Tubes) sowie *in vivo* an Ratten durchgeführt. Die verwendeten Zellkultursysteme stellen dabei zwar ein preiswertes und leicht handhabbares Modell dar, weisen jedoch bezüglich der Simulation der *in vivo* Verhältnisse sowie der Flexibilität der Versuchsbedingungen gravierende Einschränkungen auf.

Dies betrifft insbesondere die unphysiologische Kultivierung als Monolayer und die fehlende Möglichkeit zur Simulation von Wirkstoffkonzentrationsverläufen, wie sie im Organismus auftreten und aus klinischen Studien bekannt sind. Darüber hinaus ist eine Probenahme nur sequentiell möglich.

An ein verbessertes Zellkulturmodell stellen sich somit folgende Anforderungen:

- Exakt und vielfältig einstellbare experimentelle Rahmenbedingungen
- Dreidimensionale Zellkultivierung mit gewebeähnlichen Zelldichten
- Möglichkeit zur jederzeitigen Probenentnahme (Medium und Zellen)
- Idealerweise on-line Analytik
- Simulation der Wirkstoffkonzentrationsverläufe im Organismus

Ausgehend von dem zur Kultivierung von Säugerzellen etablierten Wirbelschichtreaktor (Abb. 1-1), soll ein Konzept entworfen und realisiert werden, das diesen Anforderungen Rechnung trägt. Daraus ergeben sich folgende Einzelaspekte:

- ⇒ Entwicklung und Aufbau einer on-line Analytik zur Messung der intrazellulären Radiotracerakkumulation
- ⇒ Konzeption und verfahrenstechnische Charakterisierung eines Wirbelschichtreaktors mit integrierter Dosierungseinrichtung zur gezielten Simulation von Wirkstoffkonzentrationsverläufen
- ⇒ Auswahl eines geeigneten biologischen Systems (Modellzelllinie)
- ⇒ Durchführung von Transportuntersuchungen mit verschiedenen Radiotracern zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit des entwickelten *in vitro* Modells

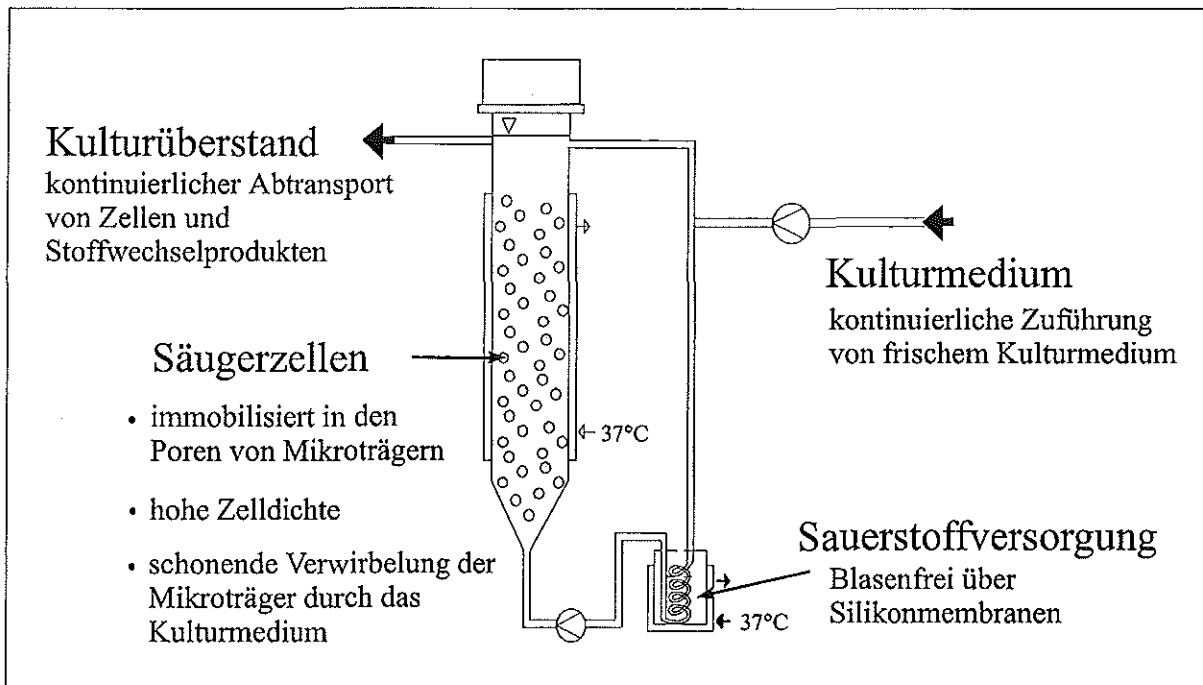


Abbildung 1-1: Wirbelschichtreaktor zur kontinuierlichen Kultivierung von Säugerzellen

Der Wirbelschichtreaktor ist ein kontinuierlich betriebenes Fermentationssystem zur Kultivierung von Säugerzellen. Durch Zellimmobilisierung in offenporigen Mikroträgern, die zur Vermeidung von Gradienten durch das zirkulierende Kulturmedium schonend verwirbelt werden, können dabei gewebeähnliche Zelldichten realisiert werden. Die Sauerstoffversorgung der Zellen erfolgt blasenfrei durch dünnwandige Silikonmembranen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Vom Wirkstoff zum Arzneimittel

Die Zulassung eines neuen Wirkstoffes als Medikament stellt den letzten Schritt eines hochkomplexen, langwierigen und kostenintensiven Prozesses dar (Abb. 2-1).

Am Anfang stehen die Aufstellung der pharmakologischen Ziele und die Darstellung von potentiell wirksamen Verbindungen. Je nach ihrer Herkunft (Naturprodukt oder synthetische Verbindung) bedeutet dies Isolierung und Strukturaufklärung oder gezielte chemische Synthese im Labor. Die auf diesem Wege erhaltenen Substanzen müssen drei elementare Bedingungen erfüllen:

1. Gute Wirksamkeit bei geringer Dosierung
2. Gute Verträglichkeit und keine oder nur geringe, im Verhältnis zum Nutzen akzeptable, Nebenwirkungen
3. Keine Akkumulation des Wirkstoffes und seiner Biotransformationsprodukte in der Umwelt

Daraus ergeben sich für die weiteren Untersuchungen zwei zentrale Fragestellungen, deren Beantwortung Gegenstand der folgenden pharmakologischen Prüfungen und klinischen Studien ist:

Was macht der Wirkstoff mit dem biologischen System?

Was macht das biologische System mit dem Wirkstoff?

Im ersten Schritt, dem primären Screening, werden alle Substanzen auf ihre grundsätzliche Wirksamkeit hin überprüft. In dieser Phase haben Tierversuche inzwischen nur noch eine untergeordnete Bedeutung, da sich der grundsätzliche Wirksamkeitsnachweis häufig auch durch biochemische oder zellbiologische Untersuchungen klären lässt. Die Mehrzahl der untersuchten Substanzen scheidet dabei für die weiteren Prüfungen, die mehrheitlich im Tierversuch durchgeführt werden, aus. Daher fällt auch in diesem Stadium, abhängig von der Güte des verwendeten *in vitro* Modells, die Entscheidung über die Zahl der im weiteren Verlauf der Arzneimittelentwicklung notwendigen Tierversuche.

Beim nächsten Schritt werden unter Einsatz verschiedener Tiermodelle zwei Untersuchungsrichtungen verfolgt. Zum einen wird die akute Toxizität geprüft, also die systemische Giftigkeit einer Substanz nach einmaliger Verabreichung. Die Beurteilung erfolgt anhand des Symptombildes beim lebenden Tier, anhand von Sektionsbefunden und anhand der Bestimmung des LD₅₀-Wertes (Substanzdosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben). Parallel zur

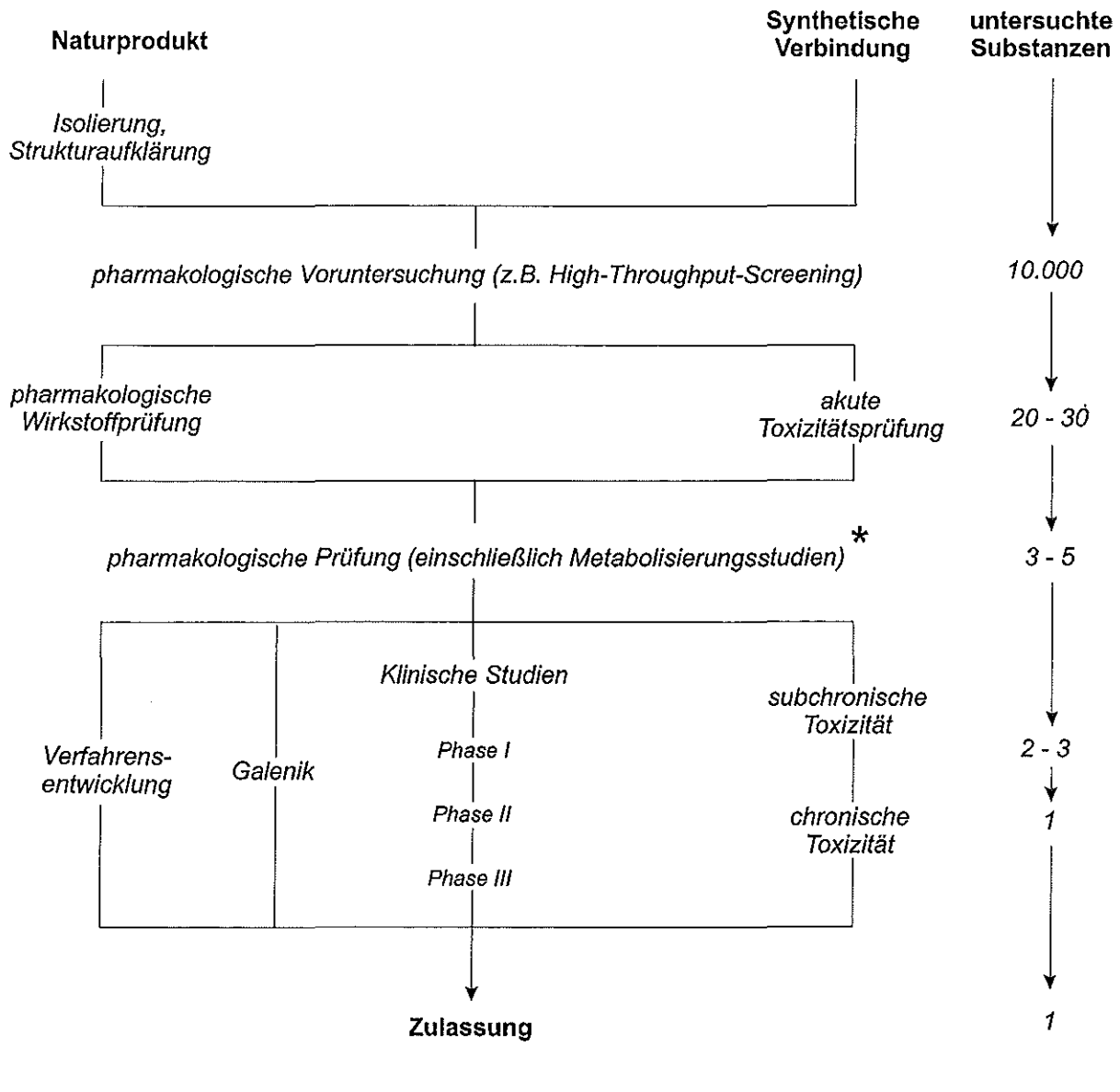
Toxizitätsprüfung erfolgt die vertiefte pharmakologische Wirkstoffprüfung (Pharmakokinetik und Pharmakodynamik). Unter Pharmakokinetik faßt man dabei die Aspekte Adsorption, Distribution, Metabolismus und Elimination zusammen, weshalb häufig auch von ADME-Untersuchung gesprochen wird. Zum Bereich der Pharmakodynamik zählt die Klärung der Fragen, wo, wann und wie der pharmakologische Effekt des Wirkstoffes zustande kommt. Die in diesem Zusammenhang ebenfalls durchgeführten Verteilungsstudien zur Verfolgung des Wirkstoffes und seiner Biotransformationsprodukte bedienen sich in der Regel radioaktiv markierter Wirkstoffanaloga, die im Gegensatz zur unmarkierten Substanz im picomolaren Konzentrationsbereich noch exakt nachgewiesen werden können. Dazu erfolgt eine präparative Auftrennung von Extrakten aus Exkrementen, Körperflüssigkeiten, Organen und Geweben mittels HPLC, GC oder LC.

Die Anzahl der Substanzen, mit denen diese Untersuchungen weitergeführt werden, nimmt ständig ab, so daß auf der letzten Stufe der Prüfungen nur noch ganz wenige übrigbleiben.

Im letzten Abschnitt beginnen die klinischen Prüfungen, die in drei Stufen durchgeführt werden - zuerst als reine Verträglichkeitsprüfung an gesunden Freiwilligen (Probanden), anschließend in einer ersten therapeutischen Anwendung an wenigen Patienten und abschließend als breit angelegte Therapiestudie an einem großen Patientenkollektiv, das nicht selten mehrere Tausend Patienten umfaßt. Parallel zu den klinischen Studien werden, falls noch nicht vorher abgeschlossen, Tierversuche zur Ermittlung der subchronischen und chronischen Toxizität durchgeführt. Dabei meint der Begriff subchronische Toxizität die systemische Giftwirkung nach wiederholter Verabreichung innerhalb eines kürzeren Zeitraums, während die chronische Toxizität die mehrmalige Verabreichung über einen längeren Zeitraum umfaßt. Ebenfalls zeitgleich zu den klinischen Studien finden die Verfahrensentwicklung der Produktion im industriellen Maßstab sowie die Suche nach der optimalen Darreichungsform (Galenik) statt.

Nach dem erfolgreichen Abschluß all dieser Untersuchungen erfolgt die Zulassung des neuen Arzneimittels durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte.

Der gesamte Entwicklungsprozeß dauert bis zur Zulassung 8 – 12 Jahre, und von ursprünglich rund 10.000 untersuchten Substanzen bleibt nur eine übrig.



- *: Einsatz radioaktiv markierter Wirkstoffanaloga
 Phase I: Erste Verträglichkeitsprüfung an gesunden Probanden
 Phase II: Erste therapeutische Anwendung an wenigen Patienten
 Phase III: Breitere therapeutische Anwendung an großem Patientenkollektiv

Abbildung 2-1: Stadien der Arzneimittelentwicklung

Es wäre vermessen anzunehmen, die Entwicklung von Arzneimitteln käme eines Tages völlig ohne den Einsatz von Tieren im Rahmen der pharmakologischen Prüfungen aus. Dies ist nicht nur eine Folge von gesetzlichen Vorschriften, sondern auch eine Konsequenz aus der funktionellen Begrenztheit von *in vitro* Systemen im Vergleich zum ganzen Organismus. Dies

sei am Beispiel isolierter Zellen, wie sie im Screening häufig eingesetzt werden, näher erläutert.

Eine Zelle enthält in ihrem Kern zwar die gesamte Erbinformation des betreffenden Organismus, aber die Zelle ist spezialisiert, das heißt, sie hat einen gewebsspezifischen Aufbau, und ihre Leistungen sind ausgerichtet auf eine bestimmte Aufgabe. Aus diesem Grund kann eine Zelle in einem *in vitro* Modell nur in sehr begrenztem Umfang einen ganzen Organismus vertreten und nicht zur Beantwortung von Fragen herangezogen werden, die auf Leistungen des Gesamtorganismus gerichtet sind (BMFT, 1990).

Trotzdem können *in vitro* Modelle wesentlich zur Reduzierung von Tierversuchen beitragen; denn die Gesamtzahl der im Rahmen einer Arzneimittelentwicklung durchgeführten Tierversuche wird maßgeblich in der pharmakologischen Voruntersuchung und damit durch die Güte des verwendeten *in vitro* Modells bestimmt. Jede durch unzureichende Mimikrierung der *in vivo* Verhältnisse falsch positiv in die weiteren Untersuchungen mit einbezogene Substanz bedingt zusätzliche Tierversuche. Deshalb liegt in der Entwicklung möglichst relevanter *in vitro* Systeme der Schlüssel zur Reduzierung von Tierversuchen in der Arzneimittelentwicklung.

2.2 *In vitro* Systeme

Als Folge intensiver Forschung stehen inzwischen ausgesprochen zahlreiche und vielfältige tierfreie Prüf- und Ergänzungsmethoden zur Verfügung. Bisher hat sich jedoch noch keine einheitliche Benennung für sie durchgesetzt. Man spricht von Alternativmethoden, von *in vitro* Methoden oder von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch. Jede dieser Bezeichnungen hat ihre spezifischen Vor- und Nachteile (BMFT, 1990). Der Ausdruck "Alternativmethoden" ist umstritten, weil er die Problematik verkürzt reflektiert und die Vorstellung erweckt, der Verzicht auf Tierversuche sei vollständig möglich. Der Begriff "*in vitro* Methode" stammt dagegen aus dem wissenschaftlichen Sprachgebrauch und wirkt beim Laien oft künstlich und fremd. Der Ausdruck "Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch" wird der Problematik durchaus gerecht, ist allerdings umständlich. Im englischen Sprachgebrauch dominiert der Begriff 3R für Refine, Reduce, Replace (verfeinern, vermindern, ersetzen). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird die Bezeichnung *in vitro* Methode Verwendung finden.

2.2.1 Ansätze für *in vitro* Modelle

Der Versuch, die existierenden *in vitro* Modelle sowie die ihnen zugrunde liegenden methodischen Ansätze im Rahmen dieser Arbeit umfassend beschreiben zu wollen, ist durch ihre inzwischen unüberschaubare Vielfalt a priori zum Scheitern verurteilt.

Deshalb soll der Versuch unternommen werden, auf Basis der methodischen Ansätze nur eine Unterteilung in verschiedene Klassen vorzunehmen, die jedoch keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt. Für jede Gruppe werden einige besonders anschauliche Beispiele exemplarisch dargestellt.

Kultivierung tierischer oder menschlicher Zellen

Die Verwendung von tierischen und menschlichen Zellkulturen in der biologischen, medizinischen und pharmazeutischen Forschung und Technologie hat in den letzten Jahrzehnten einen enormen Aufschwung erfahren. Die Kulturen sind mittlerweile zu unersetzlichen Modellsystemen für die *in vivo* Situation geworden und können in der Grundlagenforschung, physiologisches Verhalten vorausgesetzt, Teilaspekte eines Organs oder des gesamten Organismus repräsentieren. Die Zellen kommen dabei in den unterschiedlichsten Anwendungsbereichen (pharmakologische und toxikologische Prüfungen, Aufklärung zellulärer Grundlagen von Krankheiten, Produktion von Antikörpern und Proteinen) zum Einsatz und tragen so in erheblichem Maße zur Reduzierung der Zahl von Tierversuchen bei.

Innerhalb der tierischen und menschlichen Zellkulturen unterscheidet man primäre und permanente Kulturen. Primärkulturen überleben im allgemeinen nur einige Tage oder wenige Wochen, während permanente Zelllinien dauerhaft lebensfähig sind und kontinuierlich proliferieren. Bei letzteren handelt es sich jedoch nicht um ‚normale‘, sondern um transformierte Zellen, die von den Primärkulturen phänotypisch mehr oder weniger stark abweichen können.

Für die Produktion von Proteinen sind Säugerzellkulturen deshalb besonders interessant, weil sie die Produkte in humanspezifischer Form (korrekte Glykosylierung und Faltung) herstellen, was bei der Produktion durch gentechnisch veränderte Bakterien nicht möglich ist. Die Spanne der durch Zelllinien produzierten Substanzen reicht von Impfstoffen über Immunmodulatoren und Hormonen bis hin zu Blutproteinen. In der Immunologie ist die Herstellung monoklonaler Antikörper erst durch die Hybridomtechnik (Köhler und Milstein, 1975) möglich geworden, und in der Medizin werden *in vitro* kultivierte Zellen als Substitution für geschädigte körpereigene Zellen eingesetzt. Als Beispiel seien hier die Keratinozyten bei Verbrennungen, die Inselzellen des Pankreas bei Diabetes und hämopoetische Stammzellen bei Leukämie genannt (Uphoff und Drexler, 1994).

Durch die enormen Fortschritte der Zellkulturtechnik in den vergangenen Jahren können inzwischen Zellen fast aller Organe und Gewebe *in vitro* kultiviert und für Untersuchungen eingesetzt werden. Tabelle 2-1 gibt einen, wenn auch zwangsläufig unvollständigen, Überblick.

Nicht berücksichtigt in dieser Aufzählung sind die Tumormodelle, von denen das Deutsche Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg mehr als 2000, stellvertretend für fast alle bekannten Krebserkrankungen, zur Verfügung stellt. Mit ihrer Hilfe können Untersuchungen im Rahmen der Krebsforschung, z.B. das Screening potentieller Zytostatika, zunächst ohne Einsatz von Versuchstieren durchgeführt werden. Durch den Einsatz von Robotern ist besonders bei diesen Untersuchungen ein Automatisierungsgrad erreicht, der die Untersuchung und Bewertung einer großen Anzahl von Substanzen ermöglicht.

Organ / Gewebe	Forschungsgegenstand	Literatur
Blutgefäße	Arteriosklerose	Krautschick 1990
Haut	Zytotoxizität, Hautirritation	Hoh 1987; Oliver 1988
Herz	Herzmuskelschwäche, Wirkstoffscreening Nebenwirkungen von Chemotherapeutika	Hasenfuss 1992, Wallukat 1991 Löw-Friedrich 1990
Leber	Metabolisierung von Wirkstoffen	Utesch 1992
Lunge	Toxizität von Zigarettenrauch	Fielding 1989
Magen	Resorption von Wirkstoffen	Fürst 1982
Nerven	Schmerz, Epilepsie	Reuss 1986, Wienrich 1989, Lampe 1990, Netzer 1990
Nieren	Screening von Schleifendiuretika Stoffwechselaufklärung	Scott 1986, MacDonald 1991

Tabelle 2-1: Beispiele für Zellkulturen als *in vitro* Modell

Viele neu entwickelte Verfahren auf Basis von Zellkulturen liefern wertvolle Informationen über Nutzen und Risiko von Substanzen oder sonstigen Maßnahmen am Menschen, die mit Tierversuchen nicht erreicht werden können. In diesen Fällen liegt kein Ersatz für einen kon-

kreten Tierversuch vor, sondern eine neue Methode, die ohne Tierversuche unser Wissen erweitert und verbessert. Auch dadurch können Tierversuche überflüssig werden.

Niedere Tiere und Tier-Eier

Unter dem Begriff niedere Tiere werden in der Regel alle Nicht-Wirbeltiere vereinigt, z.B. Korallentiere, Würmer, Schnecken oder Insekten. Die Verwendung dieser Tiere wird jedoch kontrovers diskutiert. Zum einen wird die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen häufig in Frage gestellt, zum anderen kann der Ersatz eines Tieres durch ein anderes, wenn auch weniger hoch entwickeltes, nur eine Zwischenetappe auf dem Weg zu einer echten Alternativmethode darstellen.

Die Verwendung bebrüteter Hühnereier ist dagegen nicht nur eine allgemein akzeptierte Methode, sie stellt als Alternativmethode zum besonders stark kritisierten Draize-Test (Reiztest am Kaninchenaugen) sogar eines der am weitesten verbreiteten *in vitro* Modelle dar. Die unter der Schale bebrüteter Hühnereier liegende Chorionallantoismembran weist ein intaktes und funktionsfähiges Blutgefäßsystem auf und gilt als schmerzunempfindlich, da bis zum Testzeitpunkt (9. Bebrütungstag) noch keine Nervenfasern ausgebildet sind. Die nach Kontakt mit reizenden Substanzen auftretenden Irritationen sind mit den Rötungen und Schwellungen vergleichbar, die bei entsprechenden Untersuchungen am Kaninchenaugen beobachtet werden. Bei dieser Methode handelt es sich um einen Grenzfall zwischen *in vitro* und *in vivo* System, da der unter der Membran liegende Embryo zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits deutlich erkennbar ist (Sewing 1994).

***In vitro* Systeme mit Mikroorganismen**

Mikroorganismen sind mit Wirbeltieren nur noch so entfernt verwandt, daß sie nur in Einzelfällen als brauchbare *in vitro* Modelle verwendet werden können. Ein solches Beispiel ist der sogenannte AMES-Test, ein *in vitro* Schnelltest zur Überprüfung der Mutagenität von Substanzen. Dabei werden *Salmonella typhimurium* auf Agar-Platten mit den Testsubstanzen in Kontakt gebracht und die Mutationsrate der Bakterienkolonien als Maß für die Mutagenität verwendet. Der AMES-Test kann jedoch nur Substanzen erkennen, die genotoxisch sind, also die DNA angreifen – kanzerogene Verbindungen, die nicht gleichzeitig auch mutagen sind, werden falsch-negativ detektiert.

Um die Biotransformation der Testsubstanzen zu simulieren und damit eine eventuelle Mutagenität der metabolischen Abbauprodukte zu untersuchen, können den Versuchsansätzen bei Bedarf Säugetier-Lebermikrosomen zugesetzt werden (Lebsanft 1989).

Computergestützte Verfahren

Der Einsatz von Computern kann in zweierlei Hinsicht zur Reduzierung von Tierversuchen beitragen – als indirekte Einsparmaßnahme bei der Planung der Wirkstoffsynthese sowie direkt durch Simulation von Substanzwirkungen aufgrund zellkinetischer Kenntnisse.

Aus Ergebnissen früherer Tierversuche und *in vitro* Untersuchungen sowie durch die zunehmenden Einblicke in die zellulären Wirkmechanismen von Substanzen können am Computer maßgeschneiderte Wirkstoffe entworfen werden. Dies ermöglicht ein gezielteres Auffinden der optimalen Zielstrukturen und damit eine deutliche Reduzierung der Substanzen, die in die pharmakologischen Voruntersuchungen einbezogen werden müssen. Durch den rasant fortschreitenden Erkenntnisgewinn über die molekularbiologischen Ursachen von Krankheiten wird die Effektivität dieses Computer-Modellings in Zukunft weiter steigen.

Auch auf der Ebene der Prüfung von Substanzen an Versuchstieren lassen sich durch Computereinsatz wohl bald Einsparungen realisieren, da es inzwischen möglich ist, einfache biochemische und physiologische Funktionen durch zellkinetische Parameter zu beschreiben. Dies gilt insbesondere für die Wirkung zytotoxischer Medikamente auf Tumorzellen (Knolle, 1988). Somit erscheint es für die nahe Zukunft realistisch, zelluläre Effekte von Substanzen mathematisch zu simulieren und so deren Wirksamkeit ohne die Durchführung von Tierversuchen zu beurteilen.

Lehrfilme, Videos und Computerprogramme

Die Durchführung von Tierversuchen sowie deren Ersatz durch Alternativmethoden im Rahmen der Aus- und Weiterbildung wird derzeit noch heftig diskutiert. Es ist einerseits nachvollziehbar, daß jemand, der beruflich mit Tieren umgehen muß, im Rahmen seiner Ausbildung darauf vorbereitet wird. Andererseits bietet die inzwischen verfügbare Vielzahl von audiovisuellen Ersatzmethoden eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem Experiment. Insbesondere durch interaktive Computerprogramme, verknüpft mit Videoaufnahmen, lassen sich Inhalte mindestens gleichwertig, wenn nicht gar besser vermitteln. Zudem können Eingriffe und Behandlungen beliebig oft wiederholt werden.

Trotzdem werden sich Eingriffe und Behandlungen am lebenden Tier im Rahmen der fortschrittenen Ausbildung zum Erlernen von Arbeitstechniken vorerst nicht völlig vermeiden lassen.

2.2.2 Stufen der Entwicklung einer *in vitro* Methode

Der Verlauf der Entwicklung einer *in vitro* Methode kann im Detail je nach dem gewählten methodischen Ansatz durchaus differieren. Ihnen allen gemein ist jedoch die Einteilung in vier Phasen: Orientierung, Evaluierung, Standardisierung und Validierung.

Deren Inhalt sei exemplarisch für eine Zellkulturmethode, wie sie auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, näher erläutert.

In der Orientierungsphase erfolgen der konzeptionelle Entwurf, der Aufbau und die verfahrenstechnische Charakterisierung des verwendeten Kultursystems. Darüber hinaus muß eine Entscheidung über das geeignete biologische Modell, also die verwendeten Zellen (Primärmaterial oder permanente Zelllinie), getroffen und deren Verfügbarkeit sichergestellt werden. Nach der anschließenden Etablierung und Optimierung der Zellkulturbedingungen kann die Evaluierung des Systems beginnen. Die im Rahmen der Orientierungsphase zu berücksichtigenden Anforderungen an das verfolgte Konzept werden in Kapitel 2.2.3 behandelt.

Zur Evaluierung wird an ausgewählten Testsubstanzen die Leistungsfähigkeit des aufgestellten Modells untersucht, indem die erzielten Ergebnisse mit vorliegenden Erkenntnissen aus Tierversuchen oder klinischen Studien verglichen werden. Bei erfolgreicher Beurteilung hat die Entwicklung der *in vitro* Methode ein Stadium erreicht, in dem Partner aus anderen Forschungseinrichtungen in die weitere Methodenentwicklung einbezogen werden müssen. Dazu ist die Standardisierung des Systems sowie der Untersuchungsprotokolle unabdingbar, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu garantieren.

Abgeschlossen wird die Entwicklung einer *in vitro* Methode durch die Validierungsphase, in der in einem groß angelegten Ringversuch unter Einbeziehung der Zulassungsbehörden der Wert des neuen Modells beurteilt werden muß. Nach erfolgter Validierung bleibt im Einzelfall zu prüfen, auf welchem Wege eine allgemeine Akzeptanz der neuen Alternativmethode erreicht werden kann.

2.2.3 Anforderungen an *in vitro* Modelle

Der Wert eines *in vitro* Modells hängt von seiner Übereinstimmung mit dem biologischen System ab, also seiner Fähigkeit, die physiologischen Verhältnisse im Organ/Gewebe oder dem Gesamtorganismus zu mimikrieren (Shuler 1996). Für die Entwicklung eines Zellkulturmodells ergibt sich daraus die primäre Aufgabe, die physiologischen Wachstumsbedingungen der Zellen möglichst gut nachzustellen. Im Regelfall, mit Ausnahme reifer Blutzellen, ist dies das Gewebe, also die Kultivierung im dreidimensionalen Verband - eine Forderung, der viele der aktuell verwendeten *in vitro* Modelle nicht gerecht werden. Eine positive Ausnahme

bilden die sogenannten Multizell-Spheroïden, die inzwischen sowohl aus Tumorzellen als auch aus gesundem Gewebe generierbar sind, und die Untersuchungen erlauben, die am Tier nur schwer oder kaum möglich sind. Als Beispiel sei die Untersuchung des invasiven Wachstums maligner Zellen genannt (Bräuner 1987). In der Herstellung und Handhabung sind diese Zellaggregate jedoch ausgesprochen anspruchsvoll.

Von Interesse ist ebenfalls eine große Flexibilität des Systems hinsichtlich der experimentellen Rahmenbedingungen. Die Entwicklung eines ‚Idealmodells‘, das zur Untersuchung aller Fragestellungen eingesetzt werden kann, ist natürlich reine Utopie. Je variabler die experimentellen Möglichkeiten eines *in vitro* Konzeptes aber sind, desto größer ist die Zahl der Einsatzmöglichkeiten, und desto leichter werden sich potentielle Anwender finden lassen.

Unverzichtbar ist eine Beobachtungs- und/oder Zugriffsmöglichkeit auf das biologische System während der Untersuchung, also die Implementierung einer Probenahme oder idealerweise einer on-line Analytik.

Im Rahmen von Wirkstoffprüfungen an Versuchstieren treten nach Applikation der Testsubstanz, verursacht durch Aufnahme und Metabolisierung in verschiedenen Organen, Änderungen in der Wirkstoffkonzentration auf. *In vitro* Modelle, die solche Konzentrationsverläufe gezielt einzustellen vermögen, eröffnen bessere Möglichkeiten zur Simulation der Verhältnisse im Tierversuch und damit den Zugang zu möglicherweise relevanteren Ergebnissen.

Ebenfalls nicht zu vernachlässigen sind ökonomische Aspekte. Eine Alternativmethode, die eine aufwendige Spezialisierung hinsichtlich Ausrüstung und Handhabung erfordert, wird sich weder in der Industrie noch in Forschungseinrichtungen durchsetzen können.

Zusammengefaßt ergeben sich folgende grundlegende Anforderungen an neue *in vitro* Systeme, die zwar nicht in jedem Einzelfall maximal eingehalten und erfüllt werden können, die aber Gegenstand und Ziel des wissenschaftlichen Bemühens sein sollten:

1. Exakte, vielfältig einstellbare experimentelle Rahmenbedingungen
2. Zellkultivierung unter physiologischen *in vivo* Bedingungen
3. Möglichkeit zur jederzeitigen Probenahme; idealerweise on-line Analytik
4. Simulation von Wirkstoffkonzentrationsverläufen im Organismus
5. Einfache Handhabung und geringe Kosten

2.3 Zellzyklus und Zellzyklussynchronisation

Im Gegensatz zu Bakterien, die bei exponentiellem Wachstum praktisch kontinuierlich ihre DNA replizieren und sich teilen, läuft die Teilung eukaryontischer Zellen in einem zyklischen Geschehen mit funktionell unterschiedlichen Phasen ab (Abb. 2-2). Auf die Phase der aktiven Zellteilung (Mitose: M-Phase) folgt eine erste Zwischenperiode, die G₁-Phase (G für engl. gap = Lücke), eine Periode intensiver Proteinsynthese zur Auffüllung der nach der Zellteilung ausgedünnten Zellpools. Hieran schließt sich die Synthesephase an (S-Phase), während der die DNA repliziert und die Histone und andere Zellkernproteine synthetisiert werden. Beim Eintritt in die S-Phase überschreitet die Zelle den sogenannten Restriktionspunkt, während sie unter ungünstigen physiologischen Verhältnissen in einen reversiblen Ruhezustand (G₀-Phase) eintritt (Kiesewetter 1998). An die S-Phase schließt sich eine zweite Zwischenperiode (G₂-Phase) an, die schließlich in die erneute Zellteilungsphase mündet (Karlson 1994).

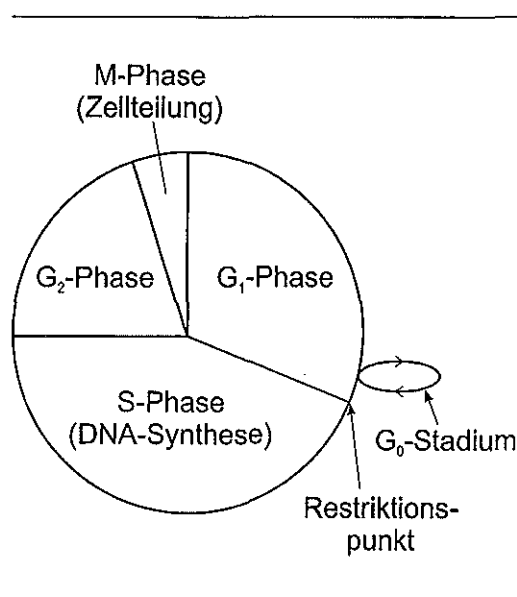


Abbildung 2-2: Zellzyklus einer Säugerzelle

Die Regulation des Zellzyklus geschieht an bestimmten Zeitpunkten durch ein System von Protein-Kinasen. Zur Aktivierung müssen diese Kinasen an spezifische Proteine, sog. Cycline, binden, die zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus synthetisiert bzw. abgebaut werden. Bei Hefen wurden G₁-Cycline (CLN 1-3) beschrieben, die für den G₁/S-Übergang entscheidend sind, während eine zweite Cyclin-Klasse (mitotisches Cyclin B) den Übergang von G₂ zur Mitose auslöst. Der Abbau der einzelnen Cycline wird durch Ubiquitin-Übertragung auf die jeweiligen Cyclin-Arten ausgelöst.

Die an der Regulation des Zellzyklus beteiligten Gene werden häufig auch als cdc (cell cycle division genes) bezeichnet (Denhardt 1986).

Viele Arzneimittel wirken spezifisch auf Zellen in bestimmten Stadien des Zellzyklus. So blockiert z.B. das in der Tumorbehandlung eingesetzte Chemotherapeutikum Doxorubicin die Topoisomerase und wirkt so selektiv auf Zellen in der Synthese-Phase (Antman, 1996).

Zur Aufklärung der genauen Wirkmechanismen solcher Substanzen sind „normale“ Zellkulturen nur begrenzt einsetzbar, da durch die Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus eine Mischwirkung entsteht. Besser geeignet sind synchronisierte Kulturen, also Zellen, die sich alle in der gleichen Zellzyklusphase befinden und diesen synchron durchlaufen. So kann die Wirkung der jeweiligen Substanz in den einzelnen Phasen des Zellzyklus getrennt untersucht werden.

Wegen der Bedeutung und der breiten Einsatzmöglichkeit zur Beantwortung zellbiologischer Fragestellungen wurden zahlreiche verschiedene Methoden zur Synchronisation von Zellkulturen entwickelt. Ihnen liegen unterschiedliche Prinzipien zugrunde, und sie führen zur Synchronisation in verschiedenen Phasen des Zellzyklus.

Im folgenden werden die wichtigsten Methoden kurz erläutert:

1. *Trennung aufgrund physikalischer Eigenschaften*

Hierzu zählen sowohl Zentrifugationsmethoden als auch der sogenannte mitotic shake-off. Die erstgenannten Techniken machen sich die Tatsache zunutze, daß die Zellgröße zwischen G₁-Phase und Mitose zunimmt. Durch gezielte Zentrifugationsschritte erhält man Zellen unterschiedlicher Größe und damit unterschiedlicher Position im Zellzyklus (Mitchell, 1977).

Die Methode des mitotic shake-off eignet sich nur für adhärente Zellen und basiert darauf, daß sich diese Zellen während der Mitose abrunden und kurzzeitig eine deutlich abgeschwächte Adhärenz aufweisen. Bei Kultivierungen in Rollerflaschen können diese Zellen durch Erhöhung der Umdrehungszahl leicht von der Wachstumsoberfläche abgelöst und separiert werden. Man erhält so eine in der Mitose synchronisierte Zellpopulation (Terasima, 1963).

2. *Trennung aufgrund biochemischer Eigenschaften*

Bei dieser Methode wird die DNA der Zellen mit einem Vitalfarbstoff (z.B. Hoechst 33342) angefärbt und anschließend mittels Flow Cytometer und Zellsortierer entsprechend ihrem

DNA-Gehalt getrennt. Der Farbstoff schädigt die Zellen nicht und erlaubt eine anschließende Weiterkultivierung.

3. Chemische Arretierung im Zellzyklus

Die Methode der chemischen Arretierung bedient sich meist der selektiven Blockierung eines für die Überschreitung des Restriktionspunktes (Abb. 2-2) wichtigen Enzyms. So blockiert beispielsweise Hydroxyharnstoff die Tetrahydrofolat-Dehydrogenase (Tobey, 1972) oder Aphidicolin die DNA-Polymerase α (Ikegami, 1978). In den meisten Fällen weisen diese Substanzen jedoch ein erhebliches toxisches Potential insbesondere für Zellen in der S-Phase auf (Fox, 1987). So ist das ebenfalls häufig für Zellsynchronisationen verwendete Methotrexat z.B. ein in der Tumorbehandlung verwendetes Chemotherapeutikum. Die toxische Wirkung auf Zellen in der G₁-Phase ist meist erheblich geringer, was man sich bei den kombinierten Methoden zunutze macht.

4. Kombinierte Methoden

Diese Techniken kombinieren in der Regel den mitotic shake-off mit einer anschließenden chemischen Arretierung der gesammelten Zellen. Dies hat den Vorteil, daß die Toxizität der verwendeten Substanzen minimiert wird und man eine am Restriktionspunkt arretierte Zellpopulation erhält (Fox, 1987).

Im Tierversuch ist eine Zellzyklussynchronisation nicht möglich, so daß sich hieraus ein Vorteil für *in vitro* Methoden ergibt.

2.4 Radiopharmazeutika für *in vivo* Untersuchungen

Die Positronenemissionstomographie (PET) und die Einzelphotonenemissionscomputertomographie (SPECT) sind bildgebende Verfahren zur Durchführung von *in vivo* Untersuchungen in der klinischen Diagnostik unter Verwendung radioaktiv markierter Moleküle (Radiotracer oder Radiopharmazeutika). Im Rahmen der SPECT kommen γ -Strahler zum Einsatz, während die PET Positronen-emittierende Radionuklide verwendet und deren Vernichtungsstrahlung detektiert.

Da in dieser Arbeit ausschließlich der Positronenstrahler [¹⁸F] eingesetzt wurde, wird im folgenden näher auf die Positronenemissionstomographie, die dabei eingesetzten Radiotracer sowie auf die aktuelle Forschung eingegangen. Die meisten der behandelten Aspekte besitzen jedoch auch für die SPECT Gültigkeit. [¹⁸F] geht durch Emission eines Positrons und

eines Neutrino und anschließende Paarvernichtung des Positrons mit einem Elektron in [^{18}O] und zwei γ -Quanten von 511 keV über. Die γ -Quanten werden dabei im 180° Winkel emittiert (Abb. 2-3).

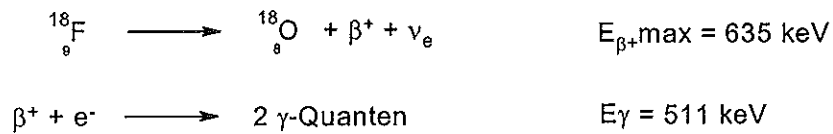


Abbildung 2-3: Radioaktiver Zerfall des Fluorisotops ^{18}F

Mit der Positronenmissionstomographie können biochemische und physiologische Vorgänge im lebenden Organismus nicht nur mit hoher Sensitivität und Ortsauflösung (3-5 mm) erfaßt werden, die Verwendung geeigneter biomathematischer Modelle erlaubt sogar deren regionspezifische Quantifizierung. Damit gelingt der Brückenschlag von der *in vitro* zur *in vivo* Molekularbiologie (Coenen 1994).

Durch die hohe Empfindlichkeit der Positronenmissionstomographie können die Radiotracer in außerordentlich geringen Mengen eingesetzt werden (Bei Untersuchungen am Menschen kann eine Masse von 0,1 μg leicht unterschritten werden.) Dies schließt eine pharmakodynamische Wirkung des Tracers ebenso aus, wie eine Störung der biochemischen Fließgleichgewichte im Organismus. Darüber hinaus wird auch die pharmakokinetische Untersuchung toxischer Verbindungen möglich.

Die Zahl der für die PET verwendbaren Nuklide ist leider sehr begrenzt. Die wichtigsten sind [^{11}C], [^{15}O] und [^{18}F], wobei [^{11}C] ($t_{1/2} = 20,4$ Minuten) und [^{15}O] ($t_{1/2} = 2,05$ Minuten) die Synthese von Radiotracer ermöglichen, die in Molekülstruktur und Elementzusammensetzung dem unmarkierten Molekül entsprechen. Insbesondere [^{15}O] ist jedoch extrem kurzlebig, was die synthetischen und pharmakologischen Verwendungsmöglichkeiten einschränkt. Ein Transport solcher Radiotracer über größere Entfernungen ist nicht möglich. Von Vorteil sind dagegen die durch die kurze Halbwertszeit bedingte geringe Strahlendosis und die schnelle Wiederholbarkeit von Untersuchungen.

Die Verwendung anderer Nuklide mit längerer Halbwertszeit, z.B. [^{18}F] ($t_{1/2} = 109,7$ Minuten), erlaubt zwar ausgedehntere Synthesen und längere Untersuchungszeiten, führt aber in der Regel zu einem Analogtracer, dessen pharmakologisches Verhalten vor der Durchführung pharmakokinetischer Studien erst untersucht werden muß.

Die wichtigsten Einsatzbereiche in der nuklearmedizinischen Diagnostik sind zur Zeit die Erfassung folgender biochemischer und physiologischer Funktionen (Coenen 1994).

- Regionaler Blutfluß und Sauerstoffverbrauch
- Substratstoffwechsel
- Rezeptordichte und -besetzung
- Immunreaktionen
- Biochemie neuronaler und hormoneller Transmitter
- Enzymreaktionen

Obwohl in der Literatur inzwischen weit über 500 Radiotracer für die Positronenemissionstomographie beschrieben wurden, befinden sich erst relativ wenige in der routinemäßigen klinischen Anwendung – die meisten zur Untersuchung physiologischer Grundfunktionen. Tabelle 2-2 gibt einen Überblick über die wichtigsten PET-Tracer und ihre Hauptindikationen.

Die Entwicklung neuer Radiotracer gliedert sich in zwei Teilschritte. Im Mittelpunkt der Konzeption einer Synthesestrategie stehen Aspekte wie die beabsichtigte Position des Markierungsisotopes, die Synthesedauer inklusive Isolierung und Reinigung, die radiochemische Ausbeute und die spezifische Aktivität. Daran anschließend erfolgt die pharmakologische Validierung. Die PET erlaubt nur die Bestimmung der Aktivitätskonzentration im Organismus, nicht aber deren molekularer Struktur. Deshalb ist die Aufklärung des metabolischen Schicksals des Radiotracers elementare Voraussetzung. Für stoffwechselanaloge Radiotracer (z.B. [^{18}F]FDG oder [^{18}F]Fluortyrosin) bedeutet dies die Untersuchung des Metabolismus hinsichtlich Stabilität, Spezifität und störender Nebenprodukten sowie die Ermittlung der Aufnahmekinetik und der Organverteilung. Diese pharmakologische Bewertung erfolgt zunächst *in vitro* an geeigneten Zellkulturmodellen und später an Kleintieren.

Abschließend erfolgt die Aufstellung eines biomathematischen Modells, das die Quantifizierung der PET-Untersuchungen erlaubt.

Das Hauptaugenmerk der aktuellen Forschung ist zum einen auf die Entwicklung von Rezeptorliganden, mit dem Ziel einer hohen Subtypenspezifität (Inzwischen sind für fast alle Rezeptortypen Liganden verfügbar.), und zum anderen auf die Tumordiagnose und Therapiekontrolle gerichtet. Bei letzterer existiert ein interessanter Ansatz in der Markierung von Chemotherapeutika zur verbesserten Therapieplanung auf Basis quantitativer Verteilungsdaten.

