

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Nacktmäuse

Die im Rahmen dieser Studie verwendeten Nacktmäuse (NMRI-nu/nu) wurden im Labor Prof. Fiebig gezüchtet (Fiebig, 1983). Fütterung und Tränke erfolgten *ad libitum* mit einer hochkalorischen, pelletierten Nacktmausdiät 1439 Extrudat (Altromin, Lage) und destilliertem Wasser. Das entmineralisierte Wasser wurde mit HCl auf pH 2,5 angesäuert und zur Infektionsprophylaxe mit Oxytetracyclin (3 g/l) versetzt. Die Tiere wurden je nach Gruppengröße in Macrolonkäfigen Typ 2 und 3, die mit Filterhauben versehen waren, auf staubfreier Einstreu S 8/15 (Altromin, Lage) gehalten. Wasser und Einstreu wurden zweimal wöchentlich gewechselt. Die Temperatur betrug konstant 25°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70%. Während der gesamten Versuchsdauer unterlagen die Mäuse einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus.

3.1.2 Merkmale der untersuchten Tumormodelle

Bei den transplantierten Tumoren handelt es sich um humane Tumoxenografts, die im Labor Prof. Fiebig etabliert wurden. Dies geschieht durch subkutane Transplantation von Resektionspräparaten menschlicher Tumoren auf thymusaplastische Nacktmäuse (NMRI nu/nu). Diese werden in Serienpassage gehalten (Fiebig, 1983). Die Tumoren erhalten fortlaufende Nummern, zum Beispiel 1103. Die abgeleiteten Tumoxenografts werden nach ihrer Histologie benannt, beispielweise Xenografts von Kolonkarzinomen mit „CXF“ („Colon Xenograft Freiburg“) und Blasenkarzinome mit „BXF“. Dabei behalten sie die Tumornummer (z.B. CXF 1103 bzw. BXF 1299) bei. Nach der Tumornummer steht hinter einem Schrägstrich die Passagenzahl, die angibt wie oft der Xenograft in der Maus in Serienpassage transplantiert wurde (z.B. CXF 1103/10). In der Regel werden nicht mehr als 20 Passagen vorgenommen. Zusätzlich steht nach dem Schrägstrich ein „N“ mit entsprechender Zahl, wenn das Xenotransplantat in Stickstoff zwischengelagert und erneut auf die Nacktmaus transplantiert wurde (z.B. CXF 1103/10N3). Um einen Xenograft als orthotop implantiert kenntlich zu machen, wurde an die Tumornummer ein „T“ angehängt (z.B. CXF 1103T/10N3). Für die Kennzeichnung des Aszitesmodells wurde die Endung „AS“ gewählt (z.B. PRXF PC3MAS). Im

letzten genannten Fall wurde die Gesamtpassagezahl der Anzahl der Passagen in Aszitesform gegenüber gestellt. Hierzu wurde nach dem Schrägstrich ein „A“ mit entsprechender Zahl eingefügt. Bei PRXF PC3MAS/4A2 etwa sind die Tumorzellen seit 4 Passagen auf der Nacktmaus, 2 davon in Aszitesform.

Die Prostatakarzinome wurden alle mit der Abkürzung PRXF ("Prostata Xenograft Freiburg") gekennzeichnet. Da die Prostatakarzinome von den käuflich erwerblichen Prostatakarzinomzelllinien PC3 und PC3M abstammen, stand bei ihrer Bezeichnung statt einer Tumornummer der Name, unter der die jeweilige Zelllinie patentiert wurde, hinter der Bezeichnung des Tumortyps (z.B. PRXF PC3M). Um die auf der Nacktmaus etablierten Xenografts von der Zelllinie unterscheiden zu können, wurde für letztere die Bezeichnung PRCL dem Tumornamen vorangesetzt (z.B. PRCL PC3M). Der im Rahmen dieser Arbeit etablierte Xenograft PRXF PC3MMT erhielt seinen Namen in Anlehnung an seinen Ursprungxenograft PRXF PC3MT. Da es sich um eine Metastase dieses Tumors handelte, wurde zur Verdeutlichung seiner Herkunft ein zweites "M" (für Metastase) dem Namen beigefügt. Das "T" am Ende des Tumornamens steht wie oben erwähnt für das orthotope Modell.

In histologischen Untersuchungen und Analysen der Isoenzymmuster werden die Passagen auf Konstanz geprüft (Bender et al., 1992).

Kolonkarzinom CXF 1103: wenig differenziertes Adenokarzinom (GII-GIII). Das Resektionspräparat stammt von einem Rezidiv. Stadium: pT₃N₁M₁. Es traten Metastasen der Haut sowie eine Peritonealkarzinose auf. Die Überlebenszeit des männlichen, 56jährigen Patienten betrug 2 Monate. Der etablierte subkutan wachsende Xenograft ist gekennzeichnet durch: Verdoppelungszeit = 4 Tage, Angangsrate = 95% und ein charakteristisches Isoenzymmuster (Fiebig et al., 1992).

Blasenkarzinom BXF 1299: mäßig differenziertes Übergangszellkarzinom (GII-GIII). Das Resektionspräparat stammt vom

Primärtumor eines 82jährigen, männlichen Patienten. Stadium: pT₂. Der etablierte subkutan wachsende Xenograft ist gekennzeichnet durch eine Verdoppelungszeit von 7 Tagen und eine Angangsrate von 97 %.

Prostatakarzinom PRXF PC3: undifferenziertes Adenokarzinom (GIV). Der 62 Jahre alte Patient hatte Knochenmetastasen. Die Zelllinie wurde aus einem Resektionspräparat des Primärtumors etabliert (Kaighn et al,1979). Der etablierte subkutan wachsende Xenograft ist charakterisiert durch eine Angangsrate von 93 % und eine Verdoppelungszeit von 7 Tagen.

Prostatakarzinom PRXF PC3M: Zelllinie etabliert aus einer Lebermetasase der Nacktmaus nach intrasplener Injektion von PC3-Zellen (Kozlowski et al., 1984). Der aus der Zelllinie etablierte subkutan wachsende Xenograft hat eine Angangsrate von 87% und eine Verdoppelungszeit von 3 Tagen und induziert Kachexie.

Die Zelllinien PRCL PC3 und PC3M, die zur Etablierung der jeweiligen Xenografts Verwendung fanden, wurden vom National Cancer Institute (Frederick, USA) bezogen.

