

© Verlag Kern & Birner, 6000 Frankfurt am Main

Morbus Duchenne

Die Beeinflussung zytoplasmatischer Enzyme in Zellkulturen von Patienten mit Muskeldystrophie

Aldolase, LDH, Biochemica-Tests, Organpräparate

V. Paffenholz, K. Theurer

Zusammenfassung

Etablierte Zellkulturen aus Hautbiopsien von muskeldystroph erkrankten Patienten (Morbus Duchenne) wurden für mehrere Passagen mit Organextrakten behandelt, um eine mögliche Beeinflussung der Aktivität zytoplasmatischer Enzyme zu untersuchen. Im zellfreien Homogenat substituierter Kulturen konnten höhere Enzymwerte bei Aldolase und LDH nachgewiesen werden als in den unbehandelten Kontrollen. Vergleichskulturen von gesunden fetalen Zellen zeigten keine selektive Beeinflussung der Enzymaktivitäten. Therapeutische Möglichkeiten bei muskeldystrophen Patienten mit Organpräparaten werden aufgrund dieser Versuche diskutiert.

Auf Zugabe von Extrakten oder isolierten Substanzen aus verschiedenen Organen in das Kulturmedium reagieren viele Zellen mit einer Aktivierung der DNA-Synthese und der Proliferation (3). Auch Lösungen von Organlyophilisaten führen schon in geringen Mengen zu einer Steigerung des Synthesestoffwechsels diploider Zellen: so konnte durch Isotopenmarkierung eine erhöhte DNA- und RNA-Synthese in Extrakt-stimulierten Kulturen festgestellt werden (5). Die Organpräparate bewirken eine Proliferationssteigerung etablierter Zellkulturen von gesunden Spendern als auch von Patienten mit Muskeldystrophie. Da aufgrund dieser Versuche eine vergleichbare Aktivierung intrazellulärer Enzyme in diesen Kulturen zu erwarten ist, wollten wir prüfen, welche Enzymwerte in Zellen von gesunden und stoffwechselgeschädigten Patienten durch Organpräparate beeinflussbar sind. Hierbei erhofften wir Hinweise für therapeutische Möglichkeiten bei den betreffenden Patienten durch experimentelle Untersuchungen an Zellkulturen zu gewinnen. Die vorliegende Arbeit beschreibt in vitro-Versuche über die Beeinflussung der Enzymaktivitäten von Aldolase und LDH in menschlichen Zellen von gesunden und muskeldystroph erkrankten Spendern durch Präparationen aus tierischem Organmaterial (Revitorgan*).

Material und Methoden

Die hier verwendeten Zellkulturtechniken entsprechen den allgemein üblichen Methoden; zu ihrer ausführlichen Darstellung sei deshalb auf die Fachliteratur verwiesen (2).

Fetale menschliche Zellen erhielten wir freundlicherweise von Seromed, München. Haut- und Muskelbiopsiematerial von Kindern mit klinisch diagnostizierter Muskeldystrophie (Typ Duchenne) verdanken wir Professor Dr. R. Beckmann, Freiburg, und Professor Dr. G. Neuhäuser, Erlangen.

Etablierte Zellkulturen aus Biopsien und solche fetaler Herkunft wurden in Wachstumsmedium (MEM) mit 10 Prozent fetalem Rinderserum gezüchtet und wöchentlich zweimal transferiert. Von den einzelnen Zellstämmen wurden identische Kulturen angelegt, die a) über mehrere Passagen Mischungen von Organsubstanzen erhielten und die b) als unbehandelte Vergleichskontrollen dienten. Jeweils 24 Stunden nach dem Transfer erfolgte die Zugabe der Organlösungen bis zu einer Mediumkonzentration von 10^{-6} g/ml (nach Lowry-Proteinbestimmung). 48 Stunden später wurde die Anzahl der behandelten und nichtbehandelten Kulturen halbiert; ein Teil wurde weitertransferiert, während der andere Teil der Zellen zur Bestimmung der Enzymaktivitäten mehrmals sorgfältig mit Puffer (PBS) gewaschen und bei 4° C homogenisiert wurde (Dounce, Ganzglashomogenisator). Die Homogenate wurden zentrifugiert, um Kerne und Membranbestandteile zu entfernen, und der Überstand zur Durchführung der Enzymtests entsprechend der beigefügten Anleitungen der Boehringer Biochemica-Testkombinationen verwendet. Zur Standardisierung der verschiedenen Homogenate wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry durchgeführt (4) und die gemessenen Enzymwerte auf einen Proteingehalt von 100 µg bezogen.