Radiopharmakon	Physiologische Funktion	Indikation
1-[¹¹ C]Acetat	Oxidativer Stoffwechsel, Citrat-Zyklus	Myokard-Vitalität
[methyl- ¹¹ C]Methionin	Aminosäuretransport	Tumor-Malignitätsgrad, Rezidiv- diagnostik, Therapiekontrolle
[¹¹ C]Methylspiperon [¹¹ C]Racloprid	D ₂ -Rezeptorbindung D ₂ -Rezeptorbindung	Motordegenerative und psychiatri- sche Erkrankungen, Therapie- monitoring von Neuroleptika
[¹³ N]Ammoniak	Blutfluß	Perfusionsmessung in Myokard und Tumor
[¹⁵ O]Sauerstoff	O ₂ -Verbrauch	Regionaler Sauerstoffverbrauch
[¹⁵ O]Kohlenmonoxid	Blutvolumen	Regionales Blutvolumen in Hirn, Leber, Lunge, Tumor
[¹⁵ O]Kohlendioxid [¹⁵ O]Wasser [¹⁵ O]Butanol	Blutfluß	Perfusionsmessung in Hirn, Herz, Leber, Tumor, extravaskuläres Lungenwasser
[¹⁸ F]Fluorid	Apatiteinlagerung	Knochenmetabolismus, Knochen- metastasen
2-[¹⁸ F]Fluor-2-deoxy-D- glukose	Glukose-Phosphorylierung	Demenzen, Epilepsie, Tumorgra- ding, -therapiekontrolle, koronare Herzerkrankungen, Myokard-Vitalität
6-[¹⁸ F]Fluor-L-dopa	Decarboxylierung	Motordegenerative Erkrankungen (Morbus Parkinson)
2-[¹⁸ F]Fluor-L-tyrosin	Aminosäuretransport, Pro- teinsynthese	Siehe Methionin
[¹⁸ F]Fluoralkylspiperon	D ₂ -Rezeptorbindung	Siehe Methylspiperon
5-[¹⁸ F]Fluoruracil	DNA-, RNA-Synthese- hemmung	Tumorthherapieplanung (Applikation von 5-FU)

Tabelle 2-2: Etablierte PET-Radiopharmaka und ihre Hauptanwendung (Coenen, 1994)

Bei der Etablierung neuer Synthesetechniken sind zwei Trends besonders hervorzuheben – der Einsatz von Enzymen und die Umsetzung an Festphasenoberflächen. Der Einsatz von Festphasen erleichtert insbesondere die Abtrennung von Reagentien und empfiehlt sich deshalb für die Automatisierung (z.B. Fluorierung mit an organischen Anionentauschern gebundenem [^{18}F] (Mulholland 1989)), während die Enzymkatalyse durch schnelle stereospezifische Reaktionen den Zugang zu Radiotracern eröffnet, die bisher aufgrund vielschrittiger Synthesen nicht mit ausreichenden radiochemischen Ausbeuten und spezifischen Aktivitäten darstellbar waren.

2.4.1 [^{18}F]-2-Fluor-2-Deoxyglukose

Das Glukoseanalogon [^{18}F]-2-Fluor-2-Deoxyglukose (FDG) findet als metabolischer Tracer zur *in vivo* Untersuchung des Glukosestoffwechsels von Organen und Geweben mit hohem Energiebedarf (Gehirn, Herz, Tumore) breite Anwendung. Daraus resultiert eine vielfältige Palette von Indikationen, die koronare Herzerkrankungen und Myokard-Vitalitätsuntersuchungen ebenso umfaßt wie die Bestimmung regionaler Glukoseverbrauchsrate in Organen oder Geweben, den Nachweis von Hirnfunktionsstörungen (z.B. Alzheimer, Epilepsie) oder die Tumordetektion und -therapiekontrolle (Abou-Khalil 1987, Alavi 1988 Botker 1997, Di Chiro 1987, Duara 1986, Haberkorn 1997, Reutens 1998, Saha 1994). Abbildung 2-4 zeigt ein Beispiel für die Detektion eines Hirntumors - in diesem Fall ein hochmalignes Astrozytom - durch PET-Untersuchungen mit [^{18}F]-2-Fluor-2-Deoxyglukose - der Tumor ist deutlich durch die erhöhte Radioaktivitätsanreicherung (heller Bereich) zu erkennen. (aus Di Chiro 1986).

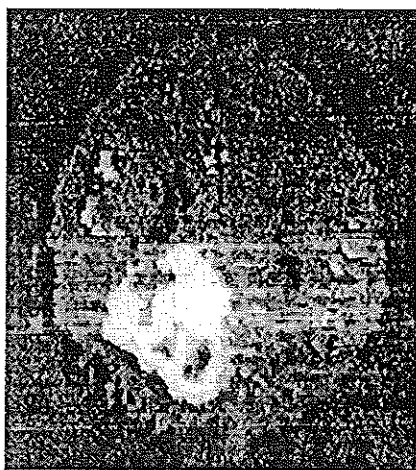
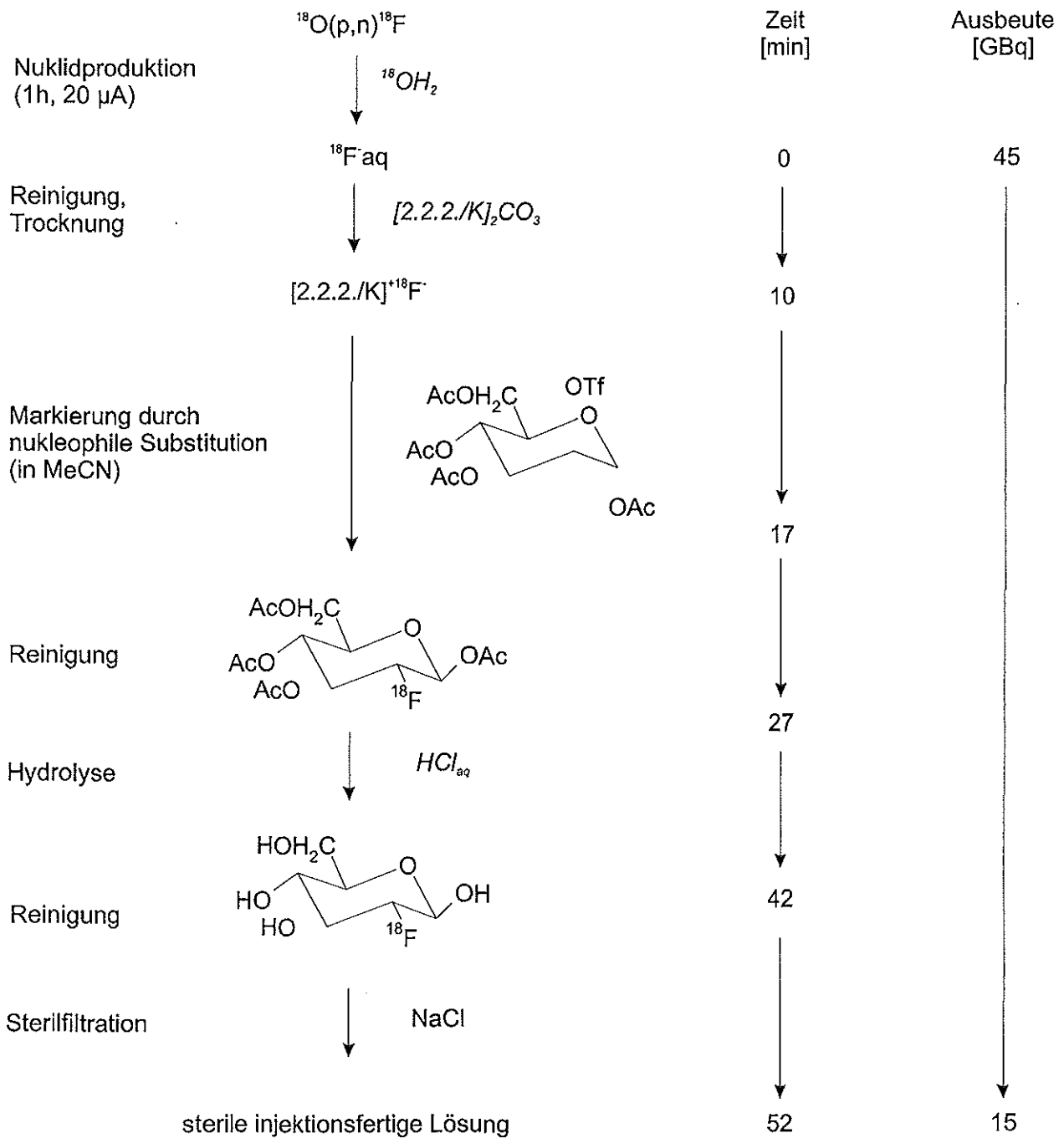


Abbildung 2-4: Positronenemissionstomographische Diagnose eines Hirntumors mit FDG

Abbildung 2-5: Fließschema zur nukleophilen ^{18}F FDG-Synthese (Coenen, 1994)

Neben $[^{15}\text{O}]\text{OH}_2$ ist $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ der wohl am besten untersuchte und am häufigsten eingesetzte PET-Tracer, was durch die Aufnahme dieser beiden Verbindungen in die Europäische Pharmakopoe dokumentiert wird (Coenen 1994).

Die trägerarme Darstellung von [^{18}F]FDG gelingt durch nukleophile Synthese (Abb. 2-5) in 52 Minuten mit einer Ausbeute von 33%, bezogen auf die eingesetzte Aktivität, und einer spezifischen Aktivität $>2000 \text{ Ci/mmol}$ (Hamacher 1986, 1990). Die Bezeichnung 'trägerarm' oder auch 'no carrier added' bezeichnet die Synthese ohne Zusatz oder Entstehung des unmarkierten Traceranalogons (in diesem Fall [^{19}F]FDG).

Die Verwendung von [^{18}F]FDG zur Tumordetektion, auf die im folgenden näher eingegangen werden soll, basiert auf der erhöhten FDG-Anreicherung in Tumorzellen im Vergleich zum umliegenden Gewebe. Dies ist eine Folge ihrer erhöhten glykolytischen Aktivität, die sich in einer verstärkten Glukosetransporter-Expression und erhöhten Hexokinaseaktivität widerspiegelt (Waki 1998).

Die Metabolisierung von Glukose unterscheidet sich von der ihres fluormarkierten Analogons. Während Glukose nach dem Transport über die Zellmembran und der Phosphorylierung zu Glukose-6-Phosphat entweder in Richtung Glykolyse, Pentosephosphatweg oder Glykogen weiter verstoffwechselt wird (Abb. 2-6), kann FDG-6-Phosphat nicht weiter metabolisiert werden. Dies führt, da FDG-6-P nicht mehr membrangängig ist und die Phosphataseaktivität, zumindestens im Gehirn, vernachlässigbar klein ist, zur intrazellulären Anreicherung.

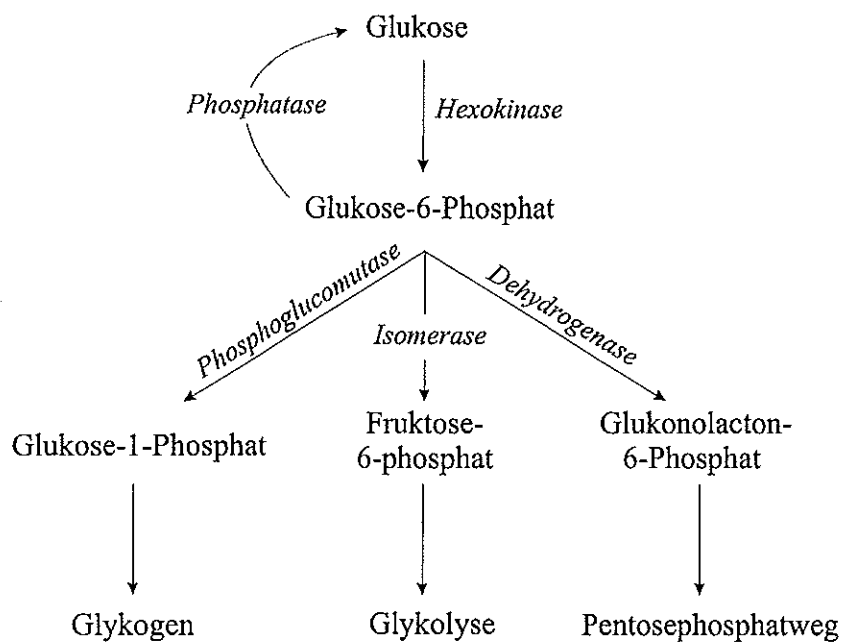


Abbildung 2-6: Vereinfachtes Schema des Glukosemetabolismus

In den ersten beiden Schritten des Glukosestoffwechsels, dem Transport über die Zellmembran durch erleichterte Diffusion über transmembrane Carrier (GLUT I-III) und der Phosphorylierung, konkurrieren Glukose und FDG miteinander, was zu einer kompetitiven Inhibierung führt. Interessanterweise ist die Affinität des Transporters zu FDG höher als die zu authentischer Glukose. Im Rattenhirn wurde für den transmembranen Transport für FDG ein K_m -Wert von 6,9 mM ermittelt, während der entsprechende Wert für Glukose mit 11,0 mM deutlich höher liegt (Crane 1983). Die Maximalgeschwindigkeiten sind dagegen nicht signifikant unterschiedlich.

Die Affinität der Hexokinase liegt dagegen eindeutig auf Seiten der Glukose. Hier ist die Angabe exakter kinetischer Konstanten aber kaum möglich, da das Enzym sowohl mitochondrial gebunden als auch frei im Cytosol vorliegen kann. Die beiden Formen besitzen unterschiedliche kinetische Eigenschaften und können je nach dem energetischen Bedarf der Zelle schnell (innerhalb von Minuten) und reversibel ineinander übergehen. Gebundene Hexokinase hat eine weniger stark ausgeprägte Inhibierung durch die Reaktionsprodukte (Glukose-6-Phosphat und ADP) und zeigt eine stärkere Bindungsaffinität zu den Substraten als die frei vorliegende Form (Graham 1985).

Abbildung 2-7 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Aufnahme und Metabolisierung von Glukose und FDG im Gehirn.

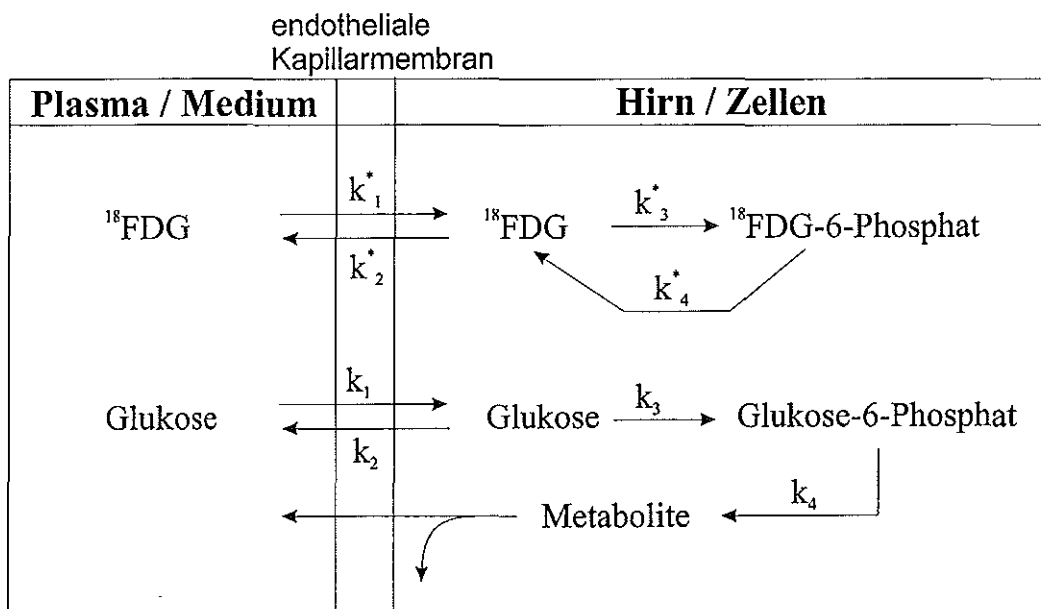


Abbildung 2-7: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme und Verstoffwechselung von Glukose und 2-[^{18}F]Fluor-2-Deoxyglukose (FDG)

Die höhere Affinität des transmembranen Transportcarriers zu FDG führt nicht zwangsläufig zu einer verstärkten intrazellulären Akkumulation, da der Rücktransport aus der Zelle heraus ebenfalls beschleunigt abläuft (Hasselbalch et al. 1996). Erst mit der Umsetzung zu nicht membrangängigem FDG- bzw. Glukose-6-Phosphat kommt es zur Anreicherung in der Zelle. Durch die vernachlässigbar geringe Phosphataseaktivität in Gliomzellen (Spence 1998) ist diese Reaktion quasi irreversibel.

Die FDG-Aufnahme kann dabei folgt beschrieben werden:

$$\frac{dc_b}{dt} = k_1^* * c_p - (k_2^* + k_3^*) * c_b + k_4^* * c_m \quad (1)$$

$$\frac{dc_m}{dt} = k_3^* * c_b - k_4^* * c_m \quad (2)$$

k_{1-4}^*	[min ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstanten
c_p	[mmol/l]	FDG-Konzentration im Blutplasma
c_b	[mmol/l]	FDG-Konzentration im Gewebe
c_m	[mmol/l]	FDG-6-Phosphat-Konzentration im Gewebe

Der direkten, nicht-invasiven Messung (PET) zugänglich ist jedoch nicht die Substanzkonzentration, sondern nur die Aktivitätskonzentration in Zerfällen pro Minute (cpm/l). Über die eingesetzte spezifische Aktivität des verwendeten Radiotracers [cpm/mmol] können die entsprechenden Werte aber berechnet werden.

$$c = \frac{c_{Akt.}}{A_{sp}} \quad (3)$$

c	[mmol/l]	Stoffmengenkonzentration
A_{sp}	[cpm/mmol]	spezifische Aktivität
$c_{Akt.}$	[cpm/l]	Aktivitätskonzentration

Die Positronenemissionstomographie vermag nicht zwischen FDG und FDG-6-Phosphat zu unterscheiden, so daß im Gewebe nur die Gesamtaktivitätskonzentration als Summe von FDG und FDG-6-Phosphat gemessen werden kann.

$$c_t = c_b + c_m \quad (4)$$

c_t [mmol/l] FDG + FDG-6-Phosphat-Konzentration im Gewebe

Da die Phosphataseaktivität und damit die Dephosphorylierung von FDG-6-Phosphat im Gehirn, wie oben beschrieben, unbedeutend gering ist, können die Gleichungen 1 und 2 unter Vernachlässigung von k_4^* wie folgt vereinfacht werden.

$$\frac{dc_b}{dt} = k_1^* \cdot c_p - (k_2^* + k_3^*) \cdot c_b \quad (5)$$

$$\frac{dc_m}{dt} = k_3^* \cdot c_b \quad (6)$$

Unter Berücksichtigung der Randbedingungen (Zum Zeitpunkt $t = 0$ sind sowohl die FDG- als auch die FDG-6-Phosphat-Konzentration gleich Null.) ergibt sich für eine konstante Radio-tracerkonzentration im Blut als Lösung der Differentialgleichungen:

$$c_b(t) = \frac{k_1^* \cdot c_p}{k_2^* + k_3^*} \cdot \left(1 - e^{-(k_2^* + k_3^*) \cdot t} \right) \quad (7)$$

$$c_m(t) = - \frac{\frac{k_1^* \cdot k_2^* \cdot k_3^* \cdot c_p}{(k_2^* + k_3^*)^2} - k_1^* \cdot k_3^* \cdot c_p \cdot t + \frac{k_1^* \cdot k_3^{*2} \cdot c_p}{(k_2^* + k_3^*)^2} - \frac{k_1^* \cdot k_3^* \cdot c_p}{k_2^* + k_3^*} \cdot e^{-(k_2^* + k_3^*) \cdot t}}{k_2^* + k_3^*} \quad (8)$$

$$c_t(t) = - \frac{k_1^* \cdot c_p \cdot \left(-t \cdot k_2^* \cdot k_3^* - k_2^* + k_2^* \cdot e^{-(k_2^* + k_3^*) \cdot t} - k_3^{*2} \cdot t \right)}{(k_2^* + k_3^*)^2} \quad (9)$$

Die Lösung der Differentialgleichungen erfolgte rechnergestützt unter Verwendung mathematischer Software (Maple V Release 5.1, Waterloo Maple Inc., Kanada). Der detaillierte Lösungsweg ist für Gleichung 5 exemplarisch im Anhang dargestellt.

Die in klinischen Untersuchungen ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für die Einzelreaktionen weisen eine erhebliche patientenspezifische Variabilität auf, was aus den Beispielwerten in Tabelle 2-3 deutlich wird.

k_1^*	k_2^*	k_3^*	Quelle
0,089	0,269	0,135	Spence, 1998
0,227 – 1,245	0,144 – 0,183	0,011 – 0,048	Oriuchi, 1996
0,105	0,148	0,074	Reivich, 1985
0,102	0,13	0,062	Phelps, 1979
0,131	0,225	0,106	Friedland, 1983

Tabelle 2-3: Geschwindigkeitskonstanten in [min^{-1}] des zellulären Transports und Metabolismus von 2- ^{18}F Fluor-2-Deoxyglukose in Hirntumoren (klinische Daten)

Der cerebrale Glukosestoffwechsel erlaubt Aussagen über Funktionsstörungen oder Gewebsveränderungen (z.B. Tumore), ist einer direkten Messung aber kaum zugänglich. Zur indirekten Bestimmung in klinischen Untersuchungen wird deshalb FDG eingesetzt. Dazu wird die FDG-Aufnahme mittels PET quantitativ bestimmt und aus den erhaltenen Werten der Glukosestoffwechsel berechnet. Da sich FDG und Glukose, wie beschrieben, bezüglich ihrer Transport- und Phosphorylierungsraten unterscheiden, wird eine Proportionalitätskonstante, die Lumped Konstante (LC_{FDG}), benötigt. Diese beschreibt das Verhältnis der Nettoflüsse von FDG und Glukose vom Blut ins Gewebe (Gl. 10).

$$\text{LC}_{\text{FDG}} = \frac{\text{MR}_{\text{FDG}}}{\text{MR}_{\text{Gik}}} \quad (10)$$

LC_{FDG}	[-]	Lumped Konstante für FDG
MR_{FDG}	[mmol/ 100g Gewebe / min]	Nettoflux für FDG ins Gewebe
MR_{Gik}	[mmol/ 100g Gewebe / min]	Nettoflux für Glukose ins Gewebe

Aus den oben dargestellten unterschiedlichen Eigenschaften von Glukose und FDG bezüglich Transport und Phosphorylierung resultiert eine starke Abhängigkeit der Lumped Kon-

stanten von der Plasmaglukosekonzentration, die durch zwei Grenzfälle beschrieben werden kann.

Für extrem niedrige Glukosekonzentrationen ergibt sich eine reine Limitierung durch den transmembranen Transport, während bei hohen Glukosekonzentrationen die Hexokinase zum limitierenden Faktor wird. Im Fall der Transportlimitierung wird sich die Lumped Konstante dem Verhältnis der Transportkoeffizienten annähern, während für die Hexokinaselimitierung das Verhältnis der Phosphorylierungskoeffizienten die Grenze für die Lumped Konstante darstellt.

2.4.2 L-2-[^{18}F]Fluortyrosin und [^{18}F]-4-Fluorprolin

Neben Glukosederivaten bilden radioaktiv markierte Aminosäureanaloga eine weitere wichtige Radiotracerklasse, die in der onkologischen Diagnostik eingesetzt wird. Sie zeigen meist eine bessere Abgrenzung des Tumors vom umliegenden gesunden Gewebe und erlauben so eine sicherere Abschätzung der Tumorausdehnung als FDG-Studien (Guth-Tougelidis 1995). Glukoseanaloga bieten dagegen Vorteile bei der Malignitätsbeurteilung.

Abbildung 2-8 zeigt die Kontrolluntersuchungen im Verlauf der chemotherapeutischen Behandlung eines Hirntumors (Oligodendrogliom Grad III). Der Tumor spricht gut auf die Behandlung an und ist nach sieben Monaten fast nicht mehr zu detektieren.

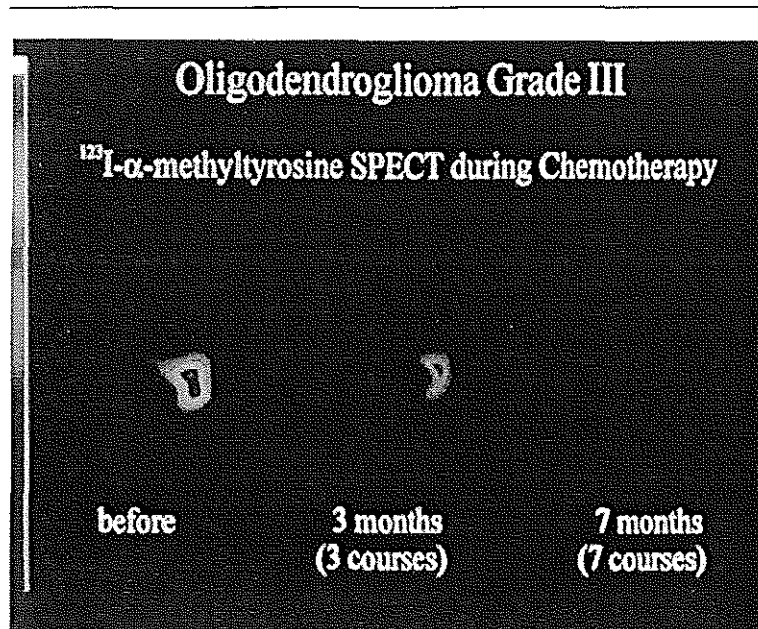


Abbildung 2-8: Chemotherapiekontrolle mit [^{123}I]-Iod- α -Methyltyrosin (mit freundlicher Genehmigung des Institutes für Medizin der Forschungszentrum Jülich GmbH)

Die meisten bisher für die Positronenemissionstomographie eingesetzten Aminosäuren sind [^{11}C]-markiert, was ihre Anwendbarkeit zur Untersuchung der Proteinbiosynthese durch die sehr kurze Halbwertszeit ($t_{1/2} = 20,4 \text{ min}$) stark einschränkt. Hier bietet die Markierung mit [^{18}F] eine Alternative, wie erste klinische Untersuchungen unter Verwendung von L-2-[^{18}F]Fluortyrosin gezeigt haben. Dieser Tracer benutzt eines der Aminosäure-Carriersysteme zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und wird innerhalb einer Stunde in zerebrale Proteine inkorporiert (Coenen 1989).

Ein aktuell in der Evaluierung befindlicher PET-Radiotracer auf Aminosäurebasis ist [^{18}F]-4-Fluorprolin. Beide Diastereomere der Verbindung können in großen Aktivitätsmengen, nahezu trägerfrei, durch Kryptand-vermittelte [^{18}F]Fluorierung der Vorläufer (2S,4S)- bzw. (2S,4R)-4-(p-Toluensulphonyloxy)-Prolinmethylester dargestellt werden (Abb. 2-9).

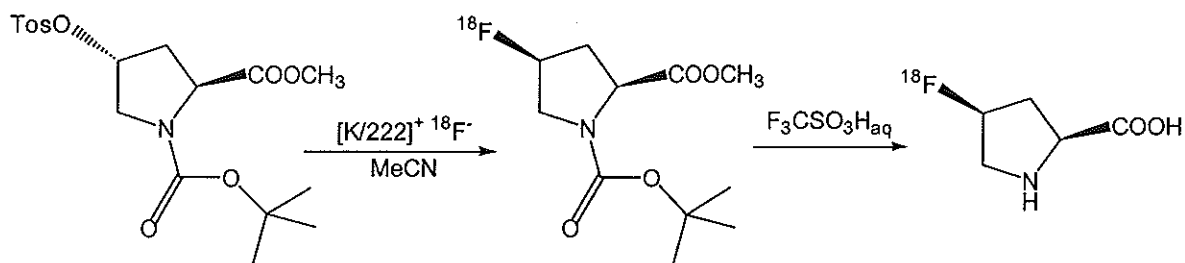


Abbildung 2-9: Schema zur nukleophilen Darstellung von cis-[^{18}F]-4-Fluorprolin (Hamacher 1999)

In ersten Untersuchungen an Zellkulturen zeigte sich, daß die Konfiguration der [^{18}F]-Bindungsstelle einen erheblichen Einfluß auf den zellulären Transport hat. So wurde trans-4-[^{18}F]Fluorprolin sowohl von Gliomzellen als auch von androgensensitiven und hormonresistenten Prostatakarzinomzellen besser aufgenommen als das cis-Diastereomer (Börner, 1998).

In Verteilungsstudien an Ratten wurde eine starke Anreicherung in der Niere beobachtet, während in Prostata, Lunge, Milz und Leber geringere Werte gemessen wurden. Die schwächste Aufnahme zeigten die Haut und das Gehirn (Cremer 1998). In fast allen Organen wurde analog zu den Zellkulturuntersuchungen eine verstärkte Akkumulation des trans-Diastereomers registriert.

Nach bisherigen Erkenntnissen wird Fluorprolin nicht verstoffwechselt. Daraus ergibt sich für die zelluläre Aufnahme folgendes vereinfachtes Schema:

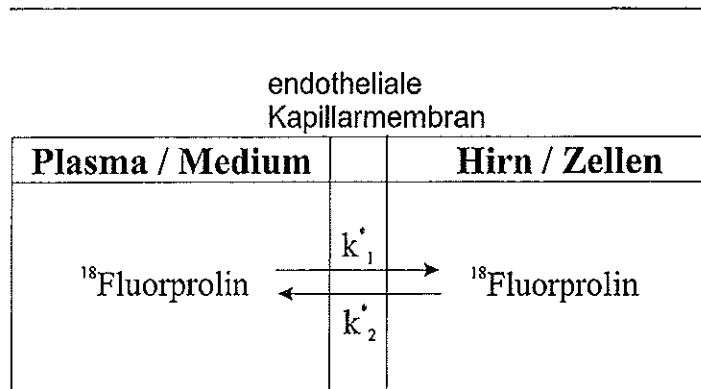


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme von 4- ^{18}F Fluorprolin

Die intrazelluläre Fluorprolin-Konzentration als Funktion der Zeit ergibt sich bei konstanter Konzentration im Blut analog zu den Berechnungen für FDG.

$$c_b(t) = \frac{k_1^* \cdot c_p}{k_2^*} \cdot \left(1 - e^{-k_2^* t}\right) \quad (11)$$

Für lange Beobachtungszeiträume folgt daraus die Ausbildung einer intrazellulären Gleichgewichtskonzentration, die durch das Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten bestimmt wird.

$$c_b(t \rightarrow \infty) = \frac{k_1^*}{k_2^*} \cdot c_p \quad (12)$$

Vergleichsdaten für die Geschwindigkeitskonstanten k_1^* und k_2^* liegen bisher noch nicht vor.

3 Material und Methoden

3.1 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene humane Gliomzelllinien (U-87 MG, U-373 MG und 86HG39) eingesetzt. Gliom ist eine Sammelbezeichnung für alle von der Neuroglia (Hüll- und Stützgewebe des Nervensystems) ausgehenden Tumore. Es existieren verschiedene Unterarten: Spongioblastom, Oligodendrogliom, Astrozytom, Glioblastom, Retinoblastom.

Während die beiden erstgenannten Zelllinien von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen wurden, wurde die Zelllinie 86HG39 freundlicherweise von Dr. T. Bilzer (Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Humane Glioblastomzelllinie U-87 MG

Die Zelllinie U-87 MG entstammt dem Glioblastom einer 44-jährigen Frau. Die hypodiploiden Zellen (diploider Chromosomensatz, bei dem ein Chromosom nur einfach vorhanden ist) weisen eine epitheliale Morphologie auf, wachsen adhärent als Monolayer und bilden in immundefizienten Mäusen maligne Glioblastome. Die Zelllinie wurde 1968 zum erstenmal beschrieben und im Juli 1973 bei der American Type Culture Collection hinterlegt (Ponten et al. 1968).

3.1.2 Humane Glioblastomzelllinie U-373 MG

Die ebenfalls 1968 erstmalig beschriebene hypotriploide Zelllinie U-373 MG wurde dem Glioblastom eines 61-jährigen Mannes entnommen und wächst adhärent als Monolayer (Ponten et al. 1968). Die spindelförmigen Zellen entsprechen cytopathologisch eher einem Astrocytom als einem Glioblastom – eine Einordnung, die durch die Bildung von Grad III Astrocytomen in immundefizienten Mäusen unterstützt wird.

3.1.3 Humane Glioblastomzelllinie 86HG39

Die Zelllinie 86HG39 wurde 1986 einem rezidiven Glioblastom im linken Frontallappen eines 56-jährigen männlichen Patienten entnommen. Sie zeigt einen ausgeprägten Polymorphismus und wächst normalerweise als Monolayer, ist aber unter geeigneten Bedingungen auch zur Bildung von Sphroiden befähigt.

3.2 Kulturmedien

Zur Zellkultivierung werden kommerziell erhältliche Pulvermedien mit einigen Zusätzen verwendet, welche ausschließlich mit ultrafiltriertem, pyrogenfreiem Wasser mit einer Leitfähigkeit $\leq 0,5 \mu\text{S}$ angesetzt werden. Der pH-Wert und die Osmolalität werden auf 7,2 bzw. 0,31 Osmol/kg eingestellt. Das zur Kultivierung von U-87 MG und U-373 MG verwendete Medium basiert auf einer 3:1 Mischung der Pulvermedien DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und Ham's F-12 (Tab. 3-1), während im Rahmen der Arbeiten mit 86HG39 IMDM (Isco-ve's Modified Dulbecco's Medium) zum Einsatz kommt. Beide Medien werden mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert.

DMEM	9,2 g
Ham's F-12	2,61 g
HEPES	4,47 g
NaHCO_3	2,4 g
Rinderserumalbumin, Fraktion 5	0,1 g
2-Aminoethanol	6,1 mg
$\text{Na}_2\text{Se}_2\text{O}_3$	2 μg
Fettsäuren	0,61 mg
Insulin	0,5 mg
Transferrin	0,5 mg
FCS	100 ml

Tabelle 3-1: Zusammensetzung von einem Liter Kulturmedium für U-87 MG und U-373 MG

IMDM	17,66 g
NaHCO_3	3,024 g
FCS	100 ml

Tabelle 3-2: Zusammensetzung von einem Liter Kulturmedium für 86HG39

Die genaue Zusammensetzung der Pulvermedien DMEM, IMDM und Ham's F-12 findet sich im Anhang dieser Arbeit.

3.3 Stammhaltung

Die Stammhaltung der Gliomzellen erfolgt in statischer Kultur in Gewebekulturflaschen mit 75 cm² Wachstumsfläche im Brutschrank (37°C und 5% CO₂). Die Zellen werden zweimal pro Woche umgesetzt und dabei abhängig von der Wachstumsrate im Verhältnis zwischen 1:4 und 1:10 auf eine Zellzahl von 10⁶ Zellen je Gewebekulturflasche verdünnt. Dazu wird das Medium entfernt, der Zellmonolayer einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend für 10 Minuten bei 37°C mit 3 ml Trypsin (2,5 g/l, Gibco/BRL, Eggenstein, BRD) inkubiert. Die abgelösten Zellen werden in 7 ml Kulturmedium aufgenommen, gezählt und entsprechend verdünnt in neue Gewebekulturflaschen mit insgesamt 30 ml Medium inokuliert.

3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien, die primären Tumoren entstammen, zeigen bisweilen in Langzeitkultivierungen (Passagenzahlen von 50 oder mehr) morphologische und immunozytochemische Veränderungen (Bilzer et al., 1990), die die Reproduzierbarkeit von Untersuchungen in Frage stellen können. Um dieser Gefahr von vornherein zu begegnen, wurde zu Beginn dieser Arbeit von allen verwendeten Zellen eine Arbeitszellbank angelegt, aus der alle drei Monate neue Zellen aufgetaut wurden. Die maximale Passagenzahl lag damit bei 30.

3.4.1 Einfrieren von Zellen

Der einzufrierenden Kultur werden 5*10⁶ vitale Zellen je vorgesehener Fraktion entnommen und bei 200 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird in vorgewärmtem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und bei -80°C in Fraktionen von 1,8 ml in Kryoröhrchen eingefroren. Nach einer Woche wird eine Fraktion aufgetaut und kultiviert. Bei normalem Wachstumsverhalten werden die übrigen Fraktionen in die Zellbank bei -196°C überführt, wo sie mehrere Jahre ohne größere Vitalitätsverluste haltbar sind.

3.4.2 Auftauen von Zellen

Um die zellschädigende Wirkung des im Einfriermediums enthaltenen DMSO zu minimieren, müssen die folgenden Arbeitsschritte möglichst schnell durchgeführt werden.

Die eingefrorene Zellfraktion wird bei 37°C aufgetaut, mit 5 ml vorgewärmtem Kulturmedium versetzt und bei 200 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche mit weiteren 20 ml Medium zur weiteren Kultivierung überführt.

3.5 Der Wirbelschichtreaktor als Kultursystem

Der Wirbelschichtreaktor (Abb. 3-1) besteht aus einer thermostatisierbaren Reaktorröhre mit konischem Bodeneinlaß, in die offenporige, mit Gelatine beschichtete (Lüllau et al., 1992) Borosilikatträger (Siran®, Schott, Mainz) gefüllt werden, die einen Durchmesser von 400-500 µm und eine Porosität von 50 % aufweisen (Abb. 3-3). Die Anströmung von unten führt zu einer homogenen, scherarmen Verwirbelung der Mikroträger. Der Reaktor ist in einen Umlauf integriert, der die Umlaufpumpe, die pO_2 -Sonde, die blasenfreie Begasung sowie eine Probenahme für Medien- und Trägerproben enthält. Die Begasung erfolgt diffusiv über dünnwandige Silikonschläuche in einem temperierten Begasungsgefäß. Die Zusammensetzung des zudosierten Gasgemisches (Preßluft, O_2 , N_2 , CO_2) wird durch Massendurchflußventile gesteuert.

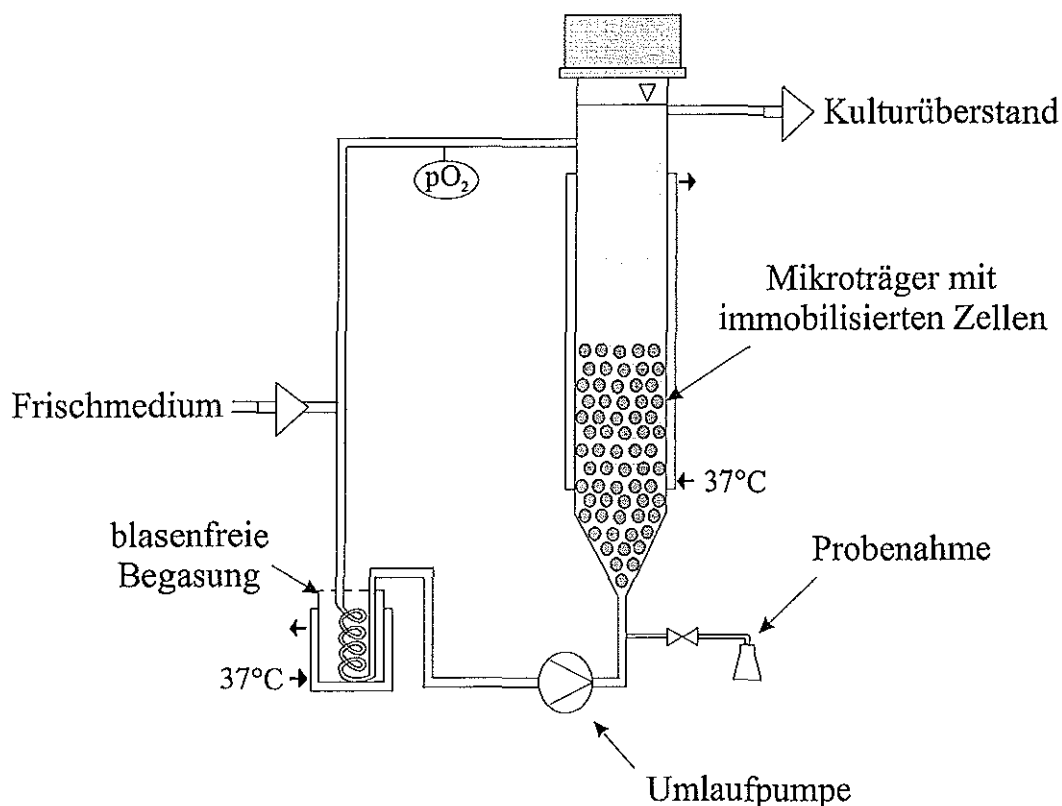


Abbildung 3-1: Fließschema des für Fermentationen verwendeten Wirbelschichtreaktors

Die Frischmedienzufuhr erfolgt kontinuierlich entsprechend dem metabolischen Bedarf der Zellen, der durch regelmäßige Umlaufprobenahmen bestimmt wird. Als Leitsubstrat dient

Glukose. Die Temperatur und der pH-Wert werden auf 37°C bzw. 7,2 eingestellt, während der pO_2 hinter dem Wirbelbett auf 30% Luftsättigung eingeregelt wird. Das durchströmbare Volumen des Systems beträgt 83 ml bei einem Trägerschüttvolumen von 30 ml.

Die Entnahme von Umlauf- oder Trägerproben kann jederzeit durchgeführt werden, entweder über das unterhalb der Reaktorröhre angebrachte Probenahmegefäß oder durch Öffnen des Reaktordeckels unter einer Sterilbank.

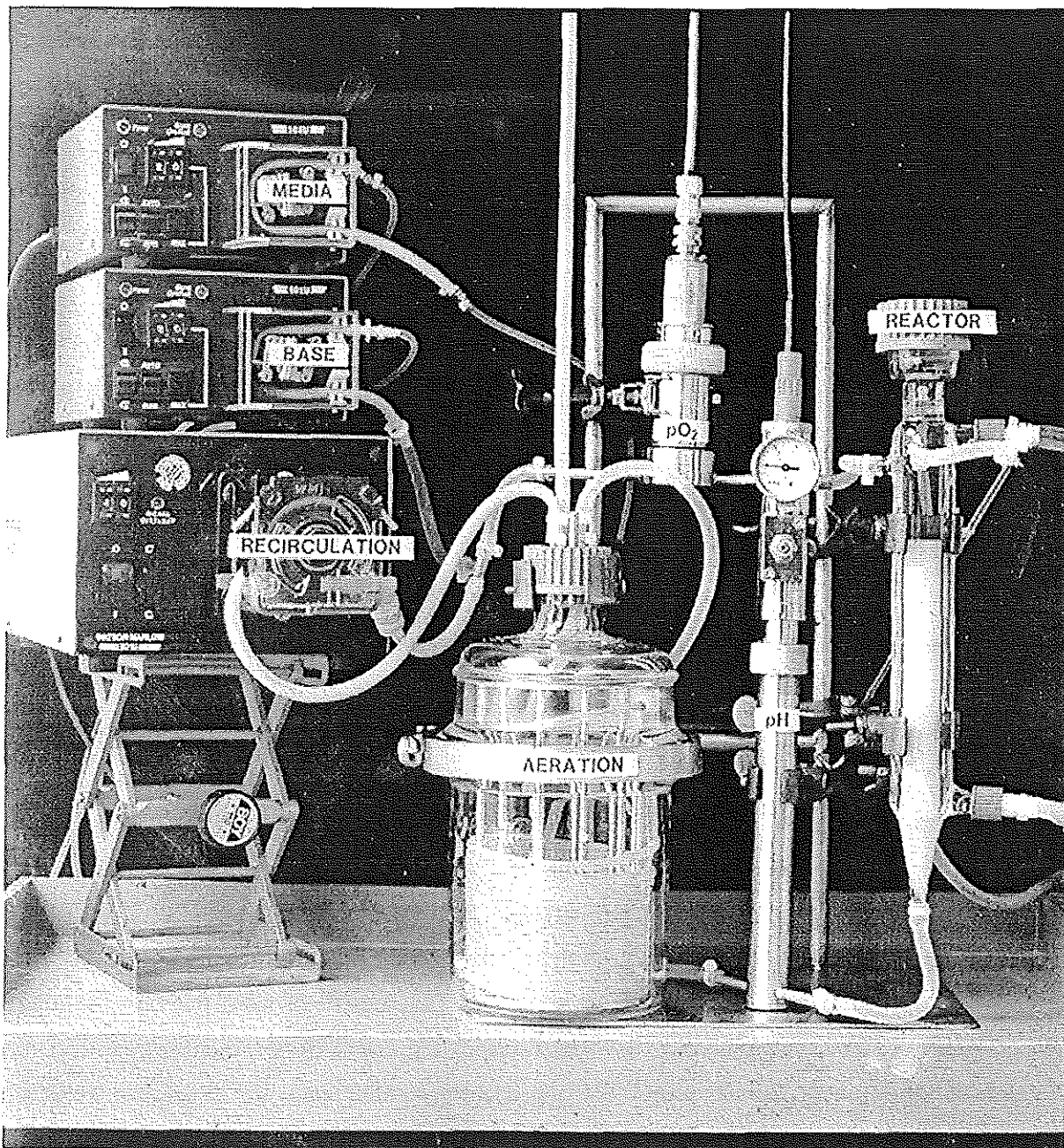


Abbildung 3-2: Photographische Abbildung eines Wirbelschichtreaktors

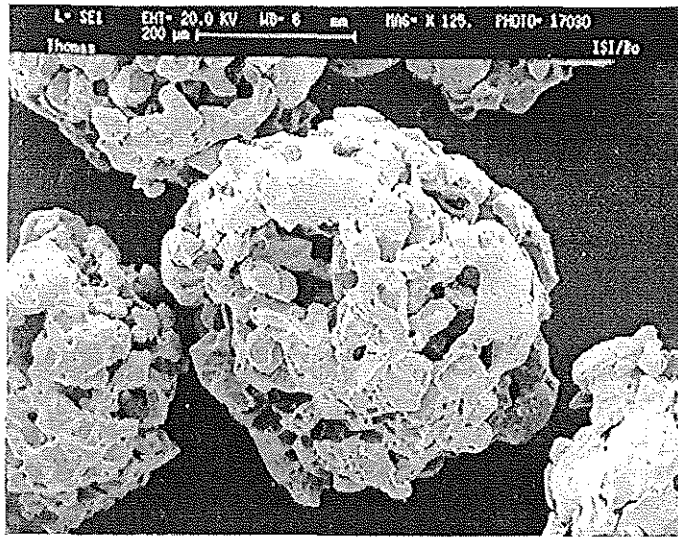


Abbildung 3-3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines unbewachsenen Trägers

Dieser Wirbelschichtreaktor wurde bereits zur Kultivierung eines weiten Spektrums unterschiedlicher Zellen eingesetzt. Dazu zählen Hybridoma, CHO und BHK ebenso wie humane Gliomzellen oder Primärmaterial wie Hepatozyten aus der Schweineleber oder stromale Zellen aus humanem Knochenmark (Schröder 1996, Thömmes 1994, Zeng 1997).

