

3.2.2.5 Histologie und Zytologie

Im Einzelnen lauteten die histologischen Diagnosen für die orthotop implantierten Tumoren und die subkutan wachsenden PC3MAS-Zellen wie folgt:

CXF 1103T:	mäßig differenziertes, infiltrativ wachsendes, metastasierendes, alveoläres Adenokarzinom des Darms
BXF 1299T:	mäßig differenziertes, infiltrativ wachsendes, metastasierendes, adenoides Transitionalzellkarzinom
PRXF PC3T:	mäßig differenziertes, infiltrativ wachsendes, metastasierendes, solides Prostatakarzinom
PRXF PC3MT:	mäßig differenziertes, infiltrativ wachsendes, metastasierendes, solides Prostatakarzinom
PRXF PC3MMT:	mäßig differenziertes, infiltrativ wachsendes, metastasierendes, solides Prostatakarzinom
PRXF PC3MAS:	mäßig differenziertes, infiltrativ wachsendes, solides Prostatakarzinom

Der histologische Aufbau des orthotop implantierten Kolonkarzinoms CXF 1103T ist in Abbildung 16a, S. 80 dargestellt. In Abbildung 16b, S. 80 wurde das subkutan implantierte Kolonkarzinom CXF 1103 dem gegenüber gestellt. Der in das Kolon implantierte Xenograft zeigte einen für Tumoren epithelialen Ursprungs typischen organoiden Aufbau: Stroma und Parenchym waren deutlich voneinander abgesetzt. Dabei war nur wenig Stroma im Verhältnis zum Parenchym mit einer geringen Anzahl von überwiegend kleinen Gefäßen sichtbar. Der Tumor infiltrierte seine direkte Umgebung. Zentral bildete sich ein großer Nekrosebereich. Bei den Tumorzellen handelte es sich um hochprismatisches Drüsenepithel, das morphologisch Ähnlichkeit mit seinen Ursprungszellen aus dem Darm aufwies. Die Zellen waren alveolär angeordnet und sezernierten geringe Mengen Schleim in die von ihnen gebildeten Lumina. Zudem waren in geringerer Anzahl isoprismatische Zellen mit intrazellulären Vakuolen vertreten, die in ihrem Aufbau Becherzellen entsprachen. Die teilweise polynukleären Tumorzellen enthielten Kerne unterschiedlicher Größe und Form. Das Chromatin war grobschollig, die Anzahl der Mitosen erhöht und das Kern-Zytoplasmaverhältnis zu Gunsten des Kernes verschoben. Das

Zytoplasma wies keine Besonderheiten auf. Die untersuchten Metastasen hatten den gleichen histologischen Aufbau wie die Primärtumoren.

Das histologische Bild des orthotop implantierten Blasenkarzinoms BXF 1299T ist in Abbildung 16c, S. 80 dargestellt. Abbildung 16d, S. 80 stellt den gleichen Xenograft unter der Haut wachsend dar. Der orthotop implantierte Blasentumor zeigte einen organoiden Aufbau. Das mittelgradig ausgebildete Stroma war von den Tumorzellen deutlich abgesetzt und enthielt Gefäße in mittlerer Anzahl und Größe. Der Tumor infiltrierte seine unmittelbare Umgebung. Zentral war in einem kleinen Gebiet Nekrose aufgetreten. Form und Größe der Tumorzellen entsprachen dem Ursprungsgewebe. Ihre Anordnung zueinander war in weiten Teilen adenoid in anderen solide. Sekretbildung wurde nicht beobachtet. Kernform und -größe variierten stark. Das Chromatin war feingranulär, die Anzahl der Mitosen erhöht. Während das Kern-Zytoplasma Verhältnis regelrecht war, fiel die schaumige Beschaffenheit des Zytoplasmas auf. Das histologische Bild der Metastasen entsprach demjenigen des Primärtumors.

Bei Betrachtung unter dem Lichtmikroskop erwies sich das Prostatakarzinom PRXF PC3T als Tumor epithelialen Ursprungs mit viel Stroma und vielen großen Gefäßen. Abbildung 16e und f, S. 81 zeigten histologische Bilder des Xenografts sowohl in der Prostata als auch unter der Haut wachsend. Der zentral nekrotisierte Tumor infiltrierte seine unmittelbare Umgebung. Das isoprismatische Drüsenepithel war solide angeordnet. Das Zytoplasma enthielt in vielen Fällen optisch leere Vakuolen, die auf eine intrazelluläre Sekretproduktion schließen ließen. Die Morphologie der Zellen war ihrem Ursprungsgewebe ähnlich. Die Zellkerne variierten sowohl in Größe und Form als auch in der Anzahl pro Zelle. Das Chromatin war feingranulär, die Anzahl der Mitosen gering. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis war zu Gunsten des Kernes verschoben. Falls das Zytoplasma nicht durch die oben erwähnten Vakuolen verdrängt worden war, war es schwach basophil. Die Metastasen entsprachen in ihrem Aufbau dem Primärtumor.