3.1.3 Transplantationstechniken

3.1.3.1 Operationsbesteck und Verbrauchsmaterialien

Chirurgiebesteck	Aesculap, Tuttlingen
Einmalkanülen, 26G	Braun, Spangenberg
Forene (Isofluran)	Abbot, Wiesbaden
Ketanest (Ketamin, 10 mg/ml)	Parke-Davis, Berlin
PBS	GibcoBRL, Schottland
Polyglycolsäure-Faden, 8-0, resorb., atraum. Nadel	Braun, Spangenberg
Rompun (Xylazin, Sol. 2%)	Bayer, Leverkusen
RPMI 1640	GibcoBRL, Schottland
Vicryl-Faden, 3-0 resorb., traumat. Nadel	Ethicon, Norderstedt

3.1.3.2 Subkutane Implantation

Der Spendertumor bzw. das Resektionspräparat wurden sofort nach der Entnahme in Kulturmedium überführt. Das Tumormaterial wurde mit dem unbewaffneten Auge auf nekrotische Anteile hin untersucht und soweit wie möglich davon befreit. Das verbleibende Material wurde in Stücke von 3-4 mm Durchmesser geschnitten. Bis zur Implantation verblieben die Tumorstücke in einer Petrischale mit PBS.

Nach Desinfektion der Haut mit Alkohol (Softasept-Spray) erfolgte unter Inhalationsnarkose ein 4 - 5 mm langer Hautschnitt auf dem Rücken der Nacktmaus. Das subkutane Gewebe wurde mit einer Schere nach ventral über 1 - 1,5 cm untertunnelt und die Tumorstückchen mit einer Pinzette eingeführt. Anschließend erfolgte eine erneute Desinfektion des Wundbereiches mit Alkohol und die Kennlichmachung des Tieres mit einer Ohrmarke. Dann wurde die Narkose beendet und die Tiere zum Aufwachen und zur Nachbeobachtung in einen mit sterilen Kompressen ausgelegten Käfig verbracht. Die Nacktmäuse waren bei der Implantation zwischen 4 und 8 Wochen alt (Fiebig, 1983).

Für die Testung auf Chemosensibilität auf Standardmedikamente wurden 45 Tieren PRXF PC3M/6 subkutan implantiert. Zum gleichen Zweck wurde 25 Tieren das Blasenkarzinom BXF 1299 implantiert.

3.1.3.3 Subkutane Injektion von Tumorzellen

Die *in vitro* als Monolayer gewachsenen Tumorzellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (GibcoBRL, Schottland) von ihrer Unterlage abgelöst und zentrifugiert. Nach anschließender Resuspension in PBS fand eine Bestimmung der Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauerzählkammer statt. Gleichzeitig wurde die Vitalität der Zellen mit dem Trypanblau-Exklusionstest überprüft. Die Aszitesflüssigkeit wurde mit Phosphatpuffer (PBS) verdünnt, um die für die Injektion erwünschte Zellkonzentration zu erhalten.

Die Injektion erfolgte mit einer 26G-Nadel. Mit der Nadel wurde nach Desinfektion der Einstichstelle mit Alkohol (Softasept-Spray) am höchsten Punkt des Rückens über der Wirbelsäule die Haut durchstoßen. Anschließend wurde die Nadel 1, 5 cm nach ventral in Richtung Schulterblatt vorgeschoben. Dort wurde die Zellsuspension abgesetzt.

12 Tieren wurden die *in vitro* gehaltenen PC3MAS-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen subkutan injiziert.

3.1.3.4 Orthotope Implantation

Der subkutan wachsende Spendertumor wurde während der exponentiellen Wachstumsphase entnommen und in eine Petrischale mit PBS überführt. Das Tumormaterial wurde mit dem unbewaffneten Auge auf nekrotische Anteile hin untersucht und soweit wie möglich davon befreit. Das verbleibende Material wurde in Stücke von 2 mm Durchmesser geschnitten. Nach Desinfektion der Haut mit Alkohol (Softasept-Spray) erfolgte unter Injektionsnarkose (80 mg/kg Ketamin + 16 mg/kg Xylazin) die Eröffnung der Bauchhöhle im inguinalen Drittel der *linea alba*. Das für die Implantation vorgesehene Organ wurde freipräpariert und die Serosa auf einer Fläche von 3 mm² stumpf entfernt. Die Tumorfragmente wurden an die äußere Wand des betreffenden Organs genäht. Hierzu wurde eine atraumatische Nadel mit einem 8-0 resorbierbaren Polyglycolsäure-Faden verwendet. Das jeweilige Organ wurde reponiert und die Bauchhöhle mit einschichtigen Knopfheften verschlossen. Hierzu wurde eine traumatische Nadel mit einem 3-0 resorbierbaren Vicrylfaden verwendet. Die exakten Implantationsorte waren: der *apex vesicae* im Falle des Blasenkarzinoms BXF 1299T, das *colon ascendens* für das Kolonkarzinom CXF 1103T und das *corpus*

prostateae im Falle der Prostatakarzinome PRXF PC3T, PC3MT und PC3MMT. Abschließend erfolgte eine Desinfektion der Operationsnaht mit Alkohol und die Kennzeichnung des Tieres mit einer Ohrmarke. Die Tiere wurden zum Aufwachen und Nachbeobachtung in einen mit sterilen Kompressen ausgelegten Makrolonkäfig verbracht.

Sie waren zum Zeitpunkt der Implantation zwischen 6 und 8 Wochen alt.

Insgesamt wurde 29 Tieren das Kolonkarzinom CXF 1103T orthotop implantiert. 4 Tiere wurden für eine Vorversuchsreihe verwendet: zwei Tieren wurde ein Stück vitalen Tumorgewebes implantiert. Zwei weiteren wurden zwei Fragmente orthotop implantiert. Die Transplantation erfolgte bei der Hälfte der Tiere an der großen Krümmung des Blinddarmes und bei der anderen Hälfte am Beginn des *colon ascendens*. Für alle folgenden Implantationen wurde die oben beschriebene Implantationstechnik eingesetzt. 10 Tiere wurden für die Charakterisierung des Modells eingesetzt. Die restlichen 15 Tiere wurden für die Reproduktion des vorangegangenen Experimentes verwendet.

Das Blasenkarzinom BXF 1299T wurde auf insgesamt 72 Nacktmäuse orthotop transplantiert. 6 Tiere wurden für die Entwicklung der Implantationstechnik eingesetzt. In dieser Vorversuchsreihe wurde 4 Tieren die Tumorstücke auf 1-2 mm Durchmesser zugeschnitten und zusammen mit 0,1 ml PBS in einer Einmalkanüle aufgezogen. Mit einer 21 G-Nadel wurde diese Mischung in die Blasenwand injiziert. Bei den restlichen zwei Tieren erfolgte die Implantation wie oben beschrieben. Bei allen folgenden Implantationen wurde die Naht von Tumorfragmenten an die Blasenwand als Implantationsmethode verwendet. 10 Tieren wurden für die Charakterisierung des orthotop implantierten BXF 1299T. Weiteren 56 Tieren wurde für die Testung auf Chemosensitivität gegenüber Standardzytostatika das Blasenkarzinom orthotop implantiert. Die unbehandelte Kontrollgruppe war zusätzlich als Reproduktion des vorangegangenen Experimentes verwendet worden.