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 Zellzahl und Vitalität

Zellzahlbestimmung in Gewebekulturflaschen und Leighton-Tubes

Die Konzentration und Vitalität von Zellen in Gewebekulturflaschen und Leighton-Tubes werden in einem Hämozytometer mittels Erythrosin B Ausschlußmethode (Phillips, 1973) bestimmt. Dazu wird das Kulturmedium entnommen, und die Zellen werden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 10 Minuten mit 2 ml einer Trypsinlösung (2,5 g/l) bei 37°C inkubiert. Die so erhaltene Zellsuspension wird mit Frischmedium geeignet vorverdünnt, mit Erythrosin B versetzt und in die Zählkammer, die ein Volumen von 0,1 µl faßt, eingebracht. Anschließend werden unter dem Mikroskop die in diesem Volumen befindlichen Zellen ausgezählt. Während vitale Zellen Erythrosin B ausschließen und deshalb farblos erscheinen, dringt der Farbstoff in tote Zellen ein und färbt diese rot. Unter Be-

rücksichtigung der gewählten Verdünnung, des Volumens der Zählkammer sowie des Volumens der Probe ergibt sich die Gesamtzellzahl. Die Vitalität der untersuchten Zellen errechnet sich nach Gleichung 13.

$$Vit = \frac{X_{vit}}{X_{ges}} \cdot 100 \quad (13)$$

Vit	[%]	Vitalität
X _{vit}	[10 ⁶]	vitale Zellzahl
X _{ges}	[10 ⁶]	Gesamtzellzahl

Zellzahlbestimmung auf Mikroträgern

Zur Bestimmung der Zahl der auf Trägern immobilisierten Zellen werden diese mit einer Kristallviolettlösung (0,1 M Zitronensäure, 0,1 % w/v Kristallviolett, 1 % Triton X-100), die die Zellen lysiert und die Kerne violett anfärbt, vom Träger abgelöst (6 Stunden bei 37°C). Die Kernzahl wird mikroskopisch mittels Hämozytometer bestimmt und die Trägerprobe anschließend getrocknet und gewogen, so daß die Zellzahl in der Einheit Zellen pro Gramm Träger (ein Gramm Träger entspricht ungefähr zwei Millilitern Schüttvolumen) angegeben werden kann. Eine Vitalitätsbestimmung ist mit dieser Methode nicht möglich, jedoch kann davon ausgegangen werden, daß sich auf den Trägern fast ausschließlich vitale Zellen befinden, da tote Zellen ihre Adhäsionseigenschaften verlieren und überwiegend binnen kurzer Zeit vom Träger abgespült werden. In geringer Anzahl verbleiben tote Zellen jedoch eingeschlossen im Trägerinneren.

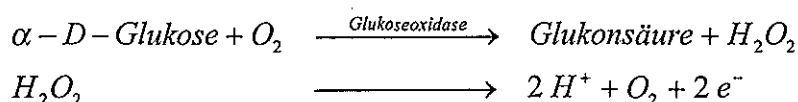
3.6.2 Osmolalität

Die Osmolalität des Mediums, die den Anteil an gelösten Stoffen in der Flüssigkeit beschreibt, ist eine kolligative Eigenschaft, d.h. sie ist unabhängig von der Art der gelösten Teilchen. Da die Osmolalität das Zellwachstum in erheblichem Maße beeinflusst (Ozturk 1998), ist es unbedingt erforderlich, die Osmolalität des verwendeten Mediums vor dem Einsatz in der Zellkultivierung zu bestimmen und gegebenenfalls auf das für die jeweilige Zelle individuelle Optimum einzustellen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Gliomzellen wird eine Osmolalität von 0,31 Osmol/kg verwendet.

Die Osmolalitätsbestimmung wird mit einem Gefrierpunktsosmometer (Osmomat O30, Gonotec) mit jeweils 50 µl Probe durch Bestimmung der Gefrierpunktserniedrigung im Vergleich zu reinem Wasser durchgeführt.

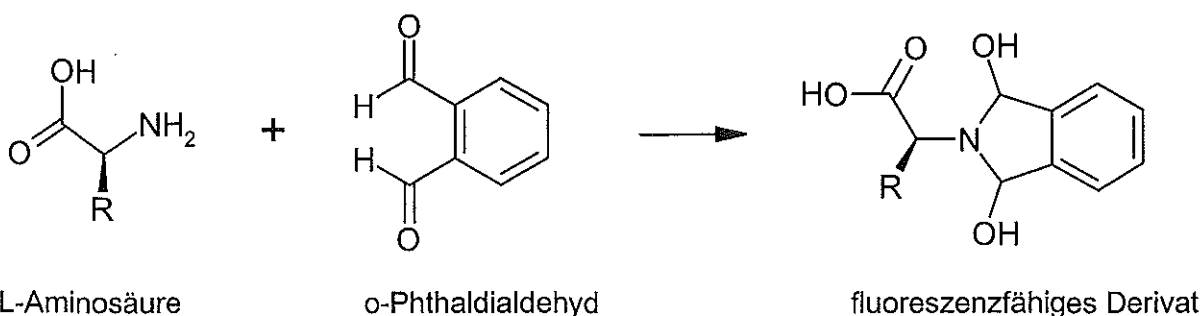
3.6.3 Glukose

Die Glukosekonzentration wird enzymatisch mit einem automatischen Analyzer (Ebio Compact, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Dabei wird Glukose mit Hilfe einer auf einer Membran immobilisierten Oxidase enzymatisch zu Glukonsäure oxidiert. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird an einer Platinelektrode hinter der Enzymmembran zu Sauerstoff oxidiert. Der resultierende Elektrodenstrom ist proportional zur Glukosekonzentration der Probe.



3.6.4 Aminosäuren

Die Konzentration der Aminosäuren wird mit Hilfe einer HPLC (Aminoquant, Hewlett-Packard, Waldbronn) bestimmt. Nach Fällung der in der Probe enthaltenen Proteine mit Trichloressigsäure und anschließender Neutralisation mit 1 M Natronlauge werden die Aminosäuren mit o-Phthaldialdehyd in ein fluoreszenzfähiges Derivat überführt. Die so vorbehandelten Aminosäuren binden auf dem Säulenmaterial und werden durch ein genau abgestimmtes Elutionsprofil nacheinander von der Säule eluiert. Die Detektion erfolgt durch Fluoreszenzmessung bei einer Anregung bei 280 nm und Emission bei 455 nm.



3.6.5 Leitfähigkeit

Zur Untersuchung des Mischverhaltens in Abhängigkeit von der Art der Tracerdosierfunktion und dem Umlaufvolumenstrom wurde direkt hinter die Reaktorröhre eine Durchfluß-leitfähigkeitsmeßzelle (LF 323-A, WTW, Weilheim) in den Umlauf integriert. Die Datenerfassung erfolgte über einen x-t-Schreiber. Das Reaktorsystem wurde mit entionisiertem Wasser und 30 ml Mikroträgern gefüllt und mit unterschiedlichen Dosierfunktionen einer hochkon-

zentrierten NaCl-Lösung (100 g/l) beaufschlagt. Dabei wurden Dirac-Impuls, Sprungfunktion sowie kontinuierliche Dosierung untersucht. Der Umlaufvolumenstrom wurde entsprechend den experimentellen Möglichkeiten variiert. Die obere Grenze wurde dabei durch den Volumenstrom gekennzeichnet, bei dem das Wirbelbett soweit expandiert, daß Träger in den Bereich des oberen Detektors geraten.

3.6.6 Flowzytometrische Analysen

Zur flowzytometrischen Untersuchung werden die Zellen enzymatisch von der Gewebekulturflasche oder den Mikroträgern abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (10 Minuten bei 200 g). Das Zellpellet wird in Ethanol_{70%} resuspendiert und kann bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt werden. Vor der Messung werden die Zellen erneut abzentrifugiert (10 Minuten bei 200 x g), in PBS resuspendiert und eine Stunde mit Propidiumiodid (18 µg/ml/10⁶ Zellen) und RNase (40 µg/ml/10⁶ Zellen) bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei wird die DNA durch den interkalierenden Farbstoff Propidiumiodid angefärbt, während die RNA selektiv enzymatisch abgebaut wird. Der Farbstoff lagert sich dabei zwischen die Basenpaare (A-T, G-C) der doppelsträngigen DNA ein (Interkalation). Der DNA-Gehalt der so präparierten Zellen wird mit dem Flow Cytometer Epics XL (Coulter, Krefeld, BRD Anregungswellenlänge: 488 nm, Emission: 630 nm) gemessen. Während Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus den einfachen DNA-Gehalt besitzen, weisen Zellen in der G₂- und M-Phase den doppelten DNA-Gehalt auf. In der S-Phase, in der die Replikation der DNA stattfindet, liegt der DNA-Gehalt zwischen einfach und doppelt, abhängig vom Voranschreiten der Zelle innerhalb der Synthesephase (Abb. 3-4).

Eine Unterscheidung zwischen Zellen in der G₂- und der M-Phase ist durch Bestimmung des DNA-Gehaltes nicht möglich. Deshalb werden diese beiden Phasen im folgenden jeweils gemeinsam genannt. Die Auswertung der erhaltenen Histogramme zur Bestimmung des relativen Anteils von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen wurde rechnergestützt durchgeführt (Multicycle, Phoenix Flow Systems, San Diego, USA).

Bei jeder Messung wird zusätzlich das von den Zellen durch Wechselwirkung mit dem Laser entstehende Streulicht erfaßt und analysiert. Der forward scatter (von der Zelle erzeugter Schatten) erlaubt Aussagen über die Zellgröße, während der sideward scatter (rechtwinkliges Streulicht) ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt. Die Granularität (übersetzt: Körnigkeit) von Zellen wird im wesentlichen von zwei zellulären Parametern bestimmt - der Form und Oberflächenstruktur sowie der Stärke der intrazellulären Kompartimentierung. So

erhalten Granulozyten ihren Namen von ihrer, im Vergleich z.B. zu B- oder T-Lymphozyten, sehr starken Körnung des Cytoplasmas.

Während der Vorbereitung auf die Zellteilung steigt die Granularität von Zellen aufgrund der Erhöhung der Zahl von Zellkompartimenten deutlich an.

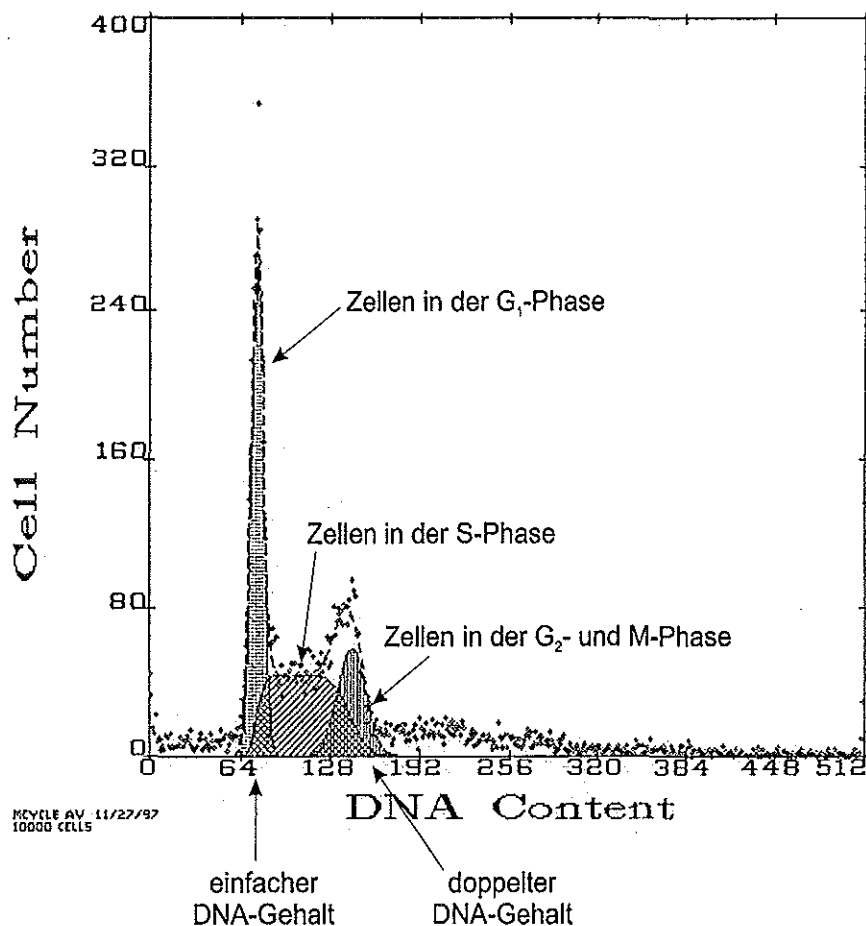


Abbildung 3-4: Analyse des zellulären DNA-Gehaltes mit dem Flow Cytometer

3.7 Radioaktivmessungen

Alle Aktivitätsmessungen an Proben (zellfreie Träger oder immobilisierte Zellen in Leighton-Tubes, Gewebekulturflaschen oder auf Mikroträgern) werden mit einem Gamaszint 5300 BF (Berthold, Bad Wildbad, BRD) in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Meßdauer beträgt je nach eingesetzter Aktivitätskonzentration 0,4 oder 1 Minute. Als Standard und Bezugswert dienen jeweils 50 µl des verwendeten aktivitätshaltigen Mediums. Alle Aktivitäten

werden aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit auf 100000 cpm / 50 µl Standard normiert.

3.7.1 Messung in Leighton-Tubes und Gewebekulturflaschen

Zur Bestimmung der intrazellulären Radiotracerakkumulation wird das Medium abgenommen und der Monolayer vorsichtig dreimal mit je 2 ml PBS gewaschen. Leighton-Tubes können direkt anschließend vermessen werden, während Zellen aus Gewebekulturflaschen zuerst enzymatisch abgelöst und in Meßröhrchen überführt werden müssen. Zur Ermittlung der zellspezifischen Aufnahme wird eine Probe (Leighton-Tube oder Gewebekulturflasche) zur Zellzahlbestimmung verwendet.

3.7.2 Messung intrazellulärer Radiotracerakkumulation im Mikroträger

Die Bestimmung der Aktivität in Trägerproben wird in PE-Röhrchen durchgeführt. Dazu wird das Medium entfernt, die Träger vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen und die Aktivität im Gammaszint gemessen. Anschließend werden die Träger getrocknet und gewogen. Zur Ermittlung der zellspezifischen Radiotraceraufnahme wird parallel eine Trägerprobe zur Zellzahlbestimmung mittels Kristallviolett-Methode verwendet.

Man erhält so analog zu Kapitel 3.7.1 die zellspezifische Aktivität [cpm/ 10^6 Zellen]. Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung des Zellvolumens die intrazelluläre Radiotracerkonzentration [cpm/ml]. Das Zellvolumen bzw. die Zellgröße kann entweder direkt gemessen oder aber näherungsweise (z.B. anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen) abgeschätzt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Der Wirbelschichtreaktor als *in vitro* Modell

Der zu Fermentationszwecken eingesetzte Wirbelschichtreaktor (vgl. Kap. 3.5) erfüllt bereits mehrere der in Kapitel 2.2.3 genannten Anforderungen an *in vitro* Systeme. So verbindet er die Vorteile eines kontinuierlichen Betriebs unter steady state Bedingungen mit der Realisierung gewebeähnlicher Zelldichten unter physiologischen Verhältnissen.

Die dreidimensionale Kultivierung bietet, wie bereits beschrieben, häufig Vorteile gegenüber der Monolayerkultur bezüglich der Simulation von Metabolismus und Zellwachstum im Organismus. Im konkreten Fall humaner Gliomzellen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, zeigen sich bei Kultivierung als dreidimensionale Spheroide bzw. als Monolayer deutliche Unterschiede in der extrazellulären Matrix (Glimelius et al., 1988). Diese spielt eine wichtige Rolle bei der zellulären Proliferation und Differenzierung (Gospodarowicz et al., 1978; Loring et al., 1982). Zudem gibt es Hinweise, daß die extrazelluläre Matrix einen Einfluß auf die Wirksamkeit verschiedener Zytostatika besitzt (West et al., 1980; Nederman et al., 1984). Ein Aspekt, dem insbesondere bei der Bewertung potentieller Therapeutika sowie bei der Untersuchung von Resistenzen solider Tumore eine erhebliche Bedeutung zukommt. Die hohen Zelldichten bieten darüber hinaus Vorteile vor allem für die Untersuchung von metabolischen Radiotracer, da so die Verbrauchsraten der nicht markierten Analoga einfacher und mit höherer Genauigkeit als in herkömmlichen *in vitro* Systemen bestimmt werden können. Die für die Bestimmung der Verbrauchsraten relevante Gesamtzellzahl liegt im Wirbelschichtreaktor um den Faktor $10^3 - 10^4$ über denen in Leighton-Tubes oder Gewebekulturflaschen.

Kultursystem	Wirbelschichtreaktor ¹	Gewebekulturflasche ²	Leighton-Tube
Gesamtzellzahl [*10 ⁶]	1000 -2000	0,5 - 10	0,2 – 0,5

¹ durchströmbares Volumen 83 ml, Trägerschüttvolumen 30 ml

² Gewebekulturflasche mit 25 cm² Wachstumsfläche

Tabelle 4-1: Gesamtzellzahl in unterschiedlichen Kultursystemen

Neben der Möglichkeit zur jederzeitigen Entnahme von Umlauf- und Trägerproben erlaubt der Wirbelschichtreaktor die präzise Einstellung unterschiedlichster Versuchsparameter. Die

Medienzusammensetzung kann ebenso wie der pH, der pO_2 oder die Temperatur an die jeweiligen Versuchsvorgaben angepaßt werden. Dabei ist auch die Einstellung von im Tierversuch nicht realisierbaren experimentellen Randbedingungen möglich. Als Anwendungsbeispiel für die Temperatur sei hier nur die Möglichkeit zur Untersuchung der Hyperthermie auf zellulären Transport und Metabolismus genannt. Die künstliche Hyperthermie ist eine vielfach therapeutisch angewendete Methode, z.B. als extrakorporale Ganzkörperhyperthermie zur Abtötung von Tumorzellen in Kombination mit Chemo- oder Strahlentherapie (Pschyrembel, 1994).

Der Umlaufvolumenstrom kann stufenlos zwischen 10 ml/min und 116 ml/min variiert werden. Die Fließrate des zirkulierenden Mediums kann somit flexibel an den Blutvolumenstrom des im Experiment simulierten Organismus (Maus, Ratte, Mensch) angepaßt werden.

Die Analogien zwischen Wirbelschichtreaktor und Organismus lassen sich exemplarisch an folgenden Punkten aufzeigen:

- | | | |
|-------------------------|---|------------------|
| • Zirkulierendes Medium | ⇔ | Blutkreislauf |
| • Umlaufpumpe | ⇔ | Herz |
| • Blasenfreie Begasung | ⇔ | Lunge |
| • Immobilisierte Zellen | ⇔ | Tumor oder Organ |

Vor dem Einsatz zur Bewertung von Radiopharmaka an immobilisierten Zellkulturen waren jedoch einige Modifikationen notwendig (Abb. 4-1).

Die Reaktorröhre wurde mit zwei γ -Detektoren ausgerüstet, die jeweils aus einem NaI-Kristall mit Integral-Line bestehen und mit einer Ausleseelektronik verbunden sind. Diese ermöglicht eine simultane, integrale Datenerfassung in frei einstellbaren Zeitintervallen ab einer Sekunde. Ein Detektor ist auf das Wirbelbett gerichtet, während der andere das Medium oberhalb des Wirbelbettes erfaßt. Durch geeignete Kollimation, mittels entsprechender Bohrungen in der Bleiabschirmung, wird sichergestellt, daß beide Detektoren ein gleich großes Volumen erfassen.

Übertragen auf einen Organismus bedeutet dies, daß Detektor 1 die Aktivität im ‚Blutkreislauf‘ erfaßt, während Detektor 2 den entsprechenden Wert für das zu untersuchende ‚Organ‘ oder ‚Gewebe (z.B. Tumor)‘ bestimmt. Dies ist solange gewährleistet, wie keine Träger in den Meßbereich des oberen Detektors gelangen, da in diesem Fall auch die intrazellulär akkumulierte Aktivität der immobilisierten Zellen mitgemessen würde. Der maximal einstell-

bare Umlaufvolumenstrom wird somit durch den Wert definiert, bei dem das Wirbelbett bis direkt unter den Erfassungsbereich von Detektor 1 expandiert wird.

Diese Anordnung ermöglicht die on-line Messung der intrazellulären Radiotracerakkumulation, da das Differenzsignal der beiden Detektoren unter Berücksichtigung des Glas- sowie des Zellvolumens im Wirbelbett (vgl. Kap. 4.6) der Traceraufnahme der immobilisierten Zellen entspricht.

Der Meßbereich der verwendeten Detektoren kann auf unterschiedliche Radioisotope eingestellt werden und erlaubt so die Untersuchung eines weiten Spektrums verschieden markierter Tracer.

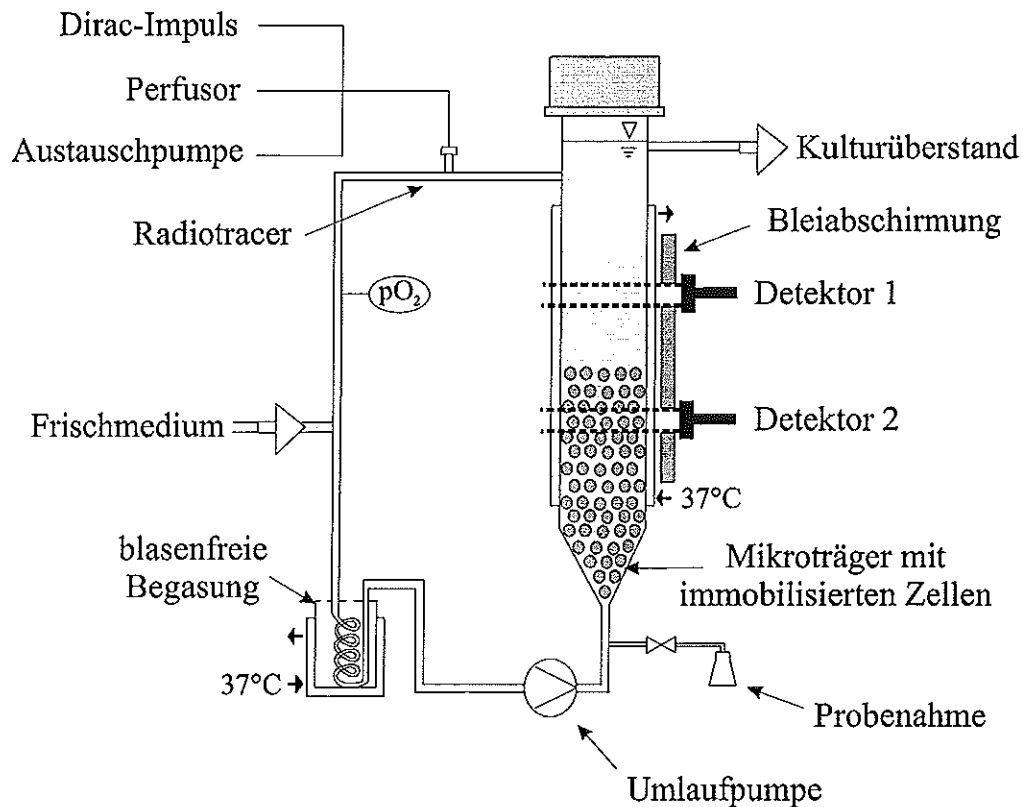


Abbildung 4-1: Fließschema des für Radioaktivmessungen verwendeten Wirbelschichtreaktors

Die Dosierung des Radiotracers kann über einen in den Umlauf integrierten Zugang entsprechend den experimentellen Anforderungen flexibel gestaltet werden. Ein Dirac-Impuls über

eine Spritze ist ebenso möglich, wie eine Sprungfunktion mittels einer Austauschpumpe oder ein genau definierter Profilverlauf unter Verwendung eines Perfusors. In allen Fällen muß gewährleistet sein, daß durch die Zudosierung des Radiotracers die Konzentrationen der übrigen Substanzen (Medienbestandteile und Stoffwechselprodukte) nicht signifikant verändert werden, um die steady state Bedingungen aufrecht zu erhalten.

An dieser Stelle sei eine kurze Bemerkung zur verwendeten Nomenklatur gestattet. Die Thematik der vorliegenden Arbeit liegt im Überlappungsbereich von Verfahrenstechnik, Medizin, Pharmakologie und Nuklearchemie. Jede dieser Disziplinen bedient sich einer spezifischen Fachsprache mit oft unterschiedlichen Begriffen für denselben Sachverhalt. Dies wird z.B. beim 'Dirac-Impuls' deutlich, einem Ausdruck, den man in medizinischen oder pharmakologischen Publikationen meist vergeblich sucht. Statt dessen wird in der Regel der Begriff 'Bolusinjektion' verwendet. In dieser Arbeit wird soweit möglich die verfahrenstechnische Nomenklatur Anwendung finden.

Im folgenden wird die Realisierung der verschiedenen Profilverläufe kurz dargestellt.

4.1.1 Dosierprofile

Dirac-Impuls

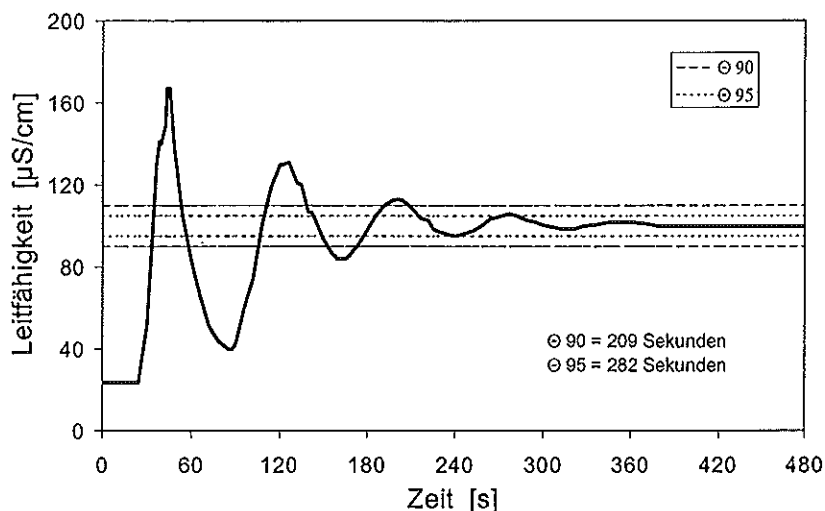


Abbildung 4-2: Injektion von 2 ml einer NaCl-Lsg. (200 g/l) in einen Wirbelschichtreaktor mit entionisiertem Wasser und 30 ml Träger (Umlaufvolumenstrom: 77,5 ml/min)

Zur Untersuchung des Mischverhaltens nach Dirac-Impulsen wurden 2 ml einer hochkonzentrierten NaCl-Lösung (200 g/l) durch ein Septum in den Umlauf des mit entionisiertem Wasser und 30 ml Trägern gefüllten Wirbelschichtreaktors injiziert. Die Leitfähigkeit wurde mittels einer hinter der Reaktorröhre in den Umlauf integrierten Durchflußmeßzelle registriert und von einem x-t-Schreiber aufgezeichnet. In Abhängigkeit vom Umlaufvolumenstrom wurden die $\Theta_{90/95}$ – Werte, d.h. die Zeiten bis zum Erreichen von 90% bzw. 95% des neuen Gleichgewichtswertes bestimmt.

Abbildung 4-2 zeigt exemplarisch den Verlauf der Leitfähigkeit im Umlauf für einen Umlaufvolumenstrom von 77,5 ml/min. Nach vier Umläufen war der neue Gleichgewichtswert erreicht. Für Θ_{90} und Θ_{95} wurden 209 s bzw. 282 s ermittelt.

Abbildung 4-3 beschreibt Θ_{90} und Θ_{95} in Abhängigkeit vom Umlaufvolumenstrom. Mit zunehmender Fließgeschwindigkeit wird der Gleichgewichtswert früher erreicht, beträgt für die im Radioaktivexperiment mit immobilisierten Zellen maximal einstellbaren Volumenströme (ca. 120 ml/min für ein Trägerschüttvolumen von 30 ml) aber immer noch 2-3 Minuten.

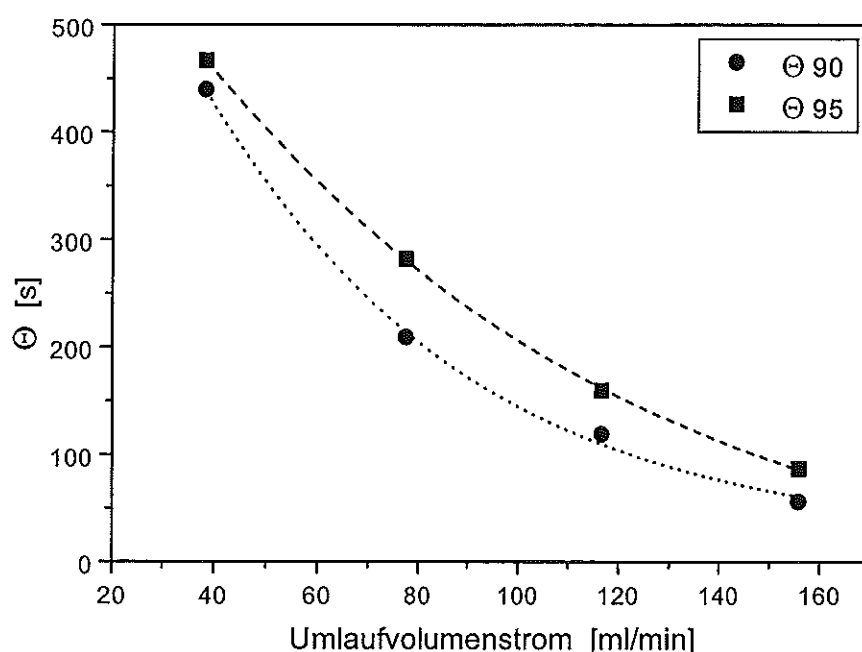


Abbildung 4-3: Mischzeiten Θ_{90} / Θ_{95} in Abhängigkeit vom Umlaufvolumenstrom

Im Rahmen von Untersuchungen zur zellulären Aufnahmekinetik von Radiotracern werden an das Tracerdosierprofil abhängig von der experimentellen Fragestellung unterschiedliche Anforderungen gestellt. Bei Erstuntersuchungen neuer Tracer, über die noch keine Informationen aus Tierversuchen oder klinischen Studien vorliegen, ist eine schnelle Einstellung der gewünschten Radiotracerkonzentration wünschenswert, um die zelluläre Radioaktivitätsaufnahme während der Zudosierung möglichst gering zu halten. Diesen Erfordernissen wird eine Sprungfunktion wesentlich eher gerecht als ein Dirac-Impuls.

Bei der Bearbeitung von Fragestellungen aus dem klinischen Umfeld ist es dagegen erforderlich, die im Organismus durch Aufnahme und Verteilung in den unterschiedlichen Organen und Geweben auftretenden, bekannten Tracerprofilverläufe möglichst exakt zu simulieren.

Deshalb stellt der Dirac-Impuls im Normalfall kein geeignetes Dosierprofil für die Bestimmung der Aufnahmekinetik von Radiotracern dar.

Für langsame Prozesse, bei denen die Mischzeiten im Vergleich zur zellulären Aufnahmegewindigkeit vernachlässigbar sind, kann der Dirac-Impuls als am einfachsten zu realisierende Dosierungsform jedoch eine Alternative zur Sprungfunktion darstellen.

Definierte Profilverläufe

Genau definierte Profilverläufe können durch die Verwendung eines programmierbaren Perfusors realisiert werden. Ansteigende Konzentrationen werden durch Zudosierung einer konzentrierten Radiotracerstamlösung erzeugt, während sinkende Konzentrationen durch Zudosierung zellfreien Kulturüberstandes erzielt werden.

Dies ermöglicht die Simulation der im Organismus auftretenden Profilverläufe, wie sie aus klinischen Studien bereits bekannt sind.

Sprungfunktion

Sprungfunktionen wurden realisiert, indem 200 ml Kulturüberstand während des stationären Zustandes der Fermentation gesammelt und durch Zentrifugation (10 Minuten bei 2000*g) und Sterilfiltration von Zellen und Debris befreit wurden. Da der Wirbelschichtreaktor im steady-state unter Auslaufbedingungen arbeitet, entspricht die Zusammensetzung dieses Filtrats dem im Reaktor zirkulierenden Medium. Das Filtrat wurde mit dem Radiotracer in die vorgesehene Konzentration versetzt und verwendet, um das im Reaktor befindliche Medium binnen 45 Sekunden komplett auszutauschen. Dazu wurde die Umlaufpumpe ausgeschaltet, der Pumpenschlauch aus dem Pumpenkopf entnommen und der Umlauf vor der Zudosierungsstelle abgeklemmt. Anschließend wurde das aktivitätshaltige Filtrat mit der Aus-

tauschpumpe in das System eingepumpt und das im Reaktor befindliche Medium in die Überstandsflasche verdrängt. Der Wirbelschichtreaktor weist während dieses Vorgangs die Charakteristika eines Strömungsrohres auf, während er im Normalbetrieb einem idealen Rührkessel entspricht. Nach 45 Sekunden wurde der Einspülvorgang beendet, die Zudosierungsleitung geschlossen, der Umlauf wieder geöffnet und die Umlaufpumpe gestartet. Gleichzeitig wurde das Frischmedium durch mit dem Radiotracer in gleicher Konzentration supplementiertes Frischmedium ersetzt, um eine Auswaschung des Radiotracers aus dem Umlauf zu verhindern und so die Konzentrationskonstanz zu gewährleisten (Abb. 4-5). Während des Austauschvorganges wurden 90 ml radiotracerhaltiges Filtrat in den Reaktor eingepumpt (Volumenstrom der Austauschpumpe $F_v = 120 \text{ ml/min}$) und die 83 ml tracerfreies Medium annähernd quantitativ verdrängt. Die Verdünnung durch nicht ausgetauschtes Restvolumen ist vernachlässigbar gering ($< 2\%$).

Abbildung 4-4 zeigt die Volumenströme der Umlauf-, Frischmedien- und der Austauschpumpe während des Austauschvorganges.

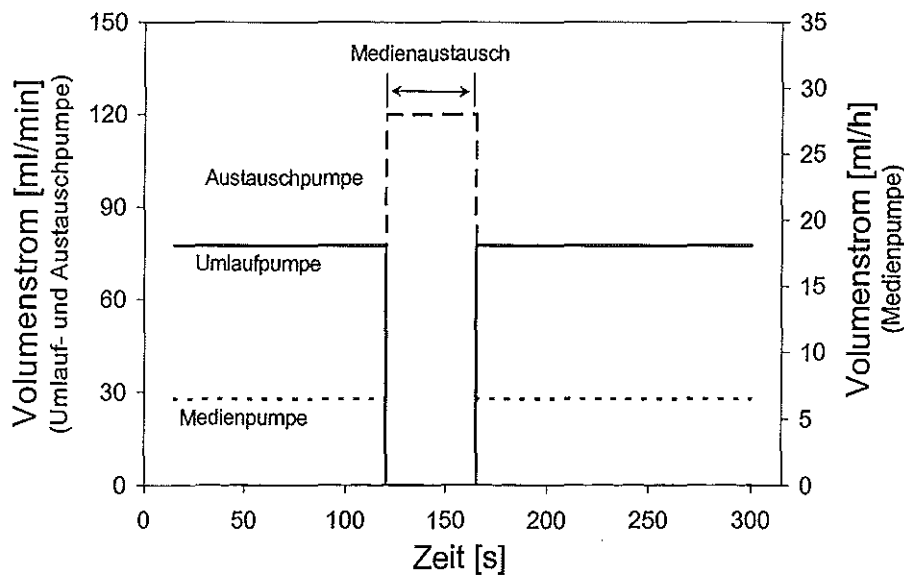
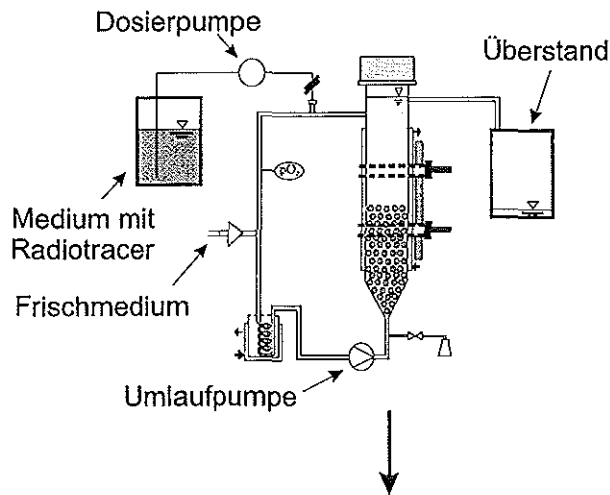


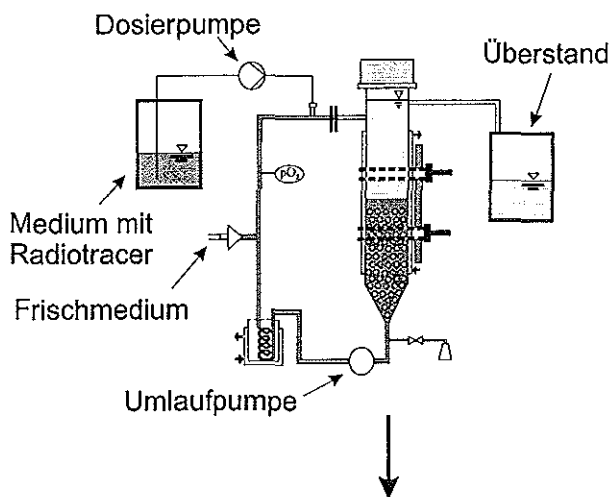
Abbildung 4-4: Volumenströme während der Simulation einer Sprungfunktion



1

vor der Sprungfunktion:

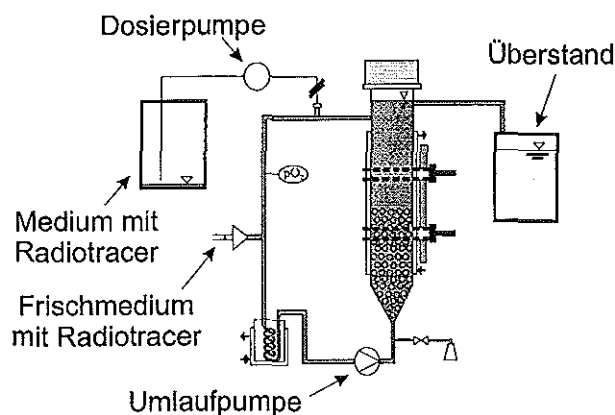
- * Umlaufpumpe an
- * zellfreier Kulturüberstand versetzt mit dem Radiotracer in der gewünschten Konzentration angeschlossen



2

während der Sprungfunktion:

- * Umlaufpumpe aus
- * Dosierpumpe an
- * Umlauf vor dem Zudosierungseingang abgeklemmt



3

nach der Sprungfunktion:

- * Umlaufpumpe an
- * Reaktormedium komplett ausgetauscht
- * Frischmedium supplementiert mit Radiotracer

Abbildung 4-5: Realisierung einer Sprungfunktion im Wirbelschichtreaktor

Im Vergleich zum Dirac-Impuls führt der Austausch des Reaktormediums zu einer erheblich schnelleren Einstellung der gewünschten Radiotracerkonzentration, so daß bereits früher mit der Messung der intrazellulären Radiotracerakkumulation begonnen werden kann (Abb. 4-6).

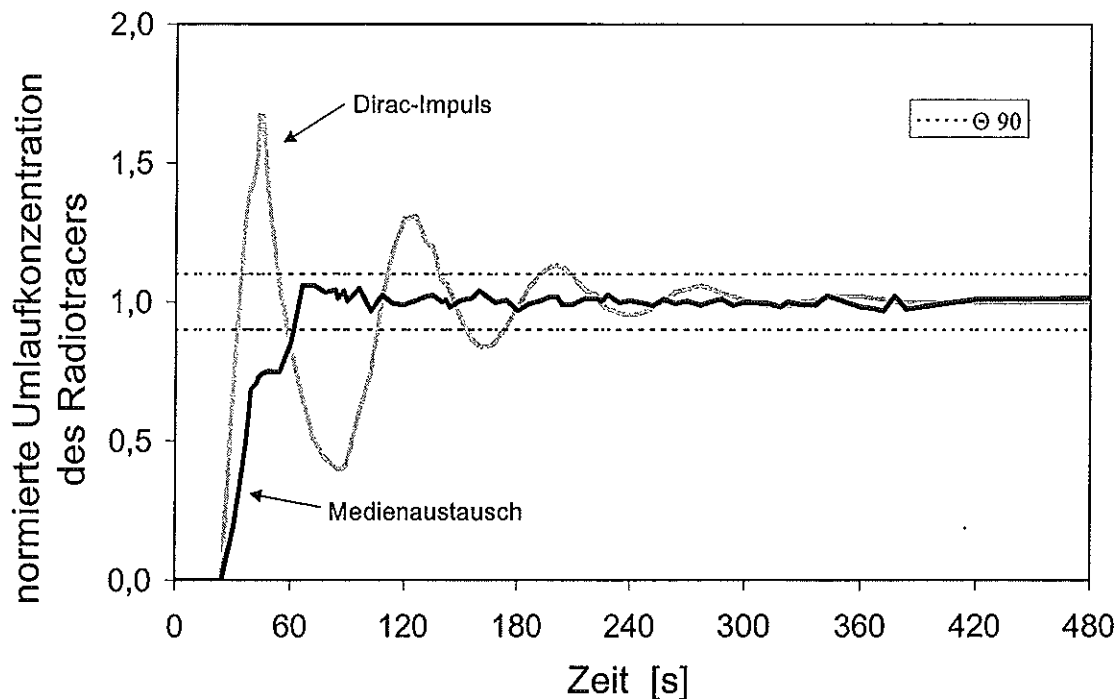


Abbildung 4-6: Vergleich der Geschwindigkeit der Konzentrationsgleichgewichtseinstellung nach Dirac-Impuls und Medienaustausch

Abbildung 4-7 A/B zeigt das Meßsignal der beiden Detektoren während einer solchen Sprungfunktion. Es handelt sich dabei um die Einspülung von $[^{18}\text{F}]$ -FDG in einen zellfreien Wirbelschichtreaktor (FDG-Endkonzentration $3 \mu\text{Ci/ml}$). Anfang und Ende des Einspülvorgangs sind entsprechend gekennzeichnet.

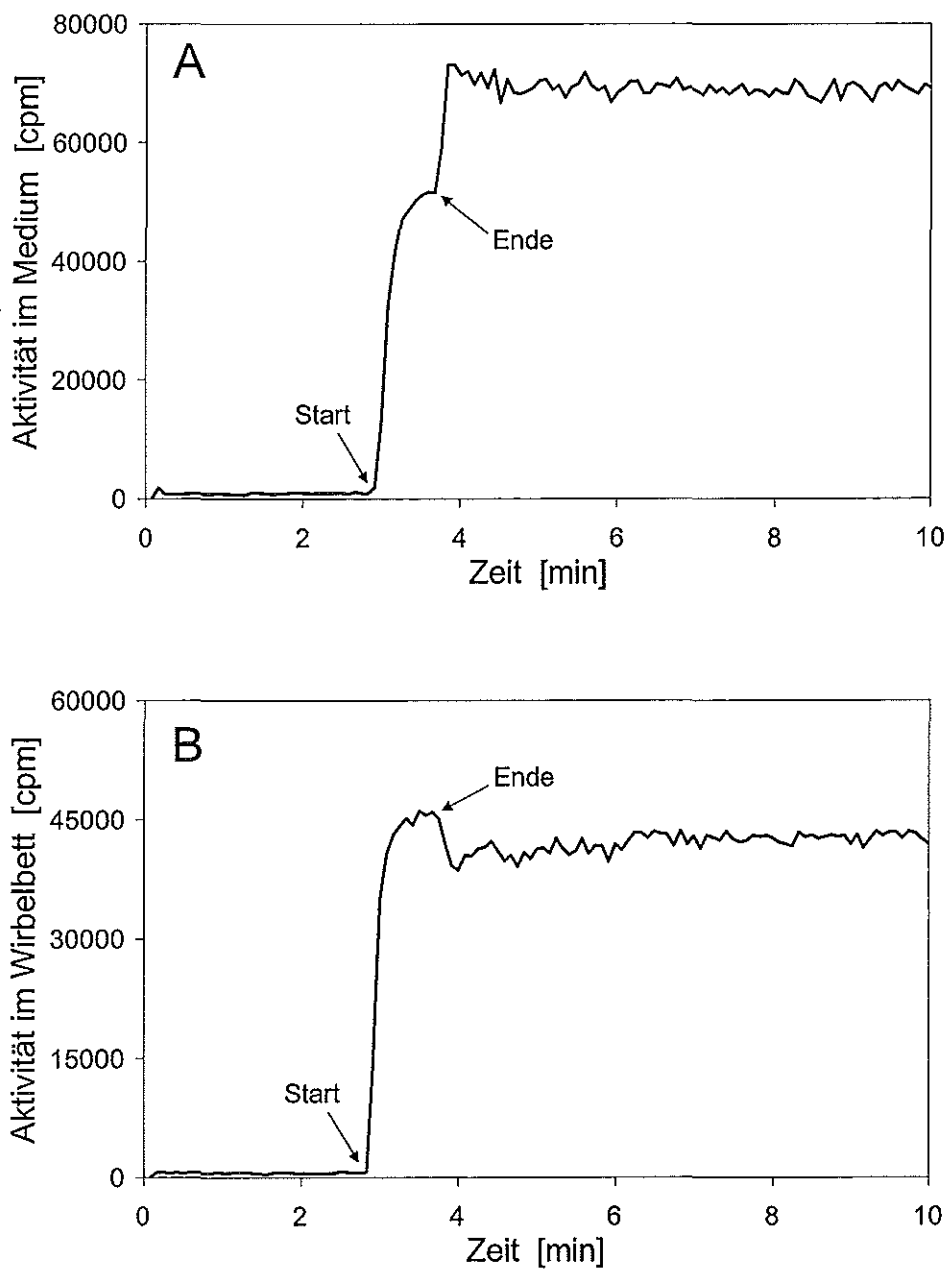


Abbildung 4-7: Meßsignale während einer Sprungfunktion im Wirbelschichtreaktor mit FDG

Um die Einspülzeit möglichst kurz zu halten, wird der Volumenstrom der Austauschpumpe auf den maximalen Wert eingestellt, bei dem noch keine Mikroträger ausgetragen werden. Dabei wird das Wirbelbett bis in den Meßbereich des oberen Detektors hinein expandiert. Durch die Mikroträger wird aktivitätshaltiges Medium verdrängt, und der Meßwert steigt erst nach Beendigung des Einspülens mit dem Absinken der Träger auf den neuen Gleichge-

wichtswert. Analog dazu sinkt der Meßwert im Bereich des Wirbelbettes durch die Verringerung der Expansion der Träger (Abb. 4-8).

