

## 4 Diskussion

### 4.1 Vergleich der orthotop und subkutan wachsenden Xenografts

#### 4.1.1 Angangsraten und Wachstumsgeschwindigkeit

Das dem Ursprungsgewebe des Tumors entsprechende Gewebe der Maus wirkte sich offensichtlich begünstigend auf das Wachstum der Tumorzellen aus, da mit Ausnahme des PRXF PC3(T) die orthotop implantierten Tumoren besser wuchsen als ihre subkutan implantierten korrespondierenden Modelle.

Diese Beobachtungen stimmten mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. Alisauskus et al. (1995) fanden beim Vergleich der Wachstumskurven orthotop und subkutan implantierter humaner Pankreaskarzinome keine Unterschiede. Sowohl Morikawa et al. (1988) als auch Naito et al. (1986) beobachteten bei den orthotopen Modellen geringfügig bessere Angangsraten als bei den subkutanen. In der Gruppe von Nakajima et al. hingegen waren die Angangsraten beider Modelle identisch (Nakajima et al., 1990). Pocard et al. fanden nur dann bessere Angangsraten im orthotopen Modell gegenüber dem subkutan implantierten Tumor, wenn der Spendentumor im Patienten nicht metastasiert war. Lagen bei dem betreffenden Patienten bereits Metastasen vor, wiesen beide Modelle gleiche Angangsraten auf (Pocard et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Xenografts verwendet, die im Patienten metastasiert waren. Das Prostatakarzinom PRXF PC3 sowie die daraus entstandenen Sublinien und das Kolonkarzinom CFX 1103. Das Blasenkarzinom BXF 1299 wuchs im Patienten infiltrativ. Die Ausbildung von Metastasen wurde im Arztbrief mit "nicht beurteilbar" angegeben. Somit konnte die Beobachtung von Pocard et al (1998), daß metastasierte Tumoren Angangsraten unabhängig vom Implantationsort haben, bestätigt werden. Der Vergleich mit nicht metastasierten Spendentumoren konnte jedoch nicht eindeutig vollzogen werden, da es sich bei dem Blasenkarzinom nicht mit Sicherheit um einen solchen handelte.

Da eine Verbesserung der Angangsrate bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Xenografts kaum möglich war, wirkte sich das optimierte Wachstumsmilieu offensichtlich vor allen Dingen auf die Wachstumsgeschwindigkeit aus. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Tsukui et al. überein, in dessen Arbeitsgruppe humane Kolonkarzinome auf der Nacktmaus etabliert wurden, die sowohl orthotop als auch subkutan wachsend sehr hohe Angangsraten aufwiesen, bei Implantation in das Ursprungsgewebe aber deutlich schneller wuchsen (Tsukui et al., 1994).

Warum PRXF PC3T im vorliegenden Fall orthotop wachsend eine so verhältnismäßig niedrige Angangsrate zeigte, war auch im Vergleich mit anderen Arbeiten nicht zu erklären. Fu et al. erzielten allerdings bei wesentlich kleineren Tierzahlen die bei der orthotopen Implantation üblichen 100% Angangsrate auch für diesen Xenograft (Fu et al., 1992b).

Bei allen drei Prostata-Modellen kam die gleiche Implantationstechnik zum Einsatz. Das Modell PRXF PC3MT konnte auf diese Weise zu einem für Chemotherapietestungen geeigneten System entwickelt werden. Daß dies bei den beiden anderen Prostatakarzinomen nicht gelang, war somit nicht auf die Implantationstechnik zurückzuführen. Vielmehr mußte davon ausgegangen werden, daß es sich bei den fraglichen Xenografts um Tumoren handelte, die für die orthotope Implantation nicht optimal geeignet waren.

