

Sonderdruck aus:

# erfahrungs- heilkunde

ZEITSCHRIFT FÜR DIE ÄRZTLICHE PRAXIS

# acta medica empirica

Hauptschriftleiter: Dr. med. Erich KRUG  
Schriftleitung: Dr. med. Heinz GRUNEWALD

---

Wissenschaftlicher Beirat:

J. BISCHKO (Wien), U. DERBOLOWSKY (Homburg), W. DOGS  
(Rinteln), J. P. DOSCH (München), K.-H. GEBHARDT (Karlsruhe),  
R. GRUNER (Saulgau), E. KOJER (Wien), W. A. LAABS (Detmold),

W. LANG (Heidelberg), H. MÜLLER (Lichtenstein), P. NEUHÄUSSER  
(München), D. REINSTORFF (Hamburg), H. SCHÄFER (Hagen),  
R. SEITHEL (Speyer), H. STADTLÄENDER (Wolfsburg), E. W.  
STIEFVATER (Freiburg), H. ZULLA (Konstanz)

---

Band 30 · Heft 10, Oktober 1981 · KARL F. HAUG VERLAG GMBH & CO. · 6900 HEIDELBERG

---

## Säulenchromatographische Auftrennung und Charakterisierung tumorhemmender Faktoren aus Leber und Plazenta

Von Th. Stiefel

Originalia

## Säulenchromatographische Auftrennung und Charakterisierung tumorhemmender Faktoren aus Leber und Plazenta

Von *Th. Stiefel*

Nach Jahren intensiver Krebsforschung verfügen wir heute zwar über Datenberge aus dem Gebiet der experimentellen Medizin und Epidemiologie sowie aus den Bereichen der Immunologie, Biologie und Biochemie. Dennoch sind wir heute weit davon entfernt, gesicherte Aussagen zur Entstehung des Krebses machen zu können. Immerhin beliefert uns die pharmazeutische Forschung inzwischen mit chemischen Substanzen, die tumorhemmende Eigenschaften aufweisen. Diese Substanzen sind jedoch mit erheblichen Nebenwirkungen belastet, so daß vor einem therapeutischen Einsatz sehr sorgfältig eine Nutzen-Schaden-Analyse mit all ihren Risiken und Unzulänglichkeiten durchgeführt werden muß.

In letzter Zeit nun macht eine neue Forschungsrichtung in der Krebsforschung auf sich aufmerksam, die die Arbeitshypothese vertritt, daß vom gesunden Individuum Steuersubstanzen produziert werden, die das Wachstum von Zellen anregen oder verzögern können. Ist die Synthese dieser Stoffe blockiert, so ist das Wachstum der Zellen unkontrolliert. Prominentes Beispiel dafür ist das Interferon, das sich beim virusinduzierten Tumor sicherlich als sehr wirkungsvoll erweisen wird, wenn auch die Hoffnungen über seine allgemeinen tumorhemmenden Eigenschaften überschätzt werden dürften. Solche Steuersubstanzen aufzufinden ist auch eines der Ziele der Forschungslaboratorien *Karl Theurer* für Organo- und Immunotherapie.

### Signifikant-tumorhemmende Wirkung im Tierversuch

Ausgangspunkt unserer Arbeiten waren überraschende Ergebnisse bei Tierversuchen, die *Munder* am Max-Planck-Institut für Immunologie in Freiburg durchgeführt hatte:

Bei vergleichenden Untersuchungen wurde beobachtet, daß Lebergewebe, das nach *Theurer* aufgearbeitet worden war, einen signifikant therapeutischen

Effekt auf das Wachstum von transplantierbaren Tumoren in Maus und Ratte hat. Im Gegensatz zu allen anderen bisher bekannten Zytostatika traten auch keinerlei Nebenwirkungen auf. Beim Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkom in CBF1-Mäusen überlebten nach 5 Wochen zwischen 70 und 90% der Tiere, gegenüber 0% in der Kontrollgruppe. Das Tumolvolumen der behandelten Gruppe lag unterhalb 10% des Tumolvolumens der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse konnte *Munder* inzwischen an anderen Tumorsystemen sowie an metastasierenden Tumoren eindrucksvoll bestätigen. Auch andere Experimentatoren, darunter *Gillissen* von der Universität Aachen, fanden signifikant-tumorhemmende Eigenschaften in Präparationen aus Leber und Plazenta, die nach *Theurer* hergestellt waren.

