

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Etablierung von orthotopen Modellen

Insgesamt wurden sechs humane Tumormodelle durch orthotope Implantation etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Tumormodell als etabliert angesehen, wenn ein reproduzierbares Verfahren entwickelt worden war, mit Hilfe dessen Tumorfragmente eines bestimmten Xenografts in ihr Zielorgan transplantiert wurden und dort kontinuierlich proliferierten. Eine weitere Selektion fand nach der Durchführung der Vorversuchsreihen statt. Hierbei wurden 8 verschiedene Xenografts auf eine kleine Anzahl Tiere, meist 2 bis 6 Mäuse pro Tumor, implantiert. Angangsraten von über 90% und Metastasierungsraten von über 50% waren die Voraussetzung für weitergehende Experimente.

In Tabelle 2 sind die etablierten und charakterisierten Tumormodelle aufgelistet.

Tab. 2: Etablierung und Charakterisierung orthotoper Modelle

Tumorbezeichnung	Anzahl Tiere			
	Vorversuchreihe	Charakterisierung	Substanztestung	Gesamt
Kolonkarzinom CXF 1103T	4	25	n.d.	29
Blasenkarzinom BXF 1299T	6	10	56	72
Prostatakarzinom PRXF PC3T	n.d.	10	n.d.	10
Prostatakarzinom PRXF PC3MT	n.d.	15	60	75
Prostatakarzinom PRXF PC3MMT ^b	n.d.	15	n.d.	15
Aszites-Modell PRXF PC3MAS ^c	n.d.	21	36 ^a	57
n = 6	n = 10	n = 104	n = 144	n = 258

^a, Untersuchungen über den Einfluss der Zellzahl auf verschiedene Parameter des Tumorwachstums.

^b, aus einer Peritonealmetastase entstandene Sublinie des PRXF PC3MT.

^c, aus Aszites entstandene Sublinie des PRXF PC3MT.

n.d. = nicht durchgeführt.

3.2.1.1 Kolonkarzinom CXF 1103T

Insgesamt wurde 29 Tieren das Kolonkarzinom CXF 1103T orthotop implantiert. Auswertbar waren für die Charakterisierung insgesamt 21 Tiere. In der Vorversuchsreihe wurde die genaue Vorgehensweise bei der Implantation festgelegt. Dabei galt es, folgende Fragen zu klären:

An welche Stelle des Darmes wird das Tumorfragment implantiert, welche Größe soll es haben und ist es von Nutzen, mehrere Tumorfragmente zu implantieren? Das Zaekum bot sich aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit als Implantationsort an. Die Darmwand am Beginn des *colon ascendens* war aufgrund ihrer besonders hohen Dicke prädestiniert für eine Transplantation. Eines der zwei am Zaekum operierten Tiere verstarb an Tag 3 *post operationem* an einer Darmperforation. Das Andere mußte an Tag 21 aufgrund der hohen Tumorlast vorzeitig beendet werden. Die übrigen Tiere wurden 42 Tage nach der Implantation beendet und seziiert. In bezug auf Angangsrates und Metastasierung war kein Zusammenhang mit der Anzahl der transplantierten Tumorfragmente erkennbar. Alle drei Tumoren wuchsen infiltrierend am Ort ihrer Implantation in die Darmwand ein. Es bildeten sich bei allen Abklatschmetastasen auf dem Peritoneum. In einem Fall traten Mikrometastasen in der Lunge auf. Als Nebenbefund wurde eine Aktivierung der regionalen Lymphknoten beobachtet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Vorversuchen ist in Tabelle 3 auf Seite 39 aufgeführt.

Aufgrund dieser Daten wurde bei allen folgenden Transplantationen jeweils ein Tumorfragment pro Tier am Beginn des *colon ascendens* implantiert.

Nacktmäuse mit orthotop implantiertem Kolonkarzinom zeigten folgende pathologisch-anatomische Befunde:

Die Bauchdecke war im linken mittleren Quadranten gewölbt. Der Tumor ließ sich durch die Bauchdecke hindurch palpieren und mit der Schieblehre vermessen. Der Allgemeinzustand der Tiere war bei kleiner bis mittlerer Tumorlast gut. Der Tumor infiltrierte die Darmwand, was zu einer partiellen bis vollständigen Stenose im Kolon führte. Außer der Darmwand infiltrierte der Tumor auch die benachbarten Organe. Bei entsprechender Größe kam es dabei zur Verlegung der Ureteren in ihrem kranialen Drittel. Daraus entwickelte sich beidseits eine Hydronephrose. Da die Harnleiter zumeist nicht vollständig stenosierte waren, zeigte sich am Endpunkt des Versuches eine partielle Druckatrophie des Nierengewebes mit einem erweiterten Nierenbecken. Metastasen bildeten sich hauptsächlich auf dem Peritoneum. Die regionalen Lymphknoten und die Leber waren ebenfalls von Metastasen befallen. Seltener traten Metastasen in den Nieren, der Lunge oder auf der Pleura auf.

