

3.2.2 Charakterisierung der orthotopen Modelle

3.2.2.1 Angangsrate

Die Angangsraten der orthotopen Modelle lagen zwischen 75% und 100%. Die niedrigste Angangsrate hatte das Prostatakarzinom PRXF PC3T. Sie betrug 75%, gefolgt von 80% des Prostatakarzinoms PRXF PC3MMT. Bei allen anderen Tumoren CXF 1103T, BXF 1299T, PRXF PC3MT sowie dem Aszitesmodell PRXF PC3MAS konnten Angangsraten von 100% erreicht werden. Nur Modelle mit solch optimalem Tumorwachstum konnten für Chemotherapeutikatestungen eingesetzt werden. Da zum Zeitpunkt der Randomisation die Tumoren noch nicht palpabel waren, mußte davon ausgegangen werden können, daß jedes implantierte Tier, das die sonstigen Kriterien der Randomisation erfüllte, auch tumortragend war.

Für das Aszitesmodell wurde zusätzlich die Angangsrate nach Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff bestimmt. 5 der 8 behandelten Tiere entwickelten im Laufe des Beobachtungszeitraumes ein Krankheitsbild entsprechend dem Aszitesmodell. Dies entsprach einer Angangsrate von 63%. Dieser Prozentsatz war ausreichend, da die erste Passage nach dem Auftauen lediglich zur Neu-etablierung des Modells Verwendung fand. Wurden die Zellen nach dem Auftauen zunächst in der Kulturflasche vermehrt, konnte die Angangsrate erneut auf 100% angehoben werden.

Eine Übersicht der Angangsraten aller orthotopen Modelle ist in Tabelle 5 auf Seite 54.

3.2.2.2 Wachstumsgeschwindigkeit

Der Wachstumsverlauf der orthotop implantierten Xenografts wurde über maximal 12 Wochen verfolgt. Die Induktionszeit betrug bei den solide wachsenden orthotopen Tumoren im Allgemeinen 21 Tage. In der Regel mußte ein Versuch nach spätestens 49 Versuchstagen beendet werden, da die Tumoren sonst die maximal zulässige Größe überschritten hätten. Lediglich das Prostatakarzinom PRXF PC3T wurde darüber hinaus beobachtet, da selbst 70 Tage nach der Implantation keine Tumoren palpabel waren.

Die Wachstumskurven der einzelnen Xenografts zeigen die Abbildungen 3 bis 6 (S. 46 bis 52). Alle haben eine lineare x-Achse und eine logarithmische y-Achse.

Im Abschnitt a (S.46-51) sind die Tumolvolumina der Einzeltiere aufgetragen. Bei Betrachtung der absoluten Werte fällt auf, daß die Anfangswerte zwar streuten, aber die Einzelkurven nahezu parallel verliefen. Somit war es sinnvoll, die Eingangswerte gleich 100% zu setzen. Damit wurde der Nachteil der großen Streuungen in den meisten Fällen eliminiert. Lediglich CXF 1103T zeigte auch bei dieser Darstellungsform eine relativ breite Streuung der Wachstumskurven der Einzeltumoren. Die Abbildungen 3b bis 6b (S. 46 - 51) zeigen die relativen Einzelwerte jedes Tumors. Trotz dieses Darstellungsverfahrens war es wünschenswert, die Streuung innerhalb eines Tumormodells so gering wie möglich zu halten. Die geringste Streuung trat bei PRXF PC3MMT, die höchste bei PRXF PC3MT auf.

Um das Wachstumsverhalten einer Gruppe gleicher Tumoren einer anderen Gruppe gegenüber stellen zu können, muß diese Gruppe in einer Kurve zusammengefaßt werden. Hierfür war bei Wachstumskurven orthotop implantierter Xenografts der Median des relativen Tumolvolumens am besten geeignet. Er verhinderte eine allzu große Beeinflussung des Kurvenverlaufes durch untypische Einzelwerte. Jede der Abbildungen 3 bis 6 zeigt in ihrem Abschnitt c (S.47-52) den Verlauf des relativen, medianen Tumolvolumens. Diese Kurve ist charakteristisch für das Wachstumsverhalten eines Tumormodells. Die Wachstumskurven, die dabei entstanden, sind nahezu linear. Die Tumoren waren folglich in eine Wachstumsphase eingetreten, in der ihre logarithmische Größe linear von der Zeit abhängig war. Eine Abflachung der Kurve gegen Ende des Beobachtungszeitraumes deutete auf eine Wachstumsverlangsamung hin. Der Tumor trat nun von seiner logarithmischen Wachstumsphase in die Plateauphase ein. Eine Abflachung der Wachstumskurve trat bei BXF 1299T an VT 14 bei einem relativen Tumolvolumen von 700% auf, was einem absoluten Wert von 550 mm³ entsprach. CXF 1103T verlangsamte sein Wachstum geringfügig ebenfalls an VT 14. Zu diesem Zeitpunkt lag sein relatives, medianes Tumolvolumen bei 1200%, was einem Absolutwert von 800 mm³ entsprach. Die Wachstumskurve von PRXF PC3MMT flachte an VT14 ab. Das relative, mediane Tumolvolumen betrug derzeit 450%. Dies entsprach einem Absolutwert von 450 mm³. Die Wachstumskurve von PRXF PC3MT flachte erst an VT 21 geringfügig ab. Das relative, mediane Tumolvolumen betrug 3500%, was einem Absolutwert von 1600 mm³ entsprach.

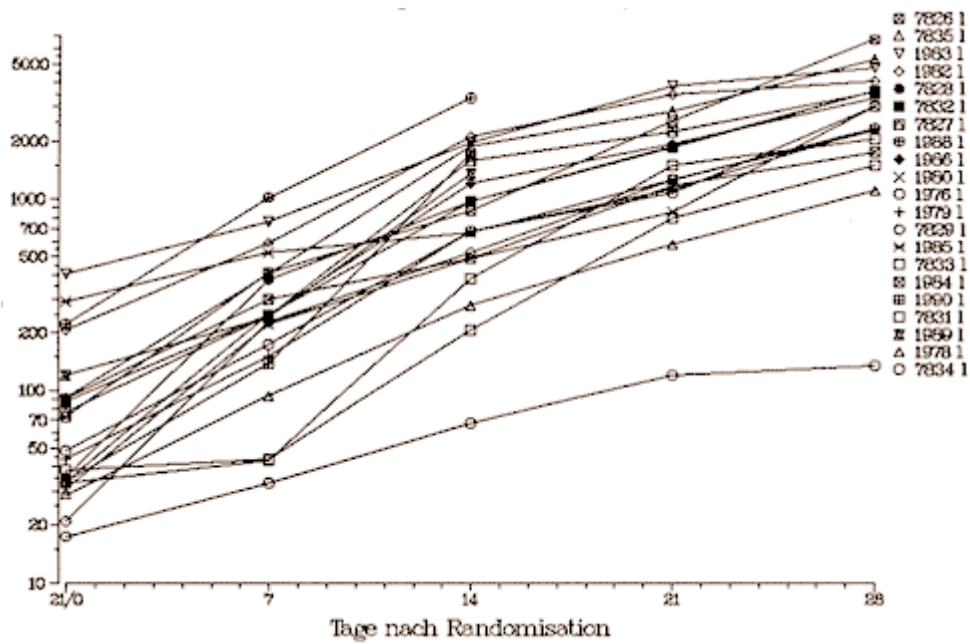


Abb. 3a: individuelle, absolute Tumorvolumina in mm³ des orthotop implantierten CXF 1103T/13N4. n = 21

