In-vitro-Thermosensibilisierung von Ehrlich-Mäuse-Ascites-Krebszellen durch Vitamin K₃ und K₅

Meßreihen unter Variierung der wesentlichen Parameter als Brücke zur in-vivo-Situation

M. VON ARDENNE UND P. G. REITNAUER

Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden-Weißer Hirsch

(Z. Naturforschg. 22 b, 422—435 [1967]; eingegangen am 27. Februar 1967)

Über in-vitro-Messungen zur selektiven Thermosensibilisierung von Krebszellen durch intrazelluläre H₂O₂-Entwicklung mit Hilfe von K-Vitaminen, insbesondere K₃-natrium-bisulfit wird berichtet. Die zur Thermosensibilisierung notwendige H₂O₂-Dosis beträgt nur etwa 1/10 der normotherm zur Vernichtung der Krebszellen erforderlichen Dosis. Dieser Befund kennzeichnet einen prinzipiellen Vorteil für die in-vivo-Realisierung und mit ihm in Zusammenhang steht das wichtige Meßergebnis, daß die selektive Thermosensibilisierung durch K₃ erst bei O₂-Partialdrücken unter 1,5 Torr sich kritisch verschlechtert. Als Brücke zur in-vivo-Situation wird in speziellen Meßreihen die Abhängigkeit der Thermosensibilisierung von der Konzentration der K-Vitamine, von der Krebszellendichte, vom O₂-Partialdruck und vom pH-Wert untersucht. Da in Übereinstimmung mit dem Reaktionsschema der intrazellulären H₂O₂-Entwicklung kein wesentlicher Verbrauch an K-Vitamin durch die Krebszellen gefunden wurde, besteht Aussicht auf Realisierung einer Sensibilisierungsdosis mit geringer Streuung im Patientenkörper. Nach Abschätzungen zur in-vivo-Dosierung wird über erfolgreiche Versuche zur selektiven Thermosensibilisierung von Krebszellen in vivo bei Mäusen mit K₃-natrium-bisulfit berichtet. Nach *oralen Applikation einer verträglichen K₃-natrium-bisulfit-Dosis gelang mit der Hyperthermiedosis von nur 41 °C — 40 min die selektive Abtötung von 90% der Zellen ihres Ascites-Tumors ohne kritische Schädigung gesunder Zellen des Tieres*. Auf Grund der Ergebnisse wird abgeschätzt, daß allein durch die Thermosensibilisierung mit K₃-natrium-bisulfit die therapeutisch notwendige Temperaturdosis auf Werte (≈ 41 °C 40 bis 60 min) gemindert wird, die bei Einsatz unserer Hyperthermietechnik auch älteren Menschen zumutbar sind.

Bei den besprochenen beiden Arten der Thermosensibilisierung beruht die Selektivität hauptsächlich auf der Ausnutzung jener Unterschiede, die nach O. WARBURG für im Körper lebende Krebszellen generell charakteristisch sind (Gärungsstoffwechsel bzw. Übersäuerung und besonders die Katalasearmut). Hierauf und auf dem gefundenen Wirksambleiben der Thermosensibilisierung bis herab zu O₂-Partialdrücken von nur 1 Torr gründet sich unsere Hoffnung, daß die künftige Krebs-Mehrschritt-Therapie eine *universelle Krebstherapie* sein wird.

1. Zur Definition der unselektiven und selektiven Thermosensibilisierung

Im Rahmen der „Krebs-Mehrschritt-Therapie“ verstehen wir unter *Thermosensibilisierung* eine *signifikante Erhöhung der therapeutischen Wärmewirkung durch einen vor oder während einer Hyperthermiebehandlung am Therapieobjekt angreifenden andersartigen, in der sensibilisierenden Dosis normotherm nicht signifikant therapiewirksamen Prozeß*. Eine Thermosensibilisierung nach dieser Definition ist bereits dann gegeben, wenn ohne Erhöhung der cancerotropen Selektivität der Wärme nur eine Senkung der notwendigen Hyperthermiedosis eintritt. — Eine gleichzeitige Selektivitätssteigerung der Therapie ergibt sich erst bei *selektiver Thermosensibilisierung*, bei der *bevorzugt oder allein die Wärmeempfindlichkeit der Krebszellen bzw. Tumoren verstärkt wird*.

Da unsere Bemühungen nicht auf die subtile Erfüllung einer Definition, sondern auf eine *ausreichende Vergrößerung der therapeutischen Wirkung einer zumutbaren Hyperthermiedosis* hinzielen, schließen wir in unsere Untersuchungen zur Thermosensibilisierung auch Substanzen ein, bei denen sich möglicherweise in der angewendeten Dosis auch normotherm cancerotoxische Effekte andeuten. Unsere praktische Handhabung des Begriffs Sensibilisierung deckt sich dabei weitgehend mit seiner Deutung in der Strahlentherapie. Versteht man doch unter Radiosensibilisatoren ganz analog Mittel, welche die Strahlenwirkung erhöhen, unabhängig davon, ob sie für sich allein, d. h. ohne Bestrahlung eine cancerotoxische Wirkung auszuüben vermögen (z. B. O₂, K-Vitamine¹).

¹ H. W. BECKER, Rad. biol. ther. 6, 285 [1965].

2. Gründe für die Auswahl von Vitamin K₃ bzw. K₅ bei der Suche nach selektiven Thermosensibilisatoren

Mit Disulfiram durchgeführte in-vitro- und in-vivo-Versuche zur (selektiven) Thermosensibilisierung von Krebszellen² lieferten erste quantitative, zu Hoffnungen berechtigende Ergebnisse zur *Krebs-Wärmetherapie mit Thermosensibilisierung*. Auch in-vitro-Messungen mit Wasserstoffperoxyd als selektiv wirkender Thermosensibilisator für Krebszellen fielen sehr positiv aus². Der Hauptbeitrag zur Selektivität ergibt sich bei H₂O₂ aus dem zwischen Krebszellen und normalen Zellen sehr unterschiedlichen Gehalt an Katalase — 1 : 10³ bis 1 : 500^{4, 5}. Bekanntlich schützt Katalase die Zellen gegen H₂O₂, so daß die sehr katalasearmen Krebszellen diesem Angriff viel stärker ausgesetzt sind als gesunde Zellen. Wir fanden weiter², daß zur Sensibilisierung nur eine Anfangskonzentration $c_{0\text{H}_2\text{O}_2} = 8 \cdot 10^{-6}$

g ml⁻¹, d. h. nur etwa 1/10 der beim gleichen Test zur irreversiblen Krebszellenschädigung notwendigen H₂O₂-Konzentration erforderlich ist. In diesem Ergebnis deutet sich an, daß wohl *prinzipiell in vivo die chemische Thermosensibilisierung der Krebszellen viel leichter zu erreichen ist als die chemische Abtötung der Krebszellen*.

Die Ausnutzung der Ergebnisse mit H₂O₂ unter in-vivo-Bedingungen kann nur mit Hilfe des *Prinzips der intrazellularen Peroxydentwicklung* [s. Abb. 1] gelingen, das für den Versuch einer normothermen Therapie mit H₂O₂ schon von anderen Autoren (z. B. l. c.^{6, 7}) vorgeschlagen wurde. Um die Aussichten für intracelluläre Entwicklung einer ausreichenden H₂O₂-Menge in vivo und bei den in Tumoren herrschenden (niedrigen) O₂-Partialdrücken möglichst groß zu gestalten, suchten wir nach einem *Chinon geringer Giftigkeit*. Unsere Wahl fiel auf *Vitamin K₃*, wobei sowohl die schwer in Wasser

Abb. 1. Anwendung der intrazellulären H₂O₂-Entwicklung für die selektive Sensibilisierung von Krebszellen gegen Wärme. NAD = reduzierendes Ferment. Kat = Katalase.

² M. VON ARDENNE, Betrachtungen und Messungen zur selektiven chemischen Sensibilisierung der Krebszellen gegen Wärme, in: M. VON ARDENNE, Theoretische und experimentelle Grundlagen der Krebs-Mehrschritt-Therapie. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1967.

³ O. WARBURG, A. W. GEISSLER u. S. LORENZ, Weitere Versuche über die Wirkung von Röntgenstrahlen auf den Stoffwechsel der Krebszellen, in: O. WARBURG, Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1962, S. 585.

⁴ J. P. GREENSTEIN, W. V. JENNETTE, and J. WHITE, J. nat. Cancer Inst. **2**, 17 [1941].

⁵ J. P. GREENSTEIN, Biochemistry of cancer. Academic Press, New York 1954. (Katalasegehalt in Krebszellen verschiedener Art.)