Zur Charakterisierung des orthotop wachsenden Xenografts und der Testung auf Chemosensitivität gegenüber Standardzytostatika wurde insgesamt 75 Tieren das Prostatakarzinom PRXF PC3MT implantiert. 15 Tiere wurden in einem ersten Experiment zur Bestimmung des Wachstumsverlaufes verwendet. 60 Tiere waren für die Substanztestung implantiert worden. Wie auch im Falle des Blasenkarzinomes wurde die unbehandelte Kontrollgruppe als Reproduktion des vorangegangenen Versuches verwendet.

Der Xenograft PRXF PC3T wurde auf 10 Tiere transplantiert. Weitere 15 Tiere wurden verwendet, um PRXF PC3MMT zu untersuchen. Diese Sublinie von PRXF PC3MT wurde aus einer Bauchhöhlenmetastase des orthotop implantierten PRXF PC3MT gewonnen.

3.1.3.5 Asziteszellen-Injektion

Bei dem orthotop implantierten Prostatakarzinom PRXF PC3MT trat mit einer Häufigkeit von 60 % Aszites auf, die durch eine hohe Tumorzellkonzentration in der Bauchhöhlenflüssigkeit gekennzeichnet ist. Bei der Sektion einer Nacktmaus mit einem solchen Erkrankungsbild wurde die Aszitesflüssigkeit steril gewonnen. Anschließend wurde die Tumorzellkonzentration mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt. Gleichzeitig wurde die Vitalität der Zellen mit dem Trypanblau-Exklusionstest überprüft. Die Aszitesflüssigkeit wurde mit Phosphatpuffer (PBS) verdünnt, um die für die Injektion erwünschte Zellkonzentration zu erhalten. Die intraperitoneale Injektion erfolgte mit einer 26G-Nadel im rechten unteren Quadranten des Abdomens. Die applizierten Zellkonzentrationen betragen 4, 2 und 1 Mio Zellen pro Tier. Entwickelten die behandelten Tiere Aszites wurde erneut die Peritonealflüssigkeit gewonnen und auf die oben beschriebene Weise auf andere Tiere übertragen.

Insgesamt wurden 57 Tiere zur Etablierung und Charakterisierung eingesetzt. Zwischen 3 und 6 Tiere wurden für die einzelnen Passagen verwendet, in deren Verlauf eine erste Charakterisierung des Modells stattfand. Jede Passage war hierbei eine Reproduktion der vorangegangenen. Die Gesamtzahl der eingesetzten Tiere für diese Versuchsreihe betrug 21. An 28 weiteren Tieren wurden Untersuchungen über den Einfluß der injizierten Zellzahl auf Angangsrate und Beobachtungszeit durchgeführt. 8 Tiere wurden für die Bestimmung der Angangsrate nach dem Tieffrieren der Zellen verwendet.

3.1.4 Kontrolle des Wachstumsverlaufes

3.1.4.1 Subkutane Tumormodelle

In Serienpassage wurde das Tumorstadium über 2 - 3 Monate bis zur nachfolgenden Passage verfolgt. Der Längs- und der Breitendurchmesser wurden wöchentlich bei Therapieversuchen zweimal wöchentlich mit einer

Schieblehre gemessen. Das fehlende Haarkleid erwies sich für die Messungen als vorteilhaft. Die Tumordurchmesser waren reproduzierbar auf ± 0.1 mm genau bestimmbar. Als untere zuverlässige Meßgrenze werden Tumordurchmesser von 2 mm und entsprechend ein Tumolvolumen von 4 mm³ angesehen (Fiebig, 1983).

Das Tumolvolumen wurde gemäß der Formel Länge x Breite x Breite / 2 errechnet (Geran et al., 1977)

Die Daten für die unter der Haut wachsenden Tumore stammten aus den jeweils zeitparallel zur vorliegenden Arbeit verlaufenen Experimenten, die im Labor Prof. Fiebig mit den betreffenden Xenografts durchgeführt wurden. Im Falle von BXF 1299 und PRXF PC3M waren dies die Versuche, die zum Vergleich der Chemosensibilität durchgeführt wurden. Durch diese Vorgehensweise wurde gewährleistet, daß die Datenbasis bei beiden Methoden eine ähnliche Größe aufwies. Zudem wurde durch die zeitliche Nähe aller Experimente zueinander sichergestellt, daß die Wahrscheinlichkeit eventueller Veränderung über die Passagen hinweg so gering wie möglich gehalten wurde.

3.1.4.2 Orthotope Tumormodelle

Das Tumorstadium wurde maximal 12 Wochen verfolgt, da es sich bei den verwendeten Xenografts um bereits etablierte Tumoren handelte. Sobald der Tumor durch die Bauchdecke hindurch palpabel war, wurde der Längs- und der Breitendurchmesser wöchentlich, bei Therapieversuchen zweimal wöchentlich mit einer Schieblehre gemessen. Die Tumordurchmesser waren ab einer Größe von 5 mm reproduzierbar auf ± 0.1 mm genau bestimmbar. Die Berechnung des Tumolvolumens erfolgte nach der oben genannten Formel. Der Tag, an dem die Tumoren zum ersten Mal messbar waren, wurde als Versuchstag (VT) 0 bezeichnet. Die Zeit zwischen Implantation und Versuchstag 0 war die Induktionszeit. Als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit wurde für jedes Modell die Zeit errechnet, die die Tumoren im Median brauchten, um 200 bzw. 400% ihrer Ausgangsgröße zu erreichen.

3.1.3.3 Aszitesmodell

Da dieses Modell keinen solide wachsenden Tumor aufwies, schied eine Messung mittels Schieblehre aus. Als Parameter zur Messung des Tumorzellwachstums wurde deshalb die Beobachtungszeit gewählt.

Hierunter war die Zeit zwischen Injektion der Aszitesflüssigkeit und Tötung des moribunden Tieres zu verstehen.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Asziteszellen wurde unter verschiedenen Bedingungen getestet. Zunächst wurden Zellen aus einer Nacktmauspassage intraperitoneal injiziert. Dabei wurden vier Gruppen gebildet, wovon drei jeweils unterschiedliche Zellzahlen erhielten und eine als unbehandelte Kontrollgruppe mit beobachtet wurde. Auf die gleiche Art und Weise wurde mit Zellen verfahren, die zuvor eine Passage in der Kulturflasche gewachsen waren. Zu guter Letzt wurde das Wachstumsverhalten nach der Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff beobachtet. Einer Gruppe wurde die aufgetaute und von DMSO gereinigte Zellsuspension direkt verabreicht. Drei andere Gruppen erhielten Zellen, die sich nach dem Auftauen 2 Wochen in der Kulturflasche vermehrt hatten.