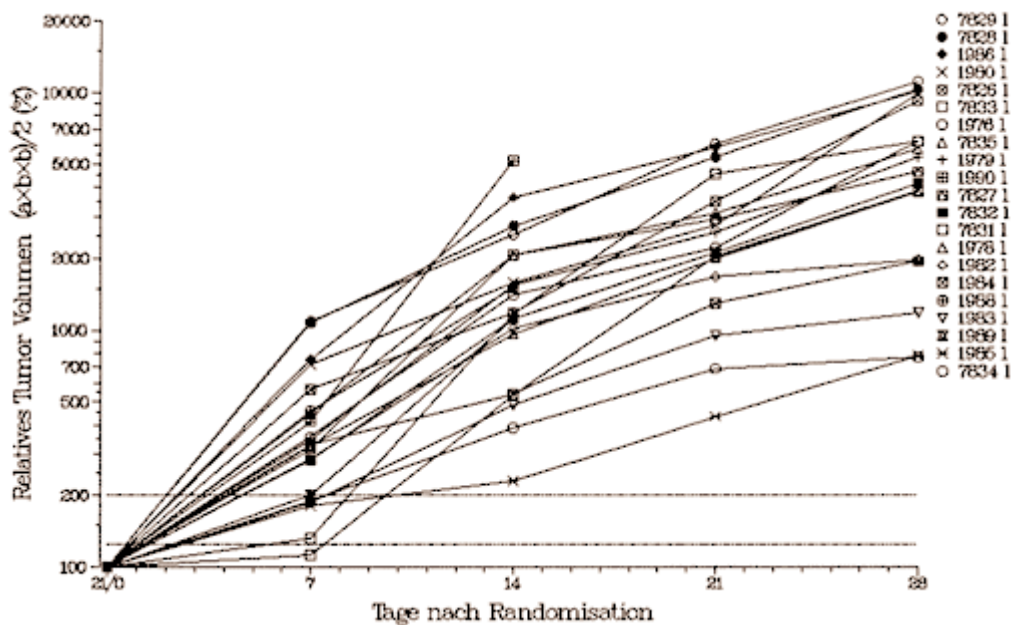


Abb. 3b: individuelle, relative Tumorvolumina des orthotop implantierten CXF 1103T/13N4. n = 21.

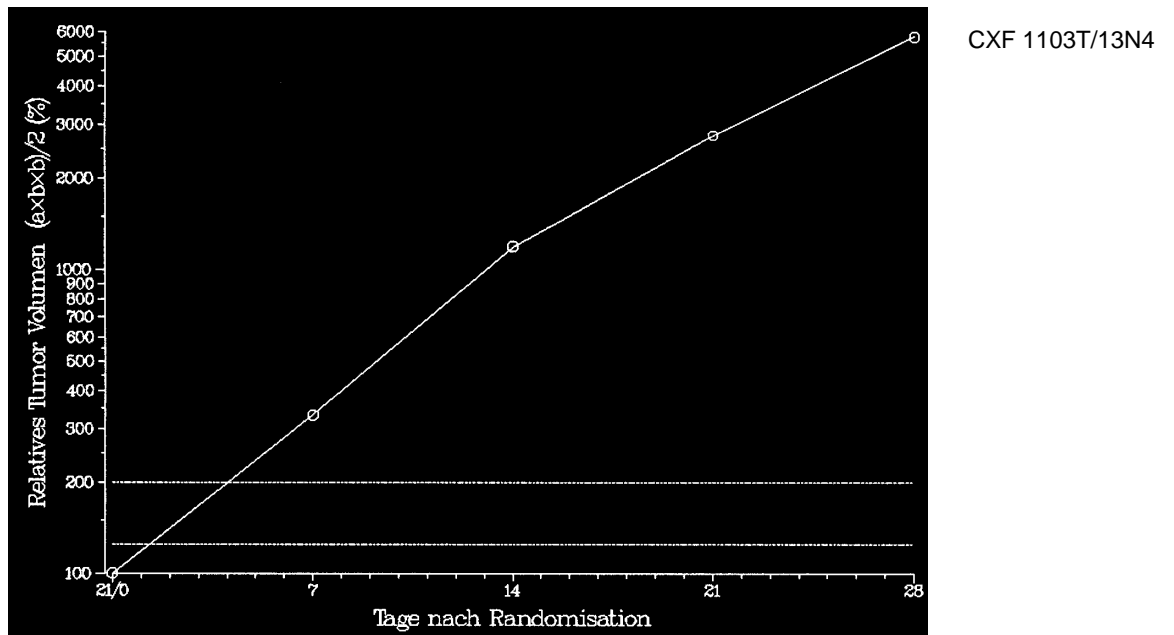


Abb. 3c: relatives, medianes Tumolvolumen des orthotop implantierten CXF 1103T/13N4. n = 21.

Abb. 3: Wachstumsverhalten des orthotop implantierten humanen Xenograft CXF 1103T/13N4 in der Nacktmaus.

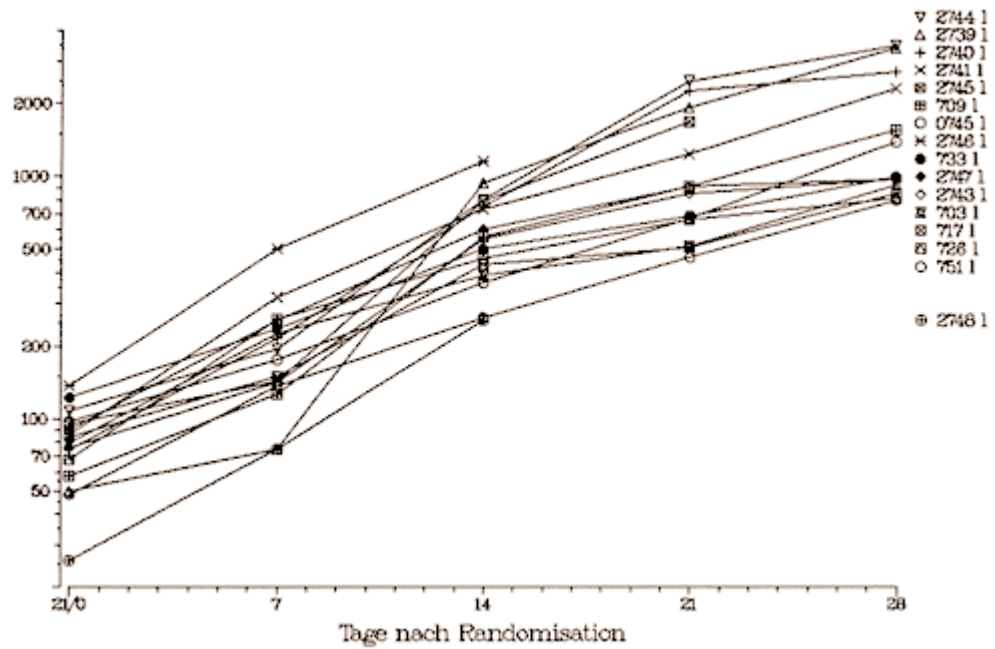


Abb. 4a: individuelle, absolute Tumolvolumina in mm³ des orthotop implantierten BXF 1299T/7N5. n = 16.