⁶ O. WARBURG, K. GAWEHN, A. W. GEISSLER, W. SCHRÖDER, H. S. GEWITZ u. U. VÖLKER, Arch. biochem. biophys. **78**, 573 [1958].

⁷ O. WARBURG, Über die fakultative Anaerobiose der Krebszellen und ihre Anwendung auf die Chemotherapie, vgl. l. c.³, S. 627.

lösliche Grundsubstanz (Menadion) als auch folgendes leicht in Wasser lösliche Präparat verwendet wurde:

Natriumsalz des 2-Methyl-2-sulfo-1,4-naphthochinons ^{*, 8}.

Weiter untersuchten wir auch die Eignung des Vitamin K₃:

4-Amino-2-methyl-naphthol-(1).

Hinweise darauf, daß bei diesen Chinon-Derivaten die Thermosensibilisierung wirklich durch H₂O₂-Wirkung (Prozeß nach Abb. 1) eintritt, ergaben sich aus dem Absinken der Sensibilisierung bei Werten des O₂-Partialdruckes $p_{O_2\text{eff}} < 1,5$ Torr, aus dem Ausbleiben der Sensibilisierung bei $p_H \leq 6,5$ (siehe unten Abb. 10, Anmerkung), aus einer dem Katalasewert etwa umgekehrt proportionalen Minderung der Katalaseaktivität durch große K₃-Dosen und aus der gefundenen Minderung der Sensibilisierung mit K₃ durch Pyruvat.

3. Ältere Arbeiten über Vitamin K₃-Wirkungen auf Krebszellen bei normaler Temperatur

TIEDEMANN, RISSE und BORN⁹ beobachteten mit Vitamin K₃ (Grundsubstanz) bei normaler Temperatur (37 °C) an Homogenisaten von Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom-Zellen (EMAC-Zellen) bei geringer Zelldichte und einer Konzentration $cK_3 = 7 \cdot 10^{-6}$ g ml⁻¹ eine Hemmung der Glykolyse aerob um 80 bis 100%, anaerob um 14 bis 44 Prozent. An nativen EMAC-Zellen war die aerobe Glykolyse schon bei $cK_3 = 1,7 \cdot 10^{-6}$ g ml⁻¹ K₃ weitgehend und mit $cK_3 = 8 \cdot 10^{-6}$ g ml⁻¹ fast vollständig gehemmt. Anaerob wurde keine Hem-

mung beobachtet. Beim gleichen Zellmaterial war nach Angabe der Verfasser die Atmung in der ersten Zeit der Einwirkung mit $cK_3 = 1,7 \cdot 10^{-6}$ g ml⁻¹ gesteigert, nach 1 bis 2 Stdn. aber gehemmt.

Von einer ebenfalls hemmenden Wirkung von K₃-natrium-bisulfit auf RNS-Abbau, Atmung und Glykolyse von Kaninchenretikulozyten bei normaler Temperatur berichten STRASSNER, PRADEL und RAHNER¹⁰. Die K₃-Konzentration $cK_3 = 2,5 \cdot 10^{-4}$ g ml⁻¹ hemmt in 170 min die Atmung der Retikulozyten um etwa 50 Prozent.

Den Einfluß von K₃-natrium-bisulfit auf Atmung, Glykolyse und Wachstum von EMAC-Zellen und Asciteszellen des NK-Lymphoms der weißen Maus untersuchten bei normaler Temperatur STRASSNER, PRADEL und NEUBERT¹¹. Für die in NaCl-Lösung gemessene Atmung von Ascites-Tumorzellen des NK-Lymphoms (geringe Krebszellendichte!) werden für 110 min Einwirkzeit Hemmwirkungen von fast 50% bei $cK_3 = 4 \cdot 10^{-5}$ g ml⁻¹ und von 86% bei $cK_3 = 2,5 \cdot 10^{-4}$ g ml⁻¹ angegeben. Eine weitere Steigerung der K₃-Konzentration bewirkte keine Zunahme der Hemmung mehr. In Wirklichkeit dürfte die Hemmung der Atmung noch größer gewesen sein (ca. 70 bzw. 100%), was aus den leider nicht differenzierten Kurven abzuschätzen ist. Für die in Ringer-Bicarbonat-Glucose-Lösung bei KCN-vergifteter Atmung aerob gemessene Gärung wird für eine K₃-Konzentration von $5 \cdot 10^{-4}$ g ml⁻¹ auf Grund einer nach 45 min erfolgten Milchsäurebestimmung eine 80-proz. Hemmung angegeben. Allerdings geben solche integrierenden Messungen nur eine grobe und u. U. irreführende Vorstellung über das wirkliche während der Beobachtungszeit erreichte Ausmaß einer Hemmung. — Bei einem Therapieversuch in vivo (große Krebszellendichte! Siehe unter 5.3) gaben die Autoren, unmittelbar nach der i.p. Applikation von Lymphomzellen beginnend, in 2 Tagen 4–3 mg K₃-natrium-bisulfit i.p. bei ca. 30 g schweren weißen Mäusen. Diese Tiere vertrugen die hohe K₃-Dosis, aber starben ebenso wie die Kontrolltiere nach ca. 30 Tagen an ihrem Lymphom.

In einer weiteren Untersuchung der gleichen Autoren¹² wird u. a. auf die Zeitabhängigkeit der K₃-natrium-bisulfit-Wirkung auf Atmung und Glykolyse und auf das Ausbleiben der Hemmwirkung unter N₂-Atmosphäre hingewiesen.

Die referierten Ergebnisse, nach denen schon bei normaler Temperatur (und geringer Krebszellendichte) eine gewisse Hemmung von Atmung und Glykolyse durch K₃ eintritt und die in l. c.² entwickelten Auswahlgesichtspunkte bestärkten uns darin, die Eignung des Vitamin K₃-natrium-bisulfit bzw. der K₃-Grundsubstanz zur selektiven Thermosensibilisierung von Krebszellen durch in-vitro-Messungen zu prüfen. — Ergebnisse aus

* VEB Berlin-Chemie, im laufenden Text mit K₃ (Na-bisulfit) abgekürzt. DAB 7, mind. 96%. Mol.-Gew. 330,3.

⁸ H. SCHLIERIG, Vitamin K₃-Berlin-Chemie. Dtsch. Ges.-Wesen 17, 2049 [1962].

⁹ H. TIEDEMANN, H. J. RISSE u. J. BORN, Z. Naturforsch. 17b, 657 [1958].

¹⁰ W. STRASSNER u. I. PRADEL, Acta biol. med. germ. 7, 233 [1961].

¹¹ W. STRASSNER, I. PRADEL u. R. NEUBERT, Acta biol. med. germ. 8, 472 [1962].

¹² W. STRASSNER, R. NEUBERT u. I. PRADEL, Acta biol. med. germ. 10, 85 [1963].

älteren Arbeiten über Vitamin K₅-Wirkungen auf Krebszellen bei normaler Temperatur standen uns aus der Literatur nicht zur Verfügung.

Unsere Messungen erfolgten mit Hilfe des (sehr strengen) Trypanblau-Färbetests an EMAC-Zellsuspensionen unter Variation der Parameter, welche für die in-vivo-Verhältnisse als wesentlich erscheinen. Daher schlagen diese in-vitro-Messungen eine Brücke zur in-vivo-Situation.

4. Schnellmethode zur Untersuchung der Thermosensibilisierung mit Hilfe von Trypanblaufärbung

Für jede Inkubation wurden 0,2...0,25 ml in kalter LY-Lösung* gewaschene EMAC-Zellen** in 40...50 ml einer gleichen, kurz vorher mit entsprechenden Mengen K₃ versetzten LY-Lösung aufgenommen ($\epsilon_Z = 5 \cdot 10^{-3} = 0,5 \text{ Vol.}\%$ Zellen). Sofort anschließend erfolgte mindestens 100 min lang die Inkubation bei 37 oder 42 °C Suspensionstemperatur im Schüttelthermostaten ($f \approx 100 \text{ min}^{-1}$) unter Begasung im offenen System mit 0,33...95 Vol.-% O₂, 5 Vol.-% CO₂, Rest N₂, wobei der Glucoseverbrauch der Zellen alle 10 min durch Zugabe von 0,05 ml LY-Lösung mit der Glucosekonzentration $c_{GK} = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$ kompensiert wurde. Im Abstand von 10 bis 20 min wurden je 3,0 ml Suspension entnommen und das 3-mal mit LY-Lösung gewaschene Zellsediment (0,015 ml) in 0,75 ml einer Mischung von 0,5 ml LY-Lösung und 0,25 ml 0,5-proz. Trypanblaulösung aufgenommen und mit einigen Tropfen hiervoor eine Thoma-Zählkammer gefüllt. Bei der sofort einsetzenden Zählung wurde die Anzahl aller und der angefärbten Zellen und daraus der Prozentsatz L der angefärbten Zellen bestimmt. Meist wurden vier Inkubationen unter verschiedenen Bedingungen, aus gehend von einer gemeinsam angesetzten Zellsuspension gleichzeitig durchgeführt.

