

Redaktion

F. Christ, München
 W. Rößling, Heidelberg

U.G.A. Sattler · S. Walenta · W. Mueller-Klieser

Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz

Laktat und Redoxstatus in malignen Tumoren

Pathophysiologisch zeichnen sich solide maligne Tumoren durch eine deutliche Gewebeacidose und -hypoxie [7] sowie durch eine verstärkte Bildung und Akkumulation von Laktat aus [19]. Letzteres entsteht in erster Linie durch eine Erhöhung der Glykolyserate, die durch eine gesteigerte Expression oder z. T. auch durch die biochemische Aktivierung glykolytischer Enzyme und membranständiger Glukosetransporter als Konsequenz metabolischer sowie onkogener Regulierungen bedingt ist. Eine Hypoxie kann die Energieproduktion zur anaeroben Glykolyse mit Laktatproduktion verlagern, aber viele Tumoren weisen auch beim Vorhandensein von Sauerstoff eine erhebliche Laktatbildung auf. Dieses Phänomen, bekannt als „aerobe Glykolyse“ oder „Warburg-Effekt“, gilt i. Allg. als das Ergebnis onkogener Veränderungen im Glukosestoffwechsel nach maligner Transformation [4, 18].

Klinische Bedeutung der Laktatakkumulation in Primärtumoren

Selbst wenn verschiedene tumoröse Läsionen im gleichen klinischen Stadium und mit dem gleichen histologischen „grading“ miteinander verglichen werden, zeigt sich, dass die Laktatakkumulation extrem variabel ist. Die klinische Relevanz dieses Phänomens ist durch meh-

Gewidmet Herrn Prof. Dr. med. Rolf Zander für die jahrzehntelange Zusammenarbeit im Physiologischen Institut.

rere unabhängige Studien an Patienten aus drei unterschiedlichen Tumorentitäten erwiesen: Hohe Laktatkonzentrationen in der Primärläsion zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren prädiktiv für ein erhöhtes Metastasierungsrisiko bei Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri [20] und der Kopf-Hals-Region [2] sowie bei Adenokarzinomen des Rektums [21]. Bei den beiden erstgenannten Entitäten waren überdies sowohl Gesamtüberleben als auch krankheitsfreies Überleben signifikant kürzer als bei Patienten mit Tumoren, die niedrige Laktatkonzentrationen aufwiesen [2, 20]. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass Tumoren mit hohen Laktatkonzentrationen – verglichen mit Tumoren mit niedrigen Laktatkonzentrationen – einen höheren Malignitätsgrad und eine höhere Aggressivität aufweisen sowie klinisch mit kürzeren Überlebenszeiten assoziiert sind.

Glykolyse und Malignität

Auch wenn wir weit davon entfernt sind, alle zugrunde liegenden Mechanismen der Zusammenhänge zwischen Laktat und Malignität vollständig zu verstehen, so sind doch kürzlich einige Aspekte klar geworden, mit denen sich die entsprechenden klinischen Phänomene z. T. er-

klären lassen. Es ist beispielsweise gezeigt worden, dass Laktat *in vitro* mit der Immunabwehr interagieren kann, indem es die antionkogene Aktivität dendritischer Zellen inhibiert [5]. Darüber hinaus wurden in zwei Untersuchungen Glukosestoffwechsel und Strahlensensibilität miteinander in Verbindung gebracht. So haben Lin et al. [11] an HeLa-Zellen nachgewiesen, dass eine Hemmung der Glykolyse durch 2-Deoxy-D-Glukose diese Zellen für eine Einzeldosisbestrahlung sensibilisieren kann. Quennet et al. [15] unterzogen humane Tumorentransplantate einer fraktionierten Bestrahlung nach einem klinischen Protokoll: Die Strahlenresistenz der Tumoren mit hohen Laktatkonzentrationen war signifikant höher als die von Tumoren mit niedrigen Laktatkonzentrationen. Diese laktatassoziierte Strahlenresistenz korrelierte interessanterweise nicht mit der Tumoroxygenierung, d. h. gut oxygenierte Tumoren waren ebenfalls resistent [22]. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Glykolyseaktivität und die resultierende Laktatakkumulation mit der Immuno-, Radio- und Chemotherapie-resistenz maligner Tumoren korreliert sind. Damit ist allerdings eine kausale Beziehung zwischen diesen Parametern noch nicht unbedingt nachgewiesen.