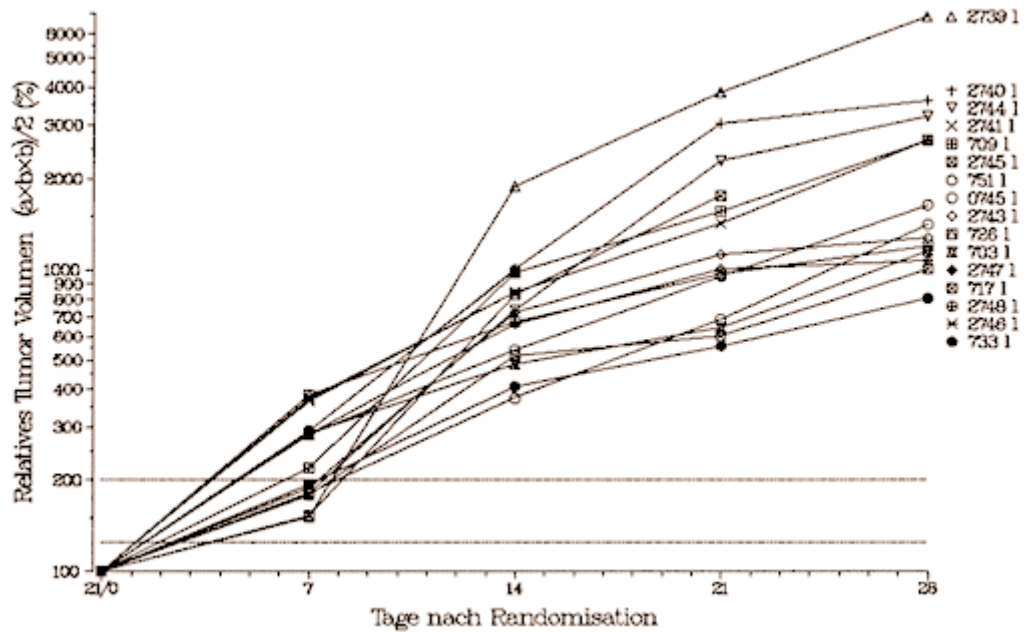


Abb. 4b: individuelle, relative Tumolvolumina des orthotop implantierten BXF 1299T/7N5. n = 16.

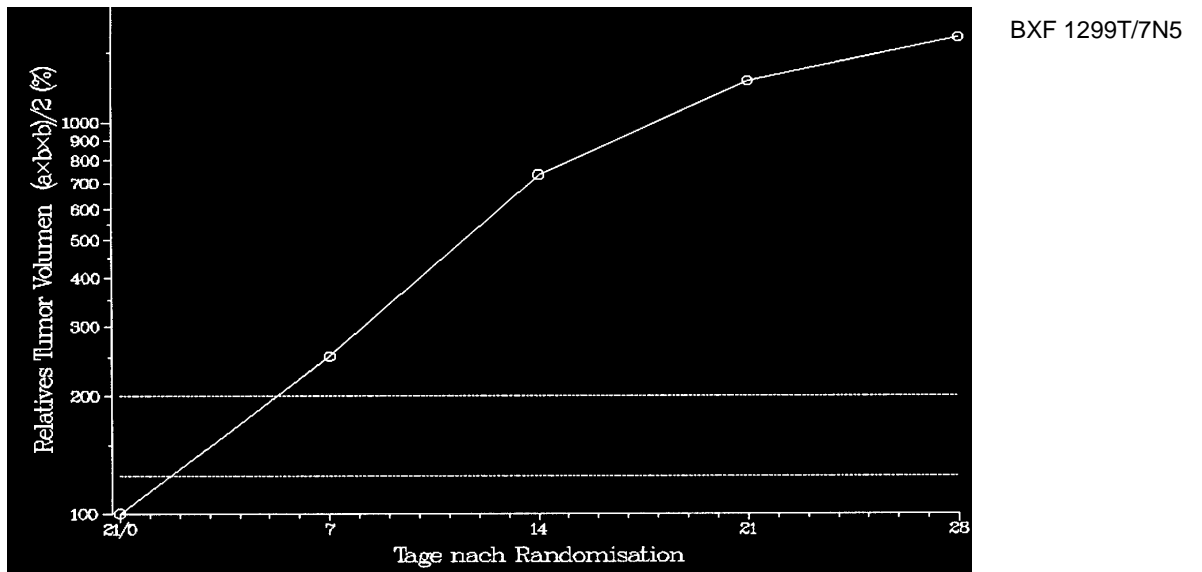


Abb. 4c: relatives, medianes Tumolvolumen des orthotop implantierten BXF 1299T/7N5. n = 16.

Abb. 4: Wachstumsverhalten des orthotop implantierten humanen Xenograft BXF 1299T/7N5 in der Nacktmaus.

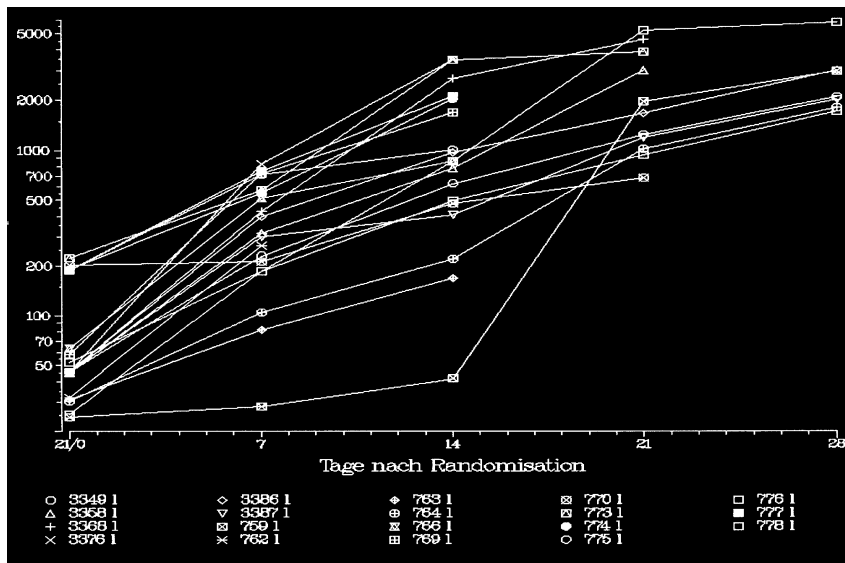


Abb. 5a: individuelle, absolute Tumolvolumina in mm³ des orthotop implantierten PRXF PC3MT in Passage 2. n = 19.

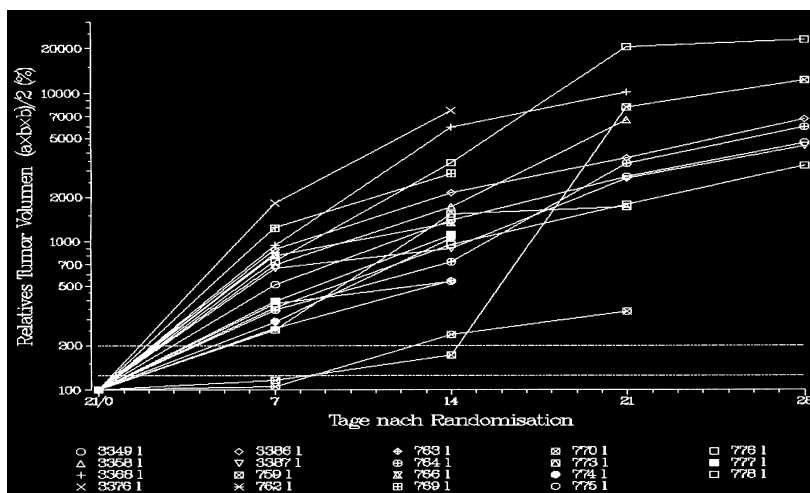


Abb. 5b: individuelle, relative Tumolvolumina des orthotop implantierten PRXF PC3MT in Passage 2. n = 19.