Im Einzelnen waren die Versuche wie folgt aufgebaut:

1. Asziteszellen aus Nacktmauspassage intraperitoneal injiziert:

Gruppe 1:	10 ml/kg NaCl	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 2:	4 Mio Zellen / Tier	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 3:	2 Mio Zellen / Tier	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 4:	1 Mio Zellen / Tier	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

2. Asziteszellen aus einer Nacktmauspassage in der Kulturflasche vermehrt und anschließend der Maus intraperitoneal injiziert:

Gruppe 1:	10 ml/kg NaCl	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 2:	4 Mio Zellen / Tier	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 3:	2 Mio Zellen / Tier	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 4:	1 Mio Zellen / Tier	n = 4	an VT 0	i.p. verabreicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

3. Asziteszellen waren vor der Injektion tiefgefroren. Die Gruppen 2-4 erhielten Zellen, die darüber hinaus nach dem Auftauen *in vitro* vermehrt worden waren:

Gruppe 1:	10 ml/kg NaCl	n = 4	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 2 ^a :	4 Mio Zellen / Tier	n = 4	an VT 0	i.p. verabreicht

Gruppe 3 ^a :	2 Mio Zellen / Tier	n = 4	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 4 ^a :	1 Mio Zellen / Tier	n = 4	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 5 ^b :	4 Mio Zellen / Tier	n = 5	an VT 0	i.p. verabreicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

^a, Zellen aufgetaut, DMSO ausgewaschen und in Kulturflasche vermehrt.

^b, Zellen aufgetaut und DMSO ausgewaschen.

Um einen Vergleich mit bereits etablierten Zelllinien zu erhalten, wurde die Prostatakarzinomzelllinie PRCL PC3M ebenfalls intraperitoneal einer Gruppe von Nacktmäusen injiziert. Die hierbei verwendeten Zellzahlen entsprachen denjenigen der vorangegangenen Versuche:

Gruppe 1:	10 ml/kg NaCl	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 2:	4 Mio / Tier	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 3:	2 Mio / Tier	n = 3	an VT 0	i.p. verabreicht
Gruppe 4:	1 Mio / Tier	n = 4	an VT 0	i.p. verabreicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Darüberhinaus wurde Nacktmäusen PC3MAS-Zellen in unterschiedlicher Anzahl subkutan injiziert. Um einen Vergleich mit den vorangegangenen Versuchen zu ermöglichen, wurden die gleichen Zellzahlen pro Seite gewählt, die zuvor einem Tier intraperitoneal verabreicht worden waren:

Gruppe 1:	4 Mio Zellen / Seite	n = 3	an VT 0	s.c. verabreicht
Gruppe 2:	2 Mio Zellen / Seite	n = 3	an VT 0	s.c. verabreicht
Gruppe 3:	1 Mio Zellen / Seite	n = 3	an VT 0	s.c. verabreicht
Gruppe 4:	0,5 Mio Zellen / Seite	n = 3	an VT 0	s.c. verabreicht

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

3.1.4.4 Körpergewichtbestimmung

Während der Vermessung der Tumoren wurde auch das Körpergewicht der Einzeltiere bestimmt. Damit war eine quantitative Größe zur Überwachung des Allgemeinzustandes der Tiere gegeben. Fiel das Körpergewicht auf weniger als 80% seines Ausgangswertes ab, mußte das Tier beendet werden (siehe Tab.A1 S. 147 im Anhang).

Um einen Vergleich mit der physiologische Körpergewichtszunahme einer unbehandelten Nacktmaus zu haben, wurde bei den Versuchen mit PRXF PC3MAS zusätzlich eine Gruppe unbehandelter Nacktmäuse gleichen Alters und Geschlechtes gewogen und mit den behandelten Tieren verglichen

3.1.5 Sektionen und histologische Aufarbeitung

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes von maximal 12 Wochen bzw. falls eines der Kriterien zur vorzeitigen Tötung (siehe Tabelle A1, S.147 im Anhang) auftrat, wurden die Tiere zunächst mittels Inhalationsnarkose betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Bei der anschließenden Sektion wurden alle makroskopischen Veränderungen in einem Sektionsprotokoll festgehalten. Die Tumoren und inneren Organe wurden histologisch untersucht. Von allen genannten Strukturen wurden Paraffinschnitte angefertigt, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden. Auftretende Von den Ergüssen, die bei PRXF PC3MT, bei PRXF PC3MAS sowie nach intraperitonealer Injektion von PC3M-Zellen in der Bauch- bzw. Brusthöhle auftraten, wurden Austriche angefertigt. Diese wurden mit Hämatoxilyn-Eosin gefärbt. An den gefärbten Ausstrichen wurden Zellzählungen durchgeführt. Dabei wurden mindestens drei Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Die Zahl der insgesamt gezählten Zellen war größer oder gleich 300. So konnte der Prozentsatz der einzelnen Zelltypen an der Gesamtheit der Zellen berechnet werden. Im Falle der orthotop transplantierten Tumoren wurde stichprobenartig von 5 unbehandelten Tieren mit Aszites und Thoraxerguß Ausstriche angefertigt.

Bei Therapieversuchen am orthotopen Modell wurden stichprobenartig 7 Tiere zum Zeitpunkt der Randomisation makroskopisch und histologisch untersucht.

Bei der Darstellung der Metastasierungsmuster wurden die Peritonealmetastasen nochmals unterteilt in solche bei denen Aszites auftrat und solche bei denen dies nicht der Fall war. Ebenso wurde bei Pleurametastasen und Thoraxergüssen verfahren. Unter dem Begriff Aszites bzw. Thoraxerguß sind also jene Sekundärgeschwulste zusammengefaßt worden, bei denen es zu einer Flüssigkeitsansammlung kam, in der Tumorzellen nachgewiesen wurden. Die restlichen Metastasen in den Körperhöhlen wurden unter dem Stichwort "Peritoneum" bzw. "Pleura" aufgeführt. Für die Metastasierungsrate wurde der Anteil metastasierender Tumoren an der Gesamtheit der kontinuierlich

gewachsenen Tumoren errechnet. Kontinuierliches Wachstum wurde in diesem Fall definiert als bei der Sektion deutlich erkennbare Vergrößerung des Tumorfragmentes.