5. In-vitro-Meßergebnisse zur Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen durch Vitamin K₃ bzw. K₅ unter Variierung der für die in-vivo-Situation wesentlichen Parameter

5.1. Einfluß der Konzentration bei K₃-natriumbisulfit

Die für die Messungen verwendeten K₃-natriumbisulfit-Proben und K₃-Grundsubstanz-Proben wurden vom VEB Berlin-Chemie geliefert. Bei der in

Abb. 2 wiedergegebenen Messung zum Einfluß der K₃-natriumbisulfit-Konzentration auf die Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen wurde die Sensibilisator-Konzentration nacheinander jeweils um eine Zehnerpotenz verringert. Die zugegebene kleine Menge ($\approx 1 \text{ ml}$) hochkonzentrierter K₃-natrium-bi-

Abb. 2. Der Einfluß der Sensibilisator-Konzentration c_{K_3} auf die Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen beim Vitamin K₃-natriumbisulfit und empfindlicher Zellsuspension (Zellmembranen stärker permeabel?). Anteil L mit Trypanblau angefärbter Zellen als Funktion der Wirkzeit t . LY-Medium.

sulfit-Lösung wurde jeweils im Verhältnis 10 : 1 von Meßreihe zu Meßreihe verdünnt und einer EMAC-Zellsuspension gleicher Herkunft zugegeben. Man erkennt, daß in diesem Fall Konzentrationen von $c_{K_3} = 10^{-5}$ und sogar noch von $10^{-6} \text{ g ml}^{-1}$ ausreichen, um bei den angegebenen Parametern und bei der geringen Krebszellendichte $\epsilon_Z = 5 \cdot 10^{-3}$ eine ausgesprochen gute Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen zu bewirken.

In der Darstellung Abb. 3 sind die vorstehenden Meßergebnisse als Kurve mit der Datumsangabe 6. 1. 1967 zusammengefaßt. Hier ist in der Ordinate die Zeit t_{LD50} für 50-proz. Anfärbung von EMAC-Zellen im Trypanblautest eingetragen. Die Darstellung enthält gleichzeitig die Ergebnisse von zahlreichen weiteren Meßreihen mit dieser Substanz. Wir fanden sowohl Ergebnisse mit noch stärkerer, als auch Ergebnisse mit wesentlich schwächerer Sensibilisierungswirkung. Sehr auffallend sind die großen Unterschiede der Sensibilisierungswirkung von Meßreihe zu Meßreihe. Zunächst wurde vermutet, daß diese Unterschiede auf Veränderungen der empfind-

* Vgl. M. v. ARDENNE u. P. G. REITNAUER, Arch. Geschwulstforsch. 27, 236 [1966], Glucosekonzentration immer 1 mg-%. Nicht nur für die Inkubation selbst, sondern auch für alle anderen Manipulationen am Zellmaterial, z. B. Waschen, benutzen wir seit längerer Zeit an Stelle reiner Salzlösungen nur noch Nährlösungen.

** Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom, seit 1964 in unserem Hause gehalten, vorher Max-Planck-Institut für Zellphysiologie, Berlin-Dahlem.

Abb. 3. Der Einfluß der Sensibilisator-Konzentration C_{K_3} auf die Zeit t_{LD50} für 50% Schädigung von EMAC-Zellen beim Vitamin K_3 -natrium-bisulfit und verschiedenen Zellsuspensionen. Trypanblaufärbetest. LY-Medium. Große Unterschiede von Suspension. K_3 -Charge: 12466 ● 17566 ○.

lichen Substanz (Lichteinwirkung usw.) zurückzuführen sein könnten. Um zu prüfen, ob zwischen der Probe bei dem Ergebnis mit höchster Sensibilisierungswirkung (Messung 6.1.1967) und mit ge-

2-Methyl-2-sulfo-1.4-naphthochinon-Na Sp.-Nr. 1768/11
 Vitamin K_3 (Proben 1; 2) 1768/20
 Herkunft: I. v. A. (VEB Berlin-Chemie) Tag: 26.1.1967
 Bruttoformel: $C_{11}H_{11}NaO_6S$
 Strukturformel:

MG: 294,260, $M_{\text{ber.}}$: 294,024, T_V : 210°C , t_E : 30 s, $M_{1...5}$: 172, 337, 158, 187, 145; Anm.: weiße Kristalle.

Die Spektren beider Proben unterscheiden sich kaum. Der intensivste Peak liegt bei 172 und entspricht der Abspaltung von H_2O und $NaSO_3^-$. Der nächstintensivste Peak 337 läßt sich nur annähernd einem Dimeren zuordnen. Dabei tritt eine Differenz von 9 ME auf: $346 - 337 = 9$. Vorübergehend erscheint ein schwacher Peak bei $343 = 344 - 1$ (Dimeres). Kleine Peaks bei 323, 250, 214, 187, 158, 145 treten in beiden Fällen mit etwa gleichen Intensitäten auf.

Das Ion der Masse 337 dürfte auf Grund der Isotopenintensitäts-Verteilung keinen Schwefel enthalten.

$337 = 338 - 1 (?)$
 $(323) = 338 - 15$
 $(250) =$
 $187 = 172 + 15$
 $172 = 173 - 1$
 $158 = 173 - 15 (CH_3)$
 $145 = 158 - 13 (CH)$

Abb. 4. EA-Molekül-Massenspektrogramme verschiedener K_3 -natrium-bisulfit-Proben (K_3 -Grundsatz, $MG = 173!$).

ringster Sensibilisierungswirkung (Messung 26.1.1967) eine Änderung des Präparates eingetreten ist, wurden mit dem in unserem Institut entwickelten EA-Molekül-Massenspektrografen^{13, 14} Massenspektren beider Proben aufgenommen. Sie sind in Abb. 4 A und B wiedergegeben. Trotz der großen Empfindlichkeit dieses Analysenverfahrens ist keine Veränderung im Massenspektrum, also der Substanz, erkennbar. Nach diesem Befund sind die beobachteten großen Unterschiede in der Sensibilisierungswirkung wahrscheinlich auf *Unterschiede in den Zellen (Penetration des K₃-natrium-bisulfits durch die Zellmembran, Katalasegehalt)* zurückzuführen*. Wir wurden in dieser Auffassung bestärkt durch die Beobachtung geringerer Sensibilisierungswirkung bei solchen Suspensionen, bei denen die EMAC-Zellen im mikroskopischen Bild besonders „frisch“ aussahen. Diese Arbeitshypothese veranlaßte uns, die Untersuchungen auf die K₃-Grundsubstanz auszuweiten, bei der a priori eine gleichbleibend gute Durchdringung der Zellmembran erwartet werden konnte.

5.2. Einfluß der Konzentration bei K₃-Grundsubstanz

Wie bereits erwähnt, ist die K₃-Grundsubstanz schwer wasserlöslich. Die Sättigungskonzentration in Wasser von 42 °C fanden wir zu $c_{K_3} \approx 8 \cdot 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$. Eine Messung zur Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen durch K₃-Grundsubstanz der Konzentration $c_{K_3} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$ bringt Abb. 5. Bei der angegebenen Konzentration und unter den genannten Parametern gelingt, wie wir sehen, auch mit der K₃-Grundsubstanz in vitro eine gute Thermosensibilisierung. Es wurden aber auch etwas schwächere Sensibilisierungen beobachtet, so daß die K₃-Grundsubstanz als Thermosensibilisator weniger günstig erscheint als K₃-natrium-bisulfit. Wie erwartet, wurden bei der leicht in die Zellen eindringenden K₃-Grundsubstanz geringere Unterschiede der Sensibilisierungswirkung von EMAC-Zellsuspension zu EMAC-Zellsuspension als bei K₃-natrium-bisulfit beobachtet.

Abb. 5. Die Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen durch Vitamin K₃-Grundsubstanz (2-Methyl-1.4-naphthochinon) bei der Konzentration $c_{K_3} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$. Anteil L mit Trypanblau angefärbter Zellen als Funktion der Wirkzeit t . LY-Medium.