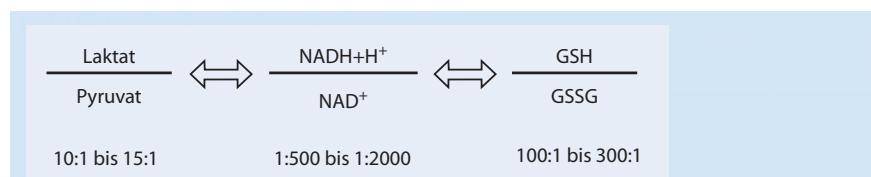


Abb. 1 ▲ Verhältnisse ausgewählter Redoxpaare (jeweils in reduziertem/oxidiertem Zustand), die zur Quantifizierung des zellulären Redoxstatus verwendet werden. Laktat/Pyruvat als klassischer Parameter (Keul et al. [9]); $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ als bestes direktes Maß (Mitka [12]); GSH/GSSG als quantitativ wichtigstes zelluläres Redoxsystem (Dooley et al. [3])

Glykolyse und Behandlungsresistenz

Es gibt mehrere Moleküle bzw. Mechanismen, die mit der Glykolyse und der aeroben Laktatproduktion zu tun haben und die in soliden Tumoren zu einer Resistenz gegenüber einer Radiatio führen können. Konsens ist, dass ionisierende Strahlen (und auch eine Reihe von in der Behandlung maligner Tumoren eingesetzter Pharmaka) über die Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) DNA-Schäden induzieren. Es gibt eindeutige Hinweise darauf, dass Pyruvat und andere Zwischenprodukte der Glykolyse effektive Radikalfänger sind. Pyruvat ist nicht nur selbst ein starkes Antioxidans, es verstärkt auch andere zelluläre antioxidative Mechanismen, beispielsweise über eine Erhöhung des Glutathion/Glutathiondisulfid- (GSH/GSSG)-Verhältnisses [1, 11]. Verglichen mit Pyruvat ist Laktat als Radikalfänger zwar weniger effizient, doch in manchen Bereichen solider Tumoren liegen die Laktatkonzentrationen häufig über 30 oder 40 mM; bei solch hohen Konzentrationen ist eine Inaktivierung von Radikalen durch Laktat durchaus wahrscheinlich [6, 14]. Es wird angenommen, dass die durch Hypoxie induzierte Strahlenresistenz weniger über die Reduzierung der ROS-Bildung entsteht, sondern vielmehr durch eine Fixierung der DNA-Schäden. Diese Fixierung beruht auf einem komplexen Zusammenspiel mehrerer Mechanismen; sie scheint in einem chemisch reduzierten Milieu weniger effektiv zu sein [10].

Zellulärer Redoxstatus und Tumorstoffwechsel

Das Ausmaß der chemischen Reduktion im zellulären Milieu wird von bestimmten Redoxpaaren reflektiert (Abb. 1). Der Redoxstatus lässt sich direkt durch das $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ -Verhältnis charakterisieren, das in der Regel zwischen 1:500 und 1:2000 liegt [12]. Das Verhältnis hängt von der Stoffwechselrate, besonders von Glykolyse und Respiration ab. Insofern steht es in enger Beziehung zur Umwandlung von Pyruvat zu Laktat durch die Laktatdehydrogenase (LDH; Abb. 2). Aus dieser Überlegung folgt,