3.1.6 Immunhistochemie

3.1.6.1 Material

2 nd Gen Anti-Mouse CEA (#08-1013)	Zymed, San Francisco, USA
Biotin-Goat-Anti-Rabbit IgG (#60430136)	Zymed, San Francisco, USA
Biotinyl. Broad Spectrum Antikörper (#71239737)	Zymed, San Francisco, USA
Diaminobenzidine	Sigma, St. Louis, USA
Imidazol	Sigma, St. Louis, USA
Kupfersulfat	Merck, Darmstadt
Gill's Hämatoxylin	Shandon, Pittsburgh, USA
Normal Goat Serum	Sigma, St. Louis, USA
Rabbit Anti-Cytokeratin (#70235024)	Zymed, San Francisco, USA
Streptavidin Peroxidase (#61032986)	Zymed, San Francisco, USA
Superfrost/Plus	Langenbrinck, Emmendingen
Trypsin, 1:250	Difco Lab., Detroit, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma, Steinheim

3.1.6.2 Methode

Die immunhistochemische Methode wurde nach der Avidin-Biotin-Methode mit Peroxidase als Enzym durchgeführt (Hsu et al., 1981). Das Ausgangsmaterial war Tumorexograftgewebe, sowie Organe und auffällige Strukturen der transplantierten Tiere, die maximal 24h in 4%igem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet worden waren. Von diesen Paraffinblöcken wurden 4-5µm dicke Schnitte hergestellt (Modell 1165 / Rotocut, Reichert und Jung), die auf beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht luftgetrocknet wurden.

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte für 30 min. bei Raumtemperatur in 0,6%iger H₂O₂-Lösung inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurde 15 min bei 37°C in einer 0,1%igen Trypsin-Lösung inkubiert. Das Trypsin wurde in kaltem Wasser ausgewaschen und die Proben 10 min. bei Raumtemperatur in PBS belassen. Alle folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur und in einer

feuchten Kammer durchgeführt. Zwischen den beschriebenen Schritten wurde jeweils dreimal mit PBS gewaschen: Für 1h wurde mit 10%igem Normal Goat Serum inkubiert. Anschließend wurde für vier Stunden der unverdünnte Antikörper zugegeben. Im Falle des humanen Zytokeratin-Nachweises wurde anschließend für 10 min. ein biotinylierter Goat-Anti-Rabbit-Antikörper zugegeben. Beim Nachweis des humanen CEA's wurde ein biotinylierter Broad-Spectrum-Antikörper verwendet. Daraufhin wurde 10 min. Streptavidin-Peroxidase zugegeben. Das für die Färbung verwendete Diaminobenzidin war im Voraus hergestellt worden:

Lösung 1: 0,03 Gramm Diaminobenzidin wurden in 50 ml TBS-Puffer gelöst und der pH auf 7,4 eingestellt. Diese Lösung wurde in aliquots abgefüllt und bei -20°C gelagert. Für den Puffer wurden 8 g NaCl, 0,2 g KCl und 3 g Trisbase in 800 ml dest. Wasser gelöst, der pH auf 7,4 eingestellt und mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde der Puffer autoklaviert.

Lösung 2: Zu 100 ml PBS wurden 4 Tropfen 30%ige H₂O₂-Lösung und 2 - 3 Kristalle Imidazol gegeben. Diese Lösung wurde für jede Färbung frisch angesetzt.

Von Lösung 1 und 2 wurden jeweils 1 - 2 Tropfen auf die Proben gegeben und 10 min. inkubiert. Nach einem Waschgang in dest. Wasser wurden die Proben 5 min. mit einer Kupfersulfatlösung bedeckt. Diese bestand aus 4 g Cu(II)SO₄ und 7,2 g NaCl, die in 1 l dest. Wasser gelöst wurden. Nach dem Waschen unter fließendem Wasser wurde 10 sec. mit Hämalaun eine Kernfärbung durchgeführt, die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe in Xylol überführt und eingedeckt.

Getestet wurde die CEA- bzw. Zytokeratin-Expriemierung sowohl am orthotop wachsenden Primärtumor als auch an verschiedenen Metastasen. Um unspezifische Färbungen auszuschließen, wurde bei einer Probe statt mit dem jeweiligen Antikörper mit PBS inkubiert.

3.1.7 Bestimmung der vaskulären Permeabilität

Bei den orthotopen Modellen BXF 1299T und PRXF PC3MT wurde die vaskuläre Permeabilität, definiert als Durchlässigkeit der Gefäße für hochmolekulare Substanzen in ihre Umgebung in diesem Falle das Tumorgewebe, der Primärtumoren und einiger makroskopisch sichtbarer Peritonealmetastasen bestimmt. Die vaskuläre Permeabilität wurde mit Hilfe eines modifizierten Miles Assays (Miles und Miles, 1952) bestimmt, der

erstmals in dieser Form von Harada et al. beschrieben wurde (Harada et al., 1971). Tumortragenden Tieren wurden 100 mg/kg Körpergewicht Evans Blue dye (Sigma, Steinheim) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Injektionslösung hatte eine Konzentration von 10 mg/ml und wurde unmittelbar vor der Applikation hergestellt. Als Lösungsmittel wurde physiologische Kochsalzlösung (Pharma Hameln, Hameln) verwendet. 30 min. nach der Injektion wurden die Tumoren und falls vorhanden die Metastasen entnommen und gewogen. Um den im Gewebe enthaltenen Farbstoff zu extrahieren, wurden auf 1 Teil Probe 9 Teile eines Aceton/Natriumsulfat-Gemisches als Extraktionslösung gegeben. Anschließend wurden die Proben mechanisch mit Hilfe eines Potters zerkleinert und über Nacht (>17h) bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt inkubiert. Zur Herstellung der Extraktionslösung wurde zunächst eine 5%ige Natriumsulfatlösung hergestellt. Das Natriumsulfat (Sigma, St. Louis, USA) wurde in destilliertem Wasser gelöst. Unmittelbar vor dem Homogenisieren wurden 7 Teile Aceton und 3 Teile 5%ige Natriumsulfatlösung vermischt und auf die zu extrahierende Probe gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Probe 5 min. bei 2500 Umdrehungen pro min. zentrifugiert. Im Überstand wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen (Ultrospec III, Pharmacia) und anhand einer Eichkurve die Farbstoffkonzentration bestimmt. Als Referenzwerte wurden die Evans blue-Konzentrationen im Blut und in der quergestreifte Muskulatur der untersuchten Tiere bestimmt. Mit den Muskelproben wurde auf die gleiche Art und Weise verfahren wie mit dem Tumorgewebe. Die Blutproben wurden abweichend davon aufgrund ihrer höheren Farbstoffkonzentrationen stärker verdünnt. 50 µl durch EDTA ungerinnbar gemachtes Blut wurden mit 9950 µl der oben beschriebenen Extraktionslösung vermischt. Auf das Pottieren konnte im Falle der Blutprobe verzichtet werden, ansonsten war die Vorgehensweise die gleiche wie im Falle der Gewebeproben. Die Höhe der vaskulären Permeabilität wurde in % und/oder µg enthaltenem Evans Blue pro Gramm Gewebe bzw. pro ml Blut nach folgender Formel berechnet:

Farbstoffkonzentration in Tumor- bzw. Muskelgewebe
 = Konzentration der Probe x 10 in µg Farbstoff /g Gewebe.