Wie in Abbildung 16g, S. 81 zu erkennen, konnte beim orthotop implantierten Prostatakarzinom PRXF PC3MT, da Stroma und Parenchym deutlich voneinander abgesetzt waren, auf einen epithelialen Ursprung geschlossen werden. Das geringgradig ausgebildete Stroma enthielt wenige, große Gefäße. Der Tumor infiltrierte seine Umgebung und enthielt kleine, zentral gelegene Nekrosebezirke. Bei den Tumorzellen handelte es sich um isoprismatisches Drüsenepithel, das intrazellulär Sekret bildete. Dies äußerte sich im Auftreten von Zellen mit optisch leeren Vakuolen im Zytoplasma. Diese Sekretbildung sowie Größe und Form der Zellen erinnerten an ihr Ursprungsgewebe. Ihre Anordnung wich jedoch davon ab: Der Tumor zeigte überwiegend einen soliden Aufbau. Die polynukleären

Zellen enthielten Kerne unterschiedlicher Größe und Form. Der Chromatingehalt schwankte von regelrecht bis hyperchromatisch, die Anzahl der Mitosen war regelrecht. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis war zu Gunsten des Kernes verschoben. Abgesehen von der oben beschriebenen Sekretbildung war das Zytoplasma basophil. Die Metastasen entsprachen weitgehend dem histologischen Bild des Primärtumors. Es fielen jedoch Rundzellularinfiltrate auf, die beim Primärtumor nicht auftraten. Zudem hatten die Lymphknotenmetastasen teilweise noch kein eigenes Stroma ausgebildet, so daß die Tumorzellen abgerundet und ohne erkennbare Anordnung zueinander über den Lymphknoten verteilt waren. Der subkutan implantierte Xenograft dieses Prostata Tumors ist in Abbildung 16h, S. 81 dargestellt.

PRXF PC3MMT entsprach in seinem histologischen Bild dem Prostatakarzinom PRXF PC3MT. Auch die oben erwähnten Besonderheiten in Bezug auf die Lymphknotenmetastasen und die Rundzellularinfiltrate waren zu beobachten. In Abbildung 16i, S. 82 ist der histologische Aufbau dieses Tumors dargestellt.

Wie in Abbildung 16k, S. 82 zu erkennen, glich das histologische Bild der subkutan wachsenden PC3MAS-Zellen demjenigen des orthotop implantierten PRXF PC3MT. Der organoide Aufbau war erkennbar. Das Stroma war nur sehr gering ausgeprägt und die wenigen Gefäße waren verhältnismäßig groß. Der infiltrativ wachsende Tumor enthielt große zentrale Nekrosebezirke. Die Tumorzellen gaben keinen Aufschluss über ihren Ursprung. Lediglich aufgrund des organoiden Aufbaus konnte darauf geschlossen werden, daß es sich um Epithelzellen handeln mußte. Ihre Form war isoprismatisch, Sekretbildung war nicht zu beobachten. Die polymorphen Kerne waren sehr groß und enthielten feingranuläres Chromatin. Die Mitosezahl war deutlich erhöht und das Kern-Zytoplasmaverhältnis war zu Gunsten des Kernes verschoben. Das Zytoplasma selber war stark basophil.

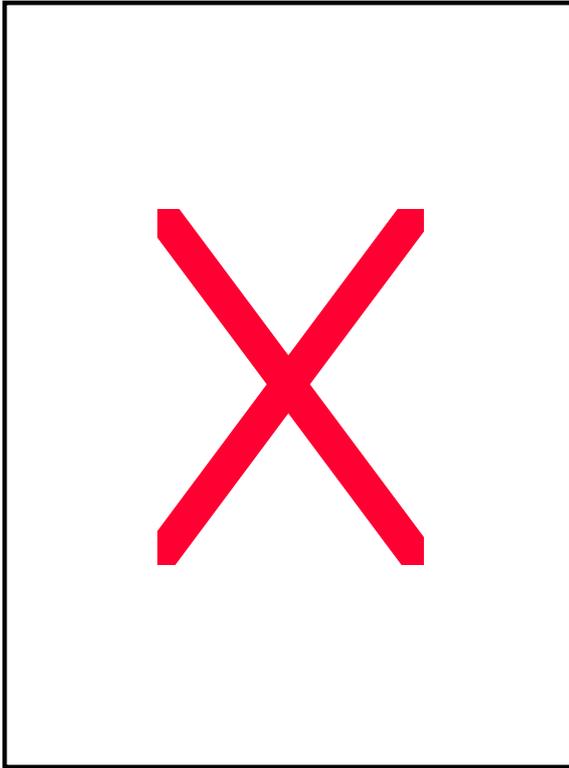


Abb. 16a: Orthotop implantiertes
Kolonkarzinom CXF 1103T/13N4.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