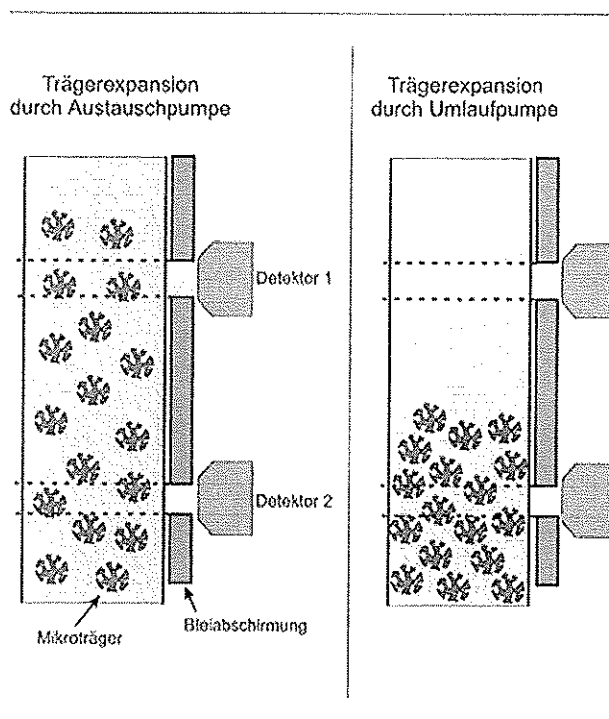


Abbildung 4-8: Expansion des Wirbelbettes während und nach der Sprungfunktion

Unter der Voraussetzung, daß der Radiotracer nicht an den beschichteten Borosilikatträgern adhärirt und es damit nicht zu einer selektiven Anreicherung kommt, entspricht der Quotient der beiden Detektormesswerte im zellfreien System dem Flüssigkeitsanteil (F) im Wirbelbett (Gleichung 14 und 15). Diese Meßanordnung ermöglicht somit eine einfache Bestimmung der Flüssigkeitsanteile in Wirbelbetten für unterschiedliche Träger oder in Abhängigkeit vom Umlaufvolumenstrom. Eine Bestimmung in Festbetten ist nach entsprechender Modifikation des Reaktors (Einbau eines Siebes, auf dem die Träger ruhen sowie Umkehr der Umlauf-fließrichtung) ebenfalls möglich.

$$F = \frac{A_{WB}}{A_{UL}} \quad (14)$$

$$V_{Glas} = 1 - F \quad (15)$$

F	[-]	Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett
$A_{WB/UL}$	[cpm]	Radioaktivität im Wirbelbett bzw. im Umlauf

Exemplarisch zeigt Abbildung 4-9 den Flüssigkeitsanteil (Porosität) im Wirbelbett in Abhängigkeit von der Umlaufgeschwindigkeit.

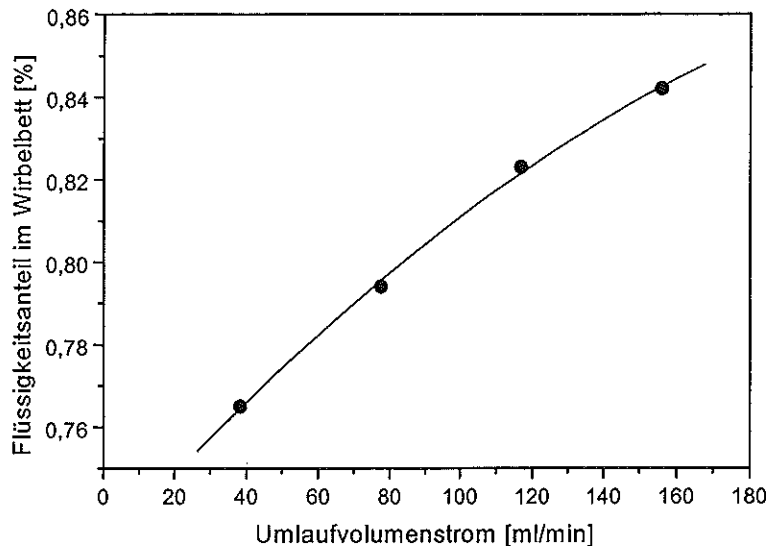


Abbildung 4-9: Flüssigkeitsanteil (Porosität) im Wirbelbett in Abhängigkeit vom Umlaufvolumenstrom

Die Übertragung der Bestimmung der Porosität auf Träger mit immobilisierten Zellen wird in Kapitel 4.6 erläutert.

4.1.2 Einfluß der Wirbelbetthöhe auf die Porosität im Wirbelbett

Durch die Entnahme von Trägerproben aus dem Reaktor während der Radioaktivexperimente (z.B. zur Bestimmung der zellspezifischen Tracerakkumulation oder zur Untersuchung der intrazellulären Metabolisierung des Tracers) verändert sich die Höhe des Wirbelbettes. Eine Veränderung der Porosität im Wirbelbett durch die Trägerentnahme würde eine starke Verfälschung des Differenzsignals verursachen, da nur das Signal im Wirbelbett verändert würde, die Aktivität im Umlauf jedoch konstant bliebe. Um derartige Effekte auszuschließen, wurde in den zellfreien Reaktor [^{18}F]Fluorid eingespritzt (Endkonzentration: 3 $\mu\text{Ci/ml}$) und die Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes abgewartet. Anschließend wurde bei konstantem Umlaufvolumenstrom mehrfach die Höhe des Wirbelbettes durch Entnahme und Zugabe von Mikroträgern verändert und die Porosität (als Quotient zwischen dem Signal des unteren und

des oberen Detektors) bestimmt. Dabei konnte kein Einfluß der Wirbelbetthöhe auf die gemessene Porosität nachgewiesen werden (Abb. 4-10), was im Einklang mit Untersuchungen diverser Autoren zum Ausdehnungsverhalten von Wirbelbetten steht (Richardson 1954, Martin 1980).

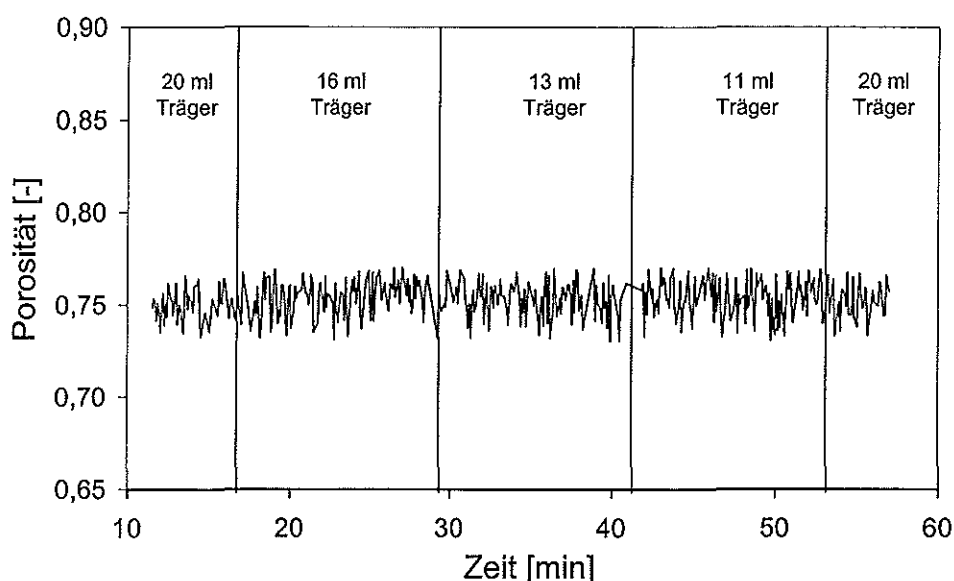


Abbildung 4-10: Porosität im Wirbelbett in Abhängigkeit von der Wirbelbetthöhe (Umlaufvolumenstrom: 19 ml/min)

4.2 Auswahl der geeigneten Zelllinie

Das Ziel der Arbeit besteht in der Entwicklung und Validierung einer Fließbetttechnik zur Bewertung von Radiopharmazeutika an Zellkulturen, so daß dem im Rahmen der Untersuchungen verwendeten biologischen System nur Modellicharakter zukommt. Deshalb wurden im Vorfeld drei unterschiedliche humane Gliomzelllinien auf ihre Eignung untersucht. Wesentliche Kriterien waren dabei die Wachstumsgeschwindigkeit, die maximale Zelldichte, die Stärke der Adhärenz sowie die Neigung der Zellen zur Ausbildung großer Aggregate und zum Bewuchs der Reaktorwände.

Während die Wachstumsgeschwindigkeit den Zeitbedarf pro Versuch determiniert, da alle Untersuchungen erst im stationären Zustand durchgeführt werden, ist die maximal erreichbare Zelldichte aus zwei Gründen interessant. Zum einen bestimmt sie entscheidend das Si-

gnal-Rausch-Verhältnis, zum anderen ist ein gewebeähnliches dreidimensionales Wachstum elementare Voraussetzung für die Simulation der Tumormorphologie.

Die Ausbildung von Aggregaten unter Einschluß mehrerer Mikroträger führt zur Bildung von Inhomogenitäten im Wirbelbett, die zu einer erheblichen Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses führen. Der Bewuchs der Reaktorwände insbesondere im Erfassungsbereich des oberen Detektors verursacht eine Signalverfälschung, da neben der Aktivität im zirkulierenden Medium zusätzlich die intrazellulär akkumulierte Aktivität dieser Zellen erfaßt wird.

Zur Beurteilung der drei in Frage kommenden Zellen wurden statische Fermentationen in Gewebekulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm^2) sowie kontinuierliche Fermentationen im Wirbelschichtreaktor durchgeführt. Dabei wurde - neben der Zellzahl - der Anteil der Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus als Maß für die Proliferationsaktivität der Kultur bestimmt. Im Rahmen der Batchfermentationen wurden die Gewebekulturflaschen jeweils mit $3 \cdot 10^5$ vitalen Zellen inokuliert und in einem Begasungsbrutschrank aufbewahrt (37°C , 5 % CO_2). Im Fall der kontinuierlichen Fermentationen im Wirbelschichtreaktor betrug das Inokulum in allen Fällen $1 \cdot 10^6$ vitale Zellen pro ml Trägerschüttvolumen. Die Gelöstsauerstoffkonzentration hinter dem Wirbelbett wurde auf 30% Luftsättigung eingeregelt.

4.2.1 U-87 MG

Satzreaktorkultivierung in Gewebekulturflaschen:

Abbildung 4-11 zeigt den Verlauf der Satzreaktorkultivierung. An eine kurze lag-Phase, nach dem Inokulum, schließt sich eine Phase exponentiellen Wachstums ($\mu_{\text{max}} = 0,0284 \text{ h}^{-1}$) an, die nach ca. 120 Stunden in die stationäre bzw. Absterbephase übergeht. Die maximal erreichte Lebendzellzahl lag bei $3,8 \cdot 10^6$ vitalen Zellen nach einer Kulturdauer von 170 Stunden.

Zu diesem Zeitpunkt war die Wachstumsfläche der Gewebekulturflasche jedoch keineswegs vollständig bewachsen. Die Zellen bildeten vielmehr ein Netzwerk mit großen Lücken, in dem man an vielen Stellen Spheroide fand, die nur schwach am Boden der Flasche verankert waren (Abb. 4-12). Dies führte dazu, daß sich bereits beim Spülen des Zellrasens mit PBS (vor der Zellzahlbestimmung) einige dieser Spheroide ablösten und somit in der Zellzählung nicht mehr erfaßt wurden. Durch diesen Zellverlust lag die tatsächliche Gesamtzellzahl wahrscheinlich geringfügig höher als in der Abbildung wiedergegeben.

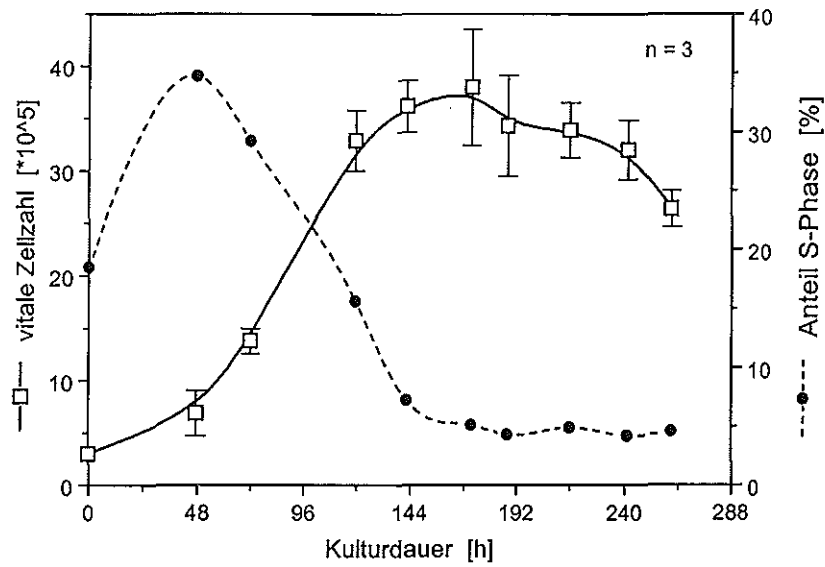


Abbildung 4-11: Batch-Fermentation von HTB-14 in Gewebekulturflaschen (T-25)

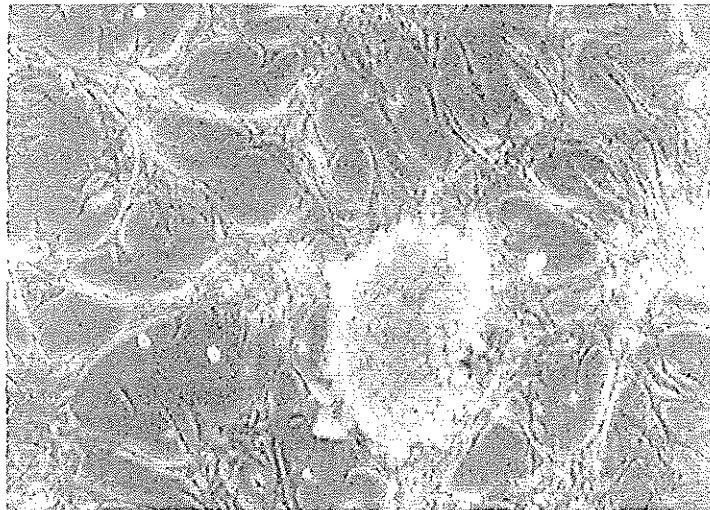


Abbildung 4-12: Mikroskopische Aufnahme von U-87 MG in Gewebekulturflaschen: Bildung von schwach adhärennten multizellulären Sphäroiden

Der Anteil der Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus (S-Phase) stieg zu Beginn der Fermentation auf deutlich über 30% an (mit einem Maximum nach 48 h), um bereits in der zweiten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase wieder abzusinken. Der S-Phasenanteil nimmt die Entwicklung der vitalen Zellzahl vorweg und hat somit prognostisches Potential für

die Aussage über den Zustand und die Entwicklung einer Zellkultur. Mit Eintritt der Kultur in die stationäre Phase erreichte der Anteil der Wachstumsfraktion einen Wert unter 5%.

Kontinuierliche Kultivierung im Wirbelschichtreaktor

Im Wirbelschichtreaktor zeigte die Gliomzelle U-87 MG ein extrem langsames Wachstum. Nach 672 Stunden hatte sich die immobilisierte Zellzahl erst um Faktor 5 erhöht, was einer Verdopplungszeit von fast 300 Stunden entsprach (Abb. 4-13).

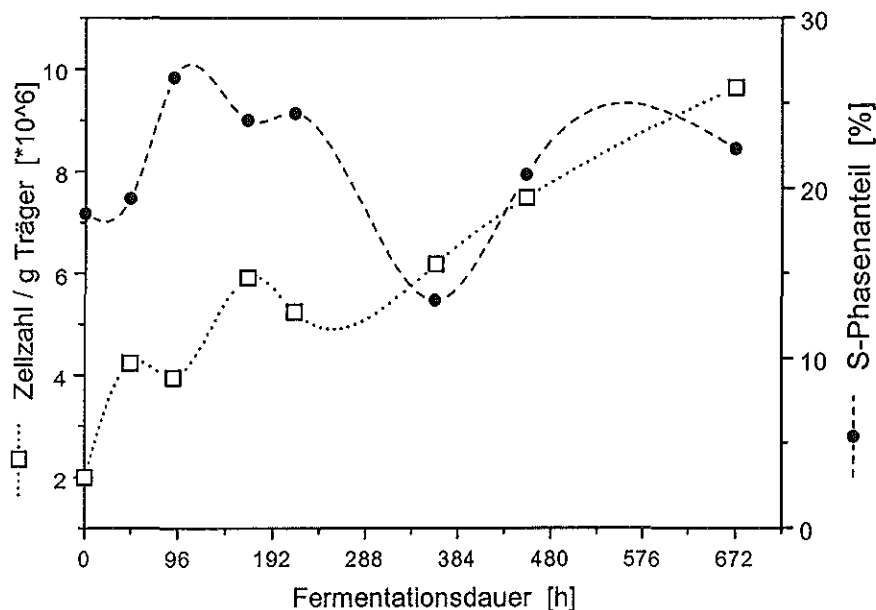


Abbildung 4-13: Kontinuierliche Fermentation von U-87 MG im Wirbelschichtreaktor

Da die Kultur stabil proliferierte, was durch den S-Phasenanteil zwischen 15% und 25% dokumentiert wurde, ist der Grund für dieses Verhalten wahrscheinlich in der Bildung der bereits für die Batchfermentation beschriebenen Spheroide zu suchen, die aufgrund ihrer geringeren Adhärenz kontinuierlich vom Träger abgespült wurden. Die Fermentation wurde wegen der langsamen Zellvermehrung nach 672 Stunden abgebrochen.

4.2.2 U-373 MG

Satzreaktorkultivierung in Gewebekulturfラスchen:

Der Verlauf der Satzreaktorkultivierung von U-373 MG zeigte einen ähnlichen Verlauf wie bereits für U-87 MG beschrieben (Abb. 4-14). Auf das Inokulum folgte eine 48-stündige lag-

Phase, an die sich das exponentielle Wachstum der Kultur anschloß. Die maximale Lebendzellzahl wurde ebenfalls nach 170 Stunden erreicht, lag mit $2,6 \cdot 10^6$ Zellen aber deutlich unter den Werten für U-87 MG. Gleiches galt für die maximale Wachstumsrate ($\mu_{\max} = 0,0229 \text{ h}^{-1}$). Die Zellen bildeten ebenfalls nur ein Netzwerk und keinen geschlossenen Monolayer, zeigten aber keine Tendenz, die für U-87 MG beobachteten Spheroide zu bilden, was die niedrigere Gesamtzellzahl erklärt.

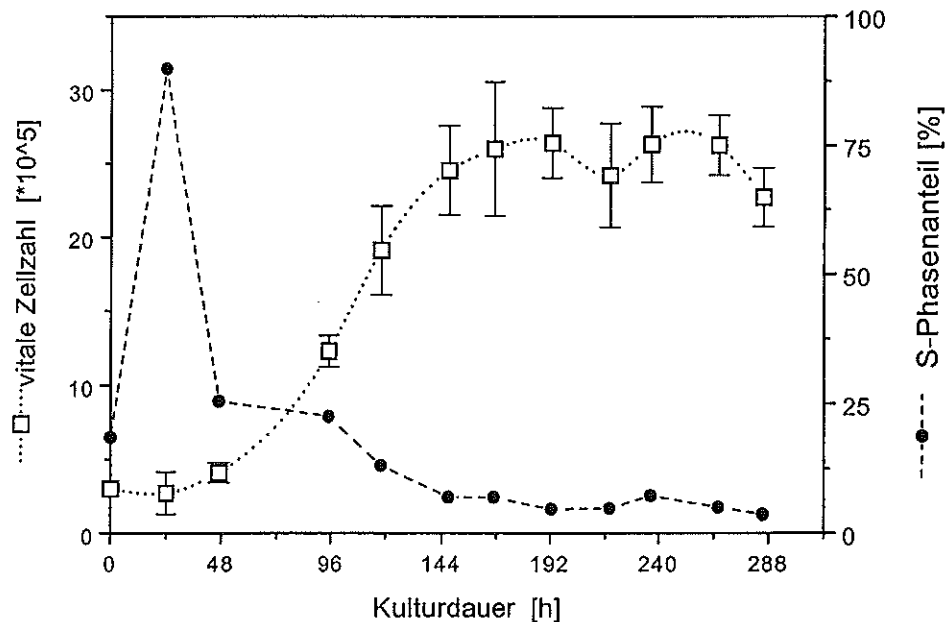


Abbildung 4-14: Batchfermentation von U-373 MG in Gewebekulturflaschen (T-25)

Auffällig ist der Anteil der Zellen in der S-Phase 24 Stunden nach dem Inokulum, der mit fast 90% außerordentlich hoch war. Dies deutet auf eine Limitierung der Vorkultur des Inokulums hin. Eine solche Limitierung kann zu einer Arretierung der Kultur in der G_0 -Phase des Zellzyklus führen. Wird die Limitierung anschließend aufgehoben, durchlaufen die Zellen den Zellzyklus annähernd synchron. In der Regel geht diese Synchronisation jedoch spätestens nach einem Durchlauf wieder verloren. Ansonsten zeigt die Zellzyklusverteilung ein analoges Verhalten zu U-87 MG mit einem starken Absinken des S-Phasenanteils bereits in der zweiten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase.

Kontinuierliche Kultivierung im Wirbelschichtreaktor

Die Fermentation im Wirbelschichtreaktor bestätigte die Ergebnisse aus den Gewebekulturflaschen bezüglich des langsamen Wachstums und der geringen Maximalzelldichte. Nach einer langen lag-Phase von ca. 200 Stunden stieg die immobilisierte Zellzahl exponentiell an, erreichte aber bereits bei einer Zelldichte von $3,6 \cdot 10^7$ Zellen pro g Träger den stationären Wert. Diese Zelldichte ist von der Ausbildung eines dreidimensionalen Tumoranalogs weit entfernt. Für Gewebe wird im allgemeinen eine Zelldichte von 10^9 je cm^3 angenommen. Die maximale Wachstumsrate lag bei $0,006 \text{ h}^{-1}$. Eine Analyse der Zellzyklusverteilung wurde in diesem Fall nicht durchgeführt.

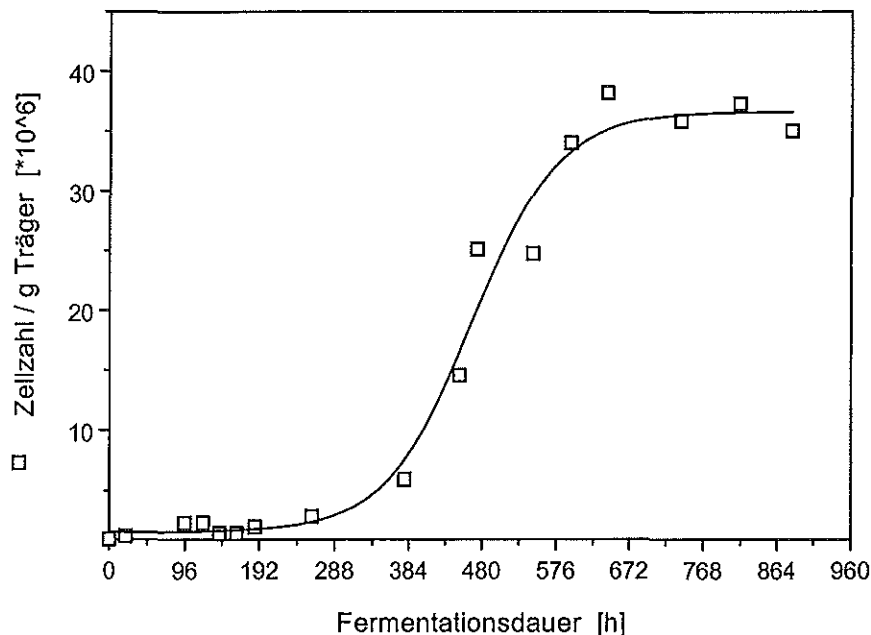


Abbildung 4-15: Kontinuierliche Fermentation von U-373 MG im Wirbelschichtreaktor

Die Verringerung der Wachstumsrate im Wirbelschichtreaktor im Vergleich zur Gewebekulturflasche ist ein sehr häufig beobachtetes Phänomen, das wahrscheinlich auf eine interzelluläre Kontaktinhibition im Trägerinneren zurückzuführen ist, wie sie insbesondere für Primärzellen allgemein bekannt ist (Dulbecco et al. 1973). Diese Kontaktinhibition führt zu einer Abnahme der Proliferationsaktivität und verhindert im Organismus so Gewebswucherungen. Ein weiterer Grund für dieses Verhalten dürfte in der erhöhten Scherbeanspruchung im Wirbelschichtreaktor begründet liegen. Neu gebildete Tochterzellen gehen nach der Mitose zunächst in Suspension und verlassen den Träger. Bis sie sich wieder ansiedeln, sind sie

im Wirbelbett und in der Umlaufpumpe nicht unerheblichen Scherbelastungen ausgesetzt. Ein Teil der Tochterzellen wird dabei letal geschädigt. Eine Limitierung durch unzureichende Nährstoff- oder Sauerstoffdiffusion kann weitgehend ausgeschlossen werden, da solche Phänomene in multizellulären Spheroïden erst bei Diffusionswegen deutlich oberhalb von 300 µm beobachtet wurden (Hambach, 1994).

4.2.3 86HG39

Satzreaktorkultivierung in Gewebekulturflaschen:

Im Gegensatz zu den beiden vorher beschriebenen Zelllinien bildet 86HG39 in der Gewebekulturflasche einen geschlossenen Monolayer aus, was sich in einer dreifach höheren maximalen Zelldichte von $1,02 \cdot 10^7$ vitalen Zellen niederschlägt, die nach 220 Stunden erreicht wird. Die maximale Wachstumsrate ist mit $0,0305 \text{ h}^{-1}$ ebenfalls am größten. Die Zellen zeigen eine starke Adhärenz und keinerlei Neigung zur Ausbildung der für U-87 MG beschriebenen Spheroïde.

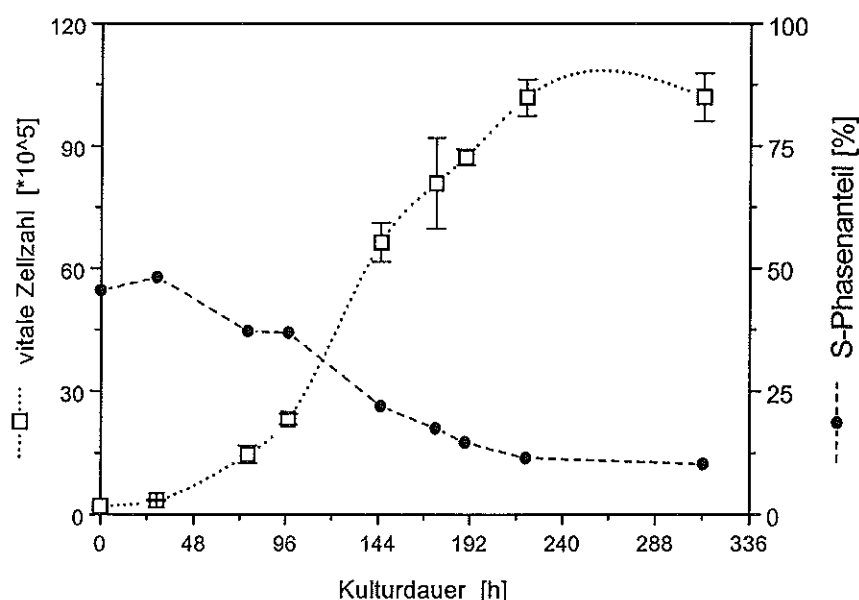


Abbildung 4-16: Batchkultivierung von 86HG39 in Gewebekulturflaschen (T-25)

Die Zellzyklusverteilung entspricht dem für Satzreaktorkultivierungen typischen Verlauf. Das Maximum des S-Phasenanteils (48%) liegt in der ersten Hälfte der exponentiellen Wachstumsphase. Anschließend folgt ein Absinken auf Werte unter 10 %. Daß der S-Phasen-

anteil nicht auf Null zurückgeht, resultiert aus der Tatsache, daß die Zellen bei Auftreten einer Limitierung noch einige Zeit den Erhaltungsstoffwechsel sicherstellen können, vielen Zellen ein Fortschreiten im Zellzyklus aber nicht mehr möglich ist. Es kommt deshalb zu keiner vollständigen Arretierung der Kultur in der G₀-Phase. Einige Zellen verbleiben in der S-Phase.

Kontinuierliche Kultivierung im Wirbelschichtreaktor

Analog zu den Ergebnissen in der Gewebekulturflasche zeigt die Gliomzelllinie 86HG39 im Wirbelschichtreaktor ein deutlich schnelleres Wachstum und eine sehr viel höhere Maximalzell-dichte als die beiden anderen untersuchten Zelllinien. Nach ca. 450 h wird der steady state mit einer Zelldichte von $1,17 \cdot 10^8$ Zellen pro Gramm Träger erreicht. Die Zellen bilden dabei einen stabilen dreidimensionalen Verbund (Abb. 4-17 und 4-18).

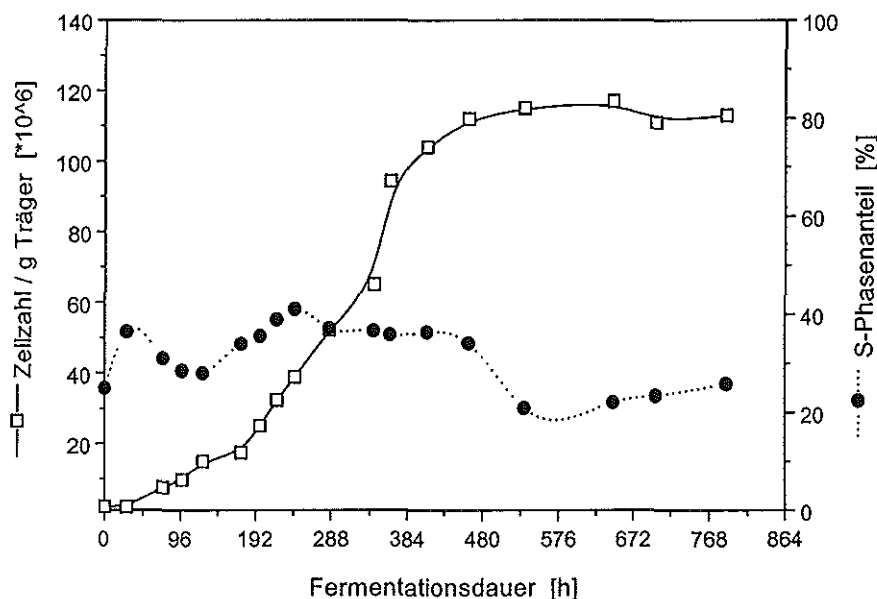


Abbildung 4-17: Kontinuierliche Fermentation von 86HG39 im Wirbelschichtreaktor

Der S-Phasenanteil lag bis zum Erreichen des steady state zwischen 35% und 40% und sank im stationären Zustand auf einen Wert zwischen 20% und 25%. Dies entspricht den Werten aus der exponentiellen Wachstumsphase der Batchfermentation. Das Absinken des S-Phasenanteils im steady state resultiert aus dem dichten Bewuchs der Träger und der dadurch verursachten, bereits beschriebenen Kontaktinhibierung.

Die maximale Wachstumsrate lag bei $0,0104 \text{ h}^{-1}$. Der Zeitraum bis zum Erreichen des stationären Zustandes wird entscheidend von der Inokulumszellzahl bestimmt. Im Falle eines dreifach höheren Inokulums ($3 \cdot 10^6$ vitale Zellen pro ml Trägerschüttvolumen) verkürzte sich die Zeit bis zum steady state auf 250 Stunden. Dieser Zeitraum läßt sich jedoch nicht beliebig verkürzen, da es sich um eine Sättigungsfunktion handelt. Nach dem Inokulum werden zuerst die besonders geeigneten Poren der Mikroträger von der maximal möglichen Anzahl Zellen besiedelt. Über diese Zahl hinaus in das System eingebrachte Zellen verbleiben zwangsläufig länger im Umlauf und sind damit stärkeren Scherbeanspruchungen ausgesetzt.

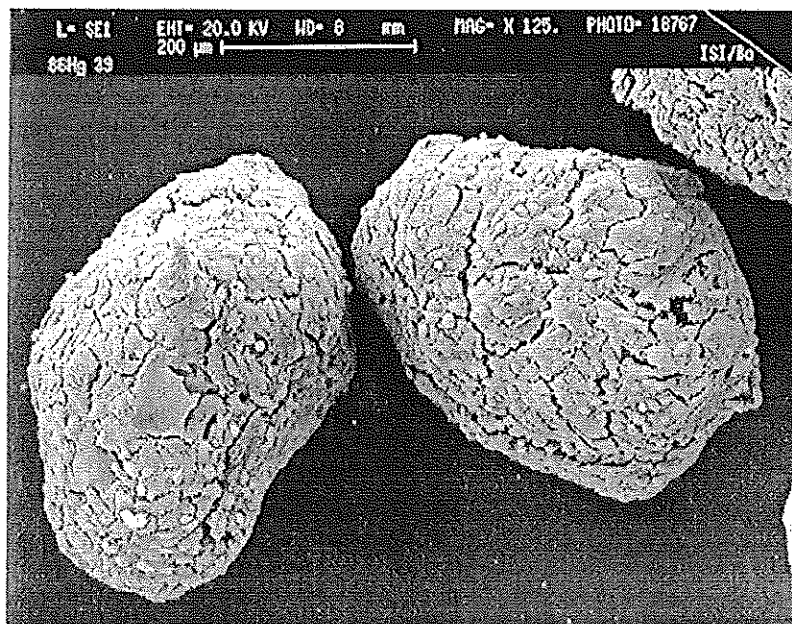


Abbildung 4-18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von 86HG39 im Wirbelschichtreaktor

4.2.4 Fazit

Die Zelllinie 86HG39 zeigt bezüglich aller untersuchter Aspekte die beste Eignung zum Einsatz als biologisches Modellsystem, da sie das schnellste Wachstum mit den deutlich größten Zelldichten verbindet. Darüber hinaus weist sie eine starke Adhärenz auf und bildet auf den Trägern stabile dreidimensionale Strukturen, neigt aber trotzdem weder zur Bildung von Verklumpungen im Wirbelbett noch zum Bewuchs der Reaktorwände. Der steady state

konnte über sechs Wochen problemlos aufrechterhalten werden. Unter der Voraussetzung, daß die Zellen durch die Versuche nicht beeinträchtigt werden, wovon bei Radiotracern im allgemeinen ausgegangen werden kann, gewährleistet dies die Durchführbarkeit einer großen Versuchszahl am identischen System.

Die Einzelergebnisse für die drei untersuchten Gliomzelllinien sind in Tabelle 4-2 noch einmal zusammengefaßt.

	U-87 MG	U-373 MG	86HG39
Max. Zellzahl (T-25) [*10 ⁶]	3,8	2,6	10,2
$\mu_{\max}$ in T-25 [h ⁻¹]	0,0284	0,0229	0,0305
Adhärenz	- ¹⁾	+	++
Dreidimensionales Wachstum im Träger	-	-	+
Max. Zellzahl (Wirbelschicht) [*10 ⁶ / g Träger]	9,6 ²⁾	36	117
Aggregatbildung im Wirbelbett	-	-	-
Neigung zu Wand- bewuchs im Reaktor	-	-	-

¹⁾ Bildung schwachadhärenter Spheroide

²⁾ Fermentation nach 672 h abgebrochen (maximale Zelldichte noch nicht erreicht)

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellauswahl

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse wurden alle folgenden Untersuchungen mit 86HG39 Gliomzellen durchgeführt.

4.3 Untersuchungen zur enzymatischen Ablösung immobilisierter Zellen vom Träger

Eine wesentliche Anforderung an in vitro Systeme ist die Implementierung einer Probenahme sowohl für Medium als auch für Zellen. Denn nur so gelingt es über das rein phänomenologische Erfassen von Effekten hinaus, Vorgänge auch auf zellulärer Ebene zu untersuchen, zu verstehen und zu quantifizieren. Während dies in Suspensionskulturen in der Regel einfach zu realisieren ist, erfordert die Entnahme von Zellen aus immobilisierten Systemen einen größeren Aufwand und ist bisweilen sogar unmöglich (z.B. aus Hohlfasermodulen). Der Wirbelschichtreaktor bietet dagegen auf zwei Wegen einen Zugang zu den auf Trägern immobilisierten Zellen - die Entnahme über das unterhalb der Reaktorröhre angebrachte Probenahmegefäß oder die Entnahme durch Öffnen des Reaktordeckels. Während die erste Variante eine kurzzeitige deutliche Verringerung des Umlaufvolumenstroms (bis zu 30 Sekunden) erfordert, ist das Öffnen des Reaktors aus steriltechnischen Gründen natürlich nur unter einer Sterilbank durchführbar.

Aus Festbettreaktoren ist die letztgenannte Art der Probenahme ebenfalls möglich. Durch die im Gegensatz zur Wirbelschicht jedoch fehlende Vermischung der Träger während der Fermentation bzw. während des Experimentes kann sie jedoch nicht als repräsentativ gelten, da eine Gradientenbildung nicht ausgeschlossen werden kann, in vielen Fällen sogar nachgewiesen ist (Schmidt 1998).

Zur Untersuchung der immobilisierten Zellen ist es notwendig, diese unbeschädigt vom Träger abzulösen (z.B. für Zellzyklusuntersuchungen). Dies geschieht in der Regel, insbesondere bei stark adhärenenten Zellen, enzymatisch, z.B. mit Trypsin oder Collagenase/Dispase. Mit Hilfe der Enzyme werden die extrazellulären Matrixproteine, mit denen die Zellen an den Trägern haften, aufgelöst. Gelegentlich wird EDTA zugesetzt, das die für die Zelladhäsion wichtigen zweiwertigen Metallionen Ca^{2+} und Mg^{2+} komplexiert und somit die Ablösung erleichtert.

Eine zu lange Einwirkzeit des Enzyms führt jedoch über die Auflösung der Matrixproteine hinaus zur Zerstörung von Membranproteinen und damit zur einer Schädigung der Zelle bis hin zum Zelltod. Daraus ergibt sich eine optimale Einwirkzeit des Enzyms, die einerseits so kurz wie möglich gehalten werden sollte, um Zellschädigungen zu vermeiden, andererseits so lang wie nötig sein muß, um die Zellen quantitativ vom Träger abzulösen, da die Ergebnisse sonst nicht als repräsentativ gelten können. Die Zellen im Trägerinneren werden zuletzt abgelöst und würden bei nicht quantitativer Zellablösung in den anschließenden Untersuchungen selektiv fehlen.

Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluß der Einwirkzeit einer Trypsinlösung (2,5 g/l; Gibco, Eggenstein) auf den Anteil der abgelösten Zellen und deren Vitalität untersucht. Dazu wurden im steady state einer kontinuierlichen Fermentation von 86HG39 Gliomzellen im Wirbelschichtreaktor Trägerproben entnommen, einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und unterschiedlich lange (1 – 25 min) mit 2 ml Trypsinlösung bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben kräftig geschüttelt, die Trypsinlösung abgenommen und die Träger dreimal mit je 2 ml Kulturmedium gewaschen. Die Zellzahl und die Vitalität in den vereinigten Überständen wurde im Hämocytometer bestimmt (vgl. Kap. 3.6.1).

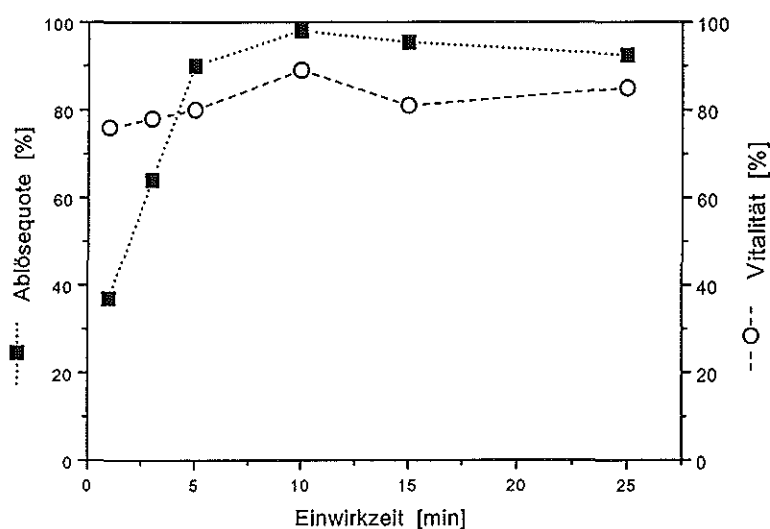


Abbildung 4-19: Einfluß der Einwirkzeit auf die Ablösequote immobilisierter Zellen

Die Gesamtzahl der immobilisierten Zellen wurde mittels Kernzählung ermittelt und die Ablösequote als Quotient aus der enzymatisch abgelösten Zellzahl und der Gesamtzellzahl bestimmt (Gl. 16).

$$\text{Ablösequote} = \frac{\text{enzymatisch abgelöste Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \quad (16)$$

In Abbildung 4-19 sind die Ablösequote und die Vitalität der abgelösten Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkzeit der Trypsinlösung dargestellt. Es zeigte sich, daß nach 10 Minuten eine im Rahmen der Meßgenauigkeit quantitative Ablösung der Zellen erreicht wird. Längere Einwirkzeiten führen scheinbar zu einer leichten Abnahme der Ablösequote, die durch enzy-

matistische Lysierung von Zellen verursacht wird. Diese Zellen entgehen der Erfassung im Hämocytometer. Die Vitalität der abgelösten Zellen blieb annähernd konstant bei 85%.

Der Anteil der toten Zellen setzt sich zusammen aus Zellen, die im Inneren der Träger eingeschlossen waren und somit nach dem Zelltod im Wirbelbett nicht vom Träger abgespült werden konnten sowie Zellen, die durch die Enzymeinwirkung oder durch die auftretenden Scherbelastungen beim kräftigen Schütteln der Probe zwischen den Trägern letal geschädigt wurden. Dem letztgenannten Aspekt kommt dabei die größte Bedeutung zu.

Bei analogen Untersuchungen mit einem Gemisch von Collagenase und Dispase waren nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten erst 74 % der immobilisierten Zellen abgelöst, so daß dieses Enzymgemisch für die untersuchten Gliomzellen nicht geeignet ist.

4.4 Untersuchungen zur Zellzyklussynchronisation von 86HG39

Die Zellzyklussynchronisation der im Wirbelschichtreaktor immobilisierten Zellen würde die Untersuchung der Aufnahme und Metabolisierung von Radiotracern und Radiopharmaka in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase ermöglichen. Voraussetzung ist jedoch ein hoher Grad an Synchronisation, da eine über den Zellzyklus verteilte Population keine Aussagen über die Wirkmechanismen und Wirkungen in den einzelnen Phasen erlaubt.

Viele der in Kapitel 2.3 beschriebenen Methoden zur Zellzyklussynchronisation sind nicht auf den Wirbelschichtreaktor übertragbar. Dies betrifft insbesondere die Selektionstechniken, die auf einer gezielten Abtrennung der gewünschten Subpopulation beruhen, da dies auf den Mikroträgern nicht möglich ist. Es wäre zwar grundsätzlich denkbar, daß ein Wirbelschichtreaktor mit einer vorsynchronisierten Zellpopulation inokuliert wird, jedoch hätte dies entscheidende Nachteile. Die Untersuchungen müßten kurz nach dem Inokulum durchgeführt werden, da ein Wachstum der Zellen mit einem Verlust der Synchronisation spätestens nach einem Durchlauf durch den Zellzyklus verbunden ist. Aus der zu diesem Zeitpunkt vorliegenden geringen Zelldichte resultiert jedoch ein sehr schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis. Darüber hinaus liegt kurz nach dem Inokulum noch kein Fließgleichgewicht vor.

Die einzige erfolgversprechende Technik ist somit die chemische Arretierung der immobilisierten Kultur am Restriktionspunkt des Zellzyklus. Da aber vor dem Einbringen des Enzyminhibitors keine Vorsynchronisation der Zellen (z.B. durch mitotic shake-off) möglich ist, die Zellen sich also auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus verteilen, muß mit einer erheblichen zytotoxischen Wirkung, insbesondere für Zellen in der S-Phase, gerechnet werden.

Aus der Vielzahl der in Frage kommenden Reagenzien (Tab. 4-3) zur chemischen Arretierung wurden für die folgenden Untersuchungen Hydroxyharnstoff und Aphidicolin ausge-

wählt. In Kombination mit dem mitotic shake-off haben sich diese beiden Verbindungen zur Zellzyklussynchronisation besonders bewährt (Fox, 1987). Ob allerdings auch ohne vorherige Zellselektion eine gute Synchronisation zu erzielen ist, mußte in Vorversuchen geklärt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden darüber hinaus die geeignete Wirkstoffkonzentration sowie die optimale Einwirkzeit bestimmt, um die akute Toxizität auf ein Minimum zu beschränken.

Hemmstoff	Angriffsort	Reaktion
Hydroxyharnstoff	DNA-Synthese	hemmt Ribonukleotid-Reduktase
Mitomycin	DNA-Synthese	bindet kovalent an DNA
Cytosin-Arabinosid	DNA-Synthese	struktur analog zu dCMP
Ethidiumbromid	DNA-Synthese	interkaliert in DNA
Aphidicolin	DNA-Synthese	hemmt DNA-Polymerase α (dCMP-Einbau)
Methotrexat	DNA-Synthese	hemmt Dihydrofolat-Reduktase
Fluorouracil	DNA-Synthese	hemmt Thymidylat-Synthetase

Tabelle 4-3: Hemmstoffe der DNA-Synthese zur Zellzyklussynchronisation

Die Voruntersuchungen wurden mit 86HG39 Gliomzellen in Gewebekulturflaschen durchgeführt.