Farbstoffkonzentration im Blut
 = Konzentration der Probe x 10 x 1000/50 in µg Farbstoff / ml Blut.

Die relativen Anteile des Farbstoffes im Gewebe an der Gesamtmenge des injizierten Farbstoffes wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{relativer Anteil Evans Blue (\%)} = \frac{\text{extrahierte Menge Evans Blue (\mu\text{g})} \times 100}{\text{injizierte Menge Evans Blue (\mu\text{g})}}$$

Die Werte eines Xenografts stellen den Median aus 6 unabhängigen Versuchen dar. Um die Einzeldaten eines Tumors sowie die Tumoren untereinander vergleichen zu können, betrug das Volumen aller getesteten Xenotransplantate ca. 400 mm³. Die Passagezahl bewegte sich zwischen 2 und 10.

3.1.8 Aufbau der Chemotherapieversuche

3.1.8.1 Subkutane Tumormodelle

Das Blasenkarzinom BXF 1299 und das Prostatakarzinom PRXF PC3M wurden im Rahmen dieser Arbeit als subkutan wachsende Xenografts in einem Chemotherapieversuch eingesetzt. Tierzahlen und Passagenummern entsprachen weitgehend denen der Experimente mit BXF 1299T und PRXF PC3MT, um bei einem Vergleich beider Modelle nicht erwünschte Einflüsse so gering wie möglich zu halten. Im Folgenden gilt die erstgenannte Zahl immer für das Blasen-, die letztgenannte für das Prostatakarzinom.

Die Testungen erfolgten in der 6. bzw. 10. Passage. Bei einem Therapieversuch erhielten 25 bzw. 45 Nacktmäuse einen Tumor in die linke Flanke subkutan implantiert. Zweimal wöchentlich wurden die Tumordurchmesser mit einer Schieblehre gemessen und die Tiere gewogen. Nach 10 bzw. 14 Tagen wurden die Tiere mit gutem Allgemeinzustand und Tumoren, welche die genannten Kriterien aufwiesen, nach Zufallszahlen den einzelnen Testgruppen oder der Kontrollgruppe zugeordnet. Der Anteil der Tiere, die nicht randomisiert werden konnten, betrug 20 bzw. 33%.

Auswertbare Tumoren mußten folgende Merkmale aufweisen:

- Tumolvolumen von mindestens 100 mm³
- geschätzte Dicke des Tumors mußte mindestens die Hälfte des kleineren Tumordurchmessers betragen
- rötliche Farbe, „vitales“ Aussehen

Bei Erfüllung dieser Kriterien traten in den Kontrollgruppen keine Spontanremissionen oder ein stationäres Wachstumsverhalten auf (Fiebig, 1983). Jede Versuchsgruppe umfaßte 5 bzw. 6 Tiere. Bei Randomisation betrug die Tumordurchmesser im Median 148 und 135 mm³. Jeder Tumor mußte seine initiale Größe bei Versuchsende mindestens verdoppelt haben. Um eine bessere Datenerfassung zu ermöglichen wurde jedem Therapieversuch eine eigene Kennzeichnung bestehend aus einem Buchstaben und einer dreistelligen Nummer gegeben (z.B. G668). Anhand dieser Nummer können die Ergebnisse der Versuche jederzeit im Datenerfassungsprogramm wieder generiert werden. Die Versuchskennzeichnung für die subkutan implantierten Tumore im Rahmen dieser Arbeit lauteten G639 für den Versuch mit dem Blasenkarzinom BXF 1299/10N8 und G575 für den Versuch mit dem Prostatakarzinom PRXF PC3M/6.

3.1.8.2 Orthotope Tumormodelle

Das Blasenkarzinom BXF 1299T und das Prostatakarzinom PC3MT wurden orthotop wachsend auf ihre Chemosensitivität geprüft. Die Versuchskennzeichnung der beiden Versuche lautete G668 für das den Versuch mit BXF 1299T/12N10 und G576 für den Versuch mit PRXF PC3MT/6. Für diese Modelle wurde das oben beschriebene Verfahren in einigen Punkten abgewandelt werden. Elf und zwölf Tage nach der Implantation wurden die Tiere randomisiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tumoren noch nicht palpabel. Folglich wurden alle Tiere mit einem guten Allgemeinzustand und einer vollständig verheilten Operationswunde nach Zufallszahlen den einzelnen Testgruppen oder der Kontrollgruppe zugeordnet. Um eine Ausgangsgröße für die Tumoren bestimmen zu können, wurde eine Gruppe von 6-7 Tieren zum Zeitpunkt der Randomisation beendet und die Tumorgöße *in situ* mit der Schieblehre bestimmt. Der Median dieser Gruppe wurde als Ausgangsgröße für alle anderen Gruppen übernommen.

Jede Versuchsgruppe umfaßte 5 - 7 Tiere. Bei Therapiebeginn betrug die Tumordurchmesser 43 mm³ bzw. 45 mm³. Die geringen Ausgangsgrößen ergaben sich aus der Tatsache, daß orthotop implantierte Xenografts eine wesentlich kürzere Verdoppelungszeit hatten als die subkutan wachsenden. Neben der Bestimmung des Tumolvolumens mittels Schieblehre, wurden am Ende des Versuches der Einfluß der Behandlung auf das Metastasierungsverhalten untersucht und das mediane Tumorgewicht ermittelt.

3.1.9 Art und Durchführung der zytostatischen Therapie

Die in Tab.1, S. 29 genannten Zytostatika wurden in ähnlichen Therapieschemata wie in der Klinik gegeben. Die hochdosierte intermittierende Gabe hatte sich bei den meisten Medikamenten wirksamer als die tägliche Behandlung erwiesen. Bei den Nacktmäusen wurden 3 Therapiezyklen in wöchentlichem Abstand verabreicht (Fiebig, 1983).