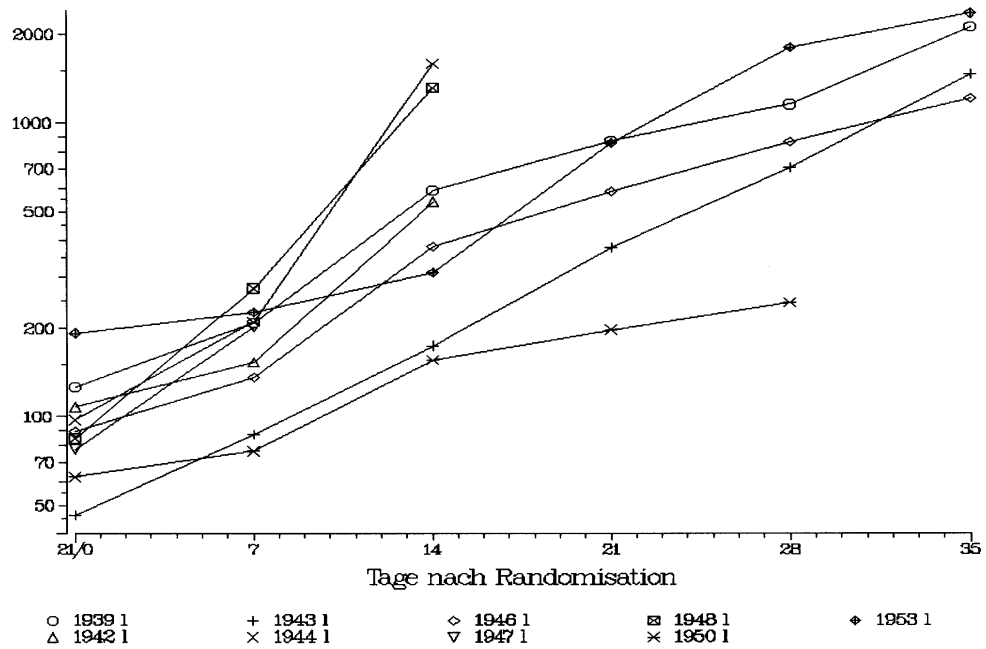


Abb. 6a: individuelle, absolute Tumorumfänge in mm³ des orthotop implantierten PRXF PC3MMT in Passage 3. n = 9.

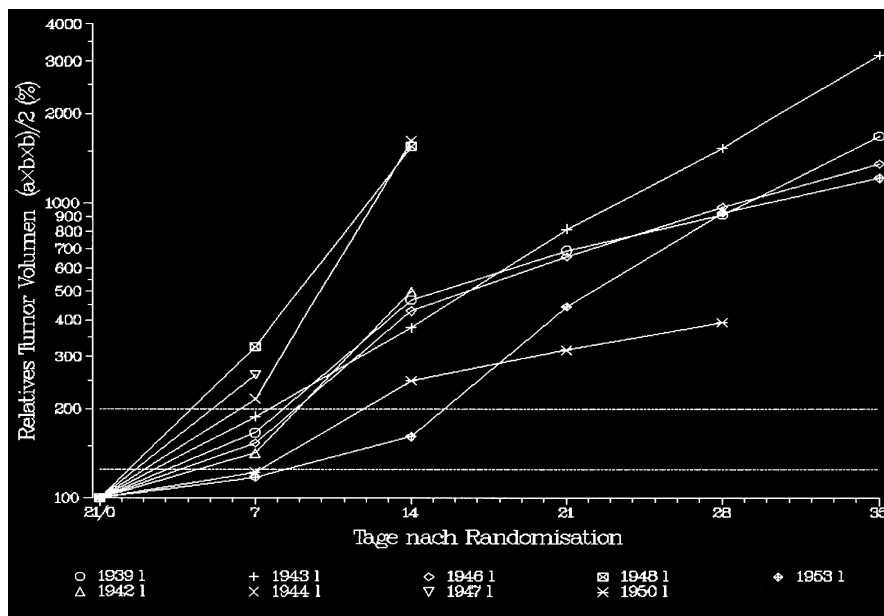


Abb. 6b: individuelle, relative Tumorumfänge des orthotop implantierten PRXF PC3MMT in Passage 3. n = 9.

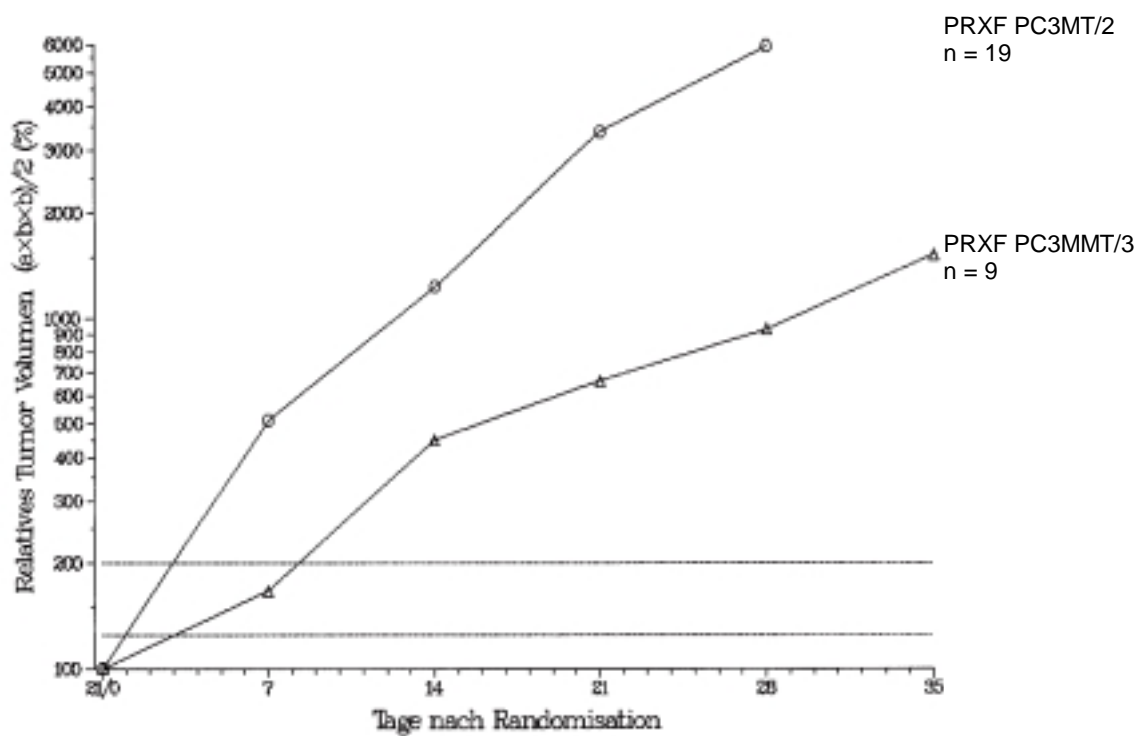


Abb. 5 + 6c: relative, mediane Tumolvolumina in Prozent der orthotop implantierten PRXFs PC3MT in Passage 2 und PC3MMT in Passage 3. PC3MT/2: n = 19; PC3MMT/3: n = 9.

Abb. 5 + 6: Wachstumsverhalten der orthotop implantierten humanen Xenografts PRXF PC3MT/2 und PRXF PC3MMT/3 in der Nacktmaus.

Die Verdoppelungszeiten der einzelnen Xenografts sind in Tabelle 5 (S. 54) aufgeführt.