5.3. Einfluß der Konzentration bei Vitamin K₅

In gleicher Darstellungsart wie Abb. 3 bringt Abb. 6 Messungen zum Einfluß der Vitamin K₅-Konzentration auf die Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen. Auch bei dieser leicht in die Zellen

Abb. 6. Der Einfluß der Sensibilisator-Konzentration c_{K_5} auf die Zeit t_{LD50} für 50% Schädigung von EMAC-Zellen bei Vitamin K₅. Trypanblaufärbetest. LY-Medium.

wie bei der nachfolgenden Hyperthermie. Wir fanden eine sehr beträchtliche Zunahme der Thermosensibilisierung, über die später im Rahmen von Untersuchungen zur Pharmakokinetik des K₃-natrium-bisulfids berichtet werden wird (Abnahme der Hyperthermiedauer t_{LD50} auf etwa 40% bei $\epsilon_Z = 5 \cdot 10^{-3}$, $c_{K_3} = 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$ und 42 °C. Durch diese Voraus-K₃-Einwirkung wird eine Senkung der Hyperthermietemperatur in vivo auf 41 °C möglich).

¹³ M. VON ARDENNE, Kernenergie I, 1029 [1958].

¹⁴ M. VON ARDENNE, K. STEINFELDER u. R. TÜMLER, Z. physik. Chem. 221, 240 [1962].

* Nach der Grundkonzeption zur selektiven Thermosensibilisierung von Krebszellen² soll der zusätzliche chemische Angriff nicht nur während des Hyperthermieschrittes, sondern möglichst auch vor dem Hyperthermieschritt erfolgen. Wir prüften daher experimentell den Einfluß einer 37 °C-90 min-K₃-Vorinkubation mit gleicher K₃-Konzentration

eindringenden Substanz zeigen sich besonders geringe Unterschiede der Sensibilisierungswirkung von EMAC-Zellsuspension zu EMAC-Zellsuspension. Auffallend gegenüber den Messungen an K_3 -natrium-bisulfid und an K_3 -Grundsubstanz ist die sehr viel stärkere Abhängigkeit der Sensibilisierungswirkung von der Konzentration beim Vitamin K_5 . Diese Feststellung und mit ihr verbunden die geringe Sensibilisierungswirkung bei Konzentrationen unter $c_{K_5} = 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$ führen zur Beurteilung, daß Vitamin K_3 als selektiver Thermosensibilisator für Krebszellen dem Vitamin K_5 überlegen erscheint.

5.4. Einfluß der EMAC-Zelldichte

Wegen der hohen Zelldichte, die in vivo im Tumorgewebe besteht ($\varepsilon_Z \approx 0,5$), hat die Frage nach der Wirksamkeit der Thermosensibilisierung bei hoher Zelldichte große praktische Bedeutung. Um die Abhängigkeit der Thermosensibilisierung von der Krebszellendichte zu erforschen, wurden Messungen der Zeit t_{LD50} für 50-proz. Schädigung von EMAC-Zellen bei Variation der Zelldichte zwischen $\varepsilon_Z = 0,5$

bis $5 \cdot 10^{-2}$ vorgenommen. Die zugrunde liegenden weiteren Meßparameter und das durch die Kurven 1 und 2 repräsentierte Ergebnis sind aus Abb. 7 zu entnehmen. Die geradlinige Verlängerung der Kurven ab $\varepsilon_Z > 5 \cdot 10^{-2}$ dient nur dazu, eine rohe Abschätzung bis zur Zelldichte des Körpergewebes zu erleichtern. Bei hoher Konzentration c_{K_3} und guter Sensibilisierungswirkung des Vitamin K_3 (Kurve 1) nimmt die Zeit t_{LD50} bei Verzehnfachung der Zelldichte auf $\varepsilon_Z = 5 \cdot 10^{-2}$ kaum zu, so daß auch bei weiterer Verzehnfachung der Zelldichte auf $\varepsilon_Z = 0,5$ (geschätzte Zelldichte in soliden Tumoren) wohl noch nahezu die volle Sensibilisierungswirkung erwartet werden kann. Die Kurve 1 wurde ebenso wie die Kurve 2 bei einem O_2 -Partialdruck über der Suspension von $p_{O_2} = 700 \text{ Torr}$ gewonnen. Weiter unten wird gezeigt werden, daß die in-vitro-Messung bei diesem hohen O_2 -Druck über der Suspension ungefähr zutreffende Zahlenwerte für die in-vivo-Situation liefert. — Bei der Kurve 2 lag die Sensibilisierungswirkung niedriger. Die Zeit t_{LD50} nimmt hier mit der Zelldichte zu.

Im Hinblick auf den in Abb. 1 angedeuteten Reaktionsmechanismus muß in gewissen Bereichen das intrazellulär gebildete H_2O_2 von den beiden beteiligten Reaktionspartnern, d.h. von der Vitamin K_3 -Konzentration c_{K_3} und vom wahren O_2 -Partialdruck am Ort der Krebszellen $p_{O_2 \text{ eff}}$ abhängen. Um zu vermeiden, daß bei der Zelldichte solider Tumoren t_{LD50} kritisch ansteigt, kommt es darauf an, die Vitamin K_3 -Konzentration in vivo auf einen möglichst hohen Wert zu bringen. Diese Forderung ist erfüllt, wenn der Mechanismus der intrazellulären H_2O_2 -Bildung nicht mehr durch die genannten Reaktionspartner, sondern durch das Reduktionsvermögen der Zellen begrenzt wird (Sättigung). Die Ursache für den Einfluß der Zelldichte im ungesättigten Bereich der K_3 -Konzentration und bei hohem O_2 -Partialdruck ist noch ungeklärt.

Auch für Vitamin K_5 wurde die Abhängigkeit der Thermosensibilisierung von der Krebszellendichte mit den Parametern der Kurven 1 und 2 in Abb. 7 gemessen. So ergab sich mit $c_{K_5} = 3 \cdot 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$ für $\varepsilon_Z = 5 \cdot 10^{-3}$ ein Wert $t_{LD50} = 62 \text{ min}$ und $\varepsilon_Z = 5 \cdot 10^{-2}$ ein Wert $t_{LD50} = 100 \text{ Minuten}$. Die Kurve für Vitamin K_5 verläuft mit diesen Parametern etwa in der Mitte zwischen den Kurven 1 und 2. Sie steigt daher nur langsam mit der Krebszellendichte an.

Abb. 7. Der Einfluß der Krebszellendichte ε_Z auf die Zeit t_{LD50} für 50% Schädigung von EMAC-Zellen bei verschiedenen Werten des wahren Partialdrucks $p_{O_2 \text{ eff}}$ und Vitamin K_3 -natrium-bisulfid als Sensibilisator. Trypanblaufärbetest. LY-Medium. Kurve 3 gilt nicht in vivo!

5.5. Einfluß des O₂-Partialdruckes

Die Kurve 3 in Abb. 7 wurde im gleichen Gang mit der Kurve 2 erhalten, nachdem der O₂-Partialdruck über der Suspension auf 10 Torr erniedrigt worden war. Die Kurve 3 zeigt eine außerordentlich starke Zunahme der Zeit t_{LD50} mit der Zellkonzentration. Aus der Sicht des Mechanismus gemäß Abb. 1 und der benutzten Meßanordnung wurde vermutet, daß diese starke Zunahme in vivo nicht erfolgt, sondern in unserer Anordnung durch *kritisches Absinken des wahren O₂-Partialdruckes* $pO_{2\text{eff}}$ am Ort der Zellen infolge des O₂-Verbrauches durch die Zellatmung bedingt ist. Diese Vermutung bestätigte sich. Bei der Messung der Kurve 3 betrug die Höhe der Suspensionsschicht im Meßgefäß etwa 9 mm und die Schüttelfrequenz lag etwa bei 100 min⁻¹. Durch elektrochemische Messung des O₂-Partialdruckes in der Suspension fanden wir, daß bereits bei der Zelldichte $\epsilon_Z = 5 \cdot 10^{-3}$ ein Absinken des wahren Partialdruckes auf $pO_{2\text{eff}} = 5$ Torr und bei der Zelldichte $\epsilon_Z = 5 \cdot 10^{-2}$ ein Absinken auf 0,5 Torr eintritt. Die Abnahme der Sensibilisierungswirkung mit Zunahme der Zelldichte ist bei dieser Messung also hauptsächlich durch das Absinken des O₂-Partialdruckes am Ort der Krebszellen bedingt. Die Kurve 3 ist daher nicht repräsentativ für die in-vivo-Situation.