Tab.1: Art und Durchführung der zytostatischen Therapie

Zytostatikum	Abkürzung	maximal tolerable Dosis (mg/kg/Tag)	Schema (Tag)	Applikationsweg	Lösung in
5-Fluorouracil (5-FU "Lederle" TM , Lederle)	5FU	100	1,8,15	i.p.	aqua ad injectabiliam
Gemcitabine (Gemzar 1000 TM , Lilly)	GEM	360	1,8,15	i.v.	aqua ad injectabiliam
GemLip ^a (Klinik für Tumorbiologie)	GEMLIP	6	1,8,15	i.v.	liposomale Formulierung
Taxotere (Doxetacel TM , Rhône-Poulenc)	TXT	20	1,8,15	i.v.	Lösungsmittel des Herstellers
Vindesin (Eldesine TM , Lilly)	VIND	1,5	1,8,15	i.v.	0,9% NaCl 0,9% Benzylalkohol

^a, die liposomale Präparation wurde von der Arbeitsgruppe Dr. U. Massing zur Verfügung gestellt.

i.p. = intraperitoneale Injektion

i.v. = intravenöse Injektion in die Schwanzvene

Die Therapieschemata der einzelnen Versuche lauteten wie folgt:

1. G639 BXF 1299/ 10N8

Gruppe 1:	10 ml/kg/d	aqua ad inj.	1,8,15	i.v.	n = 5
Gruppe 2:	60 mg/kg/d	Gemcitabin	1,8,15	i.v.	n = 5
Gruppe 3:	20 mg/kg/d	Taxotere	1,8,15	i.v.	n = 5
Gruppe 4:	1,5 mg/kg/d	Vindesin	1,8,15	i.v.	n = 5

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

2. G575 PRXF PC3M/6

Gruppe 1:	10 ml/kg/d	aqua ad inj.	1,8,15	i.v.	n = 6
Gruppe 2:	360 mg/kg/d	Gemcitabin	1,8,15	i.v.	n = 6
Gruppe 3:	20 mg/kg/d	Taxotere	1,8,15	i.v.	n = 6
Gruppe 4:	100 mg/kg/d	5-Fluorouracil	1,8,15	i.p.	n = 6
Gruppe 5:	1,5 mg/kg/d	Vindesin	1,8,15	i.v.	n = 6

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

3. G668 BXF 1299T/12N10

Gruppe 1:	10 ml/kg/d	aqua ad inj.	1,8,15	i.v.	n = 7
Gruppe 2:	60 mg/kg/d	Gemcitabin	1,8,15	i.v.	n = 7
Gruppe 3:	6 mg/kg/d	GemLip	1,8,15	i.v.	n = 6
Gruppe 4:	20 mg/kg/d	Taxotere	1,8,15	i.v.	n = 7
Gruppe 5:	1,5 mg/kg/d	Vindesin	1,8,15	i.v.	n = 6

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

4. G576 PRXF PC3MT/6

Gruppe 1:	10 ml/kg/d	aqua ad inj.	1,8,15	i.v.	n = 6
Gruppe 2:	360 mg/kg/d	Gemcitabin	1,8,15	i.v.	n = 5
Gruppe 3:	20 mg/kg/d	Taxotere	1,8,15	i.v.	n = 5
Gruppe 4:	100 mg/kg/d	5-Fluorouracil	1,8,15	i.p.	n = 6
Gruppe 5:	1,5 mg/kg/d	Vindesin	1,8,15	i.v.	n = 6

n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

3.1.10 Parameter zur Beurteilung der Chemotherapie

Als Maß für die Tumorgöße wurde das Tumolvolumen verwendet. Da die Tumoren zu Therapiebeginn eine große Streuung mit jedoch gleichmäßigem nachfolgendem Wachstum aufwiesen, war es vorteilhaft, die Ausgangsgrößen bei der Randomisation zu standardisieren und gleich 100% zu setzen. Alle Folgewerte wurden als relative Größen, bezogen auf den Ausgangswert, gemäß der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Relatives Tumolvolumen (\%)} = \frac{\text{Tumolvolumen an Tag X} \times 100}{\text{Tumolvolumen an Tag 0}}$$

Der Median wurde dem arithmetischen Mittelwert vorgezogen, da eine Normalverteilung der Tumorumfänge nicht vorausgesetzt werden konnte (Fiebig, 1983). Der Verlauf der relativen medianen Tumorumfänge wurde ausgewertet.

3.1.10.1 Wachstumsverlauf im Längsschnitt

Einstufung in Bezug auf den Ausgangswert nach den klinisch üblichen Kriterien:

- Progression: Tumolvolumen >125% des Ausgangsvolumens
- Tumorstillstand: Tumolvolumen >75% - 125%
- minimale Remission: Tumolvolumen > 50% - 75%
- partielle Remission: Tumolvolumen >10% - 50%
- komplette Remission: Tumolvolumen < 10%

3.1.10.2 Tumormassendehemmung im Querschnitt

Bestimmung des Quotienten von Test- / Kontrollgruppe bei maximalem Effekt (= optimaler T/C), in der Regel wird der Zeitpunkt der optimalen Wirkung mit angegeben.

Mit Hilfe des optimalen T/C in Verbindung mit dem Wachstumsverlauf im Längsschnitt wird eine Aktivitätswertung vorgenommen:

-	= inaktiv	= T/C > 50%
+	= Tumorchemmung	= T/C > 25% - 50%
++	= Tumorstillstand	= T/C < 25% und Tx/To > 75% - 1 25%
+++	= partielle Remission	= T/C < 25% und Tx/To > 10% - 75%
++++	= komplette Remission	= T/C < 25% und Tx/To < 10%

3.1.10.3 Relative Tumorwachstumsverzögerung

Nach dem unter 3.1.11 geschilderten Verfahren wurde die Zeit errechnet, nach der jeder einzelne Tumor seine Ausgangsgröße verdoppelt hat. Nach Berechnung der medianen Verdoppelungszeit (VDZ) für die Kontroll- und die Testgruppe wird die Wachstumsverzögerung (growth delay = GD; Kopper & Steel, 1975) gemäß der Formel berechnet:

$$GD = \frac{VDZ \text{ Test} - VDZ \text{ Kontrolle}}{VDZ \text{ Kontrolle}}$$

Der GD gibt an, um wieviel VDZ der Kontrolle die Behandlung das Tumorwachstum verzögert. Die Wachstumsverzögerung beinhaltet damit die Dauer eines Therapieeffektes, unabhängig davon, ob eine initiale Tumorverkleinerung erzielt wurde.

3.1.10.4 Verhalten der Einzeltumoren

Da die Einzeltumoren einer Versuchsgruppe praktisch immer gleichartig reagierten, war ihre Auswertung nur für Sonderfälle wie komplette Remissionen nötig, die bei den Chemotherapieversuchen im Rahmen dieser Arbeit nicht auftraten.

Bei Parameter 1, Einstufung von Remission bis Progression, wurden die Auswertkriterien klinischer Studien auf das Nacktmausmodell übertragen. Parameter 2 und 3, Tumorgößenhemmung und Wachstumsverzögerung, stellten die bei tierexperimentellen Tumoren üblichen Auswertverfahren dar.