Der Vergleich der drei Prostatakarzinome war darüber hinaus interessant, da es sich um einen Primärtumor, eine Tochter- und eine Enkelmetastase handelte. Von der Mutter- auf die Tochtergeneration fand in bezug auf die Angangsrate bei orthotoper Implantation eine positive Selektion statt. Die Überlebensfähigkeit in einem artfremden Wirt jedoch im gleichen Mutterorgan wurde gestärkt. Die Tumoren der dritten Generation hingegen zeigten Angangsraten im gleichen Größenbereich wie die erste Generation. Bei diesem letzten Generationenwechsel ging die neu erworbene Eigenschaft wieder verloren. Die erhöhte Angangsrate im heterologen Wirt ist als Steigerung der Malignität zu betrachten. Diese hatte auch Einfluss auf die Metastasierungsrate der Tumoren und das Körpergewicht der Tiere. Die Ursachen dieses Phänomens werden in Kapitel 4.2.1 genauer beleuchtet.

Der Einfluss der Implantationstechnik auf die Angangsrate wurde am Beispiel des Blasenkarzinomes BXF 1299T deutlich. Der Vorteil der Injektion lag in der direkten Nachbarschaft der Tumorfragmente zu ihrem Ursprungsgewebe dem Übergangsepithel. Dafür mußte die relativ geringe Größe der Fragmente in Kauf genommen werden, die durch die Größe der Kanüle limitiert wurde. Diese wiederum mußte der Dicke der Blasenwand Rechnung tragen. Bei der Implantation mittels Naht an die äußere Wand der Blase konnten größere Fragmente verwendet werden, was die Angangsrate erhöhte. Der Nachteil des größeren räumlichen Abstandes zum Ursprungsgewebe wurde durch die Entfernung der Serosa minimiert. Durch die Entfernung dieser natürlichen Barriere, konnten die Tumorzellen leichter infiltrativ in die Blasenwand einwachsen aber auch in die Bauchhöhle gelangen, was wiederum das Metastasierungsverhalten des Tumors beeinflusste. Letztlich wurde auf die Injektion von Tumorfragmenten

verzichtet, da die Fragmente zu klein gewählt werden mußten, um Angangsraten in der gewünschten Höhe zu erzielen.

Die relativ breite Streuung bei den Wachstumskurven aller orthotop implantierten Modelle war in keinem Fall so groß, daß die Durchführung von weitergehenden Experimenten dadurch beeinträchtigt worden wäre. Es ist lediglich darauf zu achten, bei Tumoren mit einem unregelmäßigen Wachstum größere Tierzahlen zu verwenden, da dadurch der Einfluß der Einzelwerte vermindert wird.

#### **4.1.2 Körpergewichtsveränderung**

Die Tatsache, daß lediglich PRXF PC3M(T) sowohl orthotop als auch subkutan implantiert Kachexie induzierte, ist Ausdruck der erhöhten Malignität dieses Tumor im Vergleich mit den anderen Prostatakarzinommodellen. Abgesehen vom Einfluss auf das Körpergewicht äußerte sich die gesteigerte Malignität der Tochtergeneration auch in einer erhöhten Wachstumsgeschwindigkeit und Metastasierungsrate. In Kapitel 4.2.1 werden im Zusammenhang mit der Metastasierungsrate die Gründe für diese Beobachtungen näher beleuchtet.

An dieser Stelle sei noch erwähnt, daß PC3MAS ebenfalls keine Kachexie auslöste. Lag im Falle der in Aszitesform vorliegenden Tumoren noch der Verdacht nahe, daß die Körpergewichtsabnahme durch die Flüssigkeitsansammlung in der Bauchhöhle kompensiert wurde, so zeigte der Versuch mit solide unter der Haut wachsenden PC3MAS-Tumoren, daß dieses Tumormodell tatsächlich keine Kachexie auslöste. Die Eigenschaft, das Körpergewicht negativ zu beeinflussen, war auch in diesem Falle beim Generationenwechsel verloren gegangen.

#### **4.1.3 Infiltration und Metastasierung**

Das Infiltrations- und Metastasierungsverhalten wurde bei allen untersuchten Modellen entscheidend vom Implantationsort beeinflusst. Lediglich die orthotop implantierten Tumore wuchsen infiltrativ und metastasierten.