Den Einfluß des wahren O₂-Partialdruckes in der Zellsuspension auf die Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen durch Vitamin K₃-natrium-bisulfit zeigt das Beispiel Abb. 8. Hier ist die Zunahme der Zeit für 50% Zellenanfärbung Δt_{LD50} als Funktion des

Abb. 8. Beispiel für die Zunahme Δt_{LD50} gegenüber dem bei $pO_{2\text{eff}} = 10$ Torr gemessenen Wert t_{LD50} (= 65 min) als Funktion des wahren Sauerstoffdruckes $pO_{2\text{eff}}$ in der Suspension. Bis herab zu Drucken $pO_{2\text{eff}} = 1,5$ Torr bleibt hier die Thermosensibilisierung mit Vitamin K₃ nahezu unvermindert bestehen.

wahren Druckes $pO_{2\text{eff}}$ aufgetragen. Aus dem Verlauf der Kurve im Beispiel Abb. 8 ist zu entnehmen, daß eine kritische Verschlechterung der Thermosensibilisierung bei den angegebenen sonstigen Parametern erst dann eintritt, wenn der wahre O₂-Partialdruck unter etwa $pO_{2\text{eff}} = 1,5$ Torr absinkt. Daß bei der Thermosensibilisierung mit intrazellulärer H₂O₂-Entwicklung dieser Übergang bei etwa 1/10 des O₂-Druckes liegt, den KAYSER¹⁵ bei der Untersuchung der normothermen Schädigungswirkung von Chinonen als Übergangswert (20 Torr über der Suspension, $pO_{2\text{eff}} \approx 15$ Torr) gefunden hat, dürfte darin liegen, daß man bei der Thermosensibilisierung, wie oben erwähnt, mit etwa 1/10 der H₂O₂-Konzentration für Zellschädigung auskommt. — Für Metastasen, bei denen der O₂-Partialdruck auf Werte zwischen 10 und 20 Torr geschätzt wird und für solide Tumoren, deren O₂-Partialdruck bekanntlich zwischen etwa 1 und 10 Torr liegt, dürfte nach dem Verlauf der in Abb. 8 wiedergegebenen Kurve die Thermosensibilisierung mit Vitamin K₃ (bzw. auch K₅) nicht wesentlich durch O₂-Mangel beeinträchtigt werden.

Mit gleicher Substanz und möglichst gleichen Ausgangsbedingungen kurz nacheinander durchgeführte Messungen zur Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen bei einem wahren O₂-Druck in der Suspension von etwa $pO_{2\text{eff}} = 2$ Torr bzw. 700 Torr sind in Abb. 9 A und B wiedergegeben. Diese Messungen bestätigen ebenfalls die wichtige Tatsache, daß die Thermosensibilisierung mit Vitamin K₃-natrium-bisulfit noch bei erstaunlich niedrigem O₂-Partialdruck gelingt. — In Abb. 9 B ist noch eine Messung für 37 °C mit eingetragen. Aus ihr geht hervor, daß auch schon der chemische Angriff durch Vitamin K₃-natrium-bisulfit allein bei sehr geringer Krebszellendichte nach langer Dauer schädigend wirkt. Diese Schädigung reicht aber unter in-vivo-Bedingungen noch nicht aus, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen¹¹.

5.6. Einfluß der K₃-Auswaschung nach Beginn der Zellschädigung

Bei verschiedenen Versuchen mit stark unterschiedlicher Vitamin K₃-Konzentration zeigte sich, daß die Steilheit der Anfärbungskurve bei zeitlich stark untereinander abweichendem Einsatz des Anstieges nahezu den gleichen Wert beibehält. Diese Beobachtung legte den Gedanken nahe, daß die pri-

¹⁵ D. KAYSER, Z. Naturforschg. **19 b**, 258 [1964].

Abb. 9. Selektive Sensibilisierung von Krebszellen gegen Wärme durch Vitamin K_3 -natrium-bisulfit (Suspension kleiner Empfindlichkeit) bei kleinem (A) und großem (B) Sauerstoffpartialdruck. Anteil L mit Trypanblau angefärbter Zellen als Funktion der Wirkzeit t . LY-Medium.

märe (therapeutisch wirksame) Zellschädigung schon bei kleiner Anfärbungsrate erfolgt und anschließend die weitere Schädigung der Zellen sich ohne K_3 -Wirkung weiter fortsetzt. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurde bei der Meßreihe Abb. 9 B mit der Konzentration $c_{K_3} = 1 \cdot 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$ nach $t = 70 \text{ min}$ das Vitamin K_3 ausgewaschen. Trotzdem wurde nach 105 min eine Erhöhung der Färbungsrate auf $L = 90\%$ gefunden, so daß unsere Annahme sich zu bestätigen scheint. Die ohne Auswaschung aufgenommene Kontrollkurve ergab nach 105 min die Färbungsrate $L = 85\%$, also fast den gleichen Wert.

5.7. Einfluß des p_H -Wertes

Messungen zum Einfluß des p_H -Wertes auf die Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen durch Vit-

Abb. 10. Der Einfluß des p_H -Wertes auf die Thermosensibilisierung von EMAC-Zellen bei Vitamin K_3 -natrium-bisulfit*. Die Zeit t für eine Trypanblaufärbung mit $L = 50\%$ für p_H -Werte zwischen 6 und 8.

amin K_3 -natrium-bisulfit sind in Abb. 10 wiedergegeben. Für diese Beispiele wurde ermittelt, daß erst bei Absinken des p_H -Wertes unter etwa 6,7 die Thermosensibilisierung schlechter wird. Aus diesem Befund ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

Da die normale Übersäuerung der Krebszellen im Gewebe den p_H -Wert kaum unter 7,0 sinken läßt¹⁶, dürfte in vivo infolge der Milchsäuregärung der Krebszellen keine Beeinträchtigung der Thermosensibilisierung durch Vitamin K_3 erfolgen.

Bei zusätzlicher selektiver Thermosensibilisierung mit langzeitiger starker Übersäuerung der Krebszellen ($p_H = 6,5$) durch künstliche Hyperglykämie (s. auch 8.1) vor dem Hyperthermie-Schritt² ist (mit Rücksicht auf den Wertbereich der Milchsäureaustausch-Zeitkonstanten τ_A) darauf zu achten, daß die Blutzuckerkonzentration etwa zwei Std. vor der Vitamin K_3 -Gabe wieder normalisiert wird, ehe dann im optimalen Zeitabstand der Hyperthermie-Schritt eingeleitet wird.

5.8. Messungen zum K_3 -Verbrauch durch die EMAC-Zellen *

Aus den in Abb. 11 gebrachten Messungen zum K_3 -Verbrauch durch die EMAC-Zellen deutet sich an, daß unter diesen Bedingungen kein wesentlicher Verbrauch stattfindet. Dieses Ergebnis ist nach dem Reaktionsschema Abb. 1 nicht überraschend. Seine praktische Bedeutung liegt darin, daß es die

* Die intrazelluläre H_2O_2 -Bildung nach Abb. 1 stagniert bei einem p_H -Wert von 6,5 (O. Warburg et al., Z. Naturforsch. 14b, 711 [1959]). Die Stagnation der Thermosensibilisierung mit Vitamin K_3 bei dem gleichen p_H -Wert ist ein weiterer experimenteller Hinweis auf den angenommenen Reaktionsmechanismus.

¹⁶ M. von ARDENNE u. F. RIEGER, Z. Naturforsch. 21b, 472 [1966].

* Noch im Forschungsstadium. (M. von ARDENNE, P. G. REITNAUER u. F. RIEGER, Zur Pharmakokinetik des Vitamin K_3 -natriumbisulfit als Thermosensibilisator für Krebszellen. In Vorbereitung.)

Erzielung einer *Sensibilisierungsdosis mit geringer Dosisstreuung im ganzen Körpervolumen* in Aussicht stellt. Da, wie schon wiederholt betont, auch die Temperaturdosis im Körpervolumen bei geeigneter Hyperthermietechnik nur wenig streut², scheinen damit entscheidende *theoretische Voraussetzungen für die Erzielung einer Therapie hoher Gesamtselektivität erfüllt* zu sein.

Abb. 11. Kein wesentlicher Vitamin K₃-Verbrauch durch EMAC-Zellen. Anteil L mit Trypanblau angefärbter Zellen als Funktion der Wirkzeit *t*. LY-Medium. Kurve 1: Erste Inkubation. Kurve 2: Zweite Inkubation mit neuen Zellen im Filtrat der ersten (42 °C — 100 min) Inkubation. Kurve 3: Dritte Inkubation in vorher zellfrei mit 42 °C — 100 min vorbehandelter K₃-LY-Lösung. [K₃-natrium-bisulfit, Empfindliche Zellsuspension.]

6. Toxische Daten und in-vivo-Dosierung des Vitamin K₃ bzw. K₅

Im Rahmen dieses Abschnittes soll nur eine erste *rohe Einschätzung zur Größe der in vivo voraussichtlich erzielbaren Vitamin K₃ bzw. K₅-Konzentrationen* gegeben werden. Für Vitamin K₃-natrium-bisulfit konnten zu dieser Frage einige Anhaltspunkte aus der Literatur entnommen werden.