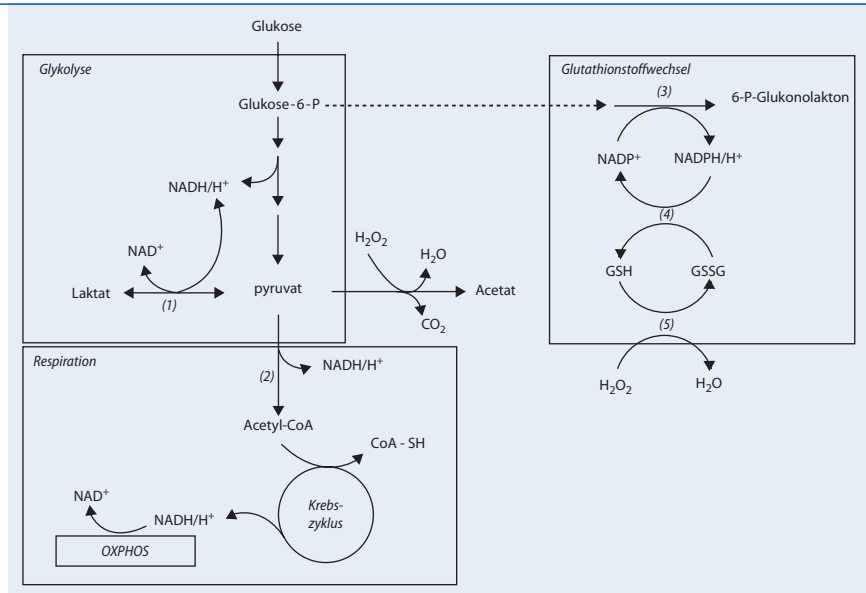
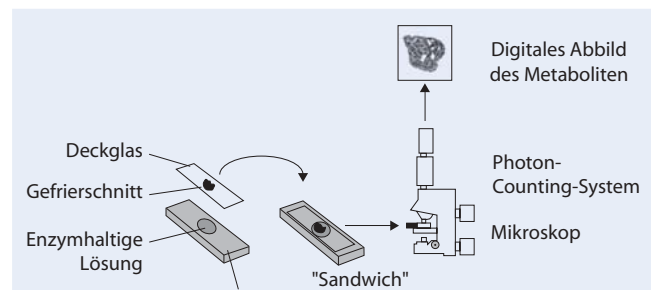


Abb. 2 ▲ Beziehung zwischen Energiestoffwechsel (Glykolyse und Respiration), Glutathionssystem und Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies (z. B. Wasserstoffperoxid). Als Ketosäure fungiert Pyruvat in der Reaktion mit Wasserstoffperoxid als Antioxidans (Salahudeen et al.) [16]. (1) LDH (Laktatdehydrogenase), (2) PDH (Pyruvatdehydrogenase), (3) G6P-DH (Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase), (4) GSH-Reduktase, (5) GSH-Peroxidase, OXPHOS (oxidative Phosphorylierung)

Abb. 3 ► Darstellung von Stoffwechselsubstanzen mithilfe der quantitativen Biolumineszenz



dass das Laktat/Pyruvat-Verhältnis (physiologisch zwischen 10:1 und 15:1; [9]) ein indirekter Parameter für die Charakterisierung des Redoxstatus in einer Zelle oder in einem Gewebe ist (Abb. 1, 2). Des Weiteren liegt eine Stoffwechselverbindung mit Glutathion vor, dem wichtigsten intrazellulären Redoxsystem (GSH/GSSG), das gewöhnlich einen Quotienten von 100:1 und 300:1 aufweist [3]. Hier trägt die initiale Reaktion des Pentosephosphatzyklus („pentose phosphate pathway“, PPP) entscheidend dazu bei, kontinuierlich $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zur Verfügung zu stellen, um Glutathion im reduzierten Zustand zu halten (Abb. 1, 2). Pyruvat kann direkt mit Wasserstoffperoxid reagieren und so als Antioxidans fungieren [16].