Zusammenfassung der Synchronisationsuntersuchungen

In umfangreichen Untersuchungen, die im Detail im Anhang (Kapitel 8.1, S. 109) dargestellt werden, konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß es nicht möglich ist, eine proliferierende Zellpopulation allein durch Zusatz eines chemischen Hemmstoffes zu synchronisieren. Sowohl Hydroxyharnstoff als auch Aphidicolin (allerdings in geringerem Umfang) zeigten deutliche cytotoxische Effekte insbesondere auf Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus. Dies führte dazu, daß weder eine vollständige Synchronisation am Restriktionspunkt, noch ein synchrones Durchlaufen des Zellzyklus nach Aufhebung der Arretierung möglich waren. Im Falle des Aphidicolin waren noch 55% der Zellen proliferationsfähig, bei Verwendung von Hydroxyharnstoff sogar nur 30%.

4.5 Einfluß des Trägerspülens auf die immobilisierte Zellzahl

Ein Aspekt, der vor der Durchführung von Transportuntersuchungen mit Radiotracern untersucht werden mußte, war die Stärke der zellulären Adhäsion am Träger. Werden während eines Experimentes mit Radiotracern Träger aus dem Wirbelschichtreaktor entnommen, um die immobilisierten Zellen zu untersuchen, z.B. zur Bestimmung der zellspezifischen Tracerakkumulation oder zur Untersuchung der intrazellulären Metabolisierung des Tracers, ist es notwendig, die Träger zuerst mehrfach mit PBS zu waschen, um anhaftendes aktivitätshaltiges Medium zu entfernen. In entsprechenden Vorversuchen erwiesen sich drei Spülschritte als ausreichend. Dabei muß allerdings sichergestellt sein, daß durch die Waschschrte keine Zellen vom Träger abgelöst werden, um die Vergleichbarkeit zwischen on-line und off-line bestimmten Daten zu gewährleisten.

Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes wurden aus einem im stationären Zustand befindlichen Wirbelschichtreaktor mit 86HG39 Gliomzellen (Zelldichte $1,2 \cdot 10^8$ Zellen/g Träger) mehrere Trägerproben entnommen, unterschiedlich oft vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend die immobilisierte Zellzahl pro Gramm Träger durch Kernzählung mit Kristallviolet bestimmt.

Es zeigte sich, daß die Spülschritte zu keinem signifikanten Zellverlust führt. Die beobachtete leichte Abnahme der immobilisierten Zellzahl liegt im Rahmen der Meßschwankungen ($n=3$).

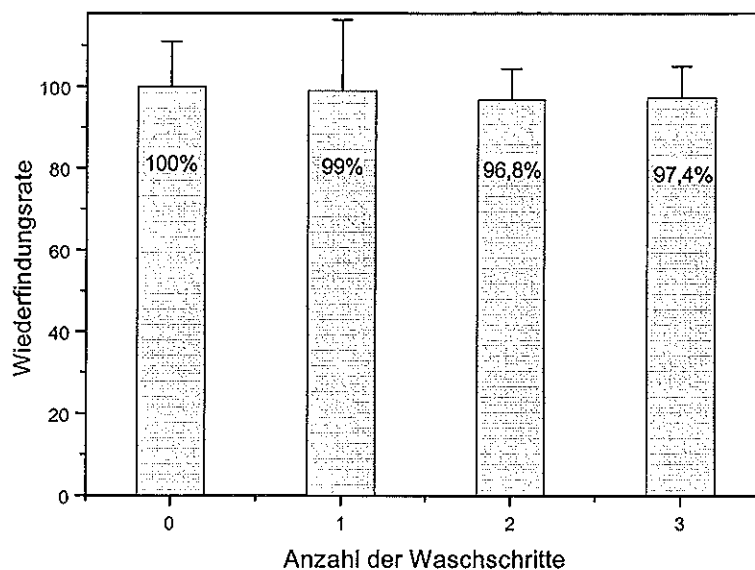


Abbildung 4-20: Einfluß des Trägerwaschens auf die immobilisierte Zellzahl ($n=3$)

4.6 Bestimmung des Flüssigkeitsanteils im Wirbelbett mit immobilisierten Zellen

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte on-line Bestimmung der intrazellulären Radiotraceraufnahme basiert wie beschrieben auf einer Differenzmessung zwischen den Aktivitätssignalen im Umlauf und im Bereich des Wirbelbettes. Dabei ist im zellfreien System das Wirbelbett-Meßsignal im Vergleich zum Umlaufsignal um den Glasanteil der Träger verringert. Eine Tatsache, die, wie bereits dargestellt, zur Bestimmung des Flüssigkeitsanteils in Wirbel- oder Festbetten ausgenutzt werden kann (vgl. Kap. 4.1.2). Im System mit immobilisierten Zellen kommt zum Glasanteil im Wirbelbett noch der Biomasseanteil hinzu. (Abb. 4-21). Um die Radiotracerakkumulation in eben diesem Zellvolumenanteil aus dem Differenzsignal zu ermitteln, muß unmittelbar vor Beginn der Transportuntersuchung der Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett bestimmt werden (Gleichungen 17 und 18).

Unter der Voraussetzung, daß der zur Porositätsbestimmung eingesetzte Radiotracer weder von den Zellen aufgenommen wird, noch an den Zellen oder den Trägern adhärert, was zu einer selektiven Anreicherung im Wirbelbett führen würde, ergibt sich die Porosität analog zu den Verhältnissen im zellfreien System als Quotient der beiden Detektormesswerte (Gleichung 14).

$$F = 1 - V_{(Glas+Zellen)} \quad (17)$$

$$A_{Zellen} = A_{WB} - F * A_{UL} \quad (18)$$

F	[-]	Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett
$V_{(Glas+Zellen)}$	[-]	Volumenanteil der Glasträger und der Zellen im Wirbelbett
A_{Zellen}	[cpm]	intrazelluläre Radiotracerakkumulation
$A_{WB, UL}$	[cpm]	Radioaktivität im Wirbelbett bzw. im Umlauf

Die Differenz zwischen dem Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett mit bzw. ohne immobilisierte Zellen entspricht bei gleichem Umlaufvolumenstrom aber nicht dem Zellvolumen (V_{Zellen}), da sich die Fluidisierungseigenschaften der Träger durch die immobilisierten Zellen ändern, so daß sich das Zellvolumen einer exakten Messung entzieht und nur näherungsweise berechnet werden kann.

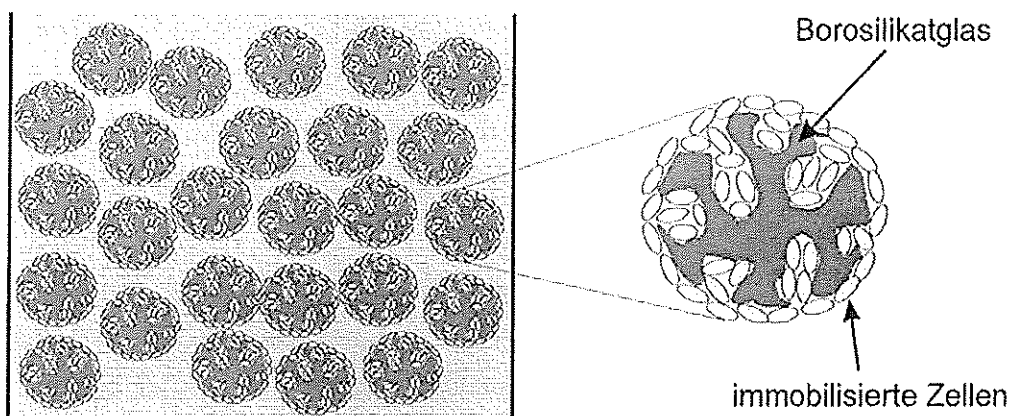


Abbildung 4-21: Ausschnitt aus dem Wirbelbett mit immobilisierten Zellen (Schematische Darstellung)

Der Radiotracer, der zur Bestimmung der Porosität eingesetzt wird, sollte nach Möglichkeit mit dem gleichen Isotop markiert sein, wie der Radiotracer in der anschließenden Transportuntersuchung, um identische Einstellungen der Meßelektronik verwenden zu können. Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich [^{18}F]-markierte Radiotracer zum Einsatz kamen, mußte eine Verbindung gefunden werden, die sich mit [^{18}F] markieren läßt, von den Zellen nicht aufgenommen wird und weder an den Zellen noch an den Trägern adhärirt.

Die einfachste denkbare Substanz für diese Anwendung ist [^{18}F]Fluorid, das als erstes Zwischenprodukt bei der FDG-Synthese in großen Mengen hergestellt wird. Um die Eignung von [^{18}F]Fluorid für die angestrebte Verwendung zu untersuchen, wurden Transportuntersuchungen in Leighton-Tubes sowie im Wirbelschichtreaktor durchgeführt. Dazu wurden in Leighton-Tubes jeweils $1 \cdot 10^5$ vitale Zellen (86HG39) in 5 ml Medium inokuliert und zwei Tage im Begasungsbrutschrank kultiviert. Die Zellzahl betrug danach $4,2 \cdot 10^5$ bei einer Vitalität von 99%. Zur Untersuchung der [^{18}F]Fluorid-Aufnahme wurde das Medium gegen 5 ml Frischmedium ausgetauscht, das vorher mit [^{18}F]Fluorid ($3 \mu\text{Ci/ml}$) supplementiert wurde. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden das Inkubationsmedium abgenommen, der Monolayer dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen und die intrazellulär akkumulierte Aktivität im Gammazint bestimmt. Dazu müssen die Zellen nicht enzymatisch abgelöst werden, da die Leighton-Tubes komplett vermessen werden können.

Analoge Untersuchungen wurden an immobilisierten Zellen im Wirbelschichtreaktor durchgeführt, indem bei einem im steady-state befindlichen Reaktor das Medium komplett durch zellfreien, mit [^{18}F]Fluorid ($3 \mu\text{Ci/ml}$) supplementierten, Kulturüberstand ausgetauscht wurde. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Trägerproben entnommen, dreimal vorsichtig mit

PBS gewaschen und im Gammazint gemessen. Zum Vergleich der [^{18}F]Fluorid-Aufnahme mit der zellulären Aufnahmerate eines metabolischen Radiotracers, wurde diese Untersuchung unter Verwendung von [^{18}F]FDG wiederholt.

Abbildung 4-22 zeigt die jeweils auf 100000 cpm eingesetzten Standard kalibrierte, zellspezifische Aktivitätsaufnahme von 86HG39 Gliomzellen in Leighton-Tubes sowie im Wirbelschichtreaktor im Vergleich zur [^{18}F]FDG-Aufnahme.

Während [^{18}F]FDG als metabolischer Tracer von den Zellen aktiv aufgenommen und intrazellulär akkumuliert wurde, war im gesamten Beobachtungszeitraum (30 min) unabhängig vom Kultursystem keine signifikante zelluläre Aufnahme von [^{18}F]Fluorid zu beobachten. Die geringe intrazelluläre Aktivitätsanreicherung ist wahrscheinlich auf Diffusion in die wenigen vorhandenen letalen Zellen zurückzuführen.

[^{18}F]Fluorid erfüllt somit die oben angeführten Voraussetzungen zur Bestimmung des Flüssigkeitsanteils im Wirbelbett mit immobilisierten Zellen und kann vor der Durchführung der eigentlichen Transportuntersuchungen entsprechend verwendet werden. Die Zudosierung des [^{18}F]Fluorid kann dabei als Dirac-Impuls realisiert werden, da die Mischzeit bis zur Gleichgewichtseinstellung wegen der vernachlässigbaren intrazellulären Akkumulation nicht relevant ist.

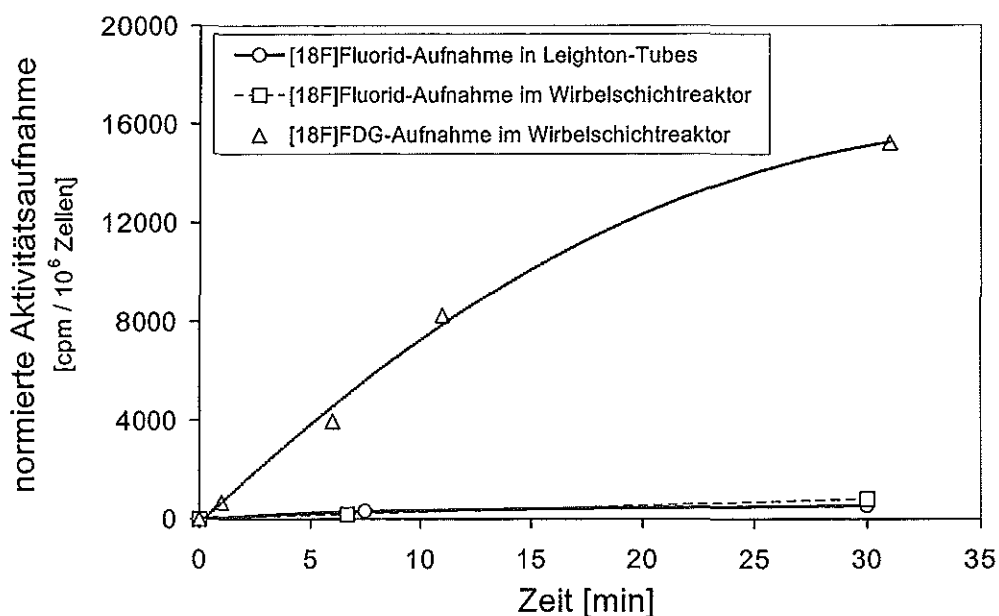


Abbildung 4-22: Vergleich der Aufnahme von FDG und Fluorid im Reaktor und in Leighton-Tubes

Als Alternative zur vorgeschalteten Porositätsbestimmung mit $[^{18}\text{F}]\text{Fluorid}$ läßt sich diese unter Verwendung des metabolischen Tracers unter gewissen Rahmenbedingungen auch direkt in die eigentliche Transportuntersuchung integrieren. Dies gilt für den Fall, daß als Dosierprofil des Radiotracers eine Sprungfunktion gewählt wird und die zelluläre Traceraufnahme zumindest in den ersten Minuten annähernd linear verläuft, wovon in der Regel ausgegangen werden kann. Aus dem instationären, sich durch die intrazelluläre Tracerakkumulation linear zunehmenden, Quotienten der beiden Detektorsignale kann auf den Quotienten zum Zeitpunkt t_0 , an dem der Tracerkonzentrationsprung gerade abgeschlossen ist, extrapoliert werden. Dieser Wert entspricht dem Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett, jedoch nur unter der Voraussetzung, daß während der Sprungfunktion ($< 1 \text{ min}$) keine nennenswerte intrazelluläre Anreicherung stattgefunden hat (Abb. 4-23), was im Einzelfall zu überprüfen ist.

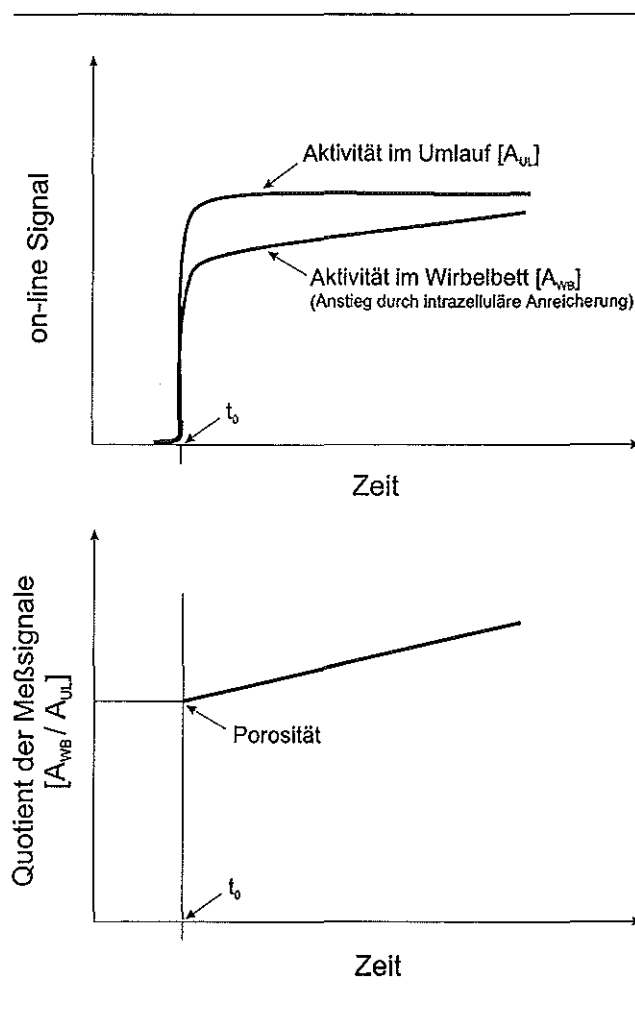


Abbildung 4-23: Schematische Darstellung der in eine Transportuntersuchung integrierten Porositätsbestimmung im Wirbelbett mit immobilisierten Zellen

Ein Nachteil dieser Methode ist die größere Ungenauigkeit, mit der sie im Vergleich zur [^{18}F]Fluorid-Variante behaftet ist. Dies resultiert aus dem Umstand, daß zur Bildung des Quotienten bei $t=t_0$ nur wenige Werte zur Verfügung stehen, während unter Verwendung von [^{18}F]Fluorid über mehrere Minuten gemittelt werden kann. Von Vorteil ist dagegen zum einen die insgesamt geringere Strahlenexposition, zum anderen, daß die Zellen ausschließlich mit dem zu untersuchenden Radiotracer in Kontakt kommen und somit eine Beeinflussung des zellulären Metabolismus durch Fluorid ausgeschlossen werden kann. Da die bei der [^{18}F]Fluorid-Methode verwendeten Fluoridkonzentrationen ($< 10^{-9}$ mol/l) aber keine pharmakologisch wirksamen Werte erreichen, ist der letztgenannte Vorteil eher theoretischer Natur. In den folgenden Untersuchungen wurden nach Abwägung der Vor- und Nachteile die Porositäten jeweils mit [^{18}F]Fluorid bestimmt.

4.7 Untersuchungen zur Aufnahme von 2- ^{18}F Fluor-2-Deoxyglukose (FDG) im Wirbelschichtreaktor mit on-line Datenerfassung

Mit den bisher beschriebenen Arbeiten waren alle notwendigen Voraussetzungen zur Durchführung von Transportuntersuchungen an immobilisierten Zellen im Wirbelschichtreaktor mit on-line Datenerfassung geschaffen, so daß die Eignung des Systems in Beispielexperimenten überprüft werden konnte. Ziel dieser Experimente war die kritische Beurteilung des Potentials des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Reaktorkonzeptes als *in vitro* Modell.

Als Radiotracer für diese Untersuchungen wurde 2- ^{18}F Fluor-2-Deoxyglukose (FDG) verwendet, da FDG, wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben, zu den klassischen metabolischen Radiotracern mit der größten Verbreitung in der nuklearmedizinischen Diagnostik gehört und deshalb unter pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Gesichtspunkten besonders gut untersucht ist. Zu den unterschiedlichsten Aspekten und Fragestellungen liegen publizierte *in vivo* Daten aus klinischen Studien und Tiermodellen vor, die einen Vergleich und eine Einordnung der mit der Fließbetttechnik produzierten Ergebnisse erlauben. Darüber hinaus ist FDG trägerfrei mit hoher spezifischer Aktivität (>2000 Ci/mmol) verfügbar.

4.7.1 Transportuntersuchung an immobilisierten Gliomzellen

Zur Untersuchung der zellulären Anreicherung von 2- ^{18}F Fluor-2-Deoxyglukose wurde ein Wirbelschichtreaktor mit 86HG39 Gliomzellen im steady-state mit einer FDG-Sprungfunktion beaufschlagt. Die Endkonzentration lag bei 3 $\mu\text{Ci/ml}$. Um die Tracerkonzentration im Umlauf

konstant zu halten und Verdünnungseffekte zu vermeiden, wurde das Frischmedium mit FDG in gleicher Konzentration supplementiert. Die on-line Datenerfassung erfolgte integral im Abstand von fünf Sekunden. Dies führt, verglichen mit einer Datenerfassung im Sekundentakt, zu einem erheblich verbesserten Signal-Rauschverhältnis ohne Informationsverluste. Änderungen in den beobachteten Transportvorgängen finden bei Säugerzellen erheblich langsamer statt.

Mehrmals während des Experimentes wurden Träger- und Umlaufproben aus dem System entnommen. Dies diente zum einen der Kontrolle, daß die on-line ermittelte Radiotracerakkumulation auch der tatsächlichen intrazellulären Anreicherung entsprach, und zum anderen zur Ermittlung der zellspezifischen Aufnahmeraten, da deren direkte Bestimmung aus dem on-line Signal nicht möglich ist. Die Detektoren erfassen zwar ein definiertes Reaktorvolumen, die Ermittlung der exakten Trägeranzahl (und damit der Zellzahl) im Meßfeld des Wirbelschicht-Detektors ist aber nicht mit der erforderlichen Genauigkeit realisierbar. Insofern ist die Entnahme einer Trägerprobe während der Transportuntersuchung zur Kalibrierung des on-line Signals notwendig. Die übrigen Trägerproben dienen nur der Kontrolle während der Entwicklungsphase des Systems.

Tabelle 4-4 faßt die experimentellen Parameter dieser Transportuntersuchung zusammen.

Zelllinie	86HG39 (humanes Glioblastom)
Medium	IMDM mit 10% FCS
Zelldichte	$1,2 \cdot 10^8$ Zellen / g Träger (steady-state)
pO ₂	30 %
Umlaufvolumenstrom	77,5 ml / min
Verweilzeit	12,8 h
Glukosekonzentration im Umlauf	0,58 g / l (3,2 mM)
Porosität	0,645 (bestimmt mit [¹⁸ F]Fluorid)
Radiotracer	2-[¹⁸ F]Fluor-2-Deoxyglukose (trägerfrei)
Dosierprofil	Sprungfunktion (Endkonzentration: 3 µCi/ml)

Tabelle 4-4: Experimentelle Parameter einer Transportuntersuchung mit 2-[¹⁸F]Fluor-2-Deoxyglukose im Wirbelschichtreaktor

Die folgende Abbildungssequenz (Abb. 4-24 – 4-27) beschreibt exemplarisch den Ablauf einer solchen Transportuntersuchung.

Abbildung 4-24 zeigt die unveränderten on-line Signale der beiden Detektoren. Zum angegebenen Zeitpunkt wird der Reaktor mit einer FDG-Sprungfunktion beaufschlagt. Dabei wird binnen 45 Sekunden die Zielkonzentration von 3 $\mu\text{Ci/ml}$ erreicht. Die Radioaktivität im Wirbelbett entspricht direkt nach dem Einbringen des Radiotracers im Vergleich zur Radioaktivität im Umlauf der Porosität im Wirbelbett. Diese wurde vor dem Einbringen von FDG, wie in Kapitel 4.6 beschrieben, mit $[^{18}\text{F}]$ Fluorid zu 64,5% bestimmt. In den folgenden Minuten weist das Signal im Umlauf eine Abnahme der Radioaktivität auf, verursacht durch den Zerfall des $[^{18}\text{F}]$ (Halbwertszeit = 109,7 Minuten), während im Bereich des Wirbelbettes die intrazelluläre Anreicherung den radioaktiven Zerfall überkompensiert.

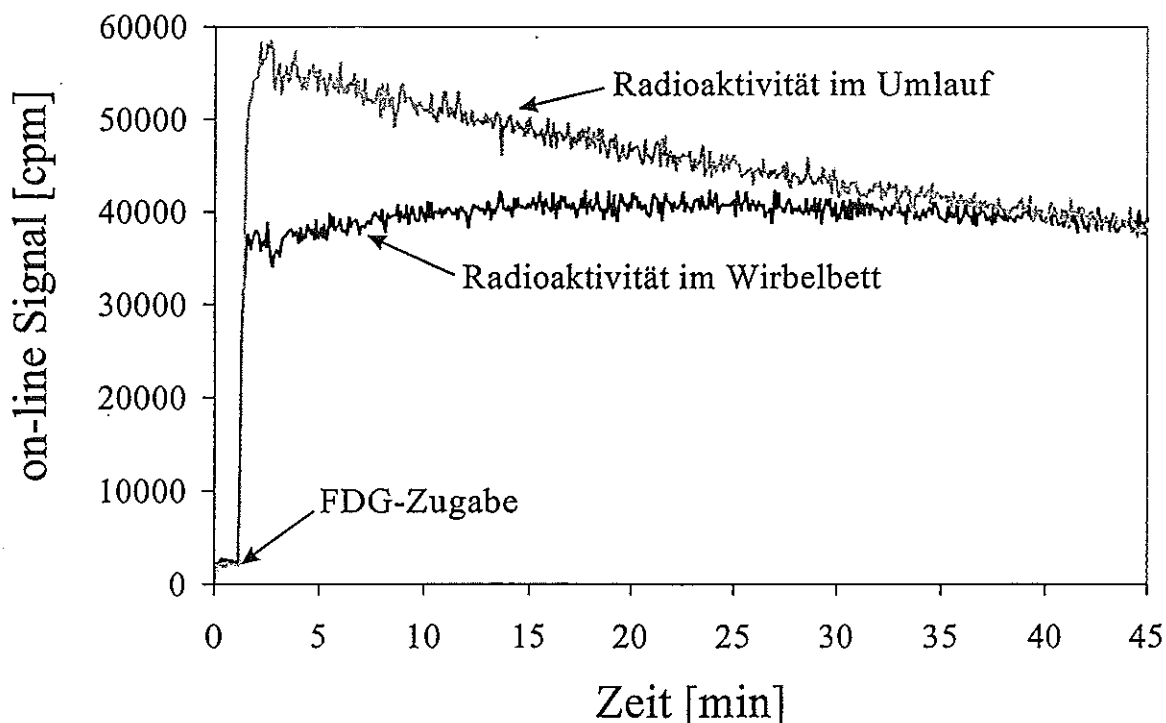


Abbildung 4-24: On-line Signale während und nach einer Sprungfunktion mit FDG (3 $\mu\text{Ci/ml}$) im Wirbelschichtreaktor mit 86HG39 Gliomzellen ($1,2 \cdot 10^8$ Zellen/g Träger)

Zur Bestimmung der zellulären Radiotraceraufnahme müssen die on-line Daten um den radioaktiven Zerfall, sowie das Wirbelbettsignal zusätzlich um den Glas- und Zellanteil korri-

giert werden. Diese Berechnungen werden im folgenden anhand der schematischen Abbildung 4-25 dargestellt, bevor die Übertragung auf die Untersuchungsdaten erfolgt.

Abbildung 4-25A zeigt die on-line Rohdaten entsprechend Abbildung 4-24. Im ersten Schritt wird der radioaktive Zerfall aus den Werten beider Detektoren eliminiert (Gleichungen 19 und 20).

$$A_{UL,t}^* = \frac{A_{UL,t}}{Z_t} \quad \text{bzw.} \quad A_{WB,t}^* = \frac{A_{WB,t}}{Z_t} \quad (19)$$

$A_{UL,t}$; $A_{WB,t}$ [cpm] Radioaktivität im Umlauf bzw. Wirbelbett zum Zeitpunkt t
 $A_{UL,t}^*$; $A_{WB,t}^*$ [cpm] zerfallskorrigierte Radioaktivität im Umlauf bzw. Wirbelbett zum Zeitpunkt t

$$Z_t = e^{-\frac{\ln 2}{t_{1/2}} \cdot t} \quad (20)$$

Z_t [-] Restradioaktivitätsanteil zur Zeit t
 $t_{1/2}$ [min] Halbwertszeit ($[^{18}\text{F}] = 109,7$ Minuten)

Aus dieser Berechnung ergibt sich Abbildung 4-25B. Die Aktivität im Umlauf ist konstant, während die Aktivität im Wirbelbett von niedrigerem Niveau ausgehend, bedingt durch die intrazelluläre Radiotraceranreicherung, ansteigt.

Im nächsten Schritt wird die Aktivität im Wirbelbett bestimmt, die sich ohne Aufnahme des Radiotracers durch die Zellen ergeben würde. Dabei handelt es sich um die Radioaktivität im Umlauf, multipliziert mit dem Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett, der vor jeder Untersuchung getrennt bestimmt wird (vgl. Kap. 4.6).

$$A_{WB,t}^{\text{soll}} = F \cdot A_{UL,t}^* \quad (21)$$

$A_{WB,t}^{\text{soll}}$ [cpm] Radioaktivität im Wirbelbett zum Zeitpunkt t ohne intrazelluläre Aufnahme des Radiotracers
 F [-] Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett

Das Ergebnis dieser Korrektur ist Abbildung 4-25C, in der sich die intrazelluläre Anreicherung als Differenz der beiden Signale ergibt (grau eingefärbter Bereich).

$$A_{Zellen,t} = A_{WB,t}^* - A_{WB,t}^{\text{soll}} \quad (22)$$

A_{Zellen} [cpm] intrazelluläre Aktivität zum Zeitpunkt t

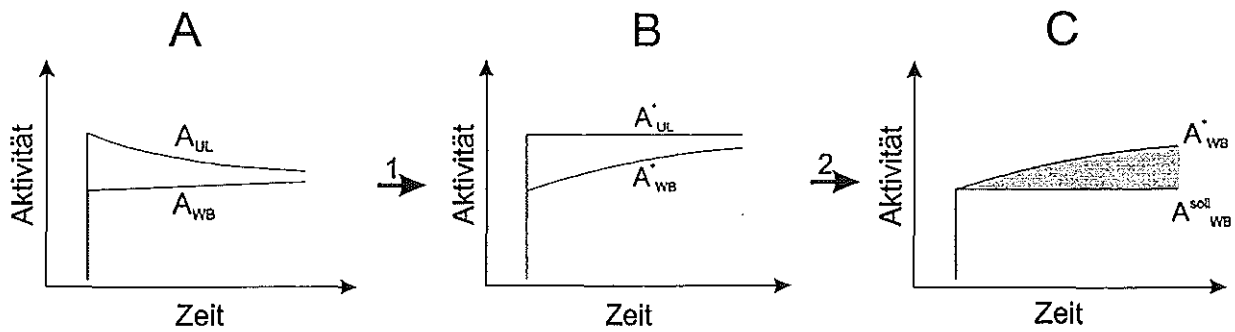


Abbildung 4-25: Schematische Darstellung der Detektorsignalbearbeitung

1: Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls

2: Berücksichtigung des Flüssigkeitsanteils im Wirbelbett

Übertragen auf die durchgeführte Untersuchung ergibt sich aus dieser Berechnung Abbildung 4-26.

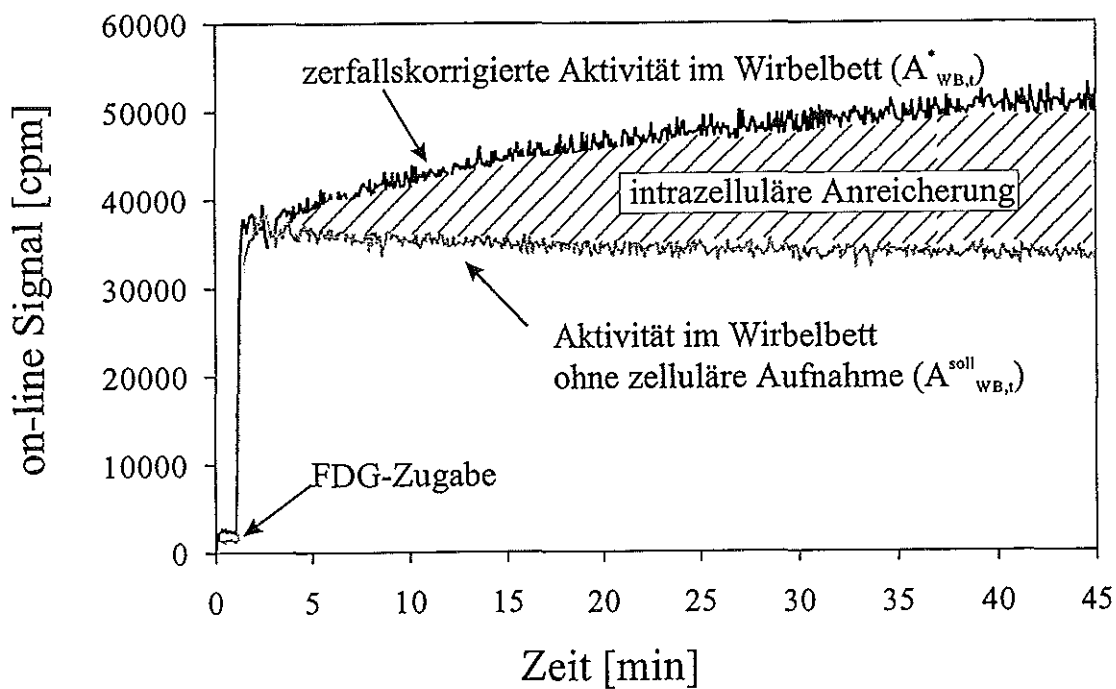


Abbildung 4-26: Meßsignale nach Berücksichtigung des radioaktiven Zerfalls und des Flüssigkeitsanteils im Wirbelbett

Ohne Radiotraceraufnahme durch die immobilisierten Zellen ergäbe sich, bedingt durch die annähernd konstante FDG-Konzentration im Umlauf, eine ebenfalls nahezu konstante Aktivität im Wirbelbett, während real eine deutliche Zunahme des Meßsignals zu beobachten ist. Aus der Differenz ergibt sich, wie oben erläutert, die intrazelluläre Anreicherung (schraffierter Bereich).

Abbildung 4-27 zeigt die Differenz zwischen den beiden Signalen in Abbildung 4-26, verglichen mit der zellspezifischen FDG-Aufnahme, die anhand der zu verschiedenen Zeitpunkten während der Transportuntersuchung entnommenen Trägerproben bestimmt wurde. Die sehr gute Übereinstimmung zwischen on-line und off-line bestimmtem Verlauf belegt die Eignung dieser Technik zur on-line Untersuchung des zellulären Radiotracertransportes.

Mit Hilfe der anhand der Trägerproben bestimmten zellspezifischen Radiotraceraufnahme [cpm/ 10^6 Zellen] kann die online gemessene Aktivitätsaufnahme kalibriert werde, so daß die zellspezifischen Daten für den gesamten Untersuchungszeitraum vorliegen.

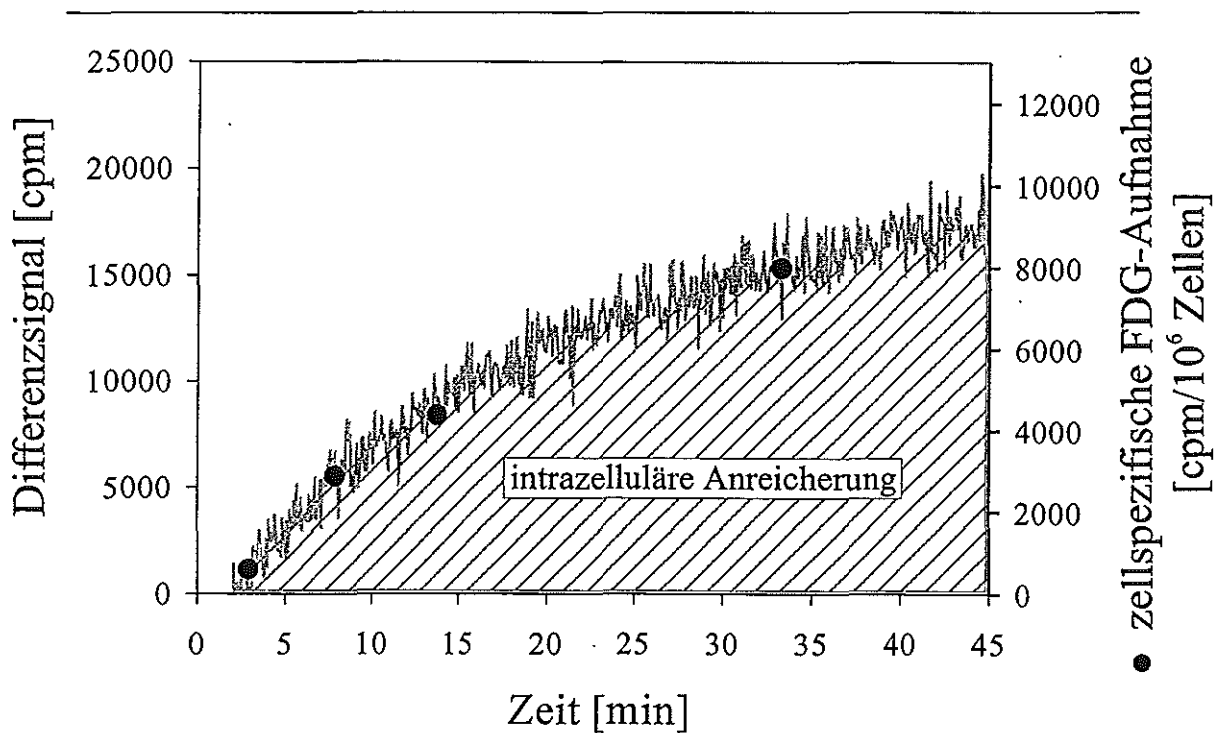


Abbildung 4-27: Vergleich zwischen on-line und off-line bestimmter Traceraufnahme der Zellen

Der Verlauf der intrazellulären FDG-Akkumulation entspricht dem in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Modell der Aufnahme und Metabolisierung von FDG in Säugerzellen. Mit zunehmenden

der intrazellulärer FDG-Konzentration gewinnt der Rücktransport an Bedeutung und vermindert so die Nettoaufnahme. Daß sich kein Gleichgewicht einstellt, sondern die intrazelluläre Aktivität weiter ansteigt, resultiert aus der weitgehend irreversiblen Umsetzung von FDG zu FDG-6-Phosphat, welches nicht mehr membrangängig ist.

Um aus den online Daten unter Verwendung des kinetischen Modells zur zellulären Aufnahme und Metabolisierung von FDG (Gleichung 9) die Geschwindigkeitskonstanten der Einzelreaktionen zu ermitteln, bedarf es der Umrechnung der zellspezifischen Aktivität in intrazelluläre Konzentrationen (Gleichung 23). Das dazu notwendige Zellvolumen kann, eine entsprechende Analytik vorausgesetzt, direkt gemessen werden oder näherungsweise z.B. anhand von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen abgeschätzt werden. Für die Modellierungen im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellradius von 6 µm bei idealer Kugelform angenommen. Das Volumen einer einzelnen Zelle ergibt sich somit zu $9,05 \cdot 10^{-10}$ ml.

$$c_{A,Zellen} = \frac{A_{Zellen}}{V_{Zellen}} \quad (23)$$

$c_{A,Zellen}$	[cpm/ml]	intrazelluläre Aktivitätskonzentration
A_{Zellen}	[cpm/ 10^6 Zellen]	zellspezifische Aktivität
V_{Zellen}	[ml/ 10^6 Zellen]	Zellvolumen

$$c_i(t) = - \frac{k_1^* \cdot c_p \cdot \left(-t \cdot k_2^* \cdot k_3^* - k_2^* + k_2^* \cdot e^{(-k_2^* - k_3^*) \cdot t} - k_3^{*2} \cdot t \right)}{(k_2^* + k_3^*)^2} \quad (9)$$

c_i	[mmol/l]	intrazelluläre FDG + FDG-6-Phosphat-Konzentration
c_p	[mmol/l]	FDG-Konzentration im Medium
k_1^*	[min ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante für den Transport Medium → Zytoplasma
k_2^*	[min ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante für den Transport Zytoplasma → Medium
k_3^*	[min ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante für die Phosphorylierung von FDG
t	[min]	Zeit

Abbildung 4-28 zeigt das Ergebnis der kinetischen Modellierung, sowie das auf die intrazelluläre Aktivitätskonzentration kalibrierte on-line Signal.

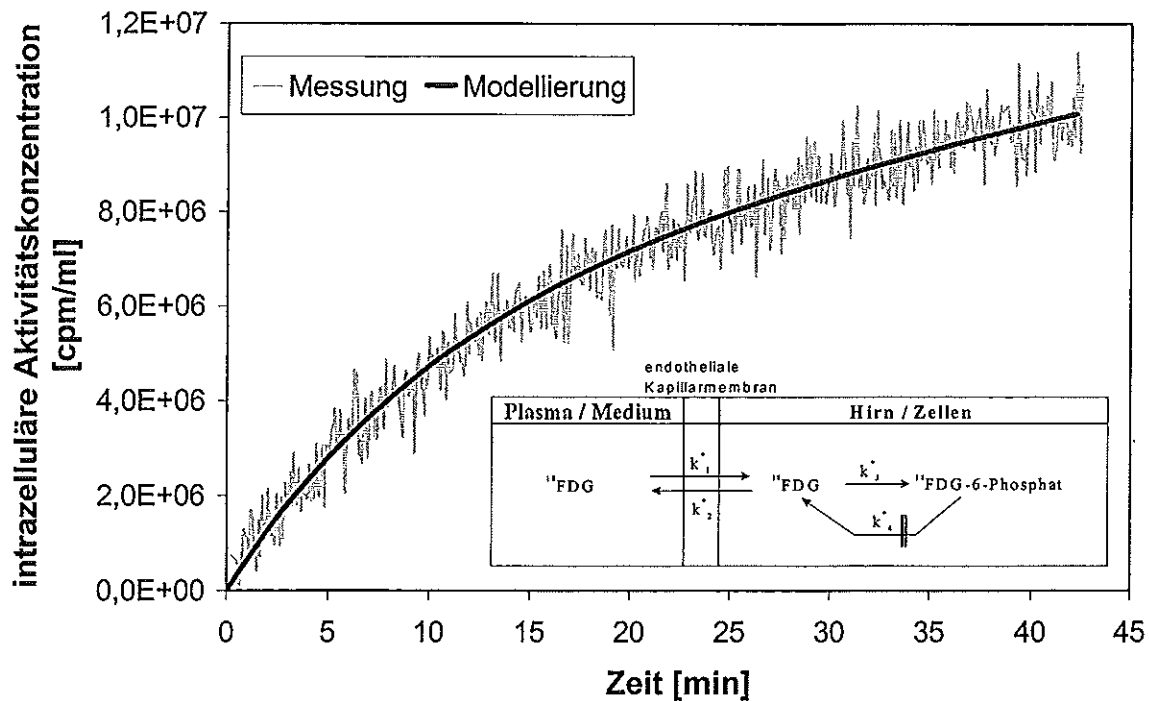


Abbildung 4-28: kinetische Modellierung der zellulären FDG-Aufnahme

Für die Geschwindigkeitskonstanten $k_1^* - k_3^*$ ergaben sich folgende Werte:

k_1^*	0,465 [min ⁻¹]
k_2^*	0,079 [min ⁻¹]
k_3^*	0,012 [min ⁻¹]

Tabelle 4-5: Geschwindigkeitskonstanten des zellulären Transports und Metabolismus von FDG

Die Geschwindigkeitskonstanten, die im Bereich der in klinischen Untersuchungen ermittelten Werte liegen (vgl. Tab. 2-3, S. 27), lassen unmittelbar zwei Schlüsse zu.

1. Der Transport ist schnell im Vergleich zur Phosphorylierung, was kinetisch als vorgelagertes Gleichgewicht mit Folgereaktion beschrieben werden kann.
2. Die deutlich höhere Konstante k_1^* im Vergleich zu k_2^* führt zu einer im Gleichgewicht ebenfalls deutlich erhöhten intrazellulären FDG-Konzentration. Ohne Folgereaktion würde

die intrazelluläre Anreicherung dem Quotienten der Transportgeschwindigkeitskonstanten k_1^* und k_2^* entsprechen. Durch die Folgereaktionen liegt das Verhältnis der intra- und extrazellulären FDG-Konzentration leicht darunter.

Mit Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten und dem kinetischen Modell des Transportes und der Phosphorylierung von FDG ist es möglich das intrazelluläre Aktivitätssummensignal (FDG + FDG-6-P) in die Einzelkonzentrationsverläufe aufzulösen und auf längere Zeiträume zu extrapolieren (Abb. 4-29).

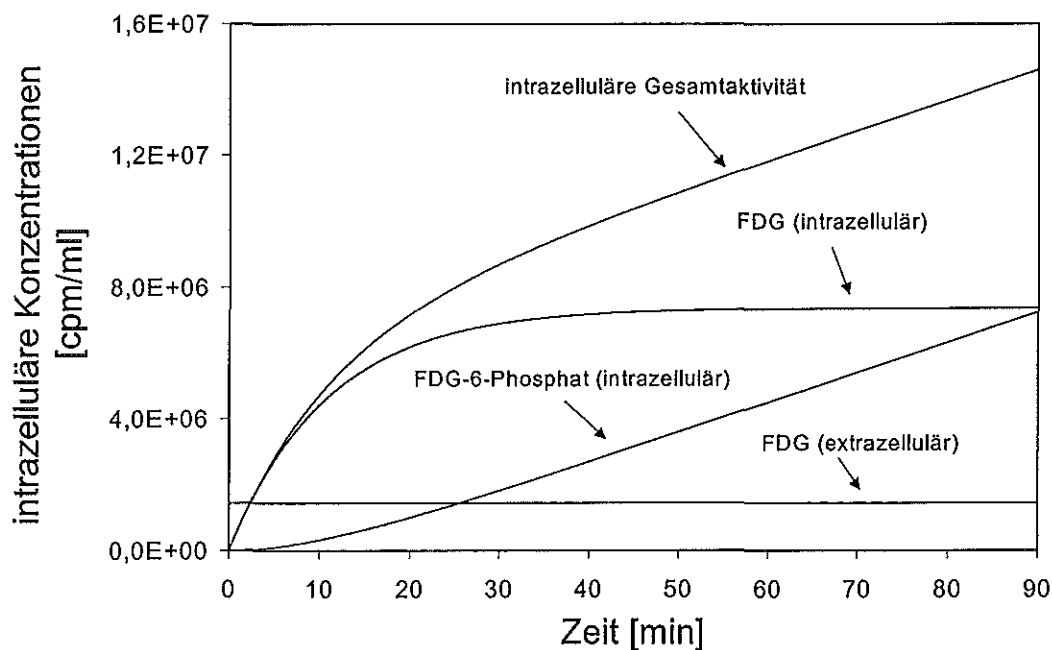


Abbildung 4-29: Modellierung der intrazellulären Konzentrationsverläufe

Während sich für die intrazelluläre FDG-Konzentration der postulierte Gleichgewichtswert einstellt, steigt die FDG-6-Phosphatkonzentration durch die ständige Nachlieferung von FDG aus dem Medium und die weitgehende Irreversibilität der Phosphorylierung linear an und übersteigt nach ca. 90 Minuten die intrazelluläre FDG-Konzentration. Die intrazelluläre Gleichgewichtskonzentration liegt um Faktor 5,1 über der extrazellulären Konzentration (Verhältnis der Transportkonstanten k_1^* und k_2^* beträgt 5,89).