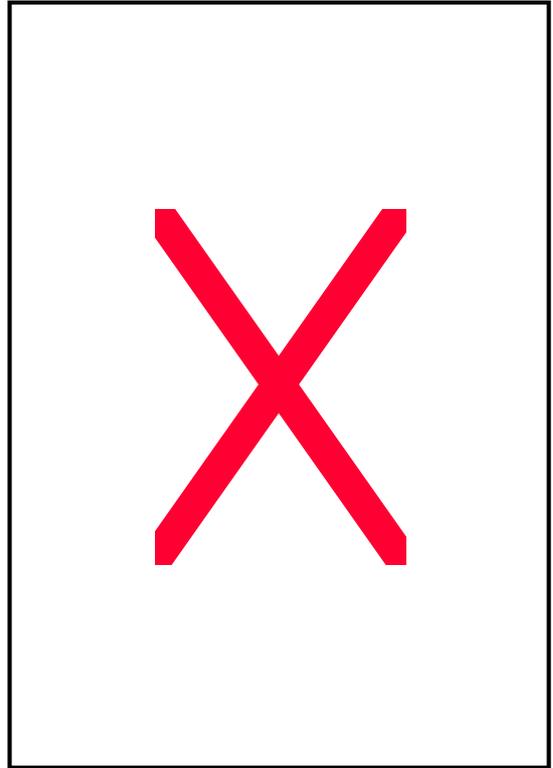


Abb. 16b: Subkutan implantiertes
Kolonkarzinom CXF 1103T/12N4.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

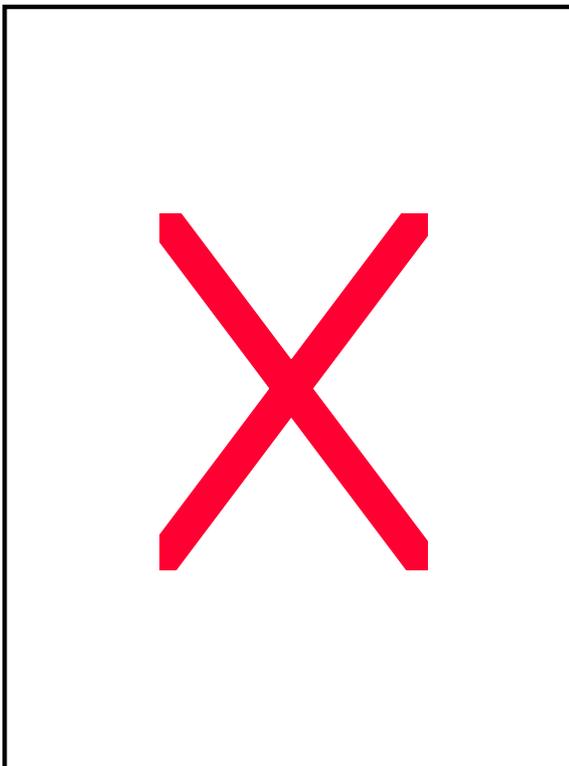


Abb. 16c: Orthotop implantiertes
Blasenkarzinom BXF1299T/7N5.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

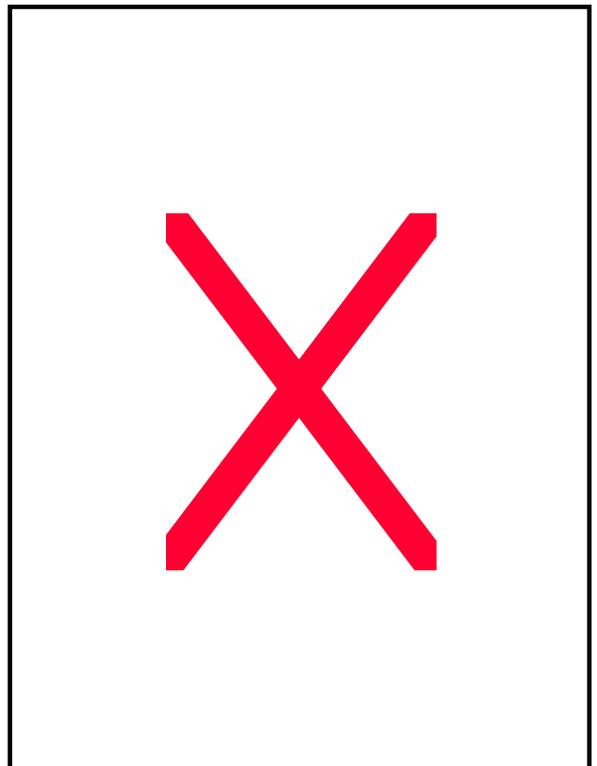


Abb. 16d: Subkutan implantiertes
Blasenkarzinom BXF 1299/10N8.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

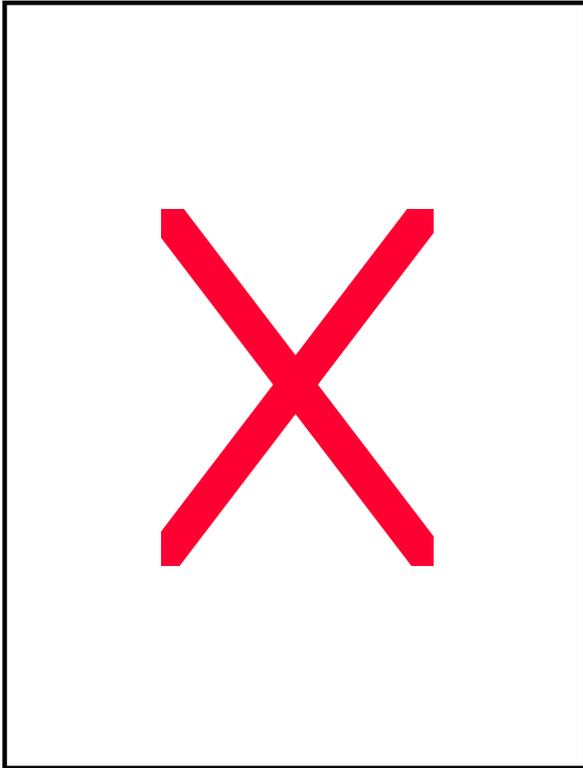


Abb. 16e: Orthotop implantiertes
Prostatakarzinom PRXF PC3T/2.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