Zum Krankheitsbild gehörte in einigen Fällen auch Aszites. Die Flüssigkeit im Bauchraum hatte ein Volumen von 0,1 bis 0,3 ml. Sie war trüb, wässrig, weiß und geruchlos. Im Ausstrich fanden sich neben Blut- auch vereinzelt Tumorzellen.

3.2.1.2 Blasenkarzinom BXF 1299T

Von den insgesamt 72 Nacktmäusen, denen das Blasenkarzinom BXF 1299T orthotop implantiert wurde, lieferten 62 auswertbare Daten. 56 Tiere waren für den Chemotherapieversuch implantiert worden. Nach der Randomisation blieben noch 47 Tiere entsprechend 84% im Versuch. Die Tumoren waren zum Zeitpunkt der Randomisation noch nicht palpabel.

Die Vorversuchsreihe lieferte folgende Ergebnisse: die Angangsrate bei den injizierten Tumoren betrug 1 von 4. Hingegen lag die Angangsrate bei Verwendung der Nahttechnik bei 2 von 2. Metastasen traten vorzugsweise in der Bauchhöhle und in einem Fall auch auf der Pleura auf. Es metastasierten ausschließlich Tumoren, die von außen an die Blasenwand genäht worden waren. Hier betrug die Metastasierungsrate 2 von 2. Eine Übersicht über die Befunde aus den Vorversuchen befindet sich in Tabelle 3 auf Seite 39. Für die Charakterisierung des Modells und für die Testung auf Chemosensitivität gegenüber Standardzytostatika wurde als Implantationsmethode das Annähen der Tumorfragmente an die Blasenwand gewählt.

Das pathologisch-anatomische Bild bei Blasenkrebs äußerte sich bei der Nacktmaus wie folgt: Die Tiere hatten eine im kaudalen Drittel aufgewölbte Bauchdecke. Der Tumor ließ sich durch die Bauchdecke palpieren und mit der Schieblehre vermessen. Der Allgemeinzustand war bei kleiner und mittlerer Tumorlast gut. Der Tumor wuchs infiltrativ in die Blase ein. Dadurch kam es zur Verlegung einer oder beider Ureteren. Da der Harn aus den betroffenen Bereichen nicht mehr abfließen konnte, staute er sich und weitete zunächst die Harnleiter, später dann auch das Nierenbecken. Falls nur eine Niere von dieser Entwicklung betroffen war, entstand eine Sackniere. Bei Verlegung beider Harnleiter trat Urämie auf, aufgrund derer das Tier beendet werden mußte. Die regionären Lymphknoten waren von allen Organen am häufigsten mit Metastasen durchsetzt. Ebenfalls befallen waren das Peritoneum, Leber, Lunge und Pleura. Der Befall von Leber, Lunge und Pleura war auf eine primär oder sekundär hämatogene Metastasierung zurück zu führen. Durch Untersuchungen an Tieren in unterschiedlich weit fortgeschrittenen Krankheitsstadien konnte festgestellt

werden, dass vor dem Befall der regionalen Lymphknoten sich Abklatschmetastasen auf dem Peritoneum bildeten.

Tab. 3: Etablierung orthotoper Tumormodelle auf der Nacktmaus

Tumorbezeichnung	Implantationstechnik	Anzahl Tiere (n)	Angangsrate (n/gesamt)	Metastasierungsrate (n/gesamt)	sonstige Befunde ^a
Kolonkarzinom CXF 1103T	Implantationsort: Zaekum	2	1 / 2	1 / 2	Darmperforation: 1 / 2
	Implantationsort: Kolon	2	2 / 2	2 / 2	Hydronephrose ^b : 2 / 2
	Zahl impl. Fragmente: 1	2	2 / 2	2 / 2	Hydronephrose ^b : 1 / 2
	Zahl impl. Fragmente: 2	2	1 / 2	1 / 2	Darmperforation: 1 / 2
Blasenkarzinom BXF 1299T	Injektion von Fragmenten	4	1 / 4	0 / 4	Hydronephrose ^b : 1 / 4
	Implantation mittels Naht	2	2 / 2	2 / 2	Hydronephrose ^b : 1 / 2

^a, nur aufgeführt, falls Befund durch Tumorwachstum oder Implantation hervorgerufen.