Die kürzeste Verdoppelungszeit hatte PRXF PC3MT. Nach 1,7 Tagen hatte der Tumor bereits 200% seines Ausgangsvolumens erreicht. CXF 1103T und BXF 1299T benötigten hierfür 3 bzw. 4,6 Tage. PRXF PC3MMT war noch einmal deutlich langsamer als die drei vorgenannten Modelle: nach 7,8 Tagen hatte der Tumor im Median 200% seines Ausgangsvolumens erreicht. Im Vergleich der drei Prostata-Modelle war PRXF PC3MT der Tumor mit der kürzesten Verdoppelungszeit. PRXF PC3MMT benötigte im Vergleich mehr als viermal so viel Zeit bis das Tumolvolumen 200% seines Ausgangswertes erreicht hatte. PRXF PC3T wuchs so langsam, daß eine Bestimmung des Tumolvolumens durch die Bauchdecke während eines Beobachtungszeitraumes von 84 Tagen nicht möglich war. Der Median der Tumolvolumina von PRXF PC3T zum Zeitpunkt der Sektion betrug 43 mm³. Dieser Wert wurde durch Vermessen der Tumoren bei eröffneter Bauchdecke gewonnen. Es ließ sich bei diesem Modell lediglich die Aussage treffen, daß die Tumoren innerhalb von 84 Tagen von einem medianen Volumen von 4 mm³ zum Zeitpunkt der Implantation auf ein medianes Volumen von 43 mm³ angewachsen waren. Die Verdoppelungszeit konnte daraus nicht errechnet werden, da nicht davon ausgegangen werden konnte, daß das Tumorstadium während der gesamten Zeitspanne logarithmisch erfolgte.

Tab. 5: Wachstumsverhalten orthotop implantierter humaner Tumorenografts in der Nacktmaus

Tumorbezeichnung	Anzahl Tiere ^a (n)	Angangs- rate ^b (%)	Induktions- zeit ^c (Tage)	Tumor- volumen VT0 (mm ³)	relatives, medianes # Tumolvolumen (%) Tag 7	14	21	28	Zeit bis Tumolvolumen	
									200% (Tage)	400% (Tage)
Kolonkarzinom CXF 1103T / 13N4	21	100	21	49	332 94	1191 95	2343 95	5351 92	3	7,6
Blasenkarzinom BXF 1299T / 7N5	16	100	21	82	252 98	734 96	956 92	1408 87	4,6	9,2
Prostatakarzinom PRXF PC3T / 2	0	75	n.d.	n.d.	n.d. 107	n.d. 109	n.d. 114	n.d. 113	n.d.	n.d.
Prostatakarzinom PRXF PC3MT / 2	19	100	21	45	509 99	1231 97	3375 93	5905 92	1,7	5,1
Prostatakarzinom PRXF PC3MMT / 3	9	80	21	89	166 101	448 101	659 104	930 104	7,8	12,8
Aszites-Modell PRXF PC3MAS / 3-7	21	100	0	n.d.	n.d. 109	n.d. 126	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

^a, Tiere mit vermeßbarem Tumor.

^b, Anteil an der Gesamtheit der auswertbaren Tiere.

^c, Zeit zwischen Implantation und erstem Meßtag.

n.d. = nicht durchgeführt.

Tabelle 6 zeigt Angangsraten und Wachstumsgeschwindigkeit der orthotop implantierten Xenografts im Vergleich mit den korrespondierenden subkutan implantierten Tumoren.

Tab. 6: Wachstumsverhalten humaner Tumorexografts orthotop und subkutan in der Nacktmaus wachsend

Tumorbezeichnung	Angangsrate		Verdoppelungszeit	
	o.t. Implantation (%)	s.c. Implantation ^a (%)	o.t. Implantation (Tage)	s.c. Implantation ^a (Tage)
CXF 1103 (T)	100	95	3	4
BXF 1299 (T)	100	97	4,6	7
PRXF PC3 (T)	75	93	n.m.	7
PRXF PC3M (T)	100	87	1,7	3

^a, Daten stammen aus den jeweils jüngsten Experimenten mit dem betreffenden Xenograft

o.t. = orthotop

s.c. = subkutan

n.m. = nicht messbar

Mit Ausnahme des PRXF PC3T wuchsen die orthotop implantierten Tumore besser als die unter die Haut implantierten. Während die Angangsraten im gleichen Größenbereich lagen, waren die Verdoppelungszeiten der Xenografts im Ursprungsgewebe deutlich kürzer als diejenigen des subkutanen Modells.

Für das Aszitesmodell mußte ein Parameter gefunden werden, der die Tumorlast des Einzeltieres anzeigte. Nach Beobachtung der Tiere über einige Passagen hinweg, stellte sich heraus, daß das einzige zuverlässige Kriterium hierfür die Beobachtungszeit war. An dieser Stelle sei noch einmal verdeutlicht, daß darunter die Zeitspanne zwischen Injektion und Beenden des moribunden Tieres verstanden wurde. Die Kriterien zur Tötung eines Versuchstieres sind in Tabelle A1 im Anhang (S. 147) aufgeführt. Der Nachteil gegenüber den anderen orthotopen Modellen lag vor allem in der Tatsache, daß es pro Tier nur einen Wert gab. Die Entwicklung von der Injektion bis zum Endstadium der Erkrankung konnte nicht quantitativ dokumentiert werden.

Die Länge der Beobachtungszeiten hing von der injizierten Zellzahl ab. Je mehr Zellen injiziert wurden, um so schneller trat ein lebensbedrohlicher Zustand des betroffenen Tieres ein. Bei Applikation der gleichen Menge von Zellen, blieb auch die Beobachtungszeit konstant. In einer ersten Testreihe wurden die Asziteszellen in 5 Passagen auf der Nacktmaus gehalten. Die dabei injizierte Zellzahl betrug jeweils 4 Mio Zellen / Tier. In Abbildung 7 sind die Beobachtungszeiten für die einzelnen Passagen aufgetragen.

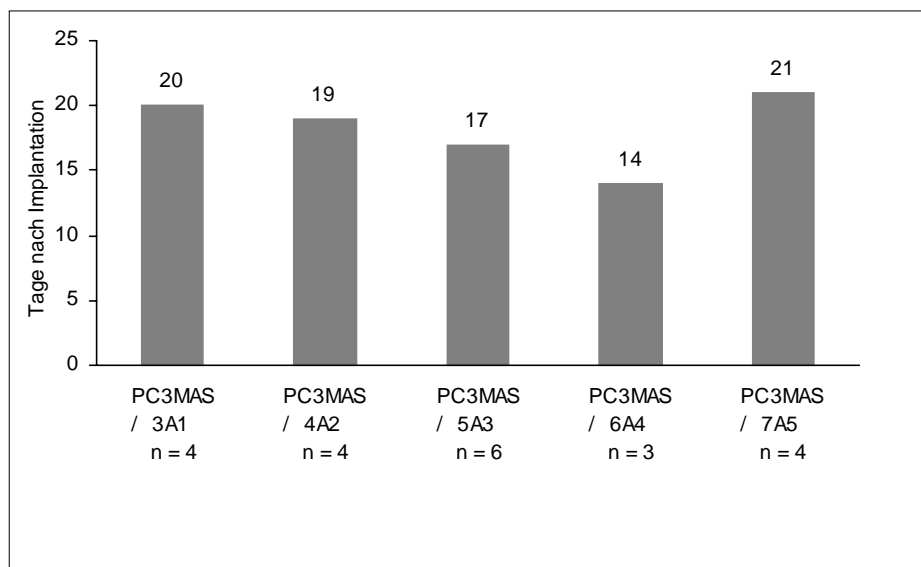


Abb.7: Mediane Beobachtungszeiten von Nacktmäusen nach intraperitonealer Injektion von PC3MAS-Asziteszellen in Passage 3 bis 7. Injizierte Zellzahl = 4 Mio / Tier
n = Tierzahl pro Passage

Der Median aus den 5 Passagen betrug 19 Tage. Die Werte innerhalb einer Passage differierten um 1-6 Tage. Diese Schwankungen innerhalb einer Gruppe gleichbehandelter Tiere traten auch in den nachfolgenden Versuchen auf.