Die zellspezifische Glukoseverbrauchsrate während des Versuchs wurde unter steady-state Bedingungen (stationäre Glukosekonzentration: 3,2 mM) bestimmt (Gleichung 24) und betrug $1,86 \pm 0,05 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}/\text{min}$.

$$q_{Glc} = \frac{V_l * (c_{ein} - c_{aus})}{X_{ges,Rkt} * \tau} \quad (24)$$

q_{Glc}	[mmol/10 ⁶ Zellen/min]	zellspezifische Glukoseverbrauchsrate
V_l	[ml]	Flüssigkeitsvolumen des Wirbelschichtreaktors
$c_{Glc,ein}$	[mM]	Glukosekonzentration im Frischmedium
$c_{Glc,aus}$	[mM]	Glukosekonzentration im Wirbelschichtreaktor
$X_{ges,Rkt}$	[10 ⁶]	Gesamtzellzahl im Reaktor
τ	[h]	Verweilzeit

Da Radiopharmazeutika, wie FDG im Rahmen solcher Transportuntersuchungen nur in Tracerkonzentrationen (in dieser Arbeit ~ 1,5 nM) zugegeben werden, ist die von den Zellen aufgenommene Substanzmenge ebenfalls außerordentlich gering. Um die Aufnahmeraten von FDG und Glukose vergleichen zu können, z.B. um die Lumped Konstante zu ermitteln, muß aus der Aktivitätsaufnahmerate diejenige FDG-Aufnahmerate berechnet werden, die sich ergeben würde, wenn FDG equimolar zu Glukose eingesetzt worden wäre. Dazu wird die eingesetzte Aktivitätskonzentration auf die gewünschte Stoffmengenkonzentration c_{soll} extrapoliert (in diesem Fall 3,2 mM), woraus sich die entsprechende spezifische Aktivität ergibt. c_{soll} entspricht dabei der Glukosekonzentration der jeweiligen Untersuchung (Gl. 25).

$$A_{sp} = \frac{c_{A,UL}}{c_{soll}} \quad (25)$$

A_{sp}	[cpm/mmol]	spezifische Aktivität
$c_{A,UL}$	[cpm/l]	Aktivitätskonzentration im Umlauf
c_{soll}	[mmol/l]	gewünschte FDG-Stoffmengenkonzentration

Die zellspezifische FDG-Aufnahmerate ergibt sich anschließend als Quotient der zellspezifischen Aktivitätsaufnahmerate und der spezifischen Aktivität (Gl. 26).

$$q_{FDG} = \frac{q_{Aktivität}}{A_{sp}} \quad (26)$$

q_{FDG}	[mmol/10 ⁶ Zellen/min]	zellspezifische FDG-Aufnahmerate
$q_{Aktivität}$	[cpm/10 ⁶ Zellen/min]	zellspezifische Aktivitätsaufnahmerate

Unter der Annahme einer extrapolierten FDG-Konzentration von 3,2 mM wurden als zellspezifische FDG-Aufnahmerate $2,12 \pm 0,06 \text{ nmol}/10^6 \text{ Zellen}/\text{min}$ ermittelt. Aus den berechneten Glukose- und der FDG-Aufnahmeraten ergab damit sich eine Lumped Konstante von $1,14 \pm 0,05$ (Gl. 27).

$$LC = \frac{q_{FDG}}{q_{Gik}} \quad (27)$$

LC [-] Lumped Konstante

Der Zeitpunkt der Ermittlung der zellspezifischen FDG-Aufnahme ist von wesentlicher Bedeutung bei der Bestimmung der Lumped Konstanten, was im folgenden näher erläutert sei. Die Lumped Konstante beinhaltet als Proportionalitätsfaktor zwischen der zellulären Aufnahme und Metabolisierung von FDG und Glukose sowohl deren Unterschiede bezüglich des Transports als auch bezüglich der Phosphorylierung. Die in die Berechnung der Lumped Konstanten eingehende FDG-Aufnahmerate ergibt sich dabei als Steigung der intrazellulären Gesamtaktivitätskurve in Abbildung 4-29. Wenige Minuten nach der Applikation von FDG ist die Aufnahmerate überwiegend transportbestimmt, erst mit steigender intrazellulärer FDG-Konzentration macht sich der Einfluß der Phosphorylierung auf den Anstieg der intrazellulären Gesamtaktivität bemerkbar (Veränderung der Kurvensteigung).

Analog zur Bestimmung der Glukoseverbrauchsrate, die unter steady-state Bedingungen durchgeführt wird (s.o.), muß zur Ermittlung der FDG-Aufnahmerate die Einstellung der intrazellulären FDG-Gleichgewichtskonzentration abgewartet werden, was in dieser Untersuchung nach ungefähr 40 Minuten der Fall war.

4.7.2 Einfluß der Glukosekonzentration im Medium auf die FDG-Aufnahme

2-[^{18}F]Fluor-2-Deoxyglukose konkurriert als molekulares Analogon sowohl in Bezug auf den Transport als auch bei der Phosphorylierung mit Glukose. Abhängig vom Glukosegehalt des Mediums ergibt sich somit eine unterschiedlich starke kompetitive Inhibierung der FDG-Aufnahme. Die theoretischen Hintergründe wurden in Kapitel 2.4.1 bereits dargestellt.

Von erheblicher Bedeutung ist diese Glukosekonzentrationsabhängigkeit der FDG-Aufnahme in der nuklearmedizinischen Diagnostik. Dies gilt insbesondere für die Ermittlung von Glukoseverbrauchsrate in Organen oder Geweben bei Patientenuntersuchungen. Die direkte Bestimmung des Glukoseverbrauchs anhand von Blutproben ist in der Regel nicht oder nur

stark fehlerbehaftet möglich, da eine Probenentnahme direkt vor und hinter dem untersuchten Organ oder Gewebe vorgenommen werden müßte. Eine Alternative bietet der Einsatz von [^{11}C] markierter Glukose ergänzend zu FDG. [^{11}C] markierte Glukose ist ebenfalls positronenemissionstomographisch detektierbar, verhält sich stoffwechselphysiologisch wie sein unmarkiertes Analogon und ermöglicht so die gezielte Bestimmung regiospezifischer Glukoseverbrauchsraten (Reivich 1985). Diese Methode ist aus zwei Gründen jedoch nicht weit verbreitet. Zum einen steigt durch die Doppeltracermethode die Strahlenbelastung für den Patienten erheblich an, und zum anderen sind [^{11}C] markierte Radiotracer aufgrund der kurzen Halbwertszeit ($t_{1/2} = 20,4 \text{ min}$) nur über kurze Distanzen transportierbar.

Im Regelfall wird deshalb nur die regiospezifische FDG-Aufnahme mittels PET bestimmt und daraus die Glukoseverbrauchsrate unter Verwendung einer a priori angenommenen Lumped Konstanten berechnet. Die Annahme einer fehlerhaften Lumped Konstanten führt aber unweigerlich zu entsprechend falschen Werten für den regiospezifischen Glukosemetabolismus (vgl. Gleichung 25) - eine erhebliche Einschränkung der medizinischen Diagnostik.

Daraus folgt ein großer Informationsbedarf bezüglich der zellspezifischen Lumped Konstanten in unterschiedlichen Organen oder Geweben sowie der sie beeinflussenden Parameter. Dazu zählt z.B. die Abhängigkeit vom Plasmaglukoselevel, der patientenspezifisch deutlich variieren kann. Durch intensive Forschung sind diesbezügliche Erkenntnisse im Tiermodell weit fortgeschritten (Lear et al. 1989, Mori et al. 1989, Sokoloff et al. 1977, Suda et al. 1990), während entsprechenden Untersuchungen am Menschen enge ethisch-moralische Grenzen gesetzt sind, so daß hier erheblich weniger Erkenntnisse vorliegen (Langen 1993). Der Wirbelschichtreaktor bietet die Möglichkeit, solche Untersuchungen an humanen Zellen in gewebeähnlichen Zelldichten unter physiologischen Bedingungen durchzuführen.

Zur Evaluierung des Einflusses der Glukosekonzentration im Medium auf die Lumped Konstante wurden Transportuntersuchungen, wie in Kapitel 4.7.1 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden sieben verschiedene stationäre Zustände (durch Einstellung unterschiedlicher Verweilzeiten) eingestellt und jeweils die Lumped Konstante ermittelt. Die untersuchten Glukosekonzentrationen wurden dabei so gewählt, daß sie sich um den humanphysiologischen Normalwert von ca. 5 mM verteilten. In allen Untersuchungen betrug die eingesetzte FDG-Konzentration 3 $\mu\text{Ci/ml}$.

Da zu Kontrollzwecken bei jeder Untersuchung eine Vielzahl von Trägerproben entnommen wurde, konnten nur drei Transportuntersuchungen pro Fermentation durchgeführt werden, so daß die Ergebnisse aus drei Fermentationen resultieren. Die erreichten Zelldichten variierten zwischen $1,05 \cdot 10^8$ und $1,2 \cdot 10^8$ Zellen/g Träger, während die Glukosekonzentrationen im Reaktor zwischen 2,7 und 12,3 mM lagen.

Tabelle 4-6 faßt die gemessenen Glukose- und FDG-Aufnahmeraten sowie die daraus ermittelten Lumped Konstanten in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Umlauf zusammen.

Glukosekonzentration [mM]	Glukoseaufnahme [nmol/10 ⁶ Zellen/min]	FDG-Aufnahme [nmol/10 ⁶ Zellen/min]	Lumped Konstante
2,7	1,91	2,33 +/- 0,02	1,22 +/- 0,01
3,2	1,86	2,12 +/- 0,09	1,14 +/- 0,05
4,0	2,02	1,72 +/- 0,2	0,85 +/- 0,1
6,0	2,48	1,94 +/- 0,23	0,79 +/- 0,01
7,1	2,67	1,76 +/- 0,16	0,66 +/- 0,06
10,5	2,47	1,81 +/- 0,25	0,73 +/- 0,1
12,3	2,39	1,63 +/- 0,1	0,68 +/- 0,04

Tabelle 4-6: Zellspezifische Glukose- und FDG-Aufnahmeraten sowie Lumped Konstanten in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Reaktor (Werte +/- s.d.; n=3)

Die zellspezifische Glukoseaufnahmerate steigt mit zunehmender Medienglukosekonzentration signifikant an, ein in der Säugerzellkultur häufig beschriebenes Phänomen (Glacken et al. 1986, Kurokawa et al. 1993, Miller et al. 1989), das aus der nahezu unregelmäßigen Glukoseaufnahme durch erleichterte Diffusion resultiert (Renner et al. 1972, Sumbilla et al. 1981). Die zellspezifische FDG-Aufnahme verhält sich dagegen invers und steigt mit sinkender Glukosekonzentration deutlich an, was aus den unterschiedlichen Affinitäten von FDG und Glukose bezüglich zellulärem Transport und Phosphorylierung folgt. FDG zeigt eine höhere Affinität als Glukose für den Carrier des transmembranen Transports, was aber nicht zwangsläufig zu einer verstärkten intrazellulären Akkumulation führt, da der Rücktransport aus der Zelle heraus ebenfalls beschleunigt abläuft (Hasselbalch et al. 1996). Erst mit der Umsetzung zu nicht membrangängigem FDG- bzw. Glukose-6-Phosphat kommt es zur Anreicherung in der Zelle.

Die für die Phosphorylierung verantwortliche Hexokinase zeigt eine erheblich höhere Affinität für Glukose im Vergleich zum fluormarkierten Analogon, was zu einer kompetitiven Inhibie-

rung der FDG-Phosphorylierung führt (Schuier, 1990). Mit sinkender Glukosekonzentration im Medium und damit abnehmender Inhibierung steigen die FDG-Phosphorylierungsrate und nachfolgend die intrazelluläre Radioaktivitätskonzentration an. Aus letzterer wird die zellspezifische FDG-Aufnahmerate berechnet. Der Begriff Radioaktivitätskonzentration muß korrekterweise verwendet werden, da mittels γ -Detektion nicht zwischen FDG und FDG-6-Phosphat unterschieden werden kann und nur die intrazelluläre Gesamtaktivität bestimmt wird.

Abbildung 4-30 zeigt die aus dem Verhältnis der FDG- und der Glukoseaufnahmeraten berechneten Lumped Konstanten in Abhängigkeit von der Medienglukosekonzentration. Da entsprechende Vergleichsdaten aus klinischen Untersuchungen an Patienten nach aktuellem Kenntnisstand nur punktuell und nicht über einen größeren Glukosekonzentrationsbereich vorliegen, sind zum Vergleich die Ergebnisse von *in vivo* Untersuchungen am gesunden Rattenhirn mit 2-[^{14}C]-2-Deoxyglukose aufgetragen. Die unterschiedlichen Plasmaglukosekonzentrationen der Tiere in dieser Studie wurden durch mehrtägiges Hungern oder durch intravenöse Insulin- bzw. Glukoseinjektion erzeugt.

Die *in vitro* im Wirbelschichtreaktor ermittelte Abhängigkeit der Lumped Konstanten stimmt gut mit den *in vivo* Daten überein. Für Glukosekonzentrationen im normo- bzw. hyperglykämischen Bereich ($>5\text{ mM}$) werden nahezu konstante Werte für die Lumped Konstante erhalten, während im hypoglykämischen Bereich ($<5\text{ mM}$) ein starker Anstieg mit sinkender Glukosekonzentration zu beobachten ist.

Dies steht im Einklang mit der gängigen Theorie der Existenz zweier Grenzfälle (Crane et al. 1983). Für extrem niedrige Glukosekonzentrationen wird die FDG-Aufnahme durch den transmembranen Transport dominiert, da die kompetitive Inhibierung der FDG-Phosphorylierung durch Glukose aufgrund der niedrigen Konzentrationen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Lumped Konstante wird sich deshalb in diesem Fall dem Verhältnis der Transportkoeffizienten annähern (Bevorzugung von FDG $\rightarrow$ Lumped Konstante > 1). Dagegen wird bei hohen Glukosekonzentrationen die Hexokinase zum bestimmenden Faktor (kompetitive Inhibierung der FDG-Phosphorylierung durch Glukose), weshalb hier das Verhältnis der Phosphorylierungskoeffizienten die Grenze für die Lumped Konstante darstellt (Bevorzugung von Glukose $\rightarrow$ Lumped Konstante < 1).

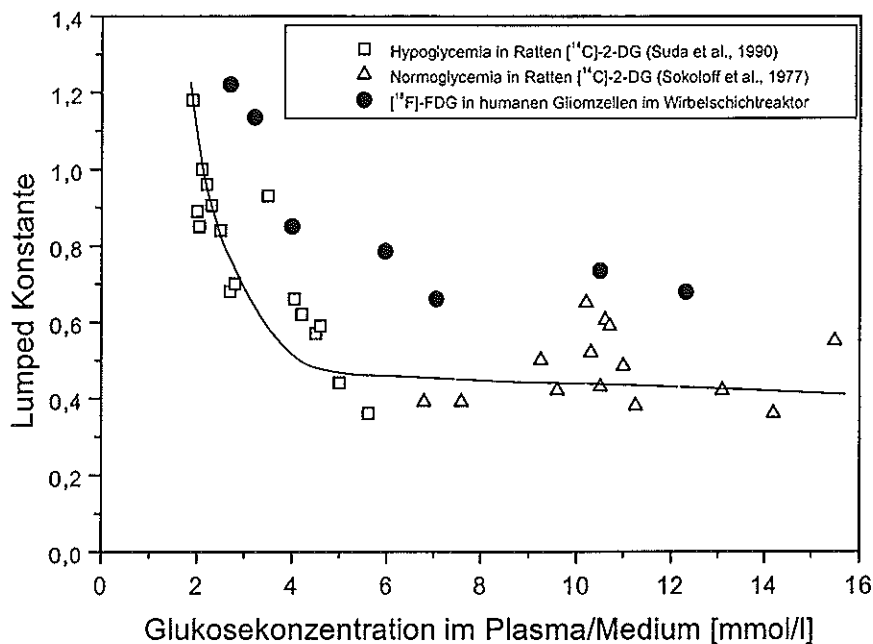


Abbildung 4-30: Glukoseabhängigkeit der Lumped Konstanten für FDG in humanen Gliomzellen im Vergleich zu entsprechenden Untersuchungen am gesunden Rattenhirn

Die gemessenen Absolutwerte der Lumped Konstanten in humanen Gliomzellen sind im Vergleich zum gesunden Rattenhirn signifikant erhöht - eine Beobachtung, die ebenfalls in verschiedenen *in vivo* Untersuchungen an Gliomen in Ratten und an Patienten gemacht wurde (Kapoor et al. 1989, Spence et al. 1990, Suda et al. 1990). Die im Rahmen dieser Studien bestimmten Lumped Konstanten für Tumore lagen meist deutlich über denen für gesundes Hirngewebe, für das Werte zwischen 0,42 und 0,52 beschrieben wurden (Phelps et al. 1979, Reivich et al. 1985), wobei aber starke patientenspezifische Schwankungen beobachtet wurden. So beschreiben Spence et al. (1998) in einer klinischen Studie an 40 Patienten mit supratentorialen Gliomen Lumped Konstanten zwischen 0,72 und 3,1. Es werden allerdings keine Angaben über die Plasmaglukosekonzentrationen der Patienten gemacht.

Die Ursache für die Erhöhung der Lumped Konstanten in Tumorzellen ist deren erhöhte Glukosetransporter- und Hexokinaseaktivität (Rempel et al. 1994, Waki et al. 1998, Yamamoto et al. 1990). Insbesondere letztere führt zu einer Erhöhung der Lumped Konstanten, da die kompetitive Inhibierung der FDG-Phosphorylierung durch Glukose abgeschwächt wird. Darüber hinaus existieren Hinweise, daß die Selektivität der Hexokinase, die zu einer deutlichen Bevorzugung von Glukose gegenüber FDG führt, in Tumorzellen verringert ist. Das Verhält-

nis der Geschwindigkeitskonstanten der Phosphorylierung k_3^*/k_3 ist in Gliomen signifikant erhöht. Kapoor et al. (1989) fanden in Untersuchungen an Ratten Werte zwischen 0,52 und 0,69 gegenüber 0,32 im gesunden Hirn.

4.7.3 Zusammenfassung

Die durchgeführten Transportuntersuchungen mit dem etablierten Radiotracer 2-[^{18}F]Fluor-2-Deoxyglucose (FDG) an humanen Gliomzellen im Wirbelschichtreaktor verfolgten zwei Ziele, zum einen den Funktionsnachweis, daß die on-line Meßtechnik die intrazelluläre Radiotraceraufnahme wiedergibt, und zum anderen einen Vergleich der erzielten Ergebnisse mit vorliegenden *in vivo* Daten aus Tierversuchen und klinischen Studien. Insbesondere der letztgenannte Gesichtspunkt diente zur Beurteilung der Eignung des entwickelten Konzeptes als *in vitro* Modell.

Zur Überprüfung des erstgenannten Aspektes wurden ein Wirbelschichtreaktor mit immobilisierten humanen Gliomzellen im steady-state mit einer FDG-Sprungfunktion (Endkonzentration 3 $\mu\text{Ci/ml}$) beaufschlagt und die intrazelluläre Radiotracerakkumulation sowohl on-line mittels γ -Detektoren als auch off-line durch sequentiell entnommene Träger- und Umlaufproben bestimmt. Die dabei erzielte gute Übereinstimmung der Ergebnisse kann als Beleg dafür gelten, daß die entwickelte Meßtechnik zur on-line Verfolgung der zellulären Radiotraceraufnahme geeignet ist, zumal der Verlauf der Aktivitätsakkumulation der allgemein akzeptierten Theorie bezüglich Aufnahme und Metabolisierung von FDG in Säugerzellen entspricht. Die kinetische Modellierung ergab Geschwindigkeitskonstanten für den Transport und die Phosphorylierung, die mit Ergebnissen aus klinischen Studien übereinstimmen. Die direkte Bestimmung der zellspezifischen Aufnahmerate aus dem on-line Signal ist aus den dargestellten Gründen jedoch nicht möglich, so daß während der Untersuchung die Entnahme einer Trägerprobe zur Kalibrierung des Signals erforderlich bleibt. Dies stellt im Vergleich zu den herkömmlichen Kultursystemen (Gewebekulturflaschen oder Leighton-Tubes) trotzdem einen enormen Fortschritt dar, da mit nur einer Probenahme kontinuierliche Daten für die zellspezifische Aufnahmerate vorliegen, während bisher trotz der gleichzeitigen Untersuchung an 20 oder mehr Kulturgefäßen nur sequentiell Werte bestimmt werden konnten. Die Vorteile der on-line Datenerfassung zeigen sich insbesondere bei der Untersuchung dynamischer Prozesse, wie der Aufnahme und Metabolisierung von Radiotracern. Die Bestimmung der zugrundeliegenden kinetischen Parameter gelingt im Vergleich zur sequentiellen Probenahme mit deutlich höherer analytischer Genauigkeit.

Der Nachweis der Eignung des Wirbelschichtreaktorsystems als *in vitro* Modell gelang zum einen durch die kinetische Modellierung der zellulären FDG-Aufnahme und zum anderen durch die Untersuchung der Glukoseabhängigkeit der Lumped Konstanten. Die im Rahmen der Modellierung ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für den Transport und die Phosphorylierung von FDG entsprachen Ergebnissen aus klinischen Untersuchungen.

Bei der Glukoseabhängigkeit der Lumped Konstanten handelt es sich, wie beschrieben, um einen Aspekt mit erheblicher Relevanz in der nuklearmedizinischen Diagnostik, zu dem aus Tiermodellen recht umfassende Vergleichsdaten vorliegen. Aus klinischen Studien an Patienten existieren dagegen Daten nur aus einem eng um den humanphysiologischen Normalwert begrenzten Glukosekonzentrationsbereich. Dies ist nachvollziehbar, da es sich aus medizinischen wie aus ethisch-moralischen Gründen verbietet, den Blutzuckergehalt von Patienten und Probanden zu Versuchszwecken durch Eingriffe extrem vom humanphysiologischen Normalwert abweichen zu lassen.

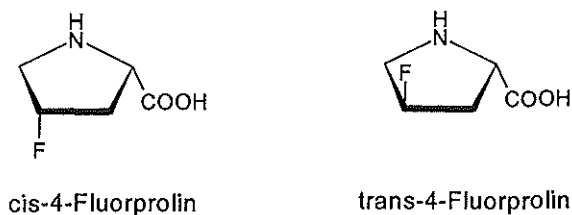
Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die im Wirbelschichtreaktor an immobilisierten humanen Gliomzellen bestimmte Abhängigkeit der Lumped Konstanten von der Medienglukosekonzentration vom grundsätzlichen Verlauf gut mit *in vivo* Daten aus dem gesunden Rattenhirn übereinstimmen. Für Glukosekonzentrationen im normo- bzw. hyperglykämischen Bereich (>5 mM) wurden nahezu konstante Werte für die Lumped Konstante erhalten, während im hypoglykämischen Bereich (<5 mM) ein starker Anstieg mit sinkender Glukosekonzentration zu beobachten war. Die ermittelten Absolutwerte der Lumped Konstanten korrelierten gut mit den vorliegenden klinischen Daten.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß für die in Abbildung 4-30 als Vergleichsdaten gezeigten *in vivo* Studien am Tiermodell insgesamt 29 Ratten eingesetzt wurden. Daß analoge Ergebnisse auch durch Untersuchungen im Wirbelschichtreaktor erhalten werden konnten, deutet das Potential dieser Technik an, einen Beitrag zur Reduktion von Tierversuchen zu leisten.

4.8 Untersuchung zur Aufnahme der Diastereomere von 4- ^{18}F Fluorprolin

Neben Glukoseanaloge bilden markierte Aminosäureanaloge eine weitere sehr wichtige Klasse der metabolischen Radiotracer. Ihre Hauptanwendung liegt in der onkologischen Diagnostik, wobei je nach Art der Markierung unterschiedliche Detektionsverfahren (PET, SPECT) zum Einsatz kommen, und begründet sich durch den bei Tumorzellen deutlich gesteigerten Aminosäuretransport (Deehan 1993).

Zur Zeit befinden sich mit den fluoranalogen, diastereomeren Aminosäuren 4-cis- und 4-trans- ^{18}F Fluorprolin die ersten ^{18}F -markierten Aminosäuren für die Positronenemissionstomographie, die in großen Aktivitätsmengen synthetisiert werden können, in der Evaluierungsphase (vgl. Kap. 2.4.2). In ersten Untersuchungen an Zellkulturen in Gewebekulturflaschen zeigte sich, daß die Konfiguration der ^{18}F -Bindungsstelle einen erheblichen Einfluß auf den zellulären Transport hat. So wurde trans-4- ^{18}F Fluorprolin sowohl von Gliomzellen (86HG39) als auch von androgensensitiven und hormonresistenten Prostatakarzinomzellen besser aufgenommen als das cis-Diastereomer (Börner, 1998) - eine Beobachtung, die einen interessanten Ansatzpunkt für vergleichende Transportuntersuchungen im Wirbelschichtreaktor darstellt.



Dazu wurden analog zu den Arbeiten mit FDG (vgl. Kap. 4.7) ein Wirbelschichtreaktor mit humanen Gliomzellen im steady-state mit einer 4-cis- ^{18}F Fluorprolin-Sprungfunktion beaufschlagt und die intrazelluläre Radiotracerakkumulation on-line gemessen. Einige Tage später erfolgte die Transportuntersuchung mit dem trans-Diastereomer am identischen System nach dem gleichen Protokoll. Zur Kalibrierung auf die zellspezifische Radiotraceraufnahme sowie zur Kontrolle der on-line Daten wurden mehrfach während der Untersuchungen Träger- und Umlaufproben entnommen. Die Radiotracerkonzentration im Umlauf wurde, wie bei den FDG-Transportuntersuchungen, durch entsprechende Supplementierung des Frischmediums konstant gehalten. Tabelle 4.7 faßt die experimentellen Parameter dieser Transportuntersuchungen zusammen.

Radiotracer	4-cis-[¹⁸ F]Fluorprolin	4-trans-[¹⁸ F]Fluorprolin
Zelllinie	86HG39	86HG39
Medium	IMDM mit 10% FCS	IMDM mit 10% FCS
Zelldichte	1,37 * 10 ⁸ Zellen / g Träger	1,44 * 10 ⁸ Zellen / g Träger
pO ₂	30 %	30 %
Umlaufvolumenstrom	77,5 ml / min	77,5 ml / min
Verweilzeit	12,8 h	12,8 h
Porosität	0,635	0,63
Dosierprofil	Sprungfunktion (Endkonzentration: 3 µCi/ml)	Sprungfunktion (Endkonzentration: 3 µCi/ml)
Datenerfassungstakt	5 s (integral)	5 s (integral)

Tabelle 4-7: Experimentelle Parameter der Transportuntersuchungen mit 4-cis- und 4-trans-[¹⁸F]Fluorprolin

Nach bisherigen Erkenntnissen aus vorklinischen und klinischen Studien wird Fluorprolin nicht verstoffwechselt. Da es in beiden Richtungen membrangängig ist, sollte dies zur Ausbildung einer intrazellulären Gleichgewichtskonzentration führen, die durch das Verhältnis der Transportkonstanten bestimmt wird. Dies wurde durch die Transportuntersuchungen bestätigt. Für trans-4-[¹⁸F]Fluorprolin wurde der Gleichgewichtswert deutlich schneller erreicht, was auf einen insgesamt schnelleren Transport im Vergleich zum cis-Diastereomer hindeutet. Dies wird aus dem direkten Vergleich der on-line Daten noch deutlicher. Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit wurde statt der on-line Daten der jeweilige gleitende Durchschnitt (8 Perioden) verwendet (Abb. 4-33).

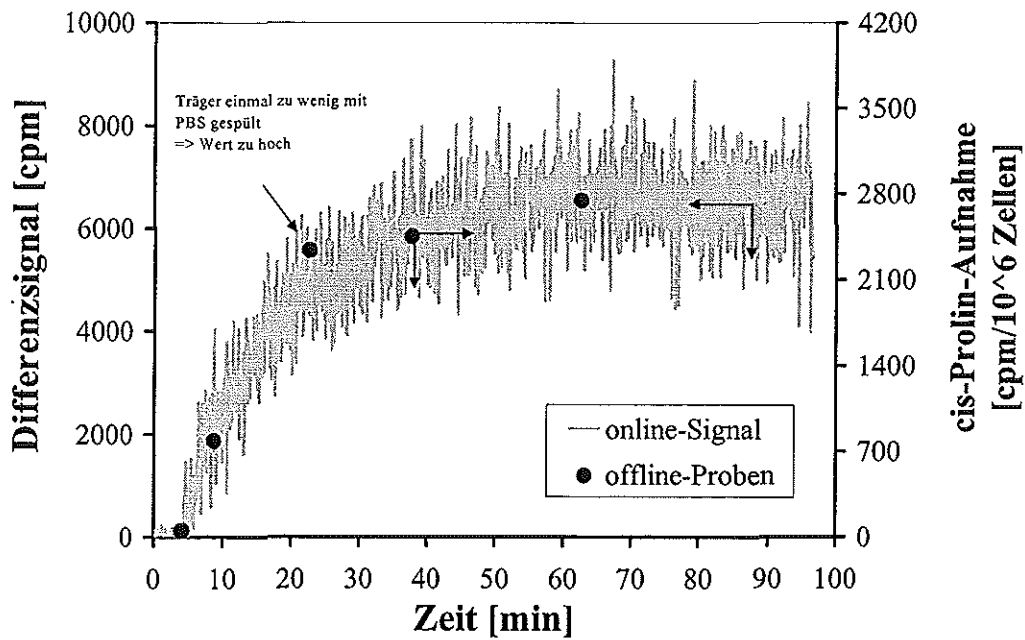


Abbildung 4-31: Transportuntersuchung mit cis-4-[^{18}F]Fluorprolin im Wirbelschichtreaktor

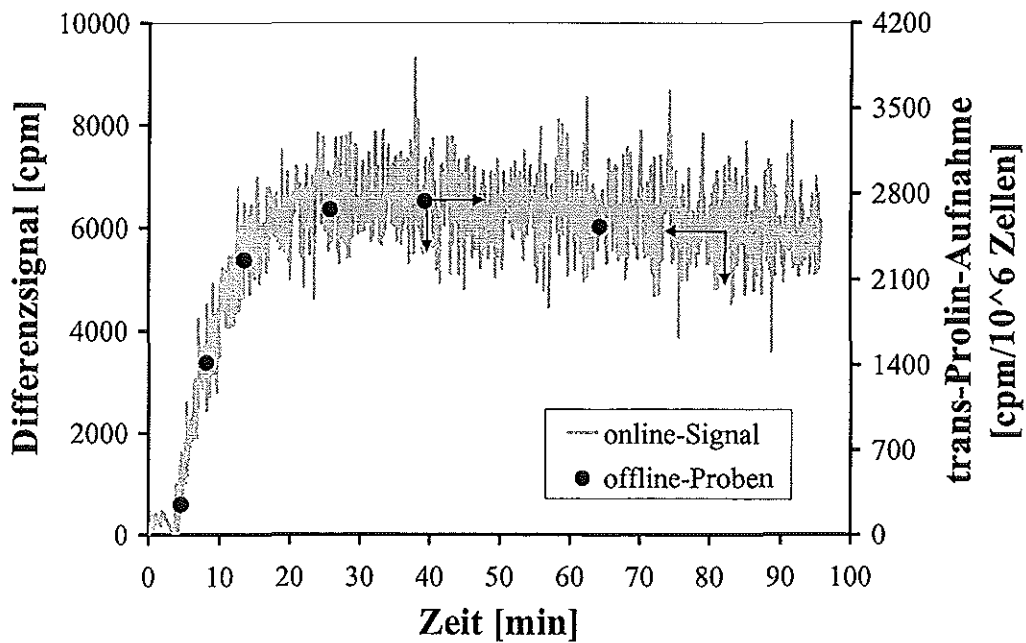


Abbildung 4-32: Transportuntersuchung mit trans-4-[^{18}F]Fluorprolin im Wirbelschichtreaktor

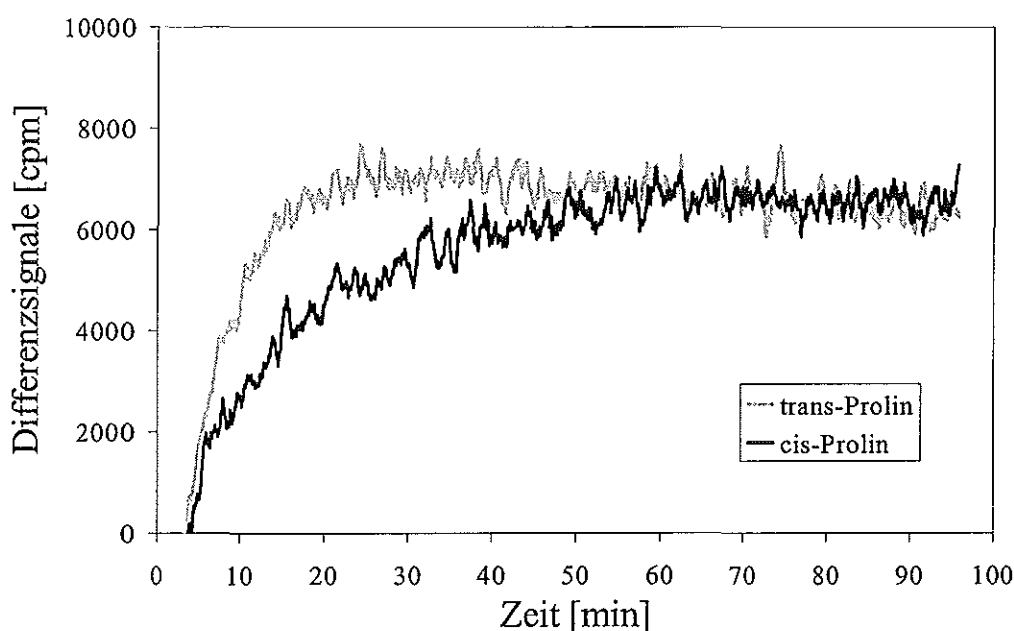


Abbildung 4-33: Vergleich der intrazellulären Aufnahme von cis- und trans-Fluorprolin

Die leichte Abnahme der intrazellulären trans-4- ^{18}F Fluorprolin-Konzentration im Verlauf der Untersuchung resultierte aus einer unzureichenden Supplementierung des Frischmediums mit dem Radiotracer, bedingt durch eine zu geringe zur Verfügung stehende Gesamtradioaktivitätsmenge. Dies führte durch Verdünnungseffekte zu einer Verringerung der Aktivitätskonzentration im Umlauf. Bei der Auswertung der Daten sowie der kinetischen Modellierung wurde dies jedoch berücksichtigt. In geringerem Ausmaß gilt dies auch für die Untersuchungen mit cis-4- ^{18}F Fluorprolin.

Aus Abbildung 4-33 bestätigt sich die höhere Transportgeschwindigkeit für trans-4- ^{18}F Fluorprolin im Vergleich zum cis-konfigurierten Analogon durch die schnellere intrazelluläre Anreicherung. Die maximale intrazelluläre Radiotracerkonzentration wird für trans-Fluorprolin bereits nach knapp 30 Minuten erreicht, für cis-Fluorprolin erst nach einer Stunde. Die Gleichgewichtskonzentration ist für beide Diastereomere jedoch identisch, so daß eine generell höhere intrazelluläre Anreicherung der trans-konfigurierten Aminosäure nicht bestätigt werden konnte. Dies ist vielmehr eine Frage des Meßzeitpunktes, da bei Verwendung von trans-4- ^{18}F Fluorprolin bereits schneller nach der Applikation des Radiotracers eine signifikante Akkumulation zu detektieren ist.

Durch kinetische Modellierung der zellulären Fluorprolinaufnahme unter Verwendung des in Kapitel 2.4.2 beschriebenen Modells (Gl. 11) kann die höhere Transportgeschwindigkeit

quantifiziert werden. Die Berechnungen wurden analog zu den Untersuchungen mit FDG durchgeführt.

$$c_b(t) = \frac{k_1^* \cdot c_p}{k_2^*} \cdot \left(1 - e^{-k_2^* \cdot t}\right) \quad (11)$$

k_1^*	[min ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante des Fluorprolintransportes Medium → Zytoplasma
k_2^*	[min ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstante des Fluorprolintransportes Zytoplasma → Medium
c_p	[mmol/l]	Fluorprolin-Konzentration im Medium
c_b	[mmol/l]	Fluorprolin-Konzentration in der Zelle

Die Abbildungen 4-34 und 4-35 zeigen die ausgehend von Gleichung 11 modellierte Fluorprolinaufnahme sowie die experimentellen Daten für beide untersuchten Diastereomere. Ebenfalls eingezeichnet ist der Verlauf der intrazellulären Aktivitätskonzentrationen, der sich unter der Voraussetzung einer konstanten Umlaufkonzentration ergeben hätte.

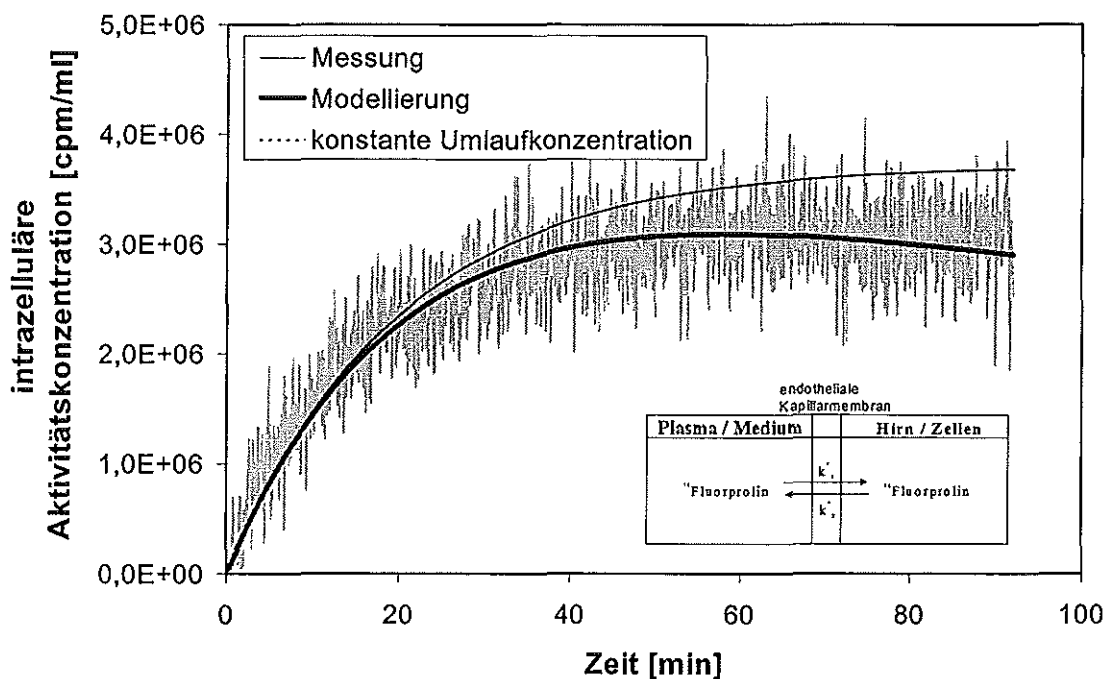


Abbildung 4-34: Kinetische Modellierung der zellulären cis-Fluorprolin-Aufnahme

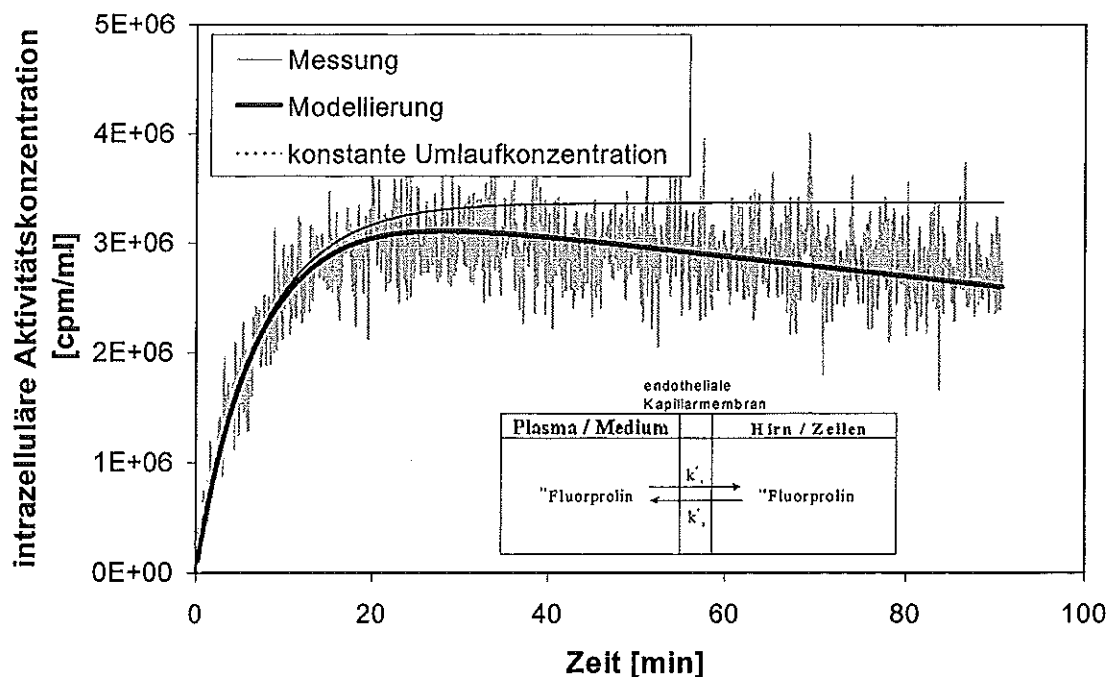


Abbildung 4-35: Kinetische Modellierung der zellulären trans-Fluorprolin-Aufnahme

Aus der kinetischen Modellierung ergibt sich eine etwa dreifach höhere Transportgeschwindigkeit für trans-4-[^{18}F]Fluorprolin im Vergleich zum cis-Diastereomer (Tab. 4-8).

	$k^*_1 [\text{min}^{-1}]$	$k^*_2 [\text{min}^{-1}]$
cis-4-[^{18}F]Fluorprolin	0,057	0,05
trans-4-[^{18}F]Fluorprolin	0,17	0,14

Tabelle 4-8: Geschwindigkeitskonstanten des zellulären Transports von [^{18}F]Fluorprolin

Bei der vergleichenden Betrachtung der Transportuntersuchungen mit 2-[^{18}F]Fluor-2-Deoxyglukose (FDG) und Fluorprolin, die unter identischen experimentellen Randbedingungen durchgeführt wurden, zeigt sich für die Aminosäure eine geringere zelluläre Radiotracer-aufnahmegeschwindigkeit. Dies resultiert aus dem im Vergleich zum Glukosestoffwechsel ebenfalls geringeren Aminosäuremetabolismus der Zellen. Im Unterschied zu FDG zeigen die beiden Diastereomere von Fluorprolin keine signifikante intrazelluläre Aktivitätsanreicherung.

lung (k_1^* und k_2^* annähernd gleich groß). Dies bestätigt erste Tierversuche an Ratten in denen im Gehirn nur eine sehr schwache Tracerakkumulation beobachtet wurde (s. S. 29).

Da das Meßrauschen aber unabhängig von der zellulären Aufnahme ausschließlich von der eingesetzten Radiotracerkonzentration und der Meßanordnung (z.B. Art und Positionierung der γ -Detektoren) bestimmt wird, resultiert für Transportuntersuchungen mit Aminosäureanaloga durch die geringere intrazelluläre Aufnahme ein im Vergleich zu markierten Glukosederivaten schlechteres Signal-zu-Rauschen-Verhältnis. Es konnte aber gezeigt werden, daß die erzielte Sensitivität trotzdem zur genauen on-line Bestimmung des zellulären Radiotracertransports ausreicht.

Die durchgeführten Transportuntersuchungen mit Fluorprolin haben für künftige vorklinische und klinische Studien eine erhebliche Bedeutung, geben sie doch wichtige Hinweise für das Zeitschema bei der Durchführung sequentieller *in vivo* Messungen (z.B. PET), was im folgenden näher erläutert werden soll.

In den Abbildungen 4-31 und 4-32 erscheinen die intrazellulären Radioaktivitätskonzentrationen nach Erreichen des Transportgleichgewichtes in die Zelle hinein bzw. aus der Zelle heraus nur deshalb konstant, weil der radioaktive Zerfall aus Gründen der Vergleichbarkeit zwischen on-line und off-line ermittelten Daten mathematisch eliminiert wurde (vgl. Kap. 4.7.1). Ohne diese Operation ergibt sich für die intrazelluläre Radioaktivität eine Maximumfunktion, da der intrazellulären Anreicherung durch den Transport der Zerfall des [^{18}F] entgegenwirkt (Abb. 4-36).

Die höchste Empfindlichkeit in sequentiellen *in vivo* Messungen wird naturgemäß zum Zeitpunkt der höchsten intrazellulären Radioaktivitätskonzentration und damit am Maximum der Anreicherungsfunktion erzielt. Die Ermittlung dieses Zeitpunktes im Rahmen von Transportuntersuchungen stellt somit einen wichtigen Aspekt bei der Vorbereitung von *in vivo* Untersuchungsprotokollen dar.

Im Falle der untersuchten Diastereomere des 4-Fluorprolin unterscheiden sich diese Zeitpunkte erheblich. Während das Anreicherungsmaximum für das trans-Isomer bereits nach 23 Minuten erreicht wurde, dauerte dies für das cis-Isomer mit 40 Minuten fast doppelt so lange.