### Schmerzfrees in-vitro-Testsystem für tumorhemmende Substanzen: Tumorzellkultur

Es lag daher nahe, die gleichen Präparationen aus Leber und Plazenta auch an in-vitro-kultivierten humanen Tumorzellen sowie an humanen Fibroblasten zu prüfen, zumal die Technik der Zellkultur in den Forschungslaboratorien *Karl Theurer* einen hohen Standard erreicht hat. Sie wurde zunächst von *Paffenholz* als Methode der Standardisierung von Organpräparaten entwickelt, hat sich aber inzwischen auch als screening test für neue Arzneimittelpräparationen hervorragend bewährt.

Zunächst wurde die Dosis-Wirkungs-Relation einer Mischung von fetalem und juvenilem Lebergewebe bestimmt. Dazu wurden  $0,5 \times 10^6$ -Zellen 8 Stunden mit Präparaten in verschiedenen Konzentrationen behandelt. 4 Stunden nach Präparatzugabe wurde mit  $^3\text{H}$ -Thymidin versetzt. Gemessen wurde die Einbaurrate von  $^3\text{H}$ -Thymidin in DNS, das heißt letztlich die Zellteilungsrate. Als Ergebnis konnten sowohl in der Tumorzell-, als auch in der Fibroblastenkultur

klare Dosis-Wirkungsbeziehungen festgestellt werden. Der Vergleich beider Funktionen zeigt, daß der bei kleinen Konzentrationen ( $10^{-6}$  bis  $10^{-9}$  g Protein/ml Kulturmedium) in der Tumorzellkultur beobachtete Inhibierungseffekt bei der Fibroblasten-Kultur kaum auftritt. Andererseits ist der stimulierende Effekt ( $> 10^{-5}$  g/ml) höherer Konzentrationen bei den Fibroblasten wesentlich deutlicher ausgeprägt. Gesunde Zellen werden also im Gegensatz zu Tumorzellen nicht von den geprüften Präparationen inhibiert, sondern bei höheren Konzentrationen stimuliert.

Der daraufhin durchgeführte 20tägige Test einer täglich mit Leberpräparation behandelten Tumorzellkultur bestätigte die in den Tierversuchen ermittelten Wirkungen: Nach 20 Tagen war die Zellzahl der behandelten Kultur auf 60% der Kontrolle zurückgegangen.

### **Fraktionierung und analytische Charakterisierung der Leberpräparationen**

Die Analyse der Dosis-Wirkungs-Relation in der Zellkultur führte zu der Arbeitshypothese, daß in Lebergewebe eine für Tumorzellen inhibierende Komponente und für Normalzellen stimulierende Komponente enthalten ist.

Zur Isolierung dieser Komponenten wurde ein umfangreiches Trenn- und Analysensystem eingesetzt, das aus einer Kombination von Zentrifugation, Ultrafiltration und Isotachophorese in einer präparativen Säule bestand. Die dabei gewonnenen 4 Fraktionen wurden analytisch mit Hilfe der SDS-Elektrophorese auf ihr Molekulargewicht untersucht.

### **Prüfung der tumorhemmenden Eigenschaften der Fraktionen im Tierversuch und in der humanen Tumorzellkultur**

Die Überprüfung der so gewonnenen Fraktionen wurde wiederum parallel im Tierversuch von *Munder* und in der Tumorzellkultur in den Forschungslaboratorien *Karl Theurer* durchgeführt. Erstaunlich gut war die tendenzielle Übereinstimmung der Ergebnisse, wobei bedacht werden muß, daß die Resultate in der

Zellkultur nach nur 8 Stunden Wirkdauer gemessen wurden, während der Tierversuch über 5 Wochen hinweg durchgeführt wurde. Die Dosierung war hier je 0,5 mg pro Tier 3–5 Tage am 7. und am 9. Tage nach der Tumorzelltransplantation. Die durch Ultrafiltration mit Trenngrenze MG 10000 gewonnene niedermolekulare Fraktion wies in der Zellkultur einen 5%igen Rückgang gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf, im Tierversuch hatte der behandelte Tumor nur  $\frac{1}{3}$  des Tumolvolumens der unbehandelten Kontrolle.