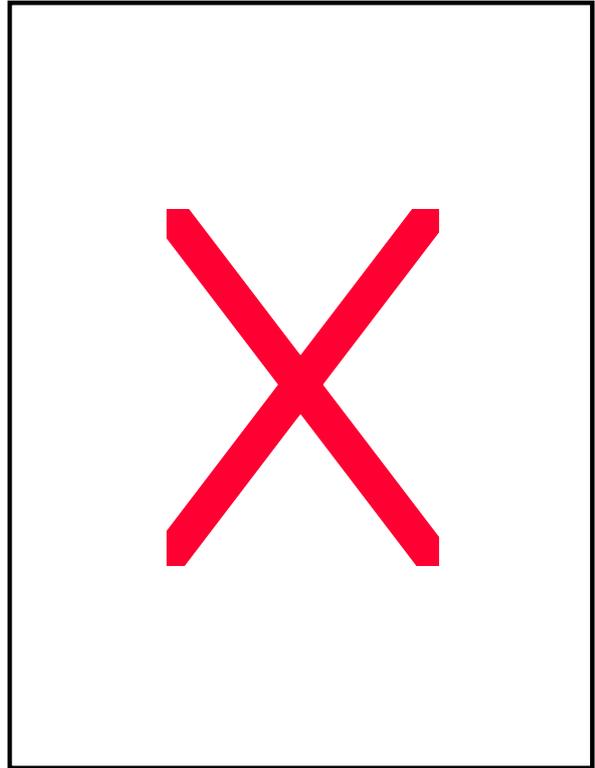


Abb. 16f: Subkutan implantiertes
Prostatakarzinom PRXF PC3/2.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

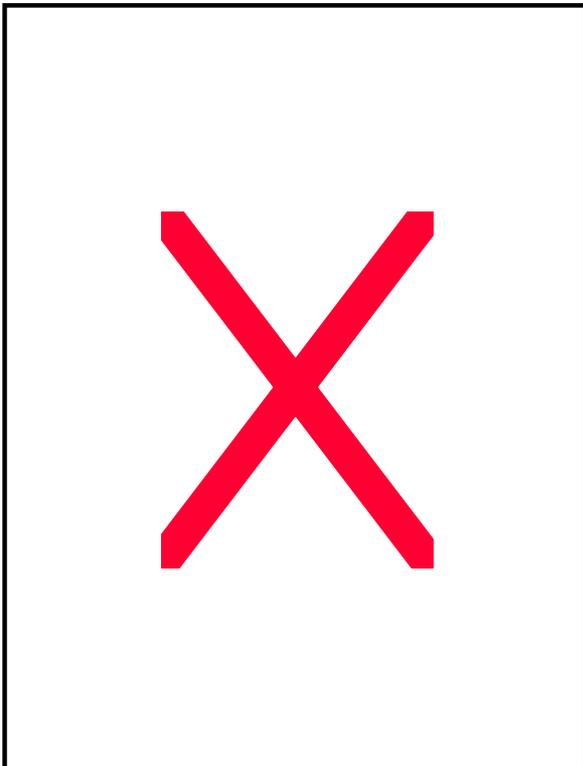


Abb. 16g: Orthotop implantiertes
Prostatakarzinom PRXF PC3MT/6.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

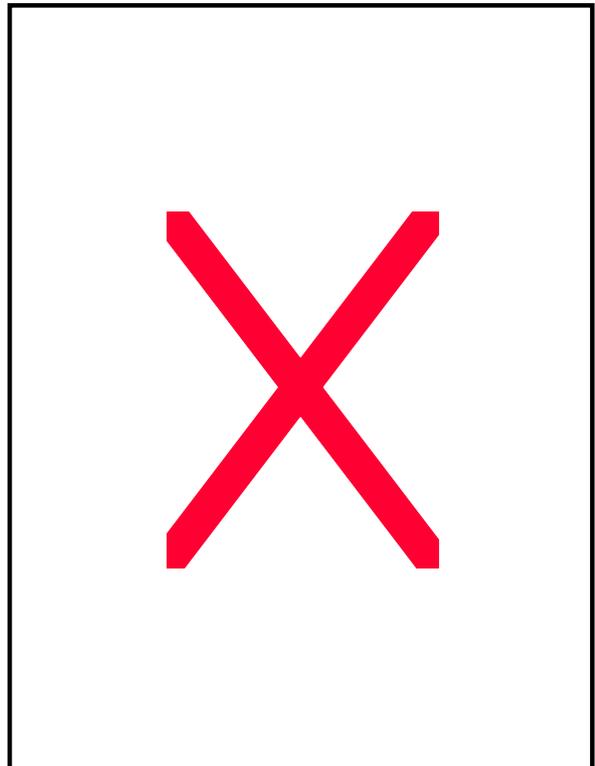


Abb. 16h: Subkutan implantiertes
Prostatakarzinom PRXF PC3M/6.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