Die Tatsache, daß subkutan implantierte Xenografts nicht metastasieren und auch nur selten infiltrativ wachsen, wurde in verschiedenen Arbeitsgruppen bereits beobachtet: Tan et al. untersuchten das Metastasierungsverhalten humaner Pankreaskarzinomzellen in

Abhängigkeit von ihrem Implantationsort in der Nacktmaus und stellten fest, daß die Tumoren unter der Haut weder infiltrativ wuchsen noch metastasierten (Tan et al., 1985). Zum gleichen Ergebniss kamen Cornil et al. (1989), die ähnliche Experimente mit einer humanen Melanomzelllinie durchführten.

Auch die Beobachtung, daß subkutan nicht metastasierende Tumoren nach der Implantation in ihr Ursprungsorgan Metastasen entwickeln, wurde von anderen Arbeitsgruppen bestätigt.

Sowohl Furukawa et al. (1993) als auch Giavazzi et al. (1986) verglichen das Metastasierungsverhalten humaner orthotop und subkutan implantierter Xenografts miteinander. In beiden Fällen metastasierten die Tumoren erst, wenn sie in ihr Ursprungsorgan implantiert worden waren.

Dessen Nähr- und Sauerstoffangebot sowie die vorgegeben histologischen Strukturen scheinen Voraussetzung für Infiltration und Metastasierung zu sein. Verschiedene Arbeiten, die sich mit dem Einfluss der direkten Umgebung auf das Tumorwachstum beschäftigten, bestätigten diese Schlußfolgerung. So stellte Nakajima fest, daß Fibroblasten aus dem Ursprungsorgan das metastatische Potential humaner Tumorzellen fördern, während es durch Fibroblasten aus der Subkutis gehemmt wird (Nakajima, 1993). Das Ausbleiben der Metastasierung bei subkutan wachsenden Xenografts ist somit nicht nur auf das Fehlen bestimmter Strukturen zurückzuführen, sondern auch auf das Vorhandensein hemmender Faktoren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nur durch die Transplantation in das Ursprungsorgan das Metastasierungs- und Infiltrationspotential der Xenografts aufgedeckt werden konnte. Offenbar waren die Tumorzellen nur unter diesen definierten Wachstumsbedingungen in der Lage den Zellverband zu verlassen und entweder in die direkte Umgebung oder in das nächstgelegene abführende Gefäß einzudringen.

#### **4.1.4 Histologie und Immunhistochemie**

Der histologische Aufbau des Tumorgewebes war vom Implantationsort unabhängig. Da das Stroma der Tumoren von der Maus stammte, bildeten an jedem Implantationsort, die für das jeweilige Organ spezifischen Fibroblasten auf immer gleich Art und Weise den stromalen Anteil des Tumors. Offensichtlich beeinflussten die humanen Tumorzellen die murinen Zellen in einer Art und Weise, die sie unabhängig von ihrer

organspezifischen Differenzierung in definierter Form mit dem Tumorparenchym interagieren ließen.

Auch bei An et al. (1997) und Fu et al. (1992a) fanden sich keine Hinweise darauf, daß der Implantationsort den histologischen Aufbau der Tumoren entscheidend beeinflusste. Price et al. dagegen fanden Veränderungen des histologischen Aufbaus nach Implantation in unterschiedliche Organe. Wurden Tumoren in ihr Ursprungorgan implantiert, waren sie besser durchblutet und entwickelten kleinere Nekrosebezirke als nach einer Implantation unter die Haut (Price et al., 1990). Beobachtungen dieser Art konnten an den in der vorliegenden Arbeit etablierten Modellen nicht gemacht werden. Die Größe der Nekrosebezirke war in allen Modellen in erster Linie abhängig von der Größe des Tumors. Als Maß für die Durchblutung war die vaskuläre Permeabilität bestimmt worden, deren Ausprägung ebenfalls unabhängig vom Implantationsort war.

Bei der Expression humanen Zytokeratins und karzinoembryogenem Antigen (CEA) handelte es sich um eine im Genom der Tumorzellen verankerte Eigenschaft, die von der direkten Umgebung der Tumorzellen unbeeinflusst blieb.

Kitadai et al. machten ähnliche Beobachtungen bezüglich der CEA-Expression. Die von ihnen untersuchten humanen Kolonkarzinome sezernierten unabhängig von ihrem Implantationsort CEA. Allerdings war das Expressionsniveau im Falle der orthotop transplantierten Tumoren wesentlich höher (Kitadai et al., 1996).