^b, Stenose der Ureteren durch Tumor.

3.2.1.3 Prostatakarzinome PRXF PC3T, PC3MT und PC3MMT

Bei der Transplantation von Prostatakarzinomen in ihr Ursprungsorgan gibt es nur eine Methode der Wahl: das Annähen der Fragmente am *corpus prostaticae*. Aus diesem Grunde wurde bei diesem Modell auf eine Vorversuchsreihe verzichtet. Insgesamt wurde 75 Tieren das Prostatakarzinom PRXF PC3MT implantiert. Von den 60 Tieren, die für den Chemotherapieversuch vorgesehen waren, wurden 77% entsprechend 46 Tieren nach der Randomisation in den Versuch aufgenommen. Alles in allem waren die Daten von 60 Tieren für die Charakterisierung dieses Tumors auswertbar.

Der Xenograft PRXF PC3T wurde auf 10 Tiere transplantiert. Weitere 15 Tiere wurden verwendet, um PRXF PC3MMT zu untersuchen. Für PRXF PC3T standen 8 auswertbare Tiere zur Verfügung, bei PRXF PC3MMT waren es 14.

Tiere mit Prostatakrebs zeigten einen deutlich aufgewölbten Unterleib bei gutem Allgemeinzustand. Durch die Bauchdecke hindurch ließ sich der Tumor gut palpieren und mit der Schieblehre vermessen. Der Tumor infiltrierte sein Ursprungsorgan sowie seine direkte Umgebung. Die in der Nachbarschaft befindlichen Geschlechtsdrüsen waren zumeist vollständig mit dem Tumor verwachsen. Besonders in den Samenblasendrüsen kam es dadurch zu Stauungen des Sekretflusses, die mit einer erheblichen Vergrößerung des Organs einhergingen. Histologisch war in diesen Fällen eine Abflachung des sekretorischen Epithels und Sekretstau zu beobachten. Da der Tumor auch das Kolon und/oder die Blase infiltrierte, kam es zu pathologischen Veränderungen am Urogenital- bzw. Darmtrakt. Durch den Verschluss der Ureteren mit Tumormasse entstand zunächst ein Harnstau, der später eine Hydronephrose hervorrief. Griff der Tumor auf den kaudalen Teil des Kolons über, entstand über kurz oder lang ein Ileus. Das Prostatakarzinom PRXF PC3T metastasierte ausschließlich in die regionalen Lymphknoten. PRXF PC3MT metastasierte ebenfalls in die regionalen Lymphknoten. Abgesehen davon waren insbesondere die Lymphknoten der Bauchhöhle der Achsel und der Leiste mit Sekundärgeschwulsten durchsetzt. Bei einem Viertel der Tiere wurden auch Leber, Lunge, Pleura, Niere und/oder die Milz von Metastasen durchsetzt. PRXF PC3MMT zeigte ein ähnliches, wenn auch nicht so ausgeprägtes Metastasierungsmuster. Die regionalen sowie die mediastinalen Lymphknoten waren befallen. Seltener auch die Lymphknoten der Bauchhöhle, der Achsel und der Leiste sowie das Peritoneum und die Leber. Das Prostatakarzinom PRXF PC3MT und seine Sublinie PRXF PC3MMT

erzeugten zudem Aszites. Die wässrige, weiße, trübe und geruchlose Flüssigkeit schwankte in ihrem Volumen zwischen 0,5 und 5 ml. Es fanden sich sowohl Blut- als auch Tumorzellen im Ausstrich. In manchen Fällen trat zusätzlich ein Erguß in der Brusthöhle auf. Aussehen und Konsistenz der Brusthöhlenflüssigkeit glichen denen der Aszites. Auch fanden sich Tumorzellen in der Flüssigkeitsansammlung, allerdings in geringeren Konzentrationen als in der Bauchhöhle.

3.2.1.4 Aszites PRXF PC3MAS

Die Etablierung dieses Modells erfolgte aus dem Prostatakarzinom PRXF PC3MT. Bei diesem Tumor trat, sofern er orthotop implantiert wurde, mit einer Häufigkeit von 60% eine Aszites auf. Durch sterile Gewinnung dieser Flüssigkeit und anschließende intraperitoneale Injektion ließ sich die Aszites auch ohne orthotope Implantation eines soliden Tumors erzeugen. Insgesamt wurden 57 Tiere zur Etablierung und Charakterisierung eingesetzt. Die Zahl der behandelten Tiere stimmte mit der der auswertbaren überein.