3.1.11 Berechnung von Tumorwachstumskurven und Verdoppelungszeiten

Von jedem Einzeltumor wurde die Wachstumsfunktion bestimmt, aus der die Zeiten bis zum Erreichen von vorgegebenen Tumorgrößen errechnet werden konnten. Während der logarithmischen Wachstumsphase bestand eine lineare Abhängigkeit der logarithmierten Tumorgröße und der Zeit. Zur Ermittlung der Wachstumsfunktion wurde die Spline-Interpolation (Herriot & Reinsch, 1973) durchgeführt. Hierbei ergab sich ein geglätteter Kurvenverlauf, die gemessenen Punkte lagen auf der Kurve. Die Zeit, nach der der einzelne Tumor 125, 150, 200 und 400% der Ausgangsgröße erreichte, wurde durch Interpolation errechnet. Die mediane Verdoppelungszeit wurde zur Charakterisierung der Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors, sowie zur Berechnung der Wachstumsverzögerung der Therapie verwendet.

3.1.12 Computerprogramme zur Datenerfassung und Auswertung

Zur Erfassung und Auswertung der Versuchsdaten stand in der Arbeitsgruppe Fiebig ein System von Rechnerprogrammen zur Verfügung. Neben den Versuchsprotokollen mit Originaldaten und relativierten Einzelwerten konnten statistische Parameter, die Wachstums-Zeit-Funktion jedes Einzeltumors und des Medians, die Wachstumsverzögerung von Therapiegruppen gegenüber der Kontrolle, sowie eine zusammenfassende Tabelle zu jedem Therapieversuch abgerufen werden.

3.1.13 *In vitro* Propagierung des Aszitesmodelles

3.1.13.1 Kulturbedingungen

Die verwendeten Tumorzelllinien wurden bei 37°C und 10% CO₂, in einem Zellkulturbrutschrank (Heraeus) gehalten. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GibcoBRL, USA) verwendet, das mit 10% foetalem Kälberserum (FKS, PAN, Aidenbach) versetzt wurde. In der Regel wurden die Zellen alle 7 bis 10 Tage mit Trypsin-EDTA-Lösung (GibcoBRL, USA) von ihrer Unterlage abgelöst und in einer Verdünnung von 1:5 in neue Kulturgefäße umgesetzt.

3.1.13.2 Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen

Der Anteil vitaler Zellen in den Aszites- bzw. Brusthöhlenflüssigkeiten wurde durch den Trypanblau-Exklusionstest bestimmt. Dabei wurden 0,9 ml Zellsuspension mit 0,1 ml Trypanblau (Trypan Blue Stain 0,4%, GibcoBRL, Schottland) vermischt. Mit dieser Lösung wurde eine Neubauer Zählkammer beschickt (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm² Fläche), die mit einem Lichtmikroskop (Modell CK2, Olympus) ausgezählt wurde. Tote Zellen waren an der tiefblauen Färbung erkennbar, vitale Zellen blieben ungefärbt.

3.1.13.3 Einfrieren und Reaktivieren von Zellen

Mindestens 10⁶ Zellen wurden in 1 -1,5 ml DMEM mit 5% DMSO vermischt, in ein Kryogefäß überführt und schrittweise abgekühlt: 60 min. bei 4°C, anschließend über Nacht oder länger bei -70°C. Die Lagerung erfolgte schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Um Zellen zu reaktivieren, wurde das Kryogefäß mit Hilfe eines Wasserbades so lange einer Temperatur von 37°C ausgesetzt, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Diese wurde für 5 min. bei 800 Umdrehungen / min. zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet anschließend in DMEM-Medium mit 10% FKS resuspendiert, um das DMSO zu entfernen. Die gereinigte Zellsuspension wurde dann in einem Zellkulturgefäß mit DMEM-Medium (+10% FKS) in einer Endkonzentration von 5 x 10⁴ Zellen / ml ausgesät.

3.1.13.4 Ermittlung der Zellverdoppelungszeit basierend auf DNA-Gehaltsbestimmung

Zur Bestimmung der Zellverdoppelungszeit wurden die Tumorzellen auf 96-Loch-Platten ausgesät. Pro Loch wurden 5000 Zellen eingesät. Die erste Reihe jeder Schale wurde als Leerkontrolle nur mit Medium befüllt. Pro Zelllinie wurden zwei Reihen (= 24 Loch) pro Platte ausgesät. Insgesamt wurden 2 Platten, für jeden Meßtag eine, bestückt und im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Einen Tag und drei Tage nach der Aussaat wurde der DNA-Gehalt jeweils einer Platte bestimmt. Hierzu wurde ein Propidiumjodid-Assay (PJ-Assay) eingesetzt (Dengler et al, 1995): Auf die Zellen wurden 50 µl/Loch einer PJ-Lösung (25 µg Propidiumjodid/ml destilliertes Wasser) gegeben. Daraufhin wurden die Platten 25 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubation erfolgte aufgrund der Lichtempfindlichkeit der PJ-Lösung im Dunkeln. Während der

Inkubationszeit band das PJ an die DNA der Zellen. Diese Bindung wurde durch Messung der ausgesendeten Fluoreszenzsignale bei 620 nm Emission und 530 nm Extinktion mit Hilfe des Cytofluor 2350 von Milipore quantifiziert. Je mehr DNA gebunden wurde, desto intensiver war das Fluoreszenzsignal. Die Platten wurden danach tiefgefroren und die Messung 24h später wiederholt. Durch das Tierfrieren wurde sichergestellt, daß alle Zellen für PJ permeabel waren und keine weitere Zellteilung mehr erfolgt. Aus beiden Messungen wurde das arithmetische Mittel für jede Zelllinie und die Leerkontrolle berechnet. Zuletzt wurden das arithmetische Mittel der Leerkontrolle von dem der Zelllinien subtrahiert.

Der prozentuale Anstieg der Zellzahl pro Tag (SGR) und die Zellverdoppelungszeit ergaben sich aus folgenden Formeln (Skehan,1986):

$$\text{SGR} = 100 \times \left[-1 + 2 \times \frac{T_u \times (\ln N_2/N_1)}{0,69315 \times T_{\text{obs}}} \right]$$

T_u = Zeiteinheit (d)

\ln = natürlicher Logarithmus

N_2 = gemessene optische
Dichte an Tag 3

N_1 = gemessene optische
Dichte an Tag 1

T_{obs} = Beobachtungszeitraum
(d)

$$\text{Zellverdoppelungszeit} = \frac{16,639}{\ln(1 + 0,01 \times \text{SGR})}$$