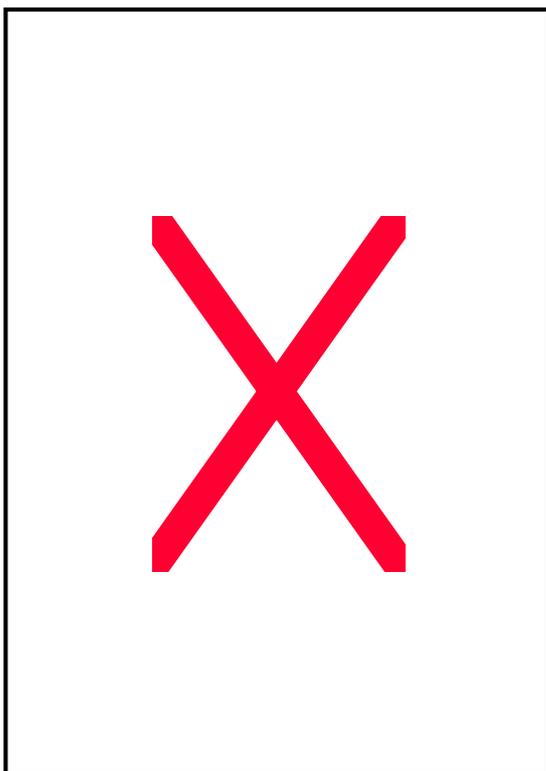


Abb. 16i: Orthotop implantiertes
Prostatakarzinom PRXF PC3MMT/3.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

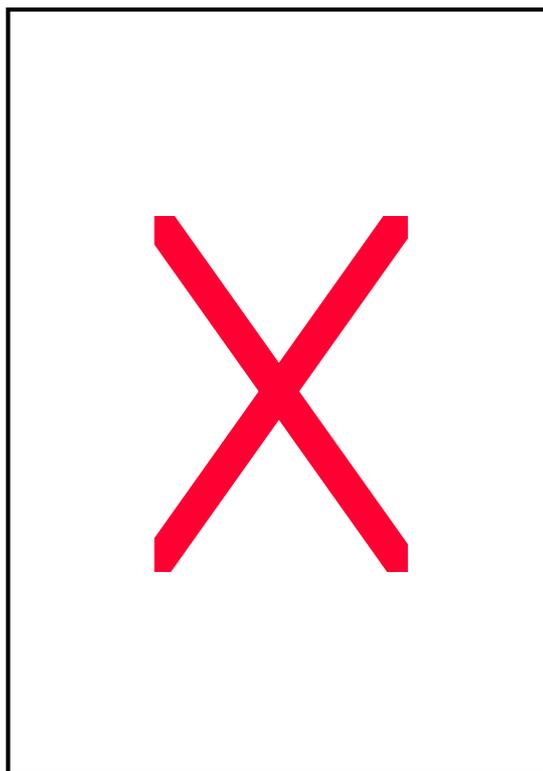


Abb. 16k: Subkutan injizierte
Asziteszellen PRXF PC3MAS/1.
HE-Färbung. 400fache Vergrößerung.

**Abb. 16: Vergleichende Histologie subkutan und orthotop implantierter
Xenografts in der Nacktmaus.**

Der Vergleich der histologischen Präparate von den orthotopen bzw. subkutanen Modellen eines Xenograft ergab, daß Morphologie und Anordnung der Zellen zueinander in beiden Modellen identisch waren. Auch die Menge des Stromas sowie die Gefäßgröße und -dichte blieben vom Implantationsort unbeeinflusst.

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Zellzählungen des orthotop implantierten Prostatakarzinomes PRXF PC3MT und des Aszitesmodells PC3MAS.

Da beim Aszitesmodell die Anteile der einzelnen Zellarten an der Gesamtheit der Zellen über die einzelnen Passagen hinweg konstant blieb, wurde der Median aus allen Passagen berechnet und mit den Daten aus dem orthotopen Modell verglichen.