6.1. Zur Situation bei Vitamin K₃-natrium-bisulfit

Bei ihrem unter normaler Körpertemperatur der Maus (ca. 35,5 °C) ohne Erfolg durchgeführten Therapie-Versuch konnten STRASSNER, PRADEL und NEUBERT¹¹ bei K₃-natrium-bisulfit eine Dosis von 0,17 g kg⁻¹ unter guter Verträglichkeit intraperitoneal applizieren. Bezogen auf den Menschen und sein Wasservolumen (50 l Wasser bei 75 kg Kör-

pergewicht) entspräche diese Dosis bei idealer Verteilung und fehlenden Abbau- bzw. Ausscheidungsverlusten einer Konzentration in wäßriger Lösung von $c_{K_3} = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ g ml}^{-1}$. Bei optimierter Applikation (schonende i. v. Dauerinfusion, Schutz gegen Hämoglobinbildung z. B. durch Methylenblau* F. HAUSCHILD 1937) beim Menschen und des von uns gefundenen 37° bis 42 °C Temperaturfaktors (1,5) erwarten wir eine verträgliche Dosis von $0,06 \div 0,08 \text{ g kg}^{-1}$ (s. unten Tab. 1). *Dieser Dosis würde im Idealfall die noch relativ hohe Konzentration $c_{K_3} \approx 1,2 \cdot 10^{-4} \text{ g ml}^{-1}$ entsprechen.* Welcher Anteil der so geschätzten c_{K_3} -Werte am Ort der Krebszellen wirksam sind, wird z. Zt. untersucht.

Als mit Sicherheit zu niedrig benannte „maximale Vitamindosen“ werden für den Menschen 50 mg K₃-natrium-bisulfit pro Person (i. v.) angegeben¹⁷ oder auch 100 mg⁸ bei i. m.-Applikation. Nach Versuchen mit 200 min Dauerinfusion usw. (s. oben) dürften sehr viel höhere Dosen (insbesondere ohne kritische Hämolyse und Hämoglobinbindung) vertragen werden.

6.2. Zur Situation bei Vitamin K₃-Grundsubstanz und bei Vitamin K₅

Von HAUSCHILD¹⁸ und STEPP et al.¹⁹ werden folgende tödlichen K₃-Grundsubstanz-Dosen angegeben:

Hund	0,11 g kg ⁻¹	} s. c.
Kaninchen	0,12 g kg ⁻¹	
Küken	0,25 g kg ⁻¹	
Maus	0,20 g kg ⁻¹	} i.p und s. c.
	1,0 g kg ⁻¹	
		} oral

Messungen über *toxische Daten der K-Vitamine bei Hyperthermie* fehlten vollkommen, weil bisher kein Interesse für diese spezielle Frage bestand. Weiter standen uns keine Messungen über toxische Daten des Vitamin K₅ zur Verfügung. Schließlich erschien es uns aus der Sicht unserer Problematik wichtig, den Unterschied der Giftigkeit zwischen intraperitonealer und oraler Applikation der hier interessierenden K-Vitamine genauer kennenzulernen. Aus diesen Gründen waren wir gezwungen, eigene Messungen mit der bei unserer Untersuchung benutzten Spezies (Maus) durchzuführen, die im oberen Teil der Tab. 1 zusammengefaßt sind. Aus

¹⁷ Vitamin-Vademecum. Deutsche Hoffmann-La Roche AG, Grenzbach/Baden 1952, S. 39.

¹⁸ F. HAUSCHILD, Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie. VEB Georg Thieme-Verlag, Leipzig 1961, S. 483.

¹⁹ W. STEPP, J. KÜLNAU u. H. SCHROEDER, Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Ferdinand Encke, Stuttgart

* Wir entdeckten inzwischen, daß die *Sensibilisierung mit K₃ durch Methylenblau* ($c_M = 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$) *sehr verstärkt* wird. Zum Beispiel ging t_{LD50} bei $c_{K_3} = 10^{-5} \text{ g ml}^{-1}$ von 105 min auf 40 min zurück!

Spezies	Dosis (Konzentration)	Applikation	K ₃ natrium- bisulfit	Grund- substanz	K ₅	
Maus (gemessen)	Mittlere letale Dosis LD ₅₀ bei 37 °C	i. p.	0,5	0,25	0,25	g kg ⁻¹
		oral	2,5	1,25		g kg ⁻¹
	Verträgliche Dosis bei 41 °C	i. p.	0,1	0,05	0,05	g kg ⁻¹
		oral	0,5	0,25		g kg ⁻¹
	Konzentration c _{K₃} im Verteilungs- volumen für verträgliche Dosis bei 41 °C	i. p.	1,5 · 10 ⁻⁴	7,5 · 10 ⁻⁵	7,5 · 10 ⁻⁵	g ml ⁻¹
		oral	7,5 · 10 ⁻⁴	3,8 · 10 ⁻⁴		g ml ⁻¹
Mensch (geschätzt)	Verträgliche Dosis bei 41 °C und optimierter Dauerinfusion (im Forschungsstadium)	i. v. (schonend)	(0,07 ?)	(0,035 ?)	—	g kg ⁻¹
	Konzentration c ₃ im Verteilungs- volumen für verträgliche Dosis bei 41 °C	i. v. (schonend)	(1 · 10 ⁻⁴)	(5 · 10 ⁻⁵)	—	g ml ⁻¹

Tab. 1. Toxische Daten von Vitamin K₃ und K₅.

den Zahlenwerten geht hervor, daß bei *Hyperthermie* die Toxizität der K-Vitamine nicht wesentlich zunimmt, obwohl ein schmaler Dosisbereich gefunden wurde, wo die Dosis bei 41 °C letal wirkt und bei 37 °C vertragen wird. Bei letaler Dosis und Hyperthermie starben die Tiere nicht während der Hyperthermie, sondern je nach der Überdosis erst einen bis einige Tage später. Bei Überdosierung scheint eine Erythrozytenschädigung (Hämoglobinbildung u.s.w.) durch Überspielung des Katalaseschutzes einzutreten. Wir erhielten keine Hinweise darauf, daß die Schädigungen bei Überdosierung auf Thrombosen zurückzuführen waren. — Bemerkenswert ist der große Unterschied der Dosiswerte zwischen intraperitonealer und oraler Gabe, die sowohl bei K₃-natrium-bisulfit als auch bei K₃-Grundsubstanz durch den Faktor 5 gekennzeichnet wird. Für K₅ wurden praktisch die gleichen Zahlenwerte wie für K₃-Grundsubstanz gefunden.

Im unteren Teil der Tab. 1 werden aus den oben zitierten Angaben der Literatur und aus den an Kleintieren erzielten Befunden Zahlenwerte abgeschätzt, die beim menschlichen Organismus erzielbar sein sollten. Die Zahlenwerte liegen um den Faktor 1/6 unter den bei der Species Maus für orale Applikation als verträglich gefundenen Werten.

Die in Tab. 1 zusammengefaßten Zahlenwerte enthielten für alle drei K-Vitamine eine im Vergleich zu anderen Chinonen bzw. Chinon-Derivaten²⁰ bemerkenswert niedrige Toxizität. Für die Optimierung der selektiven Thermosensibilisierung von Krebszellen mit den recht günstigen K₃-Präparaten in vivo ist im Anschluß an unsere orientierenden

Vorversuche eine Untersuchung zur Pharmakokinetik des Vitamin K₃ eingeleitet u. a. Auskunft geben über die günstigste Programmierung der Applikation, über die Zeitkonstanten der K₃-Abnahme im Blutplasma, Vollblut und Kreislauf, sowie vor allen Dingen über die Höhe und Streuung der sensibilisierenden Dosis im Körpergewebe.

Im Hinblick auf unsere in-vitro-Messungen und nach den bestimmten c_{K₃}-Werten hinreichender Verträglichkeit bestand Aussicht, daß bei Verwendung von K₃-Präparaten eine befriedigende in-vivo-Thermosensibilisierung gelingt. Deshalb wurden folgende in-vivo-Versuche mit Kleintieren zur Thermosensibilisierung mit K₃ unternommen.

7. Versuche mit Vitamin K₃ zur selektiven Thermosensibilisierung von Krebszellen in vivo und zur Therapie mit Sensibilisierung

In einem orientierenden Versuch an insgesamt 50 weißen Mäusen* testeten wir die *selektive Thermosensibilisierung in vivo beim Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom durch Vitamin K₃*. Einen Überblick über Anlage des Versuches und die erzielten Ergebnisse vermittelt Tab. 2.