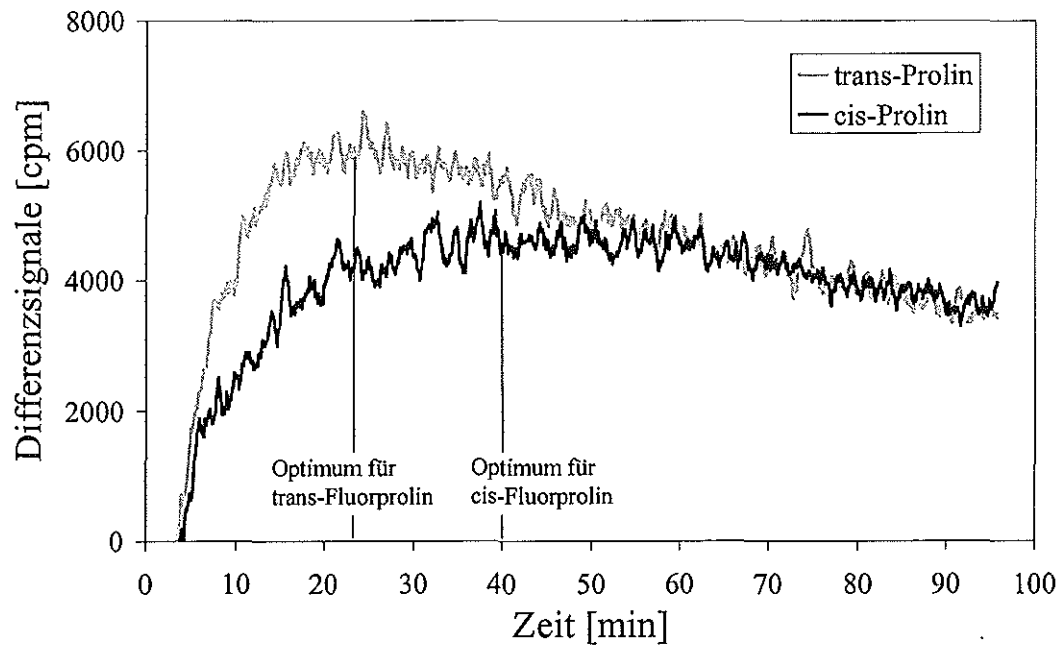


Abbildung 4-36: Vergleich der intrazellulären Aufnahme von cis- und trans-Fluorprolin ohne Korrektur des radioaktiven Zerfalls

5 Diskussion

Die in Kapitel 4 beschriebenen Untersuchungen und Ergebnisse wurden bereits größtenteils im Rahmen ihrer Darstellung interpretiert. Deshalb soll an dieser Stelle eine Bewertung des entwickelten Gesamtkonzeptes vor dem Hintergrund der in Kapitel 2.2.3 genannten Anforderungen an *in vitro* Systeme erfolgen.

I. Exakte, vielfältig einstellbare experimentelle Rahmenbedingungen

Der Wirbelschichtreaktor erlaubt die präzise Einstellung aller relevanten Versuchsparameter. Der pH-Wert, der pO_2 , die Temperatur oder die Medienosmolarität können ebenso an die experimentellen Vorgaben angepaßt werden wie die Konzentrationen aller Medienbestandteile. Darüber hinaus kann der Umlaufvolumenstrom über einen weiten Bereich variiert werden, um so den Blutvolumenstrom des jeweiligen Referenzorganismus zu simulieren.

So ist auch die Einstellung von im Tierversuch nicht realisierbaren Versuchsbedingungen möglich, wobei die Grenzen der experimentellen Möglichkeiten durch die Toleranz der jeweils verwendeten Zellen bestimmt werden.

Das System eignet sich zur Kultivierung eines weiten Spektrums unterschiedlicher Zellen, was die Einsatzmöglichkeiten dieses Reaktorkonzeptes ebenfalls erweitert. Zu den bereits erfolgreich kultivierten Zellen zählen Hybridoma, CHO und BHK ebenso wie humane Gliomzellen oder Primärmaterial wie Hepatozyten aus der Schweineleber oder stromale Zellen aus humanem Knochenmark (Schröder 1996, Thömmes 1994, Zeng 1997).

II. Zellkultivierung unter physiologischen in vivo Bedingungen

Die möglichst exakte Mimikrierung der physiologischen *in vivo* Verhältnisse zählt zu den wichtigsten, aber auch zu den schwierigsten Aufgaben bei der Entwicklung eines *in vitro* Systems. Die dreidimensionale Zellkultivierung, immobilisiert auf Mikroträgern, stellt dabei einen deutlichen Fortschritt im Vergleich zu den herkömmlich verwendeten Monolayerkulturen dar. Sie ermöglicht einen gewebeähnlichen Zell-Zell-Kontakt unter scherarmen Bedingungen im Fließgleichgewicht, was den physiologischen Verhältnissen schon sehr nahe kommt.

Trotzdem existieren noch eine Reihe von Limitierungen. Die erzielten Zelldichten liegen mit $1\text{--}2 \cdot 10^8$ Zellen/ml zwar noch um den Faktor 5-10 unter denen im Gewebe, dies stellt aber eine Verbesserung gegenüber der bisher üblichen Monolayerkultur um Faktor 500 dar! Eine gezielte, ausbalancierte Kokultivierung unterschiedlicher Zelltypen, wie sie für viele Gewebe charakteristisch ist, ist gegenwärtig noch nicht möglich. Die Untersuchung nicht nur der Wirkung unveränderter Pharmaka, sondern auch ihrer Metabolite ließe sich dagegen durch In-

tegration einer Perfusionskammer mit Mikrosomen aus Säugetierlebern realisieren (vgl. AMES-Test, S. 11).

III. Möglichkeit zur jederzeitigen Probenahme, idealerweise on-line Analytik

Der Wirbelschichtreaktor ermöglicht die jederzeitige Entnahme von Umlaufproben und Trägern mit immobilisierten Zellen, auch während eines laufenden Versuchs. Die immobilisierten Zellen können enzymatisch unbeschädigt vom Träger abgelöst werden und stehen für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Mit der entwickelten on-line Analytik erfolgt eine simultane Erfassung der Radioaktivität im Umlauf und im Wirbelbett und somit der zellulären Anreicherung. Zur Kalibrierung auf die zellspezifischen Aufnahmezeiten ist jedoch die Entnahme einer Trägerprobe zwingend erforderlich. Diese kann allerdings zu einem beliebigen Zeitpunkt des Experimentes erfolgen.

IV. Simulation von Wirkstoffkonzentrationsverläufen

Die Wirkstoffdosierung kann über einen in den Umlauf integrierten Zugang entsprechend den experimentellen Anforderungen flexibel gestaltet werden. Ein Dirac-Impuls über eine Spritze ist ebenso möglich wie eine Sprungfunktion mittels einer Austauschpumpe oder ein genau definierter Profilverlauf unter Verwendung eines Perfusors. In allen Fällen wird gewährleistet, daß sich die Zusammensetzung des im Reaktor zirkulierenden Mediums durch die Zudosierung des Radiotracers nicht signifikant verändert, um die steady state Bedingungen aufrecht zu erhalten.

V. Einfache Handhabung und geringe Kosten

Im Vergleich zu den Einwegartikeln Gewebekulturflaschen und Leighton-Tubes sind die Anschaffungskosten für den Wirbelschichtreaktor sowie für die notwendige Peripherie (Pumpen, Elektroden, Meßverstärker, γ -Detektoren, etc.) zweifellos deutlich höher. Dafür bietet der Reaktor, neben den oben dargestellten, erheblich verbesserten experimentellen Möglichkeiten, deutliche Vorteile in der Handhabung. So ist die Durchführung von Transportuntersuchungen mit Radiopharmaka deutlich weniger arbeitsintensiv. Mit nur einer Probenahme kann die zellspezifische Radiotraceraufnahme lückenlos aufgezeichnet werden, während alternativ mindestens 20 Gewebekulturflaschen oder Leighton-Tubes untersucht werden müssen und trotzdem nur sequentiell Daten erhalten werden. Darüber hinaus wird durch die Möglichkeit zur weitgehenden Automatisierung die Radioaktivitätsexposition des Experimentators reduziert.

Da Radiopharmaka meist in pharmakologisch unwirksamen Konzentrationen eingesetzt werden, kann eine Beeinträchtigung der Zellen durch die Untersuchungen in der Regel ausgeschlossen werden. Im stationären Zustand des kontinuierlich betriebenen Wirbelschichtreaktors kann deshalb eine Vielzahl von Versuchen am unveränderten System durchgeführt werden, was im Satzreaktorbetrieb (z.B. Gewebekulturflasche) nicht möglich ist.

Die Zelldichte, die Gesamtzellzahl und damit auch die Substratverbräuche liegen im Wirbelschichtreaktor um Größenordnungen über den entsprechenden Werten in Gewebekulturflaschen oder Leighton-Tubes. Dies erlaubt die schnelle, einfache Bestimmung von Substratverbrauchsraten mit Hilfe automatischer Analysegeräte. Auf arbeitsintensive, langwierige Enzym-Assays mit vielen Pipettierschritten kann verzichtet werden.

6 Zusammenfassung

Bei der Evaluierung radioaktiv markierter Substanzen (Radiotracer) werden, wie bei der Entwicklung aller neuen Wirkstoffe und Diagnostika, vorbereitend und ergänzend zu vorklinischen Studien am Tiermodell *in vitro* Untersuchungen an Zellkulturen vorgenommen. Die Zahl der notwendigen Tierversuche wird dabei nicht zuletzt durch die Güte der verwendeten Zellkulturmodelle bestimmt. Hieraus ergibt sich ein erhebliches Potential zur Reduzierung von Tierversuchen, wenn es gelingt, *in vitro* Modelle zu entwickeln, die eine möglichst gute Simulation der *in vivo* Verhältnisse ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines neuen *in vitro* Modells zur Evaluierung von Radiotracern an Zellkulturen. Dazu wurde, ausgehend von einem in der Säugerzellkultur verwendeten Wirbelschichtreaktor, eine Fließbettechnik mit on-line Datenerfassung konzipiert und charakterisiert. Nach Auswahl einer humanen Tumorzelllinie als relevantem biologischem Modellsystem wurden Transportuntersuchungen sowohl mit einem etablierten als auch mit einem in der Entwicklung befindlichen Radiotracer durchgeführt, um anhand der erhaltenen Ergebnisse eine Beurteilung der Leistungsfähigkeit und des prognostischen Potentials als *in vitro* Modell vorzunehmen.

Die wichtigsten Resultate der vorliegenden Arbeit können den folgenden Bereichen zugeordnet werden:

Entwicklung und Charakterisierung des Reaktorkonzeptes

- Es wurde eine Fließbettechnik entwickelt, die die Vorteile des zu Produktionsfermentationen verwendeten Wirbelschichtreaktors (kontinuierliche Kultivierung gewebeähnlicher Zelldichten unter physiologischen Bedingungen im Fließgleichgewicht) mit einer Möglichkeit zur flexiblen Gestaltung von Wirkstoffkonzentrationsverläufen verbindet.
- Eine on-line Analytik (zwei γ -Detektoren mit entsprechender Kollimation) ermöglicht die gleichzeitige Erfassung der Radiotracerkonzentrationen im Umlauf und im Wirbelbett und damit Aussagen über die zelluläre Aufnahme.
- Es wurde eine Methode unter Verwendung von [^{18}F]Fluorid entwickelt, die die Bestimmung des Flüssigkeitsanteils in Wirbel- und Festbetten mit und ohne immobilisierte Zellen erlaubt.
- Unter Verwendung dieser Methode wurde nachgewiesen, daß die Wirbelbetthöhe keinen Einfluß auf den Flüssigkeitsanteil im Wirbelbett besitzt.

Auswahl und Charakterisierung eines geeigneten biologischen Modells

- Drei humane Gliomzelllinien wurden unter Berücksichtigung der Aspekte Wachstumsgeschwindigkeit, maximale Zelldichte, Stärke der Adhärenz sowie Neigung zur Ausbildung von Zellaggregaten charakterisiert. Die Zelllinie 86HG39 wurde dabei als am besten geeignetes biologisches Modell ausgewählt und für alle weiteren Untersuchungen eingesetzt..
- Es wurde eine enzymatische Methode etabliert, die eine vollständige Ablösung immobilisierter Zellen vom Träger ohne Beschädigung der Zellen ermöglicht.
- Das im Rahmen der Probenbehandlung notwendige Spülen von Trägern mit immobilisierten Zellen führte im Rahmen der Meßgenauigkeit zu keiner Abnahme der immobilisierten Zellzahl.
- Durch Zusatz von Hydroxyharnstoff oder Aphidicolin zum Kulturmedium gelang eine partielle Zellzyklussynchronisation, die jedoch nicht zur Durchführung phasenspezifischer Transportuntersuchungen ausreicht.

Durchführung von Transportuntersuchungen mit Radiotracern

- Die Eignung der entwickelten Meßtechnik zur on-line Verfolgung der intrazellulären Radiotraceraufnahme konnte durch Transportuntersuchungen mit 2-[¹⁸F]Fluor-2-Deoxyglukose (FDG) im Wirbelschichtreaktor mit immobilisierten humanen Gliomzellen und durch den Vergleich der on-line Ergebnisse mit sequentiell entnommenen Proben belegt werden.
- Die ermittelten Geschwindigkeitskonstanten für den transmembranen Transport und die Metabolisierung von FDG korrelieren mit den Ergebnissen klinischer Untersuchungen.
- Die im Wirbelschichtreaktor ermittelte Abhängigkeit der Lumped Konstanten für FDG von der Medienglukosekonzentration steht im Einklang mit der allgemein akzeptierten Theorie und entspricht vorliegenden Ergebnissen aus Untersuchungen am Tiermodell. Für Glukosekonzentrationen im normo- bzw hyperglykämischen Bereich (>5 mM) werden nahezu konstante Werte für die Lumped Konstante erhalten, während im hypoglykämischen Bereich (<5 mM) ein starker Anstieg mit sinkender Glukosekonzentration zu beobachten ist.
- Die im Rahmen dieser Untersuchungen bestimmten Absolutwerte der Lumped Konstanten für FDG stimmen mit Daten aus klinischen Studien überein.

- Bei Transportuntersuchungen der beiden Diastereomere des 4-[¹⁸F]Fluorprolin konnte für die trans-konfigurierte Aminosäure eine deutlich schnellere intrazelluläre Anreicherung ermittelt werden als für das cis-Isomer. Die Geschwindigkeitskonstante für den transmembranen Transport ist für trans-4-[¹⁸F]Fluorprolin dreimal so groß wie der entsprechende Wert für das cis-Diastereomer. Diese Erkenntnis unterstützt erste Ergebnisse aus vorklinischen Studien.
- Aus dem Verlauf der zellulären Radioaktivitätsakkumulation konnten wichtige Hinweise für die Planung zukünftiger *in vivo* Untersuchungen mit 4-Fluorprolin gewonnen werden.

Zusammenfassend läßt sich konstatieren, daß das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Fließbettssystem die Möglichkeiten bisheriger *in vitro* Modelle zur Evaluierung von Radiotracer verbessert und erweitert. Dies gilt insbesondere für die Aspekte:

1. Exakte, vielfältig einstellbare experimentelle Rahmenbedingungen
2. Dreidimensionale Zellkultivierung mit gewebeähnlichen Zelldichten unter physiologischen Bedingungen im Fließgleichgewicht
3. On-line Analytik zur Bestimmung der intrazellulären Radiotracerakkumulation
4. Simulation von *in vivo* Wirkstoffkonzentrationsverläufen

Durch die gute Übereinstimmung der erzielten Untersuchungsergebnisse mit vorliegenden Erkenntnissen aus vorklinischen und klinischen Studien kann der entwickelten Fließbetttechnik zudem ein prognostisches Potential bei der Evaluierung neuer Radiotracer zugebilligt werden. Langfristig könnte dies, eine allgemeine Akzeptanz dieser Technik vorausgesetzt, einen Beitrag zur Reduzierung der Zahl von Tierversuchen bei der Wirkstoff- und Diagnostikaevaluierung leisten.

Mit den dargestellten Ergebnissen können die Orientierungs- und die Evaluierungsphase im Rahmen der *in vitro* Systementwicklung (vgl. Kap. 2.2.2) als weitgehend abgeschlossen gelten. In den folgenden Arbeiten muß deshalb die Standardisierung des Systems als Vorbereitung auf die Validierungsphase im Mittelpunkt stehen (s. Kapitel 7).

7 Ausblick

Der Wert einer neuen Methode definiert sich nicht zuletzt durch die Akzeptanz, die ihr, insbesondere von den potentiellen Anwendern, entgegengebracht wird. Dies gilt für *in vitro* Modelle noch in erheblich stärkerem Maße als für Produktionsverfahren, kann doch die Qualität des ‚Produktes‘ selten analytisch exakt erfaßt, sondern nur durch vergleichende Validierungsstudien einer großen Zahl von Laboratorien belegt werden.

Vor diesem Hintergrund bietet die hier vorgelegte Arbeit eine Reihe von Ansatzpunkten zur Fortführung und Erweiterung, wobei zwei Aspekten besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte. Dies sind zum einen die verfahrenstechnische Optimierung des vorgestellten Reaktorkonzeptes und zum anderen die Evaluierung weiterer Einsatzmöglichkeiten. Damit sollen die Bedingungen für die breite Anwendung des vorgestellten Modells geschaffen werden, die Voraussetzung für seine Validierung ist und es zu einer echten Alternativmethode werden lassen könnte.

Verfahrenstechnische Optimierung des Reaktorkonzeptes

- Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Fließbettssystem leitet sich von einem zu Produktionsfermentationen eingesetzten Wirbelschichtreaktor ab. Die damit verbundene Reaktorgröße war für die Modellentwicklung unerlässlich, da nur so die für den Funktionsnachweis notwendige Entnahme einer großen Zahl von Träger- und Umlaufproben gewährleistet war. Für den breiten Einsatz als *in vitro* Modell erscheint aber eine Miniaturisierung unerlässlich. Sie erleichtert die Parallelisierung, eine für das Screening oft gestellte Forderung, und trägt zur Kostenreduzierung (für Anschaffung und Betrieb) bei. Darüber hinaus wird der Bedarf an Zellen für das Inokulum verringert, was insbesondere bei Verwendung von Primärmaterial relevant ist.
- Das Meßrauschen wird durch die eingesetzte Radioaktivitätskonzentration und die Detektorkonfiguration (Detektoranordnung und Art der Kollimation) bestimmt und ist unabhängig von der Größe der zellulären Anreicherung. Für Radiotracer mit geringer intrazellulärer Akkumulation führt dies zu einem schlechteren Signal-zu-Rauschen-Verhältnis und damit zu eingeschränkter Aussagekraft der Ergebnisse. Durch Optimierung der Detektorkonfiguration (z.B. Verwendung von Ringdetektoren) sollten sich diesbezüglich Verbesserungen erzielen lassen.

Erweiterung des Anwendungsspektrums

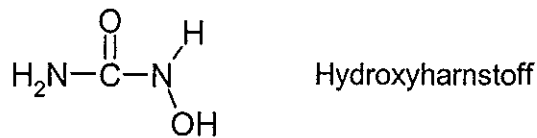
- In Erweiterung der bisher durchgeführten Transportuntersuchungen mit markierten Aminosäureanaloga kann durch selektive chemische Blockierung einzelner zellulärer Carriersysteme der jeweilige Anteil am Gesamttransport untersucht und quantifiziert werden.
- Eine an den klinischen Alltag angelehnte Anwendung könnte die postoperative Bestimmung der Lumped Konstanten für primäre humane Tumorzellen unter den patientenspezifischen physiologischen Bedingungen zur Revalidierung präoperativer PET-Messungen darstellen.
- Vor dem Hintergrund der wachsenden Zahl von Patienten mit degenerativen Hirnerkrankungen (z.B. Alzheimer, Parkinson) bilden zerebrale Rezeptorstudien einen zentralen Gegenstand in der aktuellen Hirnforschung. Die entsprechenden Untersuchungen werden bisher an postmortalen Hirnschnitten realisiert. Hier bietet die vorgestellte Technik eine Alternative insbesondere bei der Durchführung von Bindungsstudien.
- Das vorgestellte Konzept ist nicht auf die Evaluierung von Radiotracer beschränkt. Vielmehr können bereits etablierte und charakterisierte Radiotracer auch als Hilfsmittel bei der pharmakologischen Prüfung neuer Wirkstoffe eingesetzt werden. Als Beispiel sei der Einfluß von potentiellen Zytostatika auf die Glukoseaufnahme von Tumorzellen genannt. 2-[^{18}F]Fluor-2-Deoxyglukose (FDG) könnte dabei als on-line verfolgbares Maß für den zellulären Glukosetransport in Abhängigkeit von der Zytostatikumkonzentration dienen.

8 Anhang

8.1 Untersuchungen zur Zellzyklussynchronisation von 86HG39

8.1.1 Versuche mit Hydroxyharnstoff

Hydroxyharnstoff hemmt die Ribonukleosiddiphosphat-Reduktase und blockiert so den Übergang von der G₁ in die S-Phase (Fox, 1987). Als Zytostatikum (Handelsname Litalir®) wird es zur Behandlung von Melanomen, chronischer myeloischer Leukämie, Polyzythämie und anderer neoplastischer Erkrankungen eingesetzt.



Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde Hydroxyharnstoff in Konzentrationen von 2; 4; 6 und 8 mM dem Medium zugesetzt.

Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Einwirkzeit

Vierundfünfzig Gewebekulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm²) wurden jeweils mit 1*10⁵ vitalen Zellen in 8 ml Medium inokuliert und 70 h im Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Anschließend wurden das Medium gegen 8 ml Frischmedium mit Hydroxyharnstoff (2-8 mM) ausgetauscht und die Zellen 30 h weiterkultiviert.

Nach dem Wechsel auf hydroxyharnstoffhaltiges Medium dauert es rund eine Verdopplungszeit (ca. 24 h), bis eine vollständige Arretierung am Restriktionspunkt erzielt werden kann, da Zellen, die kurz vor dem Einbringen des Blockers den Restriktionspunkt überschritten haben, den kompletten Zellzyklus einmal durchlaufen müssen. Vorselektierte Zellen (z.B. durch mitotic shake-off), die gerade die Mitose beendet haben, müssen bis zum Erreichen des Restriktionspunktes lediglich die G₁-Phase durchlaufen. Daraus resultiert eine deutlich kürzere notwendige Inkubationszeit und nachfolgend eine niedrigere akute Toxizität.

Unmittelbar vor dem Medienwechsel sowie stündlich ab einer Einwirkzeit von 18 h wurden für jede untersuchte Konzentration die Zellen einer Gewebekulturflasche enzymatisch abgelöst, fixiert, gefärbt und die Zellzyklusverteilung bestimmt. Die Abbildung 8-1 zeigt den Verlauf der einzelnen Zellzyklusphasenanteile in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des Hydroxyharnstoffes. Exemplarisch werden nur die Ergebnisse mit der niedrigsten (2 mM) und der höchsten (8 mM) verwendeten Konzentration dargestellt.

Für alle untersuchten Konzentrationen zeigte sich ein identischer Verlauf. Durch die Einwirkung des Hydroxyharnstoffes erhöhte sich der Anteil der G₁-Phase von 50% auf rund 78%, während sich der Anteil der S-Phase von 41% auf 22% reduzierte. Zellen in der G₂/M-Phase waren im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht mehr detektierbar. Diese Populationsverteilung stellte sich bereits nach einer Einwirkzeit von 18 Stunden ein und änderte sich in den folgenden 12 Stunden nicht mehr.

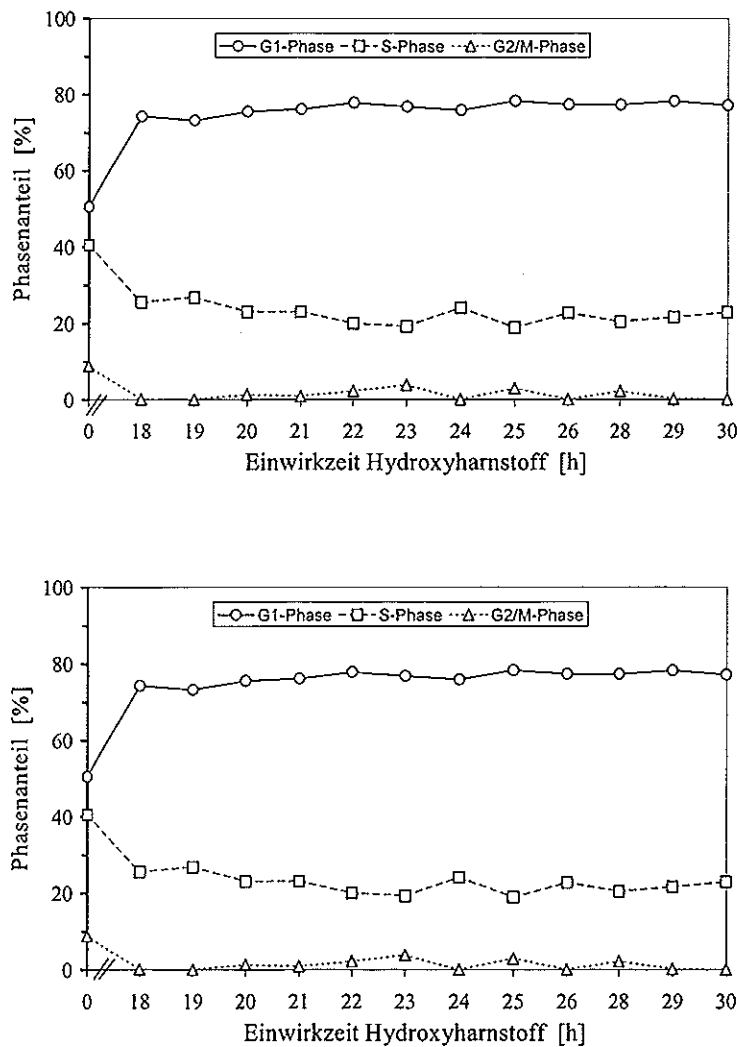


Abbildung 8-1: Phasenverteilung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit (Konzentration Hydroxyharnstoff: 2 mM (oben) und 8 mM (unten))

Eine vollständige Synchronisation am Restriktionspunkt des Zellzyklus wurde nicht erreicht. Dies deutet auf eine Zellschädigung insbesondere in der S-Phase hin, die dazu führte, daß ein erheblicher Anteil dieser Zellen in der S-Phase verblieb und den Zellzyklus nicht weiter

durchlaufen konnte. Es kann davon ausgegangen werden, daß diese Zellen in erheblichem Maße geschädigt und nicht mehr proliferationsfähig sind, was im folgenden genauer untersucht wurde.

Ähnliche Beobachtungen wurden mit CHO 10B2 Zellen gemacht (Fox, 1987). Eine zweistündige Einwirkung von 2 mM Hydroxyharnstoff führte bei 80% der Zellen in der S-Phase zu einer letalen Schädigung.

Die stark erhöhte Empfindlichkeit von S-Phasenzellen resultiert aus der Wirkungsweise der Arretierungsreagenzien, die wie beschrieben selektiv die DNA-Synthese verhindern. Zellen in der G₁ bzw. G₂/M-Phase werden davon nicht berührt, wohingegen es bei Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Inhibitorzugabe in der Phase der DNA-Replikation befinden, zu irreparablen Schäden beim Aufbau der DNA kommt.

Deutliche Auswirkungen hat die Arretierung am Restriktionspunkt auf die relative Zellgröße und die relative Granularität (Abb. 8-2). So erhöht sich die durchschnittliche Zellgröße, flow-cytometrisch bestimmt durch den von den Zellen verursachten Schatten (forward scatter), im Vergleich zur unbehandelten Population um 50%. Gleiches gilt für die Zellgranularität, die durch das zelluläre Streulicht (sideward scatter) im Flow Cytometer ermittelt wird.

Dieses Phänomen hat seine Ursache in der Arretierung der überwiegenden Mehrheit der Zellen am Restriktionspunkt. Die G₁-Phase ist gekennzeichnet durch eine hohe Proteinsyntheseleistung, um die nach der Mitose 'ausgedünnten' Zellpools wieder aufzufüllen. Durch die Synthese zellulärer Makromoleküle nimmt sowohl die Zellgröße als auch die Granularität der Zellen deutlich zu. Die Zunahme von Zellgröße und Granularität endet, sobald alle proliferationsfähigen Zellen den Restriktionspunkt erreicht haben. Auf diesem Weg kann die Mindestinkubationszeit für die jeweilige Konzentration bestimmt werden. Dies war für 2 mM Hydroxyharnstoff nach 24 Stunden der Fall, bei einer Konzentration von 8 mM zwei Stunden früher.

Aus dem Gesichtspunkt der möglichst vollständigen Synchronisation der Zellpopulation ergaben sich somit folgende Mindestinkubationszeiten (Tab. 8-1).

Konzentration Hydroxyharnstoff [mM]	2	4	6	8
Mindesteinwirkzeit [h]	24	23	22	22

Tabelle 8-1: Mindestinkubationszeiten zur maximalen Zellklusssynchronisation

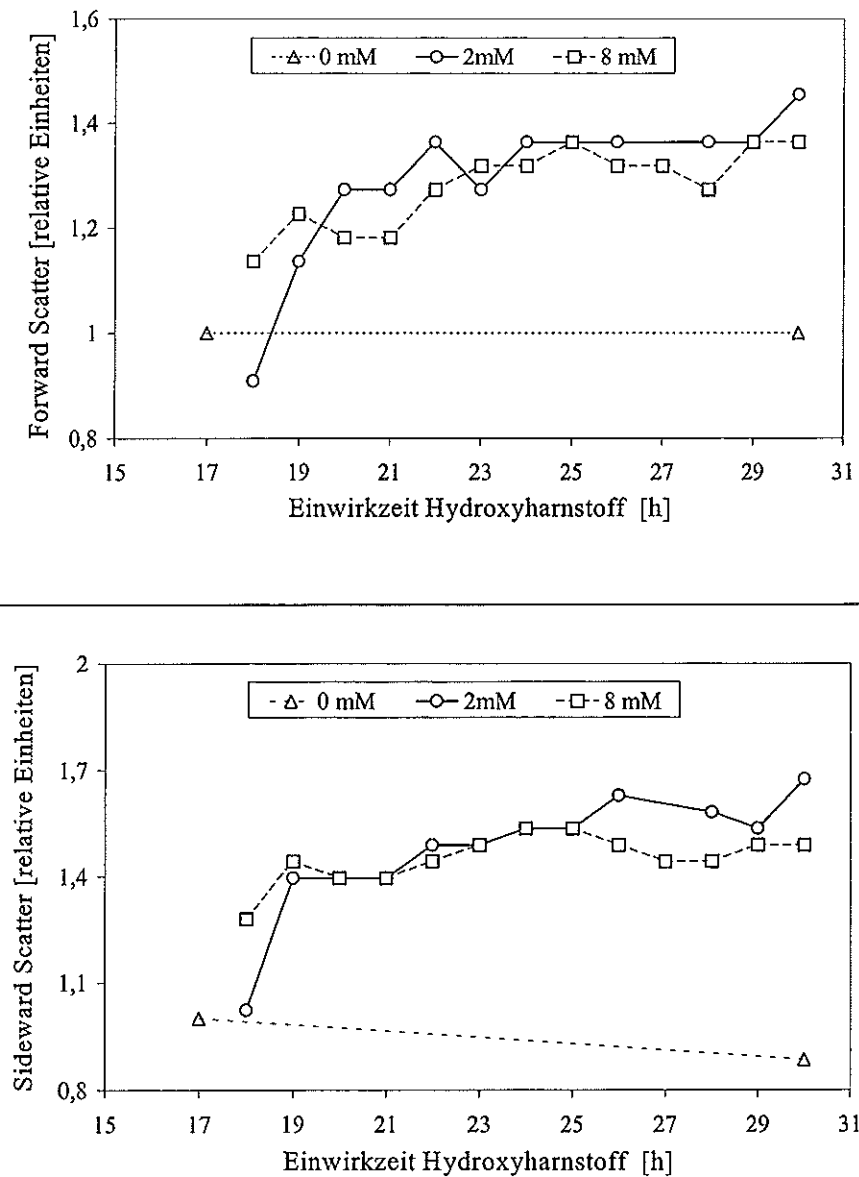


Abbildung 8-2: Relative Zellgröße (Forward Scatter) und Zellgranularität (Sideward Scatter) in Abhängigkeit von der Einwirkzeit

Vorversuch zur Beurteilung des zytotoxischen Potentials

Neben der für eine vollständige Synchronisation notwendigen Mindestinkubationszeit spielt der Gesichtspunkt der Toxizität eine entscheidende Rolle. Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Hydroxyharnstoff wurden nach einer Einwirkzeit von 22; 26 und 30 Stunden für alle untersuchten Konzentrationen (2 – 8 mM) jeweils $3,5 \cdot 10^5$ vitale Zellen in Gewebekulturflaschen mit 30 ml Frischmedium umgesetzt und damit die Arretierung aufgehoben. Die Vitalität wurde durch die in Kapitel 3.6.1 beschriebene Erythrosin B Ausschluß-

methode bestimmt. Diese Methode basiert ausschließlich auf der Membranintegrität der Zellen, erlaubt aber keine Aussage über die Proliferationsfähigkeit. Daher wurde erst nach einer Kulturdauer von 44 Stunden die vitale Zellzahl bestimmt.

Es werden wiederum exemplarisch nur die Ergebnisse der Untersuchungen mit 2 mM und 8 mM Hydroxyharnstoff dargestellt (Abb. 8-3).

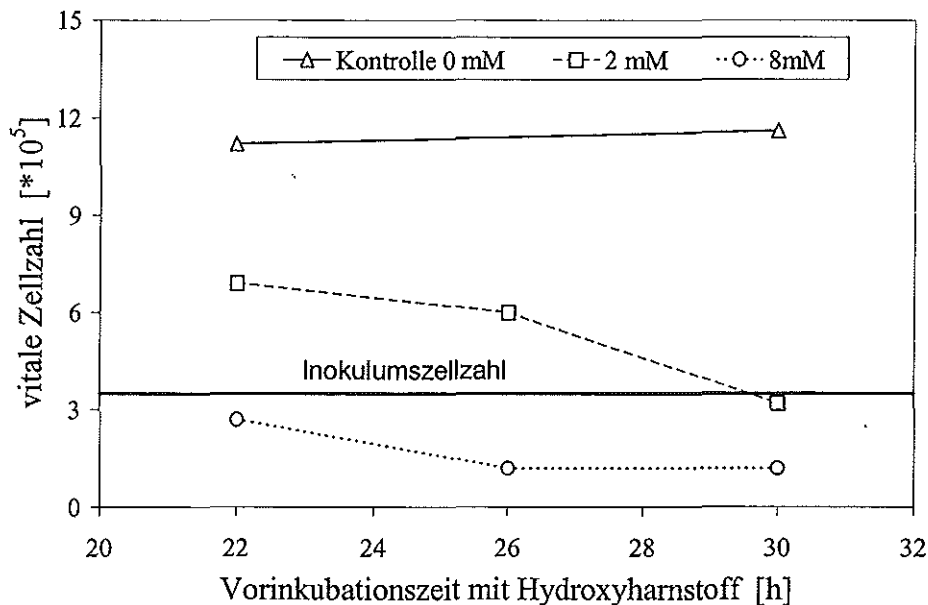


Abbildung 8-3: Toxizität in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit und der Hydroxyharnstoffkonzentration: vitale Zellzahlen nach 44 Stunden Weiterkultivierung in Frischmedium

Ein deutlicher Einfluß auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen war sowohl bezüglich der Konzentration als auch der Inkubationsdauer nachweisbar. Während sich die Zellzahl der Kontrollkultur (Vorinkubation mit Hydroxyharnstoff-freiem Medium) annähernd vervierfachte, was einer Verdopplungszeit von 25-26 Stunden und damit dem Normalwert für diese Zelllinie entsprach, war die Proliferation aller anderen Kulturen stark beeinträchtigt. Bei höheren Konzentrationen bzw. langen Einwirkzeiten war kein Zellwachstum mehr zu beobachten. In vielen Fällen starb sogar ein erheblicher Anteil der Kultur ab. Die Zellen waren in diesen Fällen zum Zeitpunkt des Umsetzens in frisches Kulturmedium also bereits letal vorgeschädigt. Tabelle 8-2 zeigt die Verdopplungszeiten in Abhängigkeit von der Hydroxyharnstoffkonzentration und der Einwirkzeit.

Aus den Toxizitätsuntersuchungen ergaben sich als Randbedingungen für Synchronisationsexperimente somit eine möglichst geringe Wirkstoffkonzentration sowie eine möglichst kurze Einwirkzeit.

Konzentration [mM]	Vorinkubationszeit [h]		
	22	26	30
0	26,2	n.b.	25,5
2	44,9	56,6	-
4	61,8	-	-
6	82,3	-	-
8	-	-	-

n.b. nicht bestimmt

- kein Zellwachstum

Tabelle 8-2: Verdopplungszeiten [h] nach Vorinkubation mit Hydroxyharnstoff

Synchronisationsexperiment in Gewebekulturflaschen

Auch wenn die Voruntersuchungen wenig Anlaß zu Optimismus gaben, eine in hohem Maße am Restriktionspunkt arretierte Zellpopulation zu erzeugen, die nach Aufhebung der Arretierung den Zellzyklus synchron durchläuft, wurde ein entsprechender Versuch unter Berücksichtigung der in den Voruntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse durchgeführt. Dazu wurden 10 Gewebekulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm²) jeweils mit $1 \cdot 10^5$ vitalen Zellen in 8 ml Medium inokuliert und 70 h im Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Anschließend wurde das Medium gegen 8 ml Frischmedium mit 2 mM Hydroxyharnstoff ausgetauscht und die Zellen weiterkultiviert, um eine Arretierung am Restriktionspunkt zu erreichen. Nach 22 h wurde die Arretierung aufgehoben, indem das hydroxyharnstoffhaltige Medium entfernt und, nach zweimaligem Waschen des Monolayers mit vorgewärmtem PBS, durch 8 ml Frischmedium ersetzt wurde. Stündlich wurden die Zellen einer Gewebekulturflasche abgelöst und die Zellzyklusverteilung bestimmt (Abb. 8-4). Zu Beginn entsprachen die gemessenen Werte den Ergebnissen aus den Vorversuchen. Knapp 80% der Zellen befanden sich in der G₁-Phase, während die restlichen gut 20% der Zellen in der S-Phase verblieben.

ben. Zellen in der G₂/M-Phase waren im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht detektierbar. Eine vollständige Synchronisation der Kultur am Restriktionspunkt wurde also nicht erzielt. In den ersten vier Stunden nach Aufhebung der Blockierung änderte sich die Phasenverteilung nicht signifikant. Danach zeigte sich eine deutliche Verschiebung zugunsten des S-Phasenanteils. Allerdings traten nicht alle in der G₁-Phase arretierten Zellen in die Synthesephase ein, was als Indiz für eine erhebliche Schädigung auch dieser Zellen gewertet werden kann. Die vierstündige Vorlaufzeit zwischen Aufhebung der Arretierung durch den Medienwechsel und dem Eintritt der Zellen in die S-Phase resultiert aus der zeitverzögerten intrazellulären Aufhebung der Arretierung, da die intrazelluläre Hydroxyharnstoffkonzentration erst allmählich auf eine unwirksame Konzentration verdünnt wird. In den folgenden Stunden stellte sich eine relativ konstante Phasenverteilung von ca. 52% S- und 48% G₁-Phase ein. Durch die fortschreitende Replikation der DNA verschob sich dabei das Maximum des S-Peaks in Richtung doppelter DNA-Gehalt (Tabelle 8-3).

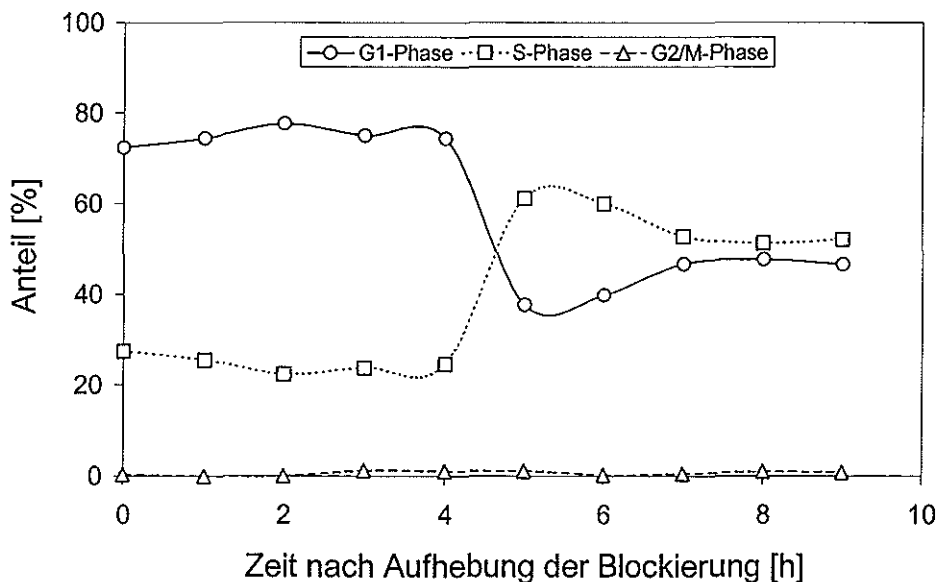


Abbildung 8-4: Synchronisationsexperiment nach 22 Stunden Vorinkubation mit Hydroxyharnstoff

Der scheinbar besonders hohe S-Phasenanteil nach fünf Stunden ist wahrscheinlich auf eine Schwäche der Auswertesoftware zurückzuführen. Kurz nach der Aufhebung der intrazellulären Arretierung lag der DNA-Gehalt der Zellen in der Synthesephase nur wenig über dem einfachen Satz, was zu einer Überlappung zwischen G₁- und S-Peak im Histogramm führt, die vom verwendeten Analyseprogramm nur stark fehlerbehaftet aufgelöst wurde.

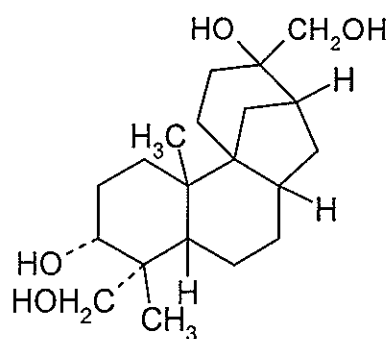
Zeit nach Aufhebung der Arretierung [h]	5	6	7	8	9
Relativer DNA-Gehalt der Zellen in der Synthesephase	1,28	1,39	1,45	1,55	1,67

Tabelle 8-3: Relativer DNA-Gehalt der Zellen in der Synthesephase (Peakmaximum) in Abhängigkeit von der Zeit nach Aufhebung der Blockierung mit Hydroxyharnstoff

Im Rahmen der Voruntersuchungen deutete sich bereits an, daß die während der Arretierung in der S-Phase verbliebenen Zellen erheblich geschädigt und nicht mehr in der Lage sind den Zellzyklus weiter zu durchlaufen. Dies konnte im Rahmen des Synchronisationsexperimentes belegt werden. Wären diese Zellen noch zur Proliferation fähig gewesen, so hätte nach Aufhebung der Arretierung ein Anstieg des G_2/M -Anteils detektierbar sein müssen. Dies war jedoch nicht der Fall.

8.1.2 Versuche mit Aphidicolin

Eine Alternative zum nachgewiesenermaßen zytotoxischen Hydroxyharnstoff stellt Aphidicolin dar, ein tetracyclisches Diterpen, das kompetitiv den dCMP-Einbau durch die DNA-Polymerase α hemmt und so den Übergang von der G_1 in die S-Phase blockiert (Ikegami et al. 1978, Pedrali-Noy et al. 1979, Ichikawa et al. 1980, Yagura et al. 1982).



Aphidicolin

Für Aphidicolin wird bei ähnlichen Synchronisationseigenschaften wie für Hydroxyharnstoff eine deutliche geringere Toxizität, insbesondere auf Zellen in der Synthesephase beschrieben (Fox, 1987).

Vorversuche zur Ermittlung der optimalen Einwirkzeit

Analog zu den Untersuchungen mit Hydroxyharnstoff wurden in Vorversuchen mit Aphidicolin die optimale Konzentration und Einwirkzeit zur Zellzyklussynchronisation bestimmt.

21 Gewebekulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm²) wurden jeweils mit $1 \cdot 10^5$ vitalen Zellen in 8 ml Medium inokuliert und 70 h im Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Anschließend wurden das Medium gegen 8 ml Frischmedium mit Aphidicolin (2 bzw. 4 µg/ml) ausgetauscht und die Zellen 25 h weiterkultiviert.

Unmittelbar vor dem Medienwechsel sowie stündlich ab einer Einwirkzeit von 18 h wurden die Zellen einer Gewebekulturflasche enzymatisch abgelöst, fixiert, gefärbt und die Zellzyklusverteilung bestimmt. Die Abbildung 8-5 zeigt den Verlauf der einzelnen Zellzyklusphasenanteile in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des Aphidicolins. Exemplarisch werden nur die Ergebnisse mit 2 µg/ml dargestellt.

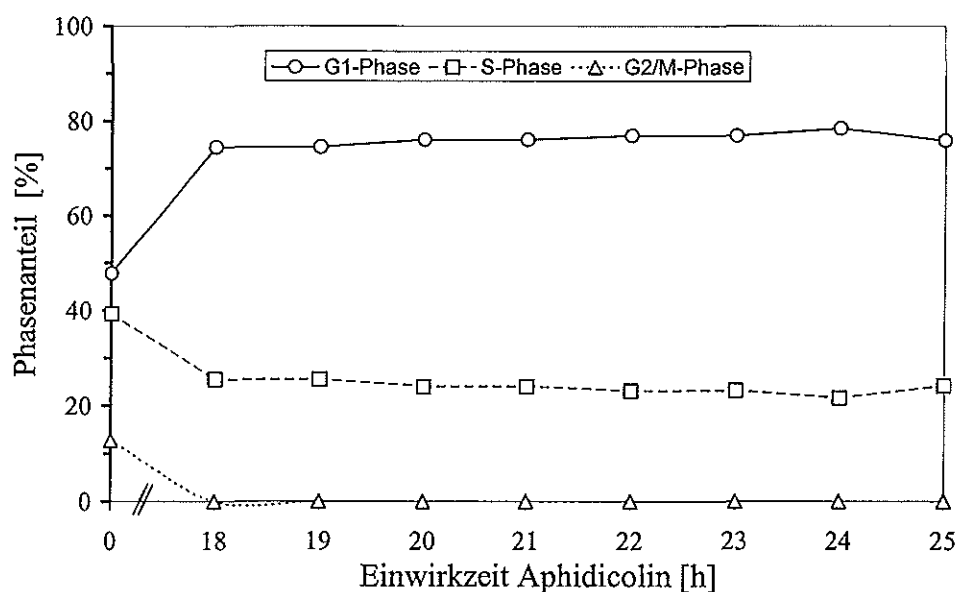


Abbildung 8-5: Vorversuch Aphidicolin (2 µg/ml): Phasenverteilung in Abhängigkeit von der Einwirkzeit

Für alle untersuchten Konzentrationen wurden ähnliche Ergebnisse wie unter Verwendung von Hydroxyharnstoff erhalten. Der Anteil der G₁-Phase erhöhte sich im Vergleich zur nicht-arretierten Kultur von 50% auf rund 78%, während sich der Anteil der S-Phase von 41% auf 22% reduzierte. Zellen in der G₂/M-Phase waren im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht mehr detektierbar. Eine vollständige Synchronisation am Restriktionspunkt des Zellzyklus wurde

jedoch auch mit Aphidicolin nicht erreicht. Diese Populationsverteilung stellte sich bereits nach einer Einwirkzeit von 18 Stunden ein und änderte sich in den folgenden 7 Stunden nicht mehr.