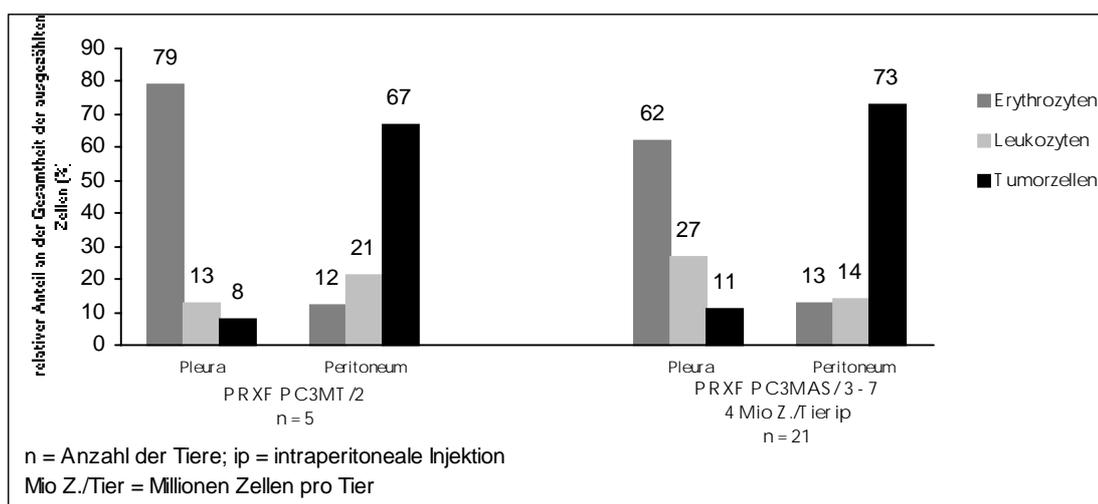


Abb. 17: Relativer, medianer Anteil der Blut- und Tumorzellen in den Pleura- und Peritonealergüssen an der Gesamtheit der ausgezählten Zellen des orthotop implantierten PRXF PC3MT in Passage 2 und des Aszitesmodells PRXF PC3MAS in den Passagen 3 bis 7.

Als wichtigste Beobachtung war sicherlich festzuhalten, daß der Anteil von Blut- gegenüber Tumorzellen in beiden Modellen nahezu identisch war. Im Einzelnen fiel auf, daß der Anteil der Tumorzellen an der Gesamtheit in den Aszitesausstrichen stets höher lag als in den Ausstrichen der Pleuraergüsse. Bei letzteren überwog der Anteil der Erythrozyten den der Leukozyten. Bei Aszites-Austrichen waren beide Blutzellarten nahezu gleich häufig vertreten. Auch eine Änderung der Zellzahl pro Tier hatte keinen Einfluss auf diese Verteilung. In Abbildung 18, S. 84 sind die medianen Anteile der Blut- und Tumorzellen in den Brust- und Bauchhöhlenergüssen in Abhängigkeit von Zahl und Ursprung der injizierten Tumorzellen aufgeführt.

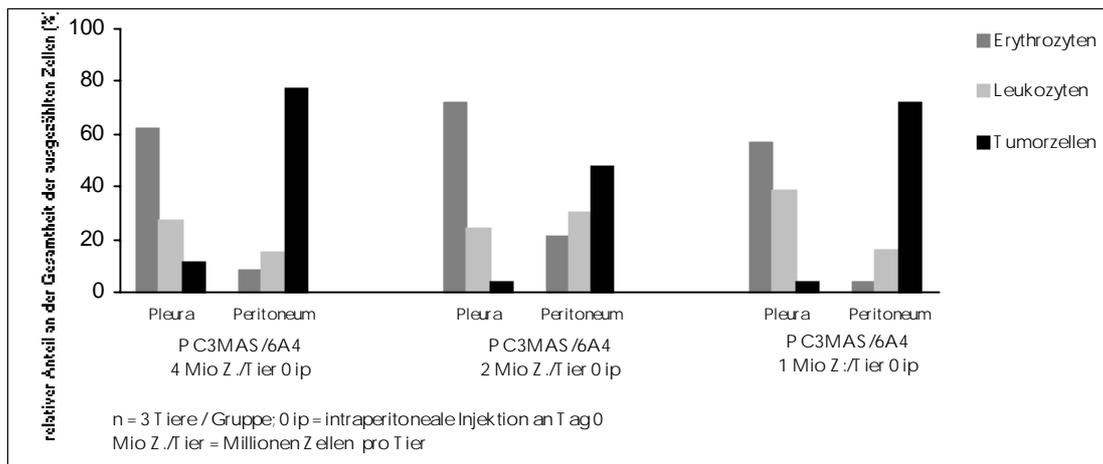


Abb.18 a: Spenderzellen stammen aus Nacktmauspassage.