Folgende Zellkulturen wurden für die Versuche verwendet:

H.S. und W.H.: Zellen aus Hautbiopsien von muskeldystrophen Spendern (Typ Duchenne)

F.H.: Zellen vom gesunden menschlichen Feten.

Ergebnisse

Die Etablierung von Zellkulturen aus Patienten-Biopsien führte nur bei den Hautentnahmen zum Erfolg; in wiederholten Versuchen wuchsen aus den Muskelstückchen nur wenige Zellen aus, die ohne eine nennenswerte Teilungsrate nach zwei bis vier Wochen degenerierten. Im Gegensatz dazu emigrierten aus den Hautbiopsien fibroblastenartige Zellen in großer Menge und konnten schon nach ein bis zwei Wochen transfe-

*) Hersteller: Vitorgan Arzneimittel, 7302 Ostfildern 1.

Tab. 1: Einfluß der Dauersubstitution von Lösungen der Revitorgan Präparatmischungen Nr. 22 + 96*) während verschiedener Passagen (P) auf die Aldolase Enzymaktivität in H. S.-Zellen (etabliert aus der Hautbiopsie eines muskeldystrophen Spenders)

Zellstamm	Aldolase (mU/100 µg Protein)	
	unbehandelt	behandelt
H.S. P11	0,956	1,096
H.S. P12	1,044	1,247
H.S. P13	1,800	2,113
H.S. P14	2,417	2,920
H.S. P15	3,138	3,375
H.S. P16	3,682	4,000
H.S. P17	3,457	3,500

riert und als eine homogene Population angesehen werden. Unter den vorliegenden Kulturbedingungen erfolgte eine Verdoppelung der Patienten-Zellen in 24 Stunden; dies entspricht der Teilungsrate von Zellen gesunder Spender oder solcher fetaler Herkunft.

Da bei degenerativen Muskelerkrankungen verschiedene Enzymwerte wie CPK, GOT, LDH, Aldolase im Patientenserum stark erhöht sind, versuchten wir, die auch zur Diagnose herangezogenen Enzymaktivitäten im Medium der etablierten Zellkulturen sowohl von muskeldystrophen als auch von gesunden Spendern zu bestimmen. Allerdings konnten wir mit den verwendeten Boehringer-Testkombinationen die genannten Enzymwerte im Kulturmedium nicht nachweisen. In den Zellhomogenaten lagen die Werte für CPK und GOT an der unteren Grenze des Meßbereiches, so daß sie für die weiteren Versuche unberücksichtigt bleiben mußten. Die Aktivitäten der Aldolase und LDH erwiesen sich jedoch im Homogenat als leicht bestimmbar und liegen daher dieser Arbeit als ein Kriterium für Stoffwechselveränderungen der genannten Zellkulturen zugrunde.