Alle Tiere erhielten am 1. Versuchstag jeweils 0,5 ml einer 20-vol.-proz. Suspension mit LY gewaschener EMAC-Zellen in physiologischer NaCl-Lösung in die Leibeshöhle gespritzt ($\cong 0,1$ ml Zellen pro Tier). Am 2. Versuchstag wurde K₃-Grundsubstanz in ölicher und K₃-natrium-bisulfit in wäßriger Lösung — in allen Fällen in einer Menge von

²⁰ J. PÜTTER, Arzneimittelforschg. **10**, 8 [1960].

* Dem VEB Arzneimittelwerk Dresden danken wir für die Überlassung von einwandfreiem Tiermaterial.

Gruppe Tiere		Therapeutische Behandlung					Ergebnisse nach zwei Kriterien									
Ver- such Kont- rolle	Zahl	Sensibilisier.		Medikation	Dosis [g kg ⁻¹]	Hyperther- mie		1. Angezeit- verzögerung*		2. In 9 Tagen gebildete Tumor- zellenmasse						
		Vitamin K ₃ als	Appli- kation	[°C]		[min]	Angeh- zeit [Tage]	Ver- zöge- rung [Tage]	Schä- dig. L. [%]	Asc.- Tumo mor [g]	Zell- dichte [εz]	Tumorzellen- masse		Schä- dig. L. [%]	Exitus**	
												[g]	[g]			[%]
V 1	5	natr.-bisulf.	oral	0,5	41	40	5,5	2	90	5,4	29,5	1,59	52,8	91	1	
K 1	5	natr.-bisulf.	oral	0,5	—	—	3,5	0	0	8,16	34,2	2,79	92,8	48	0	
V 2	5	natr.-bisulf.	i. p.	0,17	41	40	5,5	2	90	3,5	28,0	0,98	32,6	96	3	
K 2	5	natr.-bisulf.	i. p.	0,17	—	—	5	1,5	82	6,6	22,0	1,45	48,2	93	0	
V 3	10	Grundsubst.	oral	0,4	41	40	5	1,5	82	5,0	47,6	2,38	79,0	74	7	
K 3	5	Grundsubst.	oral	0,4	—	—	3,5	0	0	9,57	30,8	2,94	97,7	30	0	
K 4	8	—	—	—	41	40	4	0,5	45	7,84	33,4	2,62	87,0	60	3	
K 5	7	—	—	—	—	—	3,5	—	—	8,85	34,4	3,01	100	—	0	
Σ	50														14	

Tab. 2. Anlage und Ergebnisse eines orientierenden Versuches zur selektiven Thermosensibilisierung in vivo beim Ehrlich-Mäuse-Ascites-Carcinom durch Vitamin K₃. * Gegenüber Kontrolle ohne Behandlung (K 5). ** Vor Angehen des Tumors.

0,02 ml g⁻¹ Körpergewicht — mit den in der Tabelle angegebenen Dosen appliziert. Die Hyperthermiebehandlung in einer speziellen Einrichtung²² begann 15 min nach der intraperitonealen und 120 min nach der mittels Schlundsonde durchgeführten oralen Applikation. Wir wählten zur Vermeidung zu großer Verluste eine mit ausreichender Wahrscheinlichkeit von den Tieren tolerierte, aber therapeutisch sehr (zu) niedrige Hyperthermie-Dosis von 41 °C — 40 Minuten. Zu diesem Zweck wurden die Mäuse in Schräglage bis auf den Kopf sofort in 41 °C-Wasser eingebracht und 42 min darin belassen. Die Körpertemperatur stieg hierbei sehr schnell auf die Wassertemperatur an. Nach dem Bad wurden die Tiere mit Zellstoff abgerieben und im Lichtkasten getrocknet.

Die Ermittlung der in Tab. 2 dargestellten Behandlungsergebnisse erfolgte wie bereits in l. c.²³ beschrieben. Das Resultat des Versuches läßt sich danach wie folgt zusammenfassen:

In Übereinstimmung mit den toxikologischen Daten der Tab. 1 und mit den in-vitro-Messungen zur Thermosensibilisierung erweist sich auch in vivo das K₃-natrium-bisulfit als Thermosensibilisator der K₃-Grundsubstanz überlegen. — Im Gegensatz zu l. c.¹¹ finden wir schon bei normaler Temperatur und intraperitonealer Applikation von K₃-natrium-

bisulfit der gleichen hohen Dosis 0,17 g kg⁻¹ einen beachtlichen therapeutischen Effekt (Versuchsgruppe K 2). — *Bei oraler Applikation wurde ohne Hyperthermie in keinem Falle ein bedeutender therapeutischer Effekt beobachtet.* — Der therapeutische Effekt einer 41 °C-40 min-Hyperthermie allein blieb niedrig (Versuchsgruppe K 4). Die relativ hohe Letalität bei der Versuchsgruppe K 4 mit der genannten Hyperthermiedosis allein zeigt, daß die gewählte Hyperthermiedosis gerade an der Grenze der für die Spezies Maus im Versuch anwendbaren Dosis liegt. — Die Gegenüberstellung der Letalität bei der Versuchsgruppe K 4 mit der Versuchsgruppe V 1 deutet an, daß durch K₃-natrium-bisulfit der angegebenen Dosis die Letalität nicht wesentlich zunimmt, d. h. keine kritische Schädigung gesunder Zellen im Organismus eintritt. Das ist im Zusammenhang mit dem folgenden Befund ein Hinweis auf die auch in vivo gegebene hohe Selektivität dieser Thermosensibilisierung. — Die Gegenüberstellung der Versuchsgruppen V 1 und K 1 zeigt, daß *bei oraler Applikation einer noch verträglichen Dosis K₃-natrium-bisulfit (2 h vor dem Hyperthermieschritt!) eine so ausgezeichnete in-vivo-Thermosensibilisierung der Krebszellen im intraperitonealen Raum stattfindet, daß schon mit der sehr geringen Hyperthermiedosis 41 °C — 40 min eine therapeutische Schädigung von*

²² M. VON ARDENNE, Theoretische und experimentelle Grundlagen der Krebs-Mehrschritt-Therapie; loc. cit. S. 358 (von ARDENNE-REITNAUER, Kleintier-Hyperthermie-Einrichtung).

²³ M. VON ARDENNE u. P. G. REITNAUER, Acta biol. et med. germ. 16, 42 [1966].

90% der Krebszellen eintritt*. Dieses Ergebnis harmoniert mit unseren in-vitro-Messungen mit dem strengerem Trypanblautest. Bei Anwendung einer höher Hyperthermiedosis, z. B. 41 °C – 60 min, wie sie beim Menschen möglich ist, sollten sich noch wesentlich bessere therapeutische Erfolge erzielen lassen.

8. Hochselektive Krebszellenvernichtung durch Verstärkung natürlicher Prozesse des Organismus

Zusammenfassend können wir feststellen, daß bei der „Krebs-Mehrschritt-Therapie“ mit selektiver Thermosensibilisierung der Krebszellen durch K-Vitamine die *selektiven Angriffe durch Verstärkung von Prozessen erfolgen, die als natürliche Prozesse im Organismus ablaufen oder ablaufen können*. Wir meinen hier die Verstärkung der Krebszellengärung, die Vergrößerung des Gehaltes an K-Vitamin und die Erhöhung der Temperatur im Rahmen der Mehrschritt-Therapie.

8.1. Selektive Thermosensibilisierung durch langzeitige starke in-vivo-Übersäuerung der Krebszellen in Verbindung mit bei $p_H = 6,5$ aktivierten Zellgiften

Einer der Verfasser hatte schon vor längerer Zeit vorgeschlagen²¹, die in-vivo-Krebszellengärung während der Therapie durch zeitweilige Erhöhung der Blutglucose-Konzentration auf z. B. $3 \cdot 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$ zu verstärken. In einer weiteren Arbeit¹⁶ wurde mathematisch abgeschätzt, daß in diesem Fall eine selektive Übersäuerung des Krebsgewebes zwischen $p_H = 6,3$ bis $6,7$ zu erwarten ist, während bei normaler Blutglucose-Konzentration nur eine Absenkung auf $p_H = 6,95$ bis $7,15$ abgeschätzt wurde. Einige Monate nach Veröffentlichung dieser Abschätzungen aus unserer mathematischen in-vivo-Theorie des Gärungsstoffwechsels der Krebszellen

schwülste erschien die Arbeit von ASHBY²⁴ mit Ergebnissen über unmittelbare Messungen des p_H -Wertes in Tumoren nach künstlich auf etwa $3 \cdot 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$ erhöhter Blutglucose-Konzentration und bei normaler Blutglucose-Konzentration ($1 \cdot 10^{-3} \text{ g ml}^{-1}$). Für den Fall mit erhöhter Blutglucose-Konzentration findet ASHBY den p_H -Bereich von 6,29 bis 6,78 (Mittelwert 6,54) in ausgezeichneter Übereinstimmung mit unserer Berechnung. Für normale Blutglucose-Konzentration ermittelte er den p_H -Bereich 6,63 bis 6,9 (Mittelwert 6,80) ebenfalls in guter Übereinstimmung mit unserer Berechnung. Aus den mitgeteilten Zahlenwerten und aus klinischen Erfahrungen bei Hyperglykämie mit Kontrolle des Patienten folgt, daß *ein selektiver in-vivo-Angriff auf die Krebszellen durch ihre langzeitige Übersäuerung mit Werten um $p_H 6,5$ in Verbindung mit bei diesem p_H aktivierten Zellgiften* ²⁵ gute Erfolgsaussichten besitzt²⁵. Ist dieser Angriff so gestaltet, daß besonders die wärmeempfindlichen Systeme der Krebszellen getroffen werden, muß sich eine zusätzliche selektive Thermosensibilisierung ergeben. Die Forschungen zur selektiven Thermosensibilisierung auf diesem Wege stehen noch in den Anfängen. Dieser Weg bildet eine methodische Reserve, falls der folgende bereits gangbare Weg noch nicht ausreicht.