Es ist nachgewiesen, dass durch exogene Manipulationen – u. a. durch zugeführtes Laktat – intrazellulär ein re-

duzierter Status und ein relativ hohes $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$ -Verhältnis erzeugt werden können [8]. Dies kann im Unterschied zu „hypoxischer Hypoxie“ (durch unzureichende Sauerstoffversorgung) als „chemisch induzierte Hypoxie“ bezeichnet werden. In vielen physiologischen Situationen mag diese Unterscheidung nicht relevant sein. Möglicherweise ist sie aber in Hochlaktattumoren wichtig, deren Zellen (unabhängig von der jeweiligen Sauerstoffzufuhr) ständig einer reduzierenden Umgebung ausgesetzt sind. Interessanterweise ist unter diesen Bedingungen eine redox-sensitive AP-1-vermittelte Kontrolle der Transkription nachgewiesen worden [8]. Dies stimmt gut mit den oben erwähnten klinischen Beobachtungen überein und macht deutlich, dass der Redoxstatus solider Tumoren bisher nicht ausreichend berücksichtigt worden ist und auf quan-

U.G.A. Sattler · S. Walenta · W. Mueller-Klieser

Laktat und Redoxstatus in malignen Tumoren

Zusammenfassung

Der vorliegende Beitrag fasst Ergebnisse der experimentellen und der klinischen Onkologie zusammen, die auf eine zentrale Bedeutung des Kohlenhydratstoffwechsels maligner Tumoren für Malignitätsgrad und Therapieansprechen hinweisen. In Primärtumoren, wie etwa in Zervixkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region oder Adenokarzinomen des Rektums, ist bereits bei Erstdiagnose eine überdurchschnittliche Laktatakkumulation als Spiegel einer hohen Glykolyseaktivität mit erhöhter Metastasenbildung oder höherer Strahlenresistenz verknüpft. Der Zusammenhang zwischen therapeutischer Resistenz und Glykolyse beruht zumindest teilweise auf den Ra-

dikalfängereigenschaften glykolytischer Produkte, hauptsächlich Pyruvat und Laktat, sowie deren Verknüpfung mit dem Redoxstatus der Zelle. Vor diesem Hintergrund wurde das neue Verfahren der quantitativen Biolumineszenz zur bildgebenden Darstellung des Laktat/Pyruvat-Verhältnisses in Tumorbiopsien entwickelt. Künftige Forschungsinitiativen in der Onkologie sollten vermehrt auf den Redoxstatus solider Tumoren fokussieren.

Schlüsselwörter

Tumorstoffwechsel · Redoxstatus · Laktat · Pyruvat · Bildgebende Biolumineszenz

Lactate and redox status in malignant tumors

Abstract

This article summarizes data from experimental and clinical oncology which are indicative of a pivotal role of tumor carbohydrate metabolism in malignant behavior and outcome of treatment. In primary tumors, such as cervix carcinomas, head and neck squamous cell carcinomas or rectum adenocarcinomas, elevated lactate levels as a mirror of a high glycolytic activity, are correlated even at the initial diagnosis with a high level of malignancy as indicated by increased formation of metastases or an elevated radiotherapy resistance. The relationship between therapeutic resistance and glycolysis may at least partially be due to the radical scavenging potential of

glycolytic intermediates, mainly pyruvate and lactate and to the link between these metabolites and the cellular redox status. On the basis of these data and other considerations, a novel technique has been developed for imaging the lactate/pyruvate ratio in tumor biopsies using quantitative bioluminescence. More research effort should, therefore, be focussed on the redox status of tumors in oncological studies in the future.

Keywords

Tumor metabolism · Redox status · Lactate · Pyruvate · Bioluminescence imaging

titativer Grundlage detaillierter beschrieben werden sollte.