Die 3 elektrophoretisch getrennten Fraktionen erniedrigten in der Zellkultur nach 8 Stunden die Zellteilungsrate um 12–14%; im Tierversuch betrug das Tumolvolumen nach 5 Wochen nur noch 20% bis 25%, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

### **Jede Fraktion besitzt tumorhemmende Eigenschaften**

Nach diesen Untersuchungen war klar, daß alle geprüften Fraktionen tumorhemmende Faktoren mit ungefähr vergleichbarer Dosis-Wirkungs-Relation enthalten. Dieser Befund läßt mehrere Deutungsmöglichkeiten zu, die in weiteren Experimenten überprüft werden müssen:

1. Leber- bzw. Plazentagewebe besitzen mehrere tumorhemmende Faktoren, die in den Fraktionen relativ gleichmäßig verteilt sind und für sich alleine tumorhemmend wirken.
2. Das eigentliche tumorhemmende Agens ist ein relativ niedermolekulares Peptid, das im Spektrum der zytoplasmatischen Proteine adsorptiv verteilt ist.
3. Der tumorhemmende Faktor ist durch die eingesetzten Trenntechniken nicht isolierbar.

Unabhängig von der Lösung dieser Probleme kann nach diesen Ergebnissen festgestellt werden, daß nach *Theurer* säurebehandelte Lyophilisate von Leber und Plazenta tumorinhibierende Wirkungen besitzen, die mit chemischen Zytostatika vergleichbar sind. Wichtig für den therapeutischen Effekt ist die optimale Dosierung. Sollte es gelingen, die tumorinhibierenden Faktoren zu isolieren, so ist der Weg frei für eine völlig neue Generation hochwirksamer biologischer Zytostatika.

## Originalia

**Zusammenfassung**

Nach *Theurer* aufgearbeitetes Leber- und Plazentagewebe zeigt im Tierversuch einen signifikanten therapeutischen Effekt auf das Wachstum von Tumoren: 5 Wochen nach Tumorimplantation überlebten noch 80–90% der Tiere gegenüber keinem in der Kontrollgruppe. Die daraufhin durchgeführten Untersuchungen an humanen Zellkulturen bestätigten diese Wirkung. Nach 20 Tagen war bei Tumorzellen die Zellzahl auf 60% der Kontrolle zurückgegangen. Dieser Effekt ist mit synthetischen Zytostatika vergleichbar. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung ergab einen optimal inhibierenden Effekt bei  $10^{-8}$  g Protein pro  $0,5 \cdot 10^6$  Tumorzellen, während das Wachstum von Haut-Fibroblasten durch diese Konzentration nicht beeinflusst wird. Zur Identifizierung der Wirkfaktoren wurden umfangreiche elektrophoretische Trennungen durchgeführt und die erhaltenen Fraktionen in Zellkultur und Tierversuch geprüft. Übereinstimmend wurden bei allen Fraktionen tumorhemmende Eigenschaften vergleichbarer Größenordnung beobachtet. Die Isolierung der Wirkfaktoren macht deshalb weitere Trennversuche mit andersartigen Techniken erforderlich.

**Literatur**

Tagungsbericht der XXV. Jahrestagung über die Zytoplasmatische Therapie und die Methoden der Serum-Desensibilisierung, EHK 3/80.

Tagungsbericht der XXVI. Jahrestagung über die Zytoplasmatische Therapie und die Methoden der Serum-Desensibilisierung, EHK 3/81.

Die Zytoplasmatische Therapie im Rahmen des tumorösen Geschehens beim Kleintier, *G. Knecht*, DER PRAKTISCHE TIERARZT 5/81, S. 414 ff.

Wiederherstellung defekter Regulationen durch die Zytoplasmatische Therapie, insbesondere bei Krebs, Prof. Dr. med. *K. Theurer*, ARZTLICHE PRAXIS 42/81, S. 1709/1710.

Mit Organ-Extrakten erfolgreich gegen Krebs, XXVI. Jahrestagung für Zytoplasmatische Therapie und Serum-Desensibilisierung nach *Theurer*, Stuttgart 3.–5. Oktober 1980, SELECTA 23/81.

Tumorthherapie mit Organsubstanzen, *H. Peter*, DIE HEILKUNST 8/81.

(Anschrift des Verfassers: Dr. Th. Stiefel, Forschungslaboratorien Karl Theurer für Organo- und Immunotherapie, Ostfildern 1)