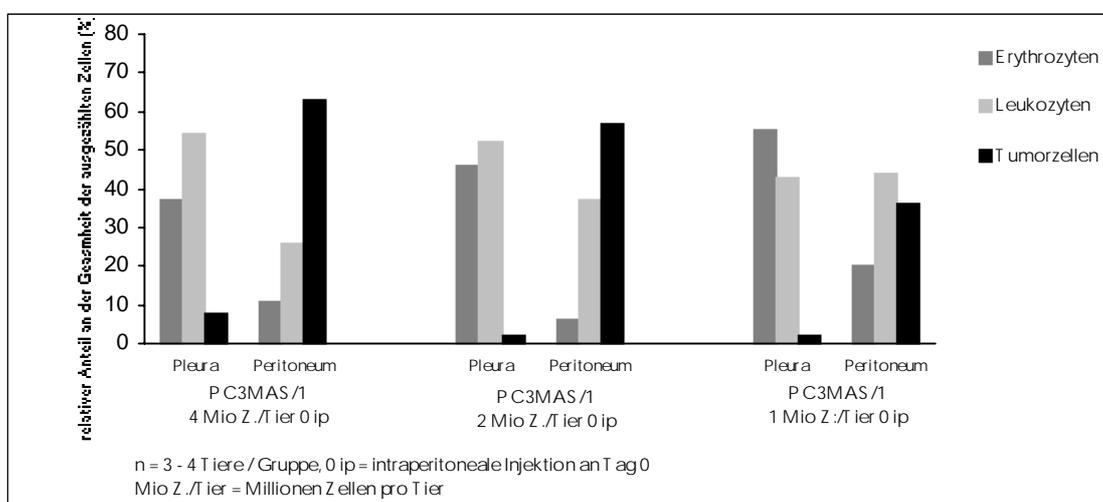


Abb.18 b: Spenderzellen wurden eine Generation *in vitro* gehalten.

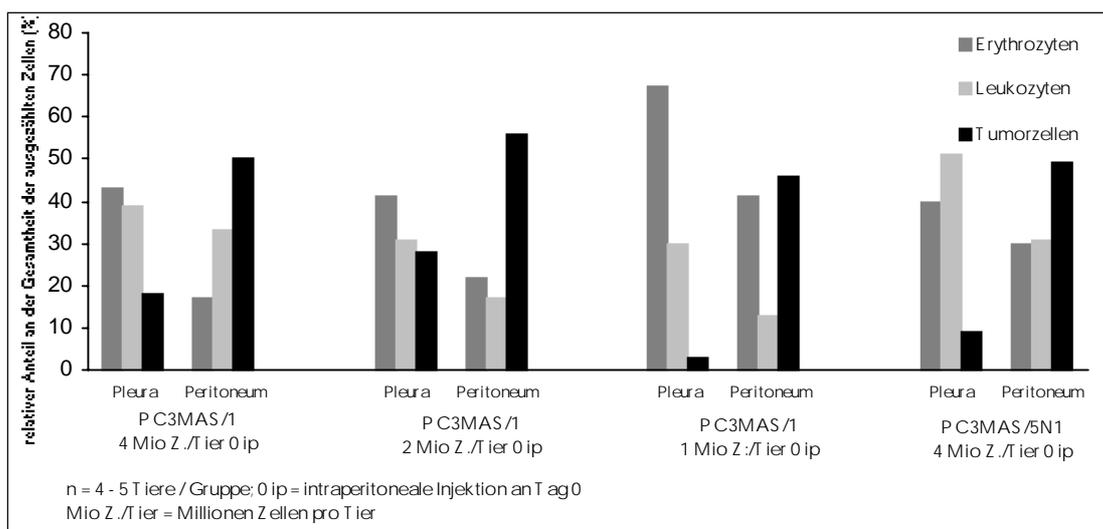


Abb.18 c: Spenderzellen waren tiefgefroren und wurden mit Ausnahme der letzten Gruppe *in vitro* vermehrt.

Abb. 18: Relativer, medianer Anteil der Blut- und Tumorzellen in den Pleura- und Peritonealergüssen an der Gesamtheit der ausgezählten Zellen des Aszitesmodells PRXF PC3MAS in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl.

Im Unterschied zu den zuvor gemachten Beobachtungen fiel auf, daß bei den Ausstrichen der Brusthöhlenergüsse die Verteilung nicht mehr so eindeutig zu Gunsten der Erythrozyten gegenüber den Leukozyten ausfiel. Es gab auch Fälle, in denen mehr Leukozyten als Erythrozyten gezählt worden waren. Diese Beobachtung stand aber in keinem Zusammenhang mit der injizierten Zellzahl oder der Herkunft der Zellen. Der Anteil der Tumorzellen an der Gesamtheit entsprach demjenigen der vorangegangenen Passagen und war unabhängig von injizierter Zellzahl und Vorbehandlung der Zellen. Wie aus Abbildung 19 ersichtlich wird, ergaben sich im Vergleich mit den intraperitoneal injizierten Prostatakarzinomzellen PRCL PC3M folgende Unterschiede: In allen drei Gruppen waren die Anteile an PC3M-Zellen bei den Aszites-Ausstrichen deutlich niedriger als bei den entsprechenden Gruppen des PC3MAS-Modells. In der Gruppe, die 2 Mio Zellen /Tier erhalten hatte, fiel zudem ein erhöhter Anteil an Leukozyten auf. Die Ausstriche der Thoraxergüsse, die nach i.p.-Injektion von PC3M-Zellen auftraten, wurden nicht mitaufgeführt. Da jeweils nur ein Tier pro Gruppe einen solches Krankheitsbild entwickelte, konnten keine aussagekräftigen Daten generiert werden.