Der Einfluß der Organsubstanzen führte bei den behandelten Kulturen im Vergleich zu den Kontrollen zu folgenden Veränderungen der Enzymaktivitäten: So erreicht bei den H.S.-Kulturen die Aldolase in den behandelten Fällen über mehrere Passagen (P) gleichbleibend höhere Enzymaktivitäten als in den unbehandelten Kontrollen (Tab. 1), und erst in der letzten Auswertung (H.S. P17) wird eine Angleichung der gemessenen Enzymwerte in den unterschiedlichen Kulturen festgestellt. Eine ähnliche Kontinuität läßt sich bei den

Tab. 2: Einfluß der Dauersubstitution von Lösungen der Revitorgan Präparatmischungen Nr. 22 + 96*) während verschiedener Passagen (P) auf die Aldolase Enzymaktivität in F. H.-Zellen (fetale menschliche Haut). In den Passagen P15 und P18 erfolgte keine Enzymbestimmung

Zellstamm	Aldolase (mU/100 µg Protein)	
	unbehandelt	behandelt
H.S. P14	2,920	2,663
H.S. P16	4,348	3,920
H.S. P17	2,750	3,054
H.S. P19	3,981	3,335
H.S. P20	3,774	4,621
H.S. P21	3,958	4,563
H.S. P22	4,145	4,145

F.H.-Zellen nicht beobachten; nach Präparatzugabe erfolgt keine selektive Aktivierung der entsprechenden Kulturen (Tab. 2), sondern die auftretenden Schwankungen in den Enzymwerten sind mehr zufälliger Natur.

Die Messung der LDH in den Homogenaten der Extrakt-behandelten H.S.- als auch W.H.-Zellen zeigen über mehrere Passagen eine signifikante Steigerung der Enzymaktivitäten (Tab. 3, 4). Allerdings ergibt sich hier eine rasche Angleichung der Werte zu den nichtbehandelten Kulturen und in den letzten Bestimmungen (H.S. P15) liegen die gemessenen Differenzen nur noch im Fehlerbereich der Methode, die an sich sehr gut reproduzierbare Ergebnisse liefert. Die generelle Wirkung der Substitution mit Organsubstanzen auf die intrazellulären Enzymaktivitäten (der LDH) konnten auch in separaten Kulturansätzen (Doppelbestimmungen) bestätigt werden (s. Tab. 3 und 4).

Tab. 3: Einfluß der Dauersubstitution von Lösungen der Revitorgan Präparatmischungen Nr. 22 + 96*) während verschiedener Passagen (P) auf die LDH-Enzymaktivität in H.S.-Zellen (etabliert aus der Hautbiopsie eines muskeldystrophen Spenders)

Zellstamm	LDH (mU/100 µg Protein)	
	unbehandelt	behandelt
H.S. P11	225	250
H.S. P12	265	345
H.S. P13	187	238
H.S. P14	241	300
H.S. P15	225	212
H.S. P15	278	275 (Doppelbestimmung)

Tab. 4: Einfluß der Dauersubstitution von Lösungen der Revitorgan Präparatmischungen Nr. 22 + 96*) während verschiedener Passagen (P) auf die LDH-Enzymaktivität in W.H.-Zellen (etabliert aus der Hautbiopsie eines muskeldystrophen Spenders)

Zellstamm	LDH (mU/100 µg Protein)	
	unbehandelt	behandelt
W.H. P7	196	223
W.H. P8	163	181
W.H. P8	183	191 (Doppelbestimmung)

Tab. 5: Einfluß der Dauersubstitution von Lösungen der Revitorgan Präparatmischungen Nr. 22 + 96*) während verschiedener Passagen (P) auf die LDH-Enzymaktivität in F.H.-Zellen (fetale menschliche Haut)

Zellstamm	LDH (mU/100 µg Protein)	
	unbehandelt	behandelt
F.H. P13	172	175
F.H. P14	145	143
F.H. P15	190	205
F.H. P16	135	178

*) Nr. 22 = Revitorgan Trockensubstanz (Lyophilisat) aus Hypophyse Nr. 96 = Revitorgan Trockensubstanzmischung, bestehend aus Skelettmuskulatur, fetalem und juvenilem Thymus, Rückenmark, fetalem Herzmuskel