Tiere, die eine Aszites entwickelten, zeigten folgende Merkmale:

Bei gutem Allgemeinzustand war die Bauchdecke deutlich aufgewölbt. Beim Palpieren fiel eine starke Fluktuation auf. Ein Viertel der Tiere entwickelte zusätzlich einen Erguß im Thorax. Bei diesen Tieren konnten Anzeichen von Atemnot, wie Schnappatmung und Zyanose der Haut beobachtet werden. In der Bauchhöhle befanden sich 0,5 - 5 ml einer weißen, trüben, wässrigen und geruchlosen Flüssigkeit, deren Tumorzellgehalt im Median bei $4,36 \times 10^7$ Zellen pro ml lagen. Eine ausgeprägte Peritonealkarzinose mit Beteiligung der Bauchhöhlenlymphknoten war ebenfalls Teil des Krankheitsbildes. Der oben erwähnte Thoraxerguß enthielt im Median $0,28 \times 10^6$ Tumorzellen pro Milliliter. Konsistenz und Aussehen entsprachen denen der Aszites. Die Mediastinallymphknoten waren bei Tieren mit einem solchen Erguß mit Tumorzellen durchsetzt. Leber und Niere waren in 6% aller Fälle von soliden Metastasen befallen. Zwei Drittel dieser Metastasen befand sich in der Leber der Rest in den Nieren.

3.2.1.5 Weitere orthotop implantierte Tumoren

Neben den sechs etablierten und charakterisierten Modellen, wurden in einer ersten Arbeitsphase noch weitere Tumortypen auf ihre Eignung als orthotopes Modell hin untersucht. Bei jeweils 2-5 Tieren wurden Mamma-, Lungen- und Magenkarzinome in ihr Ursprungsorgan transplantiert. Auf eine nähere Charakterisierung dieser Modelle wurde aufgrund ihrer niedrigen Angangs- und/oder Metastasierungsraten verzichtet. Eine Übersicht der Ergebnisse aus den Versuchen mit den nicht charakterisierten Tumormodellen ist Tabelle 4 auf Seite 43 zu entnehmen.

Tab. 4: Weitere orthotop implantierte Tumoren auf der Nacktmaus

Tumorbezeichnung	Implantationstechnik	Anzahl Tiere (n)	Angangsrate (n/gesamt)	Metastasierungsrate (n/gesamt)	sonstige Befunde ^a
Lungenkarzinom LXFA 289T	Injektion in Hauptbronchus ^b	5	0 / 5	0 / 5	lobuläre Atelektase: 3 / 5
Lungenkarzinom LXFA 989T	Injektion in Hauptbronchus ^b	3	0 / 3	0 / 3	lobuläre Atelektase: 3 / 3
Lungenkarzinom LXFE 397T	Injektion in Hauptbronchus ^b	5	0 / 5	0 / 5	lobuläre Atelektase: 4 / 5
Lungenkarzinom LXFS 538T	Injektion in Hauptbronchus ^b	4	0 / 4	0 / 4	lobuläre Atelektase: 4 / 4
Lungenkarzinom LXFL 529T	Implantation mittels Naht ^c	2	2 / 2	0 / 2	Zyanose: 2 / 2
Magenkarzinom GXF 251T	Implantation mittels Naht	2	2 / 2	0 / 2	unvollständige Pylorusstenose: 1 / 2
Mammakarzinom MAXF 401T	Implantation in mamilläres Fettgewebe	4	4 / 4	0 / 4	akute Schwellung der Lnn. axx.: 4 / 4
Mammakarzinom MAXF 1162T	Implantation in mamilläres Fettgewebe	5	5 / 5	0 / 5	akute Schwellung der Lnn. axx.: 3 / 5
		n = 8			
		n = 30			

^a, nur aufgeführt, falls Befund durch Tumorwachstum oder Implantation hervorgerufen.

^b, 1-2 mm große Tumorfragmente mittels Knopfkanüle über Trachea in Hauptbronchus injiziert.

^c, 2 mm große Tumorfragmente nach Thorakotomie an den kaudalen Lappen der linken Lunge genäht. Lnn. axx. = *lymphonodi axillares*