8.2. Selektive Thermosensibilisierung durch Erhöhung von Vitamin K-Gehalt

Vitamine der K-Reihe sind relativ ungiftige Stoffe, die z. T. von Natur aus im lebenden Organismus mit nicht für die Sensibilisierung ausreichender Konzentration vorkommen. Eine gute *Übersicht über die Wirkung der Thermosensibilisierung von Krebszellen durch K-Vitamine in der angegebenen Konzentration* (ohne vorausgehenden Schritt gemäß 8.1) gibt die in Abb. 12 gebrachte Darstellung der Meßwerte. Hier ist die Abhängigkeit der Zeit für 50-proz. Schädigung von EMAC-Zellen von der Tem-

* Bei einer Wiederholung dieses Versuches mit 75 Tieren fanden wir eine Schädigungsquote von $L = 95\%$ der EMAC-Zellen (M. v. ARDENNE u. P. G. REITNAUER, Dtsch. Gesundheitswes. **22**, im Druck [1967]. — Bei einem weiteren Versuch mit 46 Tieren und einem soliden Tumor (PVC-2240, Berlin-Buch) wurde ebenfalls ein deutlicher Therapieeffekt bei gleichen Dosen beobachtet, obwohl, wie bei den vorausgehenden Versuchen, noch keine optimierte K₂-Applikation (Dauerinfusion, Methylenblauzugabe) erfolgte.

²¹ M. v. ARDENNE, Syncarcinokolyse in Gestalt der Mehrschritt-Chemotherapie. Vortrag im Heidelberger Krebsforschungszentrum am 25. 9. 1965.

²⁴ B. S. ASHBY, Lancet **1966**, 312.

²⁵ Zum Beispiel Substanzen, die bei Absinken des p_H von 7,4 auf 6,5 durch einen irreversiblen katalysierten Reaktionsmechanismus aufgefittet werden. — Messungen mit langzeitiger Übersäuerung von außen (6 ÷ 12 h, $p_H 6,4$, Milchsäure) zeigten, daß (ohne Aktivierung eines Pharmakons) keine signifikante Thermosensibilisierung eintritt. Messungen mit langzeitiger intrazellulärer Übersäuerung (12 h, $c_{GK} > 10^{-4} \text{ g ml}^{-1}$, $p_H \approx 6,5$, in vivo erzielbar) ließen eine gewisse Steigerung der Wärmeempfindlichkeit erkennen.

²⁵ M. v. ARDENNE u. F. RIEGER, Z. Naturforsch. **22b**, im Druck [1967] (Arbeitsprinzip und konkrete Hinweise).

Abb. 12. Zeit t_{LD50} für 50%-Anfärbung (bzw. die Zeit t für Schädigung) von EMAC-Zellen als Funktion der Temperatur mit und ohne Thermosensibilisierung durch Vitamin K₃-natrium-bisulfit. Trypanblaufärbetest. LY-Medium. * Die LD50-Hyperthermiezeit beim Trypanblautest ist etwa doppelt so lang, wie die Hyperthermiezeit beim Wiederverimpfungstest!

peratur während der Hyperthermie der Suspension bzw. des Gewebes mit und ohne Thermosensibilisierung eingetragen. Als Kriterium diente wieder der Trypanblau-Test. Ohne Thermosensibilisierung ergibt sich eine mit zunehmender Temperatur steil abfallende Kurve mit sehr hohen Werten der Temperaturdosis. Der Verlauf dieser Kurve ist praktisch unabhängig von der Zelldichte. — Mit Thermosensibilisierung ergibt sich bei den angegebenen Parametern, insbesondere bei der zugrunde liegenden Zelldichte, eine mit steigender Temperatur verhältnismäßig langsam abfallende Kurve mit relativ niedrigen Temperaturdosen. Die beiden Kurven würden sich bei Temperaturwerten über 45 °C dort berühren, wo der thermische Angriff auf die Zelle den chemischen K₃-Angriff weit an Stärke überwiegt. Bei den niedrigen Temperaturwerten der Kurve mit Thermosensibilisierung überwiegt umgekehrt der chemische Angriff auf die Zelle. Betrachten wir den Kurvenabstand für einen bestimmten Wert der Zeit t_{LD50} , so ergibt sich die durch die Sensibilisierung erreichte Senkung der Hyperthermiemtemperatur. In dem gezeichneten Beispiel für $t_{LD50} = 100$ min be-

trägt die Temperaturverringerung 5 °C. Da im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus Abb. 1 diese Temperaturherabsetzung im wesentlichen selektiv nur für Krebszellen stattfindet, bedeuten die genannten Zahlen eine außerordentliche Steigerung der Therapieselektivität. Aus den im Abschnitt 5.4 kommentierten Messungen wissen wir, daß bei höherer Zelldichte nur unter sehr günstigen Umständen die Thermosensibilisierung nahezu unverändert wirksam bleibt. In der Regel wird man aber bei den im Tumorgewebe vorliegenden Zelldichten mit einer nicht unbeträchtlichen Abnahme der Sensibilisierungswirkung rechnen müssen (s. z. B. oben Abb. 7, Kurve 2)*. Diese Abnahme läßt sich, wie spezielle Messungen zeigten, mildern, wenn schon vor dem Hyperthermieschritt längere Zeit (z. B. 90 min) eine 37 °C-K₃-Einwirkung vorgesehen wird. Dann ergibt sich etwa die in vivo-Kurve der Abb. 12. Aus der Sicht der Ergebnisse dieser Arbeit läßt sich abschätzen, daß allein schon durch die Thermosensibilisierung mit Hilfe von K₃ (also ohne zusätzlichen Einsatz der weiteren gefundenen Sensibilisierungsarten) diese Temperaturdosis auf Werte (≈ 41 °C – 40 bis 60 min) gemindert wird, die bei Einsatz unserer Hyperthermie- und Kontrolleinrichtungen auch älteren Patienten zumutbar sind. Bei den in diesem Abschnitt besprochenen Arten der Thermosensibilisierung beruht die Selektivität hauptsächlich auf der Ausnutzung jener Unterschiede, die nach O. WARBURG für im Körper lebenden Krebszellen generell charakteristisch sind (Gärungsstoffwechsel bzw. Übersäuerung und Katalasearmut). Hierauf und auf dem gefundenen Wirksambleiben der Thermosensibilisierung bis herab zu O₂-Partialdrucken von nur 1 Torr gründet sich unsere Hoffnung, daß die künftige Krebs-Mehrschritt-Therapie eine universelle Krebstherapie sein wird.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden im Auftrag des Staatssekretariats für Forschung und Technik der DDR, Berlin, durchgeführt. Für Hilfen bei der experimentellen Arbeit sind wir unseren Mitarbeitern Frl. CH. LOSE, Frau M. KRUSCHE und Frl. A. ZSCHORN zu Dank verpflichtet. Verschiedene präparative Arbeiten hatte Herr Dr. W. KRÜGER freundlicherweise übernommen. Dem VEB Berlin-Chemie (Dr. KELLER) danken wir für die schnelle Bereitstellung der benötigten Substanzen.

* Zur zusätzlichen Schädigung von Tumorbereichen, die aus Versorgungsgründen ($\tau_A - K_3$, p_{O_2}) therapeutisch am schwersten zu erreichen sind, könnte ein synchroner Angriff mit *Clostridium butyricum* zweckmäßig sein. (J. R. MÖSE u. G. MÖSE, Cancer Res. 24, 212 [1964] und weitere Arbeiten. D. KAYSER, Z. Naturforsch. 17b, 658 [1962].)