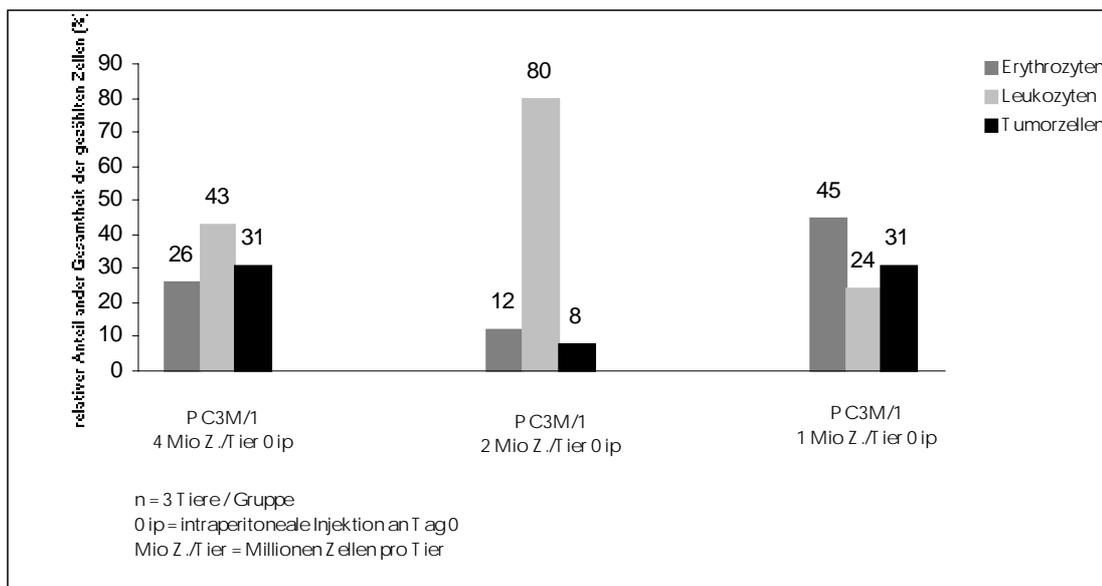


Abb. 19: Relativer, medianer Anteil der Blut- und Tumorzellen in den Pleura- und Peritonealergüssen an der Gesamtheit der ausgezählten Zellen der intraperitoneal wachsenden PC3M-Karzinomzellen in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl.

Bei Betrachtung der Zellkonzentrationen in der Bauchhöhlenflüssigkeit des Aszitesmodells PC3MAS fiel auf, dass dieser Wert über die Passagen hinweg konstant blieb. In der Aszitesflüssigkeit befanden sich im Median $4,36 \times 10^7$ Tumorzellen / ml. Die Flüssigkeit, die in der Brusthöhle auftrat, enthielt im Median $0,28 \times 10^6$ Tumorzellen / ml. Diese Befunde korrelierten mit den Beobachtungen aus den oben beschriebenen Versuchen. Sowohl der relative Anteil als auch die Zellkonzentration pro Milliliter der Tumorzellen lag in der Aszitesflüssigkeit über demjenigen der Thoraxergüsse. Der Einfluss der injizierten Zellzahl auf die Tumorzellkonzentrationen ist in den Tabellen 8 (S. 87) und 9 (S. 89) dargestellt.

Wie in Tabelle 8, S. 87 ersichtlich wird, gab es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der injizierten Zellzahl und der Tumorzellkonzentration in der Brust- oder Bauchhöhlenflüssigkeit. Bei allen drei Versuchen lagen die Tumorzellkonzentrationen im gleichen Größenbereich. In Tabelle 8a, S. 87 fiel auf, daß in den Thoraxergüssen weniger Tumorzellen enthalten waren als in den vergleichbaren Gruppen der anderen Versuche. Eine Tumorzellkonzentration gleicher Größenordnung fand sich nur noch in Tabelle 8c, S. 87 in der Gruppe, die unbehandelte, frisch aufgetaute Zellen erhalten hatte. Im Vergleich mit den anderen Parametern zur Charakterisierung des Aszitesmodells ergab sich kein Zusammenhang mit diesen Beobachtungen. Abgesehen davon war in Tabelle 8a, S. 87 mit absteigender Zellzahl eine absteigende Tendenz der Tumorzellen pro Milliliter zu erkennen.

Tab. 9: Tumorzellkonzentrationen der Peritonealergüsse der intraperitoneal wachsenden PC3M-Karzinomzellen in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl.

Tumorbezeichnung	Anzahl Tiere (n)	injizierte Zellzahl (n/Tier)	mediane Tumorzellkonzentration Peritoneum (n/ml)
PRXF PC3M/1	4	4 Mio	$2,37 \times 10^7$
	4	2 Mio	$0,06 \times 10^7$
	4	1 Mio	$0,33 \times 10^7$

Nach Injektion der Prostatazelllinie PRCL PC3M in die Bauchhöhle ergaben sich am Endpunkt des Versuches Tumorzellkonzentrationen, die nur bei Injektion der maximalen Zellzahl im Größenbereich des PC3MAS-Modelles lagen. Die Schwankungsbreite zwischen den Behandlungsgruppen war größer als diejenige in den Experimente mit PRXF PC3MAS. Dies deckte sich mit den Beobachtungen aus den vorangegangenen Kapiteln: Die injizierte Zelllinie PRCL PC3M löste zwar das gleich Krankheitsbild aus, tat dies aber nicht so ausgeprägt und so regelmäßig, wie das bei PC3MAS-Zellen der Fall war.