In Abbildung 8 sind sowohl die relative Anzahl der Tiere als auch die medianen Beobachtungszeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl aufgeführt. Die hierbei verwendeten Zellen stammten aus einer Nacktmauspassage.

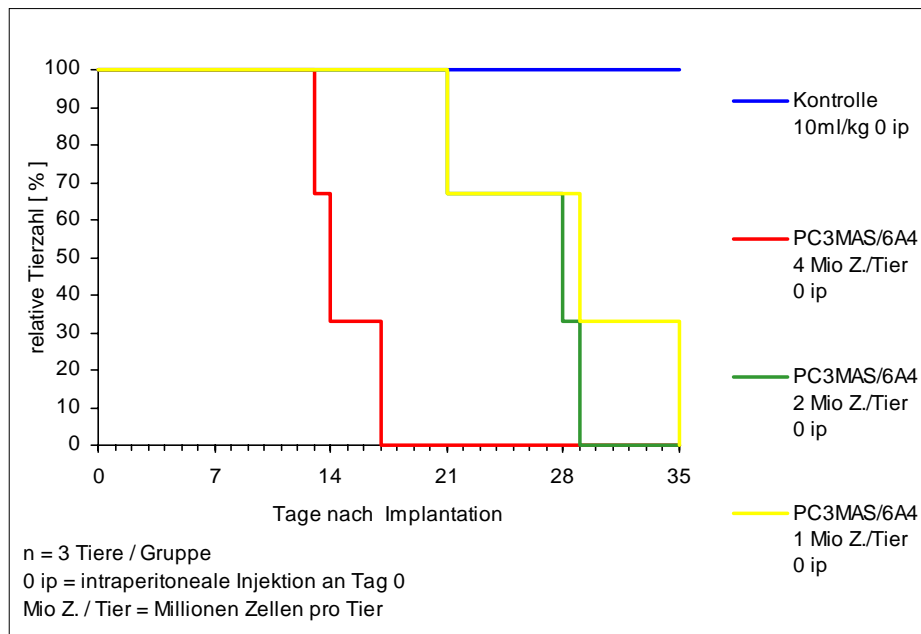


Abb. 8a: Relative Tierzahl in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3MAS/ 6A4. Spenderzellen stammen aus Nacktmauspassage.

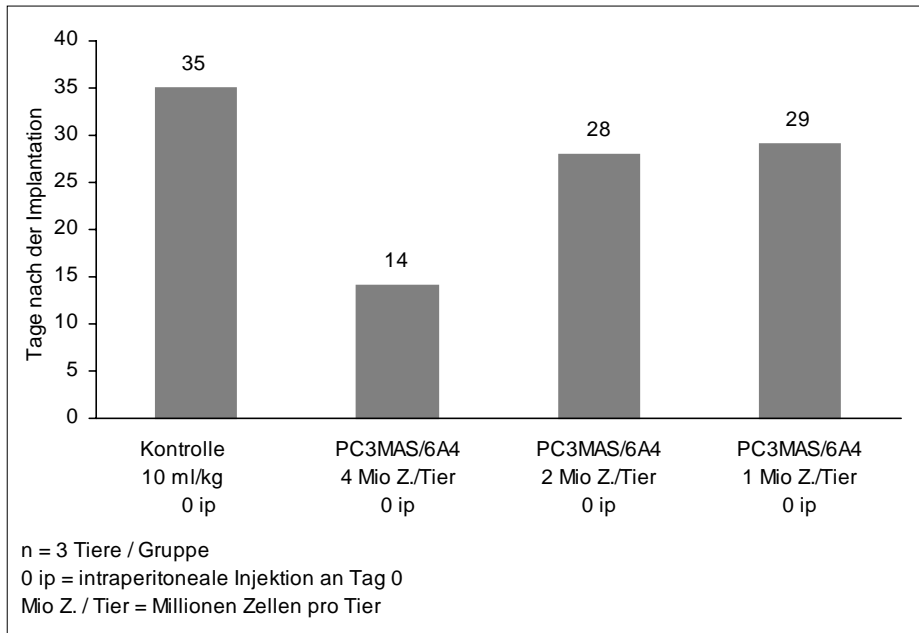


Abb. 8b: Mediane Beobachtungszeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3MAS/6A4. Spenderzellen stammen aus Nacktmauspassage.

Dieser Versuch zeigte, daß die Beobachtungszeit abhängig war von der injizierten Zellzahl. Die beiden Größen verhielten sich jedoch nicht proportional zueinander. Durch die Verlängerung der Lebensdauer, die aus der Senkung der Zellzahl resultierte, konnte die Beobachtungsdauer verlängert werden.

Abb. 9 auf Seite 59 zeigt die relative Anzahl der Tiere als auch die medianen Beobachtungszeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl. Die hierbei verwendeten Zellen wurden vor der Injektion in die Nacktmaus über eine Generation in der Kulturschale vermehrt.

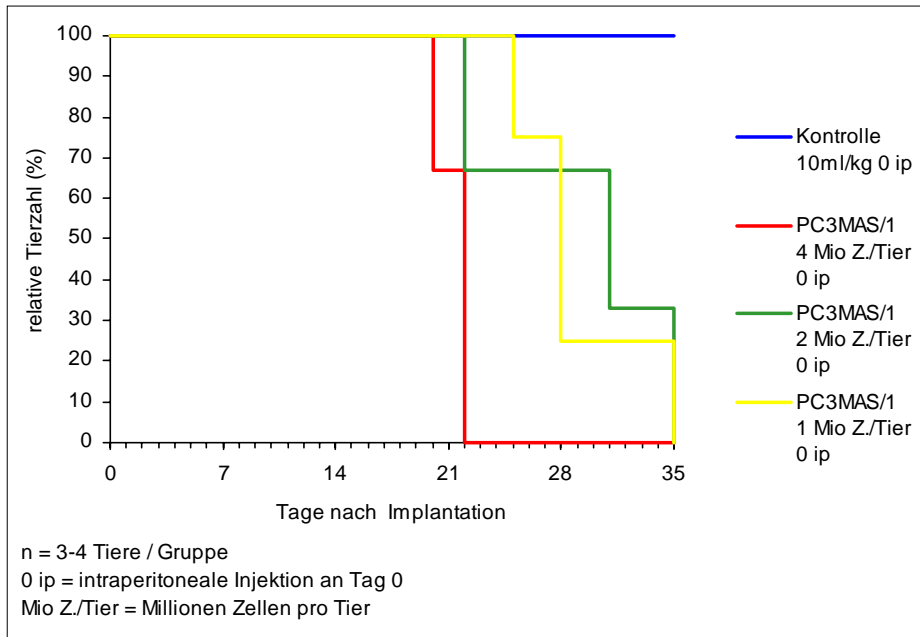


Abb. 9a: Relative Tierzahl in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3MAS/ 1. Spenderzellen wurden über eine Generation *in vitro* gehalten.