„Redoximaging“ mit quantitativer Biolumineszenz

Die oben dargelegte Diskussion fasst die Argumente zusammen, die die Autoren dazu brachten, eine Technik zur Einschätzung des Redoxstatus maligner Tumoren zu entwickeln. Da Tumoren oft ein irreguläres Gefüge aus vitalen und nekrotischen Arealen sowie Stroma und Immunzellen darstellen, war eine bildgebende Methode erforderlich, die sowohl diese strukturellen Qualitäten berücksichtigt, als auch eine quantitative Analyse des Laktat/Pyruvat-Verhältnisses erlaubt. Diese innovative Methode, die auf von den Autoren entwickelten Techniken zur Darstellung metabolischer Prozesse beruht [13], ist an anderer Stelle detailliert veröffentlicht [17] und wird hier nur knapp geschildert.

Die Metaboliten Laktat und Pyruvat werden durch biochemische Kopplung der LDH- bzw. PDH-Reaktion an Luziferasen sichtbar gemacht. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Konzentration des jeweiligen Metaboliten. Kalibriert wird die Lichtintensität mithilfe üblicher Standardmethoden. Für die Bildgebung werden Kryoschnitte auf ein Deckglas aufgebracht und dann in Kontakt mit der luziferasehaltigen Enzymlösung gebracht; hierdurch entsteht eine sandwichartige Anordnung (■ **Abb. 3**). Dieses „Sandwich“ wird dann in eine temperaturkontrollierte Reaktionskammer innerhalb eines Mikroskops mit integriertem hochempfindlichem Photon-Counting-Videosystem (Hamamatsu, Herrsching) eingelegt. Die Lichtemission wird in Echtzeit detektiert, und die Intensitäten werden über eine definierte Zeit integriert. So lassen sich zweidimensionale Intensitätskarten erstellen, die anhand der Kalibrierungen farbkodierte Darstellungen ermöglichen (■ **Abb. 4**). Da für jeden Metaboliten separate Gewebeschnitte für die jeweilige Messung erforderlich sind, werden unmittelbar aufeinanderfolgende Schnitte erstellt, die dann als quasi-identisch betrachtet werden können. Um für die Berechnungen der Pixel-zu-Pixel-Werte der Laktat/Pyruvat-Verhältnisse ein ge-

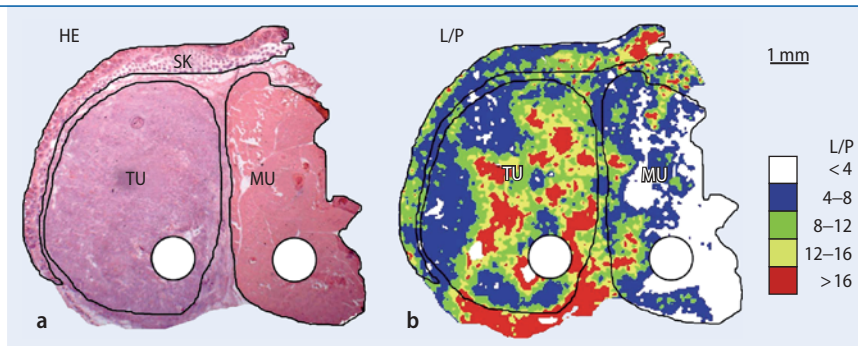


Abb. 4 ▲ Bildung von Stoffwechselformen am Beispiel eines Xenotransplantats eines humanen Plattenepithelkarzinoms aus der Kopf-Hals-Region. Zur Darstellung verschiedener Gewebetypen (MU Muskel, SK Haut, TU Tumor) wurde ein Hämatoxylin-Eosin-gefärbter Schnitt (a) verwendet. Aus parallelen Laktat- und Pyruvatbiolumineszenzen wurde die korrespondierende Laktat/Pyruvat-Darstellung (b) erstellt. Die definierten Bereiche der Laktat/Pyruvat-Verhältnisse sind in der Skala dargestellt

naues topographisches Überlagern beider Bilder zu gewährleisten, werden vor dem Schneiden der Biopsie zwei parallele Stichkanäle in die Gewebeprobe eingebracht (im Schnitt als zwei Löcher sichtbar; ■ Abb. 4). Gleiches gilt für die Überlagerung eines Schnittes mit einem Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Parallelschnitt. So gelingt die Evaluierung von Laktat/Pyruvat-Verhältnissen in definierten histologischen Bereichen, beispielsweise innerhalb von Tumorarealen oder in Hautregionen, die dem Tumor anliegen.