Da es sich bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode der Immunhistochemie lediglich um eine semiquantitative Methode handelte, konnte zu der letztgenannten Beobachtung Kitadais et al. keine klare Stellung bezogen werden.

Einige Beobachtungen von Randt (Randt, 1984) konnten jedoch bestätigt werden. So waren bei CXF 1103 und CXF 1103T sowohl die Nekrosebereiche als auch der von den Tumorzellen sezernierte Schleim CEA-positiv. Ersteres konnte auf das Freiwerden großer Mengen CEA's während des Zellzerfalls zurück geführt werden. Letzteres deutete darauf hin, daß das CEA nicht nur in den Tumorzellen gebildet sondern auch von ihnen zumindest parakrin sezerniert wurde.

Aus den oben beschriebenen Beobachtungen läßt sich schließen, dass der histologische Aufbau und die Expression von Zytokeratin und CEA Tumoreigenschaften sind, die so fest im Zellgenom verankert sind, daß ihre Ausprägung unabhängig von der Lokalisation des Tumors ist. Anhand solch

stabiler Eigenschaften können Xenografts auch nach zahlreichen Passagen auf der Nacktmaus noch eindeutig identifiziert werden.

#### **4.1.5 Vaskuläre Permeabilität**

Die Durchlässigkeit der tumoreigenen Gefäße wurde nicht von den histologischen Gegebenheiten der unmittelbaren Umgebung des Tumors beeinflusst.

Auffallend an den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten war zudem, dass die untersuchten Peritonealmetastasen über zweimal soviel Farbstoff inner- und außerhalb der Gefäße enthielten wie die jeweiligen Primärtumoren. Fukumura et al. machten diesbezüglich ähnliche Beobachtungen. Die von ihnen erzeugten Lebermetastasen hatten eine deutlich höhere vaskuläre Permeabilität als die subkutan wachsenden Tumoren (Fukumura et al., 1997).

Da in der vorliegenden Studie orthotope und subkutane Tumoren gleiche Porositäten aufwiesen, war es eher unwahrscheinlich, daß allein die Umgebung des Tumors die Porosität seiner Gefäße bestimmte. Dem Prozess der Metastasierung wurde schon an anderer Stelle ein gewisser Selektionscharakter zugeschrieben (Kyriazis et al., 1978). Folglich war anzunehmen, daß auch in bezug auf die vaskuläre Permeabilität ein solcher Selektionsprozeß beim Übergang von einer Generation auf die andere stattgefunden hatte. Durch die erhöhte Permeabilität seiner Gefäße steht dem Tumor der zweiten Generation ein verbessertes Angebot von Sauerstoff und Nährstoffen zur Verfügung. Dies untermauert die Hypothese der Selektion hinsichtlich erhöhter Gefäßpermeabilität während der Metastasierung, da solch ein Selektionsvorgang stets das verbesserte Überleben des Tumors in seinem Wirt zum Ziel hat (Fidler et al., 1977).

#### 4.1.6 Chemosensibilität gegenüber Standardzytostatika

Um die erhöhte Empfindlichkeit der orthotop implantierten Tumore gegenüber den untersuchten Zytostatika zu erklären, kann davon ausgegangen werden, daß das unterschiedliche Wachstums milieu beider Modelle sowohl die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber den Substanzen als auch die Wirksamkeit der Substanz auf die Tumorzellen beeinflußt hat.

In der Literatur gibt es sehr unterschiedliche Beobachtungen zu diesem Thema. Kuo et al. berichteten von Lungenkarzinomen, die orthotop ein völlig anderes Chemosensibilitätsprofil hatten als subkutan wachsend (Kuo et al., 1993). Ähnliche Beobachtungen machten Pocard et al. (1996) im Falle von humanen Kolonkarzinomen. Fidler et al. hingegen fanden sowohl Unterschiede als auch Übereinstimmungen der Chemosensibilitätsprofile orthotoper und subkutaner Modelle (Fidler et al., 1994). Die von Tressler et al. verglichenen Modelle veränderten alle ihre Empfindlichkeit gegenüber Zytostatika nicht, wenn sie statt subkutan orthotop wuchsen (Tressler et al., 1994).