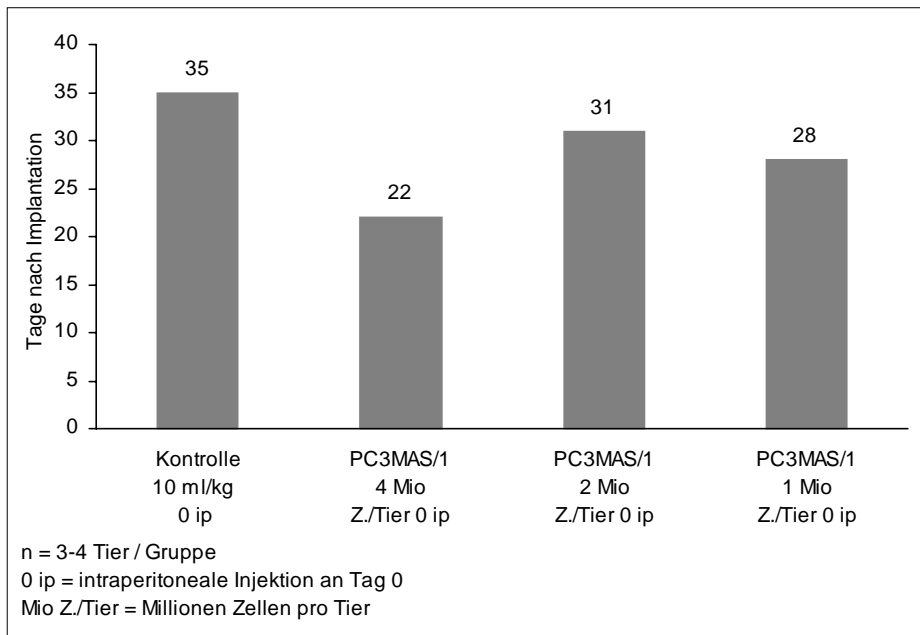


Abb. 9b: Mediane Beobachtungszeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3MAS/1. Spenderzellen wurden über eine Generation *in vitro* gehalten.

Bei Betrachtung der Daten dieses Versuches fiel sofort auf, daß die mit 2 Mio Zellen behandelten Tiere länger beobachtet werden konnten als diejenigen, die 1 Mio Zellen erhalten hatten. Da die Differenz zwischen den

Medianen beider Gruppen aber lediglich 3 Tage betrug und die Gruppengröße mit 3 bzw. 4 Tieren relativ klein war, wurde dieser Tatsache keine statistische Relevanz beigemessen. Bei Betrachtung der Gruppe 2 im Vergleich mit den Gruppen 3 und 4 konnte auch in diesem Versuch eine Abhängigkeit der Beobachtungszeit von der injizierten Zellzahl beobachtet werden. Beide Größen verhielten sich nicht proportional zueinander. Gruppe 2 aus diesem Versuch lebte 8 Tage länger als die entsprechende Gruppe aus dem Versuch, bei dem die Spenderzellen aus einer Nacktmauspassage stammten. In den unteren beiden Zellkonzentrationen glichen sich die Beobachtungszeiten der beiden Versuche.

Die vorrangige Aussage in diesem Versuch war, daß die Zellen durch die Passage in der Kulturflasche ihre Fähigkeit zur Erzeugung einer Aszites nicht verloren hatten. Es war folglich nicht nötig, die Zellen permanent auf der Nacktmaus zu halten.

Abb. 10 zeigt die relative Anzahl der Tiere als auch die medianen Beobachtungszeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl. Die hierbei verwendeten Zellen wurden vor der Injektion in die Nacktmaus in flüssigem Stickstoff gelagert und im Falle der Gruppen 2 - 4 *in vitro* vermehrt.

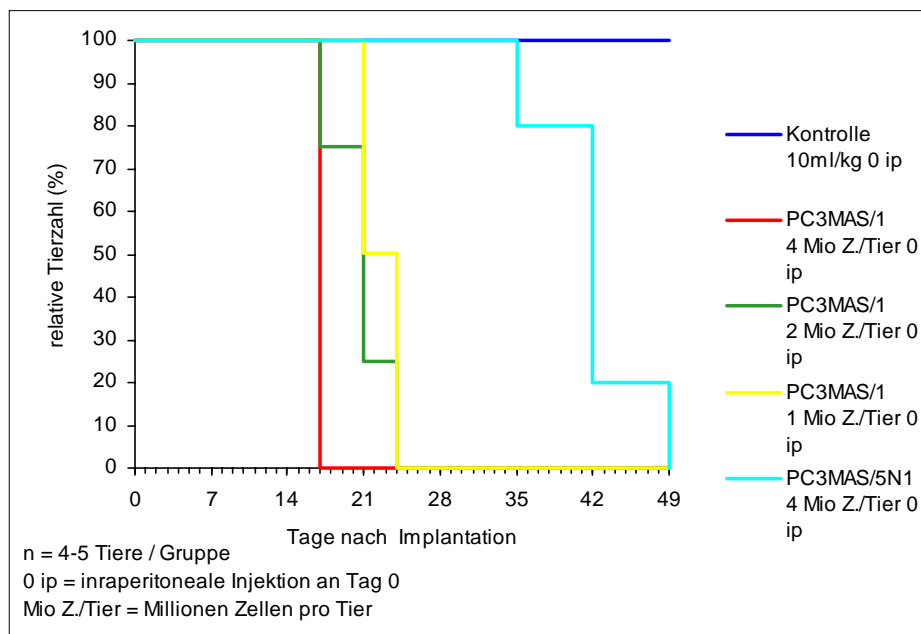


Abb. 10a: Relative Tierzahlen in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3MAS/1 bzw. 5N1. Spenderzellen waren tiefgefroren und wurden bei Gr. 2-4 *in vitro* vermehrt.

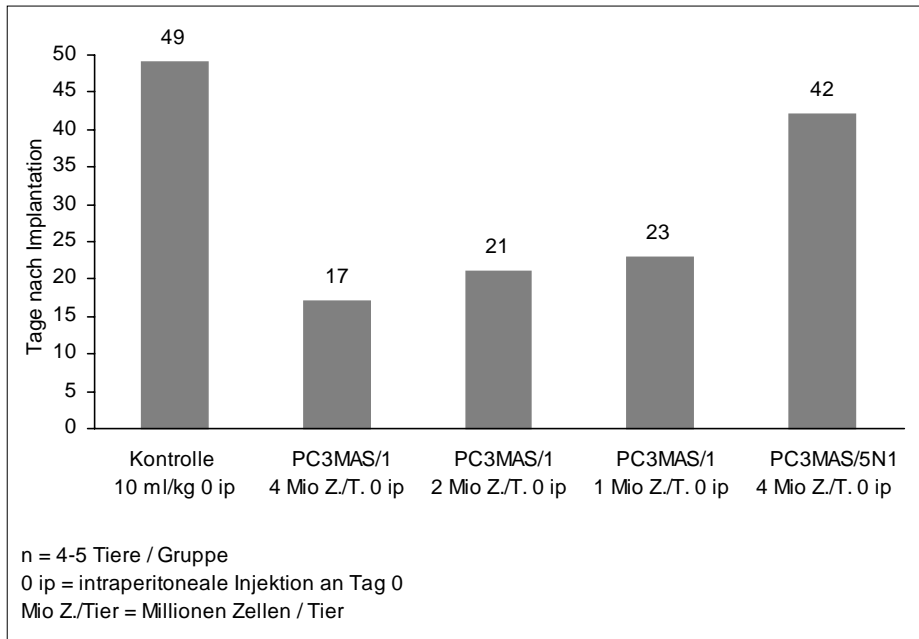


Abb. 10b: Mediane Beobachtungszeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3MAS/1 bzw. 5N1. Spenderzellen waren tiefgefroren und wurden bei Gr. 2-4 *in vitro* vermehrt.