Diskussion

Die gemessenen Unterschiede der Aldolase- und LDH-Enzymwerte bei verschiedenen menschlichen Zellstämmen weisen auf eine allgemeine Aktivierung der Extrakt-behandelten Kulturen hin. Die Ergebnisse bestätigen damit frühere Befunde, in denen eine zumeist konzentrationsabhängige Stimulierung der DNA- und RNA-Synthese sowie der Proliferation nach Zugabe von Organsubstanzen in das Kulturmedium diploider Zellen erfolgte (5). Konform mit der Anregung des Stoffwechsels verändern sich die Aktivitäten der zytoplasmatischen Enzyme, die speziell bei den Zellen aus muskeldystrophischen Biopsiematerial unter dem Einfluß der Organsubstanzen erhöht sind. Die Dauersubstitution der Revitorgan-Präparatmischung Nr. 22 + 96 führt jedoch nicht zu einer kontinuierlichen Steigerung der Teilungsrate oder der Enzymaktivitäten. Nach unterschiedlichen Zeiten gleichen sich die behandelten und unbehandelten Kulturen wieder an, wie sich auch an den gemessenen Enzymaktivitäten erkennen läßt. Wahrscheinlich handelt es sich bei der Angleichung um eine Adaptation der Zellen an das Präparat. Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden die Enzymwerte anhand von Parallelkulturen doppelt bestimmt. Das Fehlen genereller Unterschiede verdeutlicht, daß die Aufarbeitung der Kulturen ebenso wie die Aktivitätsmessungen in hohem Maß reproduzierbar sind.

Eine vergleichsweise ähnliche Stimulierung der Aldolase oder LDH wie in den behandelten H.S.- und W.H.-Kulturen läßt sich bei den mitgetesteten fetalen F.H.-Zellen nicht nachweisen. Allerdings bewirkt auch hier die Präparatzugabe in das Kulturmedium einen erhöhten Stoffwechsel und eine vermehrte Zellteilungsrate und entspricht damit schon früher erhobenen Befunden (5).

Bisherige Erfahrungen über die Anwendung der Organsubstanzen bei degenerativen Muskelerkrankungen lassen eine günstige Beeinflussung des Krankheitsverlaufes bei entsprechend frühzeitigem Behandlungsbeginn erkennen (1). Die hier aufgeführten zellulären Stoffwechselveränderungen vermitteln einen Einblick in molekulare Reaktionsabläufe, die wir auch nach Injektion der Präparate in einem Organismus erwarten und die ausschlaggebend für die Veränderungen des Krankheitsbildes sind. Da wir diese Vorgänge an Zellkulturen einfacher und genauer als am Menschen oder Versuchstier untersuchen können, sehen wir in diesem System eine Möglichkeit, die Wirkung von Organpräparaten experimentell zu prüfen und aufgrund der gewonnenen Ergebnisse Hinweise für eine krankheitsbezogene Therapie zu geben.

Anschrift der Verfasser:

Dr. rer. nat. Volker Paffenholz
Dr. med. Karl Theurer
Forschungslaboratorien Karl Theurer
Brunnwiesenstraße 23
7302 Ostfildern I

Literaturhinweise:

- (1) Beckmann, R. Duchenne-Muskeldystrophie: Probleme, Frühdiagnose, Frühbehandlung. *Klinische Pädiatrie*, 190 (1978) 531-539.
- (2) Bonin, O. *Quantitativ-virologische Methodik*. 1973, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- (3) Gospodarowicz, D. and J. S. Moran. Growth factors in mammalian cell culture. *Ann. Rev. Biochem.*, 45 (1976) 531-558.
- (4) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. G. Randall. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
- (5) Paffenholz, V. und K. Theurer. Einfluß von makromolekularen Organsubstanzen auf menschliche Zellen in vitro. I. Diploide Kulturen. *Der Kassenarzt*, 18 (1978) 5218-5226.