Vorversuch zur Beurteilung des zytotoxischen Potentials

Um zu beurteilen, ob die zytotoxische Wirkung von Aphidicolin auch für die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte humane Gliomzelllinie geringer ist als die bereits beschriebene Toxizität von Hydroxyharnstoff, wurden die entsprechenden Untersuchungen auch mit Aphidicolin durchgeführt. Dazu wurden nach einer Einwirkzeit von 17; 21 und 25 Stunden für alle untersuchten Konzentrationen (2 bzw. 4 $\mu\text{g/ml}$) jeweils $3,5 \cdot 10^5$ vitale Zellen in Gewebekulturflaschen mit 30 ml Frischmedium umgesetzt und damit die Arretierung aufgehoben. Als Maß für die Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde nach einer Kulturdauer von weiteren 44 Stunden die vitale Zellzahl bestimmt.

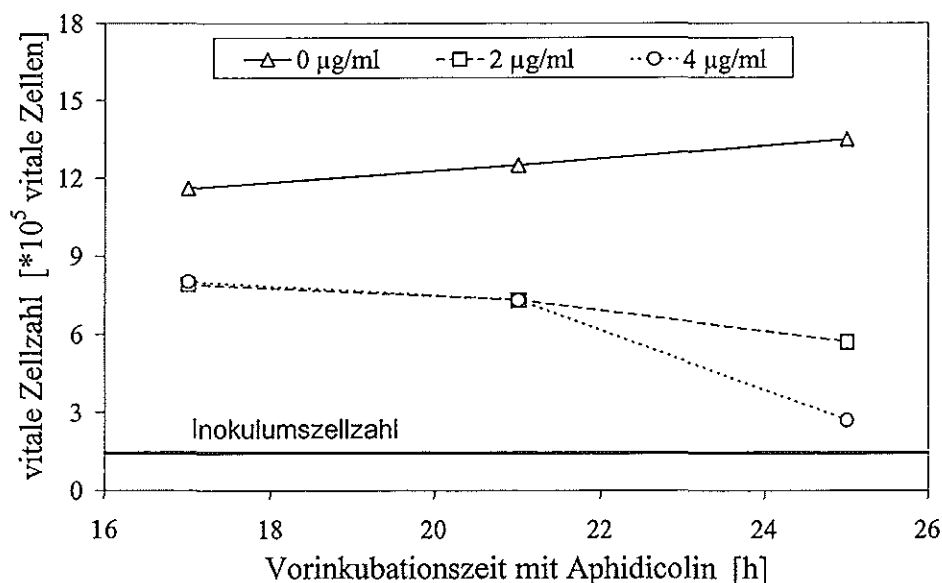


Abbildung 8-6: Toxizität in Abhängigkeit von der Einwirkzeit, Zellzahlen nach 96 Stunden Kultur in Frischmedium

Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit Hydroxyharnstoff als Arretierungsreagenz konnte in allen Fällen eine Zunahme der vitalen Zellzahl registriert werden (Abb. 8-6). Trotzdem zeigte sich eine Beeinträchtigung bezüglich der Proliferation in Abhängigkeit sowohl von der

Einwirkdauer als auch von der verwendeten Aphidicolin-Konzentration, was sich in einer zum Teil erheblichen Verlängerung der Verdopplungszeit manifestierte (Tabelle 8-4).

Das zytotoxische Potential von Aphidicolin ist im Vergleich zu Hydroxyharnstoff jedoch deutlich geringer, so daß ein weiterer Versuch zur Synchronisation einer Gliomzellpopulation diesmal unter Verwendung von Aphidicolin unternommen wurde.

Konzentration [µg/ml]	Vorinkubationszeit [h]		
	17	21	25
0	32	30,9	28,2
2	39,3	41,2	48,6
4	39	41,2	107

Tabelle 8-4: Verdopplungszeiten nach Vorinkubation mit Aphidicolin

Synchronisationsexperiment in Gewebekulturflaschen

Aus den Vorversuchen ergaben sich als geeignete Versuchsbedingungen eine Aphidicolinkonzentration von 2 µg/ml sowie eine Inkubationszeit zur Arretierung der Zellen am Restriktionspunkt von 20 Stunden.

Neun Gewebekulturflaschen (Wachstumsfläche 25 cm²) wurden jeweils mit $1,25 \cdot 10^5$ vitalen Zellen in 8 ml Medium inokuliert und 50 h im Begasungsbrutschrank (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Anschließend wurden das Medium gegen 8 ml Frischmedium mit 2 µg/ml Aphidicolin ausgetauscht und die Zellen weiterkultiviert, um eine Arretierung am Restriktionspunkt zu erreichen. Nach 20 h wurde die Arretierung aufgehoben, indem das Arretierungsmedium entfernt und, nach zweimaligem Waschen des Monolayers mit vorgewärmtem PBS, durch 8 ml Frischmedium ersetzt wurden. Stündlich wurden die Zellen einer Gewebekulturflasche abgelöst und die Zellzyklusverteilung bestimmt. Unmittelbar nach Aufhebung der Arretierung entsprachen die gemessenen Werte den Ergebnissen aus den Vorversuchen. Rund 75% der Zellen befanden sich in der G₁-Phase, während die restlichen 25% der Zellen in der S-Phase verblieben. Zellen in der G₂/M-Phase waren im Rahmen der Meßgenauigkeit nicht detektierbar. Eine vollständige Synchronisation der Kultur am Restriktionspunkt wurde also nicht erzielt. Die in der Synthesephase verbliebenen Zellen verteilten sich dabei, wie aus dem Histo-

gramm ersichtlich wird (Abb. 8-7), gleichmäßig über den gesamten Bereich der S-Phase (DNA-Gehalt zwischen einfach und doppelt).

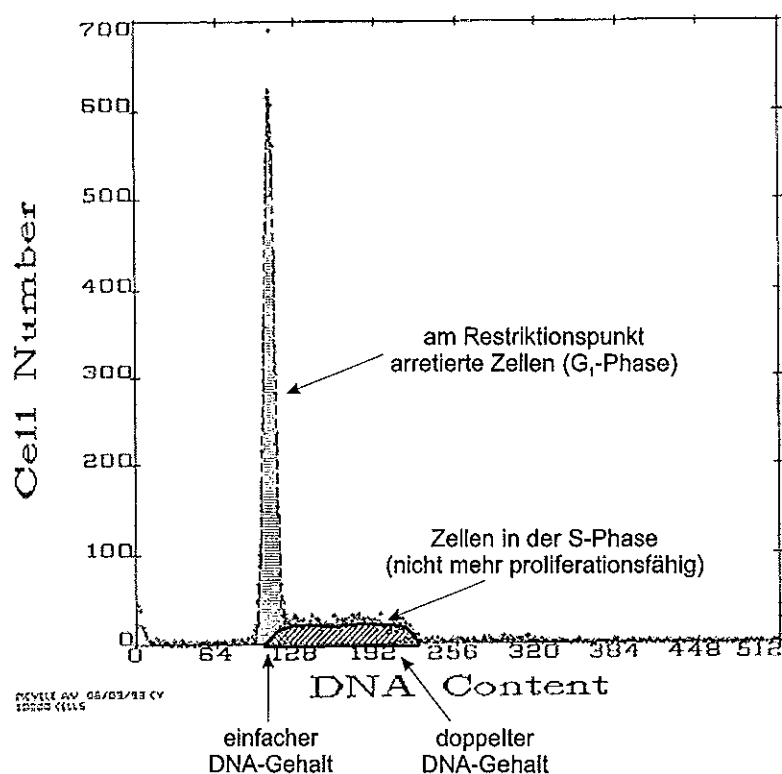


Abbildung 8-7: Histogramm einer mit Aphidicolin (2 µg/ml) arretierten Gliomzellpopulation nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden

Im Gegensatz zum Synchronisationsexperiment mit Hydroxyharnstoff zeigte sich bereits nach einer Stunde eine deutliche Verschiebung der Phasenverteilung (Abb. 8-8). Die intrazelluläre Blockierung der DNA-Polymerase α durch Aphidicolin wird also erheblich schneller aufgehoben als die Inhibierung der Ribonukleosiddiphosphat-Reduktase durch Hydroxyharnstoff (vgl. Abb. 8-4). Ein Großteil der Zellen aus der G₁-Phase tritt in die Synthesephase ein. Allerdings findet auch in diesem Fall kein vollständiger Übergang der G₁-Zellen statt, was auch hier als Indiz für eine erhebliche Schädigung dieser Zellen gewertet werden kann. Der prozentuale Anteil der geschädigten Zellen ist jedoch deutlich kleiner als im Experiment mit Hydroxyharnstoff.

In den folgenden Stunden stellte sich eine relativ konstante Phasenverteilung von ca. 80% S- und 20% G₁-Phase ein, wobei sich das Maximum des S-Peaks im Histogramm mit fortschreitender Replikation der DNA in Richtung doppelter DNA-Gehalt verschob. Der Eintritt

der Zellen in die G₂-Phase bzw. in die Mitose konnte im Rahmen dieses Versuches nicht beobachtet werden.

Der Anteil der Zellen in der Synthesephase setzte sich dabei additiv aus den nach Aufhebung der Blockierung eingewanderten und den während der Arretierung in der S-Phase verbliebenen Zellen zusammen. Letztere sind nicht mehr proliferationsfähig, was zum einen aus der Tatsache ableitbar ist, daß im Verlauf des Experimentes keine signifikante Erhöhung des G₂/M-Anteils auftrat, und zum anderen aus dem Histogramm erkennbar wird. Der DNA-Gehalt der bei der Arretierung in der Synthesephase verbliebenen Zellen (vgl. Abb. 8-7) änderte sich auch nach Aufhebung der Blockierung nicht mehr, während ein Großteil der am Restriktionspunkt arretierten Zellen mit der Proliferation begann. Daraus folgt im Histogramm eine Überlagerung zweier Subpopulationen in der S-Phase (Abb. 8-8).

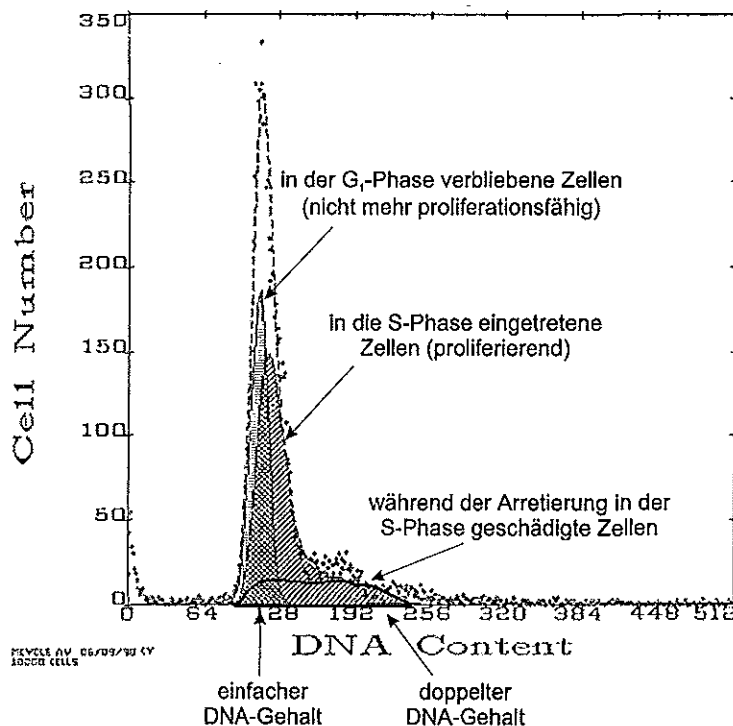


Abbildung 8-8: Histogramm einer Gliomzellpopulation zwei Stunden nach Aufhebung der Arretierung mit Aphidicolin (2 µg/ml)

Für den Anteil der nach Aufhebung der Arretierung weiter proliferierenden Zellen ergibt sich ein Wert von nur 55%. Die restlichen 45% der Zellen sind proliferationsunfähig und verteilen sich auf die G₁-Phase (20%) und die Synthesephase (25%), eine Folge der zytotoxischen Wirkung des Aphidicolins während der Inkubation zur Arretierung der Population.

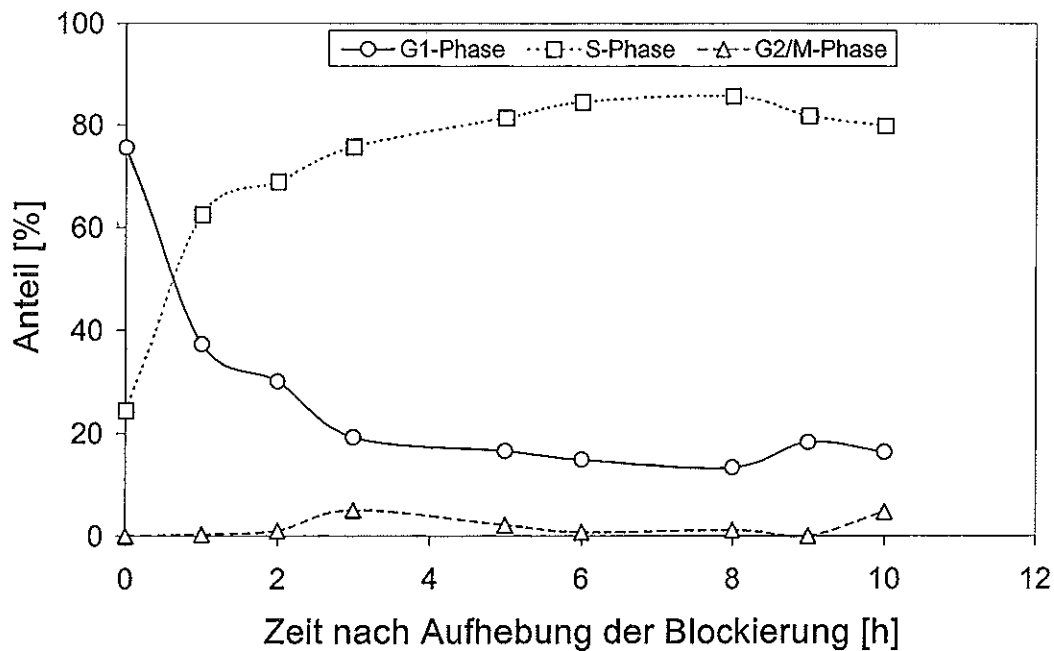


Abbildung 8-9: Synchronisationsexperiment nach 20 Stunden Vorinkubation mit Aphidicolin

8.1.3 Zusammenfassung der Synchronisationsuntersuchungen

Voraussetzung für die Bestimmung der zellzyklusphasenspezifischen Aufnahmeraten von Radiotracern und Radiopharmaka ist die Generierung einer vitalen, am Restriktionspunkt des Zellzyklus arretierten Kultur, die diesen nach Aufhebung der Arretierung synchron durchläuft. In einer über den Zellzyklus verteilten Population ist eine Bilanzierung der phasenspezifischen Aufnahmeraten dagegen unmöglich.

Unter Berücksichtigung der durch das Kultursystem (Wirbelschichtreaktor) vorgegebenen Rahmenbedingungen kam aus den dargestellten Gründen nur eine chemische Arretierung ohne Vorsynchronisation der Zellen (z.B. durch mitotic shake-off) in Betracht. Aus den in Frage kommenden Arretierungsreagenzien wurden Hydroxyharnstoff und Aphidicolin ausgewählt, da für diese Verbindungen besonders gute Synchronisationseigenschaften beschrieben sind. Sie weisen jedoch, wie alle Substanzen, die die DNA-Synthese hemmen, eine erhebliche Zytotoxizität, insbesondere gegenüber Zellen in der S-Phase, auf, da bei diesen in die laufende Replikation der DNA eingegriffen wird. Ein Wirkmechanismus, der sich im Fall einer stark proliferierenden Kultur mit einem hohen Anteil an Zellen in der Synthesephase besonders deutlich auswirkt, und wie die Untersuchungen gezeigt haben, die Generie-

rung einer vollständig synchronisierten Kultur ohne Vorselektion unmöglich macht. So waren nach Aufhebung der Arretierung im Falle des Aphidicolin lediglich noch 55% der Zellen proliferationsfähig, bei Verwendung von Hydroxyharnstoff sogar nur 30%.

Um auszuschließen, daß die beobachteten Effekte der Arretierungsreagenzien abhängig vom Kultursystem (im Fall dieser Untersuchungen Gewebekulturflaschen) sein könnten, wurde abschließend ein Synchronisationsexperiment im Wirbelschichtreaktor unter Verwendung von Aphidicolin (Konzentration 2 µg/ml; Inkubationszeit 20 Stunden) durchgeführt. Die Arretierung wurde aufgehoben, indem das gesamte Reaktormedium durch 500 ml zellfreien Kulturüberstand ausgetauscht wurde (vgl. Kap. 4.1.1. Generierung einer Sprungfunktion). Die erhaltenen Ergebnisse entsprachen den Resultaten aus den Gewebekulturflaschen, weshalb auf eine detaillierte Darstellung an dieser Stelle verzichtet wird.

8.2 Lösungsweg der verwendeten Differentialgleichungen

Der Lösungsansatz für die zur Beschreibung der Radiotraceraufnahme verwendeten Differentialgleichungen sei exemplarisch am Beispiel von Gleichung 5 erläutert.

$$\frac{dc_b}{dt} = k_1^* \cdot c_p - (k_2^* + k_3^*) \cdot c_b \quad (5)$$

k_{1-3}^*	[min ⁻¹]	Geschwindigkeitskonstanten
c_p	[mmol/l]	FDG-Konzentration im Blutplasma
c_b	[mmol/l]	FDG-Konzentration im Gewebe

Aus der durch die experimentellen Rahmenbedingungen sichergestellten Konstanz der FDG-Konzentration im Umlauf (Blutplasma) ergibt sich folgender Lösungsansatz:

$$y' = a - b \cdot y \quad \text{mit } a = k_1^* \cdot c_p \text{ und } b = k_2^* + k_3^*$$

$$\Leftrightarrow y' + b \cdot y = a \quad \text{inhomogene, lineare Differentialgleichung}$$

Das Integral dieser inhomogenen, linearen Differentialgleichung ergibt sich als Summe des Integrals der zugehörigen homogenen Differentialgleichung und einem partikulären Integral der inhomogenen Differentialgleichung.

$$\Leftrightarrow y' + b \cdot y = 0 \quad \text{zugehörige homogene Differentialgleichung}$$

$$\rightarrow y(t) = C \cdot e^{-b \cdot t} \quad \begin{array}{l} \text{Lösung der homogenen Differentialgleichung} \\ \text{mit } C = \text{Integrationskonstante} \end{array}$$

$$\rightarrow y = \frac{a}{b} \quad \text{Lösung des partikulären Integrals}$$

$$\rightarrow y(t) = \frac{a}{b} + C \cdot e^{-b \cdot t} \quad \text{Lösung der inhomogenen Differentialgleichung}$$

Übertragung auf Gleichung 5 durch Substitution von a und b ergibt:

$$c_b(t) = \frac{k_1^* \cdot c_p}{k_2^* + k_3^*} + C \cdot e^{-(k_2^* + k_3^*) \cdot t}$$

Unter der Randbedingung, daß die intrazelluläre FDG-Konzentration c_b zum Zeitpunkt $t = 0$ ebenfalls gleich Null ist, folgt für die Integrationskonstante C:

$$c_b(0) = \frac{k_1^* \cdot c_p}{k_2^* + k_3^*} + C \cdot e^{-(k_2^* + k_3^*) \cdot 0}$$

$$\Leftrightarrow C = -\frac{k_1^* \cdot c_p}{k_2^* + k_3^*}$$

Damit ergibt sich, durch Einsetzen der Integrationskonstanten, Gleichung 7 (vgl. S. 26):

$$c_b(t) = \frac{k_1^* \cdot c_p}{k_2^* + k_3^*} \cdot \left(1 - e^{-(k_2^* + k_3^*) \cdot t} \right)$$

8.3 Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Zusammensetzung der Kulturmedien:

	DMEM [mg/l]	Ham's F-12 [mg/l]	IMDM [mg/l]
Anorganische Salze			
CaCl ₂ (anhyd.)	200,00	33,22	165,00
CuSO ₄ * 5H ₂ O	-	0,003	-
Fe(NO ₃) * 9H ₂ O	0,10	-	-
FeSO ₄ * 7H ₂ O	-	0,834	-
KCl	400,00	223,60	330,00
MgCl ₂ (anhyd.)	-	57,22	-
MgSO ₄ (anhyd.)	97,67	-	97,67
NaCl	6400,00	7599,00	4500,00
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	125,00	-	125,00
Na ₂ HPO ₄ (anhyd.)	-	142,04	-
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	-	0,863	-
Aminosäuren			
L-Alanin	-	8,90	25,00
L- Arginin * HCl	84,00	211,00	84,00
L-Asparagin	-	-	25,00
L-Asparagin * H ₂ O	-	15,01	-
L-Asparaginsäure	-	-	30,00
L-Cystein * H ₂ O * HCl	-	13,30	
L-Cystin * 2 HCl	-	-	91,24

Tabelle 8-5: Zusammensetzung der Pulvermedien DMEM, Ham's F12 und IMDM (Herstellerangaben)

	DMEM [mg/l]	Ham's F-12 [mg/l]	IMDM [mg/l]
Aminosäuren			
L-Glutaminsäure	-	35,12	75,00
L-Glutamin	584,00	146,00	584,00
Glycin	30,00	30,00	30,00
L-Histidin * HCl * H ₂ O	42,00	20,96	42,00
L-Isoleucin	105,00	3,94	105,00
L-Leucin	105,00	13,10	105,00
L-Lysin * HCl	146,00	36,50	146,00
L-Methionin	30,00	4,48	30,00
L-Phenylalanin	66,00	4,96	66,00
L-Prolin	-	34,50	40,00
L-Serin	42,00	16,00	42,00
L-Threonin	-	-	95,00
L-Tryptophan	-	-	16,00
L-Tyrosin (Di-Natriumsalz)	104,20	7,81	104,20
L-Valin	94,00	11,70	94,00
Vitamine			
Biotin	-	-	0,013
D-Ca-Pantothenat	4,00	13,96	4,00
Folsäure	4,00	1,30	4,00
i-Inositol	7,20	18,00	7,20
Nicotinamid	4,00	-	4,00

Tabelle 8-5: Zusammensetzung der Pulvermedien DMEM, Ham's F12 und IMDM (Herstellerangaben)

	DMEM [mg/l]	Ham's F-12 [mg/l]	IMDM [mg/l]
Vitamine			
Niacinamid	-	0,037	-
Pyridoxin * HCl	-	0,062	-
Pyridoxal * HCl	4,00	-	4,00
Riboflavin	0,40	0,038	0,40
Thiamin * HCl	4,00	0,34	4,00
Vitamin B12	-	1,36	0,013
Andere Komponenten			
D-Glukose	4500,00	1802,00	4500,00
HEPES	-	-	5958,00
Hypoxanthin (Natriumsalz)	-	4,77	-
Linolsäure	-	0,084	-
Liponsäure	-	0,21	-
Phenolrot	15,00	1,20	15,00
Putrescin * 2HCl	-	0,161	-
Natriumpyruvat	-	110,00	110,00
Thymidin	-	0,73	

Tabelle 8-5: Zusammensetzung der Pulvermedien DMEM, Ham's F12 und IMDM (Herstellerangaben)

Fettsäuren:

7,6 mg D,L-6,8-Liponsäure und 3,2 mg Linolensäure in 8,9 ml Ethanol_{abs}

PBS (Phosphate Buffer Saline):

8 g/l NaCl,; 1,15 g/l Na₂HPO₄; 0,2 g/l KH₂PO₄; 0,2 g/l KCl in entionisiertem Wasser; pH 7,2

Kristallviolettlösung:

0,1 M Zitronensäure; 0,1% (w/v) Kristallviolett; 1% (w/v) Triton X-100

Erythrosin B – Stammlösung:

2 g Erythrosin B; 4,05 g NaCl; 0,3 g K_2HPO_4 in entionisiertem Wasser; pH 7,2;
vor Gebrauch 1:10 mit PBS verdünnen

8.4 Liste der verwendeten Geräte

8.4.1 Zellkultivierung

Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau, BRD
Gas-Massendurchflußregler	Brooks, Veenendaal, NL
Kühlschrank	Liebherr, Düren, BRD
Laborzentrifuge	Beckmann Instruments, München, BRD
Laminar-Flow Werkbank	BDK Luft u. Reinraum, Sonnenbühl, BRD
Luftfilter	Gelman Sciences, Dreieich, BRD
Mediensterilfilter	Satorius, Göttingen, BRD
Schlauchpumpen	Watson-Marlow, Rommerskirchen, BRD
pO ₂ - Elektroden	Ingold Meßtechnik, Steinbach, BRD
Wasserbad	Lauda, Königshoven, BRD

8.4.2 Analytik

Aminosäure HPLC, AminoQuant 1090 AX	Hewlett Packard, Waldborn, BRD
Durchflußzytometer, EPICS XL	Coulter Electronics, Krefeld, BRD
Glukoseanalysator, Ebio Compact	Eppendorf, Hamburg, BRD
Mikroskop	
Osmometer, Osmomat O 30	Gonotec, Berlin, BRD

8.4.3 Radioaktivmessungen

Gammaszint 5300 BF	Berthold, Bad Wildbad, BRD
Timing SCA, Modell 455	Ortec, BRD
Linear Amplifier, TC 202 BLR	Tennelec, BRD

8.5 Literatur

- Abou-Khalil BW, Siegel GJ, Sachellares JC et al. 1987. Positron emission tomography studies of cerebral glucose metabolism in chronic partial epilepsy. *Ann Neurol* **22**: 480-486
- Alavi JB, Alavi A, Chawluk J. 1988. Positron emission tomography in patients with glioma: a predictor of prognosis. *Cancer* **62**: 1074-1078
- Antman K. 1996. Fortschritte in der herkömmlichen Krebstherapie. *Spektrum der Wissenschaft*, Sondernummer 1/96: 59-64
- Bilzer T, Stavrou D, Dahme E, Keiditsch E, Bürrig KF, Anzil AP, Wechsler W. 1990. Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. *Virchows Archiv A Pathol Anat* **418**: 281-293
- Börner AR. 1998. Publikation in Vorbereitung
- Botker HE, Böttcher M, Schmitz O et al. 1997. Glucose uptake and lumped constant variability in normal human hearts determined with [^{18}F]fluorodeoxyglucose. *J Nucl Cardiol* **4**: 125-132
- Bräuner T. 1987. Interzelluläre Kommunikation und invasives Wachstum maligner Zellen. Verlag Stöffler und Schütz, Stuttgart
- Bundesministerium für Forschung und Technologie, 1990. Zellen und Computer: Alternativen zum Tierversuch
- Coenen HH, Kling PGS. 1989. Cerebral metabolism of L-[2- ^{18}F]fluortyrosine, a new PET tracer of protein synthesis. *J Nucl Med* **30**: 1367-1372
- Coenen HH. 1994. Radiopharmazeutische Chemie: Grundlagen zur in vivo Untersuchung molekularer Vorgänge mit PET. *Der Nuklearmediziner* **17**: 203-214
- Coleman RE, Hoffman JM, Hanson MW, Sostman HD, Schold SCJ, 1991. Clinical application of PET for the evaluation of brain tumors. *J Nucl Med* **32**: 616-622

Crane PD, Pardridge WM, Braun LD, Oldendorf WH. 1983. Kinetics of transport and phosphorylation of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rat brain. *J. Neurochem.* **40**: 160-167

Cremer M. 1998. persönliche Mitteilung

Deehan B, Carnochan P, Trivedi M, Tombs A. 1993. Uptake and distribution of L-2-[I-125] Iodo- α -methyl tyrosine in experimental rat tumours: comparison with blood flow and growth rate. *Eur J Nucl Med* **20**: 101-106

DelRaso NJ. 1993. In vitro methodologies for enhanced toxicity testing. *Toxicol. Lett.* **68**: 91-99

Denhardt DT, Edwards DR, Parfett CLJ. 1986. Gene expression during mammalian cell cycle. *Biochim Biophys Acta.* **865**: 82-125

Di Chiro G. 1987. Positron emission tomography using [^{18}F]fluorodeoxyglucose in brain tumors: a powerful diagnostic and prognostic tool. *Invest Radiol* **22**: 360-371

Duara R, Grady C, Haxby J. 1986. Positron emission tomography in Alzheimer's disease. *Neurology* **36**: 879-887

Dulbecco R, Elkington J. 1973. Conditions limiting multiplications of fibroblastic and epithelial cells in dense culture. *Nature* **246**: 197-199

Fielding S, Short C, Davies K, Wald N, Bridges BA, Waters R. 1989. Studies on the ability of smoke from different types of cigarettes to induce DNA single-strand breaks in cultured human cells. *Mutat Res.* **214**: 147-151

Fox MH, Read RA, Bedford JS. 1987. Comparison of synchronized chinese hamster ovary cells obtained by mitotic shake-off, hydroxyurea, Aphidicolin, or methotrexate. *Cytometry.* **8**: 315-320

Frazier JM. 1993. In vitro models for toxicological research and testing. *Toxicol. Lett.* **68**: 73-90

Freidland RP, Budinger TF, Yano Y, Huesman RH, Knittel B, Derenzo SE, Koss B, Ober BA. 1983. Regional cerebral metabolic alterations in Alzheimer-type dementia: kinetic studies with 18-fluorodeoxyglucose. *J Cereb. Blood Flow Metabol* 3 (suppl 1): 510-511

Fürst W, Neubert R, Stütz B, Buchmann B, Reppel L. 1982. Möglichkeiten zur in vitro Beurteilung der Bioverfügbarkeit. 3. Mitteilung: Funktionsweise eines neu konstruierten Resorptionsmodells und damit erhaltene Ergebnisse. *Pharmazie*. 37: 571-577

Glacken MW, Fleischaker, Sinskey AJ, 1986. Reduction of waste product excretion via nutrient control: Possible strategies for maximising product and cell yields on serum in cultures of mammalian cells. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 491-506

Glimelius B, Norling B, Nederman T, Carlsson J, 1988. Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: Increased incorporation of proteoglycans and fibronectin as compared to monolayers. *APMIS*. 96: 433-444

Goldberg AM, Frazier JM, 1989. Alternatives to animals in toxicity testing. *Sci. Am.* 261: 24-30

Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR, 1978. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res.* 38: 4155-4171

Graham JF, Cummins CJ, Smith BH, Kornblith PL. 1985. Regulation of hexokinase in cultured gliomas. *Neurosurgery* 17: 537-542

Guth-Tougedilis B, Müller S, Mehorn MM, Knust EJ, Dutschka K, Reiners C. 1995. Anreicherung von DL-3-¹²³I-Iod- α -Methyltyrosin in Hirntumorrezydiven. *Nucl.-Med.* 34: 71-75

Haberkorn U, Bellemann ME, Altmann A et al. 1997. PET 2-Fluoro-2-Deoxyglucose uptake in rat prostate adenocarcinoma during chemotherapy with gemcitabine. *J Nucl Med* 38: 1215-1221

Hamacher K, Coenen HH, Stöcklin G. 1986. Efficient stereospecific synthesis of no carrier added 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-D-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution. *J Nucl Med* **27**: 235-238

Hamacher K, Blessing G, Nebeling B. 1990. Computer-aided synthesis (CAS) of no-carrier added 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxyglucose: an efficient automated system for the amino polyether-supported nucleophilic fluorination. *Appl J Radiat Isot* **41**: 49-65

Hamacher K. 1999. persönliche Mitteilung

Hambach B. 1994. Der Einsatz von Wirbelschichtreaktoren in der Zellkulturtechnik – Beiträge zur Verfahrensentwicklung. Dissertation an der RWTH Aachen

Hasenfuss G, Mulieri LA, Leavitt B, Allen PD, Haeberle JR, Alpert NR. 1992. Alteration of contractile function and excitation-contraction coupling in dilated cardiomyopathy. *Circ Res.* **70**: 1225-1232

Hasselbalch SG, Knudsen GM, Holm S, Hageman LP, Capaldo B, Paulson OB. 1996. Transport of D-glucose and 2-Fluorodeoxyglucose across the blood-brain barrier in humans. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**: 659-666

Hoh A, Maier K, Dreher RM. 1987. Multilayered keratinocyte culture used for in vitro toxicology. *Molecul Toxicol.* **1**: 537-546

Ichikawa A, Negishi M, Tomita K, Ikegami S. 1980. Aphidicolin: A specific inhibitor of DNA synthesis in synchronous mastocytoma P-815 cells. *Jpn J Pharmacol* **30**: 301-308

Ikegami S, Taguchi T, Ohashi M. 1978. Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase- α . *Nature* **275**: 458-459

Kapoor R, Spence AM, Muzi M, Graham MM, Abbott GL, Krohn KA, 1989. Determination of the deoxyglucose and glucose phosphorylation ratio and the lumped constant in rat brain and transplantable rat glioma. *J Neurochem.* **53**: 37-44

Karlson P, Doenecke D, Koolman J. 1994. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart

Kiesewetter A. 1998. Wachstums- und Produktbildungsverhalten von rekombinanten CHO-Zellen. Diplomarbeit an der Fachhochschule Jena

Knolle H. 1988. Cell kinetic modelling and the chemotherapy of cancer. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **256**: 495-497

Krautschick I, Künnert B, Meier T. 1990. Description of a simple method to study some aspects of the pathogenesis of arteriosclerosis by perfusion of arterial segments. *Exp Pathol* **38**: 217-221

Kurokawa H, Ogawa T, Kamihira M, Park YS, Iijima S, Kobayashi T. Kinetic study of hybridoma metabolism and antibody production in continuous culture using serum-free medium. *J. Ferment. Bioeng.* **76**: 128-133

Lampe H, Bigalke H. 1990. Carbamazepine blocks NMDA-activated currents in cultured spinal cord neurons. *Neuro Report*. **1**: 26-28

Langen KJ, Braun U, Rota Kops E, Herzog H, Kuwert T, Nebeling B, Feinendegen LE. 1993. The influence of plasma glucose levels on fluorine-18-fluorodeoxyglucose uptake in bronchial carcinomas. *J Nucl Med* **34**: 355-359

Lear JL, Ackerman RF. 1989. Regional comparison of the lumped constants of deoxyglucose and fluorodeoxyglucose. *Metabol Brain Disease* **4**: 95-104

Lebsanft J, McMahon JB, Steinmann GG, Schoemaker RH. 1989. A rapid in vitro method for the evaluation of potential antitumor drugs requiring metabolic activation by hepatic S) enzymes. *Biochem Pharmacol* **24**: 4477-4483

- Loring J, Glimelius B, Weston JA, 1982. Extracellular matrix materials influence quail neural crest cell differentiation in vitro. *Dev. Biol.* **90**: 165-174
- Löw-Friedrich I, v. Bredow F, Schoeppe W. 1990. In vitro studies on the cardiotoxicity of chemotherapeutics. *Chemotherapy*. **36**: 416-421
- Lüllau E, Dreisbach C, Grogg A, Biselli M, Wandrey C. 1992. Immobilization of animal cells on chemically modified carrier. In: Spier, Griffith (Eds.): Animal cell technology, Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 469-475
- MacDonald C, Watts P, Stuart B, Kreutzburg-Duffy U, Scott DM, Kinne RKH. 1991. Studies on the phenotype and karyotype of immortalized rabbit kidney epithelial cell lines. *Exp Cell Res.* **195**: 458-461
- Martin H. 1980. Wärme- und Stoffübertragung in der Wirbelschicht. *Chemie-Ingenieur-Technik* **52**: 199-209
- Miller WM, Wilke CR, Blanch HW. 1989. The transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture I: Glucose pulse and step changes. *Biotechnol. Bioeng.* **33**: 477-486
- Mitchell BF, Tupper JT. 1977. Synchronization of mouse 3T3 and SV40 3T3 cells by way of centrifugal elutriation. *Exp. Cell Res.* **106**: 351-355
- Mori K, Cruz N, Dienel G, Nelson T, Sokoloff L. 1989. Direct chemical measurement of the of the lumped constant of the [^{14}C]deoxyglucose method in rat brain: Effects of arterial plasma glucose level on the distribution spaces of [^{14}C]deoxyglucose and glucose and on λ . *J Cereb Blood Flow Metab.* **9**: 304-314
- Mulholland GK, Mangner TJ, Jewett DM, Kilbourn MR. 1989. Polymer supported nca nucleophilic radiolabeling reactions with [^{18}F] fluoride and [^{11}C] cyanide ion on quaternary ammonium resins. *J Lab Compds Radiopharm* **26**: 378-380
- Nederman T, Norling B, Glimelius B, Carlsson J, Brunk B, 1984. Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res.* **44**: 3090-3097

- Netzer R, Bigalke H. 1990. Memantine reduces repetitive action potential firing in spinal cord nerve cell cultures. *Eur J Pharmacol.* **186**: 149-155
- Oliver GJA, Pemberton MA, Rhodes C. 1988. An in vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial validation. *Toxic in vitro.* **2**: 7-17
- Oriuchi N, Tomiyoshi K, Inoue T et al. 1996. Independent Thallium-201 Accumulation and Fluorine-18-Fluodeoxyglucose Metabolism in Glioma. *J Nucl Med.* **37**: 457-462
- Ozturk SS, Palsson BO. 1991. Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism and antibody production. *Biotechnol. Bioeng.* **37**: 989-993
- Pedrali-Noy G, Spadari S. 1979. Effect of aphidicolin on viral and human DNA polymerases. *Biochem Biophys Res Commun.* **88**: 1194-1202
- Phelps ME, Huang SC, Hoffman EJ, Selin C, Sokoloff L, Kuhl DE. 1979. Tomographic measurement of local cerebral glucose metabolic rate in humans with (F-18)2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: validation of method. *Ann Neurol.* **6**: 371-388
- Phillips HJ. 1973. Dye exclusion tests for cell viability. In: Kruse PF, Patterson MK (Eds.), Tissue culture, Academic Press, New York. Pp. 406-408
- Ponten J, Macintyre EH. 1968. Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**: 465-486
- Pschyrembel. 1994. Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter Verlag, Berlin
- Reivich M, Alavi A, Wolf A. 1985. Glucose metabolic rate kinetic model parameter determination in humans: the lumped constant and rate constants for [¹⁸F]fluorodeoxyglucose and [¹¹C]deoxyglucose. *J Cereb Blood Flow Metab* **5**: 179-192
- Renner, Plagemann, Bernlohr. 1972. Permeation of glucose by simple and facilitated diffusion by novikoff rat hepatoma cells in suspension culture and its relationship to glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* **247**: 5765-5776

Rempel A, Bannasch P, Mayer D. 1994. Differences in expression and intracellular distribution of hexokinase isoenzymes in rat liver cells of different transformation stages. *Biochim. Biophys. Acta* **1219**: 660-668

Reuss K, Wienrich M, Harting J. 1986. Untersuchungen an Nervenzellkulturen können Tierversuche in der Schmerzforschung einsparen. In BMFT (ed): Ersatzmethoden zum Tierversuch. Projekte in der Biotechnologie. Bonn. Pp 11-29

Reutens DC, Gjedde AH, Meyer E. 1998. Regional Lumped constant differences and asymmetry in fluorine-18-FDG uptake in temporal lobe epilepsy. *J Nucl Med* **39**: 176-180

Richardson JF, Zaki WN. 1954. Sedimentation and fluidisation: Part I. *Trans. Inst. Chem. Engrs.* **32**: 35-53

Saha GB, MacIntyre WJ, Go RT, 1994. Radiopharmaceuticals for brain imaging. Seminars in nuclear medicine, Vol XXIV, 324-349

Schmidt S. 1998. Persönliche Mitteilung

Schröder B, Herfurth C, Biselli M, Schmoll HJ, Link H, Ebell W, Wandrey C. 1996. Cocultivation of hematopoietic cells in a fluidized bed reactor. In: Funatsu K et al. (eds.) Animal cell technology: Basic and applied aspects. Kluwer Acad Publ; Boston, MA. Pp. 137-141

Schüier F, Orzi F, Suda S, Lucignani G, Kennedy C, Sokoloff L. 1990. Influence of plasma glucose concentration on lumped constant of the deoxyglucose method: Effects of hyperglycemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **10**: 765-773

Scott MD, Zierold K, Kinne R. 1986. Development of differentiated characteristics in cultured kidney (Thick Ascending Loop of Henle) cells. *Exp Cell Res* **162**: 521-529

Sewing KF 1994. Zum Ersatz von Tierversuchen: Kommentare – Projektberichte - Literaturbesprechungen. Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei, Hannover, 179-181

Shuler ML, Ghanem A, Quick D, Wong MC, Miller P, 1996. A self-regulating cell culture analog device to mimic animal and human toxicological responses. *Biotechnol Bioeng.* **52**: 45-60

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C. 1977. The [^{14}C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* **28**: 897-916

Spence AM, Graham MM, Muzi M, 1990. Deoxyglucose lumped constant estimated in a transplanted rat astrocytic glioma by the hexose utilization index. *J Cereb Blood Flow Metab.* **10**: 190-198

Spence AM, Muzi M, Graham MM, O'Sullivan F, Krohn KA, Link JM, Lewellen TK, Lewellen B, Freeman SD, Berger MS, Ojemann GA. 1998. Glucose metabolism in human malignant gliomas measured with PET, 1-[C-11]glucose and FDG: analysis of the FDG lumped constant. *J Nucl Med.* **39**: 440-448

Suda S, Shinohara M, Miyaoka M, Lucignani G, Kennedy C, Sokoloff L. 1990. The lumped constant of the deoxyglucose method in hypoglycemia: Effects of moderate hypoglycemia on local cerebral glucose utilization in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* **10**: 499-509

Sumbilla, Zielke C, Reed, Ozand, Zielke HR. 1981. Comparison of the oxidations of glutamine, glucose, ketone bodies and fatty acids by human diploid fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **675**: 301-304

Terasima T, Tolmach LJ. 1963. Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **30**: 344-362

Thömmes J, Gätgens J, Biselli M, Runstadler PW, Wandrey C. 1994. The influence of dissolved oxygen tension on the metabolic activity of an immobilized hybridoma population. *Cytotechnology* **13**: 29-39

Tobey RA, Crissman HA. 1972. Use of flow microfluorometry in detailed analysis of effects of chemical agents on cell cycle progression. *Cancer Res.* **32**: 2726-2732

Uphoff CC, Drexler HG. 1994. Zelllinien in Forschung und Technik. In: Sewing KF. Zum Ersatz von Tierversuchen. Schlütersche Verlagsanstalt und Druckerei, Hannover. S. 15-16

Utesch D, Diener B, Molitor E, Oesch F, Platt KL. 1992. Characterization of cryopreserved rat liver parenchymal cell by metabolism of diagnostic substrates and activities of related enzymes. *Biochem Pharmacol.* **44**: 309-315

Waki A, Fujibayashi Y, Magata Y, Yokoyama A, Sadato N, Tsuschida T, Ishii Y, Yonekura Y. 1998. Glucose transporter protein-independent tumor cell accumulation of fluorine-18-AFDG, a lipophilic fluorine-18-FDG analog. *J. Nucl. Med.* **39**: 245-250

Wallukat G, Wobus AM. 1991. Use of spontaneously beating heart muscle cells differentiating from pluripotent embryonic stem cells for testing of chronotropic agents. Recent developments in toxicology: trends, methods and problems. *Arch Toxicol suppl.* **14**: 136-138

West GW, Weichselbaum R, Little JB. 1980. Limited penetration of methotrexate into human osteosarcoma spheroids as a proposed model for solid tumor resistance to adjuvant chemotherapy. *Cancer Res.* **40**: 3665-3668

Wienrich M, Reuss K, Harting J. 1989. Effects of receptor-selective neurokinin agonists and a neurokinin antagonist on the electric activity of spinal cord neurons in culture. *Br J Pharmacol.* **98**: 914-920

Yamamoto T, Seino Y, Fukumoto A. 1990. Overexpression of facilitated glucose transporter genes in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**: 223-230

Yagura T, Kozu T, Seno T. 1982. Arrest of chain growth of replicon-sized intermediates by aphidicolin during rat fibroblast cell chromosome replication. *Eur J Biochem.* **123**: 15-21

Zeng S, Dinter A, Eisenkrätzer D, Biselli M, Wandrey C, Berger EG. 1998 Pilot scale expression and purification of soluble protein A tagged β -1,6-Acetylglucosaminyltransferases in CHO cells. *Biochem Biophys Res Comm* **237**: 653-658

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Ch. Wandrey für die wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. V. Herzog für die Übernahme des Koreferates,

Herrn Dr. M. Biselli für den Anstoß zu dieser Arbeit, sein stetes Interesse und die kritische Durchsicht der Arbeit,

Herrn Prof. Dr. K. J. Langen, Herrn H. Mühlensiepen und insbesondere Herrn M. Cremer für die stete Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit,

Herrn R. Engels und Herrn R. Reinartz für die exzellente Kooperation, die Programmierung der notwendigen Software und für die großzügige Überlassung der Meßelektronik,

den Mitarbeitern des Institutes für Nuklearchemie, insbesondere Herrn Dr. K. Hamacher für seine stete Diskussionsbereitschaft sowie der Arbeitsgruppe um Herrn Dr. R. Gail für die Synthese der Radiotracer,

Herrn S. Schmidt für die anregenden Diskussionen, die Hilfe bei der kinetischen Modellierung sowie die kritische Durchsicht der Arbeit,

Frau C. Herfurth für ihren unermüdlichen Einsatz und die hervorragende Zusammenarbeit,

der Arbeitsgruppe für Zellkulturtechnik für die stete Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Problemen und für die hervorragende Arbeitsatmosphäre,

allen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere den Damen und Herren der Werkstätten und des Fotolabors,

meinem Vater für die sorgfältige Durchsicht der Arbeit,

Jana Tönnies für ihre Geduld und ihr Verständnis für die mit der Erstellung dieser Arbeit verbundenen Gefühlsschwankungen.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3658
Mai 1999
ISSN 0944-2952