Das Ziel beider Modelle ist die Reflektion der klinischen Situation. Daß dies beim subkutan wachsenden Xenograft der Fall ist, ist an vielen Stellen bereits beschrieben worden (Kubota et al., 1993; Duplan, 1984; Imaizumi et al., 1993).

Die im Labor Prof. Fiebig etablierten subkutan wachsenden Xenografts zeigten hohe Übereinstimmungen ihrer Chemosensibilität im Vergleich mit dem Patienten, da dies eines der Hauptkriterien zur Entwicklung eines Modelles darstellte (Berger et al., 1992). Dies war wohl auch der Grund, warum die in dieser Arbeit untersuchten Modelle sich lediglich in der Intensität der Antwort auf ein Chemotherapeutikum unterschieden. Die subkutan wachsenden Tumoren hatten aufgrund des oben beschriebenen Auswahlverfahrens das gleiche Chemosensibilitätsprofil wie der Patiententumor. Es war sehr unwahrscheinlich, daß bei der Implantation in das Ursprungsorgan sich dieses Profil in einer Art und Weise verändern würde, die es von der Situation im Patienten entfernte. Näherliegender war, daß Eigenschaften, die schon im subkutan wachsenden Xenograft

erkennbar waren, nach Implantation in die ursprüngliche Umgebung noch deutlicher hervortreten würden.

Dank des guten Spendermaterials konnten im Rahmen dieser Dissertation Tumormodelle etabliert werden, die die klinische Situation recht genau widerspiegeln.

Die Implantation in das Ursprungsorgan wurde auch schon von anderen Gruppen als besonders nahe der Klinik beschrieben. Rofstad entwickelte mehrere Melanom-Modelle, deren Empfindlichkeit gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie derjenigen des Patienten entsprachen (Rofstad, 1994). Boven et al. machten die gleiche Beobachtung bei humanen Weichteilsarkomen (Boven et al., 1998). Hoffman et al. etablierte von nahezu allen Tumorarten orthotope Modelle, die zumeist hohe Übereinstimmungen mit den Patientendaten aufwiesen (Hofmann et al., 1994).

Die in der Arbeitsgruppe Prof. Fiebig etablierten Modelle bieten gegenüber anderen den Vorteil, daß die Xenografts sowohl subkutan als auch orthotop implantiert als etabliertes Modell zur Verfügung stehen. Da diese Modelle sich in ihren Chemosensitivitätsprofilen gleichen, ist es möglich, potentiell antitumoral wirksame Substanzen zunächst auf breiterer Basis an verschiedenen subkutan wachsenden Xenografts zu testen, um sie anschließend am orthotop implantierten Tumor weitergehend zu untersuchen.

Bei der Durchführung von Zytostatikatestungen an orthotopen Modellen sind allerdings folgende Tatsachen zu beachten:

Die tatsächliche Wirksamkeit der Substanzen kann aus den Beobachtungen während des Versuches nicht vollständig abgeleitet werden, da die Meßbarkeitsgrenze höher liegt als im subkutanen Modell. Eine Sektion mit Bestimmung von Tumorgewicht und Metastasierungsrate bleibt bei diesen Modellen unerlässlich.

Darüber hinaus sollten, um die optimale Wirkung auf das Tumorgewebe besser quantifizieren zu können, Teile der behandelten Gruppen beendet und das Tumolvolumen *in situ* bestimmt werden, sobald dieses durch die Bauchdecke hindurch nicht mehr meßbar ist. Voraussetzung für solch einen Versuchsaufbau wäre die Erhöhung der Gruppengröße auf mindestens 10 Tiere.

Bei Verwendung des Aszitesmodells PC3MAS ist zu beachten, dass die Tumorzellkonzentrationen in den Ergüssen unabhängig von äußeren Umständen im Bereich von einer Zehnerpotenz schwanken können. Je

höher die Zahl der bei solchen Versuchen eingesetzten Tiere ist, um so geringer wird der Einfluss solcher Schwankungen.