Die grundsätzliche Frage danach, ob die PC3MAS-Zellen nach einer Lagerung in flüssigem Stickstoff ihre Fähigkeit behielten, Aszites zu erzeugen, konnte positiv beantwortet werden. In Gruppe 5 wurden nur Tiere in die Berechnung der Beobachtungszeit miteinbezogen, die tatsächlich Aszites entwickelten. Der Unterschied zwischen den Gruppen 2 bis 4 und der Gruppe 5 war dennoch auffallend. Obwohl in Gruppe 2 und 5 die gleiche Anzahl Zellen verabreicht worden war, differierten die Beobachtungszeiten erheblich. Selbst bei Injektion einer geringeren Zellzahl wie im Falle der Gruppen 3 und 4 blieben die Beobachtungszeiten hinter denen der Gruppe 5 zurück. Die Beobachtungszeiten der Gruppen 2 bis 4 lagen im gleichen Größenbereich wie die entsprechenden Gruppen aus den vorangegangenen Versuchen.

Die Beobachtungszeiten und relativen Tierzahlen nach intraperitonealer Injektion unterschiedlicher Zellzahlen der etablierten Prostatakarzinomzelllinie PRCL PC3M stellten sich wie folgt dar:

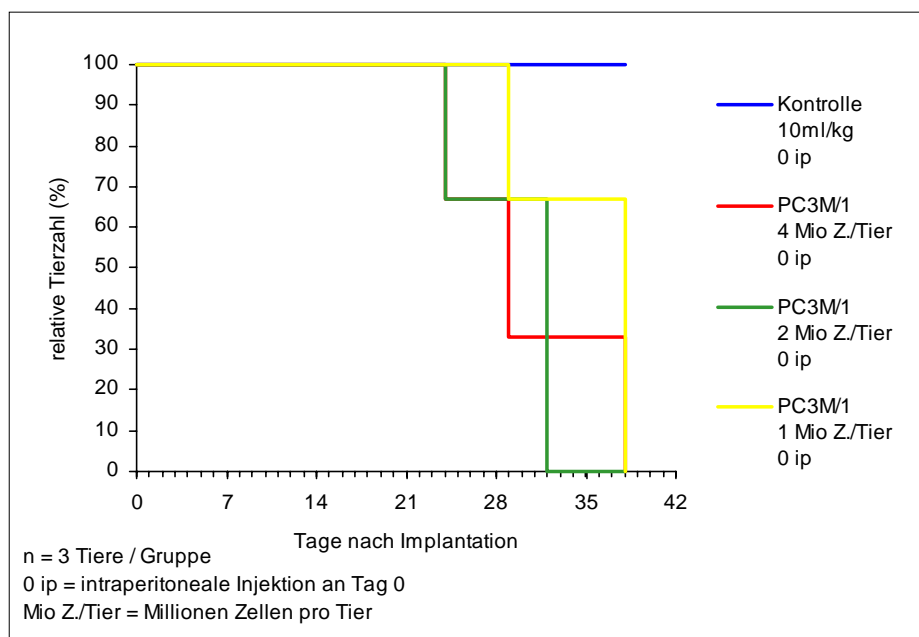


Abb. 11a: Relative Tierzahlen in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3M/1. Spenderzellen stammen von Prostatakarzinomzelllinie PRCL PC3M.

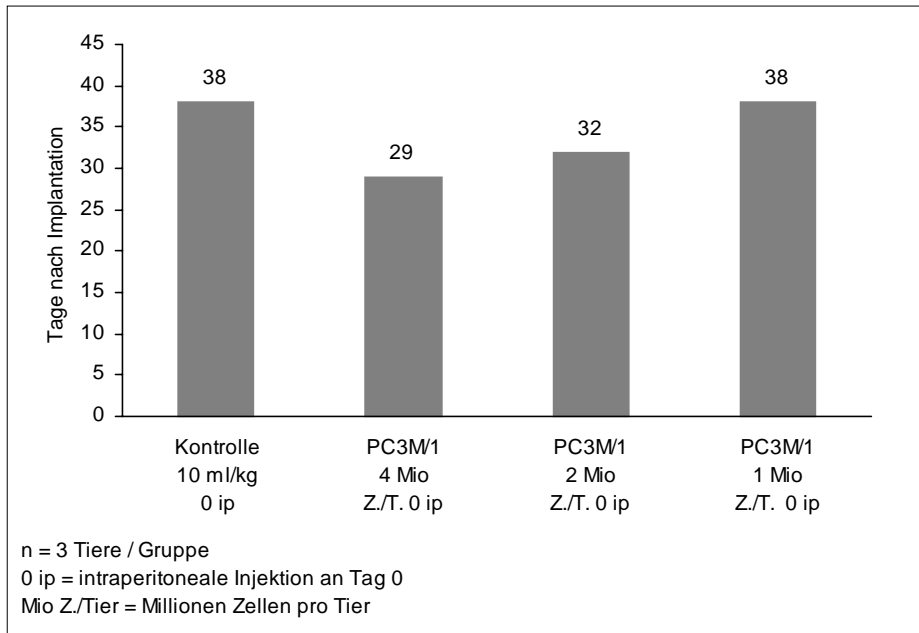


Abb. 11b: Mediane Beobachtungszeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl nach intraperitonealer Injektion von PC3M/1. Spenderzellen stammen von Prostatakarzinomzelllinie PRCL PC3M.

Das vorrangige Ergebniss dieses Experimentes war, daß sich bei intraperitonealer Injektion auch mit der Prostatakarzinomzelllinie PRCL PC3M Aszites auslösen ließ. Weitere Parallelen zu den Versuchen mit dem Aszitesmodelle PRXF PC3MAS waren eine Angangsrate von 100% in allen behandelten Gruppen sowie die Abhängigkeit der Beobachtungszeit von der injizierten Zellzahl. Beide Größen verhielten sich auch in diesem Modell nicht proportional zueinander.

Im Vergleich mit den vorangegangenen Versuchen lebten alle drei Behandlungsgruppen dieses Versuches bedeutend länger als die Vergleichsgruppen in den Versuchen mit PC3MAS. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen innerhalb eines Versuches waren wesentlich kleiner. Bei der Sektion fiel auf, daß das Krankheitsbild schwächer ausgeprägt war. Einzelheiten zu Metastasierung und Zytologie werden in den jeweiligen Kapiteln angesprochen.

Abschließend ließ sich sagen, daß bei den orthotopen Modellen BXF 1299T, CXF 1103T, PRXF PC3MT und PRXF PC3MMT der Wachstumsverlauf kontinuierlich mitverfolgt werden konnte. Die Palpation und die Vermessung mittels Schieblehre durch die Bauchdecke ergaben reproduzierbare Meßwerte. Wurden die Werte auf ein Diagramm mit logarithmischer y-Achse aufgetragen, lagen sie auf einer linearen Wachstumskurve. Steigung und Verlauf der Wachstumskurve sowie die Dauer der Induktionszeit waren für das einzelne Tumormodell reproduzierbar.

Das Aszitesmodell nahm insofern eine Sonderstellung ein, als daß die Tumorlast nur am Endpunkt des Versuches bestimmt werden konnte. Mit der Beobachtungszeit war dennoch ein Parameter gefunden, der reproduzierbar Auskunft über die Tumorlast des Einzeltieres gab. Durch seine Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl wurde der Verlauf eines Versuches beeinflusst und vorhersehbar.