Fazit für die Praxis

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eindeutig, dass strahlenresistente laktatreiche Tumoren sich durch einen reduzierten Redoxstatus („chemische Hypoxie“) auszeichnen, der anhand extrem hoher Laktat/Pyruvat-Verhältnisse von bis zu 30:1 deutlich wird. Die Bedeutung der bildgebenden Darstellung des Redoxstatus für das Therapieansprechen individueller Malignome wird derzeit systematisch überprüft. Ziel dieser Untersuchungen ist eine verbesserte Patientenauswahl für bestimmte Therapieprotokolle und letztlich eine Optimierung der therapeutischen Effizienz.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. rer. nat. W. Mueller-Klieser
 Institut für Physiologie und Pathophysiologie,
 Johannes Gutenberg-Universität
 Duesbergweg 6, 55099 Mainz
 wolfgang.mueller-klieser@uni-mainz.de

Danksagung. Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Mu 576/14-1, 14-2 und 14-3) und der Stiftung Rheinland-Pfalz für Innovation (15202-386261/606) für die Unterstützung.

Interessenkonflikt. Keine Angaben.

Literatur

- Brand K (1997) Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield. *J Bioenerg Biomemb* 29(4): 355–364
- Brizel DM, Schroeder T, Scher RL et al. (2001) Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51(2): 349–353
- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT et al. (2004) Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279(21): 22284–22293
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4(11): 891–899
- Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S et al. (2006) Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 107(5): 2013–2021
- Groussard C, Morel I, Chevanne M et al. (2000) Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study. *J Appl Physiol* 89(1): 169–175
- Hockel M, Vaupel P (2001) Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 93(4): 266–276
- Hoffmann A, Gloe T, Pohl U (2001) Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J Cell Physiol* 188(1): 33–44
- Keul J, Doll E, Keppler D (1972) *Medicine and sport science*, Bd 7. Energy metabolism of human muscle. Karger, Basel
- Larsen E, Reite K, Nesse G et al. (2006) Repair and mutagenesis at oxidized DNA lesions in the developing brain of wild-type and Ogg1-/- mice. *Oncogene* 25(17): 2425–2432
- Lin X, Zhang F, Bradbury CM et al. (2003) 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res* 63(12): 3413–3417
- Mitka M (2005) Diabetic retinopathy mechanism probed. *JAMA* 293(2): 148–149
- Mueller-Klieser W, Walenta S (1993) Geographical mapping of metabolites in biological tissue with quantitative bioluminescence and single photon imaging. *Histochem J* 25(6): 407–420
- O'Donnell-Tormey J, Nathan CF, Lanks K et al. (1987) Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells. *J Exp Med* 165(2): 500–514
- Quennet V, Yaromina A, Zips D et al. (2006) Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice. *Radiother Oncol* 81(2): 130–135
- Salahudeen AK, Clark EC, Nath KA (1991) Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 88(6): 1886–1893
- Sattler UG, Walenta S, Mueller-Klieser W (2007) A bioluminescence technique for quantitative and structure-associated imaging of pyruvate. *Lab Invest* 87(1): 84–92
- Semenza GL (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med* 8(4) Suppl: S62–67
- Walenta S, Schroeder T, Mueller-Klieser W (2004) Lactate in solid malignant tumors: potential basis of a metabolic classification in clinical oncology. *Curr Med Chem* 11(16): 2195–2204
- Walenta S, Wetterling M, Lehrke M et al. (2000) High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers. *Cancer Res* 60(4): 916–921
- Walenta S, Chau T-V, Schroeder T et al. (2003) Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists? *J Cancer Res Clin Oncol* 129(6): 321–326
- Yaromina A, Zips D, Thames HD et al. (2006) Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies. *Radiother Oncol* 81(2): 122–129